

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590706

研究課題名(和文)疼痛慢性期における大脳皮質帯状回からの下行性抑制系調節に対するプリン受容体の役割

研究課題名(英文) A role of purinergic receptor on descending pain modulatory system in anterior cingulate cortex of chronic pain

研究代表者

右田 啓介 (MIGITA, KEISUKE)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10352262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、GABAA受容体の発現を調節するPRIP-1タンパクのノックアウト(PRIP-1<sup>-/-</sup>)マウスを用いて疼痛を評価した。PRIP-1<sup>-/-</sup>マウスでは炎症性および非侵害性刺激による疼痛反応の閾値が低下していた。また、脊髄でのGABAA受容体 $\alpha 2$ サブユニットの発現が増加し、 $\alpha 2$ サブユニットについては脊髄前角および後角部分で発現が有為に減少していた。さらに、脊髄後角の膠様質神経細胞ではGABAA受容体の機能が障害されていた。一方、P2X7受容体に関しては細胞内部位がHSP90と相互作用を持つ可能性が示唆された。PRIP-1やP2X7受容体は新たな疼痛治療の標的因子になり得るかもしれない。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the phenotypes of pain behaviors in phospholipase C-related inactive protein type 1 knockout (PRIP-1<sup>-/-</sup>) mice that play an important role in trafficking to the plasma membrane of GABAA receptor. PRIP-1<sup>-/-</sup> mice showed the hyperalgesic responses induced by formalin and von Frey filaments. In situ hybridization studies of GABAA receptors revealed that expression of gamma 2 subunit mRNA was significantly decreased in the dorsal and ventral horn of spinal cord of PRIP-1<sup>-/-</sup> mice, whereas beta 2 subunit mRNA expression was significantly increased in all areas of the spinal cord. Patch-clamp recordings showed that the function of GABAA receptor in spinal cord was impaired by knockout of PRIP-1. On the other hand, HSP90 regulates the P2X7 current by interacting with the cysteine-rich domain of the cytoplasmic C-terminus. PRIP-1 and P2X7 receptor may become a new drug target for neuropathic pain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：慢性疼痛 中枢神経系 IPSC プリン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

痛みのシグナルは、我々の身体が危険な状態にあることを知らせるために必要不可欠である。これまでに、感覚情報伝達に關与する経路として、脊髄から大脳皮質への入力経路や視索前野から脊髄への下行性抑制経路が示されている。疼痛発症時も末梢からの感覚情報は同様の経路をたどると考えられるが、神経線維の脱落や受容体の発現量の変化あるいはリン酸化の変化により、神経因性疼痛の主症状であるアロディニア（異痛症）が引き起こされていることが明らかになりつつある。末梢からの感覚情報は、脊髄後根神経節を介して脊髄神経に伝達されるが、その伝達にはATPを含む多くの興奮性あるいは抑制性神経伝達物質が關与している。申請者はこれまでに、様々な受容体刺激によるATPの細胞外放出機構について報告している。細胞外に放出されたATPはプリン受容体に結合する。現在、プリン受容体は、イオンチャネル内蔵型のP2X<sub>1-7</sub>受容体とG蛋白共役型のP2Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub>受容体に分類されている。申請者は、特にP2X<sub>2</sub>受容体におけるイオン透過性およびgating機構について検討してきた。その結果、第二膜貫通部分の339および340番目のアミノ酸がカルシウムイオンの透過性を調節し、342から344番目のアミノ酸がgating部位である可能性が高いことを報告した。また、P2X<sub>2</sub>受容体のイオン透過性には、第一膜貫通部分も深く關与していることを見出した。一方、坐骨神経部分結紮（PSNL）モデル動物やストレプトゾトシン（STZ）誘発糖尿病モデル動物における脊髄後根神経節では、プロテインキナーゼCやP2X<sub>2</sub>またはP2X<sub>3</sub>受容体がアロディニアの発症に關与していることを見出した。近年、坐骨神経結紮により脊髄の活性型ミクログリアが増加し、その膜上にはP2X<sub>4</sub>受容体が過剰に発現していることが明らかになった。さらに、P2X<sub>4</sub>受容体は、ミクログリアからBDNF放出を引き起こし、脊髄神経のTrkB受容体を介してKCC2の発現を減少させる。このKCC2の減少は、細胞内のCl<sup>-</sup>イオン濃度を上昇させ、GABA<sub>A</sub>受容体の応答が興奮性に変化することも見出されている。このような脊髄における一連の過程が、アロディニアを引き起こす原因の一つと考えられている。

## 2. 研究の目的

これまでの疼痛研究は、脊髄を中心に研究が行われてきたが、最近のfMRIによる研究では、疼痛患者は様々な痛覚刺激により大脳皮質帯状回や視床などで強い活性を示すことが報告されている。このことから、疼痛の慢性期では高次中枢における調節機構の変化が想定される。しかしながら、神経因性疼痛における上位中枢での調節機構および脳内P2X受容体の關与については明らかになっていない。先頃、神経損傷モデル動物の大脳皮質帯状回II-III層錐体細胞では、シナプスの可塑的变化が生じていることが報告された。申請者は、STZモデル動物とPSNLモデル動物の大脳皮質帯状回II-III層およびV層錐体細胞における自発性抑制性シナプス後電流（sIPSC）および微小抑制性シナプス後電流（mIPSC）の変化について検討し、STZモデル動物のV層錐体細胞ではsIPSCが大きくなっている所見を得た。これらのことから、神経障害では大脳皮質帯状回II-III層における興奮伝達の上昇が、糖尿病ではV層における抑制性伝達の上昇が、それぞれの疼痛維持機構に關与していると考えられる。

そこで本研究では、疼痛に対する中枢神経系の抑制性伝達の重要性について検討を行った。

また、疼痛反応にはミクログリアのP2X<sub>4</sub>受容体の關与が報告されている。ミクログリアにはP2X<sub>7</sub>受容体も発現しているが、受容体特性に不明な点が多い。特に、P2X<sub>7</sub>受容体の細胞内部分は、アミノ酸配列の長さやシステインが多い配列を含んでおり、他のP2X受容体と異なる特徴的な配列を持っている。そこで、システインが多い配列部分の受容体機能について検討を行った。

## 3. 研究の方法

### ・疼痛モデル動物

C57BL/6マウスの坐骨神経1/2~1/3を8-0ナイロン糸で結紮しPSNLマウスを作製した。また、GABA<sub>A</sub>受容体 $\gamma$ 2サブユニットの輸送に關連するPRIP-1をノックアウト（PRIP-1<sup>-/-</sup>）したマウスを用いて以下の実験を行った。

### ・ホルマリンテスト

5%ホルマリン溶液をマウスの後肢足底部に皮下注射した。注射後の、舐めるおよび嘔む

行動の回数を経時的に記録した。

・ホットプレートテスト

マウスを 46、48、50、52、55 のホットプレートにのせ、後肢足底の逃避反応発現までの時間を記録した。

・ von Frey テスト

0.008 g から 2 g まで付加できる von Frey フィラメントを後肢足底部に押し付け、逃避反応の有無を記録し疼痛閾値を評価した。

・ In situ hybridization histochemistry

マウスの腰髄を取り出し、20 $\mu$ m 切片を作製した。GABA<sub>A</sub> 受容体 $\alpha$ 1, $\beta$ 2, $\gamma$ 2 プローブを用いて腰髄でのサブユニットの分布を検討した。

・電気生理学的手法を用いた抑制性神経活動の機能解析

マウスの急性脊髄スライスを作製し、ホールセルパッチクランプ法を用いて膠様質の神経細胞から自発性抑制性シナプス後電流 (sIPSC) を記録した。細胞外灌流液には人工脳脊髄液 (117mM NaCl, 3.6mM KCl, 1.2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 25mM NaHCO<sub>3</sub> and 11mM glucose) 電極内液にはセシウム溶液 (150mM CsCH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>, 5mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EGTA, 10mM HEPES, 3mM Mg(ATP)<sub>2</sub>, 0.4mM NaGTP) を用いた。

・ P2X7 受容体機能解析

HEK293T 細胞に P2X7 受容体遺伝子を導入し、受容体タンパクを強制発現させた。この細胞にパッチクランプ法を適応し、ATP に対する親和性および NMDG<sup>+</sup>の透過性の変化、さらに HSP90 の関与について検討した。

#### 4. 研究成果

・ *PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスに対するホルマリンテスト  
ホルマリンを野生型マウスの後肢足底部に投与すると、投与開始から 15 分までと 15 分から 45 分までの 2 相性の疼痛行動が観察された (Fig. 1)。これまでの研究から、第 1 相はホルマリンによる直接の刺激によるものであり、第 2 相は炎症性の応答といわれている。*PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスは、第 2 相の疼痛反応が有為に増加していた。このことから、PRIP-1 は炎症により引き起こされる疼痛反

応の機序に関与していることが示唆された。

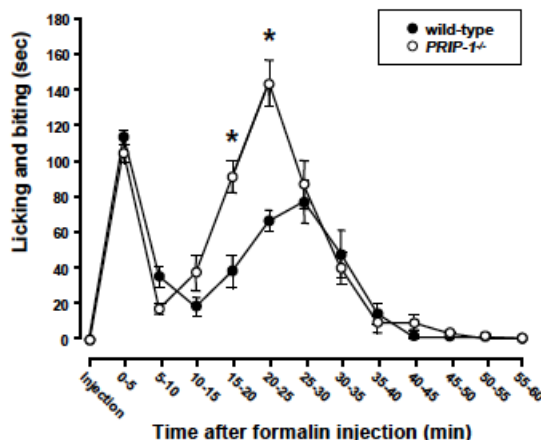


Fig. 1. *PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスにおけるホルマリン疼痛

・ *PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスに対するホットプレートテスト

46 から 55 までホットプレートの温度を変え、熱に対する疼痛反応を観察した (Fig.2)。50 で刺激した際、野生型と比べ *PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスにおける疼痛応答に過敏傾向が観察されたが有為差はなかった。

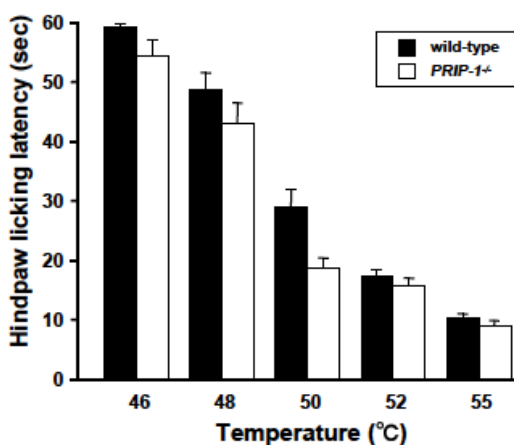


Fig. 2. *PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスの熱刺激に対する疼痛反応

・ *PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスに対する von Frey テスト

野生型マウスに比べ、*PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスは von Frey フィラメントによる刺激に対して疼痛閾値が低下していた (Fig. 3)。次に、それぞれのマウスの坐骨神経を部分結紮した際の疼痛反応を経時的に記録した (Fig. 4)。その結果、野生型マウスおよび *PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスともに結紮側で有為に疼痛閾値の低下が起きていた。

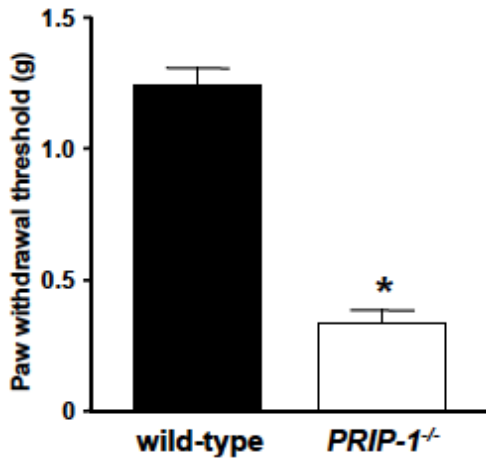


Fig. 3. *PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスにおける非侵害性機械刺激

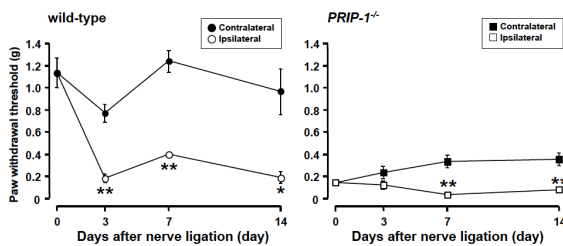


Fig. 4. *PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスの坐骨神経部分結紮による疼痛閾値の変化

・*PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスにおける GABA<sub>A</sub> 受容体  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 2$  サブユニットの脊髄内分布  
 中枢に最も多く分布している GABA<sub>A</sub> 受容体サブユニットの脊髄内発現について検討した (Fig. 5)。 $\alpha 1$  サブユニットの分布は野生型マウスと *PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスの間に違いは認められなかった。 $\beta 2$  サブユニットの発現は *PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスの方が有為に増加していた。また、 $\gamma 2$  サブユニットは、脊髄前角および後角部分で有為に発現が減少していた。

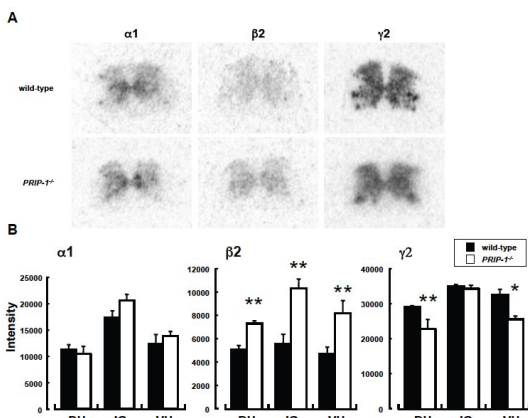


Fig. 5. *PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスの脊髄内 GABA<sub>A</sub> 受容体  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 2$  サブユニットの分布

・*PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスの脊髄後角神経細胞における抑制性応答の変化

野生型マウスおよび *PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスの脊髄後角膠様質の神経細胞から sIPSC を記録した (Fig. 6A)。両マウスの sIPSC は、GABA<sub>A</sub> 受容体拮抗薬のピククリン投与により一部抑制され、さらにグリシン受容体拮抗薬のストリキニーネ投与により完全に抑制された。また、ピククリン投与により tonic 電流が観察されるが、野生型と *PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスの間に有為差はなかった。次に、GABA<sub>A</sub> 受容体の作用薬であるジアゼパムの効果を検討した (Fig. 6B)。その結果、野生型マウスではジアゼパムにより sIPSC の減衰時間の延長がみられたが、*PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスでは減衰時間の延長が消失していた。このことから、*PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスの脊髄神経は GABA<sub>A</sub> 受容体の機能が障害されていることが明らかとなった。*PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスにおける痛覚異常は、脊髄神経の GABA<sub>A</sub> 受容体の機能障害が一因となっている可能性が高い。

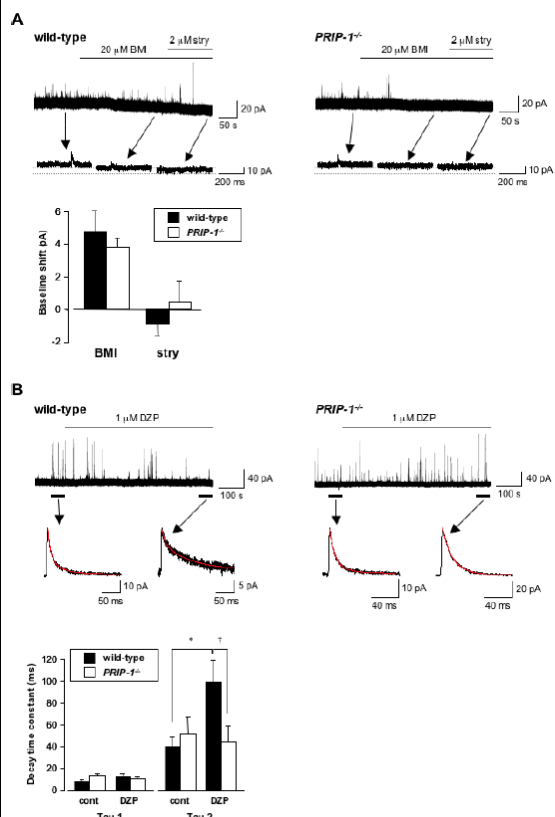


Fig. 6. *PRIP-1*<sup>-/-</sup>マウスの脊髄後角神経細胞における sIPSC

・P2X7 受容体の細胞内部位のチャネル機能に対する役割

P2X7 受容体を発現した細胞に 3 mM ATP を投

与すると内向き電流が記録される(Fig. 7)。そこで、HSP90 の拮抗薬であるゲルダナマイシンを 20 分間投与すると、ATP による内向き電流は大きくなった。次に、P2X7 受容体の C 末側にあるシステインが多い配列を除去したキメラ受容体を作製し同様の実験を行った。その結果ゲルダナマイシンによる ATP 電流の増加は消失した。このことから、P2X7 受容体の細胞内部分にあるシステインが多い部分は HSP90 と相互作用がある可能性が示唆された。この部位を抑制することで、ミクログリアの活性が抑制され、最終的には疼痛を抑制することが出来るかもしれない。

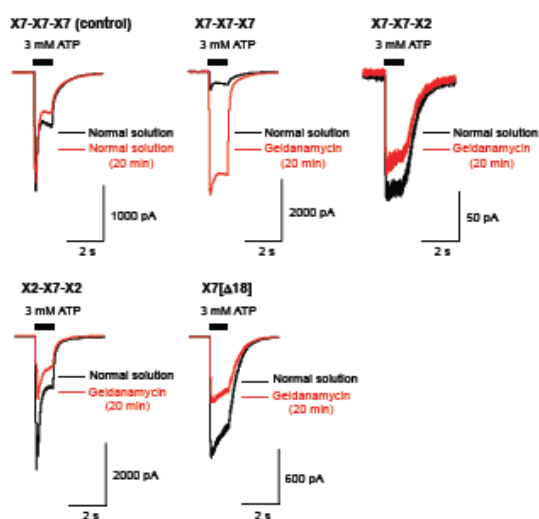


Fig. 7. P2X7 受容体に対するゲルダナマイシンの影響

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

「1~7は査読あり」

1. Tomonoh Y, Deshimaru M, Araki K, Miyazaki Y, Arasaki T, Tanaka Y, Kitamura H, Mori F, Wakabayashi K, Yamashita S, Saito R, Itoh M, Uchida T, Yamada J, Migita K, Ueno S, Kitaura H, Kakita A, Lossin C, Takano Y, Hirose S. The kick-in system: a novel rapid knock-in strategy. PLoS One. 2014 9:e88549, DOI: 10.1371

2. Nishijima H, Suzuki S, Kon T, Funamizu Y, Ueno T, Haga R, Suzuki C, Arai A, Kimura

T, Suzuki C, Meguro R, Miki Y, Yamada J, Migita K, Ichinohe N, Ueno S, Baba M, Tomiyama M. Morphologic changes of dendritic spines of striatal neurons in the levodopa-induced dyskinesia model. Mov Disord. 2014 29:336-343, DOI: 10.1002

3. Yamada J, Zhu G, Okada M, Hirose S, Yoshida S, Shiba Y, Migita K, Mori F, Sugawara T, Chen L, Liu F, Yoshida S, Ueno S, Kaneko S. A novel prophylactic effect of furosemide treatment on autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE). Epilepsy Res. 2013 107:127-137, DOI: 10.1016

4. Kitayama T, Morita K, Sultana R, Kikushige N, Migita K, Ueno S, Hirata M, Kanematsu T. Phospholipase C-related but catalytically inactive protein modulates pain behavior in a neuropathic pain model in mice. Molecular Pain 2013 9:23, DOI: 10.1186

5. Nishijima H, Arai A, Kimura T, Mori F, Yamada J, Migita K, Wakabayashi K, Baba M, Ueno S, Tomiyama M. Drebrin immunoreactivity in the striatum of a rat model of levodopa-induced dyskinesia. Neuropathology. 2013 33:391-396, DOI: 10.1111

6. Migita K, Yamada J, Nikaido Y, Shi X, Kaneko S, Hirose S, Ueno S. Properties of a Novel GABA(A) Receptor (2) Subunit Mutation Associated With Seizures. J Pharmacol Sci. 2013 121(1):84-87

7. Zhu G, Yoshida S, Migita K, Yamada J, Mori F, Tomiyama M, Wakabayashi K, Kanematsu T, Hirata M, Kaneko S, Ueno S, Okada M. Dysfunction of extrasynaptic GABAergic transmission in phospholipase C-related, but catalytically inactive protein 1 knockout mice is associated with an epilepsy phenotype. J Pharmacol Exp Ther. 2012 340(3):520-528, DOI: 10.1124

8. Migita K, Tomiyama M, Yamada J, Fukuzawa M, Kanematsu T, Hirata M, Ueno S.

Phenotypes of pain behavior in phospholipase C-related but catalytically inactive protein type 1 knockout mice. Mol Pain. 2011 7:79, DOI: 10.1186

〔学会発表〕(計 6件)

1. The intracellular domain of the P2X7 receptor subunit participates in current facilitation and receptor kinetics  
2013年, 11月12日, San Diego, USA  
Neuroscience2013

Keisuke Migita, Junko Yamada, Yoshikazu Nikaido, Shinya Ueno

2. P2X2受容体のチャネル機能に対する細胞内ドメインの役割

2013年, 6月20日, 京都  
第36回日本神経科学大会

Keisuke Migita, Junko Yamada, Yoshikazu Nikaido, Shinya Ueno

3. P2X7受容体における細胞内ドメインの機能的特徴

2013年, 3月23日, 福岡  
第86回薬理学会年会

Keisuke Migita, Junko Yamada, Yoshikazu Nikaido, Shinya Ueno

4. GABA<sub>A</sub> receptor via phospholipase C-related but catalytically inactive protein type 1 in the spinal cord participate in abnormal pain sensation  
2012年, 10月13日, New Orleans, USA  
Neuroscience2012

Keisuke Migita, Masahiko Tomiyama, Junko Yamada, Yoshikazu Nikaido, Takashi Kanematsu, Masato Hirata, Shinya Ueno

5. PRIP-1 ノックアウトマウスの痛覚異常は脊髄における GABA 作動性シナプス伝達異常が関与している

2012年, 9月19日, 名古屋  
第35回日本神経科学大会

Keisuke Migita, Masahiko Tomiyama, Junko

Yamada, Yoshikazu Nikaido, Takashi Kanematsu, Masato Hirata, Shinya Ueno

6. てんかん患者由来GABA<sub>A</sub>受容体 $\alpha$ 2サブユニット(N40S)変異受容体の薬理学的特性

2012年, 3月16日, 京都  
第85回薬理学会年会

Keisuke Migita, Junko Yamada, XiuYu Shi, Sunao Kaneko, Shinichi Hirose, Shinya Ueno

〔図書〕(計 1件)

右田啓介, 山田順子, 上野伸哉

可塑性と臨床: 痛み, 中外医学社

Clinical Neuroscience 2011 29(7):836-838.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~neurophysiol/staff.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

右田 啓介(MIGITA KEISUKE)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 10352262

(2)研究分担者

上野 伸哉(UENO SHINYA)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 00312158

(3)連携研究者

本多 健治(HONDA KENJI)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号: 60140761