

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592306

研究課題名(和文)mTORを介した末梢神経プロテオームの変化による疼痛発症のメカニズム解析

研究課題名(英文)Analysis of pain hypersensitivity due to the mTOR mediated proteome alteration in the primary afferent neurons.

研究代表者

天谷 文昌 (Amaya, Fumimasa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60347466

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文): タンパク合成に関与するmTORの知覚神経における機能を調査した。リン酸化mTOR (pmTOR)はラット一次知覚神経に発現し、足底切開後に発現量は増加した。mTOR阻害剤ラパマイシンは足底切開後の痛覚過敏を減弱させた。足底にインスリン様成長因子(IGF)を投与するとpmTORは増加、IGF阻害剤により足底切開後のpmTOR増加は抑制された。足底切開モデルではVGLUT3の発現が増加し、ラパマイシンによりその発現は抑制された。IGFによりVGLUT3の発現は増加した。足底切開後に増加したIGFがmTORのリン酸化を介してVGLUT-3の発現を増加させ、痛覚過敏の成立させることが示された。

研究成果の概要(英文): Phosphorylated mTOR (pmTOR) expression was detected in the primary afferent neurons in the dorsal root ganglion (DRG). Expression of pmTOR increased after plantar incision. mTOR inhibitor rapamycin reduced plantar incision-induced hyperalgesia. Intraplantar injection of IGF increased pmTOR expression and IGF inhibitor inhibited plantar incision-induced pmTOR induction. VGLUT3 expression was increased in the DRG after the plantar incision and rapamycin prevented incision-induced VGLUT-3 increase. IGF injection into the paw increased VGLUT-3 expression in the DRG. These results demonstrated that increased local production of IGF facilitates mTOR phosphorylation and increase VGLUT3 expression in the DRG neurons, leading pain hypersensitivity after the tissue injury.

研究分野：麻酔科学

キーワード：痛覚過敏 mTOR IGF 一次知覚神経 組織損傷

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛は難治性であり、有効な治療法の確立が必要とされる。慢性疼痛の発症には知覚神経感作と呼ばれる現象が関与しているが、これは、炎症や組織損傷によって合成された成長因子など生理活性物質が、その組織に投射する知覚神経に働きその機能を亢進させることによって生じる。

インスリン様成長因子(IGF)は組織損傷後の末梢組織で合成され、創傷組織の修復する働きを持つ。われわれは、1) IGF 受容体が一次知覚神経に存在すること、2) 足底に投与した IGF が痛覚過敏を引き起こすこと、3) IGF 阻害薬が組織損傷後の痛覚過敏を抑制することを示し、組織由来の IGF が一次知覚神経を感作して痛覚過敏を発症していることを明らかにした (Miura M. et al, Pain)。

IGF は mTOR と呼ばれる細胞内伝達物質を活性化させることでタンパク合成を調節する働きを持つ。mTOR とは mammalian target of rapamaicin の略で、抗生物質ラパマイシンの標的となることにちなんで命名された物質である。Rapamaicin はさまざまな神経活動に影響することが動物実験により確認されており、mTOR が正常な痛覚伝達に何らかの役割を果たしている可能性は高い。しかしながら、mTOR が一次知覚神経にどのような影響を与えているのか十分には検討されていない。

2. 研究の目的

(1) 一次知覚神経における mTOR の発現解析

一次知覚神経における mTOR の発現分布を形態学的に詳細に調査する。

(2) mTOR 阻害剤の鎮痛作用の検討

ラパマイシンをはじめとした mTOR 阻害剤は現在数種類が製造・販売されている。これら mTOR 阻害剤をラットに投与して行動解析を行い、mTOR 活性が痛覚閾値にどのような影響をあたえるのか調査する。

(3) 疼痛時の mTOR の発現と機能変化の解析

ラットに慢性疼痛モデルを作成し、一次知覚神経における mTOR の発現を形態学的に同定、発現分布にどのような変化が生じるのか解析する。同時に mTOR 活性を測定し、慢性疼痛状態において mTOR の活性がどのように変化するのか検討する。

(4) mTOR 阻害剤による疼痛緩和効果の検討

慢性疼痛モデルを作成したラットに mTOR 阻害剤を投与し、行動解析を行うことで mTOR 阻害剤の疼痛緩和効果について検討する。

(5) mTOR 活性調節に関わる細胞内情報伝達系の同定

IGF は IGF 受容体を介して AKT をリン酸化させることで mTOR を活性化させると考えられている。一次知覚神経においてこの系が mTOR を活性化させているのか否かを検討する。

3. 研究の方法

(1) 動物の処置と行動解析

雄性 SD ラット(200-250g)を実験に用いた。イソフルラン麻酔下に足底を切開するモデル(足底切開モデル)を作成した。足底切開モデルラットおよび未処置ラットに対して

von Frey filament により機械刺激に対する痛覚閾値を測定し、radiant heat 刺激により熱刺激に対する逃避潜時を測定した。mTOR 阻害薬であるラパマイシン(1.5-15mg/Kg)を腹腔内投与し、足底切開後の痛覚閾値に対する影響を調査した。

(2) 免疫組織化学法

足底切開モデルラットならびに未処置ラットを深麻酔下に 4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定し、後根神経節(Dorsal root ganglion: DRG)及び脊髄を摘出した。ウェスタンブロットング用には深麻酔下のラット DRG を摘出しタンパクの抽出を行った。また、足底切開モデル作成時に IGF 阻害剤 PPP を投与したラットからも同様に DRG を摘出した。

DRG と脊髄から組織切片を作成した。リン酸化 mTOR (p-mTOR)、vesicular glutamate transporter-3 (VGLUT-3)、TRPV1 の発現を免疫組織化学法により同定した。p-mTOR 陽性細胞の分布を明らかにするため、NF200 (有髄一次知覚神経のマーカー)、IB4 (無髄一次知覚神経のマーカー)、CGRP (無髄一次知覚神経のマーカー) と p-mTOR の二重染色を行った。

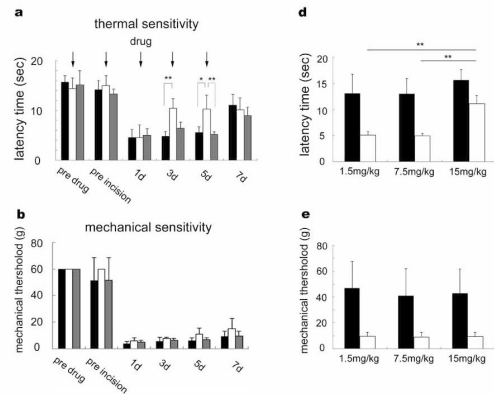
ウェスタンブロットングでは VGLUT-3 および TRPV1 に対する抗体を用いて両者の発現量を定量した。

4. 研究成果

(1) 足底切開後の痛覚過敏に対するラパマイシンの効果

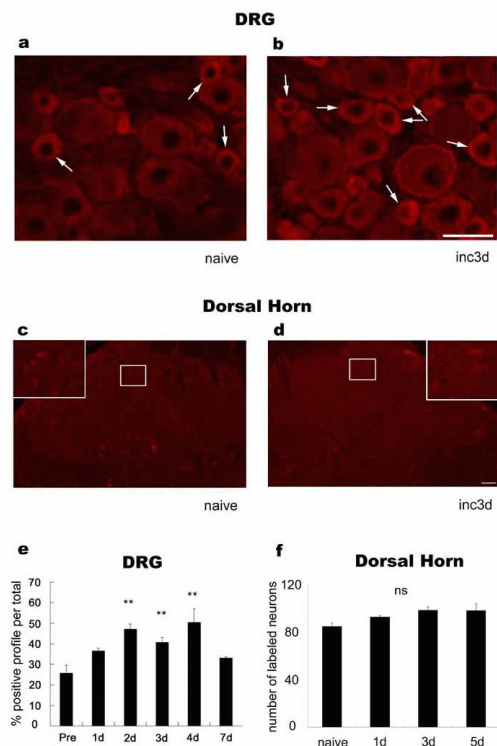
足底切開モデルの作成により、処置後 1-5 日間の間、熱刺激に対する反応潜時の短縮と機械刺激に対する痛覚閾値の低下が認められ、

痛覚過敏が生じることが示された。ラパマイシンの投与により、処置後 3-5 日の熱痛覚過敏は抑制されたが、機械痛覚過敏は変化しなかった。



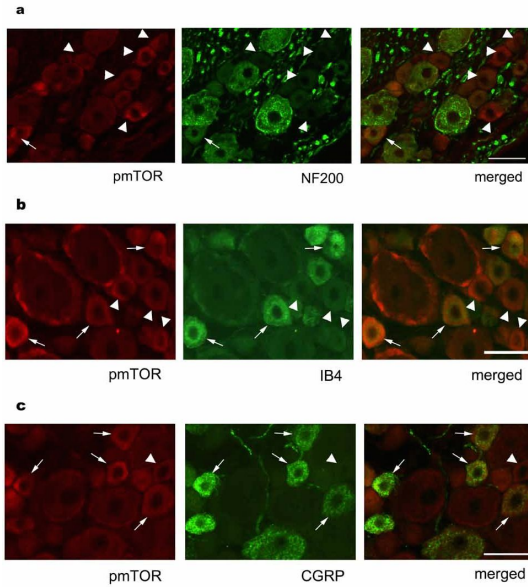
(2) DRG における p-mTOR の発現

DRG および脊髄の神経細胞において、免疫組織化学法により p-mTOR の発現が確認された。DRG においては、p-mTOR 陽性細胞数は足底切開モデル作成 2-4 日後に増加した。脊髄における p-mTOR 発現に変動は認めなかった。



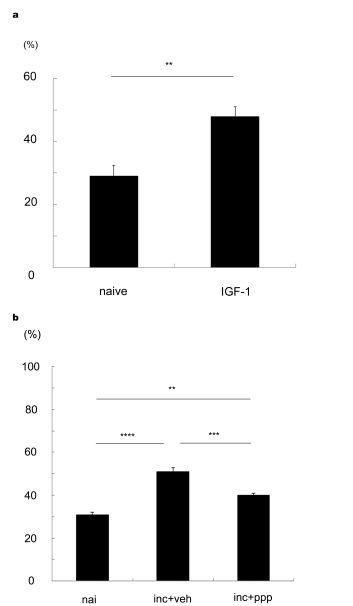
(3) p-mTOR 陽性細胞の分布

二重染色の結果、p-mTOR 陽性細胞の多くは IB4 または CGRP 陽性な無髄一次知覚神経に多く発現し、NF200 陽性な有髄一次知覚神経における発現は少なかった。



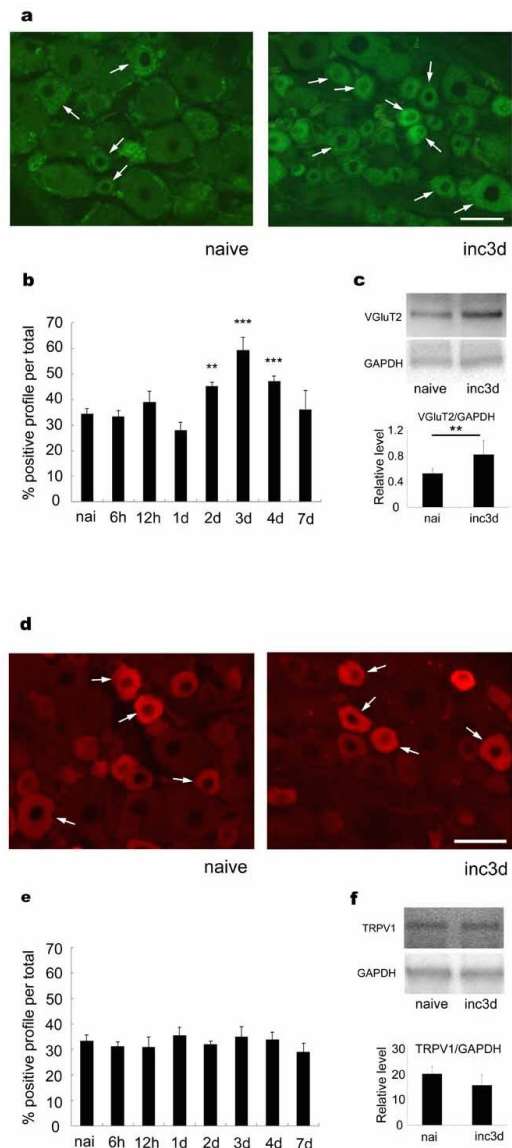
(4) DRG における p-mTOR 発現に対する IGF の影響

DRG における VGLUT-3 の発現は IGF の足底注入により増加した。また、足底切開モデル後に増加した VGLUT-3 の発現は IGF 阻害剤 PPP の投与によって抑制された。



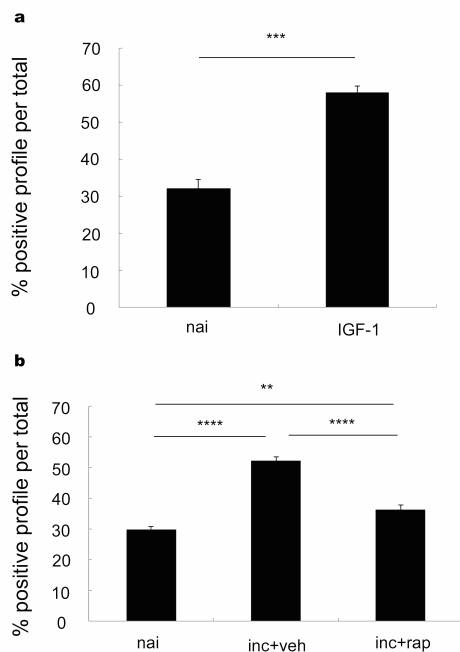
(5) 足底切開モデルにおける TRPV1 および VGLUT-3 の発現変化

足底切開モデルにおいて、VGLUT-3 の発現量は増加したが、TRPV1 の発現量に変化はなかった。



(6) 足底切開モデルにおける VGLUT-3 発現増加に対するラパマイシンの影響

DRG における VGLUT-3 の発現は足底への IGF 投与により増加した。また、足底切開後に認められた VGLUT-3 陽性ニューロンの増加はラパマイシンの投与により有意に抑制された。



これらの結果から、足底切開モデルでは、組織損傷によって増加した IGF が mTOR のリン酸化を通じて VGLUT-3 の発現増加をうながし、熱性痛覚過敏の維持に関与することが示された。

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 5 件)

Kohno T, Kimura M, Sasaki M, Obata H, Amaya F, Saito S. Milnacipran inhibits glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptor activity in spinal dorsal horn

neurons. Mol Pain. 8:45, (2012). 査読有

Mizukoshi K, Sasaki M, Izumi Y, Miura M, Watanabe M, Amaya F. Activation of p38 MAP kinase in the DRG contributes to pain hypersensitivity after plantar incision. Neuroscience. 234:77-87, (2013). 査読有

Amaya F, Izumi Y, Matsuda M and Sasaki M. Tissue injury and related mediators of pain exacerbation. Current Neuropharmacology. (2013) 11: 592-597,. 査読有

Sasaki M, Hashimoto S, Sawa T, Amaya F. Tumor necrosis factor-alpha induces expression of C/EBP-beta in primary afferent neurons following nerve injury. Neuroscience. (2014) 279: 1-9. 査読有

Norisada J, Hirata Y, Amaya F, Kiuchi K, Oh-hashii K. A sensitive assay for the biosynthesis and secretion of MANF using NanoLuc activity. Biochem Biophys Res Commun. (2014) 449:483-9. 査読有

[学会発表](計 3 件)

天谷文昌. 手術後痛は本当に取るべきなのか? 創傷治癒と痛み: 創傷部の末梢神経に何が起こるか? 第 60 回日本麻酔科学会学術集会(札幌)(2013).

Y. Izumi, Sasaki M, Amaya F. Phosphorylation of mTOR maintains pain hypersensitivity after the tissue injury.

Annual meeting of Society for
Neuroscience 2014 (Washington DC)

Matsuda M, Yamakita S, Yamaguchi Y,
Izumi Y Amaya F. Nerve injury increases
cAMP sensor Epac1 and Epac2 in the
distinct subgroups of DRG neurons.

Annual meeting of Society for
Neuroscience 2014 (Washington DC)

〔図書〕(計 3 件)

天谷文昌, 和泉勇太. 手術後鎮痛のすべて.
分子から見た手術後痛のメカニズム :
pp22-25, (2013) 文光堂 (東京).

天谷文昌. 痛み診療キーポイント. 痛みの
研究手法. ノックアウトマウス : p16, (2014)
文光堂 (東京).

天谷文昌. 痛み診療キーポイント. Na チャ
ンネル : p27, (2014) 文光堂 (東京).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

天谷 文昌 (AMAYA, Fumimasa)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号 : 6 0 3 4 7 4 6 6

(2)研究分担者

佐和 貞治 (SAWA, Teiji)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号 : 1 0 2 0 6 0 1 3