

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790647

研究課題名(和文) 疼痛における生体膜糖脂質の機能と鎮痛への応用のための基礎的研究

研究課題名(英文) The roles of glycolipids in nociception and analgesia.

研究代表者

渡辺 俊 (Watanabe, Shun)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：50415337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ガングリオシドGT1bをマウスの足底皮下に投与すると疼痛を引き起こし、さらに低濃度ホルマリンによる疼痛を増強する。GT1bによる痛覚過敏では皮下におけるグルタミン酸の細胞外濃度の上昇と、グルタミン酸受容体の活性化が重要である。これらを踏まえ、GT1bによる痛覚過敏がホルマリン以外の疼痛刺激により引き起こされるか検討を行い、機械刺激にも効果を持つことを示した。また、脊髄後根節神経細胞由来細胞において、GT1bは上清中のグルタミン酸濃度を上昇させる効果を有していた。以上から、GT1bは疼痛刺激に対し特異性を持ち、神経由来細胞においても個体と同様にグルタミン酸濃度調節に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ganglioside GT1b produced nociceptive behavior and hyperalgesia in low-dose formalin tests. Antagonist studies and microdialysis in plantar tissues suggested that the subcutaneous glutamate levels and glutamate receptor activation play important roles in GT1b induced hyperalgesia. According to these results, we investigated whether GT1b produces heat/cold hyperalgesia, or mechanical allodynia. GT1b induced mechanical allodynia but not heat/cold hyperalgesia. In addition, GT1b increase glutamate levels in dorsal root ganglia neuron derived cell culture supernatants. Taken together, these findings suggest the hyperalgesic effects of GT1b is dependent on nociceptive stimuli and GT1b increase extracellular glutamate levels in cell cultures as well as subcutaneous tissues of mice.

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：疼痛 ガングリオシド 糖脂質 スフィンゴ糖脂質

1. 研究開始当初の背景

生体膜はリン脂質、糖脂質、コレステロールなどから構成されるが、この中で、糖脂質は脂質部分に親水性の頭部として何種類かの単糖が結合した構造をとる。糖脂質の中でも、ガングリオシドと呼ばれる一群の糖脂質はシアル酸を含有し、特に神経系組織に多量に存在することから神経細胞における重要性が指摘されてきた。その生合成経路に従って、o-、a-、b-、c-シリーズなどと分類されている(図 1)。

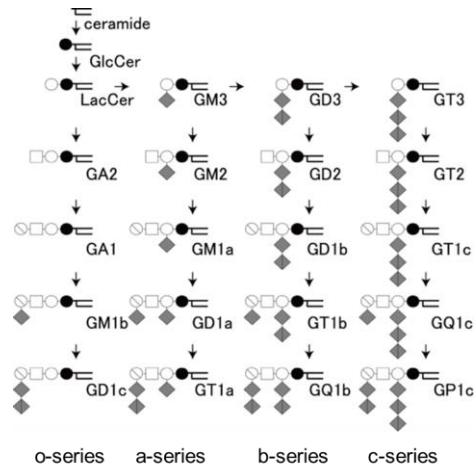


図 1 ガングリオシドの生合成経路

これらガングリオシドの生理的な機能であるが、近年明らかになってきた重要なものとしてラフト形成能力が挙げられる。ラフトは、ガングリオシドなどスフィンゴ脂質がコレステロールとともに微小領域を形成する生体膜上の構造で、膜タンパク質の活性や局在を制御すると考えられており、生体膜の存在様式として流動モザイクモデルをさらに発展させたものとなる。疼痛においても、細胞膜上のタンパク質は重要な機能を担い、自由神経終末に種々の細胞膜受容体が存在し、感覚神経を興奮させることが明らかとなっている。しかしながら、疼痛におけるガングリオシドの機能についての研究は極めて少ない。このことから、申請者はガングリオシドと疼痛の発生の関連性を想定した。そこで、まず末梢におけるガングリオシドの機能を検討するために、マウス足底皮下に b-シリーズガングリオシドである GT1b を投与し、疼痛関連行動である足なめ行動 (licking) の長さを測定することで痛みの強さを評価した。その結果、ガングリオシド GT1b は疼痛を生じ、低濃度ホルマリンに対する疼痛増強作用も有していた。一方で、a-シリーズガングリオシドによる発痛作用や疼痛増強作用はほとんど認められなかった。また、このガングリオシドによる疼痛増強機構について検討し、グルタミン酸受容体のアンタゴニスト、グルタミン酸分解酵素の投与によって GT1b の疼痛増強作用が消失したこと、さらに、足底皮下内のグルタミン酸濃度が GT1b 投与により上昇することが明らかとなった。以上か

ら、GT1b はグルタミン酸の蓄積を介し、グルタミン酸受容体を活性化させることで疼痛増強を引き起こすことが示唆された。さらに、ガングリオシドがシアル酸を含むことから、シアル酸分解酵素をマウス足底に投与したところ、高濃度のホルマリンによる疼痛が減弱されることから、内在性のガングリオシドも疼痛に関与していることが示唆された(図 2)。

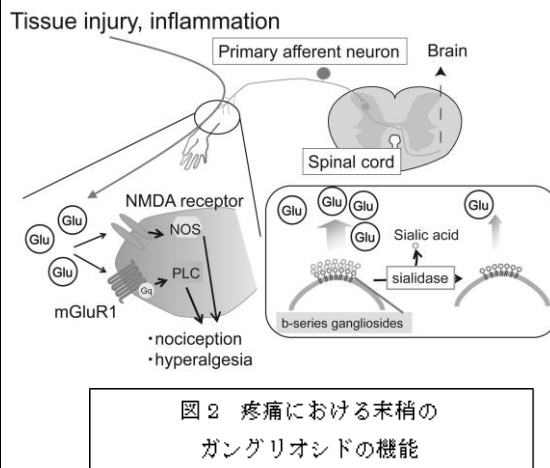


図 2 疼痛における末梢のガングリオシドの機能

2. 研究の目的

疼痛は多様な刺激により引き起こされるため、ホルマリンに対するガングリオシドの効果を検討したのみでは不足である。そこで、ホルマリン以外のどのような疼痛刺激に対してガングリオシド GT1b が関与しているか検討を行った。

また、炎症性疼痛や神経障害性疼痛などの慢性疼痛においては、痛覚過敏やアロディニアといった、痛みが増強する、あるいは痛みを起こさない刺激に対しても痛みが引き起こされる現象がみられる。そのため、疼痛の増強を引き起こすガングリオシドが慢性疼痛モデルマウスにおいても変動する可能性が考えられるため、検討することとした。さらに、GT1b がどのような分子メカニズムによりグルタミン酸濃度を調節しうるか不明であるため、脊髄後根神経節神経細胞由来の培養細胞株を用いて GT1b 投与によりグルタミン酸濃度が変動しうるか検討を行った。

3. 研究の方法

日本クレアより購入した ICR マウスオス 5-6 週齢を用いた。疼痛の測定法は、ホルマリン試験、ホットプレート試験、コールドプレート試験、von Frey filament 試験 (up-down 法による) を使用した。いずれも、GT1b を後肢足底皮下に投与後 40 分において測定を行った。

慢性疼痛モデルとしては、同マウスの後肢足底皮下への完全フロイントアジュバントによる炎症性疼痛モデルを作製し、脊髄、坐骨神経、足底皮膚 (投与部位および対側側) を採取した後、糖脂質を抽出、精製し、TLC により解析を行った。

細胞を用いた解析としては、脊髄後根神経節神経細胞由来の細胞株である F11 細胞を分化させたものを用い、グルタミン酸濃度が GT1b によりどのように変化するか検討した。方法としては、培養上清中のアミノ酸を OPA ラベル化した後、HPLC により蛍光測定を行った。

4. 研究成果

マウスを用い、GT1b の足底皮下への投与により各種疼痛刺激に対する疼痛行動がどのように変化するか検討を行った。その結果、下表に示すように、GT1b は機械的刺激とホルマリンのみに影響を与え、どちらも過敏化させる効果が認められた。しかしながら、熱刺激、あるいは冷刺激においては影響を及ぼさないようである。但し、今回用いた温度は熱、冷刺激ともに一点のみであるため、さらに多様な温度における検討を行う必要がある。特に冷刺激については自発的な疼痛が生じる温度域を用いたため、疼痛行動が生じないより温和な条件においても検討を行う必要がある。

表 1 ガングリオシドによる痛覚過敏効果

stimulus		vehicle	GT1b	
0.05 % formalin	licking time (seconds)	30.8 ± 2.8	57.4 ± 4.4	**
	50% threshold (g)	0.627 ± 0.13	0.140 ± 0.04	**
52 °C hot plate	latency (seconds)	22.9 ± 3.4	20.1 ± 2.9	
	latency (seconds)	81.3 ± 8.9	76.3 ± 11.6	

次に、炎症性疼痛モデルを作製し、糖脂質抽出後、部分精製を行い、TLC により検討を行った。現在どのような糖脂質が変化しているかについて解析中である。

また、ガングリオシドによる細胞外グルタミン酸濃度調節メカニズムの検討を行うために、細胞モデルにおける実験系を検討した。細胞としては脊髄後根神経節神経細胞由来の細胞株である F11 細胞を用いた。この細胞を神経突起伸長させた後、培地交換後 GT1b 処理を行った。その結果、GT1b によりグルタミン酸濃度の上昇が認められた (図 3)。

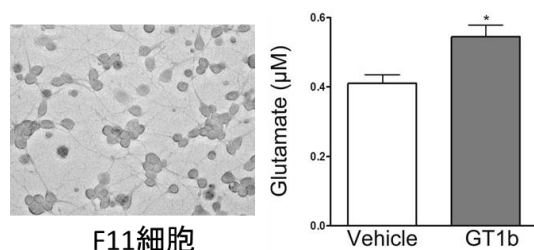


図 3 ガングリオシドによる DRG 由来細胞における細胞外グルタミン酸濃度の変化

以上からガングリオシド GT1b により引き起こされる痛覚過敏においては、ある程度の刺激特異性が認められることが明らかとなった。特に、熱や冷刺激といった温度変化に対する疼痛においては GT1b が関与してい

ない可能性が考えられる。また、慢性疼痛における糖脂質変化については、今後さらに解析を進め、同様にグルタミン酸分泌などの機構に關与しているか検討を行う予定である。また、培養細胞におけるグルタミン酸濃度変化についても、その分子メカニズムを解析し、マウスの疼痛モデルにおいて同様な分子機構が關与していることを検討しておくことを予定している。

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 1 件)

Watanabe S, Higashi H, Ogawa H, Takamori K, Iwabuchi K. Involvement of ganglioside GT1b in glutamate release from neuroblastoma cells. *Neurosci Lett.* 517(2), 140-3, 2012 年 査読有り
doi: 10.1016/j.neulet.2012.04.049

[学会発表] (計 7 件)

- ① Watanabe S, Higashi H, Tanabe M. The hyperalgesic effects of ganglioside. 第 87 回 日本薬理学会年会 2014 年 3 月 19~21 日 仙台
- ② Watanabe S, Higashi H, Tanabe M. The Roles of Glycosphingolipids on Regulation of Peripheral Glutamate Levels during Nociception. The 5th Asian Pain Symposium. 2013 年 12 月 18~20 日 岡崎
- ③ Watanabe S, Tanabe M, Higashi H. The roles of b-series gangliosides in nociceptive responses. 7th International Ceramide Conference. 2013 年 10 月 20~24 日 Montauk, NY, U. S. A.
- ④ 渡辺 俊, 東秀好, 高森建二, 岩渕和久 疼痛における末梢グルタミン酸を介したガングリオシドの機能。第 54 回 日本脂質生化学会 2012 年 6 月 7~8 日 福岡
- ⑤ 渡辺 俊, 東 秀好, 高森 建二, 岩渕和久. Intraplantar injection of gangliosides produces nociceptive behavior via a glutamate signaling mechanism. 第 85 回日本薬理学会年会

2012年3月14～16日 京都

- ⑥ 渡辺 俊、岩渕 和久、高森建二、丹野孝一、東 秀好. 疼痛行動におけるグリオシドの機能 第84回日本生化学会大会 2011年9月21～24日 京都
- ⑦ Watanabe S, Tan-no K, Tadano T, Higashi H. Intraplantar injection of gangliosides produces nociceptive behavior and hyperalgesia. 第31回内藤コンファレンス 2011年9月13～16日 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 俊 (WATANABE, Shun)
北里大学・薬学部 助教
研究者番号：50415337