

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790651

研究課題名（和文）慢性疼痛の発生・増強機構の解明を目的とした新規機能性分子の解析

研究課題名（英文）The analysis of novel neuropathic pain related protein in the mechanism of chronic pain.

研究代表者

片野 泰代 (KATANO TAYO)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：60469244

研究成果の概要（和文）：プロテオミクス解析にて同定した神経障害性疼痛の関連分子、Neuropathic Pain Related Protein-A, -B (NPRP-A, NPRP-B) の役割を解明するために解析を行った。NPRP-Bは、脊髄後角をはじめ中枢神経系で発現し、粗シナプス画分で濃縮して存在することを明らかにした。またin vivoでリン酸化修飾を受けている事を明らかにした。さらにNPRP-A, -Bのfloxed型マウスを作出、Creマウスとの交配によってKOマウスを作出した。NPRP-B ノックアウトマウスではアロディニアの発症が有意に抑制された。

研究成果の概要（英文）：To clarify the role and functions of Neuropathic Pain Related Protein-A, -B (NPRP-A, NPRP-B), we analyzed biological properties and pain responses after spared nerve injury (SNI) of NPRP-B using specific antibody and knock-out mice. NPRP-B is highly expressed in the central nervous system including spinal dorsal horn and especially enriched in synaptosomal fraction. NPRP-B exists as phosphorylated protein. In NPRP-B knock-out mice, mechanical allodynia is significantly reduced after SNI compared with that in wild-type mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：疼痛の発生・増強機構、プロテオミクス、コンディショナル KO

## 1. 研究開始当初の背景

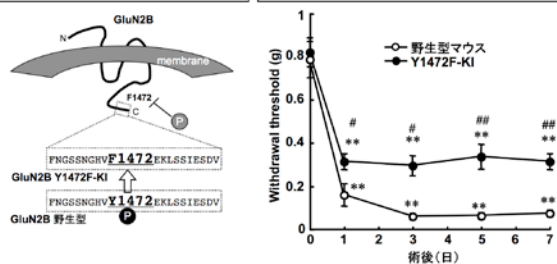
慢性疼痛は、帯状疱疹後神経痛による神経障害性疼痛、関節リウマチによる炎症性疼痛、むち打ち、腰痛症を含む筋・筋膜性疼痛といった全く異なる病態に由来して発症する。これら疾患の原因は全く異なるものの、全ての患者で疼痛を主訴、愁訴とする点で共通する。申請者は、これまでに明らかにしてきた知見

から、全ての疼痛に共通の新たな機能性分子を探索、同定し、本分子による慢性疼痛の発生・維持機構を明らかにするために、特に脊髄後角に焦点を当て解析する。

本解析内で対象組織としている脊髄後角は、末梢組織で生じた侵害刺激を伝える1次求心性線維と、その刺激を脳へと伝達する2次ニューロンがシナプスを形成する部位で

あり、末梢組織からの入力が増幅や、シナプスのフィードバック調節といった痛みを増悪させる可塑性が生じ、中枢性感作に至る。これまでに申請者は、慢性疼痛の一つである神経障害性疼痛のモデルマウスを複数の遺伝子改変マウスで作製し、神経障害性疼痛発生の解明に努め、NMDA 受容体サブユニットの一つ GluN2B が痛みの発生に重要であることを明らかにした (Abe *et al.*, *EJN*, 2005)。GluN2 は、長い細胞内領域を持ち、多くの PSD タンパク質群と会合することにより、シナプスでの受容体発現の維持とチャネル活性、およびリサイクリングが調節される。同領域内の 1472 番目のチロシン (Y1472) は Src kinase family にリン酸化され、このリン酸化は分子間の会合に重要な部位であることが知られる一方、神経障害性疼痛でリン酸化亢進が生じることを明らかにした (Abe *et al.*, *EJN*, 2005)。さらに、Y1472 をフェニルアラニンに置換したノックイン (Y1472F-KI) マウス (Nakazawa *et al.*, *EMBO J.*, 2007) では、神経障害性疼痛で認められる痛覚過敏やアロディニアが、野生型に比べ有意に抑制され

図1. Y1472F-KIではリン酸化が生じない 図2. Y1472F-KIは疼痛閾値低下に抵抗性を示す



ることを突き止め、GluN2B Y1472 のリン酸化が神経障害性疼痛の発生・維持に重要な細胞内シグナルであることを明らかにした (Matsumura *et al.*, *EJN*, 2010, Katano *et al.*, *Neuropharmacol.*, 2011 図 1, 2)。

申請者は、神経障害性疼痛モデル脊髄後角で GluN2BY1472 リン酸化の下流での関連分子を新たに探索するために、平成 22 年度までの基盤研究 (C) (20602015) で、i) 野生型無処置群、ii) 野生型神経障害性疼痛モデル群、iii) Y1472F-KI 無処置群、iv) Y1472F-KI 神経障害性疼痛モデル群の 4 群のプロテオミクス解析を実施した。プロテオミクス解析では、中枢性感作の機能性分子は PSD に多く存在することから、標的分子の濃縮として PSD 画分を腰部脊髄後角より蔗糖密度勾配遠心分離法にて精製した。マウスの腰部脊髄後角から解析必要量の PSD 画分を得るために、それぞれの比較対照の各群より 130-150 匹前後のマウスを使用した。得られた画分中の発現

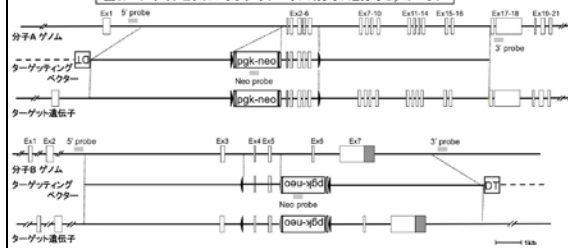
タンパク質を isobaric tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ) による標識および、多段階質量分析法 (MS/MS) を用いて比較定量と同定を行った。

解析の結果、Y1472 のリン酸化シグナルの下流に位置する 2 分子を、神経障害性疼痛関連分子として同定し、Neuropathic Pain Related Protein-A、-B (NPRP-A、NPRP -B) と名付けた。NPRP-A と NPRP-B は分子量それぞれ 150.4kDa と 60.0kDa の蛋白質であり、それぞれ異なる遺伝子から産生された異なる蛋白質である。両分子とも、シナプスでの発現と PDZ ドメインを有するアダプター分子との結合が報告されているが、その機能については不明である。

## 2. 研究の目的

申請者は、NPRP-A と NPRP-B が PSD に存在し、また野生型マウスで神経障害性疼痛の発生に伴って有意に増加する分子であることから、NPRP-A と -B の神経障害性疼痛への関与および、分子機能を解明することにより、疼痛の発生・増強の機序を明らかにしたいと考えた。申請者は、NPRP-A、NPRP-B の遺伝子発現と、組織内の局在の変化を、神経障害性疼痛モデルをはじめとする疼痛モデルで明らかにする。また NPRP-A、-B の疼痛発生・増強への関与を明らかにするために、NPRP-A および -B のそれぞれのコンディショナルノック

図3. コンディショナルノックアウトマウス(分子Aと分子B)のマップ



アウト (cKO) マウスを作製 (図 3) し、cKO マウスを使用した疼痛モデルの作製と行動評価を行う。さらに、SNI モデルあるいは NMDA 刺激による NMDA 受容体の活性化への NPRP-A、NPRP-B の関与と、これまでに明らかにしてきた疼痛関連分子とカスケード (GluN2B pY1472-NMDA 受容体 (カルシウム流入増加)-CaMKII pT286/287 (活性化) -GluA1 pS831 (シナプスの可塑的变化)-神経障害性疼痛の出

現(図2 Katano *et al.*, *Neuropharmacol.*, 2011)への影響を培養細胞を用いて評価する。本解析は、Y1472F-KI マウスを用い、Y1472リン酸化の下流のシグナルカスケードに焦点を当てた独自のプロテオミクス解析で見いだされた NPRP-A、NPRP-B の疼痛への関与を解明するものである。NPRP-A および-B の機能を示す報告は、慢性疼痛のみならず、記憶・学習でも認められておらず、その成果は疼痛経路の新しい解明だけでなく、記憶・学習や慢性疼痛の脳における機序でも新しい展開に繋がる研究として発展することが大いに期待できる。

神経障害性疼痛を含むいくつかの疼痛疾患は社会的にも問題となっている難治性の疼痛を呈することから、病態の発生・増強の機序の解明につながる標的分子の探索・同定と機能解析は、創薬研究への発展性も期待でき、意義のある解析と考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) KOマウスの作製

C57BL/6Nマウス胚盤胞より樹立されたES細胞株、RENKAにNPRP-Aおよび-Bのターゲティングベクターを導入し、相同組換えが確認されたクローンを用い、flox型マウスを作製した(図3)。flox型マウスは、cre recombinaseを発現するcreマウスとの交配によって目的遺伝子を欠損させ、KOマウスとする(図3)。flox型マウスは適切なcreマウスの選択で、全身あるいは脊髄、脳といった組織特異的なコンディショナルKOマウスの両方の作製が可能となる。KOマウスを作製し、病態モデルでのNPRP-A、NPRP-Bの疼痛発生・増強への役割を明らかにする為の解析に使用する。

#### (2) 神経障害性疼痛モデルマウスでの遺伝子発現と細胞内局在変化の解析

まず、神経障害性疼痛モデル(Spared Nerve Injury (SNI)モデル)を作製する。NPRP-A と NPRP-B が、SNI モデルで生じる触覚刺激を痛覚と認識する病態、アロディニアや痛覚過敏の発生、あるいは増強・維持のどちらにより強く関与するかを明らかにするために、SNIモデル作製後の経時的な遺伝子発現を real time PCR にて定量的に評価する。さらに、SNIモデルによる脊髄後角での NPRP-A および-B

の発現量、および細胞内局在変化を免疫組織学的、生化学的に解析する。生化学的な解析では、脊髄後角組織を分画し、NPRP-A および-B の発現増加が細胞全体で生じているのか、あるいはトランスローケーションの促進によるシナプス部位のみでの増加であるのかを解析する。解析に使用する抗体は、すでに作製済みであり、実験可能な状態となっている。

#### (3) 培養細胞を用いたNPRP-A、-Bの細胞内局在変化とNMDA受容体活性への関与

培養細胞にNPRP-A、-Bを過剰発現あるいは、siRNAを使用した発現抑制を行い、NMDA受容体の細胞内局在変化を、NMDA受容体サブユニットにGFPやHAなどのタグ蛋白を結合させ解析する。また、NMDA刺激による受容体活性化への影響についても、電気生理学的手法を用いて解析を行う。さらに、タグ蛋白にて、pull-down assayを行い、NPRP-Aあるいは NPRP-B とNMDA受容体との直接的な相互作用を調べる。この解析によって、NMDA受容体と NPRP-AおよびNPRP-Bとの分子あるいは機能的な相互作用を明らかにする。

#### (4) NPRP-A、NPRP-B KOマウスを使用した疼痛モデルの行動解析

Creマウスとの交配で得たNPRP-Aおよび NPRP-BのKOマウスを使用し、行動解析を行う。NPRP-Bが神経障害性疼痛時に関与する分子であることを明らかにするためにまず、無処置群での痛覚および熱刺激に対する応答性を野生型マウスと比較し、痛覚伝達が野生型マウスと比べ、有意差を示さず正常であることを確認する。その後、SNIモデルを作製し、野生型マウスSNIモデルで発症する機械的アロディニア、および痛覚過敏の出現を行動学的に評価し、発症における抵抗性の有無を明らかにする。

#### (5) NPRP-AおよびNPRP-BのCaMKII活性化への関与

また、野生型マウスSNIモデル脊髄で生じる、CaMKIIの活性化と、AMPA受容体サブユニットGluA1のリン酸化は、GluN2B Y1472F-KIマウスで抑制されることを明らかにしている。そのことから、NPRP-AおよびNPRP-BのKOマウスで、CaMKIIの活性化を評価し、NPRP-Aおよび-B

NPRP-Bの機能がCaMKIIの上流あるいは下流に位置するかを検討する。

(6) NPRP-AおよびNPRP-Bの各種疼痛モデルへの関与

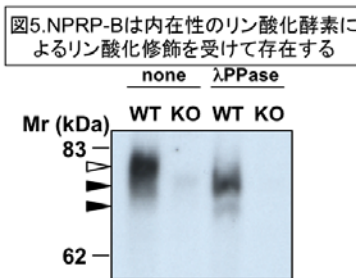
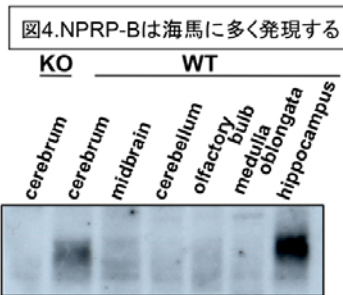
CaMKIIの活性化は炎症性疼痛モデル脊髄においても生じることから、NPRP-AおよびNPRP-BのKOマウスで、足背部への完全フロインドアジュバンド(CFA)投与で作製する慢性炎症性疼痛モデル、および電氣的に下肢筋に、反復性伸張性収縮運動負荷を与え、作製する筋肉痛モデルを作製し、疼痛行動解析を実施する。この解析で、NPRP-AおよびNPRP-Bが慢性疼痛に共通の発現調節に関与する分子であるか、あるいは神経障害性疼痛に特異的な分子であるかを検討する。また、筋・筋膜性疼痛は患者数が多いにも関わらず、マウスで疼痛解析の報告はないことから、NPRP-A、および-NBを介した機序での、神経障害性あるいは炎症性疼痛との相同、相違点について明らかにする。

#### 4. 研究成果

in vivoでの機能解析を目的としKOマウスの作製を開始し、初年度でNPRP-A、-Bのfloxed型マウスを作出した。NPRP-A、-BはCreマウスとの交配によってKOマウスを作出した。

NPRP-BのKOマウスは、野生型と比べやや小さいが、ほぼ同様に発達しKOマウス個体はメンデルの法則に従って得られており胎生致死ではないことが確認できた。また、NPRP-BはKOマウスを対照群とした、特異的な抗体によるwestern blotにて中枢神経系での発現分布を明らかにし、脳では特に海馬に多く発現していることを明らかにした(図4)。

また、脊髄後角においても発現し、粗シナプス画分で濃縮して存在することを確認した。さらに、NPRP-Bは複数の翻訳後修飾



によるブロードしたバンドとして検出される(図5白矢じり)、このバンドはλ protein phosphatase (λ PPase)処理にて低分子両側にシフト(図5黒矢じり)したことから、この修飾がリン酸化によるものであることを明らかにした(図5)。

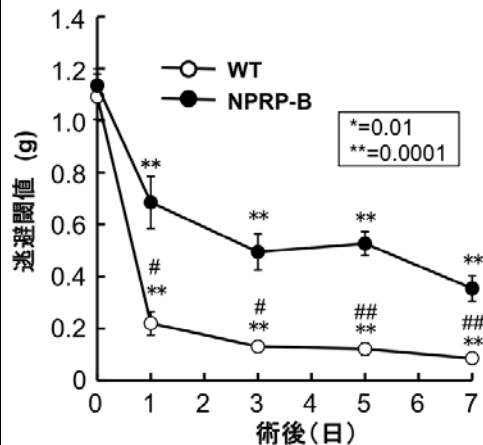
さらに、NPRP-BがNMDA受容体のアダプター分子として知られるPSD-95と相互作用することを、培養細胞を用いたin vitroの解析で明らかにし、またこの相互作用がリン酸化によって阻害されることを示す結果を得た。

NPRP-B KOマウスを用いてSNIモデル(図6)

を作製し行動解析を実施した。その結果、SNIモデル作製の1日目より野生型マウスでアロディニアが出現し、有意に疼痛閾値が低下、7日後も持続した。NPRP-B KOマウス



図7. NPRP-B KOマウスでアロディニアが抑制される



スでも、アロディニアは認められたが、野生型に比べその閾値低下は有意に抑制されていた(図7)。

しかしながら、CaMKIIの阻害剤であるKN-93の髄腔内投与では野生型で認められるような閾値の改善は認められなかった。そのことから、NPRP-BはCaMKII同様にGluN2B-NMDARの下流に位置するが、異なる経路である事が示唆された。

他方、NPRP-B KOマウスで認められるアロディニアの抑制はSNIモデルだけではなく、CFAの皮下注射によって生じる慢性炎症性疼痛モ

デルでも、有意に機械的アロディニアと熱アロディニアの発症に抵抗性を示した。この結果から、NPRP-Bは神経障害性疼痛に留まらず、広く慢性疼痛に関わる分子である事が明らかになった。

本解析から、同定したNPRP-Bが、痛みの発現にin vivoで関与することが明らかになった。今後、リン酸化などの翻訳後修飾を介した本分子の疼痛発現における機能および関与について明らかにする予定である。

#### 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6件)

① Lu J, Katano T, Nishimura W, Fujiwara S, Miyazaki S, Okasaki I, Aritake K, Urade Y, Minami T and Ito S., Proteomic analysis of cerebrospinal fluid before and after intrathecal injection of steroid into patients with postherpetic pain. *Proteomics* (査読あり) **12**(19-20), 2012, 3105-12.

doi: 10.1002/pmic.201200125.

② Unezaki S, Sasaki A, Mabuchi T, Matsumura S, Katano T, Nishio N, Andoh T, Nakazawa T, Yamamoto T, Nakatsuka T, Kuraishi Y and Ito S. Involvement of Tyr1472 phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit in postherpetic neuralgia in model mice. *Mol. Pain* (査読あり) **8**, 2012, 59 (1-13).

doi: 10.1186/1744-8069-8-59.

③ Katano T, Nakazawa T, Nakatsuka T, Watanabe M, Yamamoto T and Ito S. Involvement of spinal phosphorylation cascade of Tyr1472-NR2B, Thr286-CaMKII, and Ser831-GluR1 in neuropathic pain. *Neuropharmacology* (査読あり) **60**, 2011, 609-616.

doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.12.005.

④ Chizaki R, Yao I, Katano T, Matsuda T and Ito S. Restricted Expression of Ovol2/MOVO in XY Body of Mouse Spermatocytes at the Pachytene Stage. *J. Androl.* (査読あり) **33**, 2011, 227-86.

doi: 10.2164/jandrol.110.012294.

⑤ Okazaki T, Otani H, Shimazu T, Yoshioka K, Fujita M, Katano T, Ito S and Iwasaka T. Reversal of inducible nitric oxide synthase uncoupling unmasks tolerance to ischemia/reperfusion injury in the diabetic rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (査読あり) **50**, 2011, 534-544.

doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.12.010.

⑥ Kunori S, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, Katano T, Audoly LP, Urade Y and Ito S. A novel role of prostaglandin E<sub>2</sub> in neuropathic pain: blockade of microglial migration in the spinal cord. *Glia* (査読あり) **59**, 2011, 208-218.

doi: 10.1002/glia.21090.

[学会発表] (計4件)

① 片野泰代 山崎真弥 阿部学 福田正史 奥村宣明 中澤敬信 高尾敏文 山本雅 崎村建司 伊藤誠二 慢性疼痛の発生・増強機構の解明を目的とした新規機能性分子の解析 第85回日本生化学会大会 2012年12月15日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡)

② Katano T, Fukuda M, Okumura N, Nakazawa T, Yamamoto T, Takao T and Ito S., Search of neuropathic pain related proteins in neuropathic pain model mice by iTRAQ proteome analysis., *Neuroscience 2012*, 2012.10.13~2012.10.17 New Orleans, USA.

③ Katano T, Nakazawa T, Nakatsuka H, Watanabe M, Yamamoto T, Ito S. The activation of NR2B-NMDAR by

phosphorylation of Tyr1472-NR2B triggers phosphorylation cascade in neuropathic pain. Neuroscience 2011, 2011.11.16. Washington DC, USA.

④ 片野泰代 奥村宣明 高尾敏文 中澤敬信 山本雅 伊藤誠二 プロテオミクス解析による神経障害性疼痛機能性分子の探索 第84回日本生化学学会大会 2011.9.23 京都国立京都国際会館 (京都)

[その他]

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/medchem/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片野 泰代 (KATANO TAYO)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：60469244