

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592352

研究課題名(和文)疼痛制御に関与するSema3Aシグナルパスウェイの解明

研究課題名(英文)Elucidation of Sema3A signaling pathway in mechanisms of neuropathic pain

研究代表者

紙谷 義孝(Kamiya, Yoshinori)

新潟大学・医歯学総合病院・教授

研究者番号：90381491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経障害性疼痛におけるSema3Aシグナルカスケードの動態を明らかにするために、神経絞扼性疼痛モデル(CCIモデル)ラットの脊髄後角におけるSema3A関連タンパクであるCRMP2、CDK5、その下流で疼痛に関与するNMDA受容体NR2Bサブユニットの発現をウエスタンブロット法により検討した。Sema3Aの髄腔内間欠投与により、疼痛行動は低下し、CRMP2、CDK5の発現は増加、NR2Bの発現は減少した。一方抗癌剤投与による疼痛モデルラットでは、神経成長因子であるNGF及びその受容体TrkAが脊髄及び後根神経節で増加し、産生増加、分解の低下の理由によるものでないことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To clarify the dynamics of Sema3A signaling cascade in peripheral neuropathic pain, we examined Sema3A related proteins CRMP2, CDK5 and NR2B subunit of NMDA receptor in the spinal cord dorsal horn of chronic constriction injury in unilateral sciatic nerve model by Western blotting. Intrathecal intermittent administration of Sema3A induced reduction of pain behavior in pain model rats and increase of CRMP2 and CDK5 expression and decrease of NR2B expression in spinal dorsal horn. On the other hand, in paclitaxel-induced pain model rats, NGF and its receptor TrkA is increased in the spinal dorsal horn and dorsal root ganglion. Our findings suggested that the increase of NGF and TrkA might not be neither due to increase of production nor decrease of degradation.

研究分野：麻酔科学

キーワード：神経因性疼痛 神経ガイダンス因子 神経成長因子 疼痛メカニズム シグナルパスウェイ NMDA受容体

1. 研究開始当初の背景

神経障害に伴い、一次知覚神経及び脊髄後角では様々な生化学的变化、それに引き続く組織学的・神経回路的变化が生じ、疼痛の形成・維持につながると考えられている。その際に様々な成長因子・サイトカインが関与していることが明らかになりつつある。申請者は神経ガイダンス因子の一つ Sema3A を神経障害性疼痛モデルラットのクモ膜下腔に神経障害と同時に投与することによって疼痛行動を減弱できることを初めて示し、神経ガイダンス因子の疼痛における作用の一端を明らかにしてきた。

Sema3A は、Neuropilin-1 と PlexinA からなる複合受容体と結合しシグナルが活性化され、チロシンキナーゼの1つである Fyn、サイクリン依存性キナーゼの CDK5 や、軸索形成を誘導する因子である CRMP2 を介してシグナル伝達が行われることが知られている。また、NMDA 受容体のサブユニットの一つである NR2B は、Sema3A シグナル同様、Fyn によってリン酸化される。神経障害性疼痛のモデル動物では NR2B のリン酸化が増加することが報告されており、NMDA の受容体の活性化は神経障害性疼痛を引き起こす中枢性過敏因子の1つと考えられている。また、Sema3A シグナル下流分子である CRMP2 と CDK5 は NR2B に対し抑制的に働くことが報告されている。

一方、CDK-5、CRMP2 は、全く別の研究から疼痛に関与する可能性が示唆されている。以上のことから、Sema3A とその受容体を介したシグナルが疼痛のシグナリングにも関与していることが示唆される。また Sema3A はナトリウムチャンネルを介した軸索輸送亢進作用を持つことから、軸索輸送障害作用を持つ抗がん剤パクリタキセルによる神経障害性疼痛に対しても、セマフォリンシグナルが潜在的な治療ターゲットの可能性を有していると考えられた。神経因性疼痛モデルを用いた Sema3A のシグナルカスケードの病態における役割の解析を通じてこれらの疾患の病態解明につながっていくことも期待できるため、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、異なる疼痛モデルにおけるセマフォリンシグナルの役割を明らかにする目的で、神経障害性疼痛モデルラット、パクリタキセルによる薬剤性疼痛モデルラットを用いて、坐骨神経、DRG、脊髄後角における Sema3A そのもの及びその受容体、セマフォリンシグナルの下流分子の発現量及びリン酸化(活性化)の程度、接着因子などをウエスタンブロット及びにより測定、免疫染色法により局在を明らかにし、コントロール動物のそれ

と比較する。更にウイルスベクターによる遺伝子導入法を用いて DRG 及び脊髄後角でセマフォリンシグナルを直接賦活化することにより、神経障害性疼痛の行動学的変化、接着因子の発現変化を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛モデルラットを用いた Sema3A 及びその受容体、セマフォリンシグナル関連タンパクの発現の測定

モデル動物に対する疼痛の評価：モデル動物として8週齢(200g前後)のSDラットを使用する。von Frey hair (4g、8g、15g：各脚5回ずつ測定)及び auto von Frey 装置を用いた Hargreaves 法により機械的刺激疼痛閾値を、アセトン 100 μ L を足底に吹きかけることによる冷刺激疼痛閾値を測定する。この方法を用いてモデル動物の疼痛閾値の変化を定量的に評価する。

坐骨神経結紮による神経障害性疼痛モデル (CCI)：ラットを 2%イソフルレン吸入により麻酔し、左大腿後面を剃毛し消毒、局所麻酔薬の浸潤を行った後約 2cm の切開を大腿骨に沿って加える。大腿後面の筋間を剥離し、坐骨神経を遊離した後 4-0 絹糸を用いて 1mm 間隔で 4 箇所緩く結紮する。消毒後 4-0 絹糸を用いて閉創する。モデル作成後 1,3,7,10,14,21 日後の疼痛閾値を確認、ペントバルビタール(100mg/kg)による安楽死後に坐骨神経、DRG、脊髄後角を採取する。

パクリタキセル投与による薬剤性末梢神経障害疼痛モデル：パクリタキセルは原末をクレモフォル EL + エタノール(50:50)の溶液に 3.3mg/mL の濃度で溶解し、1mL に分注し、-20 で使用時まで保存、使用直前に生理食塩水で 1mg/mL に希釈し使用する。パクリタキセル投与前にベースラインの疼痛閾値を測定する。となるように取り腹腔内投与する。実験開始後 1、4、7、10 日目にイソフルレンで麻酔を行い、体重測定後 8mg/kg のパクリタキセルを腹腔内投与し、慢性疼痛が安定する実験開始後 21 日目に CCI ラットと同様に組織を採取する。

Sema3A 及び関連タンパクの発現量の測定：上記のサンプルを可溶化し、タンパク濃度を測定した後にウエスタンブロットを行い、Sema3A、その受容体である Neuropilin-1、PlexinA、セマフォリンシグナルの下流分子である CDK-5、CRMP2(リン酸化 CDK-5)、FARP2 の発現量の時間経過による増減の動態を明らかにする。

(2)免疫組織学、in situ hybridization による Sema3A 及びその関連タンパク、接着因子の局在の変化の検討

組織学的検討：(1)の実験から神経障害によって大きく変動したタンパクを用いて坐骨神経、DRG、脊髄後角における免疫組織学的検討を行う。免疫染色を行うタイミングは実際のタンパク発現の変動によるが、概ね CCI ラットでは術後 3、7、14、21 日目、パクリタキセル投与ラットでは投与後 2、21 日目を想定している。ペントバルビタールを用いた深麻酔後、ザンボニ液(4%パラホルムアルデヒド+10%ピクリン酸混合液)を経心臓的に還流、組織固定後に凍結切片を作成する。細胞の同定には、神経:NeuN、神経線維:NF200、ミクログリア:Iba-1、アストログリア:GFAP を用いる。神経に関してはペプチド含有性ニューロンのマーカーとして CGRP、ペプチド非含有性ニューロンのマーカーとして IB4 を用いる。共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像を取得後、専用ソフトを用いて定量的解析を行う。同時に DRG、脊髄後角において in situ hybridization(ISH, non-RI)を行い、メッセンジャーRNA とタンパク質の挙動の違いを検討する。

4. 研究成果

(1)CCI モデルラットにおける Sema3A 髄腔内投与の疼痛抑制作用

CCI モデルと、および左坐骨神経絞扼後 Sema3A (1000u) を 3 回髄腔内投与したモデルを用いて、von Frey、auto von Frey、アセトンを用いた疼痛評価を行った(図1)。

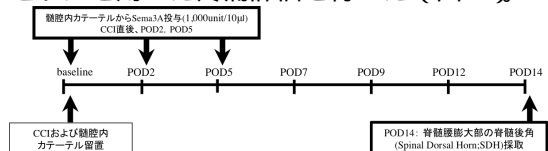


図1:実験タイムテーブル

4、8、15g の Von Frey filament を用いた疼痛評価では、8g でのみ Sema3A 髄腔内投与による疼痛緩和が確認された(図2)。auto von Frey test においても Sema3A の髄腔内投与による疼痛緩和作用が認められたが、アセトンを用いた寒冷刺激評価では緩和作用は見られなかった(図3)。

このことから、Sema3A の髄腔内投与は、低閾値機械刺激を伝達する有髄 AB 線維に主に作用する事が示唆された。

(2)CCI モデルラットにおける、Sema3A 髄腔内投与によって変化する Sema3A シグナル関連分子の脊髄での発現

CCI モデルラット、CCI + Sema3A 投与モデ

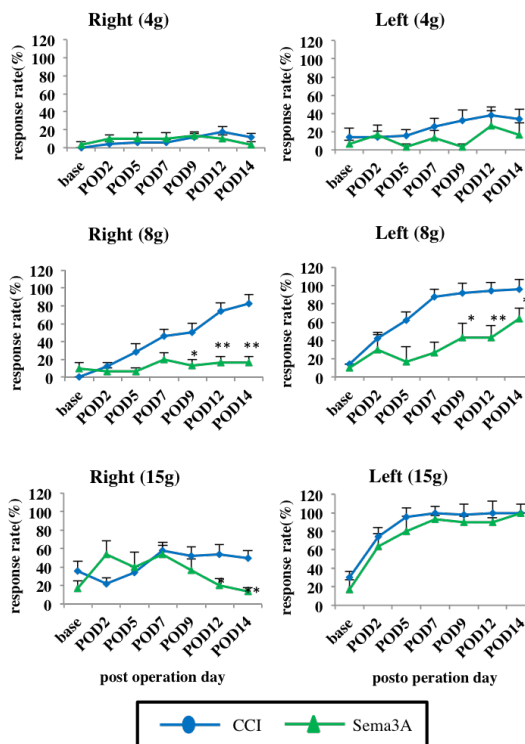


図2: von Frey test (4g, 8g, 15g)

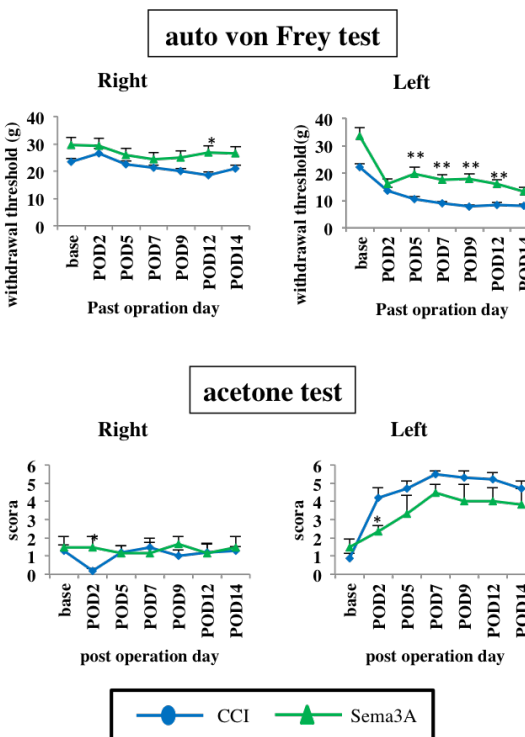


図3:auto von Frey test及びacetone test

ルの CCI 術後 3、14 日目の脊髄後角におけるウェスタンブロッティングを行い、CDK5 の発現については、CCI モデルでは減少しているのに対し、Sema3A 髄腔内投与モデルでは減少が見られないこと、CRMP2 およびその

リン酸化フォームである p-CRMP2 の発現が Sema3A 投与により著増すること、NR2B の発現は、術後 3 日目では、CCI モデルと Sema3A 髄腔内投与モデル双方で増加しているものの、Sema3A 髄腔内投与モデルでは増加の程度が抑えられていた (図 4,5)。

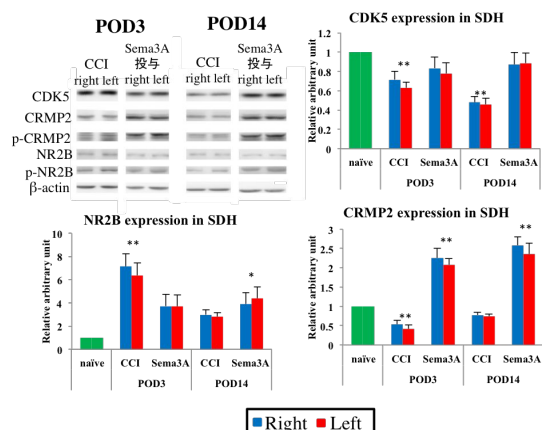


図4: CCI、CCI+Sema3Aの脊髄後角における Sema3Aシグナリング関連のウエスタンブロット

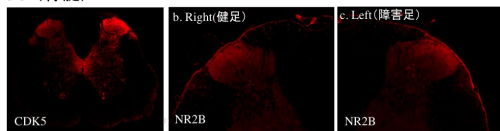
	POD3				POD14				
	Sham	CCI	Sema3A	Sham	CCI	Sema3A	Sham	CCI	Sema3A
CDK5	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CRMP2	-	---	+++	---	---	++	---	---	++
p-CRMP2	-	-	+++	+	+++	+++	+	+++	+++
NR2B	+	++	+	+	+	++	+	+	++
p-NR2B	+	++	+	-	+	+	-	+	+

図5: 各モデル動物脊髄後角の術後3日目(A)、術後14日目(B)における各タンパクの発現量の増減を表にまとめた。naiveを基準に、増加傾向は(+), 減少傾向は(-)とした。

(3)Sema3A 髄腔内投与による脊髄での CDK5、NR2B 発現の免疫組織学的検討

CCIモデルと Sema3A 投与モデルでの CDK5 と NR2B の局在の変化を調べるため、術後 3 日目における脊髄腰膨大部での免疫染色を行った。脊髄での CDK5 および NR2B の発現は、CCI モデルでは障害側および健側の脊髄後角第 II 層で強発現していた一方、Sema3A の髄腔内投与モデルでは、CCI モデルで確認された脊髄後角表層での強い発現が認められなかった (図 6)。

CCI(脊髄)



CCI+Sema3A

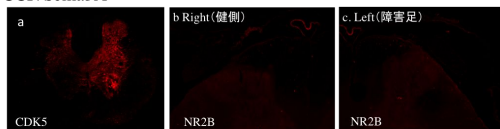


図6: 脊髄後角におけるCDK5、NR2Bの免疫組織学

ただし、免疫染色については、統計的な検討が行えるほどの例数を稼げず、定量的な検討は行えていない。術後 14 日目まで Sema3A の疼痛緩和効果が持続していることから、術後 14 日目における免疫組織学的検討も行った

ていく必要がある。また、CDK5 については、(2)と(3)の結果が相反するものとなったが、それが手法の差によるものなのか、今後の検討が必要である。

以上の検討により、CCI モデルラットに対して、Sema3A の髄腔内投与は、神経障害に伴う脊髄後角での CDK5 の発現量の減少を抑制し、かつ CDK5 のリン酸化を促進することで、NR2B のリン酸化を減少させる。増加した CRMP2 が、NR2B の膜表面への移動を抑制させるといったメカニズムにより NR2B の働きを抑制させることで疼痛緩和作用を示すものと推測された。

(4)パクリタキセル投与による疼痛モデルラットにおける神経成長因子およびその関連タンパクの脊髄・DRG における挙動

パクリタキセル(Ptx) 8mg/kg × 4 回腹腔内投与により、ラットは経時的な機械的刺激および冷刺激に対する過敏行動を示す (図 7)

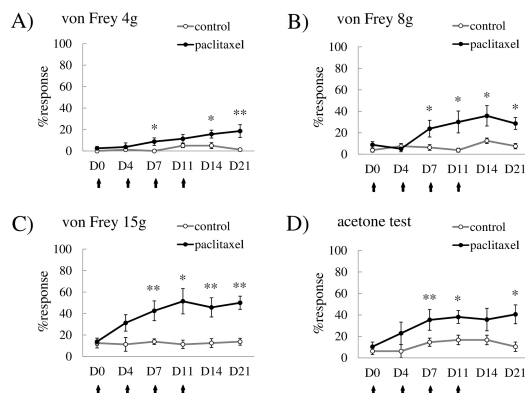


図7: von Freyおよび acetone test 矢印は Ptx を投与したタイミング

Ptx 投与モデルラットにおいて、脊髄では NGF が、DRG では NGF, BDNF, TrkA およびリン酸化 TrkA(pTrkA)の発現が有意に増加していることが明らかとなった。一方、BDNF の受容体である TrkB の発現は脊髄では認められなかった (図 8)。

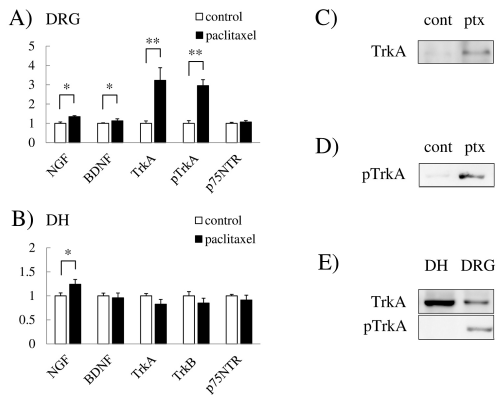


図8: 脊髄後角および DRG における神経成長因子およびその受容体の発現. NGF: nerve growth factor, BDNF: brain-derived neurotrophic factor, TrkA: Tropomyosin receptor kinase A, pTrkA: phosphorylated TrkA, p75NTR: p75 neurotrophine receptor

(5) Ptx モデルラットでの TrkA, NGF 増加のメカニズムの検討

Ptx モデルラットの脊髄後角、DRG における神経成長因子関連タンパクの増加が、タンパク合成によるものかどうかを検討するため、in-situ hybridization (ISH) 法により検討した。兵庫医科大学麻酔科学教室 福岡哲男博士に依頼し、NGF および TrkA に対する ISH を脊髄後角および DRG で行っていただいたが、そのどちらにおいても mRNA 発現の増加は認められず、かつ NGF については脊髄広角での発現そのものが見られない、という結果であった (data not shown)。

TrkA が増加しているのが、これらタンパクの分解が障害されている可能性を検討するため、TrkA の分解酵素として知られている NEDD4-2 の DRG での発現変化を検討した。Ptx モデルラット DRG において、NEDD4-2 は、対照群ラットに比べ約 2 倍に増加しており、TrkA の増加は分解の亢進によって生じているのではないことが明らかになった (図9)。

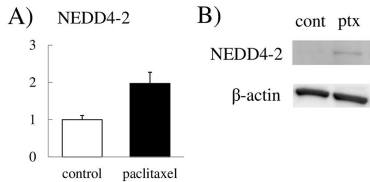


図9: DRG における NEDD4-2 の発現

Ptx は微小管構成タンパクの過重合を引き起こすことにより細胞分裂を抑制し、抗腫瘍効果を発揮するが、同時に微小管に依存する神経の軸索輸送をも障害し、神経障害をきたすと考えられている。NGF、TrkA が DRG で増加しているのも軸索輸送の障害によって蓄積しているのではないかと推測された。

(6) NGF-TrkA シグナリングの抑制による疼痛緩和効果

NGF は神経成長因子の代表であり、神経保護効果を有すると同時に、炎症性疼痛や組織障害性疼痛の際には発痛物質として作用することが知られている。Ptx モデルマウスにおいて、NGF-TrkA シグナリングの活性化が実際に疼痛行動に寄与しているかを確認するため、NGF を含むチロシンキナーゼの阻害薬である k252a (2 μ g \times 4 回) を髄腔内投与し、Ptx による知覚過敏に与える影響を検討した。予め腰部からくも膜下カテーテルを留置しておいた SD ラットに対し、Ptx 投与と同じタイミングで k252a を投与、von Frey による機械的刺激に対する過敏性を経時的に検討した。k252a を投与されたラットでは、溶媒 (25% DMSO) を投与されたラットに比べ、有意に疼痛行動が抑制されることが明らかとなった。一方、冷刺激に対する過敏性には変化が見られなかった (図10)。

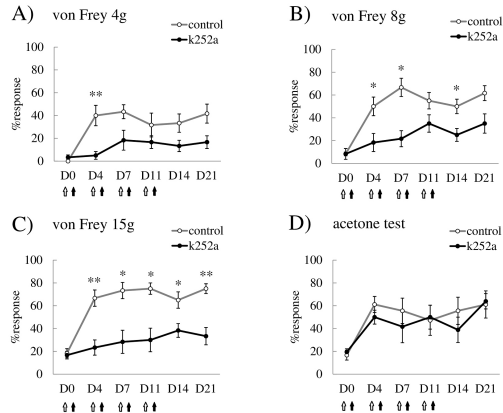


図10: k252a 髄腔内投与による Ptx モデルラットの疼痛行動の抑制

k252a は TrkA に対する特異性は高くないが、予備の実験から TrkB の脊髄後角・DRG での発現が高くないこと、特異的阻害薬の入手が困難だったことなどから、使用したが、本来ならば NGF の機能阻害抗体や TrkA の特異的阻害薬を使用すべきだろうと考えられる。

今回の研究計画では、神経障害性疼痛および薬剤性疼痛モデルにおける Sema3A シグナリングの役割を統合して検討する計画であったが、研究代表者の異動などがあり、資格通りに研究が進まなかった点があった。今後は Sema3A シグナリングが難治性疼痛に普遍的に関与しているかどうかを検討していく必要がある。

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 1件) 査読あり
Nakahashi Y, Kamiya Y, Funakoshi K,
Miyazaki T, Uchimoto K, Tojo K, Ogawa K,
Fukuoka T, Goto T.
Role of nerve growth factor-tyrosine kinase
receptor A signaling in paclitaxel-induced
peripheral neuropathy in rats.
Biochem Biophys Res Commun. 2014 Feb
14;444(3):415-9.

[学会発表](計 3件)

Yoshinori Kamiya, Kensuke Saeki,
Naoya Yamashita, Masato Takiguchi,
Yusuke Nakahashi and Kengo Funakoshi.
CDK5, CRMP2 and NR2B in spinal dorsal
horn and dorsal root ganglion have
different role in pain signaling between
neuropathic pain model and inflammatory
pain model.
Euroanaesthesia 2013, Barcelona, Spain,
2013, 6

Kensuke Saeki, Yoshinori Kamiya,
Yusuke Nakahashi, Naoya Yamashita,
Kengo Funakoshi.
Paradoxical Expression Profiles of Sema3A
and CDK5 in Spinal Dorsal Horn and
Dorsal Root Ganglion of Neuropathic Pain
Model Rat.
The ANESTHESIOLOGY 2012 annual
meeting, Washington DC, USA, 2012, 10

Yusuke Nakahashi, Yoshinori Kamiya,
Toshiharu Tazawa, Kenichi Ogawa, Kengo
Funakoshi, Takahisa Goto.
EXPRESSION CHANGES OF NERVE
GROWTH FACTOR AND TRKA IN
DORSAL HORN AND DORSAL ROOT
GANGLIA IN PACLITAXEL-INDUCED
PERIPHERAL NEUROPATHY IN RATS.
The 14th World Congress on Pain
(Milan2012), Milan, Italy, 2012, 8

[図書](計 0件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

紙谷 義孝 (KAMIYA, Yoshinori)
新潟大学・医歯学総合病院・教授
研究者番号：90381491

(2)研究分担者

船越 健悟 (FUNAKOSHI, Kengo)
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号：60291572

山下 直也 (Naoya Yamashita)
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・
客員講師
研究者番号：40508793

(3)連携研究者

()
研究者番号：