

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592798

研究課題名(和文)新規細胞内輸送調節分子を介した疼痛制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of pain regulation mechanism via novel intracellular transport modulation factor.

研究代表者

北山 友也 (Kitayama, Tomoya)

武庫川女子大学・薬学部・講師

研究者番号：60363082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：新規細胞内輸送調節因子であるPRIPの遺伝子欠損動物では、坐骨神経部分結紮法を用いて作成した神経障害性疼痛モデルの疼痛が抑制されることが明らかとなった。この機序は、細胞内クロライドイオン濃度を制御する輸送体であるKCC2のリン酸化状態を制御することにより、細胞膜上の発現を制御することであった。KCC2の発現減少は、細胞内クロライドイオン濃度の上昇を誘発し、その結果抑制性シグナルの変調が発生し、神経障害性疼痛が発症する。PRIP欠損は、坐骨神経部分結紮誘発性の脊髄KCC2発現減少を抑制することにより、疼痛発症・維持に拮抗することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To determine the involvement of PRIPs in pain sensation, a hind paw withdrawal test was performed before and after partial sciatic nerve ligation (PSNL) in PRIPs knockout mice (DKO). DKO mice that underwent PSNL surgery showed hard-wired ipsilateral paw withdrawal threshold. To further investigate the inverse phenotype in DKO mice, we produced mice with specific siRNA-mediated knockdown of PRIPs in the spinal cord. Consistent with the phenotypes of KO mice, PRIPs knockdown (DKD) mice with PSNL showed decreased pain-related behavior. This indicates that reduced expression of both PRIPs in the spinal cord induces resistance towards a painful sensation. The expression of KCC2, which controls the balance of neuronal excitation and inhibition, was normal level in DKO mice after PSNL. Suppressed expression of PRIPs induces an elevated expression of KCC2 in the spinal cord, resulting in inhibition of nociception and amelioration of neuropathic pain in DKO mice.

研究分野：神経科学

キーワード：神経障害性疼痛 クロライドイオン 抑制性シグナル

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛（ニューロパシックペイン）は、炎症性の疼痛とは異なり、知覚神経の情報伝達の異常に基づく慢性疼痛である。本来痛みを生じない非侵害性刺激により耐え難い痛みを生じるアロディニアおよび自発痛などが主症状であり、非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）や麻薬性鎮痛薬ですら奏功しない。そのため、有効な治療手段、治療薬の開発が望まれる分野である。

神経障害性疼痛の発症・維持機構については、幾つもの研究が報告されている。細胞内クロライドイオン濃度の変調（Coull et al., Nature, 2005）、脊髄レベルにおける抑制性シグナルの減弱（Ito et al., Neurosci. Res., 2001）などである。この様に、GABA シグナルに代表される抑制性シグナルの変調が神経障害性疼痛の発症・維持機構に関連する報告が中心である。我々の研究でも抑制性シグナルの増強が慢性疼痛を緩和することを報告している（Morita et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 2008）。しかしながら、神経障害性疼痛に対して有効な手段である GABA_A 受容体の直接刺激等の抑制性シグナルの増強は、脳内中枢神経を過剰抑制するため、治療法として活用するためには問題がある。

このため、神経障害性疼痛の詳細な発症機序・維持機構の解明が必要であり、この研究過程で新たな治療ターゲットの同定が期待される。

2. 研究の目的

我々は、抑制性シグナルの直接的な増強は、副作用が大きいことから、抑制性シグナルを調節する機構に注目した。つまり、生体内で間接的に抑制性シグナルを賦活化することにより神経障害性疼痛を緩和する手段である。そのため、GABA_A 受容体の細胞膜発現を調節することが知られている PLC Related Catalytically Inactive Protein (PRIP) に関して検討をおこなうこととした。さらに、坐骨神経部分結紮法を用いて作成した神経障害性疼痛モデル動物の脊髄を用いたアレイ結果の解析から得た、神経障害性疼痛発症・維持に関与する可能性がある候補遺伝子についても検討をおこなうこととした。これらの解析を介して、神経障害性疼痛の治療ターゲットの検索と、新たな治療法を確立することが最終的な目的である。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛モデル動物の作成

神経障害性疼痛モデル動物は、坐骨神経の部分結紮をおこなうことにより作成した。全身麻酔下で除痛処置をおこなった動物について、大腿骨尾側を走行する坐骨神経を外科的処置により露出させ、8-0 絹糸により約 1/2 から 1/3 結紮した。その後、坐骨神経を元の位置に修復し、6-0 絹糸により筋組織および

皮膚組織を縫合した。

(2) 疼痛関連行動の検討

疼痛閾値の検討は、フォンフライフィラメントを用いた方法でおこなった（Morita et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 2008）。後足の足底部にフォンフライフィラメントを用いて様々な荷重の刺激を与え、後足を引っ込めた（逃避行動）荷重を痛み閾値とした。

アロディニア様の疼痛の検出は、ペイントブラシを用いて検討した（Morita et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 2008）。ペイントブラシによる接触刺激に対する逃避反応の強さをスコアとして用いた。

(3) 実験動物

PRIP 遺伝子に関連する実験は、PRIP1 および PRIP2 の両遺伝子の欠損動物を用いた。これらの動物は、連携研究者の兼松先生から供与して頂いた。PRIP 遺伝子欠損マウスは、広島大学に設置されている動物飼育実験施設において繁殖させ使用した。

他の実験においては、ddY 系マウスを用いた。これらのマウスは、業者より購入後最低一週間の馴化期間をおいてから実験を開始した。

何れの動物についても、週齢 6 週間から 10 週間の雄性を用いた。これら動物実験については、日本薬理学会動物実験ガイドラインおよび広島大学動物実験ガイドラインを遵守すると共に、広島大学における動物実験倫理委員会の許可を受けている（許可番号 A9-11, A10-38, A11-12, A12-125）。

(4) ノックダウンモデル動物の作成

PRIP をはじめとする標的遺伝子の機能を検討するために RNA 干渉法を利用した一過性の遺伝子発現抑制モデル（ノックダウン動物）を作成し、疼痛関連行動を観察した。siRNA の設計および合成に関しては、市販されている物を購入し使用した。siRNA の動物への適応は、不活化した日本センダイウイルスのエンペローブを使用した（HVJ Envelope Vector kit；石原産業株式会社）。siRNA の効力は一過性であり、使用したベクターには、感染力がないため遺伝子改変には当たらない。

これらベクターを用いて、各遺伝子に対する siRNA を脊髄腔内（L5-L6）に投与した。L5-L6 領域は、坐骨神経が入力する部位である。

(5) 遺伝子発現変動の検出

遺伝子発現の変動については、タンパク質レベルでの変化を指標とした。標品は、脊髄（L5-L6）を回収して調製した。検出については、主にウエスタンブロット法を用いた。

(6) タンパク質の機能変動の検出

タンパクレベルでの機能変動については、

主にトランスポーターの取り込み能について検討をおこなった。亜鉛イオンの輸送に参与する ZnT1 の機能については、亜鉛イオン感受性の蛍光色素の負荷実験をおこなった。クロライドイオンの輸送に参与する KCC2 の機能については、pH 感受性の蛍光色素の負荷実験をおこなった。

(7) 初代グリア培養細胞

細胞レベルでの神経障害性疼痛発症・維持機構を解析するために、脊髄由来アストロサイトの初代培養をおこなった。細胞の回収は、生後 1-2 日のマウス脊髄からおこなった。回収した細胞について、約 1 週間の培養後巻き替えをおこない、さらに約 1 週間培養したものを実験に用いた。

これら培養細胞に対して、種々の暴露実験をおこない、その培養上清および細胞を脊髄腔内に投与した。また、培養細胞自体についても、タンパク質レベルにおける発現変動・機能変動を検討した。

4. 研究成果

(1) PRIP 遺伝子欠損動物の神経障害性疼痛抵抗性

PRIP 遺伝子欠損マウスに対して、坐骨神経部分結紮をおこなった場合、正常動物に同処置をおこなった場合に比べて、疼痛関連行動が抑制されることが明らかとなっていた。そのため、PRIP 遺伝子に焦点を当て解析をおこなった。脊髄レベルにおける PRIP 遺伝子の一過性の発現抑制は、坐骨神経部分結紮誘発性の神経障害性疼痛を有意に抑制した(図 1)。

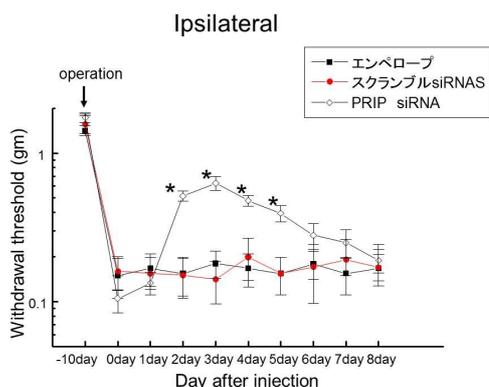


図 1. 疼痛に対する脊髄 PRIP 発現抑制

このことから、PRIP 遺伝子による疼痛調節機構は、脊髄レベルで作用していることが推察される。次に PRIP 遺伝子が、GABA_A 受容体の細胞膜上への輸送を調節していることが報告されていることから、GABA_A 受容体の細胞膜上の発現について、脊髄レベルで検討を加えたが、特に神経障害性疼痛の抑制に関連する変動は認められなかった。

次に細胞内クロライドイオン濃度の制御をおこなっている KCC2 タンパク質について解析をおこなった。KCC2 は、カリウムイオン

とクロライドイオンの輸送をおこなう輸送体であり、細胞内クロライドイオンを細胞外に比べて低い状態に保つ機能がある。KCC2 の機能が抑制されると、細胞内クロライドイオン濃度が上昇し、抑制性シグナルに変調をきたす。この変調が神経障害性疼痛の発症・維持機構の一因と報告されている(Coull et al., Nature, 2005)。正常動物では、坐骨神経部分結紮により、KCC2 の発現量は有意に減少する。しかしながら、PRIP 遺伝子欠損動物では、坐骨神経部分結紮をおこなっても、KCC2 の発現抑制は軽微であり、有意な発現減少は認められなかった。さらに、PRIP 遺伝子欠損による神経障害性疼痛抑制効果は、KCC2 の阻害薬である R-DIOA の脊髄腔内への投与により拮抗された。したがって、PRIP は KCC2 の細胞膜上への発現を制御することにより、疼痛を制御している可能性が明らかとなった。この PRIP による KCC2 の発現制御は、KCC2 のリン酸化状態の制御を介していると推察される。

(2) 細胞内亜鉛濃度上昇に伴う神経障害性疼痛の発症機序

今までに、我々は坐骨神経部分結紮動物の脊髄における遺伝子変動をアレイにより解析しており、多数の神経障害性疼痛発症・維持に関連する候補因子を見出している。それらの中から、細胞内亜鉛イオン濃度を調節する ZnT1 に焦点を当て解析をおこなった。ZnT1 に対する siRNA を脊髄腔内に投与し、ZnT1 一過性発現抑制をおこなうと、一か月以上持続する疼痛が認められた(図 2)。

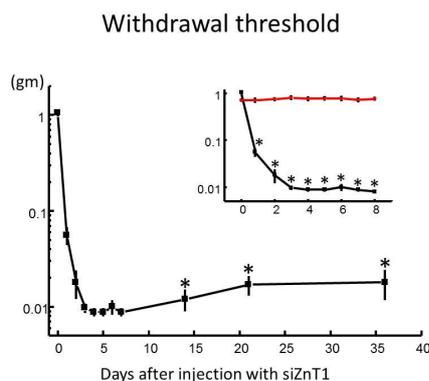


図 2. ZnT1 一過性発現抑制誘発性の疼痛

この時、ZnT1 の脊髄におけるタンパク質レベルでの発現抑制は 1 週間程で投与前のレベルまで回復していた。したがって、ZnT1 発現抑制は、神経障害性疼痛の発症メカニズムに参与する可能性が示唆された。また、坐骨神経部分結紮によっても ZnT1 の発現が減少することを明らかにした。

ZnT1 は、細胞膜上に発現しており、細胞内の亜鉛を細胞外へ直接排泄する唯一の輸送体であり、細胞内亜鉛濃度の調節に深く関与している。この ZnT1 の発現を抑制することにより、細胞内亜鉛イオン濃度の上昇が認められる。脊髄由来アストロサイト初代培養細胞

胞を用いた実験では、細胞内亜鉛イオン濃度の上昇に伴い、プロテインキナーゼCの活性化が誘導され、さらに転写制御因子であるNF Bの細胞核移行性が亢進した。また、インターロイキン6の発現増強および成熟型の発現量が増加していた。転写制御因子 CREBのリン酸化も亢進していた。CREBは、133番目のセリン残基のリン酸化により転写活性が亢進することが報告されており、下流にはBDNFの遺伝子が存在する。実際、BDNFの発現量が増加していた。BDNFは、過去の報告からTrkBを介してKCC2の発現を抑制することが知られている。

上記の様々な細胞内応答について、各種阻害剤を用いて、カスケード反応について詳細な検討を加えた。ZnT1発現抑制培養アストロサイトにおいて、細胞膜透過性亜鉛キレートであるTPENを暴露することにより、上記の応答は全て消失した。プロテインキナーゼCの阻害薬を添加することにより、NF Bの細胞核移行、インターロイキン6発現増強、CREBリン酸化、BDNF発現増強が抑制された。NF Bの細胞核移行を阻害することにより、インターロイキン6発現増強、CREBリン酸化、BDNF発現増強が抑制された。インターロイキン6のsiRNAを添加することにより、CREBリン酸化、BDNF発現増強が抑制された。CREBのリン酸化に参与するプロテインキナーゼAの阻害薬を暴露することにより、BDNF発現増強が抑制された。これらの結果から、細胞内亜鉛濃度の上昇は、プロテインキナーゼC活性化、NF Bの細胞核移行、インターロイキン6発現増強、CREBリン酸化、BDNF発現増強のカスケード反応であることが示唆された。

これらの結果から、細胞内亜鉛イオンの上昇は、最終的にはKCC2の発現抑制を誘導することにより、神経障害性疼痛を誘導すると推察した。この仮説に従い、これ以降の実験をおこなった(図3)。

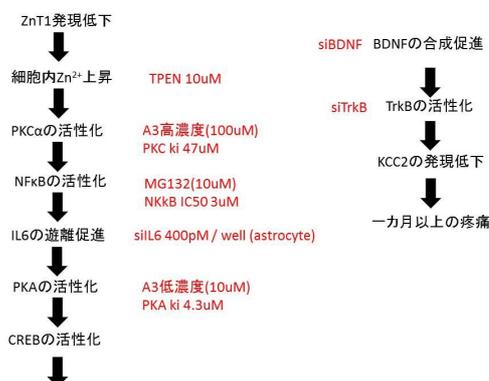


図3. カスケード反応および使用阻害薬

まず、ZnT1一過性発現抑制をした脊髄由来アストロサイト初代培養細胞の上清を、正常マウスの脊髄腔内に投与した。その結果、疼痛が誘導されたが、この疼痛はBDNFの受容体であるTrkBの発現を一過性に抑制したマ

ウスでは認められなかった。つまり、BDNFを介した反応であることが示唆される。同様に、ZnT1の発現を抑制した培養アストロサイトを移植した場合でも疼痛が認められた。

ZnT1siRNAを直接脊髄腔内に投与し作成した神経障害性疼痛モデルマウスについて、各種siRNAを用いて検討した結果、ZnT1一過性発現抑制誘発性疼痛は、インターロイキン6、BDNF、TrkBの各siRNA前処置をおこなった動物では、完全に拮抗された(図4)。

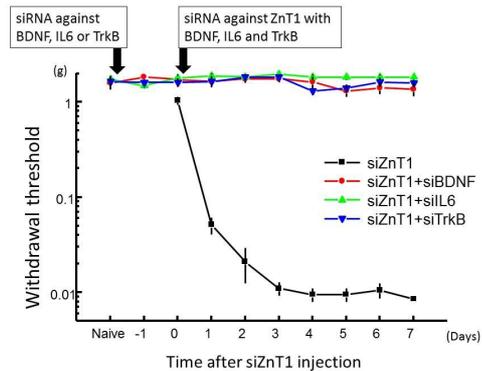


図4. ZnT1一過性抑制誘発性疼痛に対する各種siRNAの拮抗作用

さらにZnT1一過性発現抑制誘発性神経障害性疼痛モデル動物の脊髄急性切片を作成しKCC2の機能について検討をおこなったところ、KCC2の輸送能が減弱していた。この減弱は、KCC2のタンパク質レベルにおける発現減少に起因することを明らかとした。

(3)PRIPとZnT1のクロストークの可能性

PRIPによる疼痛制御機構とZnT1による疼痛制御機構は、KCC2の細胞膜上への発現制御である点が共通であることから、クロストークの可能性について検討をおこなった。PRIPはKCC2リン酸化制御を介しており、ZnT1はBDNF-TrkBを介した制御であることから、細胞内亜鉛イオン濃度上昇に伴うカスケード反応とPRIPの関連性を中心に検討を加えたが、明確なクロストークを示す実験結果は認められなかった。

<引用文献>

Coull JA., Beggs S., Boudreau D., Boivin D., Tsuda M., Inoue K., Gravel C., Salter MW. and De Koninck Y.

BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 15, 438, 1017-1021, 2005

Ito S., Okuda-Ashitaka E. and Minami T. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociception and nocistatin. *Neurosci. Res.*, 41, 4, 299-332, 2001.

Morita K., Motoyama N., Kitayama T., Morioka N., Kifune K. and Dohi T. Spinal antiallodynia action of glycine transporter inhibitors in neuropathic pain models in mice. J. Pharmacol. Exp. Ther., 326, 2, 633-45, 2008.

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)

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

〔学会発表〕(計 4 件)

北山友也、森田克也、兼松隆

細胞内亜鉛濃度変化に伴う神経障害性疼痛発症機構 第 128 回日本薬理学会近畿部会、2015 年 11 月 20 日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府、大阪市)

北山友也、森田克也、兼松隆

ZnT1 の発現低下は BDNF-KCC2 経路を介して神経障害性疼痛を誘導する。第 87 回日本薬理学会、2014 年 3 月 20 日、仙台国際センター(宮城県、仙台市)

北山友也、森田克也、Rizia Sultana、兼松隆

PRIP 遺伝子欠損マウスで認められる神経因性疼痛寛解作用は KCC2 高発現に起因する。第 86 回日本薬理学会、2013 年 3 月 23 日、福岡国際会議場(福岡県、福岡市)

北山友也、森田克也、兼松隆

PRIP1 ノックアウトマウスと PRIP1,2 ダブルノックアウトマウスは疼痛反応の表現型が異なる。第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、国立京都国際会館(京都府、京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

北山 友也(KITAYAMA, Tomoya)

武庫川女子大学・薬学部・講師

研究者番号：60363082

(2)研究分担者

森田 克也(MORITA, Katsuya)

広島文化学園大学・看護学部・教授

研究者番号：10116684

(3)連携研究者

兼松 隆(KANEMATSU, Takashi)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：10264053