

平成 29 年 7 月 31 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460712

研究課題名(和文) 神経傷害性疼痛における接着因子とCaチャネルの局在変化による脊髄後角の形態変化

研究課題名(英文) Alpha2 delta-1 mediated synaptic plasticity in the dorsal horn of peripheral nerve injury model rats

研究代表者

山中 博樹 (Yamanaka, Hiroki)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：20340995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経損傷モデルラットで以下の事が解った。リン酸化L1-CAM(Ser 1181)のDRGでの消失と alpha2-delta1の増加同期すること。上記変化の無髄の損傷ニューロンでの限定。L1-CAM, alpha2-delta1 pL1-CAMが脊髄後角で末梢神経損傷後に共存する事。この構造でのペプチドの貯留とシナプスマーカーとの接触の増加。プレガバリンの投与の結果以下 alpha2-delta1の輸送阻害 L1-CAM陽性終末の減少 pL1-CAMのリン酸化阻害 シナプスがL1-CAM接触の抑制 L1-CAM陽性終末に接しているシナプスは脊髄後角の介在ニューロンのものである事。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrated the following new findings in the neuropathic pain model rats:1) nerve injury increased alpha2 delta-1 and decreased phosphorylated L1-CAM in injured DRG neuron. 2) Alpha2 delta-1 showed co-localization with phosho-L1-CAM in the dorsal horn. 3) Nerve injury increased the attachment of synaptophysin-ir with alpha2 delta-1and phosho-L1-CAM ir varicosity. 4) Administration of pregabalin decreased Alpha3 delta-1, L1-CAM and phosphp-L1-CAM in the dorsal horn after nerve injury. 5) Administration of pregabalin inhibited the formation of synaptophysin-L1-CAM-ir contact in the dorsal horn of neuropathic pain model rats.

研究分野：疼痛学

キーワード：神経傷害性疼痛 脊髄後角 シナプス 可塑性 接着因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 接着因子について

末梢神経損傷後の脊髄後角において、シナプス・グリア細胞を含めた形態の変化が起こることが示唆されてきた。細胞の形態変化には一般に細胞外との連絡、すなわち他との接着調節の変化が伴う。この因子の相当する細胞間接着因子は我々が研究を開始するまで候補因子は上げられて来なかった。これに対して我々は細胞間接着因子である L1-CAM, CHL1 の痛覚伝導系での発現変化が神経傷害性疼痛に関与する事を報告してきた (Yamanaka et al., Eur J Neurosci, 2007 Yamanaka et al., J Comp Neurol, 2011)。本研究でターゲットとしている L1-CAM は突起伸展とシナプス新生等の形態変化に関与しており (Dityatev et al., Neuron Glia Biol, Review 2009)、これらのことから脊髄後角における接着因子の増加は損傷に伴う神経回路の形態的な再構築を担う原因因子のひとつであろうと考えている。In vitro では神経突起伸長の際に L1-CAM の細胞内のドメインのいくつかの部位のリン酸化が起きるとされている。神経障害性疼痛モデルラットを用いた予備的な実験の結果、損傷を受けて比較的遅いタイムコースでリン酸化 L1-CAM の増加が L1-CAM の脊髄後角での集積と同期して、同様の部位においておきていることが確認されている。また、末梢神経損傷モデルで変化する L1-CAM は Growth associate protein-43 (GAP-43) と共存する。これらを併せてみると、L1-CAM は脊髄後角で動的な形態変化を伴う構造に局在し、その接着活性から、局在した終末領域を形態的に変化させていくことが強く推察される。しかしながら、この局在がシナプスに限定しているのか、或いは新規の形態形成のポイントが軸索上に形成された結果あるか否かについては不明であった。

(2) カルシウムチャンネルについて

末梢神経損傷後に後根神経節(DRG)において N 型カルシウムチャンネルのサブユニットである alpha2 \square elta-1 の発現が上昇する事が知られている。これはチャンネル構成サブユニットではない alpha2 Delta 1 が電位感受性カルシウムチャンネルポアそのものとともに脊髄後角の終末に輸送されて、損傷したニューロンの終末部位からの神経伝達物質のカルシウム依存的な放出を促進しているメカニズムとして扱われてきた。すなわち損傷ニューロンの過常興奮から異常な神経伝達が脊髄後角のニューロンを興奮させているであろうという証左として考えられてきた。この alpha2 Delta 1 発現は主に小型のニューロンで末梢神経損傷後に長期間にわたって増加する事が認められている。この alpha2 \square elta-1 と結合する gabapentin/pregabalin は神経傷害性疼痛治療薬として有効であるが作用機序は上述の神経活動依存的な神経

伝達物質の放出抑制であろう事が想定されてきたが電気生理学的に C 線維の過興奮そのものが不明である事と、アロディニアの症状を引き起こすトリガーとしての神経、すなわち末梢との連絡が intact である A beta 線維と alpha2 Delta 1 が発現増加する損傷した C 線維がどのように関連して痛覚過敏を起こしているのかが不明であった。近年、alpha2 \square elta-1 は細胞外基質と結合してシナプス新生に関与し、gabapentin の薬効メカニズムのひとつにシナプス新生の阻害を行っていることが報告された (Eroglu et al., Cell, 2009)。シナプス新生を担っている L1-CAM と alpha2 \square elta-1 の共存を検討した予備的な実験では alpha2 \square elta-1 の発現上昇は L1-CAM が細胞膜へ集積するニューロンでおきており、gabapentin/pregabalin のターゲットとなっている細胞は L1-CAM の変化が起きているニューロンである事がわかった。この事から神経損傷がもたらす接着因子と alpha2 \square elta-1 の変化とそれに引き続くカルシウムチャンネルが脊髄後角の一次求心性線維の形態の変化に関与しているのではないかと考えられた。しかしながら、上記の分子が脊髄後角での変化についてはどのような構造で増加しているかが明らかにされておらず、シナプス新生に関与する因子でありながら、脊髄後角ではシナプスに局在するかどうか、また末梢神経損傷後のシナプスで増加するかどうかは不明であった。すなわち、シナプス新生・可塑性変化が神経障害性疼痛のメカニズムであると仮定されてもそれが損傷した C 線維由来のシナプスであるという証左は報告されていなかった。また、損傷を受けた C 線維が間接的にせよ脊髄後角でのシナプス再構築に関与しているという報告は本研究開始前には報告されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は神経傷害性疼痛モデルの一次求心性線維における Ca²⁺チャンネルに調節された接着構造異常の発現を明らかにする事である。具体的には Ca²⁺チャンネル Alpha2 Delta 1 サブユニットと同期した発現変動を示す接着因子(L1-CAM, リン酸化 L1-CAM)の変化と、この接着因子集積に対するプレギバリンの抑制とそれに伴うシナプスの再構築の具体的なあり方の解明を目的とする。これにより神経傷害後の一次求心性線維終末の形態変化を介した異常な神経伝達が神経傷害性疼痛の原因である事を示す事である

3. 研究の方法

本研究は末梢神経損傷モデルラットとして坐骨神経の分枝うち坐骨神経の枝である総腓骨神経と脛骨神経を結紮し、腓腹神経 sural nerve を非損傷として残す、Spared nerve injury(SNI モデル)を使用し、L4/5 後根神経節とそれに相当する脊髄を使用して

検討する。組織学的検討以外は新鮮凍結検討項目は以下の5点に集約される。

(1) L1-CAM, リン酸化 L1-CAM, alpha2 Delta 1 蛋白の DRG および脊髄後角での検出・定量。免疫組織化学と Western blotting を使用し、DRG, 脊髄後角でのそれぞれの蛋白の総量と部位別での染色強度による定量を行い、神経損傷により蛋白の移動・リン酸化の程度を検討する。

(2) 上記(1)の損傷ニューロンの終末の形態の検討。以下のマーカー蛋白との位置関係・共存を L1-CAM, Alpha2 Delta 1 について行う。シナプスマーカー (synaptophysin)、樹状突起マーカー (MAP-2)、神経細胞体マーカー (NeuN)、損傷一次求心性線維マーカー (growth associate protein 43: GAP43)、マイクログリアマーカー (Iba1)、アストロサイトマーカー (GFAP)。これらの染色は蛍光抗体を用いた二重または三重染色を行う事で確認し、共焦点レーザー顕微鏡を使用してデータを得る

(3) Alpha2 Delta 1/L1-CAM・リン酸化 L1-CAM 陽性の終末が上記構造と特異的な共存・接触などをしめた場合、これらの検出については共焦点レーザー顕微鏡を用いて3次元的な画像を作成し、またそれが末梢神経損傷モデルで変化した場合、3次元的な画像定量を行う。画像の定量には Bitplane 社の 3D/4D 画像解析ソリューションである Imaris を使用する。デコンボリューション処理は Hygens 社の Huygens deconvolution を使用して行う。

(4) Gabapentin / Pregabalin の投与による上記(1), (2), (3)への影響の検討。髄腔内・腹腔内への Pregabalin の投与を行う。この後に(1)で確認した変化のある構造への影響を(3)の方法を用いて三次元的に定量する。

(5) L1-CAM Ser1181 をリン酸化する Casein kinase2 細胞内シグナルの一次求心性線維での検討。リン酸化 L1-CAM (Ser1181) が Casein kinase2 の投与で変化するかを確認し、シナプス構造を中心に三次元的に解析する。

4. 研究成果

末梢神経損傷モデルラット (Decosterd and Woolf, Pain 2000) を用いて L1-CAM, リン酸化 L1-CAM (Ser 1181), alpha2 Delta-1 の一次求心性線維における発現検討を免疫組織化学にて行った。末梢神経損傷の受傷後、タイムコースを設定して比較的長期の段階まで発現を定量した。その結果、リン酸化 L1-CAM (Ser 1181) の DRG での消失と alpha2 Delta-1 の DRG での増加が同時期に同一ニューロンで起きることが明らかになった。これらは末梢神経損傷後 3 日から 30 日にわたり、有意に確認出来た。

DRG での細胞群の同定 (有髄・無髄線維) や後角の層別の定量も行った結果、上記変化は無髄の損傷ニューロンに限定して確認さ

れた。

レーザー共焦点顕微鏡を用いて L1-CAM, alpha2-Delta-1 pL1-CAM が脊髄後角で末梢神経損傷後に共存する事を確認した。この共存構造を詳細に検討した結果、CGRP ガラニンなどのペプチドの貯留とシナプスマーカーとの接触を認めた。シナプスマーカーとの接触は三次元的画像の解析により定量した結果、その接触構造は末梢神経損傷後に増加していることがわかった。この変化に対してプレガバリンの投与を行った結果、(1) alpha2 Delta-1 の輸送障害による脊髄後角での低下、(2) L1-CAM 陽性終末の減少、(3) pL1-CAM のリン酸化阻害が確認され、このモデルを共焦点レーザー顕微鏡を用いて三次元的画像解析を行った結果、プレガバリンの投与はシナプスが L1-CAM に接している数を抑制していることがわかった。また、脊髄後角の介在ニューロンに特異的に発現している抑制性終末・興奮性終末のそれぞれのマーカー蛋白との共存から、L1-CAM 陽性終末に接しているシナプスは脊髄後角の介在ニューロンのものである事が強く示唆された。プレガバリンの投与と同様の結果を、L1-CAM の Ser1181 を特異的にリン酸化するキナーゼであるとされる Casein kinase II 阻害剤の投与からも得ており、これらのことから末梢神経損傷後の脊髄後角シナプスの構造変化は alpha2 Delta 1 の下流で Casein kinase II によって L1-CAM のリン酸化が起こることによって引き起こされる事がわかった。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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
山中 博樹 (YAMANAKA, Hiroki)
兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：20340995