

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670643

研究課題名(和文) 疼痛を惹起する新規因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of new molecules that elicit hyperalgesia

研究代表者

山下 俊英 (YAMASHITA, Toshihide)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10301269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はネトリンファミリーの一つであるNetrin-4が疼痛発症に関与していることを見いだした。Netrin-4は成体脊髄において後角2層内側に局在する介在神経細胞に発現していた。Netrin-4遺伝子が欠損した動物の痛覚刺激に対する応答について検討したところ、神経障害性疼痛および炎症性疼痛が引き起こされないことを見いだした。一方で、脊髄髄腔内にNetrin-4タンパク質を投与すると、動物は痛覚過敏を示した。Netrin-4は脊髄神経細胞に発現するUnc5B受容体と結合して、チロシン脱リン酸化酵素SHP2を活性化させることでアロディニアを引き起こすことがわかった。

研究成果の概要(英文)：We demonstrate that Netrin-4, a member of the axon guidance molecule family, was expressed in dorsal horn inner lamina II excitatory interneurons of rat spinal cord. A similar expression pattern for Netrin-4 was also observed in human spinal cord. Behavioral analysis revealed that Netrin-4 mutant rats showed abolishment of tactile and heat hyperalgesia that occurs after peripheral nerve injury or inflammation. Transient suppression of Netrin-4, or its receptor Unc5B, after injury could prevent allodynia. Conversely, intrathecal Netrin-4 protein administration to naive rats enhanced excitatory synaptic transmission in the dorsal horn and induced allodynia, suggesting Netrin-4 is involved in spinal sensitization. Furthermore, Unc5B receptor and activation of tyrosine phosphatase SHP2 mediated Netrin-4-induced pain signal in the spinal cord.

研究分野：神経科学

キーワード：疼痛 神経

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は発症機序が非常に複雑でいまだに根本的な治療方法が開発されていないことが臨床上の重大な問題となっている。有効な治療薬を開発する為には、神経障害性疼痛の発症・維持に関わる分子メカニズムを明らかにし、新規標的分子を同定する必要がある。特に疼痛発症の主な原因箇所である、脊髄後角内での現象および機構を明らかにすることは、疼痛治療薬の開発のために非常に重要である。我々は神経障害性疼痛に関与する因子として、ネトリン (Netrin) に着目した。ネトリンは細胞外基質ラミニンに類似した構造を持っている分泌タンパク質である。過去の知見から、ネトリンは発生・発達期の軸索ガイダンス、細胞移動、細胞生存、神経突起形成、シナプス形成に関与していることが報告されているが、成体脳における役割はほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、疼痛を惹起する新規因子としての Netrin-4 の役割を解明することを目的とする。脊髄の感覚伝導路において Netrin-4 を発現する細胞を同定し、その受容体を含めたシグナル伝達機構を明らかにする。Netrin-4 の欠失 (ノックアウト動物) によって神経障害性疼痛および炎症性疼痛が緩和されるかどうかについて、病態モデルを用いて検討する。Netrin-4、その受容体、あるいは下流のシグナルが分子標的となりうるかという疑問に対して、一過性の Loss of function study を施行し解答を得る。得られた知見により、Netrin-4 が疼痛発症に関与する新規因子であることを示す。本研究によって、疼痛発症因子としての Netrin-4 の基盤を確立し、Netrin-4 を標的とした神経障害性および炎症性疼痛治療薬の開発に繋がる成果を得ることを到達目標とする。

3. 研究の方法

(1) Netrin-4 の発現パターンの解析

Netrin-4 の脊髄での発現について解析する。

(2) Netrin-4 ノックアウトマウスの感覚伝導路の形態学的な解析

Netrin-4 ノックアウトラットにおいて、感覚伝導路が発生の段階で障害されていないかについて検証する。侵害受容刺激を伝達する末梢神経回路が Netrin-4 ノックアウトラットでどのように変化しているのか解剖学的手法を用いて明らかにする。

(3) Netrin-4 ノックアウトラットの痛み関連行動の解析

Netrin-4 の末梢神経回路形成における関与を明らかにするために、Netrin-4 ノックアウトラットの解析を行う。

(4) Netrin-4 ノックアウトラットにおける神経障害性および炎症性疼痛の解析

Netrin-4 の神経障害性疼痛の発症への関与について明らかにするために、坐骨神経部分絞扼 (Seltzer) モデルを作製し機械刺激に対する応答について調べる。

また、神経障害に基づかない疼痛にも Netrin-4 が関与しているのかどうか解析を行う。完全フロイントアジュバント (CFA) を Netrin-4 ノックアウトラットの後肢裏に注入して慢性炎症性疼痛モデルを作製する。Netrin-4 ノックアウトラットで痛覚過敏は惹起されないかどうかについて検討する。以上の実験により、Netrin-4 が様々な種類の疼痛の発症メカニズムに広く関与しているかという疑問に答えることができる。

(5) Netrin-4 を標的とした治療応用の可能性の検討

Netrin-4 の一時的な発現抑制によって、神経障害性疼痛および慢性炎症性疼痛が観察されなくなるかどうかを検証する。末梢神経損傷後に、siRNA あるいはアンチセンスオリゴを脊髄髄腔内に投与して Netrin-4 の一時的な発現抑制をおこない、痛覚過敏の抑制が観察されるかどうか解析する。

(6) Netrin-4 によって惹起されるシグナル伝達機構の解析

Netrin-4 の受容体としては DCC および Unc5H が知られている。Netrin-4 による疼痛シグナルを伝える受容体を同定することは、基礎的にも重要な知見となるが、薬剤開発の点でも極めて重要である。まずこれらの分子について、特に脊髄後角での発現部位を詳細に検討する。その後、Loss of function の実験を行う。末梢神経損傷後に、siRNA あるいはアンチセンスオリゴを脊髄髄腔内に投与して、当該受容体の一時的な発現抑制をおこない、痛覚過敏の抑制が観察されるかどうか解析する。

4. 研究成果

Netrin-4 ノックアウトラットは、ノックアウトした遺伝子が GFP に置き換えられているため、このラットを用いて Netrin-4 蛋白の局在を解析することができる。特に脊髄後角での発現部位を詳細に検討した。その結果、後角 2 層の内側のニューロンに発現しており、末梢からの入力を修飾する介在ニューロンが標的分子を発現しているのではないかと考えられた。

Netrin-4 ノックアウトラットにおいて、感覚伝導路が発生の段階で障害されていないかについて検証した。侵害受容刺激を伝達する末梢神経回路が Netrin-4 ノックアウトラットでどのように変化しているのか解剖学的手法を用いて明らかにした。Netrin-4 を発現している脊髄後角 2 層ニューロンをゴルジ染色法を用いて可視化し、その神経支配（樹状突起とスパインの形態等）を観察した結果、異常は認められなかった。特に脊髄における神経細胞の形態学的な異常の有無を免疫染色で検討、さらに回路の異常の有無について検証したが、異常は認められず、発達期の神経回路の異常の可能性は低いと考えた。

Netrin-4 ノックアウトラットには、繁殖及び

臓器・器官形成に顕著な異常は観察されない。Netrin-4 の神経障害性疼痛の発症への関与について明らかにするために、坐骨神経部分絞扼（Seltzer）モデルを作製し機械刺激に対する応答について調べた。野生型では機械刺激に対する閾値が減少する痛覚過敏が観察されるが、Netrin-4 ノックアウトラットでは閾値の低下が消失した。また、神経障害に基づかない疼痛にも Netrin-4 が関与しているのかどうか解析を行った。完全フロイントアジュバント（CFA）を Netrin-4 ノックアウトマウスの後肢裏に注入して慢性炎症性疼痛モデルを作製した。この場合も、Netrin-4 ノックアウトラットで痛覚過敏は惹起されなかった。以上の実験により、Netrin-4 が様々な種類の疼痛の発症メカニズムに広く関与していることが示された。

一方で、脊髄髄腔内に Netrin-4 タンパク質を過剰に投与すると、動物は痛覚過敏を示した。すなわち脊髄の Netrin-4 は動物の痛覚刺激に対する応答をコントロールする役割を担い、神経障害性疼痛発症の原因遺伝子であることが分かった。

Netrin-4 の一時的な発現抑制によって、神経障害性疼痛および慢性炎症性疼痛が観察されなくなるかどうかを検証した。末梢神経損傷後に、Netrin-4 siRNA を脊髄髄腔内に投与して Netrin-4 の一時的な発現抑制をおこない、痛覚過敏の抑制が観察されるかどうか解析した。一時的な発現抑制によって疼痛の発症を抑えることが出来たことから、Netrin-4 の一時的な発現抑制という戦略による治療応用の可能性が拓かれた。

さらに、Netrin-4 は脊髄神経細胞に発現する Unc5B 受容体と結合して、チロシン脱リン酸化酵素 SHP2 (Src homolog 2 domain-containing tyrosine phosphatase) を活性化させることでアロディニアを引き起こすことがわかった。Unc5B siRNA あるいは SHP2 阻害剤を脊髄髄腔内に投与すると神経障害性モデルにお

る機械性アロディニアの発症が抑制された。
以上の研究結果から、Netrin-4→Unc5B→SHP2
という全く新規の疼痛発症のシグナル経路を
明らかにすることが出来た。

脊髄後角の神経細胞に発現する Netrin-4 は、
脊髄後角内において疼痛を惹起する因子で
あることが示された。

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)

[学会発表](計 2件)

早野泰史、山下俊英(2015) 脊髄介在ニ
ューロンが発現する Netrin-4 は中枢感
作を引き起こす、第91回日本解剖学会
近畿支部学術集会、口演、京都
(2015.11.28)

早野泰史、山下俊英(2015) Unc5B 受容
体結合分子群による脊髄感作の新規分子
メカニズム、生理学研究所研究会「痛み
の理解を目指した 先端的アプローチ」
口演、岡崎(2015.12.18)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molneu/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

山下 俊英 (YAMASHITA, Toshihide)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10301269