

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26670692

研究課題名(和文)新規神経栄養因子MANFの小胞体ストレス軽減作用を介した神経障害性痛治療の可能性

研究課題名(英文)Therapeutic possibility of MANF, a new class of nerve growth factor, against neuropathic pain.

研究代表者

天谷 文昌 (Amaya, Fumimasa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60347466

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)：MANFは小胞体ストレスにより誘導されるタンパクであり、海馬では神経保護的な作用を示す。本研究では末梢神経損傷後の一次知覚神経における小胞体ストレスとMANF発現の関係を調査した。ラットSNLモデルを作成し、痛覚過敏を行動解析により調査するとともに、L4、L5神経節を採取して小胞体ストレスマーカーとMANFの発現を定量した。ERストレスマーカー、MANFともに神経損傷により増加した。ERストレス阻害剤pifithrinは痛覚過敏とMANFの発現が抑制し、神経損傷後のERストレスがMANFを介して神経障害性痛に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：MANF is induced by ER stress and acts protectively in the hippocampus. In this analysis, we investigated the expression of MANF and pain hypersensitivity after the peripheral nerve injury. Rats were treated with SNL model. Pain hypersensitivity was assessed by behavioral analysis. ER stress marker and MANF expression was analyzed in the DRG. Expression of ER stress marker and MANF was increased in SNL model. ER stress inhibitor pifithrin reduced pain hypersensitivity and MANF expression after the SNL. Nerve injury induced ER-stress might lead to the development of neuropathic pain via MANF expression.

研究分野：疼痛治療医学

キーワード：小胞体ストレス MANF SNL

## 1. 研究開始当初の背景

Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF)は2003年に発見された神経栄養因子で、パーキンソン病モデルラットにおいてドーパミンニューロンの細胞死を抑制し、中大脳動脈結紮モデルの虚血領域を減少させる神経保護作用を持つ。MANFはERストレス応答性を持ち、アストロサイトのERストレスを軽減させ、炎症性サイトカインの放出を抑制することが知られている。末梢神経損傷や糖尿病性神経症では知覚神経とともにグリア細胞が活性化し、炎症性サイトカインなどを分泌して神経障害性痛を発病することが知られている。グリア細胞を活性化させる外的因子としてATPやCXCL3、HMGB-1などのシグナルの存在が知られているが、グリア細胞内で生じる変化は不明である。

## 2. 研究の目的

- (1) 神経障害性痛モデルの脊髄後角および一次知覚神経におけるERストレスの状態とMANFの発現を明らかにする。
- (2) MANFを髄腔内に投与し、未処置ラットおよび神経障害性痛モデルラットの痛覚閾値の変化を観察、痛覚過敏への効果を明らかにする。
- (3) MANFを神経障害性痛モデルラットに投与し、脊髄後角におけるグリア細胞の活性化とERストレスが抑制されるか明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経障害性痛モデルにおけるERストレス応答の状態とMANFの発現解析

モデル動物の作成  
雄性SDラットを用いる。神経障害性痛モデルとしてラット脊髄神経結紮(SNL)モデル

と糖尿病性神経症(ストレプトゾトシン投与:STZ)モデルを作成する。

### ERストレス応答の評価

これらのラットより後根神経節と脊髄後角を採取する。組織を処理しmRNAとタンパクを抽出、リアルタイムPCRならびにウェスタンブロッティングによってGRP78、CHOP、sXBP1など、ERストレス発生時に増加する遺伝子を定量する。処置後の時系列に沿って定量し、それぞれのモデルにおいて痛覚過敏が発現するタイミングとERストレス応答活性化の時期の関係を明らかにする。組織切片を作成し、免疫組織化学法を用いてGRP78、CHOP、sXBP1を発現する細胞を同定する。脊髄組織においては二重組織化学法を用いて、陽性細胞が神経(NeuN抗体陽性)、アストロサイト(GFAP陽性)、マイクログリア(OX42陽性)のいずれであるかを確認する。

### MANFの発現解析

ラットSNLモデルおよびSTZモデルより後根神経節と脊髄後角を採取する。我々はMANF遺伝子の発現量をリアルタイムPCRで測定する系を確立しており、これらの組織に応用する。同時にウェスタンブロッティングによってMANFタンパクを定量する。さらに、これらの組織から切片を作成し免疫組織化学法によって組織学的にMANF陽性細胞を検出する。発現の解析はMANFだけでなくその相同体であるCDNFについても施行する。

### (2) MANF投与による痛覚閾値の変化

雄性SDラットを用いる。髄腔内にPE10カニューレを挿入し髄腔内への薬剤投与を可能にする。カニューレ挿入後MANFを投与し、経時的に痛覚閾値を測定する。痛覚閾値は熱刺激(radiant heat刺激)と機械刺激(von

Frey 刺激)を用いる。

### (3)ER ストレス刺激剤による痛覚閾値の変化

ER ストレス刺激剤である Tunicamycin を投与し、経時的に痛覚閾値を測定する。痛覚閾値は熱刺激 (radiant heat 刺激) と機械刺激 (von Frey 刺激)、冷刺激 (acetone 刺激) を用いる。後根神経節や脊髄後角を採取して mRNA を抽出し、リアルタイム PCR や免疫組織化学法により GRP78、CHOP、sXBP1 など、ER ストレス発生時に増加する遺伝子を定量する。

### (4) ER ストレス抑制剤による痛覚過敏と MANF 発現の変化

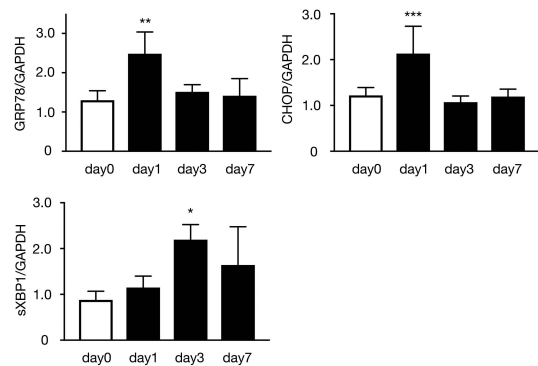
ER ストレス抑制剤である Salubrinal を SNL モデルまたは STZ モデルラットに投与し、経時的に痛覚閾値を測定する。痛覚閾値は熱刺激 (radiant heat 刺激) と機械刺激 (von Frey 刺激)、冷刺激 (acetone 刺激) を用いる。後根神経節や脊髄後角を採取して mRNA を抽出し、リアルタイム PCR や免疫組織化学法により GRP78、CHOP、sXBP1 など、ER ストレス発生時に増加する遺伝子を定量する。同時に MANF の発現も評価する。

## 4. 研究成果

### (1)神経障害性痛モデルにおける ER ストレス応答の状態と MANF の発現解析

ラットに SNL モデル、STZ モデルを作成し、行動解析により痛覚過敏が生じていることを確認した。脊髄および後根神経節を採取して両モデルにおける ER ストレスタンパクの発現を定量した。

SNL モデルにおいては、処置 1-3 日後の後根神経節において GRP、CHOP、sXBP1 の発現が増加していることをリアルタイム PCR により確認した(図)。免疫組織化学法により、GRP、



CHOP、sXBP1 は後根神経節の一次知覚神経に発現していることが明らかとなった。

一方、脊髄組織においては GRP、CHOP、sXBP1 の発現に変化を認めなかった。STZ モデルにおいては、後根神経節および脊髄において、GRP、CHOP、sXBP1 の発現は変化しなかった。SNL モデルにおいて、後根神経節における MANF の発現は増加した。後根神経節において、MANF は一次知覚神経に発現していた。脊髄における MANF の発現に変化は認めなかった。STZ モデルにおいては、後根神経節や脊髄の MANF 発現に変化は生じなかった。

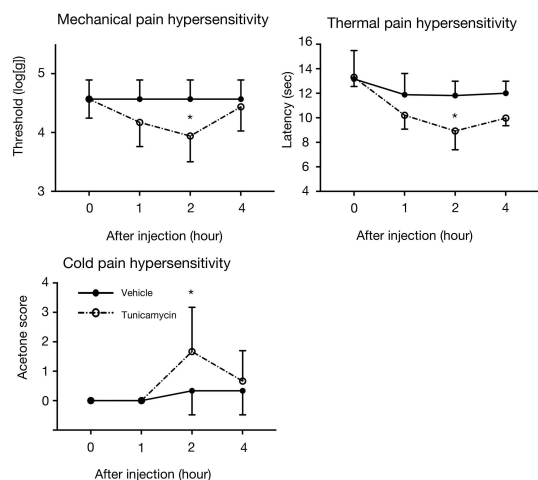
### (2) MANF 投与による痛覚閾値の変化

髄腔内に留置したカテーテルから MANF を投与し、投与後の痛覚過敏の有無について行動解析を行った。しかしながら、機械刺激・熱刺激に対する応答に変化を認めず、痛覚受容に対する MANF の影響はあきらかではなかった。

### (3)ER ストレス刺激剤による痛覚閾値の変化

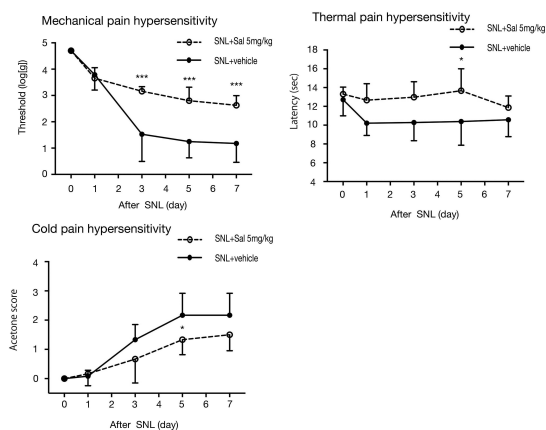
慢性痛モデルにおける GRP、CHOP、sXBP1 の発現変化より、後根神経節細胞の ER ストレスが慢性痛と関連することが示されたため、ER ストレス刺激剤 Tunicamycin を後根神経節近傍に投与して行動解析を行い、痛覚閾値の変化を調べた。Tunicamycin 投与後には機械刺激、熱刺激、冷刺激に対する応答の亢進が生じ、痛覚過敏を来していることが明らかと

なった(図)。Tunicamycin 投与後には後根神経節における GRP の発現は上昇していた。



#### (4) ER ストレス抑制剤による痛覚過敏と MANF 発現の変化

SNL モデルに ER ストレス抑制剤である Salubrinal を投与し、行動解析を行って痛覚閾値の変化を調べた。Salubrinal 投与群では SNL による痛覚過敏が有意に抑制された(図)。



Salubrinal 投与群における後根神経節での CHOP 発現は有意に抑制された。

#### 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)

[雑誌論文](計 5 件)

(1) Yamakita S, Horii Y, Takemura H, Matsuoka Y, Yamashita A, Yamaguchi Y, Matsuda M, Sawa T, Amaya F. Synergistic activation of ERK1/2 between A-fiber

neurons and glial cells in the DRG contributes to pain hypersensitivity after tissue injury. Mol Pain. 2018 in press. (査読有)

(2) Oh-Hashi K, Sugiura N, Amaya F, Isobe KI, Hirata Y. Functional validation of ATF4 and GADD34 in Neuro2a cells by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. Mol Cell Biochem. 440: 65-75, 2018 (査読有)

(3) Yamakita S, Matsuda M, Yamaguchi Y, Sawa T, Amaya F. Dexmedetomidine prolongs levobupivacaine analgesia via inhibition of inflammation and p38 MAPK phosphorylation in rat dorsal root ganglion. Neuroscience. 361: 58-68, 2017. (査読有)

(4) Matsuda M, Oh-Hashi K, Yokota I, Sawa T, Amaya F. Acquired Exchange Protein Directly Activated by Cyclic Adenosine Monophosphate Activity Induced by p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Primary Afferent Neurons Contributes to Sustaining Postincisional Nociception. Anesthesiology. 126: 150-162, 2017. (査読有)

(5) Norisada J, Hirata Y, Amaya F, Kiuchi K and Oh-hashii K. A Comparative Analysis of the Molecular Features of MANF and CDFN. PLoS One. 11: e0146923, 2016. (査読有) [学会発表](計 2 件)

(1) Yamaguchi Y, Matsuda M, Oh-hashii K, Amaya F. Expression of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in rat dorsal root ganglion. 16th World Congress on Pain. 2016 September 26-30;

Yokohama, Japan.

(2) Matsuda M, Yamakita S, Yamaguchi Y, Izumi Y Amaya F. Nerve injury increases cAMP sensor Epac1 and Epac2 in the distinct subgroups of DRG neurons. Annual meeting of Society for Neuroscience 2014. 2014 November 15-19; Washington DC, USA.

## **6 . 研究組織**

### (1)研究代表者

天谷 文昌 (Amaya Fumimasa)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60347466

### (2)研究分担者

大橋 憲太郎 (Oh-hashii Kentaro)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号：50332953