

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26890025

研究課題名(和文) BMPシグナルによる侵害受容ニューロン機能制御の分子・神経メカニズムの解析

研究課題名(英文) Molecular and neurophysiological basis of the functional regulation of nociceptive sensory neurons by the BMP signaling pathway

研究代表者

本庄 賢 (HONJO, Ken)

筑波大学・生命環境系・特任助教

研究者番号：50731866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者のこれまでの研究から、侵害受容ニューロンにおけるBMPシグナル経路の亢進が、侵害受容過敏を引き起こすことがわかってきた。本研究では、生体内で侵害受容ニューロンの活動を観察する新たなイメージング法を確立し、それを用いてBMPシグナル経路が亢進した侵害受容ニューロンでは、熱に対する神経応答が異常に上昇していることを見出した。この結果は、BMPシグナル経路が侵害受容ニューロンの生理機能制御を通じて、痛覚の調節に関わっている可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In my previous study, it has been suggested that the activation of BMP signaling pathway in nociceptive sensory neurons leads to a sensitized nociception. In this study, I established a new imaging method to observe responses of nociceptive sensory neurons in vivo. Using the imaging technique, I found that the neuronal responses to noxious heat was abnormally exaggerated in nociceptive sensory neurons with hyperactive BMP signaling. This result raises the possibility that BMP signaling can be a regulator of nociception which controls it through regulating neurophysiological functions of nociceptive sensory neurons.

研究分野：神経行動遺伝学

キーワード：ショウジョウバエ 侵害受容 痛覚 BMP

1. 研究開始当初の背景

痛みは肉体の機能異常を知らせる重要な警告シグナルであり、我々の生存に必要不可欠である。しかし一方で、過度または慢性的に続く非適応的な痛みは、逆に心身の健康を損なう疾病として治療が必要である。日本人の成人を対象とした 2010 年の大規模調査では、日本人の成人の 2 割以上が慢性的な痛みで悩まされており、その 7 割近くが痛みへの治療効果に満足していないという結果が報告されている(Yabuki et al., 2012)。現存利用されている鎮痛薬は非常に限られた分子経路のみを標的にしており、効果と副作用の面で課題が残されている。より有効な、副作用の少ない鎮痛法の開発には、痛覚シグナルの分子・神経機構の解明、そして新しい創薬ターゲットの発見が必要不可欠である。

侵害受容ニューロンは、組織損傷の可能性をもつ侵害性刺激に特化した感覚ニューロンである。侵害受容ニューロンの興奮は痛みの知覚の引き金であり、侵害受容ニューロンの異常興奮は慢性的な痛み(慢性疼痛)の主要原因の一つと目されている(Gold and Gebhart, 2010)。従って、このニューロンの機能調節に関わる分子機構の理解は、疼痛および慢性疼痛の分子機序を理解する上で重要であると考えられる。これまでに、侵害受容ニューロンの機能とその調節に重要な因子として、サイトカイン等の様々な細胞外因子と、それにより活性化される細胞内シグナル経路、そしてその調節をうける侵害性刺激受容体等のエフェクター分子が多数同定されてきた。しかし、侵害受容ニューロンの機能調節に関わる分子経路の理解は、まだまだ十分とは言えない。

脳・神経機能の分子基盤を理解する上でショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) が有効なモデル動物であることは既に広く認められているが、ショウジョウバエ幼虫が侵害性刺激に特異的な侵害受容反応(横転回避反応、ローリング)を示すことが発見されたのを端緒に、ショウジョウバエは侵害受容のモデルとしても広く利用され始めている(図1)。近年、ショウジョウバエと哺乳類の間で痛覚シグナル分子がよく保存されていることを示す結果が次々と報告されており、ショウジョウバエは我々の痛覚の分子基盤を理解する上で有用なモデルであることも証明されつつある(Tracey et al., 2003; Neely et al., 2010; Milinkeviciute et al., 2012)。

申請者のこれまでの研究から、ショウジョウバエ幼虫を利用した侵害受容ニューロンの機能に関わる新規分子の探索から、BMP シグナル経路が侵害受容ニューロンの機能調節に関わることを示す結果を得た。しかし、BMP シグナル経路が神経機能を調節するとことを示す知見はほとんどなく、その具体的なメカニズムは不明であった。

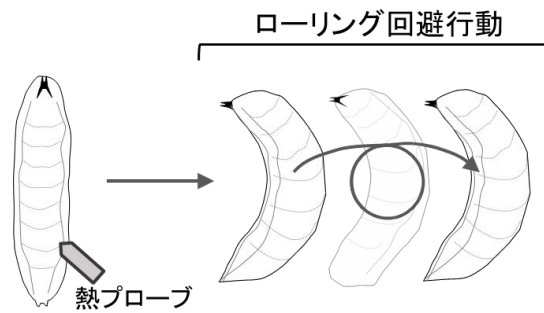


図1. 幼虫の侵害受容反応。

ショウジョウバエの幼虫は 39 を超える高温や 30mN 以上の機械刺激など、組織を傷害する危険性のある刺激に対し、横転による特徴的な回避行動を示す。この反応は閾値よりも低い温度刺激や機械刺激に対しては見られないことから、侵害刺激に対する痛覚応答であると考えられる。また、このローリングは幼虫が通常見せる蠕動運動とは明確に区別できることから、侵害受容の明確な指標として利用することができる。

2. 研究の目的

申請者の行ってきたの先行研究から、侵害受容ニューロンでの BMP シグナル経路の亢進が侵害受容過敏を引き起こすことがわかってきた。しかし、その具体的なメカニズムは不明である。先行研究で、行動実験直前の 24 時間に限り侵害受容ニューロンで BMP シグナル経路を亢進させた場合、痛覚神経形態異常を伴わずに侵害受容過敏が生じることがわかった。この結果は、BMP シグナルが神経形態ではなく、何らかの神経生理機能の調節により侵害受容過敏を引き起こすことを示唆している。そこで、本研究では(1) 神経機能イメージングにより、侵害受容ニューロンで BMP シグナル経路が亢進した際に変化している神経生理機能の同定を目的とした。

また、BMP シグナル経路は転写調節因子 Smad のリン酸化による核内移行調節を介し、様々な遺伝子の発現調節を行うことが知られる。侵害受容ニューロンにおいても、核内のリン酸化 Smad の増加と侵害受容反応の過敏化に相関関係が認められることから、侵害受容の過敏化に関わる遺伝子は BMP 経路下流で Smad を介した遺伝子発現調節を受けている可能性が高い。そこで、本研究では(2) 侵害受容ニューロンから抽出した mRNA サンプルの RNA-seq 解析により、侵害受容ニューロンで BMP シグナル経路の下流で発現調節をうける遺伝子の網羅的同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) BMP シグナル経路が侵害受容ニューロンの機能を調節する神経生理学的メカニ

ズムを調べるために、まずショウジョウバエ幼虫の侵害受容ニューロンにおける神経活動イメージング法を確立し、このイメージング法と蛍光カルシウムセンサーの GCaMP、蛍光膜電位センサーの ArcLight、そしてシナプス伝達の蛍光センサーである SynaptopHluorinなどを組み合わせ(図2)、BMP シグナルの亢進で過敏化した侵害受容ニューロンで生じている神経生理学的変化の可視化を行う。これらの蛍光センサーは神経細胞内の異なる神経生理学的活動を可視化することができるため、それぞれのセンサーを用いてイメージングを行うことで、BMPシグナルの亢進で変化している神経生理学的プロセスを絞り込むことができると予想される。

(2) 侵害受容ニューロンで BMP シグナル経路の下流で発現調節を受け過敏化に関わる遺伝子の網羅的同定を行うために、組織特異的な mRNA の抽出法として、Translating Ribosome Affinity Purification (TRAP) 法が利用できる。TRAP 法は GFP を結合させたリボソームタンパク質 RpL10A を用い、翻訳中の mRNA をそれに結合しているリボソームを介した免疫沈降により回収する手法である。GFP 結合 RpL10A を細胞種特異的に発現させることで、特定の細胞からの mRNA の回収を実現できる。TRAP 法による特定の神経細胞からの mRNA 抽出はすでにマウス、ショウジョウバエ等で実施されているが、幼虫侵害受容ニューロンで用いた報告はないことから、まずこの方法の有効性を確認する。次に、TRAP 法により侵害受容ニューロンから特異的に mRNA を抽出し、BMPシグナルが亢進した侵害受容ニューロンで発現が変化している遺伝子の RNA-seq 解析による網羅的同定を行う。

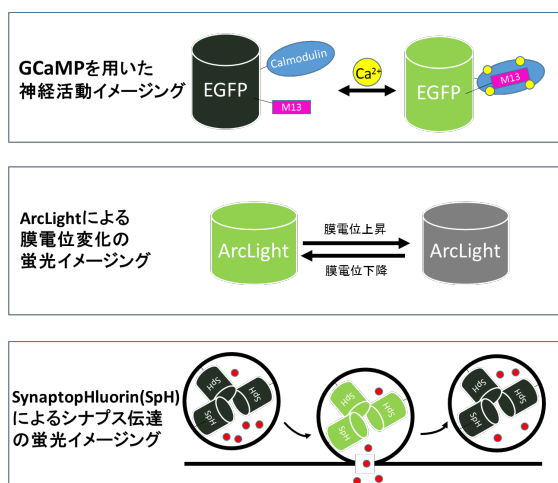


図2 .GCaMP、ArcLight、SpHを用いたイメージングの概略図。GCaMP(上段)はカルシウムイオンと結合した時に蛍光強度が上昇する蛍光タンパクセンサーであり、神経細胞が興奮した際のカルシウムイオン

流入を可視化できる。ArcLight(中段)は膜電位依存的に蛍光強度が変化する蛍光タンパクセンサーであり、神経細胞の膜電位変化を可視化できる。SynaptopHluorin(下段)は pH 依存的に蛍光強度が変化する蛍光タンパクセンサーであり、シナプス小胞が細胞膜に融合した際の、小胞内の pH 変化をとらえることで、シナプス伝達を可視化することができる。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエ幼虫の侵害受容ニューロンにおける GCaMP を利用した神経活動イメージング法を確立することができた。今回確立したイメージング法は、50 以上の高い温度刺激に対する侵害受容ニューロンの応答も記録することが可能であり、これまでに報告されている方法に比べて、より高温域まで幅の広い温度領域に対する侵害受容ニューロンの応答を安定的に記録することができると考えられる。

この手法を用いて BMP シグナルの亢進した侵害受容ニューロンの熱刺激に対する応答性を観察したところ、正常な侵害受容ニューロンに比べて、熱刺激によって生じるカルシウムイオン流入の顕著な増加が認められた。この結果は、BMP シグナルの亢進により侵害受容ニューロンの熱刺激に対する興奮性が上昇したことを意味し、これまでの結果と合わせると、BMP シグナルの亢進は、侵害受容ニューロンの興奮性を亢進させることで神経の過敏化を引き起こしている可能性を示唆するものである。この結果はこれまで得られている研究結果と合わせて、現在投稿論文として準備中である。

また、GCaMP を用いた幼虫の侵害受容ニューロンの熱刺激に対する応答の観察の中で、侵害受容ニューロンの熱への応答性が、温度の変化率に依存するというこれまで報告されていない新しい熱応答特性を発見した。ショウジョウバエ幼虫の侵害受容ニューロンの熱応答特性の分子機構は未だ十分に解明されておらず、本研究で明らかになった新しい熱応答特性がどのようなメカニズムで生じているかは、今後研究を進めていきたいと考えている。

一方、ArcLight と SynaptopHluorin を用いたイメージング実験では、センサーの蛍光変化の小ささから、熱応答によるシグナルとサンプルの微小な動きなどによるノイズを区別することが難しいことが判明した。これらのセンサーを利用したイメージングにはイメージング中のノイズの低減が必要であると考えられ、今後イメージング法の改良を試みたいと考えている。

(2) TRAP 法を利用した幼虫侵害受容ニューロンからの mRNA 回収のために、TRAP 法に利用する GFP 結合 RpL10 タンパク質を幼虫の侵害受容ニューロン特異的に発現す

るショウジョウバエ系統を作成した。現在この系統からの mRNA 抽出の条件を検討しており、十分な mRNA 試料が精製でき次第、RNA-seq 解析を行う予定である。

5．主な発表論文等

6．研究組織

(1)研究代表者

本庄 賢 (HONJO, Ken)

筑波大学・生命環境系・特任助教

研究者番号：50731866