

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590724

研究課題名(和文) 神経損傷誘導性糖蛋白 Gpnmb がイオンチャネル活動調節・痛み情報伝達に果たす役割

研究課題名(英文) The roles of glycoprotein non-metastatic melanoma B (Gpnmb) in the modulation of ion channel activities and pain conduction

研究代表者

横山 茂 (SHIGERU, Yokoyama)

金沢大学・子どものこころの発達研究センター・特任教授

研究者番号：00210633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの坐骨神経切断部および脊髄損傷受傷部位において、糖タンパクGpnmb (glycoprotein non-metastatic melanoma B) の発現上昇が認められた。免疫組織染色を行ったところ、損傷部位近傍のGpnmb免疫反応陽性細胞の少なくとも一部は、ED1、OX6、あるいはOX42陽性であった。Gpnmbはマクロファージあるいはミクログリアで産生され、末梢および中枢神経系の損傷に伴う病態変化に關与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The expression of glycoprotein non-metastatic melanoma B (Gpnmb) was up-regulated in both sciatic nerve and spinal cord injuries. In the lesioned sites, Gpnmb-immunoreactive cells were co-stained with markers including OX-42, ED1, and OX6. These results suggest that Gpnmb, which is produced by macrophages and microglia, may play important roles in pathophysiological processes in both peripheral and central nerve injuries.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：痛み 神経損傷 Gpnmb

1. 研究開始当初の背景

神経が障害を受けると、感覚神経線維および交感神経線維の異常発芽が認められる。さらに、障害部位と神経細胞体で異常自発性放電と刺激に対する反応過敏が観察される。このような膜興奮異常は、膜電位依存性ナトリウム(Na^+)チャネルとカリウム(K^+)チャネルの活動状態、発現量の相対的变化のために生じると推測され、神経障害性疼痛、自発痛、痛覚過敏、アロディニアの要因と考えられている。これまでの研究から、これらの病的疼痛に關与する Na^+ チャネルのサブタイプとして、Nav1.3、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9 が重要視されている (Dib-Hajj, S. et al. *Ann. Rev. Neurosci.* 33, 325-347, 2010)。一方、 K^+ チャネルでは、Kv1.1、Kv1.2、Kv1.4 (Rasband, M. N. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13373-13378, 2001)、Kv3.4、Kv4.3 (Chien, L. Y., et al. *J. Neurosci.* 12, 9855-9865, 2007) の關与が報告されている。

しかしながら、これらのチャネルの活動状態、発現量を変化させる分子メカニズムについては、十分に解明されていない。ブラディキニン等の古典的な発痛物質によるチャネル活動変調はかなり解明されているが、その大部分は、チャネル蛋白のリン酸化等による短期的な反応機構である。また神経成長・栄養因子 (NGF: nerve growth factor; GDNF: glial cell-line derived neurotrophic factor 等) がチャネルの発現量を変化させ、発芽を促進すること知られてきたが (Navarro, X. *Int. Rev. Neurobiol.* 87, 483-505, 2009 など)、受容体とチャネルの局在が一致しない (Fukuoka, T. et al. *J. Comp. Neurol.* 510, 188-206, 2008 など)。このため、既存の知見によって、疼痛の成立機序を完全に説明することは困難な状況にある。

われわれは、膜電位依存性 Na^+ および K^+ チャネルの脊髄後根神経節における発現局在をメッセンジャーRNA (mRNA) あるいはタンパクレベルで解明してきた。さらに、坐骨神経軸索切断ラットの後根神経節において膜電位依存性 K^+ チャネル(Kv1.2)の mRNA とタンパクが減少することも見出している。これら研究を通じて、神経損傷受傷部位で産生される未知の分子が、神経線維の異常発芽に加えて膜電位依存性 Na^+ チャネルの発現増加並びに K^+ チャネルの発現低下をもたらすという仮説を持つに至った。(Yokoyama, S., Takeda, H., & Higashida, H. *Ann. NY Acad. Sci.*, 868, 454-457, 1999; Felts, P. A., Yokoyama, S., Dib-Hajj, S., Black, J. A., & Waxman, S. G. *Mol. Brain Res.*, 45, 71-82, 1997 など)

これまでに主要なサイトカインを調べたが、IL-1 β 、IL-6、TNF α は疼痛、軸索変性を来さない緩徐な坐骨神経伸張によっても誘導され、必要十分なものとは思われない。(Osamura, N., Ikeda, K., Ito T., Higashida, H., Tomita, K., & Yokoyama, S. (*Exp. Neurol.*

195, 61-70, 2005; Hagiwara, N., Ikeda, K., Higashida, H., Tomita, K., & Yokoyama, S. *J. Orthop. Sci.* 10, 614-621, 2005; Ito, T., Ikeda, K., Tomita, K., & Yokoyama, S. *Neurosci. Lett.* 472, 104-108, 2010)

以前より、われわれは上記の研究と並行して、坐骨神経切断端で発現誘導される遺伝子のクローニングを試みてきた。成体ラットの左坐骨神経を切断し、近位側断端および健常な右坐骨神経幹から mRNA を抽出した。さらに、cDNA 合成、サブトラクション・ハイブリダイゼーション法を行い、cDNA クローン約 150 個を得て部分塩基配列を決定した。これらがコードするタンパク分子が疼痛発生に關与するか否かという視点から新しい知見が得られるのではないかと考えるに至った。

これらの中でも、今回の研究対象に選んだ Gpnmb (Glycoprotein non-metastatic melanoma b) タンパクは、以下の性質から有力な候補と考えられた。

(1) 正常の中樞神経組織のマクロファージ、ミクログリアの一部に発現し (Huang, J.-J. and Yokoyama, S. *Brain and Behavior* 2, 85-96, 2012) 坐骨神経損傷、脊髄損傷時の発現上昇が認められ。

(2) 坐骨神経切断端のマクロファージ、脊髄後角のミクログリア細胞に発現が認められる。

(3) 黒色腫細胞から最初にクローン化された I 型膜蛋白であるが、蛋白分解 (ectodomain shedding) により、液性因子として放出され骨芽細胞等の分化誘導を促進するという報告がある。神経系における Gpnmb タンパクは、神経膠芽腫の浸潤・転移促進因子として研究されてきただけで、非腫瘍性の神経組織での働きは全く不明である。これらの点から、従来からの神経栄養因子、サイトカインとは異なる新しい範疇の情報伝達であることが期待される。

2. 研究の目的

神経障害性疼痛発生に關与する新規分子を同定する。この目的のために、Gpnmb タンパクを対象にし、以下の点を調べる。

(1) Gpnmb タンパクが感覚ニューロンの膜電位依存性 Na^+ チャネルの発現上昇あるいは膜電位依存性 K^+ チャネルの発現低下を持続的にもたらし、一次求心性線維あるいは交感神経線維の発芽を誘導する活性を持つかどうか調べる。

(2) さらに、Gpnmb タンパクが神経障害性疼痛発生に關与するかどうかを、動物モデルで検証する。

3. 研究の方法

Gpnmb タンパクが神経障害性疼痛発生に關与することを証明するために、以下の5つの実

験をおこなう計画した。

- (1) 神経損傷部位での Gpnmb タンパク発現の確認
- (2) Gpnmb タンパクの調製
- (3) Gpnmb 過剰発現および Gpnmb 発現抑制用 siRNA 発現ウイルスベクターの作製
- (4) 培養細胞における電気生理学的測定
- (5) 神経突起伸展活性の測定
- (6) 個体レベルでの疼痛の評価

4. 研究成果

Gpnmb の mRNA レベルが成体ラットの左坐骨神経切断時の近位および遠位断端で上昇し、非傷害側 (右) では変化しないことを、RNA プロットおよび逆転写ポリメラーゼ連鎖反応によって確認した。Gpnmb の mRNA は正常坐骨神経にも低レベルではあるが検出された。Gpnmb 特異的な抗体を用いて免疫染色を行ったところ、正常坐骨神経では Gpnmb 免疫反応性は S100 タンパク陽性細胞の一部に強く認められた。坐骨神経切断端では、強い Gpnmb 免疫反応性が OX-42、ED1 あるいは OX6 陽性の細胞に認められた。この Gpnmb 免疫反応性は坐骨神経切断後 5 - 7 日後に最高レベルに達し、約 1 か月の間に消褪していった。これらの観察から、Gpnmb は正常時はシュワン細胞に発現しているが、神経損傷・炎症に際して浸潤する単球・マクロファージ系の細胞で高発現されることを示していることが示唆された (Yokoyama, S. and Yanagida, N. Soc. Neurosci. Abstr., 438.21, 2012; Yokoyama, S. Soc. Neurosci. Abstr., 813.15, 2013)。しかしながら、S100 タンパク、OX42、ED1 あるいは OX6 のマーカーで必ずしも全ての Gpnmb 陽性細胞が標識できないこともあり、他の細胞 (マーカー) についても注意深い検索が必要であると思われた。

成体ラットの脊髄損傷モデルを用いて Gpnmb の免疫染色を行ったところ、切断後 5 日後の損傷部近傍において、Gpnmb 免疫反応

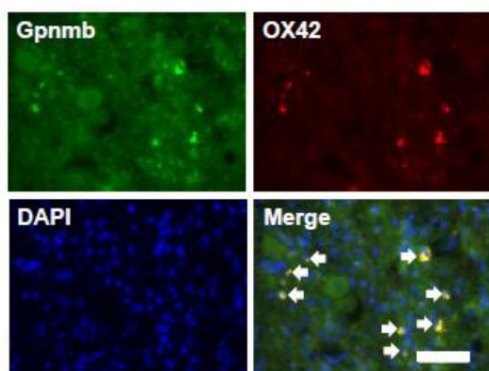


図 1 Gpnmb タンパクの脊髄損傷部位での発現 切断損傷受傷後約 5 日のラット胸髄を抗 Gpnmb 抗体、OX42 抗体および DAPI で共染色した。Gpnmb 免疫反応性が OX42 陽性細胞の細胞内に認められる (白矢印)。スケール、50 μ m。

性 ED1 あるいは OX6 陽性の細胞に認められた (図 1)。Gpnmb は中枢神経系の損傷、変性、炎症過程にも関与することが示唆された。

さらに、ラット Gpnmb の cDNA を大腸菌用発現ベクターに組み込み、これを大腸菌に導入して融合タンパクの発現を行ったところ、予想される分子量のタンパクの大量発現が確認された (図 2)。しかしながら、この融合タンパクは封入体を形成している模様で、可溶化、精製するのに適当な界面活性剤を見つけられなかった。このため、3. 研究方法 (3)

(6) の実験に進むことができなかった。現在も可溶化、精製するための条件を検討中である。また併せて、カイコウイルスの発現系も試みている。

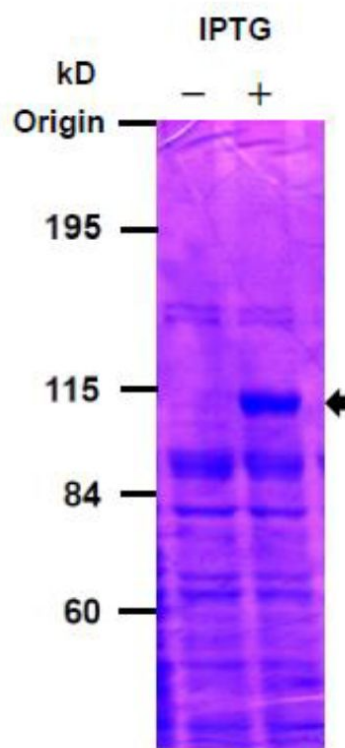


図 2 Gpnmb タンパクの大腸菌発現 ラット Gpnmb の cDNA を大腸菌発現用ベクターに組み込み、大腸菌に導入し、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) を加えて発現誘導を行った。誘導前 (-) には認められなかった約 110 kD のバンドが誘導後 (+) に認められた (黒矢印)。

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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

1. Huang, J.-J., and Yokoyama, S. (2014). Enhanced expression of glycoprotein non-metastatic melanoma B in macrophages and microglia in inflamed

rat brain. The 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience. November 19 (November 15-19), 2014, Walter E. Washington Convention Center, Washington DC, MD, U.S.A. (Soc. Neurosci. Abstr., 807.09)

2. Yokoyama, S. (2013). Cellular localization of glycoprotein non-metastatic melanoma B in axotomized rat sciatic nerve. The 43rd Annual Meeting of Society for Neuroscience. November 13 (November 9-13), 2013, San Diego Convention Center, San Diego, CA, U.S.A. (Soc. Neurosci. Abstr., 813.15)
3. 横山茂 末梢神経切断・伸張動物実験モデルの遺伝子発現解析から神経再生医療を考える 第4回神経再生医療研究会 in Sapporo 特別講演 2013年2月6日 第一三共株式会社札幌支店3階会議室 札幌
4. Yokoyama, S., and Yanagida, N. Up-regulation of glycoprotein non-metastatic melanoma B in axotomized rat sciatic nerve. The 42nd Annual Meeting of Society for Neuroscience. October 13-17, 2012, Ernest N. Memorial Convention Center, New Orleans, LA, U.S.A. (Soc. Neurosci. Abstr., 438.21)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

横山 茂 (YOKOYAMA, Shigeru)
金沢大学・子どものこころの発達研究センター・特任教授
研究者番号：00210633

(2)研究分担者

吉川 弘明 (YOSHIKAWA, Hiroaki)
金沢大学・保健管理センター・教授
研究者番号：10272981