

一次求心性A 線維のイオンチャネル発現異常が神経障害性疼痛発生に与える影響

著者	横山 茂
著者別表示	Yokoyama Shigeru
雑誌名	平成17(2005)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	2003-2005
ページ	11p.
発行年	2007-05-07
URL	http://doi.org/10.24517/00049439



一次求心性 A β 線維のイオンチャネル発現異常が
神経障害性疼痛発生に与える影響

15500255

平成 15 年度～平成 18 年度科学研究費補助金
(基盤研究(C))研究成果報告書

平成 19 年 5 月 7 日

研究代表者 横山 茂

金沢大学医学系研究科助教授

金沢大学附属図書館



0800-04467-3

<はしがき>

末梢感覚ニューロンが損傷されると、損傷部位及び脊髄後根神経節の細胞体において異常自発性放電が観察される。この現象は、神経損傷、糖尿病、帯状疱疹をはじめとする多くの疾患に伴う疼痛の要因と考えられている。旧来の電気生理学的研究に基づいて、この自発性放電現象はナトリウム(Na^+)チャンネルとカリウム(K^+)チャンネルの相対的な活動状態の変化によるものとして説明されている。しかしながら、今日多数の膜電位依存性 Na^+ 並びに K^+ チャンネルの遺伝子が同定されているにもかかわらず、この現象を分子生物学的あるいは生化学的に掘り下げて解析した研究はない。

これまで研究で我々は、電位依存性 Na^+ 、 K^+ チャンネルの脊髄後根神経節における発現および局在をメッセンジャーRNA (mRNA)あるいは蛋白レベルで明らかにしてきた。さらに坐骨神経切断ラットの脊髄後根神経節での予備実験から、(i)膜電位依存性 Na^+ チャンネルの特定のサブタイプの mRNA が増加することと、(ii)膜電位依存性 K^+ チャンネルの特定のサブタイプの mRNA と蛋白が減少することを見出しつつある。

我々は神経障害性疼痛の発生機序として、一次感覚ニューロンの損傷受傷部位で誘導される未知の分子がもたらすシグナルが逆行性に核に伝達され、膜電位依存性イオンチャンネル遺伝子群の転写活性を増減させるという作業仮説を立てている。この仮説の検証のために、本研究では損傷ニューロンで異常発現を示す電位依存性 Na^+ 、 K^+ チャンネルのサブタイプを特定し、その遺伝子発現を調節する誘導因子を同定することを試みた。

研究組織

研究代表者：横山 茂 (金沢大学大学院医学系研究科助教授)

研究分担者：池田和夫 (金沢大学医学部附属病院講師)

研究分担者：東田陽博 (金沢大学大学院医学系研究科教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	1,000,000	0	1,000,000
平成 16 年度	800,000	0	800,000
平成 17 年度	600,000	0	600,000
平成 18 年度	600,000	0	600,000
総計	3,000,000	0	3,000,000

研究発表

(ア) 学会誌等

Jin D., Liu, X.-X., Lopatina, O., Hashii, M., Yokoyama, S., Koizumi, K., Amina, S., Shuto, S., Shiraishi, Y., Tanaka, S., and Higashida, H. (2007). Oxytocin released from mouse hypothalamus and nerve endings by extracellular application of beta-NAD⁺ and cyclic ADP ribose. *Nature Protocols*. DOI: 10.1038/nprot.2007.214.

Jin, D., Liu, H.-X., Hirai, H., Torashima, T., Nagai, T., Lopatina, O., Schayder, N., Yamada, K., Noda, M., Seike, T., Fujita, K., Takasawa, S., Yokoyama, S., Koizumi, K., Shiraishi, M., Tanaka, S., Hashii, M., Yoshihara, T., Higashida, K., Islam, Md., Yamada, N., Hayashi, K., Noguchi, N., Kato, I., Okamoto, H., Matsushima, A., Salmina, A., Munesue, T., Shimizu, N., Mochida, S., Asano, M., and Higashida, H. (2007). CD38 is critical for social behavior by regulating oxytocin secretion. *Nature* 446, 41–45.

Higashida, H., Bowden, S. E. H., Yokoyama, S., Egorova, A., Hashii, M., Hoshi, N., Zhang, J.-S., Knijnik, R., Noda, M., Zhong, Z.-G., Takeda, H., Akita, T., Kuba, K., Yamagishi, S., Shimizu, N., Takasawa, S., Okamoto, H., and Robbins, J. (2007). Overexpression of constitutively active form of human CD38/ADP-ribosyl cyclase enhances acetylcholine-induced M(KCNQ)-current inhibition in rodent NG108-15 neuroblastoma cells. *Neurosci. Res.* 57, 339–346.

Higashida, H., Salmina, A., Hashii, M., Yokoyama, S., Zhang, J.-S., Noda, M., Zhong, Z.-H., and Jin, D. (2006). Bradykinin activates ADP-ribosyl cyclase in neuroblastoma cells: intracellular concentration decrease in NAD and increase in cyclic ADP-ribose. *FEBS Lett.* 580, 4857–6850.

Hagiwara, N., Ikeda, K., Higashida, H., Tomita, K., and Yokoyama, S. (2005). Induction of tumor necrosis factor- α in Schwann cells after gradual elongation of rat sciatic nerve. *J. Orthop. Sci.* 10, 614–621.

Osamura, N., Ikeda, K., Ito T., Higashida, H., Tomita, K., and Yokoyama, S. (2005). Induction of interleukin-6 in dorsal root ganglion neurons after gradual elongation of rat sciatic nerve. *Exp. Neurol.* 195, 61–70.

Johansson, J. U., Lilja, L., Chen, X.-L., Higashida, H., Meister, B., Noda, M., Zhong, Z.-G., Yokoyama, S., Berggren, P.-O., and Bark, C. (2005). Cyclin-dependent kinase 5 activators p35 and p39 facilitate formation of functional synapses. *Mol. Brain Res.* 138, 215–227.

Higashida, H., Hoshi, N., Zhang, J.-S., Yokoyama, S., Hashii, M., Duo, J., Noda, M., and Robbins, J. (2005). Protein kinase C bound with A-kinase anchoring protein is involved in muscarinic receptor-activated modulation of M-type KCNQ potassium channels. *Neurosci. Res.* 53, 231–234.

Hoshi, N., Zhang, J.-S., Omaki, M., Takeuchi, T., Yokoyama, S., Wanaverbecq, N., Langeberg, L., Yoneda, Y., Scott, J. D., Brown, D. A., and Higashida, H. (2003). AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists. *Nature Neurosci.* 6, 1–7.

Higashida, H., Mochida, S., Chen, X.-L., Shin, Y., Zhang, J.-S., Noda, M., Hossain, K. Z., Hoshi, N., Hashii, M., Shigemoto, R., Nakanishi, S., Fukuda, Y., and Yokoyama, S. (2003). Subtype-specific coupling with ADP-ribosyl cyclase of metabotropic glutamate receptors in retina, cervical ganglion and NG108-15 cells. *J. Neurochem.* 85, 1148–1158.

Macica, C. M., von Hehn, C. A. A., Yang-Wang, L., Ho, C. S., Yokoyama, S., Joho, R. H., and Kaczmarek, L. K. (2003). Modulation of the Kv3.1b potassium channel isoform adjusts the fidelity of the firing pattern of auditory neurons. *J. Neurosci.* 23, 1133–1141.

(イ) 口頭発表

横山 茂 神経損傷部位で発現誘導される遺伝子群の探索 平成 18 年度金沢大学重点経費シンポジウム「損傷中枢神経の再生」2007 年 2 月 9 日 金沢大学医学部記念館

伊藤貴明, 池田和夫, 富田勝郎, 東田陽博, 横山 茂 培養ラットシュワン細胞におけるインターロイキン 6 (IL-6) による末梢ミエリン蛋白 22 (PMP22) mRNA の発現誘導 第 21 回日本整形外科学会基礎学術集会 2006 年 10 月 19, 20 日 長崎

横山 茂 軸索損傷後の末梢神経で誘導される遺伝子群の探索 第 53 回中部日本生理学会 2006 年 9 月 28 日 山梨大学甲府キャンパス教育人間科学部総合研究棟

横山 茂 軸索損傷後の末梢神経で誘導される遺伝子群の探索 第 3 回脳細胞・発達・学習・記憶分子シンポジウム 革新脳科学 COE・金沢大学十全医学会・脳医科学専攻合同シンポジウム 2006 年 9 月 23 日 金沢大学医学部記念館

Kin, T., Ryu, K., Hashii, M., Yokoyama, S., Koizumi, K., Lopatina, O. L., Islam, S. Md., and Higashida, H. Trial of social behavior tests in ordinal house mice. 第 49 回日本神経化学学会大会 2006 年 9 月 15 日 名古屋国際会議場

檜木茂, 池田和夫, 橋本典之, 船木清人, 伊藤貴明, 富田勝郎, 東田陽博, 横山 茂 軸索切断後のラット座骨神経における VI 型プロコラーゲン $\alpha 1$ の mRNA の誘導 第 47 回日本手の外科学会学術集会 2004 年 4 月 22, 23 日 大阪

納村直希, 池田和夫, 富田勝郎, 東田陽博, 横山 茂 末梢神経慢性伸張モデルの脊髄後根神経節における Interleukin-6 mRNA の発現について 第 47 回日本手の外科学会学術集会 2004 年 4 月 22, 23 日 大阪

Higashida, H., Mochida, S., Chen, X.-L., Shin, Y., Zhang, J.-S., Noda, M., Hossain, K. Z., Hoshi, N., Hashii, M., Shigemoto, R., Nakanishi, S., Fukuda, Y., and Yokoyama, S. Subtype-specific coupling with ADP-ribosyl cyclase of metabotropic glutamate receptors in retina, cervical superior ganglion

and NG108-15 cells. 第76回日本生化学会大会 2003年10月15-18日 横浜

Higashida, H., Zhang J.-S., Mochida, S., Chen, X.-L., Shin, Y., Noda, M., Hossain K. Z., Hoshi, N., Hashii, M., Shigemoto, R., Nakanishi, S., Fukuda, Y., and Yokoyama, S. Subtype-specific coupling with ADP-ribosyl cyclase of metabotropic glutamate receptors in retina, cervical superior ganglion and NG108-15 cells. (代謝型グルタミン酸受容体とADPリボシルシクラーゼとのサブタイプ特異的なカップリング) 第26回神経科学大会 2003年7月23-25日 名古屋

Osamura, N., Ikeda, K., Hagiwara, N., Hinoki, S., Tomita, K., Higashida, H., and Yokoyama, S. Expression of Interleukin-6 (IL-6) mRNA at the Dorsal Root Ganglia –Gradual Nerve Elongation Model– 8th Annual meeting of American Society for Peripheral Nerve. 2003 Palm Springs, CA, U.S.A.

檜木茂, 池田和夫, 納村直希, 萩原教夫, 橋本典之, 伊藤貴明, 富田勝郎, 東田陽博, 横山 茂 軸索切断後のラット座骨神経近位断端で発現誘導される遺伝子群のクローニングと解析 第18回日本整形外科学会基礎学術集会 2003年小倉

Osamura, N., Ikeda, K., Hagiwara, N., Hinoki, S., Tomita, K., Yokoyama, S., and Higashida, H. Expression of Interleukin-6 mRNA at the Dorsal Root Ganglia – Gradual Nerve Elongation Model– 9th Congress of the Federation of the European Societies for Surgery of the Hand. June 25–28, 2003 Lisbon, Portugal [Proceeding: Osamura, N., Ikeda, K., Hagiwara, N., Hinoki, S., Tomita, K., Yokoyama, S., and Higashida, H. (2003). Expression of interleukin-6 mRNA at the dorsal root ganglia – gradual nerve elongation model -. 9th Congress of the Federation of the European Societies for Surgery of the Hand. Proceedings (ed. By Ferreira, A. C.) pp. 59-62. (Lisbon, June 25–28, 2003)]

(ウ) 出版物

横山茂 膜電位依存性イオンチャネルの分子構造, 多様性と神経機能調節 金沢大学十全医学会誌 115: 130-133 (2007)

東田陽博, 星直人, 横山茂 イオンチャネルと結合するアンカリング蛋白 AKAP の役割 生体の科学 55: 129-132 (2004)

東田陽博, 横山茂, 星直人 イオンチャネル 伊藤正男監修 脳神経科学 三輪書店 pp. 289-301 (2003)

研究成果

1. 損傷受傷一次感覚ニューロンにおけるイオンチャネルの発現変化 (論文投稿準備中)

経過および結果は、以下の通りである。

(1) ラット膜電位依存性 K⁺チャネル(Kv1.1 と Kv1.2)のアミノ末端に対する抗体を作製した。Kv1.1 あるいは Kv1.2 の相補 DNA を導入した COS-7 細胞で特異的な染色が認められた。いずれの抗体でも、ラット小脳膜分画を用いたウェスタンブロット解析において、約 75kD の特異的なバンドが確認された。

(2) 正常ラット腰部脊髄後根神経節と三叉神経節を蛍光抗体法によって染色したところ、Kv1.1 あるいは Kv1.2 陽性の細胞は中～大型であり、その 50%以上はニューロフィラメント (RT97) にも同時陽性であった。IB4 (イソレクチン) あるいはペリフェリンと同時陽性の細胞は僅かであった。

(3) 脊髄後角の免疫組織染色では、Kv1.1、Kv1.2 の反応性は深部 III-IV 層で顕著であった。

(4) ラットヒラメ筋の免疫組織染色では、Kv1.1 および Kv1.2 の反応性が螺旋状の構造物に認められた。この部位は、抗ニューロフィラメント抗体にも反応性を示したことから、感覚ニューロンの末梢側の筋感覚受容体として特殊な構造とっていると考えら、Kv1.1 および Kv1.2 チャネルは筋感覚受容体近傍の活動電位の発生調節に関与することが推測された。

(5) 成体ラットの前脛部に蛍光標識金コロイドを注入して脊髄後根神経節内の細胞体を蛍光標識したところ、その一部はKv1.1あるいはKv1.2についても陽性であった。

(6) 成体ラットの坐骨神経を結紮した疼痛モデルでは、腰部脊髄後根神経節ニューロンの細胞体でKv1.1およびKv1.2の免疫反応性の低下が認められた。

以上の(1)～(6)の結果から、Kv1.1、Kv1.2チャンネルの正常神経における役割は、筋および皮膚に分布する非侵害性感覚受容ニューロンにおける活動電位の大きさ、頻度、伝播等の調節であることが示唆された。また、神経損傷後にこれらのチャンネルの発現低下が、非痛覚(触覚、振動覚、温度覚等)ニューロンと二次痛覚ニューロンとの異所性シナプスの形成と相俟って、痛覚過敏、アロディニアで観察される過剰膜興奮をもたらす可能性が推測された。

2. 軸索損傷後の末梢神経で誘導される遺伝子群の探索

哺乳動物の末梢神経軸索が損傷されると、損傷部位より遠位側はWaller変性に陥り軸索は消失する。一方、近位側断端では軸索の再生が始まる。これらの生体反応が生じる際には、多数の分子の発現が誘導されることが予想されている。しかしながら、従来の多くの研究にもかかわらず、これらの分子群の全貌は未だに明らかにされていない。また、このような中に膜電位依存性チャンネルの発現量を変化させる分子が存在すると予想される。本研究では、坐骨神経伸長モデルおよび坐骨神経切断モデルを用いて、分子同定を試みた。

(1) 坐骨神経伸長モデル (Osamura et al., 2005; Hagiwara et al., 2005)

成体ラットの左大腿骨にステンレス製のピンを固定し、骨切り後に坐骨神経を延長した。伸長速度によって1.0、2.0、20.0 mm/日の3群に分けて、いずれ

のグループも合計 20.0 mm まで伸長した。伸張した神経のトルイジン・ブルー染色を行ったところ、Waller 変性は 1.0、2.0 mm/日群では認められなかったが、20.0 mm/日群では顕著であった。

次に、腰部脊髄後根神経節および坐骨神経から RNA を抽出し、インターロイキン 1 β (IL1 β)、インターロイキン 6 (IL6)、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、神経成長因子 (NGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、ニューロトロフィン 3 (NT-3)、ニューロトロフィン 4/5 (NT-4/5) に特異的なプライマーを用いて、半定量的 RT-PCR を行った。腰部脊髄後根神経節では、IL1 β 、IL6 の mRNA 量が上昇がし、TNF α 、NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5 の mRNA 量に有意な変化は認められなかった。伸長した坐骨神経では、TNF α の mRNA 量が上昇がし、IL1 β 、IL6、NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5 の mRNA 量に有意な変化は認められなかった。腰部脊髄後根神経節および坐骨神経におけるこれらの mRNA 発現量の上昇は、Waller 変性が認められない 1.0、2.0 mm/日群でも有意であった。

これらの結果から、IL6、TNF α をはじめとするサイトカインは、損傷を受けたニューロン、シュワン細胞で誘導、分泌される主要な因子であることが想定された。

(2) 坐骨神経切断モデル (投稿準備中)

成体ラットの左坐骨神経を切断し、3-7 日後に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。cDNA 合成の後、サブトラクシオン・ハイブリダイゼーション法を行い、cDNA クローン約 150 個を得た。これらの塩基配列を決定し、GenBank/EMBL/DDBJ に登録されているデータと比較したところ、89%が既存の配列と一致もしくは高い相同性を示した。コードされるタンパクの内訳は、細胞外マトリックスおよび細胞膜表面分子 25%、細胞骨格関連分子 14%、

リン酸化酵素等の代謝酵素 18%、分泌タンパク 11%、RNA 合成関連分子 4%、タンパク合成関連分子 4%、細胞周期・DNA 複製関連分子 3%、その他 21%であった。

3. 今後の展開と計画

損傷後の末梢神経では多数の遺伝子の発現が誘導されることが確認された。今後、これらの遺伝子産物が膜電位依存性チャネル（特に Kv1.1 と Kv1.2）の発現量を変化させるかどうか、またそのために神経損傷後の疼痛が増強するかどうか、詳細に検討する予定である。