

サイトヘジン2 小胞輸送経路による慢性疼痛の制御機構の解明 ーサイトヘジン2の慢性疼痛の治療標的としての可能性に向けてー

1. 研究の目的

慢性疼痛は、神経の損傷や炎症により生じる痛覚感受性が持続的に亢進した状況で、痛覚過敏や異痛症などを伴うことより、患者のQOLの低下に大きく影響する。慢性疼痛は近年の人口構造や疾病構造の変化により増加しているが、有効な治療法は確立しておらず、その発症機序の解明とそれに基づく創薬・治療法の開発が望まれる。

慢性疼痛の脊髄レベルでの発症機序のひとつとして、脊髄後角ニューロンにおいて、持続的な痛覚刺激によりグルタミン酸受容体が活性化し、持続的な興奮性の亢進を引き起こす可塑的な変化が生じることが知られている。これまでグルタミン酸受容体自体を標的とした阻害剤の慢性疼痛への有効性が動物実験レベルでは示されているが、認知障害や運動失調などの重篤な中枢神経系の副作用から、臨床応用に至っていないのが現状である。そのため、慢性疼痛により特異性の高いグルタミン酸受容体のシグナル経路や制御機構のさらなる解明が病態の理解や新たな治療戦略の開発に重要である。

申請者は、低分子量GTP結合タンパク質ADPリボシル化因子6 (Arf6)により制御される細胞内小胞輸送経路の神経機能の解明を目指し、これまでに学習・記憶の細胞レベルでの基盤現象である海馬のシナプス可塑性において、Arf6経路がグルタミン酸受容体のシナプス発現に関わる主要な小胞輸送経路であることを明らかにしてきた (Fukaya et al., *J. Neurosci.* 2020)。その研究過程で、Arf6の活性化制御因子のひとつであるサイトヘジン2が脊髄後角ニューロンに豊富に発現することを見出し、グルタミン酸受容体制御経路が慢性疼痛と海馬のシナプス可塑性との間で共通性を示すことから、「サイトヘジン2-Arf6小胞輸送経路が、脊髄後角ニューロンでのグルタミン酸受容体依存的な慢性疼痛の新たな制御機構である」可能性を検証する本研究内容を着想するに至った。

本研究は、(1) サイトヘジン2の脊髄後角での発現局在、(2) サイトヘジン2遺伝子欠損マウスを用いた慢性疼痛への機能関与の可能性、(3) 慢性疼痛におけるサイトヘジン2-Arf6の作用機構、(4) 慢性疼痛の治療標的としてのサイトヘジンの可能性を明らかにすることを目的として実施した。

2. 研究の計画

(1) 脊髄後角におけるサイトヘジン2発現局在に関する免疫組織学的解析

サイトヘジン2の脊髄での発現局在を明らかにするために、サイトヘジン2特異抗体を用いて光学及び電子顕微鏡レベルで免疫組織学的検討を行う。

(2) 中枢神経系特異的サイトヘジン2遺伝子欠損マウスを用いた慢性疼痛における機能解析

① 中枢神経系特異的サイトヘジン2遺伝子欠損マウスの樹立

東京薬科大学・山内淳司教授から供与を受けたサイトヘジン2 flox マウスと Nestin プロモーター制御下に中枢神経系に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを交配し、中枢神経特異的にサイトヘジン2遺伝子を欠損する遺伝子改変マウスを樹立する。

② 慢性疼痛モデルにおける行動解析

野生型マウスとCytohesin-2遺伝子欠損マウスを用いて炎症性疼痛モデル（完全フロイトアジュバント投与モデル）と神経障害性疼痛モデル（坐骨神経部分結紮モデル）を作成し、von Frey試験で疼痛感受性の変化を評価する。

③ 慢性疼痛におけるサイトヘジン2の作用機序の解明

疼痛刺激後の脊髄に対して抗リン酸化ERK1/2抗体を用いたウエスタンブロット解析を実施する。

(3) サイトヘジン選択的阻害薬 SecinH3 の髄腔内投与の慢性疼痛への効果の検討

サイトヘジン経路の慢性疼痛における治療標的としての可能性を検討するため、サイトヘジン選択的阻害薬(SecinH3)の髄腔内投与による慢性疼痛の抑制効果を von Frey 試験による疼痛感受性の変化で評価する。

3. 研究の成果

- (1) 脊髄後角におけるサイトヘジン 2 発現局在に関する免疫組織学的解析
成熟期マウスの脊髄腰膨大部において、サイトヘジン 2 は脊髄後角 I / II 層に豊富に発現しており、細胞マーカーとの二重免疫蛍光染色法により、サイトヘジン 2 陽性の後角ニューロンの多くは、興奮性の介在ニューロンや投射ニューロンであることが明らかになった。さらに免疫電子顕微鏡解析により、サイトヘジン 2 は後角ニューロンにおいてシナプス近辺の樹状突起に豊富に分布し、興奮性シナプスにおいてシナプス後肥厚部(PSD)の近傍(ペリシナプス)のシナプス後膜に優位に局在することを見出した。二重免疫蛍光染色法によりサイトヘジン 2 の一部が代謝型グルタミン酸受容体 mGluR5 を共局在すること、さらに mGluR5 もペリシナプスに豊富に局在する報告があることより、免疫沈降法により検討した結果、脊髄においてサイトヘジン 2 は mGluR5 と複合体を形成することを明らかにした。以上の結果より、サイトヘジン 2 は脊髄の後角ニューロンに豊富に発現し、興奮性シナプスのペリシナプスで mGluR5 と複合体を形成し機能する可能性が示唆された。
- (2) 中枢神経系特異的サイトヘジン 2 遺伝子欠損マウスの樹立と慢性痛覚行動解析
サイトヘジン 2 floxマウスとNestinプロモーター制御下Creリコンビナーゼ発現トランスジェニックマウスを交配し、ウエスタンブロット解析及び免疫組織化学解析により中枢神経系特異的にサイトヘジン 2 の発現が消失していることを確認した。次に野生型及び遺伝子欠損型マウスを用いて、足底部への完全フロイトアジュバント投与による炎症性痛覚モデルおよび坐骨神経の部分結紮による神経損傷性痛覚モデルを作成し、von Frey試験により機械的刺激に対する痛覚閾値の変化を行動学的に検討した。その結果、野生型マウスおよび遺伝子欠損型マウスともに、処置後2日をピークに最低7日間持続する痛覚閾値の低下が認められたが、痛覚閾値の低下の程度は遺伝子欠損型マウスにおいて有意に少ないことが判明した。さらに、痛覚刺激後の脊髄において、Arf6の活性化が刺激後12時間にピークを示すことを明らかにした。
- (3) 慢性疼痛におけるサイトヘジン 2-Arf6 の作用機構の解析
サイトヘジン2が脊髄においてmGluR5と複合体を形成すること、mGluR1/5がERK1/2の活性化を介して慢性疼痛の発現に関与することより、サイトヘジン2がmGluR1/5依存的な慢性疼痛の制御に関与する可能性を検討するために、mGluR1/5選択的アゴニストであるDHPGの髄腔内投与により生じる疼痛に対する行動学的変化の野生型と遺伝子欠損型マウス間での相違を検討した。その結果、遺伝子欠損型マウスは野生型に比較して機械的刺激に対する痛覚閾値の低下が少ないことが明らかになり、脊髄ニューロンのサイトヘジン2が、mGluR5の下流シグナル経路として慢性疼痛の発現に関与する可能性が示唆された。さらに、mGluR1/5の主要な下流シグナル経路であるERK1/2の活性化を抗リン酸化ERK1/2抗体を用いたウエスタンブロット解析により検討した結果、遺伝子欠損型マウスの脊髄では、DHPGの髄腔内投与によるERK1/2の活性化が著明に減弱していることが明らかになった。
- (4) サイトヘジン選択的阻害薬 SecinH3 の髄腔内投与の慢性疼痛への効果の検討
サイトヘジンの慢性疼痛に対する治療標的としての可能性を検証するために、SecinH3 を野生型マウスの髄腔内に投与し、炎症性および神経障害性疼痛モデルを作成し、von Frey試験により機械的刺激に対する疼痛閾値を検討した。その結果、SecinH3 の髄腔内投与により SecinH3 非投与群、投与群いずれも疼痛モデル作成後 2 日目で疼痛閾値は低下したが、SecinH3 投与群は、非投与群と比較して疼痛閾値は有意に高かった。さらに Arf6 活性は、SecinH3 非投与群では疼痛モデル作成後 12 時間でピークを示したが、SecinH3 投与群では Arf6 活性の有意な増大は認められなかった。以上の結果は、SecinH3 によるサイトヘジンの阻害は慢性疼痛の緩和を示し治療標的となりうる可能性が明らかになった。

4. 研究の反省・考察

- (1) 脊髄後角ニューロンにおける新たな慢性疼痛制御経路としてのサイトヘジン 2-Arf6 経路

本研究では、免疫組織学的解析および免疫沈降法により、Arf6 活性化制御因子であるサイトヘジン 2 が脊髄の後角ニューロンの興奮性シナプスのペリシナプスに mGluR5 と複合体を形成し局在することを明らかにした。さらに、個体レベルでの疼痛行動解析により、① 中枢神経系特異的サイトヘジン 2 遺伝子欠損マウスにおいて、炎症性および神経損傷性痛覚刺激により生じる持続的な痛覚感受性の亢進の緩和を示すこと、② SecinH3 の野生型マウスの髄腔内投与におけるサイトヘジンの機能阻害により、サイトヘジン 2 遺伝子欠損マウスの表現型と同様に疼痛行動の緩和を示すとともに、脊髄での Arf6 の活性化が抑制されること、③ DHPG 髄腔内投与による脊髄の mGluR1/5 の活性化により生じる痛覚感受性の亢進が、遺伝子欠損型マウスにおいて緩和されることを見出した。これらの結果より、サイトヘジン 2 は、脊髄後角ニューロンにおいて mGluR5 の下流制御経路として Arf6 の活性化を介した疼痛感受性の制御に関与する可能性が強く示唆された。一方、サイトヘジン 2-Arf6 経路による痛覚感受性の制御機構のひとつとして、慢性疼痛の発現に重要な mGluR1/5 の主要な下流シグナル経路である ERK1/2 経路の関与を見出したが、その詳細な分子制御機構については未解決問題として残された。

(2) 慢性疼痛の治療標的としてのサイトヘジン 2-Arf6 経路の可能性

本研究では、髄腔内に SecinH3 の投与による脊髄におけるサイトヘジンの機能阻害により、炎症性および神経損傷性疼痛モデルにおける持続的な痛覚感受性の亢進が緩和されることを見出し、サイトヘジン 2-Arf6 経路の慢性疼痛の新たな治療標的としての可能性を見出した。しかしながら、サイトヘジン 2-Arf6 経路は脊髄後角ニューロン以外に広く神経組織や末梢組織においても発現し、細胞の普遍的な機能に関与していることより、SecinH3 投与により様々な副作用が生じる可能性が考えられ、今後、慢性疼痛の発現過程におけるサイトヘジン 2-Arf6 経路の詳細な分子制御機構の解明により、特異性の高い標的分子の探索が必要であると考えられた。

以上の研究成果は、*Neurobiology of Disease* に 2021 年 11 月号に報告した（研究発表学会誌①）。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Ito A, Fukaya M, Sugawara T, Hara Y, Okamoto H, Yamauchi J, Sakagami H. (2021) Cytohesin-2 mediates group I metabotropic glutamate receptor-dependent mechanical allodynia through the activation of ADP ribosylation factor 6 in the spinal cord. *Neurobiol. Dis.* 159:105466.
- ② Murakami M, Murakami AM, Matsuzaki Y, Sawamura D, Ohba T, Miyoshi I, Itagaki S, Sakagami H. Attenuated β -adrenergic response in calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV-knockout mice. *PLoS One*, 16:e0249932 (2021).
- ③ Ishibashi Y, Shoji S, Ihara D, Kubo Y, Tanaka T, Tanabe H, Hakamata T, Miyata T, Satou N, Sakagami H, Mizuguchi M, Kikuchi K, Fukuchi M, Tsuda M, Takasaki I, Tabuchi A. Expression of SOLOIST/MRTFB i4, a novel neuronal isoform of the mouse serum response factor coactivator myocardin-related transcription factor-B, negatively regulates dendritic complexity in cortical neurons. *J. Neurochem.* 159: 762-777 (2021)
- ④ Chomphoo S, Sakagami H, Kondo H, Hipkew W. Localization of PIP5K γ selectively in proprioceptive peripheral fields and also in sensory ganglionic satellite cells as well as neuronal cell membranes and their central terminals. *J. Anat.* 239: 1196-1206 (2021)
- ⑤ Kawarada L, Fukaya M, Saito R, Kassai H, Sakagami H, Aiba A. Telencephalon-specific Alkbh1 conditional knockout mice display hippocampal atrophy and impaired learning. *FEBS Lett.* 595:1671-1680 (2021)
- ⑥ Nishinarita R, Niwano S, Niwano H, Nakamura H, Saito D, Sato T, Matsuura G, Arakawa Y, Kobayashi S, Shirakawa Y, Horiguchi A, Ishizue N, Igarashi T, Yoshizawa T, Oikawa J, Hara Y, Katsumura T, Kishihara J, Satoh A, Fukaya H, Sakagami H, Ako J. Canagliflozin Suppresses Atrial Remodeling in a Canine Atrial Fibrillation Model. *J Am Heart Assoc.* 10: e017483 (2021)
- ⑦ Kato Y, Ochiai A, Seki Y, Morimoto T, Oizumi H, Ohbuchi K, Mizoguchi K, Yamamoto M, Sakagami H, Miyamoto Y, Yamauchi J. (2021) Phospholipase D and phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 1 are involved in the regulation of oligodendrocyte morphological differentiation. *Exp Cell Res.* 405:112654 (2021)
- ⑧ Sirisin J, Kamnate A, Polsan Y, Somintara S, Chomphoo S, Sakagami H, Kondo H, Hipkew W, Localization of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5K) α confined to the surface of

lipid droplets and adjacent narrow cytoplasm in progesterone-producing cells of in situ ovaries of adult mice. *Acta Histochem.*, 123: 151794 (2021)

(2) 口頭発表

- ① 深谷 昌弘, 伊藤 諭子, 岡本 浩嗣, 山内淳司, 阪上 洋行「マウス脊髄でのcytohesin-2-Arf6経路を介した代謝型グルタミン酸受容体依存的な機械的アロディニアの発症機序」
第44回日本神経科学大会 2021年7月31日

(3) 出版物

該当なし