

2024年度（第49回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	北 里 大 学	研究所名等		
研 究 課 題	神経成長因子による疼痛の新規制御機構としてのArf6小胞輸送 ー小胞輸送経路を標的とした慢性疼痛の治療戦略の創出に向けてー		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①神経成長因子、②慢性疼痛、③末梢感作、④ニューロトロフィン受容体、⑤メンブラントラフィック			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
阪 上 洋 行	北 里 大 学 ・ 医 学 部	教 授	研究の総括

○研究分担者

[illegible]

神経成長因子による疼痛の新規制御機構としての Arf6 小胞輸送

—小胞輸送経路を標的とした慢性疼痛の治療戦略の創出に向けて—

1. 研究の目的

慢性疼痛の発症機序のひとつとして、組織の炎症や神経の損傷により組織局所から分泌された神経栄養因子(NGF)などの様々な液性因子が感覚神経終末に作用し、痛覚の感受性の持続的な亢進が考えられているが、その詳細な分子機構は不明である。また、抗 NGF 抗体を用いた難治性疼痛に対する臨床治験は一定の緩和効果を示したが、副作用のため治療薬として未だ認可されておらず、NGF 疼痛シグナルの制御機構のさらなる解明が求められる。申請者らは、神経内分泌細胞株 PC12 細胞の NGF 依存的な突起形成における低分子量 G タンパク質 Arf6 経路の機能解析の過程で、Arf6 とその活性化因子 EFA6A が NGF 受容体 TrkA の小胞輸送を介して NGF 応答性を調節する新たな制御経路であることを見出しつつある。本研究は自己所見を発展させて、『一次感覚ニューロンにおいて、EFA6A-Arf6 経路が、TrkA の小胞輸送を介した NGF 疼痛シグナルの新たな制御経路である可能性』を個体レベルで検証することを目的とする。本研究により、NGF 疼痛シグナルの新たな分子機構と慢性疼痛の治療法的としての小胞輸送経路の可能性が明らかになることが期待される。

2. 研究の計画

- (1) PC12 細胞における EFA6A-Arf6 小胞輸送の NGF シグナルにおける機能解析
PC12 細胞において EFA6A-Arf6 経路が NGF 依存的な突起形成に関与する結果を既に明らかにしている。その分子機序を明らかにするために、PC12 細胞を用いて、NGF 刺激に伴う TrkA の細胞内小胞輸送における EFA6A-Arf6 の役割に着目して細胞生物学的に検討する。
- (2) 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
EFA6A と Arf 6 の脊髄神経節感覚ニューロンでの発現局在を明確にするため、特異抗体を用いて免疫組織学的に検討する。
- (3) EFA6A 遺伝子欠損マウスを用いた NGF 依存的な痛覚過敏に関する行動学的解析
全身型 EFA6A 遺伝子欠損マウスを用いて NGF 投与による機械的刺激、熱刺激およびカプサイシンなどの化学的刺激に対する疼痛感受性閾値の変化を検討する。
- (4) EFA6A-Arf6 小胞輸送による NGF 疼痛シグナルの制御機構の解明
NGF 刺激に伴う TrkA 下流シグナル経路の活性化と痛覚関連分子(BDNF, CGRP, substance P, TRPV1, など)の遺伝子発現の調節に関して、EFA6A 遺伝子欠損型と野生型間で比較検討する。さらに一次感覚ニューロンにおいて EFA6A-Arf6 経路が TrkA と TRPV1 の小胞輸送を制御する可能性を検証するために、脊髄神経節ニューロンの初代培養を作製し、NGF 刺激後の TrkA と TRPV1 の細胞膜発現量の変化と細胞内動態を経時的に検討する。

3. 研究の成果

- (1) PC12 細胞における EFA6A-Arf6 小胞輸送の NGF シグナルにおける機能解析
TrkA の細胞外領域を認識する抗体を用いて、PC12 細胞の細胞表面に発現する TrkA を標識し、NGF 刺激後の TrkA の細胞内動態を検討した結果、コントロール細胞では、TrkA は NGF 刺激後すみやかに細胞内にエンドサイトーシスされ、刺激後 30 分後には細胞表面での TrkA の発現量が刺激前の 40%程度に減少する。その後、取り込まれた TrkA は早期エンドソームに移行し、刺激後 3 時間後には刺激前の 75%まで回復する。一方、EFA6A ノックダウン細胞では刺激前と刺激後 30 分での TrkA の細胞表面の発現量には差はないものの、刺激後 3 時間後の TrkA 細胞表面発現量の回復は認められない。さらに NGF 刺激前に TrkA 抗体を細胞表面の TrkA に結合させた後、NGF で刺激し、固定する直前に蛍光標識した二次抗体と反応させることにより、処理過程を通して細胞膜に残っていた TrkA および細胞表面にリサイクリングされた TrkA の発現量の経時的な変化を検討した結果、コントロールでは刺激後 30 分で、刺激前に

存在した細胞膜上の TrkA は、細胞内に取り込まれて約 55%程度に減少し、取り込まれた TrkA の約 50%が 3 時間後に細胞膜へリサイクリングされるのに対して、EFA6A ノックダウン細胞では、刺激前と刺激 30 分後にエンドサイトーシスされる TrkA は、コントロールと同程度であるのに対して、3 時間後に細胞膜へリサイクリングされる TrkA が著明に低下していた。以上の結果から、EFA6A は、NGF 刺激後に細胞内に取り込まれた TrkA の細胞膜へのリサイクリングを制御する可能性が明らかになった。

(2) 脊髄神経節における EFA6A の発現局在に関する免疫組織学的解析

脊髄神経節を用いたウエスタンブロット解析により、脊髄神経節において EFA6A は 2 つのアイソフォームのうち、約 110kDa の Sec7 領域を含む EFA6A の発現が検出される一方、Sec7 領域が欠落する短い EFA6As の発現は認められなかった。次に EFA6A 特異抗体を用いてマウス脊髄神経節の発現を免疫組織化学的に検討した結果、EFA6A は小型から中型の一次感覚ニューロンの一部に発現が検出された。さらに一次感覚ニューロンのサブタイプマーカーとの二重染色により、EFA6A 陽性細胞の約 45%が CGRP 陽性ニューロンに、約 20%が IB4 陽性ニューロンと共存した。また、CGRP 陽性ニューロンの約 40%が、IB4 陽性ニューロンの約 15%が EFA6A 陽性であった。また、EFA6A は一次感覚ニューロンの細胞体のみならず、足底部の皮膚の自由終末においても発現が認められた。また、TrkA 陽性細胞の約 50%が EFA6A 陽性を示した。さらに免疫電子顕微鏡解析により、EFA6A は一次感覚ニューロンの主に細胞膜直下に局在する一方、外套細胞には免疫陽性反応は認められなかった。

(3) EFA6A 遺伝子欠損マウスを用いた NGF 依存的な痛覚過敏に関する行動学的解析

全身型 EFA6A ノックアウトマウスを用いて、足底部に NGF を投与し、機械的刺激に対する疼痛感受性閾値を von Frey 法により検討した。その結果、野生型マウスでは NGF 投与側の足底における機械的刺激に対する疼痛感受性閾値が 4 時間後から低下し、1 週間後も持続的に低下が認められるのに対して、ノックアウトマウスでは 4 時間後に低下が認められるものの野生型と比較して有意に閾値は高く、4 日後には投与前の閾値に戻った。

4. 研究の反省・考察

本研究により、PC12 細胞において EFA6A-Arf6 は NGF 刺激に伴いエンドサイトーシスされた TrkA の細胞表面へのリサイクリングする新たな経路であることを見出した。次に脊髄神経節において免疫組織学的検討の結果、Arf6 の活性化因子である EFA6A は脊髄神経節において TrkA 陽性の一次侵害受容ニューロンの一部に発現することが明らかになった。さらに EFA6A 遺伝子欠損マウスは NGF 依存的な疼痛感受性の低下を示すことを明らかにした。これらの結果から、EFA6A-Arf6 経路は NGF シグナルの新たな制御経路であることが示唆された。

しかしながら、今回用いた EFA6A ノックアウトマウスは、全身型ノックアウトマウスであり、脊髄神経節以外の EFA6A の欠損により NGF 依存的な疼痛感受性の低下を引き起こしている可能性は否定できない。今後、脊髄神経節特異的なノックアウトマウスや脊髄神経節での EFA6A の発現によるレスキュー実験などによる確認が必要である。また、実験計画(3)に関しては、実験に十分なマウス数を得ることができずやや計画が遅れている。しかしながら、EFA6A ノックアウトマウス由来の一次ニューロンの初代培養において、PC12 細胞で観察されて所見と同様に、EFA6A が NGF 刺激に伴う TrkA の細胞膜へのリサイクリングに関与することを明らかにしつつある。今後、残された実験計画を完遂する予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Fukaya M, Ibuchi K, Itakura M, Shiroshima T, Hara Y, Sugawara T, Frédéric Luton, Sakagami H. (2024) EFA6A, an exchange factor for Arf6, regulates NGF-dependent TrkA recycling from early endosomes and neurite outgrowth in PC12 cells, *Traffic* 25: e12936.
- ② Nakashima M, Shiroshima T, Fukaya M, Sugawara T, Sakagami H, Yamazawa K, (2024) C-terminal truncations in IQSEC2: implications for synaptic localization, guanine nucleotide exchange factor activity, and neurological manifestations. *J. Hum. Genet.* 69: 119-123.
- ③ Ratchatasunthorn A, Sakagami H, Kondo H, Hipkaseo W, Chomphoo, S, (2024) Temporal

involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase γ in differentiation of Z-bands and myofilament bundles as well as intercalated discs in mouse heart at mid-gestation. *J. Anatomy* 244: 1030-1039.

④ Chomphoo S, Sakagami H, Kondo, H, Hipkæo, W. (2024) Localization of EFA6A, an exchange factor for Arf6, in Z-lines and sarcoplasmic reticulum membranes in addition to myofilaments in I-domains of skeletal myofibers of peri-natal mice. *Acta Histochem.* 126: 152187.

⑤ Ohtsuka S, Miyai Y, Mima H, Magari M, Chiba Y, Suizu F, Sakagami H, Ueno M, Tokumitsu H, (2024) Transcriptional, biochemical, and immunohistochemical analyses of CaMKK13/2 splice variants that co-localize with CaMKIV in spermatids. *Cell Calcium* 117: 102820.

(2) 口頭発表

① 阪上 洋行「ADPリボシル化因子(Arf6)による小胞輸送を介した神経成長因子シグナルの制御と生体機能」第42回日本生化学会北陸支部大会 2024年6月1日

(3) 出版物

該当なし