2025年度（第50回）学術研究振興資金　学術研究報告

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 －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－	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		

〇研究代表者

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

〇研究分担者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
深　谷　昌　浩	北里大学･医療衛生学部	教　　授	実験･データ解析
斉　藤　康　二	北 里 大 学 ・ 医 学 部	講　　師	実験･データ解析

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

慢性疼痛は、「典型的には 3 ヶ月以上持続する、または通常の治癒期間を超えて持続する痛み」と国際疼痛学会(IASP)により定義されている病態により、患者に身体的・心理的に大きな負担を与えるとともに、医療経済的にも深刻な損失を招いている。

慢性疼痛の発症機序として、組織の炎症や神経の損傷により損傷局所より神経成長因子(NGF)をはじめとする様々な液性因子が放出され、神経終末に作用し、痛覚の感受性閾値の低下や興奮性の亢進、さらに可塑的な変化が生じるものを考えられている。しかしながら、慢性疼痛に対する有効な治療法はなく、慢性疼痛の分子機序のさらなる解明とそれに基づく新たな創薬・治療法の開発は喫緊の課題である。

NGF は、発達期の感覚ニューロンや交感神経節後ニューロンの生存や分化に必須の神経栄養因子である一方、組織の損傷や炎症に伴い組織局所で分泌されて、疼痛の惹起や痛覚感受性の亢進を引き起こす。近年、NGF シグナルを標的とした抗体治療薬が開発され、変形性関節症や慢性腰痛の患者の難治性疼痛に対して有意な緩和効果を示し有望視されていたが、重篤な副作用のため未だ実用化に至っていない。したがって、慢性疼痛における NGF シグナル経路の制御機構のさらなる解明が求められる。

研究代表者らは、小胞輸送を制御する低分子量 G タンパク質 Arf6 が、活性化因子 EFA6A により活性化されて、NGF 受容体 TrkA の細胞表面発現を調節することにより、神経内分泌細胞株 PC12 細胞の NGF 依存的な神経突起の形成を制御することを見出した（Fukaya et al., 2024)。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小胞輸送経路を標的とする慢性疼痛の新規治療法の開発に繋がる可能性が期待される。

2. 研究の計画

(1) 脊髄後角における EFA6A 発現局在に関する免疫組織学的解析
脊髄神経節感覚ニューロンでの EFA6A 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。

(2) 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に対する疼痛感受性閾値の変化を検討する。

(3) EFA6A-Arf6 小胞輸送による NGF 疼痛シグナルの制御機構の解明
一次感覚ニューロンにおいて EFA6A-Arf6 経路が、TrkA および侵害刺激受容体である 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、細胞外領域を認識する抗体で細胞表面に発現する TrkA と TRPV1 を標識することにより、NGF 刺激後の TrkA と TRPV1 の細胞表面発現量の変化を経時的に検討する。

3. 研究の成果

(1) 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

EFA6A 特異抗体を用いてマウス脊髄神経節での発現局在を免疫組織化学的に検討した。その結果、EFA6A 陽性反応は小型から中型の一次感覚ニューロンの一部に認められた。TrkA 陽性細胞の約 50%が EFA6A 陽性を示した。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する一方、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。

(2) 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

EFA6A 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの足底部に NGF を投与し、機械的刺激に対する疼痛感受性閾値の経時的な変化を von Frey 法により検討した。その結果、NGF 投与側の足底において、野生型マウスでは疼痛感受性閾値が NGF 投与 4 時間後から低下し、7 日後まで持続的に低下を示した。一方、遺伝子欠損マウスでは NGF 投与 2 日目までは疼痛感受性閾値は刺激前と比較して低下したが、その疼痛感受性閾値は野生型に比べて有意に高かった。さらに、NGF 投与 4 日後には、投与側の測定部の疼痛感受性は投与前のレベルに戻り、さらに NGF 投与反対側の足底の閾値と同等であった。

(3) EFA6A 遺伝子欠損による NGF 刺激後の TrkA 及び TRPV1 の細胞表面発現への影響

脊髄神経節初代培養ニューロンに対して NGF 刺激後の TrkA と TRPV1 の細胞表面発現を細胞外領域に対する抗体を用いて標識し検討した。その結果、野生型においては、NGF 刺激 4 時間後の TrkA の細胞表面発現量は、刺激後前の 20%にまで減少する一方、24 時間後には細胞表面発現量が 50%まで回復した。一方、遺伝子欠損型では、NGF 刺激 4 時間後では野生型と同程度に TrkA 細胞表面量が減少するのに対して、NGF 刺激 24 時間後において野生型で観察された NGF の細胞表面量の増加は認められなかった。次に NGF 刺激前に細胞表面に存在する TrkA を、細胞外領域を認識する抗体で標識した後に、NGF で 30 分間刺激した後、維持培養液を戻して経時的に固定前に、細胞表面に残存する TrkA とリサイクリングにより細胞膜に戻ってきた TrkA の総和となる細胞表面に存在する一次抗体で標識された TrkA を蛍光二次抗体で可視化して検討した結果、野生型では NGF 刺激 30 分後に細胞内に取り込まれて減少した TrkA 表面発現量は、6 時間後にはその一部がリサイクリングされて刺激前の 80%レベルまで回復した。一方、遺伝子欠損型の TrkA 表面発現量は NGF 刺激 30 分後では野生型と同レベルに減少するのに対して、6 時間後での発現量の増加は観察されなかった。これらのことより、脊髄神経節初代培養ニューロンにおいても PC12 細胞と同様に EFA6A-Arf6 経路は NGF 依存的な TrkA のリサイクリングを制御することが明らかになった。さらに、NGF 刺激による TPRV1 細胞表面発現量の経時的変化を検討した結果、野生型では 4 時間後には TPRV1 細胞表面発現量が約 40%増加し、24 時間においても持続するのに対して、遺伝子欠損型では NGF 刺激 4 時間および 24 時間後において、TPRV1 細胞表面発現量は変化せず、刺激前と同レベルであった。以上のことより、EFA6A は NGF 依存的な TrkA と TPRV1 の小胞輸送経路の制御を介して痛覚感受性に関与する可能性が示唆された。

4. 研究の反省・考察

本研究により、EFA6A 遺伝子欠損マウスは、NGF 投与による機械的疼痛の感受性が野生型に比較して低いこと、さらに EFA6A-Arf6 が初代脊髄神経節初代ニューロンにおいても PC12 細胞と同様に NGF 依存的な TrkA の細胞表面発現を制御するともに、TRPV1 の細胞表面発現の調節に関わることより、EFA6A-Arf6 小胞輸送経路が、NGF 疼痛シグナル経路における下流効果経路として TrkA や TRPV1 の細胞表面発現量の制御を介して、慢性疼痛に関わる可能性が示唆された。今後、脊髄神経節特異的なノックアウトマウスを用いた疼痛感受性の検討や脊髄神経節での EFA6A の発現によるレスキュー実験などによる本現象の確認とともに、遺伝子欠損マウスの脊髄神経節の一次感覚ニューロンでの TrkA や TRPV1 の発現量の変化を個体レベルで検

証する予定である。

5. 研究発表

(1)学会誌等

① Sakagasmi H, Shiroshima T, Nemoto N, Niimura T, Sugawara T, Hara Y, Okubo T, Fukaya M. Disruption of the gene for Iqsec1/BRAG2 in mice leads to embryonic lethality with reduced large apical vacuoles in the visceral endoderm. ***FEBS Let.*** 599(4):581-591 (2025)

② Sugawara T, Matsu-Ura H, Inagaki R, Kawamura T, Tanaka M, Hara Y, Saito K, Fukaya M, Moriguchi S, Sakagami H. EFA6A, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for Arf6, Regulates Developmental Stage-Dependent Spine Morphogenesis, Synaptic Plasticity, and Long-Term Memory in the Hippocampus. ***Mol Neurobiol***. 62: 11904-11919 (2025)

(2)口頭発表

① 深谷 昌弘, 伊藤 諭子, 岡本 浩嗣, 阪上 洋行「EFA6A, a guanine nucleotide exchange factor for Arf6, regulates NGF-induced TrkA recycling in DRG neurons and heat hyperalgesia」第130回日本解剖学会全国学術集会 (APPW2025　2025年3月19日

(3)出版物

該当なし