

研究成果報告書の概要

講座等名	医化学講座	事業推進者名	伊藤 誠二（平成 29 年度） 小林 拓也（平成 30 年度）
所属部門	神経部門		
分担研究課題	難治性神経疾患の病態解明と診断治療法の開発（平成 29 年度） 異常感覚を伴う神経可塑的变化とその病態に関する研究（平成 30 年度）		
キーワード	糖尿病性ニューロパシー、神経再生、脊髄、プロスタグランジン		
講座内の本プロジェクト参加研究者数			10 名
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 伊藤 誠二（平成 29 年度研究統括）、小林 拓也（平成 30 年度研究統括）、松村 伸治（疼痛に関わる脊髄イメージング）、片野 泰代（疼痛関連分子のプロテオミクス解析）、寿野 良二（GPCR の構造生物学）、中川 学（生化学分析）、西田 和彦（脊髄投射神経の発生学的解析）、井上 明俊（掻痒の中樞性感作機構）、前野 覚大（高圧 NMR 解析）、舩津 宣雄（生殖細胞特異的転写因子の解析）</p>			
<p>研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）</p> <p>難治性神経疾患、殊に、慢性疼痛である神経障害性疼痛などの異常感覚を伴う神経可塑的变化とその病態解明と診断治療法の開発に焦点を当て、神経障害性疼痛モデル マウス、各種遺伝子改変マウスを用いた解析、プロテオミクスによる新規疼痛関連分子の探索、および多光子励起顕微鏡を用いたイメージング技術を駆使した研究を展開してきた。さらに、損傷した末梢神経の再生機構、痒み刺激の伝達機構、体性感覚の伝達に関与する新規脊髄後角ニューロンの同定を行った。平成 30 年度より構造生物学的手法により、G タンパク質共役受容体の構造を明らかにし、今後その立体構造を基に慢性炎症、がん、精神疾患などに対して、より有効性が高く副作用の少ない治療薬の探索・開発の緒に就いた。</p> <p>平成 29 年度</p> <p>(1) 末梢神経再生の分子機構の解明 我々はこれまでマウス坐骨神経切断-再生モデルを確立し、再生した軸索の伸長を形態学的かつ機能的評価系を構築した。この系を用い、末梢神経の再生にはシュワン細胞に発現するエンドセリン受容体 (ETBR)、体液 Na⁺濃度センサーとして働く Na⁺チャネル (Nax)、および乳酸が重要な役割を果たしていることを明らかにした。このシグナル伝達系の阻害剤を神経切断部位に持続的投与し、シュワン細胞における乳酸産生には Nax と直接相互作用する Na⁺/K⁺-ATPase が関与し、神経再生においてシュワン細胞からの乳酸が乳酸輸送体 MCT4 によりニューロンに取り込まれることを示唆した。</p> <p>(2) 糖尿病における末梢神経障害を再現するモデルマウスの確立 糖尿病の合併症の一つに末梢神経障害があり、一次求心性線維の変性とそれに続く不完全な再生結果として慢性疼痛が惹起される。この末梢神経障害の治療法の確立を目的として、マウスを用い末梢神経障害を伴う 2 型糖尿病モデルを確立した。この糖尿病マウスで坐骨神経切断-再生モデルを作製し、再生能を評価すると、糖尿病マウスでは神経再生が有意に遅延した。糖尿病マウスの後根神経節では軸索伸長の阻害に関与するシグナル伝達分子 PTEN の発現が亢進したが、坐骨神経切断箇所に PTEN の阻害剤を持続投与すると神経再生が有意に回復した。本研究で確立した 2 型糖尿病モデルによる末梢神経再生評価系は、将来的にこの疾患の治療に大きく貢献するものであると期待される。</p>			

(3) **脊髄後角の体性感覚情報処理に関与する投射ニューロンの解析** 脊髄後角は一次求心性線維により伝達された体性感覚を中継する部位であるが、脊髄後角に存在する様々なニューロンのうち高次脳中枢への伝達を直接担うのは投射ニューロンである。本研究ではこれらニューロンの発生時期と発生ドメインを明らかにし、その分子マーカーの同定を目指した。EdUを用いた神経細胞の誕生時期の解析より、投射ニューロンのほとんどは胎生 9.5 日目から 10.5 日目までに最終分裂を終えることが明らかとなった。この時期に生まれる脊髄後角ニューロンは脳室帯背側領域の 6 つの前駆細胞ドメイン (dII1-dII6) から発生することがこれまでの研究より明らかとなっている。そこで、dII4 から dII6 由来の Lbx1 系譜細胞を標識する遺伝子改変マウスを用いた解析、およびマーカー分子を用いた組織化学的解析をそれぞれ行った。その結果、投射ニューロンのほとんどは dII5 由来であることが明らかとなった。

平成 30 年度

(1) **CASK-interacting protein 1 (Caskin1)の中樞神経系における機能的特徴の解析** カルシウム/カルモジュリン依存性セリンプロテインキナーゼ (CASK) -interacting protein 1 (Caskin1)は、in vitro で興奮性シナプス後部に含まれる足場タンパク質の CASK だけでなく他の神経タンパク質にも結合し、様々な神経機能を持つことが考えられているが、その役割は不明であった。以前、脊髄後角における Caskin1 が慢性疼痛下で増加することを示した。さらなる詳細な役割の解明を試みるため、Caskin1 ノックアウト (Caskin1-KO) マウスおよび特異的抗 Caskin1 抗体を作製した。これらを用い、Caskin1 が、中枢神経系の広い領域において、歩行、侵害受容、記憶、およびストレス反応を含む幅広い行動表現型に寄与することを明らかにした。

(2) **G タンパク質共役受容体の立体構造の解明** 急性炎症の痛みや腫れ、発熱、さらに動物のストレス行動、慢性炎症やがんにも関与するプロスタグランジン (PG) の、受容体の立体構造を世界で初めて X 線結晶構造解析によって解明した。膜たんぱく質を耐熱化させて立体構造を崩れ難くするアミノ酸置換を統計熱力学理論に基づいて短時間で予測する手法である理論的耐熱化予測法を利用して安定的なアミノ酸変異体を探索し、結晶の分解能を向上させることに成功した。それにより、EP4 拮抗薬 (ONO-AE3-208) が結合した EP4 と抗体の複合体の立体構造と PGE₂ が結合した EP3 の立体構造を解明した。EP3 と EP4 の全体構造は、2 番目の細胞外ループが βヘアピン構造を取りオルソステリック部位に蓋をする。EP4 では ONO-AE3-208 は細胞の外側からダイレクトに受容体に結合するのではなく、一旦細胞膜の中に入り、脂質二重層との境界面に結合することが示唆された。PGE₂ は ONO-AE3-208 よりもさらに受容体の奥に入り込むことを明らかにした。さらに、EP3 はダイマーを形成し、脂質二重層の成分であるリン脂質がダイマーを安定化していることを示唆した。これらは、新しい薬剤の設計に繋がる重要な構造情報であり、多くの薬物の開発が期待されている標的分子・プロスタグランジン受容体の「形」が原子レベルで明らかにしたことで、今後その立体構造を基に慢性炎症、がん、精神疾患などに対して、より有効性が高く副作用の少ない治療薬の探索・設計が可能になると期待される。