

【31】

氏 名	福 島 央 之
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	乙第767号
学位授与の日付	平成29年2月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項
学位論文題目	シタキシン1Aの中枢シナプス機能に関する電気生理学的・分子生物学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 平 田 幸 一 (副査) 教授 白 瀧 博 通 教授 上 田 秀 一

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

シタキシン1Aは、シタキシン蛋白ファミリーのメンバーのひとつであり、主に神経に発現する重要な膜蛋白である。この蛋白は、シナプス前膜側のカルシウムチャネルとの作用による神経伝達物質の開口放出や細胞膜における輸送だけでなく、神経の発芽や伸張の制御にも関与していることが報告されている。

末梢神経損傷や組織の炎症は、神経障害性疼痛の原因となる。その痛みは、侵害刺激に対して感度が増加する痛覚過敏と非侵害受容性刺激が痛みを引き起こす異痛症（アロディニア）があいまった状態と考えられる。痛覚過敏の機序として、痛みを伝えるシナプス伝達が増強するという仮説がある。異痛症の機序としては、非侵害性受容器からの刺激を伝える第一次求心性線維が発芽・伸張し、痛みを上位に伝える二次神経とシナプスを形成してしまうとする仮説がある。

従来の免疫組織化学的研究では、様々な感覚の伝達・調節がなされる脊髄後角表層にシタキシン1Aが豊富に分布することが示されている。

【目 的】

シタキシン1Aが、末梢神経損傷によって引き起こされる痛覚の可塑性に対し、どのように関与しているかを明らかにする。

【対象と方法】

6～8週の雄性ICRマウス、および、シタキシン1Aが欠損しているノックアウト（KO）マウス

を使用した。神経培養には、妊娠したICRから採取した妊娠14～15日の胎児を使用した。

ケタミン・キシラジンによる全身麻酔下に坐骨神経を露出した後、部分結紮を行い神経障害性疼痛モデルマウスを作製した。偽手術マウスは、坐骨神経を露出した後、結紮を行わず縫合して作製した。

部分結紮の効果とアンチセンスによるシタキシン1Aノックダウンの効果を行動的に評価するために、足底をフォン・フライ フィラメントにより刺激したときに見られる引き込み反射の刺激閾値を調べた。

さらに、脊髄後角表層のニューロンからパッチクランプ法を用いてシナプス後電流を記録し、末梢神経結紮およびシタキシン1A欠損の効果調べた。

シタキシン1AのmRNAの発現量の経時変化は、real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (リアルタイム逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 RT-PCR) を用いて解析した。さらに、ウェスタンブロットング法によって、シタキシン1A蛋白の発現量の変化も追跡した。

マウス胎児から神経を単離し培養した。培養した神経に低分子干渉RNAを付加し、シタキシン1Aをノックダウンした。

免疫組織学的手法により、シナプス後膜のマーカースとして膜蛋白を裏打ちする蛋白PSD-95の抗体、シナプス前膜のマーカースとして開口放出に関わるシナプトフィジンの抗体を用いて、脊髄切片の染色を行った。

シタキシン1AのmRNAから蛋白への翻訳を阻害して、ノックダウンするためにアンチセンス-オリゴDNAを髄腔内投与した。

【結 果】

シタキシン1A KO マウスに坐骨神経結紮を行ったところ、フォン・フライ実験における引き込み反射の閾値低下と脊髄後角の興奮性シナプス伝達の増強が観察された。

坐骨神経結紮は、野生 (WT) マウスにおいて、機械刺激に対する異痛症を生じさせると、脊髄後角内におけるシタキシン1Aの発現量減少が観察された。このことは異痛症の発症にシタキシン1Aが関与していることを示唆する。

アンチセンス-オリゴDNAを髄腔内投与すると、下肢の引き込み反射の閾値低下が惹起された。このことは、坐骨神経結紮が、シタキシン1Aを減少させることによって異痛症を発症させることを示す。

坐骨神経結紮は、WTマウスにおいて、脊髄後角表層内の微小シナプス後膜電流の振幅は変えずに頻度を増加させた。アンチセンス-オリゴDNAを髄腔内投与しシタキシン1A発現を抑制すると、坐骨神経結紮と同様に、微小シナプス後膜電流の振幅は変えずに頻度を増強させた。これらの結果は、シナプス前終末端において、シタキシン1Aが伝達物質の放出を抑制的に制御している可能性を示唆する。

RNA干渉法によるシタキシン1Aのノックダウンは、培養された脊髄後角神経細胞の発芽・伸張を促進した。さらに、坐骨神経結紮は、PSD-95抗体およびシナプトフィジン抗体の共染色の密度を

増加させた。これらのことは、シタキシン1Aが神経細胞の発芽・伸張およびシナプス新生を抑制することを示している。

異痛症に対する治療薬としてプレギバリンが注目されている。シタキシン1A KOマウスでは、プレギバリンによる脊髄後角内の興奮性シナプス伝達の抑制効果が、WTマウスに比べて減弱していることが観察された。このことは、プレギバリンがシタキシン1Aに作用し伝達物質の放出を抑制することを示している。

【考 察】

末梢神経結紮後、シタキシン1Aの減少は、異痛症の発症から遅れて徐々にあらわれる。つまり、シタキシン1Aの減少は、異痛症の発症の早期には関与せずに、後期の痛みの持続に関与していると考えられる。

末梢神経結紮後の脊髄後角表層内の興奮性シナプス伝達の亢進は、シタキシン1Aの減少よりも早く生じる。シタキシン1Aの減少は、神経損傷後のシナプス伝達亢進の後期において関与している可能性が考えられる。その伝達亢進の機序としては、興奮性シナプスの新生が起っていることが、免疫染色実験の結果から示唆される。一方、シタキシン1Aの減少よりも早くに見られる興奮性シナプス伝達の亢進には、開口放出に関与するカルシウムチャネルの神経損傷に伴う機能的な変化が推測される。

シタキシン1Aの発現減少により、神経突起の発芽・伸長および分枝が亢進し、シナプスの新生が惹起されることを観察した。これは、末梢神経損傷にともない、非侵害受容性のA β 線維が、後角表層に分布する侵害受容性ニューロンまで伸びてシナプスを形成することにより異痛症が発症するという仮説を裏付けるものであると考えられる。

【結 論】

シタキシン1Aの機能については、多くの詳細なin vitroにおける研究が報告されてきた。今回、シタキシン1A KOマウスを用いることにより、シタキシン1Aが、脊髄後角表層内において、神経細胞の発芽・伸張およびシナプス新生を抑制し、さらにシナプス伝達を抑制的に制御していることを明らかにした。さらに、坐骨神経を結紮すると、脊髄後角表層内のシタキシン1Aの発現が減少し、その結果として、神経細胞の発芽・伸張、シナプス新生、興奮性伝達物質の放出量の増加が起ることを示した。

脊髄後角表層は、痛覚を含めた様々な感覚情報のシナプス伝達とその修飾が行われている部位である。シタキシン1Aの発現変化が、この部位におけるシナプス伝達の可塑性に関与し、異痛症などの発症に拘わっていることが示唆される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

シタキシン1Aは、シタキシン蛋白ファミリーのメンバーのひとつであり、神経伝達物質の開口放出に対して調節機能を有し、細胞膜輸送に関与して神経突起の発芽や伸張に対しても調節機能を

有することが知られている。シタキシ1Aノックアウトマウスにおいて、海馬におけるシナプスの長期増強の障害が報告され（参考文献）、申請者らは脊髄後角表層内のシナプス伝達の可塑性の異常（副論文2）を報告した。脊髄後角表層では、疼痛情報のシナプス伝達・調節が行われ、また、シタキシ1Aが豊富に発現している。申請者は、海馬培養細胞において、パッチクランプ・ホールセル記録とFM1-43染色によるシナプス数の計測を用い、シタキシ1Aが興奮性シナプス伝達を抑制的に調節することを示した（副論文1）。また、脊髄後角表層内の興奮性シナプス伝達の解析を行い、シタキシ1Aノックアウトマウスにおいて、末梢神経損傷によって惹起される可塑的变化が増強していることを報告した（副論文2）。また、抗てんかん薬として開発され鎮痛薬として用いられるプレガバリンの脊髄内作用機序の検討を加え、プレガバリンはシナプス前終末端において、シタキシ1Aを含む開口放出機構に作用し、興奮性シナプス伝達を抑制することを示した（副論文3、4）。

今回の学位申請にかかる主たる論文においては、シタキシ1Aが、中枢シナプス可塑性に対しどのように関与しているか、その詳細な機序を明らかにすることを目的とした。実験には、6～8週齢の雄性ICRマウスを用いた。坐骨神経部分結紮の効果とアンチセンスの髄腔内注入によるシタキシ1Aノックダウン効果をフォンフライ試験によって行動学的に評価した。結紮したマウスでは、急性脊髄スライスの後角表層ニューロンから記録した微小シナプス後電流の頻度が増加を示した。さらに、脊髄後角表層のシタキシ1A mRNAおよび蛋白の発現量が減少した。アンチセンスの髄腔内注入によりシタキシ1Aをノックダウンしたマウスにおいても、同様の結果が得られた。マウス胎児の脊髄から採取したのち分離培養した脊髄後角ニューロンにおいて、siRNA法によってシタキシ1Aをノックダウンすると、神経突起の伸張・分岐が亢進した。さらに、シナプス標識抗体を使い脊髄切片の二重免疫染色を行った結果、末梢神経損傷により脊髄後角表層内の興奮性シナプスの数の増加が観察された。これらの結果から、シタキシ1Aが、中枢神経系内の興奮性シナプスにおいて、伝達物質の開口放出を抑制的に制御していること、また興奮性シナプス伝達の可塑性に重要な関与をしていると結論づけた。

【研究方法の妥当性】

実験は動物実験委員会の許可を得た上で行われ、動物の使用はアメリカ国立衛生研究所（NIH）と国際疼痛学会のガイドラインに従って行われ、倫理的な問題はない。

神経損傷モデル作製には、すでに確立されているSeltzer法に則り坐骨神経部分結紮を行っている。坐骨神経部分結紮の影響の検討には、偽手術マウスとの比較を行っており、対象群の置き方は適切である。シタキシ1A mRNAと蛋白量の発現量の経時変化の観察のために、リアルタイム逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応法とウエスタンブロット法を使用している。脊髄後角表層内のシナプス後電流を記録するために、ホールセル-パッチクランプ法を用いている。各々の確立された実験法を用い、適切な比較対照を置いている。脊髄内のシタキシ1AノックダウンにはアンチセンスDNA髄腔内投与を行い、コントロールとして適切なノンセンス配列を用いている。脊髄後角分離培養ニューロンにおけるシタキシ1Aノックダウン実験では、siRNA法を用い、siRNA濃度依存性の影響をSholl解析に

よって検討しており妥当である。統計解析は、客観的で適切に行われており、研究方法は妥当である。

【研究結果の新奇性・独創性】

シタキシシン1Aがシナプス伝達にどのように関与するかについては、従来より、培養細胞等のin vitro系において多くの詳細な研究が行われている。申請者は、一連の研究において、シタキシシン1Aノックアウトマウスの使用、アンチセンスDNAの髄空内投与方法の応用などを駆使し、シタキシシン1Aのシナプス機能をin vivo系において明らかにしており、独創的な研究と評価できる。一連の研究を通して、シタキシシン1Aが、中枢神経系内のシナプス伝達とその可塑性に対して抑制性の調節機能を有することを明らかにしていることは、極めて新奇性が高く優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請者は、電気生理学的手法、分子生物学的手法など様々な手法を用いて、これまで検討されることが少なかったin vivo系において、シタキシシン1Aの中枢シナプス機序について詳細に検討した。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、生理学、分子生物学などの関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請者は、シタキシシン1Aの中枢シナプス伝達とその可塑性に対する重要な役割を明らかにした。特に、研究の中心である脊髄後角表層は、疼痛情報のシナプス伝達・変調が行われる部位であり、その研究結果は、神経障害性疼痛の発症機序の解明に重要な情報を提供するものであると考えられる。この新しい知見は神経生理学の今後の進歩にも大いに貢献する大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は生理学や分子生物の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究結果は当該領域の国際誌に掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主たる論文公表誌) 学位論文 (Thesis) Neuroscience 175 : 344-357, 2011

(副論文1) Neurosci Lett 415 : 130-134, 2007

(副論文2) Eur J Neurosci 26 : 2179-2187, 2007

(副論文3) Neurosci Lett 558 : 186-191, 2014

(副論文4) Neurosci Lett 636 : 270-275, 2017

(参考論文) J Neurosci 26 : 5767-5776, 2007