

研究テーマ**痛み伝達における脂質性シグナルの生理的役割の解析****1. 緒言**

痛みは有害な体外環境の変化を知らせるためのシグナルである。痛みの緩和は古来より医学研究の中心的な位置を占めてきた。種々の痛みは、三叉神経節 (TG) および脊髄後根神経節 (DRG) に存在する一次体性感覚神経細胞 (末梢神経細胞) の末梢神経末端により受容され、脳幹もしくは脊髄の特定の二次感覚神経細胞 (中枢神経細胞) に伝達される。これまでの研究により、痛覚伝達の解剖学的背景は徐々に解明されつつあるが、現在に至っても、痛覚受容、特に慢性疼痛の発症分子メカニズムは良く分かっていない。

近年、細胞膜構成リン脂質の一種であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP₂) が熱やカプサイシンの受容体であるTrpV1をはじめとするTransient Receptor Potentialファミリーのイオンチャネルの活性を調節することが報告されてきた。また、ホスホリパーゼCδ4やホスホリパーゼDが痛覚シグナルに関与することが示唆されてきた。これらのことから、痛覚伝達において、脂質性シグナルが重要な役割を果たしているのではないかと推察された。

本研究では、PIP₂をはじめとする脂質性シグナル分子の痛覚受容・伝達における役割を検討することを目的とした。

2. 方法**1. ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PIP5K) ノックアウト (KO) マウス**

PIP5K_A及びPIP5K_B-KOマウスは共同研究者である筑波大学大学院人間総合科学研究科 金保安則教授の研究室により作製されたものを使用した。実験は全て同週齢の♂マウスを用い、筑波大学動物実験指針に法り、担当部局の承認を受けたプロトコルを用いた。

2. 行動学的解析

ホットプレートテスト: 50°C、53°C、55°Cに温めたプレート上にマウスを乗せ、ジャンプするもしくは後ろ足を舂めるまでの時間を計測した。7回の試行を行い、最後の3回の時間を平均することで結果とした。

テールイマージョンテスト: 48°C、50°C、52°Cに温めた水浴インキュベーターを用意し、タオルに包んだマウスの尾を水浴に浸した。尾を水浴から上げるまでの時間を計測した。7回の試行を行い、最後の3回の時間を平均することで結果とした。

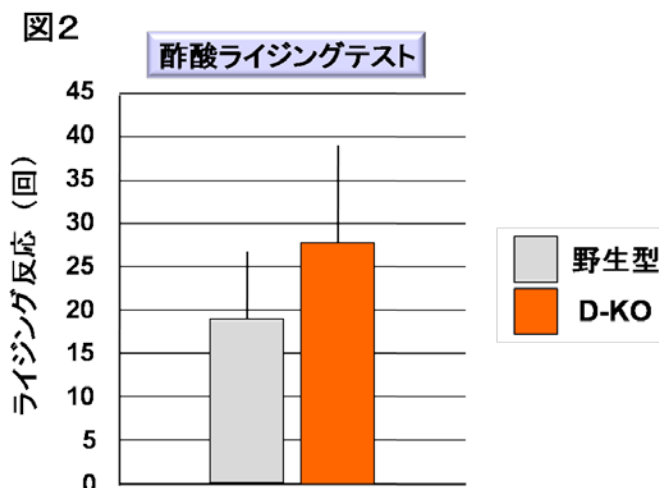
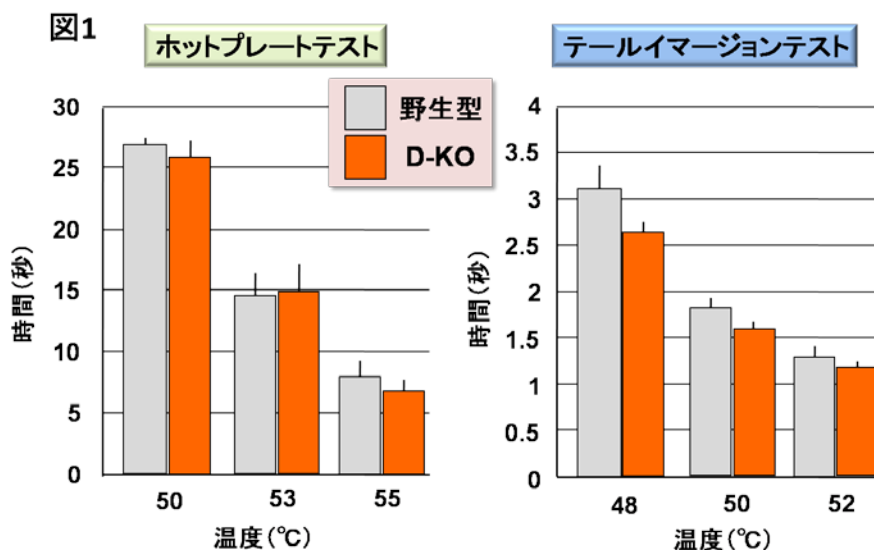
酢酸ライジングテスト: マウス腹腔に、生理食塩水で希釈した 0.6% 酢酸を注入し (30 ml/kg)、20分間に示すライジング反応を計測した。

味覚テスト: それぞれのマウスに、水および5% sucrose水もしくは10 mM HClを与え、48時間中の摂取量を計測した。

3. 結果 研究成果

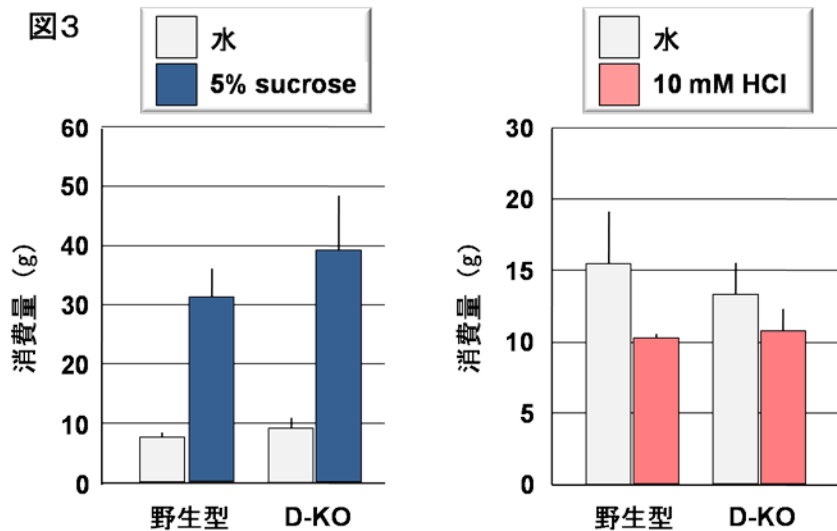
1. ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼノックアウトマウス

痛覚伝達におけるPIP₂の役割を解析するために、PIP₂の合成酵素であるPIP5K_AとPIP5K_Bのノックアウトマウスの解析を行った。これらのKOマウスおよびPIP5K_A/PIP5K_Bダブルノックアウト (D-KO) マウスは、外見に目立った異常はなく、成体まで成長した。そこで、野生型およびD-KOマウスの各種刺激に対する反応を行動学的に解析した。熱に対する反応の指標として、ホットプレートテスト、テールイマージョンテストを行ったが、両者に顕著な差は見出されなかった (図1)。また、化学刺激に対する反応を検討する目的で、酢酸ライジングテストを行った。その結果、有意ではないものの、D-KOマウスで若干の増加傾向が見られた (図2)。本結果は現在さらに確認中である。



PIP₂は味覚受容体の調節因子であるTrpM5の機能を調節するという報告があるので、味覚刺激に対するPIP5K-KOマウスの反応性を検討した。その結果、甘味、酸味に対するD-KOマウスの反応は野生型と変わらないことが分かった (図3)。

一方、私たちはこれらの解析の間に、D-KOマウスが雄性不妊であることを見出した。D-KOマウスの精巣では生殖細胞とセルトリ細胞の間の細胞接着部位に存在するF-アクチンが正常に構築され



ず、伸長精子細胞が脱落することが分かった。また、一部残存する精子も中間部、尾部の構造が以上となり、生殖能力を欠如することが分かった。

2. 新奇脂質性シグナル分子の探索

私たちは以前より、感覚神経ネットワーク構築に関与する新しい遺伝子をスクリーニングする目的で、DNAマイクロアレイスクリーニングを行ってきた。その結果をもとに、本研究ではin situ hybridization法を用いて感覚神経細胞に発現する新奇遺伝子の同定を試みた。その結果、ethanolamine kinase-1が胎生期神経細胞に強く発現していることが分かった。

4. 考察 まとめ

本研究においては、PIP5K_A、PIP5K_Bの痛覚、味覚伝達における役割を、ノックアウトマウスを用いて検討した。その結果、これらのアイソザイムの両者を欠損させても、痛覚、味覚に顕著な変化が見られないことが分かった。しかし、PIP5Kには、神経系に強く発現するPIP5K_Cサブタイプが存在するため、このサブタイプがPIP5K_A、PIP5K_Bの欠損を代償している可能性がある。また、PIP₂は主にPIP5Kにより合成されるが、PIP5Kを欠損させることにより、別経路での合成が代償する可能性も否定できない。今後はこれらの可能性を検討し、感覚情報伝達におけるPIP₂の役割を明らかにする予定である。

また、感覚神経細胞に強く発現する新奇遺伝子としてethanolamine kinase-1を同定した。Ethanolamine kinase-1は細胞膜リン脂質のphosphatidylethanolamine (PE) を合成する最初のステップの酵素である。PEは極性頭部が小さく、PEの存在量の増減は細胞膜ダイナミクスを大きく変化させることから、PEの動態が軸索ガイダンスや感覚情報伝達に関与している可能性は高いと考えられる。今後は、神経細胞内でのPEの動態を検討するほか、ethanolamine kinase-1-KOマウスを用いた行動学的検討を行っていきたいと考えている。

5. 発表論文、参考文献

論文投稿準備中