

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

慢性疼痛薬開発に向けた中枢神経系での分子機能解析

研究代表者氏名 片野 泰代¹⁾
研究分担者氏名 吉川 明里¹⁾, 阿部 学²⁾, 崎村 建司²⁾
1) 関西医科大学・医学部・医化学 2) 新潟大学・脳研究所

研究要旨

慢性疼痛時には、脳および脊髄での可塑的変化が生じることで、疼痛などの異常感覚が持続する。我々は本病態に関わる分子 **BEGAIN** を同定、その欠損マウスでは異常感覚が抑制されることを明らかにしている。他方 **BEGAIN** は、脳で高発現するが脳内での詳細な発現分布およびその機能については明らかではなかった。今回、我々は脳研究所との共同研究で作成した、**BEGAIN-iCre-driver** マウスを用いることで、脳内の **BEGAIN** の発現分布の可視化に成功した。さらに電子免疫染色法を用いた解析から、海馬における **BEGAIN** は、興奮性のシナプス後部に局在することを明らかにした。慢性疼痛では、シナプスタンパク質群による可塑的変化が生じることが多くの研究から示されている。そして、この可塑的変化は記憶・学習におけるいくつかの分子機序と関連する。今回我々は、**BEGAIN-KO** マウスを用いた行動解析を行うことで、**BEGAIN** が慢性疼痛だけでなく、記憶・学習にも寄与するシナプスタンパク質であることを明らかにした。

A. 研究目的

これまでに、慢性疼痛疾患の一つである神経障害性疼痛モデルを用いて、本病態である機械的アロディニアを有意に減弱させる関連分子として **BEGAIN** を脊髄後角から同定した。他方、**BEGAIN** は脳に高発現する分子として報告されるがその機能は不明のままであった。

他方、慢性疼痛時には、末梢あるいは中枢で感作が生じることで、触覚を痛覚と認識する異常感覚や、組織損傷治癒後も継続する慢性疼痛が生じる。中枢性の感作は、中枢神経系の可塑的変化によることが理解されており、記憶・学習のモデルである **LTP** の関連分子と共通の分子機序が報告されてきた。

これらの研究背景から、我々は **BEGAIN** の脳内における発現分布を明らかにし、慢性疼痛と共通の分子機序を有する記憶・学習への **BEGAIN** の寄与を明らかにすることを目的とし、組織学的および行動学的解析により明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

新潟大学脳研究所との共同研究・支援を受けて **BEGAIN** のプロモーター下流で **iCre** を発現する不ドライバーマウスを作成した。このドライバーマウスと **Ai9** レポーターマウスを交配することで、**BEGAIN** 発現領域を **tdTomato** により可視化した。また、**BEGAIN** の特異的抗体を用いた免疫染色により、脳内での **BEGAIN** タンパク質の局在についても同時に解析を実施した。加えて、これまでに同研究所の支援により作成した **BEGAIN-KO** マウスを用いて、記憶・学習を評価するバーンズ迷路および恐怖条件付けテストを実施した。

C. 研究結果

BEGAIN-iCre::Ai9 マウスの脳切片を観察することで、脳内に広く **BEGAIN** が発現することが確認できた。また **tdTomato** は海馬で強いシグナルを示し、**BEGAIN** は脳内では特に海馬に高発現することがわかった。そして、**BEGAIN** の特異的抗体

を用いた解析でも、内在性の BEGAIN タンパク質が海馬で最も高い発現を示すことがわかった。一方で、海馬内を詳細に観察することで、内在性タンパク質と tdTomato の局在に差が認められることがわかった。さらに北海道大学、渡辺雅彦教授らとの共同研究による電子免疫顕微鏡法による観察から、BEGAIN が興奮性のシナプス後部に発現することも明らかにした。

BEGAIN が海馬で高発現することを明らかにしたことから、記憶・学習への関与について BEGAIN-KO マウスを用いた行動解析を実施した。その結果、BEGAIN-KO マウスでは野生型マウスに比べ、空間記憶および恐怖記憶の両方が減弱することがわかった。

D. 考察

本研究により、神経障害性疼痛の関連分子として同定した BEGAIN が、記憶・学習にも寄与する分子であることが示された。神経障害性疼痛の場として解析した脊髄では、内在性の BEGAIN タンパク質は、II-III 層に局限発現することを免疫染色法により明らかにしている。一方で、*In situ* hybridization 法では前角も含め、全ての細胞から BEGAIN mRNA が検出されていた。一方で、BEGAIN-iCre ドライバーマウスでの解析では、脊髄および脳の内側において、免疫染色と一致する発現分布を示すことができている。しかしながら、海馬において、CA1, CA3 および DG 領域における発現量比が tdTomato と免疫染色では一致しなかった。そのことから、BEGAIN タンパク質の発現は、転写だけではなく、翻訳、あるいは翻訳後の輸送あるいは安定性により調整されることが考えられた。今後、部位あるいは病態や機能に特異的な BEGAIN タンパク質の発現制御を解明することで、より詳細な分子機序の解明が可能になることが期待できる。

E. 結論

脳に広く発現分布する BEGAIN は、脊髄後角と海馬で限局し高い発現を示し、また後シナプス後部に局在することがわかった。そして、シナプスの可塑的变化を基盤とする慢性疼痛と記憶・学習の両方に関わる機能性タンパク質であることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Katano T, Konno K, Takao K, Abe M, Yoshikawa A, Miyakawa T, Sakimura K, Watanabe M, Ito S & Kobayashi T, Brain-enriched guanylate kinase-associated protein, a component of the post-synaptic density protein complexes, contributes to learning and memory Sci Rep, 13(1):22027, 2023

2. 学会発表

1. Tayo Katano, Kotaro Konno, Keizo Takao, Manabu Abe, Akari Yoshikawa, Tsuyoshi Miyakawa, Kenji Sakimura, Masahiko Watanabe, Seiji Ito, and Takuya Kobayashi. Functional characterization of brain enriched guanylate kinase associated protein (BEGAIN) in the hippocampus Neuroscience IBRO 2023, 2023.9, Granada, Spain
2. 片野泰代
神経障害性疼痛におけるシナプス分子 BEGAIN の役割
生理学研究所 痛み研究会 2023, 2024.1
3. 片野泰代、吉川明里、小林拓哉
BEGAIN-KO マウスを用いた脊髄後角 PSD 画分での比較プロテオミクス解析
Comparative proteomic analysis in the PSD fraction of the spinal dorsal horn between wild-type and BEGAIN-KO mice.
第 96 回 日本生化学会大会, 2023.10, 福岡,
4. Tayo Katano, Yoshiki Yasukochi, Akari Yoshikawa, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Koichiro Higasa, Takuya Kobayashi
Transcriptome analyses in the

spinal dorsal horn after spared
nerve injury (SNI) in the
BEGAIN-KO mice

BEGAIN-KO マウス脊髄後角におけ
る神経障害性疼痛時の網羅的発現変
動分子解析

第46回日本神経科学大会, 2023.8,
仙台

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし