

令和元年6月10日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09004

研究課題名(和文) 神経因性疼痛における新規Kチャンネルとセロトニンの役割に関する研究

研究課題名(英文) Study of a role of serotonin on a novel K channel in neuropathic pain.

研究代表者

山本 悟史 (YAMAMOTO, Satoshi)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：60220464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経因性疼痛の発生原因を調べる目的で、ラット脊髄後根神経節ニューロンを用いて、熱刺激で活性化される新規Kチャンネル(Kheat)に対するセロトニンの役割を、パッチクランプ法を用いて検証した。BaあるいはtetraethylammoniumでKheat電流を単離したのち、セロトニンによるKheatの制御機構を調べたが、Kheatの制御は確認出来なかった。同様に、TRPV1受容体の制御も確認できなかった。今回の研究では正常ラットを用いて実験を行ったため、セロトニンによる制御機構を確認出来なかった可能性がある。今後は、末梢神経傷害モデルラットを用いて同様の実験を引き続き行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経傷害後に発生する神経因性疼痛は、創傷治癒後に持続する難治性疾患である。この疼痛に関与する分子としてATP、セロトニンやノルアドレナリン(NA)などの化学伝達物質、TRPV1受容体やセロトニン受容体(5-HT受容体)などが挙げられている。これまでに我々は、神経因性疼痛の発生メカニズムとして、NAと熱感受性Kチャンネル(Kheatチャンネル)の関係を明らかにしてきた。今回の研究では、NAと同様に「セロトニンがKheatチャンネルを抑制すれば疼痛発生の要因となる」と仮説を立て、それを実証する実験を行い、神経因性疼痛発生機序の解明に繋げる。

研究成果の概要(英文)：To study the mechanism of generation of neuropathic pain, a role of serotonin on a novel heat-activated K channel (Kheat) in dorsal root ganglion neurons of the rat was examined using a patch-clamp technique. Kheat was isolated by Ba or tetraethylammonium. Under the isolation of Kheat, serotonin did not affect to Kheat, as well as to TRPV1 receptors. The reason of the less effect of serotonin might be attribute to using normal rats but not neuropathic pain model rats in this study. To clear the problem, similar experiments will be continue in neuropathic pain model rats.

研究分野：神経生理学

キーワード：神経因性疼痛 脊髄後根神経節 Kチャンネル 熱 セロトニン セロトニン受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TRPV1受容体は、脊髄後根神経節 (DRG) 神経細胞に多く発現している受容体で、疼痛の情報伝達に参与していることが知られている。この受容体は40 以上の熱によって活性化され、その活性化の程度はパッチクランプ法による実験で内向き電流として記録出来る (図1A)。我々は、この受容体に関する実験中、偶然、熱によって活性化される外向き電流を発見した (図1B)。詳細に調べたところ、この電流は熱によって活性化される新規の K^+ チャネル (K_{heat}) によって発生しており、DRG神経細胞は、TRPV1受容体のみを持つ細胞 (図1A)、 K_{heat} チャネルのみを持つ細胞 (図1B)、及びその両者を持つ細胞 (図1C) の3種類に分類されることを明らかにした (Yamamoto et al., *Life Sci* 2009)。

DRG 神経細胞が自発的に活動電位を発生し、これが神経因性疼痛の発生原因になっていると仮定した場合、神経細胞の興奮性が疼痛の発生を決める因子となる。TRPV1 受容体は細胞の興奮性を高め、 K_{heat} チャネルは逆に興奮性を抑制することを考えると、この2つの分子の活性化の程度によって細胞の興奮性が決定されると言える (図2)。即ち、TRPV1 受容体の増強もしくは K_{heat} チャネルの抑制が起きれば、神経細胞の興奮性が高まり、神経因性疼痛が発生すると考えられる。我々は、ノルアドレナリン (NA) が K_{heat} チャネルを抑制して DRG 神経細胞の興奮性を増加させることを明らかにした (Yamamoto et al., *Life Sci* 2009) が、NA と同様に疼痛発生への関与が指摘されているセロトニンにも K_{heat} チャネルを抑制する作用があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

神経因性疼痛の発生機序の一つに交感神経の関与が指摘されている。即ち、「末梢神経傷害が交感神経節後細胞の発芽を誘起し、その軸索が DRG 神経細胞に到達している」という報告がある。我々は、交感神経から放出されるノルアドレナリン (NA) が K_{heat} チャネルを抑制することを報告しており、またセロトニンは末梢性疼痛物質・下行性疼痛抑制物質として作用し、DRG 神経細胞は 5-HT 受容体を発現していることが知られている。そこで今回の研究では、NA と同様に「セロトニンが 5-HT 受容体を介して K_{heat} チャネルや TRPV1 受容体に作用し、神経因性疼痛の発生要因になっているのではないかと考えた (図3)。

DRG 神経細胞が疼痛シグナル (活動電位) を発生するためには、DRG 神経細胞の膜電位が活動電位の発生閾値まで脱分極しなければならない。そこで、5-HT 受容体を介した作用によって脱分極電位が発生する機序として次の仮説を立てた。

(1) K_{heat} チャネルの抑制による脱分極

体温付近の温度である程度開いている K_{heat} チャネルが、5-HT 受容体を介した蛋白キナーゼの作用によって抑制され (図4)、脱分極が発生する。(K_{heat} チャネルが体温付近の温度で開いていることは確認済み。)

(2) TRPV1 受容体の閾値低下との相乗作用による脱分極

5-HT 受容体を介した蛋白キナーゼの作用により、TRPV1 受容体がリン酸化され、通常 40 以上でしか活性化されない受容体 (図5) が体温付近の温度で活性化されるようになる (TRPV1 受容体の閾値低下) (図6)、との報告があることより、この現象が上記 (1) と同時に生じれば、相乗的に脱分極が起こり、体温付近の温度でも神経細胞がより興奮しやすくなる。

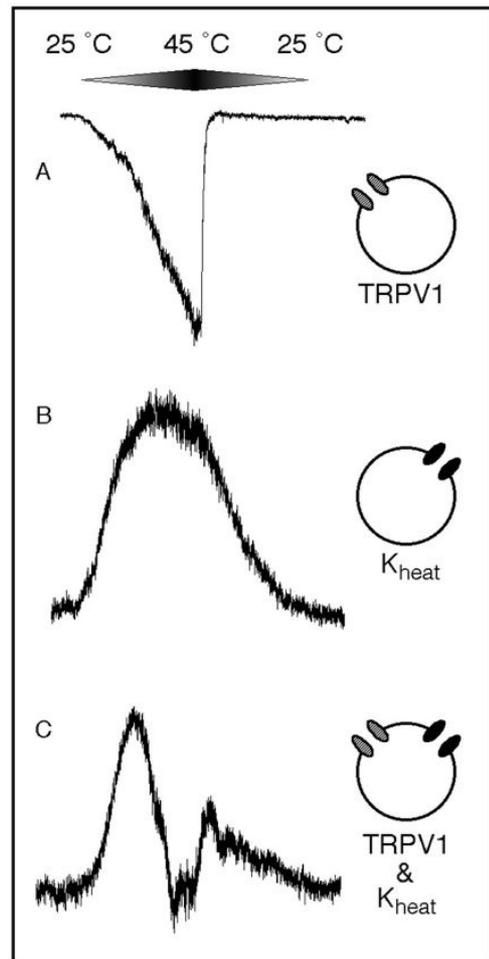


図1 熱刺激によってDRG神経細胞に誘起される膜電流

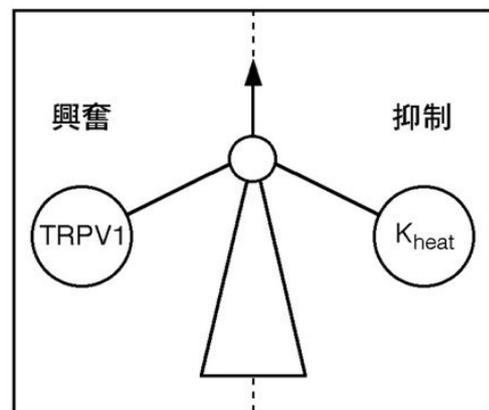


図2 DRG神経細胞の興奮性調節

本研究では、上記(1)と(2)の仮説を実証する実験を行い、神経因性疼痛発生機序の解明を目指す。

本研究は「セロトニンが K_{heat} チャネルを抑制すれば疼痛発生の要因となる」と仮説を立てた点に特色があり、さらに「神経因性疼痛の発生源がDRG神経細胞の発生する活動電位にある」と考えた点が独創的である。本研究結果が明らかになれば、難治性疼痛である神経因性疼痛の病態が解明され、治療法の開発に役立つと考えられる。

3. 研究の方法

(1) セロトニンによる K_{heat} チャネル機能の抑制

「セロトニンが、5-HT受容体を介して K_{heat} チャネルを抑制し、DRG神経細胞の興奮性を亢進させる」という仮説を立証する実験を行う。

K_{heat} チャネル電流の記録

成熟ラットより単離したDRG神経細胞を対象に、パッチクランプ法を用いて、熱刺激によって誘起される全膜電流を測定する。実験はTRPV1受容体の阻害薬存在下に行い、 K_{heat} チャネルの活性化によって発生した電流($I_{K_{heat}}$)のみを記録する。

セロトニンによる K_{heat} チャネル機能の抑制

5-HT受容体を介したセロトニンの作用によって $I_{K_{heat}}$ が抑制されることをパッチクランプ法を用いて確認する。さらに、各種阻害薬を用いて、抑制作用がどの5-HT受容体サブタイプを介したのか、どの蛋白キナーゼを介したのか、を調べる。

(2) セロトニンによる K_{heat} チャネル温度依存性の変化

5-HT受容体を介したセロトニンの K_{heat} チャネル抑制作用が、単に K_{heat} チャネルを抑制したものなのか、それとも温度依存性を変化させたものなのか、について検討する。

熱刺激と温度データの記録

神経細胞への熱刺激は、灌流液の温度を急激に変化させることのできる熱刺激装置(自作)を用いて行い、細胞の温度は、細胞の近傍に設置した高感度温度計でモニターする。温度データはデジタル変換してリアルタイムでコンピューターに記録し、 K_{heat} チャネル温度依存性のデータとして使用する。

K_{heat} チャネル温度依存性の測定

熱刺激によって誘起される $I_{K_{heat}}$ とで測定した温度データを用いて、 K_{heat} チャネルの温度依存曲線を描き、5-HT受容体を介した $I_{K_{heat}}$ の抑制がチャネルの温度依存性変化によるものなのかどうか、を検証する。

(3) セロトニンによるTRPV1受容体の閾値低下

TRPV1受容体電流の記録

単離DRG神経細胞を対象に、パッチクランプ法を用いて、熱刺激によって誘起される全膜電流を測定する。実験は K_{heat} チャネルの阻害薬存在下に行い、TRPV1受容体の活性化によって発生した電流(I_{TRPV1})のみを記録する(現在、 K_{heat} チャネルは Ba^{2+} によって抑制されるということが判明している)。

セロトニンによるTRPV1受容体機能の制御

5-HT受容体を介したセロトニンの作用によって、体温付近でも I_{TRPV1} が発生するようになることを確認するとともに、TRPV1受容体の温度依存曲線を描き、膜電位を測定する以下の実験の刺激温度を決める際の参考とする。

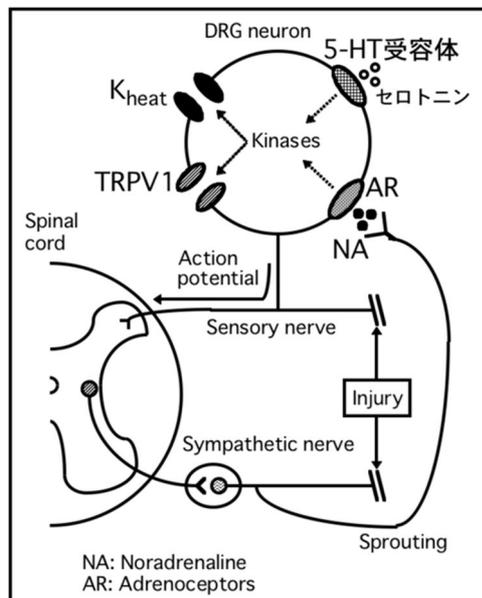


図3 末梢神経傷害による交感神経の発芽とDRG神経細胞の機能調節

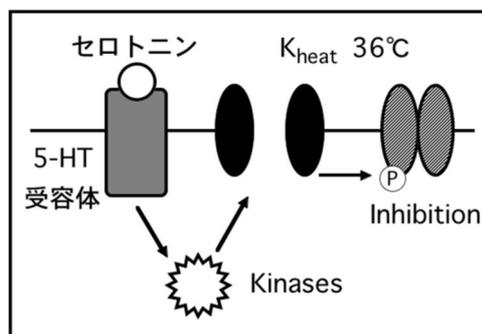


図4 セロトニンによる K_{heat} 抑制機序

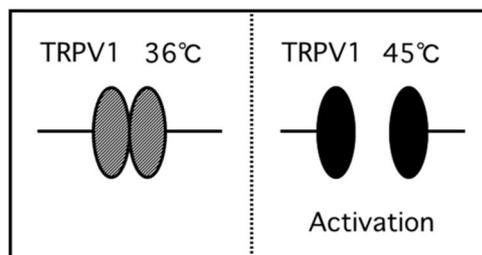


図5 TRPV1活性化機序(通常)

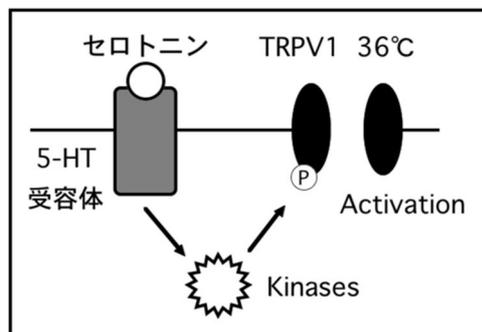


図6 TRPV1活性化機序(セロトニン存在下)

(4) TRPV1受容体の閾値低下との相乗作用による脱分極

「セロトニンが、5-HT受容体を介して K_{heat} チャネルを抑制することに加えてTRPV1受容体の温度に対する閾値を低下させ、DRG神経細胞の興奮性が相乗的に亢進し、体温付近の温度でもより興奮しやすくなる」という仮説を立証する実験を行う。

膜電位の記録

パッチクランプ法による記録をカレントクランプモードにすることにより、単離DRG神経細胞の膜電位を測定できる状態にする。

K_{heat} チャネルの抑制による脱分極

I_{TRPV1} の温度依存性を調べ、熱に対するTRPV1受容体の阻害薬存在下において、熱刺激によって K_{heat} チャネルの活性化による過分極が発生することを記録し、5-HT受容体を介したセロトニンの作用によって過分極の抑制・脱分極が起こることを確認する。

TRPV1受容体の閾値低下による脱分極の増強

K_{heat} チャネルの阻害薬存在下において、熱刺激によってTRPV1受容体の活性化による脱分極が発生することを記録し、5-HT受容体を介したセロトニンの作用によって脱分極の増強・閾値の低下が起こることを確認する。

セロトニンによる相乗的脱分極

TRPV1受容体・ K_{heat} チャネルに対する阻害薬の非存在下における実験を(1)と(2)の実験と同様に行い、 K_{heat} チャネルの抑制とTRPV1受容体の閾値低下が同時に起きることにより、DRG神経細胞の興奮性が相乗的に亢進することを証明する。また、この相乗作用により、体温に近い温度でもより容易に細胞が興奮することを立証する。

4. 研究成果

(1) K_{heat} チャネル電流の記録

単一のDRG神経細胞における K_{heat} チャネルの活性化によって発生する K_{heat} チャネル電流について、パッチクランプ法を用いて電気生理学的に測定・検証した。その結果、熱刺激に対して反応するDRG神経細胞は、TRPV1受容体チャネルのみを発現するもの、 K_{heat} チャネルのみを発現するもの、TRPV1受容体チャネルと K_{heat} チャネルの両方を発現するもの、の3種類に分類できた。(図7)

それぞれを発現している細胞の割合を調べたところ、約5%、約40%、約55%、であることが判明した。(図8)

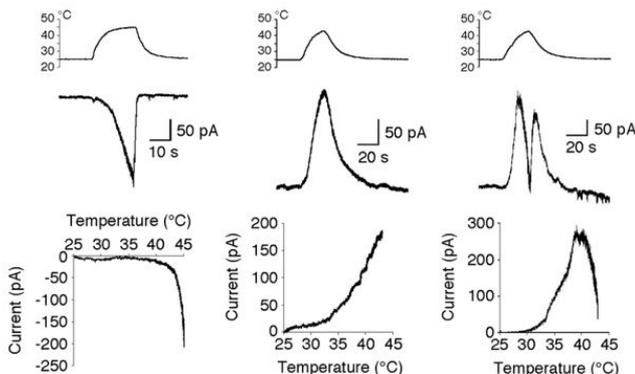


図7 DRG神経細胞における熱誘起性電流

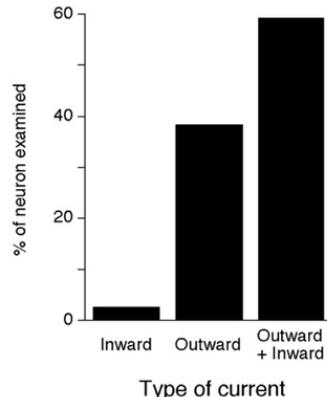


図8 熱誘起性電流の分類

(2) K_{heat} チャネルの温度依存性

K_{heat} チャネルのみを発現している細胞について、 K_{heat} チャネルの温度依存性を調べた。その結果、 K_{heat} チャネルは25~33までは殆ど活性化されず、33以上の温度で急激に活性化されることが判明した。(図7)

(3) K_{heat} チャネル電流およびTRPV1受容体電流の単離

DRG神経細胞には、TRPV1受容体と K_{heat} チャネルが混在して発現している。それぞれの機能を観察するためには、この2者のうち1者のみを測定する実験条件を求めなければならない。それぞれを独立して阻害する条件を調べたところ、TRPV1受容体は ruthenium red (RR)にて(図9 A, D), K_{heat} チャネルは Ba^{2+} および tetraethylammonium (TEA)にて(図9 B, D), それぞれ阻害できることがわかった。また、 K_{heat} チャネル電流は、-90mVに逆転電位をもち、電流-電圧関係は整流性がないlinearな性質をもっていることが判明した(図9 C)。

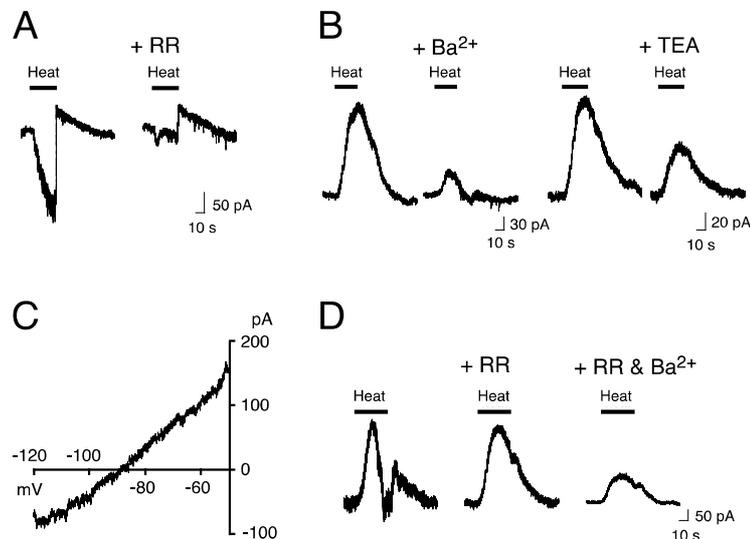


図9 DRG 神経細胞における K_{heat} チャネル電流および TRPV1 受容体電流の単離

(4) セロトニンによる K_{heat} チャネル機能の制御

DRG 神経細胞には、5-HT 受容体が発現している。このうち、多くの 5-HT 受容体は代謝型受容体であることから、 K_{heat} チャネル機能を制御している可能性があるため、5-HT 受容体による K_{heat} チャネルの機能変化について調べた。その結果、5-HT 受容体を介した K_{heat} チャネルの機能変化は確認できなかった。

(5) セロトニンによる TRPV1 受容体の制御

DRG 神経細胞には、熱刺激により活性化される TRPV1 受容体が発現している。上記(4)と同様に、セロトニンが 5-HT 受容体を介して TRPV1 受容体を制御する可能性について調べた。その結果、5-HT 受容体を介した TRPV1 受容体の機能変化は確認できなかった。

(6) まとめ

末梢神経傷害後に発生する神経因性疼痛は、創傷治癒後に持続する難治性疾患である。この疼痛に関与する分子として、DRG ニューロンにおける TRPV1 受容体と K_{heat} チャネルに注目してセロトニンの作用を検討した。しかしながら、現時点でセロトニンによる TRPV1 受容体と K_{heat} チャネルの機能制御については確認できていない。その原因およびそれに対する対応として、下記の考察をした。

神経因性疼痛は、末梢神経が傷害された際に観察される病態である。今回の研究では、末梢神経が傷害されていない実験動物を対象に実施したため、セロトニンによる TRPV1 受容体と K_{heat} チャネルの機能制御を観察出来ていない可能性がある。よって、今回の研究を末梢神経傷害モデル動物を使用して行い、セロトニンによる TRPV1 受容体と K_{heat} チャネルの機能制御について引き続き検証したい。

TRPV1 受容体に対するセロトニンの作用を確認できなかった原因として、TRPV1 受容体を発現している細胞は、予想に反して非常に少数であったこと、また、TRPV1 受容体電流は、大きさが小さく、セロトニンによる TRPV1 受容体の制御を観察することは困難であったこと、が考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Wang S, Kobayashi K, Kogure Y, Yamanaka H, Yamamoto S, Yagi H, Noguchi K, Dai Y. Negative regulation of TRPA1 by AMPK in primary sensory neurons as a potential mechanism of painful diabetic neuropathy. *Diabetes*, 67(1), 98-109, 2018. 査読有, DOI: 10.2337/db17-0503

Kogure Y, Wang S, Tanaka K, Hao Y, Yamamoto S, Nishiyama N, Noguchi K, Dai Y. Elevation H_2O_2 levels in trinitrobenzene sulfate-induced colitis rats contributes to visceral hyperalgesia through interaction with the transient receptor potential ankyrin 1 cation channel. *J Gastroenterol Hepatol*. 31, 1147-1153, 2016. 査読有, DOI: 10.1111/jgh.13226

Wang S, Yamamoto S, Kogure Y, Zhang W, Noguchi K, Dai Y. Partial activation and inhibition of TRPV1 channels by evodiamine and rutaecarpine, two major components of fruits of *Evodia rutaecarpa*. *J Nat Med*, 79, 1225-1230, 2016. 査読有 DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00599

〔学会発表〕(計1件)

一次知覚神経における AMP キナーゼによる TRPA1 膜発現の制御, 王勝蘭, 小林希実子, 小暮洋子, 山中博樹, 山本悟史, 八木秀司, 野口光一, 戴毅. 第 39 回日本疼痛学会, 2017 年 6 月 16-17 日, 神戸.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 田中 康一

ローマ字氏名: (TANAKA, Kohichi)

所属研究機関名: 兵庫医療大学

部局名: 薬学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 30274848

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 戴 毅

ローマ字氏名: (DAI, Tsuyoshi)

研究協力者氏名: 小暮 洋子

ローマ字氏名: (KOGURE, Yoko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。