

令和元年5月29日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15671

研究課題名(和文)NK1受容体とG₁₄は内臓痛治療の新たな標的分子となるのか？研究課題名(英文)G₁₄-mediated NK1 receptor cell signaling in the celiac-superior mesenteric ganglion

研究代表者

山内 正憲 (Yamauchi, Masanori)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00404723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：腹腔神経叢は腹部臓器機能の調節に関与しているため、内臓痛の伝達にも関与している。われわれはサブスタンスP/NK1受容体シグナル伝達系に着目して、腹腔神経節ニューロンで電気生理学的に、その詳細な細胞機能を探索した。サブスタンスPによるシグナル伝達の惹起で、カルシウム電流とMタイプカリウム電流が抑制された。siRNAを用いたG₁₄遺伝子のノックダウンにより、この抑制は減弱した。したがってG₁₄はこの経路で機能している分子だと明らかになった。さらにわれわれは遺伝子レベルでの詳細な機能を探索するため、現在、パッチクランプ記録後のニューロンの単一細胞RNA-seqの技術の確立を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

G₁₄は腹腔神経節ニューロンに特異的に発現、機能しているシグナル分子であることを突き止めたので、腹腔神経節だけに作用する分子標的薬が開発できるかもしれない。たとえば腹部手術ならその分子標的薬と腹横筋膜面(TAP)ブロックを併用することで、麻薬の必要量が減少し、質の高い麻酔管理ができるであろう。またがん患者では麻薬投与量を大幅に減量して、さらに副作用の少ない腹腔神経叢ブロックを提供できるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Celiac-superior mesenteric ganglion (CSMG) is involved in regulating abdominal organ function, and is also involved in visceral pain transmission. We investigated the modulation of Ca²⁺ and M-type K⁺ currents by the tachykinin substance P (SP)/neurokinin-1 receptor signaling pathway in acutely dissociated rat CSMG neurons (with Prof. Ruiz-Velasco at Penn State University). The results of an electrophysiological study showed that SP blocked the Ca²⁺ and M-currents. Silencing the G₁₄ subunit, a member of the G_{q/11} subfamily, significantly attenuated the Ca²⁺ and M-current blocks. The results suggest that in CSMG neurons, SP-stimulated NK-1 receptors modulate Ca²⁺ and M-currents by employing a single pathway requiring G₁₄ subunits. Moreover, to identify genetic mechanisms in the pathway, we have developed a single-cell whole transcriptome sequencing method using a neuron after electrophysiological recording. We will find changes in the transcriptome of the neurons in near future.

研究分野：麻酔科学

キーワード：腹腔神経叢 サブスタンスP Gタンパク共役受容体 内臓痛 パッチクランプ

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

1. 研究開始当初の背景

腹部内蔵からの疼痛(内臓痛)は強烈な侵害情報であるが、その機序はあまり明らかになっていない。腹腔神経叢は脊髄や後根神経節と並び、腹部内臓痛伝達の重要な役割を担っているが、細胞レベルのニューロン機能や、シナプスレベルでの分子機構は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

われわれはラット腹腔神経叢(CSMG: celiac-superior mesenteric ganglion)を用いて基礎研究を行う。腹腔神経節ニューロンに特異的な膜タンパクやシグナル伝達機構を電気生理学的手法と分子生物学的手法を用いて同定する。さらに CSMG におけるゲノム網羅的な遺伝子発現変化(トランスクリプトーム変化)を観察し、腹部内臓痛に関与する未知の遺伝子やタンパクの同定を試みる。

3. 研究の方法

- (1) 急性単離 CSMG ニューロンのホールセルカルシウム電流の記録
パッチクランプ法を用いて、急性単離 CSMG ニューロンのホールセルカルシウム電流を記録する。CSMG での発現レベルが高い、NK1 受容体とのそのシグナル伝達を検討するため、サブスタンス P を投与してカルシウム電流応答を記録する。RNA 干渉を用いてシグナル伝達に関与する G タンパクを探索する。
- (2) 急性単離 CSMG ニューロンのホールセルカリウム電流(M 電流)の記録
パッチクランプ法を用いて、急性単離 CSMG ニューロンのホールセルカリウム電流を記録する。サブスタンス P を投与してカリウム電流応答を記録する。RNA 干渉を用いてカリウム電流応答への調節を記録する。
- (3) 急性単離 CSMG ニューロンの RNA-seq
採取した CSMG から全量 RNA を抽出して、ゲノム網羅的な遺伝子発現解析(トランスクリプトーム解析)を行う。
- (4) パッチクランプ記録後の CSMG ニューロンの単一細胞 RNA-seq
サブスタンス P 投与によるカルシウム/カリウム電流応答のニューロン間の差異を詳細に検討するために、細胞内溶液を記録パッチピペットから回収し、RNA-seq を行う。

4. 研究成果

- (1) 急性単離 CSMG ニューロンのホールセルカルシウム電流の記録
サブスタンス P は急性単離 CSMG ニューロンのホールセルカルシウム電流を電位依存性に抑制した。CTX と PTX で処置してもこの抑制は記録され、 G_s や $G_{i/o}$ を介していないことが明らかになった。 G_{o3} の過剰発現を用いても同様に、 $G_{q/11}$ を介していないことも明らかになった。次に siRNA を用いて G_{14} の発現を抑制したところ、この抑制は減弱した。
- (2) 急性単離 CSMG ニューロンのホールセルカリウム電流(M 電流)の記録
サブスタンス P は急性単離 CSMG ニューロンのホールセルカリウム電流を抑制した siRNA を用いて G_{14} の発現を抑制したところ、この抑制は減弱した。以上より、CSMG ニューロンにおけるサブスタンス P による細胞内シグナル伝達とそれに伴うカルシウム電流とカリウム電流の抑制は G_{14} を介する経路が関与している可能性が示唆された。
- (3) 急性単離 CSMG ニューロンの RNA-seq
ゲノム網羅的な遺伝子発現解析でおよそ 20,000 種類の遺伝子すべての発現特性の分子カタログを作成した。対照はラット上顎神経節としたが、CSMG における NK1 受容体の遺伝子発現は対照の 38 倍であった。
- (4) パッチクランプ記録後の CSMG ニューロンの単一細胞 RNA-seq
現在、研究中である。パッチピペットから採取した全量 RNA は 10ng 以下であったが、全トランスクリプトーム増幅を用いることにより、候補遺伝子(われわれの検討では GRK2 遺伝子)の RT-PCR による増幅に成功した(次ページ図)。さらにシングルセルレベルで cDNA ライブラリを合成して RNA-seq を試みたが、原因不明の非特異的な増幅がいくつかのサンプルで確認された。コンタミネーションが最も疑わしかったが、研究期間内では原因の解明に至らなかった。科研費による補助は終了するが、今後はパッチクランプ記録後の細胞でのシングルセル RNA-seq 技術の確立を実現したい。

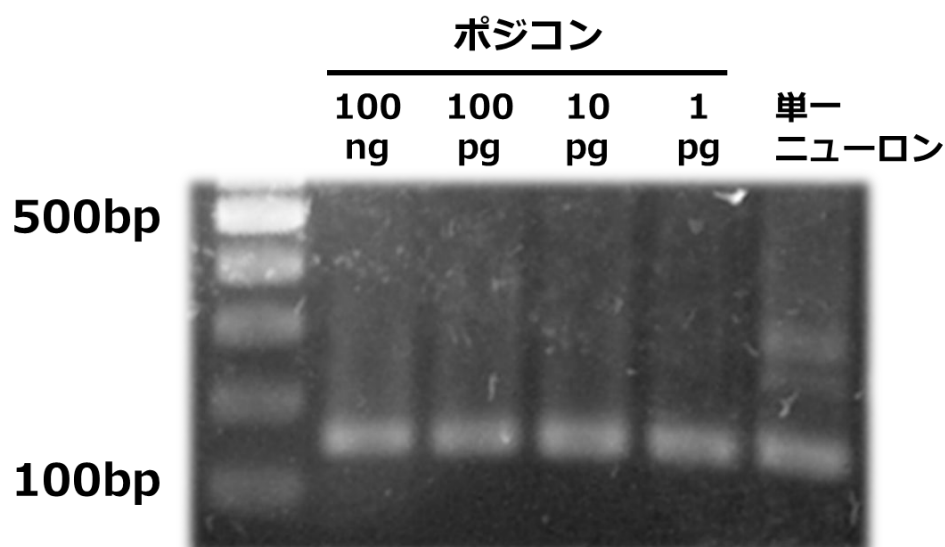


図 われわれはピコグラムレベルで1細胞由来のRNAを用いて増幅に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Sugino S, Farrag M, Ruiz-Velasco V: G₁₄ subunit-mediated inhibition of voltage-gated Ca²⁺ and K⁺ channels via neurokinin-1 receptor in celiac-superior mesenteric ganglion neurons. J Neurophysiol 2016; 115: 1577-86.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 杉野 繁一

ローマ字氏名: SUGINO, Shigekazu

所属研究機関名: 東北大学

部局名: 大学病院

職名: 助教

研究者番号(8桁): 00423765

(2)研究協力者

研究協力者氏名: Victor Ruiz-Velasco

ローマ字氏名: (RUIZ-VELASCO, Victor)

研究協力者氏名: 今村 百可

ローマ字氏名: (IMAMURA, Yuka)

研究協力者氏名: 遠藤 康弘

ローマ字氏名：(ENDO, Yasuhiro)

研究協力者氏名：村上 徹

ローマ字氏名：(MURAKAMI, Toru)

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。