

平成 22 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19380163

研究課題名 (和文) 知覚神経培養細胞と神経組織標本を用いた疼痛反応の定量化に関する研究

研究課題名 (英文) Quantitative analysis of pain response in isolated spinal cord and cultured dorsal root ganglion cell

研究代表者

伊藤 茂男 (ITO SHIGEO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：40109509

研究成果の概要(和文)： 痛みの発生に重要なタンパク質であるバニロイド受容体チャネルは、カプサイシンに加えてマスタードオイルやメチルサリチル酸などにも反応すること、さらに外液 Na⁺イオンがチャネル開口を制御していることを明らかにした。また、炎症により放出されるヒスタミンや5-ヒドロキシトリプタミンは、それぞれの受容体に作用して痛みを増悪させること、高炭酸暴露による鎮痛作用にはアデノシンが関与していることを示した。

研究成果の概要 (英文) : We found that vanilloid receptor (TRPV1) channels, being key proteins for pain generation, were activated by mustard oil or methylsalicylate in addition to a vanilloid compound such as capsaicin and that the opening of the channels was controlled by extracellular Na⁺ ions. It was demonstrated that histamine and 5-hydroxytryptamine, which were released at inflammation sites, augmented pain due to TRPV1 channel activation through respective receptors for these amines, and that adenosine release was associated with the analgesic action in response to hypercapnia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード： バニロイド受容体、TRPV1チャネル、背根神経節細胞、新生仔ラット脊髄、ヒスタミン、5-ヒドロキシトリプタミン、アデノシン、腸管神経叢細胞

1. 研究開始当初の背景

痛覚刺激は背根神経節細胞の一次知覚神経線維に活動電位を発生させ、脊髄シナプスにおいて痛みの伝達物質であるサブスタン

スP放出などを介して2次知覚神経に伝達される。近年、ラット一次知覚神経において唐辛子の辛味成分であるカプサイシンにより活性化されるバニロイド受容体遺伝子がク

ローニングされ、これが炎症性疼痛と熱性疼痛に関与することが示された。我々は、ブタのバニロイド受容体 (TRPV1: Transient Receptor Potential V1) 遺伝子をクローニングし、これを発現させ、TRPV1チャネルの機能を解析した (Biochem Pharmacol, 2005)。さらに新生仔ラット摘出脊髄標本を用いて、鎮痛薬や発痛物質の *in vitro* 評価が可能であることを示した (Dev Brain Res, 2005; Neurosci, 2006)。また、実験動物の安楽死に多用される炭酸ガス暴露は、摘出脊髄ではアデノシンを放出し、このアデノシンが麻酔作用を示すことを世界で始めて明らかにした (J Physiol, 2006)。動物の疼痛管理は、獣医療のみならず動物愛護の観点からも非常に重要であるが、動物の痛みを客観的に評価できる方法は少なく、動物の疼痛管理に関する科学的基盤は極めて脆弱である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、電気生理学的手法、Ca 画像解析法と受容体蛋白遺伝子のクローニング技術を組み合わせ、脊髄における痛覚発生機序と痛覚過敏と抑制機構の分子基盤を明らかにし、次いで、知覚神経培養細胞のバニロイド受容体反応と TRPV1 発現細胞の反応を比較することにより、疼痛を客観的かつ簡便に評価できる実験系を開発することである。

3. 研究の方法

(1) マウスと新生仔ラットを安楽死後、背根神経節細胞 (DGR) をコラーゲナーゼ処理して分離後、培養して実験に供した。また、ブタ、ラットもしくはヒト TRPV1 遺伝子をヒト胎児腎臓培養細胞 (HEK293) に導入、発現させて実験に供した。発現ベクターには GFP 遺伝子を組み込み、GFP 蛍光をもつ細胞をバニロイド受容体発現細胞とした。

(2) 新生仔ラットを安楽死処分して脊髄を摘出後半裁し、27-29°C に保温した装置に静置した。摘出脊髄は常時混合ガス (5%CO₂+95%O₂) で飽和した人工脳脊髄液 (pH7.3) で灌流した。高炭酸溶液は人工脳脊髄液を 20%CO₂+80%O₂ でガス化することで調整した (pH6.7)。背根に刺激電極を、腹根に記録電極を接続し、2分毎に脊根を電氣的に刺激し、腹根から反射電位を記録した。刺激後 10msec の潜時で生ずる単シナプス反射電位 (MSR: 運動の指標) と約 20 秒の潜時で最大となる遅発性前根電位 (sVRP: 痛覚反応の指標) を記録し、これらに対する様々な薬物の反応を調べた。MSR は振幅の大きさを、sVRP はマックラボを介してコンピューターに取り込み、その反応の曲線下面積 (積分値) を解析した。

(3) HEK293 培養細胞と DRG 培養細胞の細胞内 Ca 濃度は fura 2 を用いた画像解析法により、これらの細胞の細胞膜電流と細胞膜電位は、アクソパッチ増幅器を用いたホールセルパッチクランプ法により測定した。

4. 研究成果

(1) バニロイド受容体チャネルの機能解析:
ブタ、ラット及びヒトのバニロイド受容体 (TRPV1) の全長遺伝子を HEK293 細胞に発現させた。カプサイシン (CAP) を投与すると細胞内 Ca 濃度が増加した。ブタ TRPV1 チャネルは、ラット及びヒトの TRPV1 と同様、42°C 以上の温度と pH 低下で活性化した。ラットとは異なり、ブタでは CAP 反応を抑制する TRPV1 遮断薬カプサゼピンは、熱刺激及び pH 低下による反応も抑制した。カプサゼピンによるこれらの抑制反応はヒト TRPV1 でも見られることから、ブタとヒト TRPV1 は機能的に類似していることが明らかとなった。
わさびなどから抽出されるマスタードオ

イル(MO)は、ブタTRPV1発現HEK293細胞において、細胞内Ca増加反応を引き起こし、この反応はTRPV1チャンネル遮断薬であるカプサイジン、ルテニウムレッド、イオドレジネフェラトキシンで抑制された。MOに反応したDRG細胞の85%が、CAPに反応することから、MOはTRPV1の新しいアゴニストであることが示された。

ヒトTRPV1遺伝子を発現させたHEK293細胞において、メチルサリチル酸 (MS) は細胞内Ca増加反応と電流反応を引き起こした。この反応は、カプサイジン、ルテニウムレッド、イオドレジネフェラトキシンで抑制された。MSは持続投与してもCa増加反応は持続せず、強い脱感作を引き起こした。脱感作時にはCAP、pH低下及び50℃による細胞内Ca増加反応は抑制された。CAP反応を抑制するTRPV1受容体のアミノ酸置換では、MSによる反応をわずかしき低下しなかったことから、MSはCAPとは異なる部位でTRPV1に作用してチャンネルを活性化させた後、不活性化させることが示された。また、ラットではMSは侵害反応を抑制することから、TRPV1の脱感作反応が一部鎮痛作用に関与していると思われる。

ブタTRPV1をHEK293細胞に発現させ、この細胞のCa濃度とチャンネル電流を測定した。TRPV1はNa⁺イオンを除去すると活性化され、TRPV1のH⁺センサー部分のアミノ酸を置換すると、Na⁺による抑制反応は低下した。細胞外のNa⁺イオンはチャンネルを形成する細胞外ドメインのH⁺結合部位に何らかの影響を与え、TRPV1チャンネルの活性化を抑制していることが示された。

(2) 一次知覚神経においてカプサイジン (CAP) 反応を修飾する生理活性物質：

新生仔ラットDRG培養細胞をCAP、熱及びpH低下により刺激すると細胞内Ca増加を起

し、5-ヒドロキシトリプタミン (5-HT) はこれらの反応を大きく増強した。DRG細胞のRT-PCRでは5-HT_{2A}と5-HT₇受容体mRNAが検出された。両受容体アゴニストは5-HTと類似した増強反応を引き起こした。5-HTによるTRPV1を介する反応の増強には、5-HT_{2A}と5-HT₇受容体の活性化が関与し、それぞれプロテインキナーゼC (PKC) とプロテインキナーゼA (PKA) を介する細胞内情報伝達が亢進していることが示された。炎症部位での疼痛過敏の一部には、血小板などから放出される5-HTが関与していることが示唆された。

TRPV1発現DRG細胞 [DRG(+)] をもつマウスとTRPV1遺伝子欠損マウス [DRG(-)] を用いてヒスタミン (HIS) のTRPV1に対する作用を調べた。DRG(+)+では、HISはpH低下とCAPによる細胞内Ca増加反応と脱分極反応をともに大きく増強したが、DRG(-)では増強反応を示さなかった。DRG(+)+におけるCa増加反応は、H1受容体拮抗薬及びホスホリパーゼC (PLC) 阻害薬とPKC阻害薬で抑制され、H2、H3及びH4受容体拮抗薬及びリボキシゲナーゼ阻害薬とPKA阻害薬では影響受けなかった。炎症時の痛覚閾値の低下は、炎症細胞から放出されるHISが一部関与していることが示された。

(3) 新生仔ラット摘出脊髄におけるアデノシンの作用：

高炭酸ガスを通気した人工脳脊髄液で新生仔ラット摘出脊髄を灌流 (高炭酸アシドーシス、pH 6.7) すると、MSRとsVRPは抑制され、この抑制はアデノシン (ADO) A1受容体遮断薬で部分的に回復した。脳脊髄液のpHを燐酸緩衝液もしくはヘパース緩衝液で調整して、pHを低下させても抑制反応は生じなかった。このことより高炭酸による細胞内pH低下がADO放出を起し、シナプス伝達を抑制すると思われる。ATPをADOに変換す

るエクトヌクレオチダーゼの阻害薬は高炭酸による抑制反応には影響与えなかった。ADOの分解を促進するアデノシンデアミナーゼの阻害薬はMSRを抑制せず、sVRPのみを抑制した。ADOのリン酸化を促進するアデノシンキナーゼの阻害薬は高炭酸と同様、MSRとsVRPを抑制した。また、高炭酸はアデノシンキナーゼ活性を抑制した。高炭酸によるADO放出の増加にはアデノシンキナーゼの抑制が関与していることが示唆された。

高炭酸による脊髄からのADO放出は、細胞内からプリンを放出できる細胞膜のプリン輸送体やチャネルの阻害薬及び細胞外ADOを減少させるATP分解酵素阻害薬では影響受けなかった。細胞内ADOをトラップするホモシステインでアデノシン放出が有意に抑制されたことから、高炭酸では細胞内ADOが増加し、細胞外に漏出することが示唆された。

また、低酸素ガスを通気した人工脳脊髄液で新生仔ラット摘出脊髄を灌流すると、MSRとsVRPが抑制され、前者はアデノシンA1受容体遮断薬で回復するが、後者はほとんど影響を受けなかった。低酸素刺激は摘出脊髄からADO放出を引き起こした。グリア細胞の代謝抑制薬は、このADO放出を抑制したが、高炭酸刺激によるADO放出を抑制しなかった。低酸素刺激によるADO放出にはグリア細胞が関与するが、高炭酸と低酸素では異なる機序でADOが放出されることが示された。

(4) ラット腸管神経叢培養細胞における炎症による変化：

新生仔ラット摘出腸管神経叢細胞を培養して、ブラジキニン(BK)による細胞内Ca増加反応と細胞膜電流を調べた。BKによる反応はB2受容体拮抗薬で消失し、B1受容体拮抗薬では影響受けなかった。B2受容体は神経細胞とグリア細胞に発現していた。神経細胞

のBKによるCa増加反応はシクロオキシゲナーゼ(COX)阻害薬で抑制され、PGE2で増強した。BKはPGE2放出を起こした。BKによるCa増加反応の大きさは細胞培養の密度に依存し、グリア細胞の密度が低いと反応は低下した。BKは直接神経細胞のB2受容体に作用し、脱分極とCa反応を起こすと同時に、グリア細胞からPGE2を放出させ、神経細胞のCa増加反応を増強することが示唆された。

新生仔ラット摘出腸管神経叢培養細胞を各種炎症誘起物質で処置した結果、インターロイキン1 β (IL-1 β)は神経細胞とグリア細胞のBKによるCa反応を増強した。このBKによるCa反応の増強はB1受容体拮抗薬で抑制された。IL-1 β 処置によりB1受容体がグリア細胞で発現した。B1受容体アゴニストはグリア細胞でCa増加反応を起こし、PGE2放出を増加させた。COX阻害薬とEP1受容体拮抗薬はIL-1 β 処置した神経細胞のBKによるCa反応の増強を消失させた。以上の結果より、IL-1 β 処置によりグリア細胞においてB1受容体が発現し、グリア細胞からPGE2放出が高まり、BKによる神経細胞のCa反応が増強されたことが明らかとなった。

新生仔ラット摘出腸管神経叢の培養細胞をリポポリサッカライド(LPS)で処置するとB1受容体を介するBKによるCa反応が増強した。この増強反応にはグリア細胞から放出されるIL-1 β が関与すること、すなわち、炎症時には腸管のグリア細胞と腸管神経細胞のクロストークが変化することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

- 1) Kajihara Y, Murakami M, Imagawa T, Otsuguro K, Ito S and Ohta T. Histamine

- potentiates acid-induced responses mediating transient receptor potential V1 in mouse primary sensory neurons. *Neuroscience*. 査読有, 166, 292-304 (2010)
- 2) Murakami M, Ohta T and Ito S. Lipopolysaccharides enhance the action of bradykinin in enteric neurons via secretion of interleukin-1 β from enteric glial cells. *Journal of neuroscience research*. 査読有, 87, 2095-2104 (2009)
- 3) Otsuguro K, Ban M, Ohta T and Ito S. Roles of purines in synaptic modulation evoked by hypercapnia in isolated spinal cord of neonatal rat *in vitro*. *British Journal of Pharmacology*. 査読有, 156, 1167-1177 (2009)
- 4) Ohta T, Imagawa T, and Ito S. Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 in Analgesic Action of Methylsalicylate. *Molecular Pharmacology*. 査読有, 75, 307-317 (2009)
- 5) Otsuguro K, Tang J, Tang Y, Xiao R, Freichel M, Tsvilovskyy V, Ito S, Flockerzi V, Zhu MX, and Zholos AV. Isoform-specific Inhibition of TRPC4 Channel by Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *The Journal of Biological Chemistry*. 査読有, 283, 10026-10036 (2008)
- 6) Murakami M, Ohta T, and Ito S. Interleukin-1 β enhances the action of bradykinin in rat myenteric neurons through up-regulation of glial B1 receptor expression. *Neuroscience*. 査読有, 151, 222-231 (2008)
- 7) Ohta T, Imagawa T and Ito S. Novel Gating and sensitizing mechanism of capsaicin Receptor (TRPV1): Tonic inhibitory regulation of extracellular sodium through the external protonation sites on TRPV1. *The Journal of Biological Chemistry*. 査読有, 283, 9377-9387 (2008)
- 8) Otsuguro K, Yasutake S, Yamaji Y, Ban M, Ohta T and Ito S. Why does carbon dioxide produce analgesia? *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*. 査読有, 14, 101-106 (2007)
- 9) Ohta T, Imagawa T and Ito S. Novel agonistic action of mustard oil on recombinant and endogenous porcine transient receptor potential V1 (pTRPV1) channels. *Biochemical Pharmacology*. 査読有, 73, 1646-1656 (2007)
- 10) Murakami M, Ohta T, Otsuguro K and Ito S. Involvement of prostaglandin E₂ derived from enteric glial cells in the action of bradykinin in cultured rat myenteric neurons. *Neuroscience*. 査読有, 145, 642-653 (2007)
- [学会発表] (計 16 件)
- 1) 乙黒 兼一, 低酸素による新生ラット脊髄反射電位抑制における日齢の影響とアデノシンの関与, 第 149 回日本獣医学会学術集会, 2010 年 3 月 26 日, 武蔵野市 (日本獣医生命科学大学)
- 2) 川本 研介, 新生ラット脊髄反射電位に対する内因性モノアミンの作用, 第 83 回日本薬理学会, 2010 年 3 月 16 日, 大阪市 (大阪国際会議場)
- 3) 川本 研介, 新生ラット脊髄反射電位に対するメタンフェタミンの作用, 第 148 回日本獣医学会学術集会, 2009 年 9 月 25 日, 鳥取市 (とりぎん文化会館)
- 4) 乙黒 兼一, 低酸素暴露によるラット脊

- 髓からのプリン化合物放出, 第 147 回日本獣医学会学術集会, 2009 年 4 月 2 日, 宇都宮市 (栃木県総合文化センター)
- 5) 村上 真津香, Lipopolysaccharide による腸管グリアから interleukin-1 β 放出を介した bradykinin 反応のアップレギュレーション, 第 82 回日本薬理学会, 2009 年 3 月 16 日, 横浜市 (パシフィコ横浜)
- 6) 加治原 佑介, マウス一次知覚神経細胞におけるヒスタミンによるプロトン誘発性 TRPV1 反応の増強, 第 82 回日本薬理学会, 同上
- 7) 高橋 巧, 新生ラット脊髄における低酸素によるアデノシン放出機序について, 第 59 回日本薬理学会北部会, 2008 年 9 月 27 日, 仙台市 (仙台市情報・産業プラザ)
- 8) 岩崎 健幸, 新生ラット脊髄における内因性セロトニンの神経調節機能について, 第 146 回日本獣医学会学術集会, 2008 年 9 月 24 日, 宮崎市 (宮崎大学)
- 9) 加治原 佑介, マウス一次知覚神経細胞におけるヒスタミンによる TRPV1 反応の増強, 第 146 回日本獣医学会学術集会, 同上
- 10) 村上 真津香, 炎症性腸疾患における腸管神経系の機能変化に対する腸管グリアの関与-in vitro 炎症モデルを用いた検討, 第 145 回日本獣医学会学術集, 2008 年 3 月 28 日, 相模原市 (麻布大学)
- 11) 村上 真津香, Interleukin-1 β による腸管グリアを介した壁内神経細胞における bradykinin 反応の増強作用について, 第 58 回日本薬理学会北部会, 2007 年 9 月 29 日, 札幌市 (北海道大学)
- 12) 乙黒 兼一, PIP₂ による TRPC₄ チャネル抑制作用とアイソマーによる違い, 第 58 回日本薬理学会北部会, 同上
- 13) 乙黒 兼一, TRPC4 チャネル活性の PIP₂ による調節, 第 144 回日本獣医学会学術集

会, 2007 年 9 月 2 日, 江別市 (酪農学園大学)

- 14) 太田 利男, Allylthiocyanate による TRPV1 チャネルに対する活性化作用, 第 144 回日本獣医学会学術集会, 同上
- 15) 伊藤 茂男, Why Does Carbon Dioxide Produce Analgesia? 第 6 回国際動物実験代替法会議, 2007 年 8 月 24 日, 東京都 (イースト 21 東京)
- 16) 村上 真津香, Interleukin-1 β による壁内神経細胞における bradykinin 反応の増強-腸管グリア B1 受容体発現の関与-, 第 143 回日本獣医学会学術集会, 2007 年 4 月 3 日, つくば市 (つくば国際会議場)

[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] (計 1 件)

- 1) 伊藤 茂男, 伝達の仕組み解明 薬に, 北海道新聞 (夕刊), 2009 年 10 月 20 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 茂男 (ITO SHIGEO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号: 40109509

(2) 研究分担者

乙黒 兼一 (OTSUGURO KEN-ICHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号: 40344494

(3) 連携研究者

なし