

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500353

研究課題名（和文） 神経因性疼痛発現における新規イオンチャネルの解析

研究課題名（英文） Study of a novel K<sup>+</sup> channel in generation of 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

研究成果の概要（和文）：脊髄後根神経節ニューロン（DRG）において、熱刺激で活性化される新規 K<sup>+</sup>チャネル（K<sub>heat</sub>）を発見した。ノルアドレナリン（NA）は K<sub>heat</sub> を、アドレナリン受容体（ $\alpha 1$  および  $\beta$ ）を介して、蛋白キナーゼ（それぞれ C および A）を活性化することにより抑制した。末梢神経傷害後、発芽して DRG に到達した交感神経節後線維終末からは NA が放出され、これが K<sub>heat</sub> を抑制して DRG の興奮性を高めることが神経因性疼痛の発生要因と考えられる。

研究成果の概要（英文）：The results of the present study show that heat-activated K<sup>+</sup> channel currents in DRG neurons are inhibited by both PKC and PKA as mediated via alpha and beta adrenergic receptors, respectively. This may represent a new insight into regulation of thermosensation via a noradrenergic pathway, leading to revealing the mechanisms of neurogenic pain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学，神経・筋肉生理学

キーワード：感覚系神経生理学，神経因性疼痛，イオンチャネル，熱，脊髄後根神経節

## 1. 研究開始当初の背景

（1）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バニロイド受容体（TRPV1）や ATP 受容体（P2X）などのイオンチャネル型受容体，さらにアドレナリン受容体などが挙げられている。近年我々

は、ノルアドレナリン（NA）が  $\alpha$  アドレナリン受容体を介して P2X 受容体機能を増強し、神経因性疼痛の発症要因となることを報告した（Maruo et al., *Pain* 2006）。今回の研究では、TRPV1 受容体とそれに拮抗する働きをもつ K<sup>+</sup>チャネル（最近我々が発見した新規チャネル）に対する NA の作用について検討

する。

(2) TRPV1 受容体は、脊髄後根神経節 (DRG) の小型神経細胞に多く発現している受容体で、疼痛の情報伝達に関与していることが知られている。この受容体は 40°C 以上の熱によって活性化され、活性化の程度はパッチクランプ法を用いた実験で内向き電流として記録出来る。この受容体の神経因性疼痛への関与を成熟ラットの DRG 神経細胞を用いて調べていたところ、偶然、熱によって活性化される外向き電流を発見した。詳しく調べた結果、この電流は熱によって活性化される新規の  $K^+$  チャンネル ( $K_{heat}$ ) によって発生しているということが判った。そして DRG 神経細胞は、TRPV1 受容体のみを持つ細胞、 $K_{heat}$  チャンネルのみを持つ細胞、およびその両者を持つ細胞の 3 タイプに分類され、意外な事に、小型神経細胞の殆どは両者を持つタイプであることが判明した。

(3) 小型 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発生を左右する重要な因子となる。TRPV1 受容体は細胞の興奮性を高める方向に働き、 $K_{heat}$  チャンネルは逆に抑制する方向に働くことを考えると、この 2 つの分子の発現量や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。我々が調べた結果、 $K_{heat}$  チャンネルは体温 (36°C) 程度の温度である程度活性化されていることが判っている。これに対し、TRPV1 受容体は 40°C 以上の温度でなければ活性化されない。そこで、神経細胞が興奮性を増す仕組みとして、体温程度の温度で TRPV1 受容体の活性化、もしくは  $K_{heat}$  チャンネルの抑制、という機構が存在するのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 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」という事実が報告されている。そこで本研究では、「交感神経終末から放出されたノルアドレナリン (NA) が DRG 神経細胞に作用することで神経因性疼痛が発生するのではないか」と考えた。

(2) 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の脱分極する必要がある。アドレナリン受容体を介した NA の作用によって脱分極電位が発生する機序として 2 つの仮説を立てた。

① タンパクキナーゼ (PKA や PKC) の作用により、TRPV1 受容体がリン酸化され、通常 40°C 以上でしか活性化されない受容体が体温付

近の温度で活性化するようになり、脱分極が起きる。即ち、温度に対する活性化閾値が低下する。

② 体温付近の温度である程度開いている  $K_{heat}$  チャンネルが、タンパクキナーゼ (PKA や PKC) の作用によって抑制され、脱分極が発生する。

(3) 本研究では、まず、 $K_{heat}$  チャンネルの性質について詳しく解析した後、上記の仮説を立証する実験を行う。即ち、NA による TRPV1 受容体の活性化閾値の低下あるいは  $K_{heat}$  チャンネルの抑制を証明し、神経因性疼痛の発生機序解明を目指す。

## 3. 研究の方法

DRG 神経細胞に熱刺激を与えると、TRPV1 受容体と  $K_{heat}$  チャンネルの両方が活性化される。これまでの研究で、TRPV1 受容体についてはよく調べられているが、 $K_{heat}$  チャンネルは我々が発見した新規のイオンチャンネルであり、その性質が殆ど判っていない。従って、初年度はまず、 $K_{heat}$  チャンネルの性質について解析を行い、その後、ノルアドレナリン (NA) による  $K_{heat}$  チャンネルや TRPV1 受容体の制御機構に関する行う以下の研究計画を立てた。

### (1) $K_{heat}$ チャンネルの解析

#### ① $K_{heat}$ チャンネル電流の記録

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、 $K_{heat}$  チャン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。

#### ② $K^+$ チャンネルの種類

$K_{heat}$  チャンネルが新規のイオンチャンネルなのか、それとも既知のイオンチャンネルが熱に反応する性質を持っているものなのか、が全く判っていない。そこで、各種  $K^+$  チャンネルの阻害薬を用いてスクリーニング実験を行い、新規イオンチャンネルなのかどうかを薬理的に調べる。

#### ③ Running up 現象・Running down 現象

繰り返し熱刺激を行うと、 $I_{K_{heat}}$  が時間経過と共に増強していく Running up 現象や逆に減弱していく Running down 現象をこれまでの実験で観察している。これらの現象がどういう機序で起きているのかを、各種タンパクキナーゼや  $Ca^{2+}$  依存性などについて調べる。

#### ④ 加齢の影響

熱刺激による  $K_{heat}$  チャンネルの活性化は成熟ラットで観察される。従って、 $K_{heat}$  チャンネルの加齢による変化を、幼若〜成熟ラットを用いて、 $I_{K_{heat}}$  を指標に調べる。また、 $I_{K_{heat}}$  の温度依存性を調べ、熱に対する活性化閾値を求め、これに対する加齢の影響についても調べる。

## (2) ノルアドレナリンによる $K_{heat}$ チャンネル機能の制御

「NA の作用によって DRG 神経細胞が興奮する」という仮説を立証する実験を  $K_{heat}$  チャンネルを対象に行う。即ち、「NA が  $K_{heat}$  チャンネルの機能を抑制する」ということを証明する。

### ① NA による $K_{heat}$ チャンネル機能の抑制

NA によって  $IK_{heat}$  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、抑制作用がどのアドレナリン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 $K_{heat}$ チャンネルの温度依存性の変化

NA の作用が、単に  $K_{heat}$  チャンネルを抑制したもののなのか、それとも温度依存性を変化させたもののなのか、を検討する。

## (3) ノルアドレナリンによる TRPV1 受容体機能の制御

「NA の作用によって DRG 神経細胞が興奮する」という仮説を立証する実験を TRPV1 受容体を対象に行う。即ち、「NA が TRPV1 受容体を介した反応を増強する」ということを証明する。

### ① 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  $K_{heat}$  チャン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、 $K_{heat}$  チャンネルは  $Ba^{2+}$  によって抑制されるということが判っている)。

### ② NA による TRPV1 受容体の温度依存性の変化

$I_{TRPV1}$  の温度依存性を調べ、熱に対する TRPV1 受容体の活性化閾値を求める。NA 存在下では活性化閾値が低下し、体温付近の温度 (36°C) でも活性化することを確認する。さらに、各種阻害薬を用いて、NA の作用がどのアドレナリン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。

## (4) TRPV1 受容体のリン酸化

NA による TRPV1 受容体の温度依存性の変化が受容体のリン酸化で起こっている事を証明する。

① NA で前処置した DRG 神経細胞をホモジナイズし、TRPV1 受容体に対する抗体で免疫沈降する。次に、抗リン酸化抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、TRPV1 受容体がリン酸化されていることを確認する。また、タンパクキナーゼ阻害薬存在下ではリン酸化が抑制されることを確認する。

② 上記を、NA で処置していない DRG 神経細胞と比較検討することにより、NA の作用によって TRPV1 受容体のリン酸化が起こっていることを証明する。

## 4. 研究成果

### (1) 脊髄後根神経節ニューロンにおける熱誘起 $K^+$ 電流とノルアドレナリンの作用

ラット脊髄後根神経節 (DRG) ニューロンを対象に、熱によって誘起される電流をパッチクランプ法を用いて測定した。灌流液の温度を 25°C から 45°C に変化させたところ、保持電位 -60mV において温度依存性に外向き電流 (図 1 A) が発生した。この電流の性質を調べたところ、 $K^+$  チャンネル阻害薬の  $Ba^{2+}$  や tetraethylammonium (TEA) で有意に抑制されること (図 1 C)、および逆転電位が  $K^+$  の平衡電位付近 (-90mV) であること (図 1 D) より、 $K^+$  チャンネルの活性化によって発生する電流 ( $IK_{heat}$ ) であることが判明した。 $IK_{heat}$  に対するノルアドレナリン (NA) の作用を調べたところ、NA は  $IK_{heat}$  を抑制した。

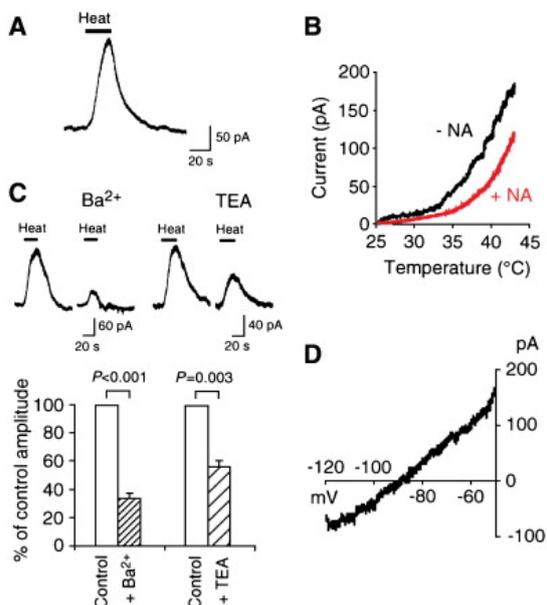


図 1 脊髄後根神経節ニューロンにおける熱誘起  $K^+$  チャンネル電流

### (2) アドレナリン受容体による熱誘起 $K^+$ 電流の制御

NA は濃度依存性に  $IK_{heat}$  を抑制したので、NA による  $IK_{heat}$  の抑制機序について、アドレナリン受容体作動薬を用いて調べた。その結果、 $IK_{heat}$  は  $\alpha 1$  アドレナリン受容体作動薬の cirazoline と  $\beta$  アドレナリン受容体作動薬の isoproterenol によって有意に抑制されたが、 $\alpha 2$  アドレナリン受容体作動薬の UK14304 によって影響を受けなかった。(図 2 A, B, C) 従って、NA による  $IK_{heat}$  の抑制作用は、 $\alpha 1$  アドレナリン受容体と  $\beta$  アドレナリン受容体を介するものであることが判明した。

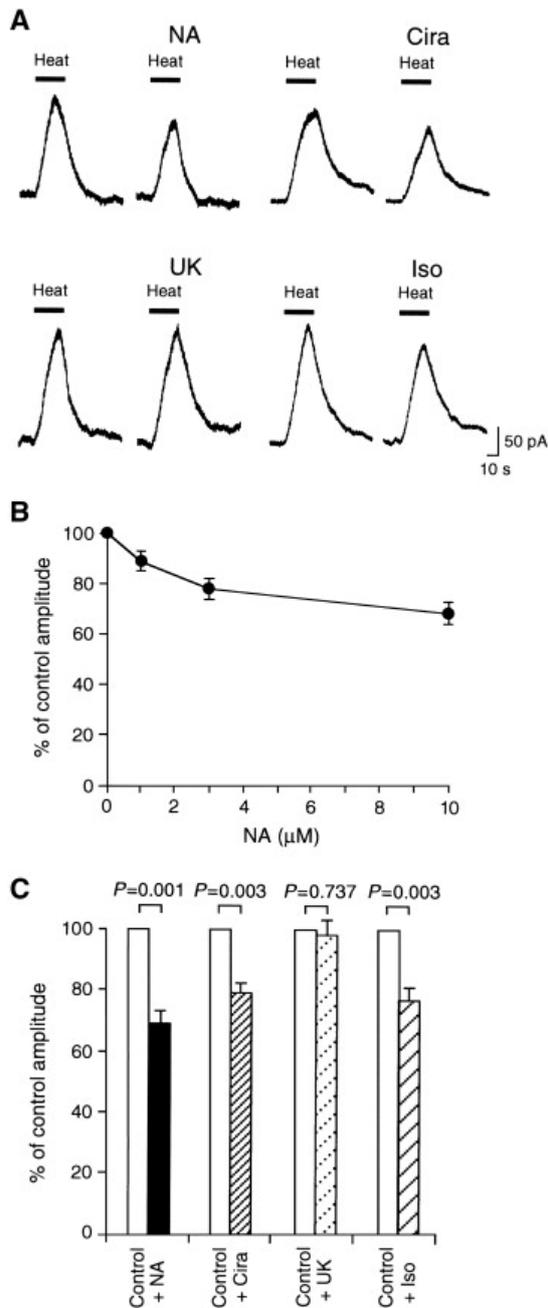


図2  $\alpha_1$  アドレナリン受容体と  $\beta$  アドレナリン受容体による熱誘起  $\text{K}^+$  電流の制御

### (3) 熱誘起 $\text{K}^+$ 電流を制御する細胞内シグナリング

$\alpha_1$  アドレナリン受容体と  $\beta$  アドレナリン受容体を介する NA の  $\text{IK}_{\text{heat}}$  抑制機序について、その細胞内シグナリングを調べた。その結果、NA の作用は、蛋白キナーゼ A 阻害薬の H-89 および蛋白キナーゼ C 阻害薬の GF109203X で阻害され、この両者の存在下では完全に抑制された。アデニル酸シクラーゼを活性化作用のある forskolin (結果として蛋白キナーゼ A を活性化する) と蛋白キナーゼ C を活性化作用のある PMA は NA と同様の作用

を示し、この両者を同時投与すると単独投与したときよりも  $\text{IK}_{\text{heat}}$  を強く抑制した。以上より、NA による  $\text{IK}_{\text{heat}}$  の抑制作用は、蛋白キナーゼ A と蛋白キナーゼ C を介するものであることが判明した。

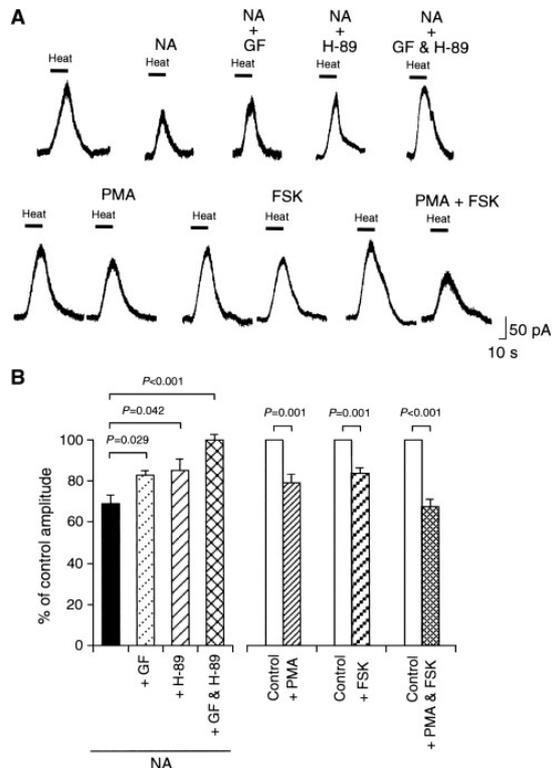


図3 PKA と PKC による熱誘起  $\text{K}^+$  電流の制御

### (4) 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パニロイド受容体 (TRPV1) が挙げられている。TRPV1 受容体は熱によって活性化されるイオンチャネルであるが、末梢神経傷害後は、何らかの原因でこれが活性化されることで内向き電流 (図 4 A) が誘起され、DRG ニューロンに活動電位が発生して痛み情報となって中枢神経に伝達されると推測される (図 6)。今回発見した熱によって誘起される  $\text{K}^+$  チャネル (熱感受性  $\text{K}^+$  チャネル ( $\text{K}_{\text{heat}}$ )) が活性化されると DRG ニューロンに外向き電流  $\text{IK}_{\text{heat}}$  が誘起される (図 4 B)。  $\text{IK}_{\text{heat}}$  は TRPV1 受容体活性化によって発生する内向き電流を打ち消す作用がある (図 4 C)。それ故、  $\text{K}_{\text{heat}}$  は DRG ニューロンの興奮性を抑制していると考えられる (図 5)。

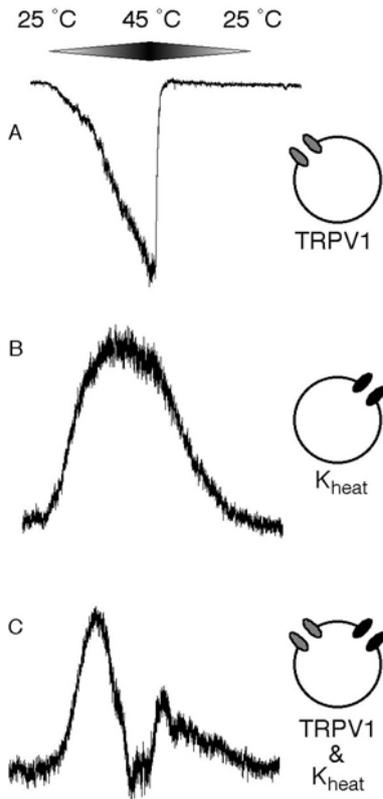


図4 脊髄後根神経節ニューロンにおける熱で誘起される電流

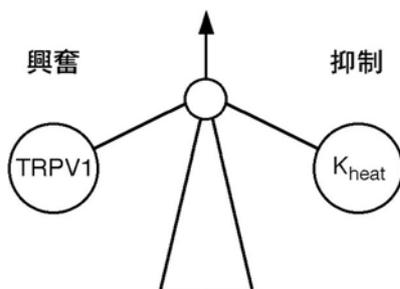


図5 イオンチャネルによる脊髄後根神経節ニューロンの興奮制御

神経因性疼痛の原因となる末梢神経傷害後は、交感神経節後線維が発芽し、その終末部がDRGニューロンに到達することが知られている。交感神経節後線維終末からはノルアドレナリン (NA) が放出されることから、NAはアドレナリン受容体を介して、DRGニューロンに何らかの影響を与えると考えられる (図6)。今回の研究において、NAは $I_{K_{heat}}$ を抑制することを証明した。その機序は、 $\alpha 1$  アドレナリン受容体および $\beta$ アドレナリン受容体を介して、それぞれ蛋白キナーゼC (PKC) および蛋白キナーゼA (PKA) の細胞内シグナリングを活性化することにより、 $K_{heat}$ を抑制していることが分かった (図7)。

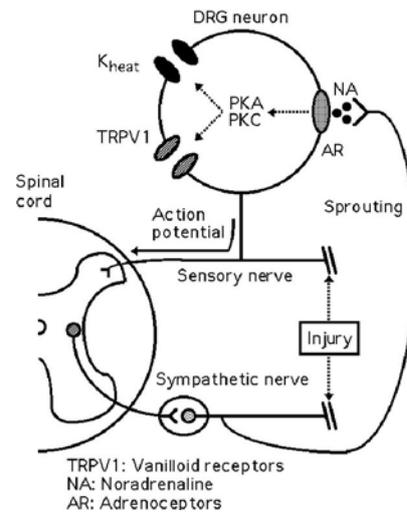


図6 脊髄後根神経節ニューロンに対するノルアドレナリンの作用

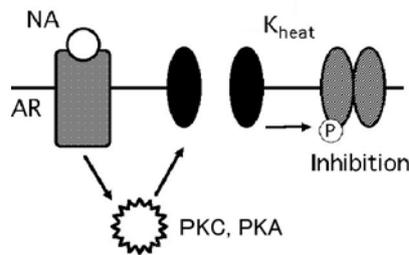


図7 ノルアドレナリンによる熱感受性 $K^+$ チャネルの抑制

末梢神経傷害後、図6のような状態になっているとすれば、NAによって $K_{heat}$ が抑制され、DRGニューロンの興奮性が高まっている可能性が高く、これが神経因性疼痛の発生要因のひとつになっていると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計2件)

- ① Yamamoto S, Kanno T, Yamada K, Yasuda Y, Nishizaki T. Dual regulation of heat-activated  $K^+$  channel in rat DRG neurons via  $\alpha(1)$  and  $\beta$  adrenergic receptors. *Life Sci*. Vol. 85, 167-171, 2009, 査読有
- ② Dai Y, Wang S, Tominaga M, Yamamoto S, Fukuoka T, Higashi T, Kobayashi K, Obata K, Yamanaka H, Noguchi K. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J Clin Invest*. Vol. 117, 1979-1987, 2007, 査読有

〔学会発表〕（計 1 件）

- ①Kogure Y, Yamamoto S. Practical training in electrophysiology of the heart. IUPS teaching workshop. Aug 1-4, 2009, Kobe

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (3) 連携研究者

西崎 知之 (NISHIZAKI TOMOYUKI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：00221474

永田 徹 (NAGATA TETSU)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60131588

山本 英幸 (YAMAMOTO HIDEYUKI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：70373529