

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790189
 研究課題名 (和文) ペプチド性神経伝達物質の遊離機構の分子基盤と遊離制御システムの解明
 研究課題名 (英文) A study to elucidate the molecular mechanism of peptide neurotransmitter release
 研究代表者
 唐 和斌 (He-Bin Tang)
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号:10403502

研究成果の概要

末梢組織の損傷・炎症により知覚神経が活性化されると、知覚神経から substance P (SP) などの神経ペプチドが遊離され中枢へ痛みを伝えることが知られている。そのため、SP の動態を明らかにすることは疼痛発症メカニズムの解明に重要な役割を果たすと考えられる。本研究では、様々な侵害刺激による脊髄後根神経節 (DRG) 神経からの SP 遊離についてラジオイムノアッセイ法を用いて検討し、さらに SP 遊離を制御する分子メカニズムについて明らかにした。したがって、本研究により疼痛に対する新たな治療概念の構築に貢献する可能性が考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	300,000	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：COX-1/-2, DRG neurons and non-neuronal cells, MAP kinases, NK-1R, the release and synthesis of SP, TRPV1, the deletion of Na_v1.8, the intracellular Ca²⁺ signaling transduction

1. 研究開始当初の背景

SP は tachykinin family に属する神経ペプチドであり、侵害刺激により一次知覚神経の中枢および末梢側の神経終末から遊離される。一次知覚神経の中枢側の神経終末から遊離された SP は、二次神経を活性化することにより中枢へ侵害情報を伝達する。そのため、SP は痛みの伝達物質として知られており、様々な侵害刺激による SP の動態を明らかにす

ることは疼痛発症メカニズムの解明に重要な役割を果たすと考えられる。

2. 研究の目的

様々な侵害刺激による培養 DRG 神経からの SP 遊離について検討し、これらの侵害刺激による SP 遊離を制御する分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ラット DRG 初代培養細胞の作製：生後 6 - 9 週齢の Wistar 系ラットより DRGs を採取し、酵素処理 (collagenase および trypsin) により細胞を分散した。その後、polyethyleneimine および laminin でコーティングした 35 mm dish あるいは 24 well plate に細胞をまき、10 % inactivated horse serum、1 % penicillin/streptomycin および 200 mM glutamine を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 中にて、37°C、5 % CO₂ 条件下で培養した。なお実験には培養 5 日目の細胞を用いた。
- (2) SP の測定：薬物はペプチダーゼ阻害剤を添加した溶媒 (Krebs-HEPES buffer あるいは血清含有 DMEM) に溶解し、細胞に処置後、37°C にてインキュベートした。その後、溶媒を回収し、高感度ラジオイムノアッセイ法により SP 含有量を検出した。
- (3) 免疫細胞化学染色：DRG 細胞を anti-SP と anti-MAP-2、anti-SP と anti-NK-1R、anti-SP と anti-Nav1.8、そして、anti-NK-1R と anti-TRPV1 抗体でそれぞれ反応させ、二重染色を行った。
- (4) マウス坐骨神経 CCI モデルの作製：モデルの作製は、野生型および Nav1.8 ノックアウトマウスを用いてトリクロロアセトアルデヒド-水素 (450mg/kg i.p.; 和光、大阪) による麻酔下にて行った。左後肢の坐骨神経を周囲組織から剥離し、ピンセットで軽く持ち上げることににより軸索部分を軽度引き伸ばした後、4-0 のクロミガット縫合糸 (Ethichon, Brussels, Belgium) で緩く縛った。反対側の坐骨神経においては露出させたが縛らない疑似手術を行った。また、左後肢に疑似手術を行ったコントロールマウスも作製した。
- (5) リアルタイム PCR：L4-6 DRGs から acid guanidinium-phenol-chloroform 法に準じて total RNA を抽出し、superscript キット (Life Technologies, Gaithersburg, MD) を用いて cDNA を作製した。その後、2 μg cDNA を鋳型とし、iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Tokyo) と forward および reverse プライマーを用いて DNA engine Opticon 2 real-time PCR detection system (Bio-Rad, Tokyo, Japan) により PPT-A mRNA 量を定量した。

- (6) ウェスタンブロット解析：薬物を処置した DRG 細胞を溶解しプロテインサンプルを作製した。サンプルは SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜に転写後、COX-2、NK-1R または β-actin に対する特異的な一次抗体と反応させた。その後、horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit あるいは anti-mouse IgG 抗体を反応させ、ECL を用いた化学発光法により可視化した。バンドは Scion image 4.0.3 software を用いて定量した。内部標準として β-actin を用いた。

4. 研究成果

- (1) カプサイシン (TRPV1 アゴニスト) による培養 DRG 神経からの SP 遊離は、NK-1R アゴニストによる NK-1R の活性化により増強された。さらに、この増強作用は、NK-1R 活性化による protein kinase C (PKC) を介した TRPV1 の Ser800 サイトのリン酸化が関与していることが明らかになった。
- (2) Nav1.8 の欠損により侵害刺激による培養 DRG ニューロンからの SP 遊離が抑制された。また、Nav1.8 ノックアウトマウスにおける L6 DRG の SP 合成量は野生型マウスと比較して減少していることが明らかとなった。(Fig. 1).

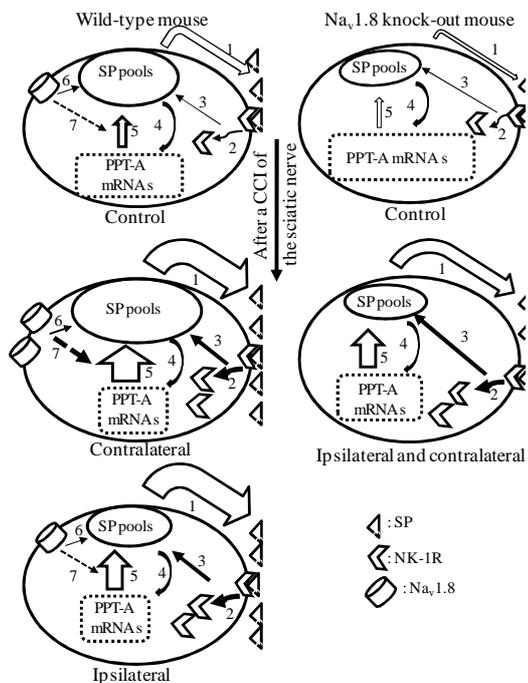


Fig. 1. L6 DRG における SP 遊離・合成系と

Nav1.8 発現との関連を示す概念図。1: DRG 神経の細胞内 SP プールからの SP 遊離。2: 遊離された SP は NK-1R に結合し、SP-NK-1R 複合体の内在化を引き起こす。3: SP-NK-1R 複合体の内在化によりさらなる SP 遊離を誘導する。4: SP 遊離による細胞内 SP プールの SP 量の減少により、SP 合成系が賦活される。5: 細胞内 SP プールの SP 量の減少による SP 合成系の賦活は、PPT-A mRNA レベルの減少によって誘導される可能性が考えられる。6: Nav1.8 は SP 遊離の増強に関わる可能性が考えられる。7: Nav1.8 は、さらなる SP 遊離に関わるシグナルの増強に関与する可能性が考えられる。坐骨神経の CCI により 1、2、3、5、6、および 7 のうちいくつかの応答を増強させる。矢印の太さは相対的な活動強度を表す。

- (3) 培養 DRG 神経からの SP 遊離は神経と非神経細胞 (図 2) の共存を必要とする。
(Fig. 2).

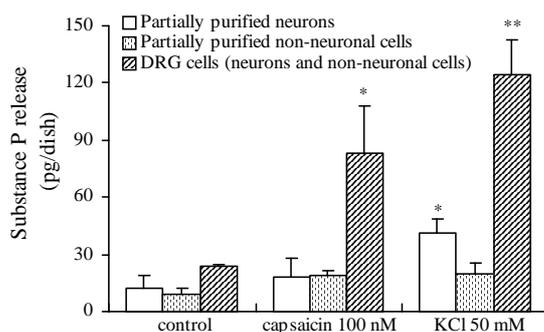


Fig. 2 カプサイシンおよび KCl 処置 (37°C、10 分間) による non-purified DRG 神経、partially purified DRG 神経あるいは非神経細胞からの SP 遊離

- (4) カプサイシンによる TRPV1 を介した培養 DRG 神経からの SP 遊離は、2 つの異なるメカニズムを介して引き起こされた: ①細胞外 Ca^{2+} 依存的な経路で、PI3K 活性および IP_3 感受性細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 遊離が関与する; ②細胞外 Ca^{2+} 非依存的な経路で、MEK 活性が関与する。
- (5) NK-1R アゴニストによる NK-1R 活性化により培養 DRG 神経から SP 遊離が誘導され、この遊離には MAP キナーゼ、PKC および COX-2 が関与する。

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 5 件)

- (1) Tang HB, Li YS, Miyano K, Nakata Y: Phosphorylation of TRPV1 by neurokinin-1 receptor agonist exaggerates the capsaicin-mediated substance P release from cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology*. 55:1405-1411, 2008. 査読有り

- (2) Tang HB, Shiba E, Li YS, Morioka N, Zheng TX, Ogata N, Nakata Y: Involvement of Voltage-gated Sodium Channel $Na_v1.8$ in the Regulation of the Release and Synthesis of Substance P in Adult Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons. *J Pharmacol Sci*. 108: 190-197, 2008. 査読有り

- (3) Tang HB and Nakata Y: The activation of transient receptor potential vanilloid receptor subtype 1 by capsaicin without extracellular Ca^{2+} is involved in the mechanism of distinct substance P release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 377:325-332, 2008. 査読有り

- (4) Tang HB, Li YS and Nakata Y: The release of substance P from cultured dorsal root ganglion neurons requires the non-neuronal cells around these neurons. *J Pharmacol Sci*. 105: 264-271, 2007. 査読有り

- (5) Tang HB, Li YS, Arihiro K and Nakata Y: Activation of the neurokinin-1 receptor by substance P triggers the release of substance P from cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. *Mol Pain*. 3:42, 2007. 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

- (1) Tang HB: Elucidation of substance P release mechanisms.
第 81 回日本薬理学会年会、
2008 年 3 月 19 日 (横浜)
- (2) 唐和斌: DRG からの神経ペプチド (サブスタンス P) の遊離機構の解明、
第 35 回薬物活性シンポジウム、
2007 年 11 月 29 日 (広島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

唐 和斌 (He-Bin Tang)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10403502

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者