

機関番号：33905
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20602007
 研究課題名（和文）プロスタグランジン受容体 EP3 を介したブラジキニン B2 受容体の脱感作
 減弱機序
 研究課題名（英文）The attenuation mechanism of bradykinin B2 receptor desensitization
 through prostaglandin EP3 receptor
 研究代表者
 小崎 康子 (KOZAKI YASUKO)
 金城学院大学・薬学部・准教授
 研究者番号：20126882

研究成果の概要（和文）：内因性痛み物質の 1 つであるブラジキニン（BK）を繰り返し投与すると BK B2 受容体の脱感作がおこる。プロスタグランジン (PG) E2 は EP3 受容体を介してこの脱感作を減弱し、結果として痛みの増強をおこす。本報の結果から、PGE2 は EP3 受容体を介して、BK と結合した B2R の細胞内への移行と、内在化した B2R の細胞膜へのリサイクリングの両方を促進して、侵害受容体の BK 反応を感作する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Repeated administration of bradykinin (BK), which is one of the endogenous algogenic substances, induces desensitization of B2 receptor. Activation of prostaglandin (PG) E2 EP3 receptor attenuates B2 receptor desensitization, leading to increased pain. Our findings indicate a possibility that prostaglandin enhances both internalization of B2R bound to BK and recycling of the internalized bradykinin B2R through EP3R, and this might be a mechanism for sensitizing the BK response of nociceptors by prostaglandin E2.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学、分子生物学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：プロスタグランジン EP3 受容体、ブラジキニン B2 受容体、脱感作、痛覚過敏、受容体内在化

1. 研究開始当初の背景

内因性痛み物質の 1 つであるブラジキニン（BK）を繰り返し投与すると BK B2 受容体 (B2R) の脱感作がおこり、プロスタグランジン (PG) E2 は EP3 受容体 (EP3R) を介してこの脱感作を減弱するという電気生理学の実験結果が報告されているが、その細胞内メカニズムについては不明であった。そこで、我々は、先に、EP3R と B2R を共発現する CHO 細胞において、BK を短時間に繰り返し

投与した場合にも B2R の脱感作がおこること、この脱感作が EP3R/Gi 経路を介して減弱されることを確認した。(Kozaki et al., J. Neurochem., 2007) BK による B2R の脱感作は、BK によって誘起される細胞内カルシウム上昇反応よりも遅い過程であることから、受容体の内在化等の過程が関与する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

PGE₂ EP3R を介した B2R の脱感作の減弱を導く細胞内メカニズムの解明を目的としたものである。

3. 研究の方法

緑色蛍光蛋白質(GFP)でタグ付けした B2R と EP3R を共発現する CHO 細胞において、細胞膜部に GFP 由来の蛍光が観察される。この蛍光強度が BK 投与後にどのように変化するか経時的変化を観察し、EP3R アゴニスト、蛋白キナーゼ阻害剤等がこの GFP 蛍光の減少、すなわち、B2R の細胞内移行に与える影響を調べる。

BK は B2R と結合して、細胞内へ移行するので、細胞内へ移行した BK の総量は、BK と結合して細胞内に入った延べの B2R の量を反映すると考えられる。EP3R と GFP 標識 B2R を安定的に共発現する培養細胞系において、BK 分子の細胞内移行に対する、EP3R アゴニスト、蛋白キナーゼ阻害剤、受容体インターナリゼーション阻害剤等の影響を調べることによって EP3R アゴニストの作用点を明らかにする。

4. 研究成果

(1) GFP 標識 B2R の細胞内移行に対する EP3R アゴニストの作用 : GFP 標識 B2R と EP3R を共発現する培養細胞系において、細胞膜部分に観察される GFP 由来の蛍光強度は、BK 投与 (1 μM、1 分間) 4~10 分後に減少した。この時、B2R は BK と結合して、細胞内へ移行したと考えられる。BK による細胞内カルシウム上昇反応は、投与開始 45 秒後に最大となるので、B2R の細胞内移行は BK によるカルシウム上昇反応の後に起こる遅い過程であることを確認した。この B2R の細胞内移行は、EP3R アゴニスト、ONO-AE-248 前投与 (0.1 μM、BK 投与 3 分前) あるいはプロテインキナーゼ(PKA) 阻害剤 H-89 前処置 (10 μM、BK 投与前 20 分間) によって抑えられ、B2R を細胞膜部分に留める作用をもつことが分かった。EP3 アゴニストと PKA 阻害剤は、図 1 に示すような B2R の細胞内移行を抑制するか、B2R の膜へのリサイクリングを促進する作用があると考えられる。

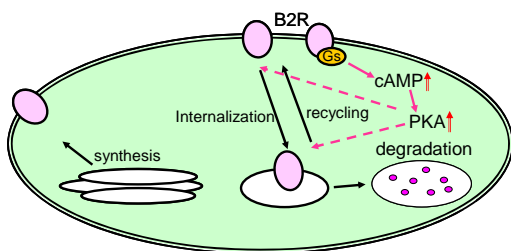


図 1 B2R の細胞内移行とリサイクリング

(2) EP3R アゴニストの ³[H]BK の細胞内移行に対する作用 : GFP-B2R と EP3R を安定的に共発現する CHO 細胞株において、³[H]BK (4nM) を 15 分間投与した場合に、B2R と結合して細胞内へ移行する ³[H]BK の割合は、H-89 (10 μM、20 分) による前処置で減少し、³[H]BK-B2R の細胞内移行を抑制したことがわかった。B2R 細胞内移行の過程には、PKA の活性化が関与すると考えられる。ONO-AE-248 (1 μM、5 分) 前投与では ³[H]BK の細胞内移行の抑制は見られず、PKA 阻害剤の作用とは明らかに異なっていた。受容体インターナリゼーション阻害作用が知られるコンカナバリン (Con) A を前投与 (0.5 mg/ml、15 分間) すると、細胞内へ移行する ³[H]BK の割合は減少したが、ONO-AE-248 の同時投与は、ConA による ³[H]BK の細胞内移行阻害作用に対して拮抗的に働いた。(図 2)

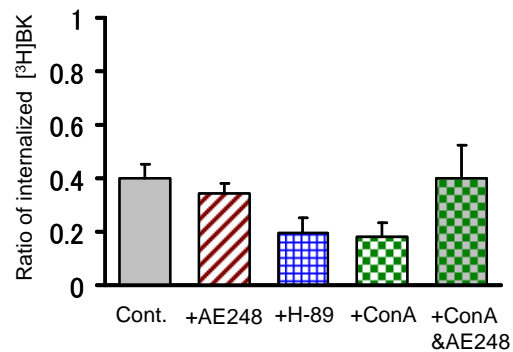


図 2 BK の細胞内へ移行する割合に及ぼす EP3 アゴニスト (AE248)、PKA 阻害剤 (H-89)、受容体インターナリゼーション阻害剤 (ConA) の影響 (Cont.はコントロール)

EP3R アゴニストは、B2R の細胞内移行と細胞膜へのリサイクリングを促進する作用があることが分かった。

EP3R を介したプロスタグランジンの B2R 脱感作減弱機序は、PKA 阻害剤とは異なる作用機序を含み、B2R の細胞内移行とリサイクリングの両方を促進して、BK 反応を増強する可能性があると考えられる。(図 3)

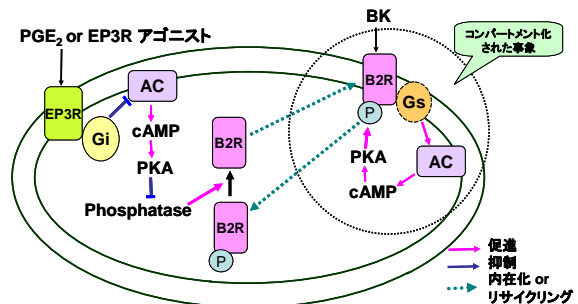


図 3 EP3 を介した PGE₂ の BKB2R 脱感作減弱

機構について推測される模式図

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 4 件)

1. Bradykinin and nerve growth factor play pivotal roles in muscular mechanical hyperalgesia after exercise (delayed onset muscle soreness). Murase, S., Terazawa, E., Queme, F., Hiroki Ota, H., Matsuda, T., Hirate, K., Kozaki, Y., Katanosaka, K., Taguchi, T., and Mizumura, K. J. Neurosci., 査読有, 30(10): 3752-3761, 2009.
(DOI:10.1523/JNeurosci.3803-09.2010)
2. Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: What do we know? (Review) Mizumura, K., Sugiura, T., Katanosaka, K., Banik R. K., Kozaki, Y. Exp. Brain Res., 査読有, 196 (1): pp.53-65, 2009.
(DOI:10.1007/s00221-009-1814-5)2009 年 6 月
3. Prostaglandin E2 negatively regulates AMP-activated protein kinase via protein kinase A signaling pathway. Funahashi, K., Cao, X., Yamauchi, M., Kozaki, Y., Ishiguro, N., Kambe, F. Prostaglandins & Other Lipid Mediators, 査読有 88: pp.31-35, 2009.
(DOI:10.1016/j.prostaglandins.2008.09.002)
4. 3beta-Hydroxysteroid-delta24 reductase is a hydrogen peroxide scavenger, protecting cells from oxidative stress-induced apoptosis. Lu, X., Kambe, F., Cao, X., Kozaki, Y., Kaji, T., Ishii, T., and Seo, H. Endocrinology, 査読有 149: pp.3267-3273, 2008..
(DOI:10.1210/en.2008-0024)

[学会発表] (計 6 件)

1. プロスタグランジン EP3 受容体の活性化による内在化ブラジキニン B2 受容体の細胞膜へのリサイクリングの促進. 小崎康子、鈴木義明、片野坂公明、森雅美、水村和枝、日本薬学会第 131 年会 (静岡) 2011.3.
2. プロスタグランジンは EP3 受容体を介して、内在化したブラジキニン B2 受容体のリサイクリングに作用する可能性がある. 小崎康子、鈴木義明、片野坂公明、森雅美、水村和枝、第 33 回 日本神経科学会 (神戸) 2010.9
3. The bradykinin (BK)-induced desensitization and sequestration of BK

B2 receptor is decreased by activation of prostaglandin EP3 receptor. Kozaki, Y., Kambe, F., Suzuki, Y., Katanosaka, Mizumura, K. 36th International Congress of Physiological Sciences (Kyoto), 2009.7.

4. ブラジキニン B2 受容体の脱感作と細胞内移行はプロスタグランジン EP3 受容体の活性化により抑制される. 小崎康子、神部福司、鈴木義明、片野坂公明、森雅美、水村和枝、日本薬学会第 129 年会、2009.3 (京都)
5. 伸張性収縮後に COX-2 mRNA と NGF mRNA 発現増大は異なった時間経過をとる. 妹尾詩織、小崎康子、片野坂公明、田口徹、水村和枝、第 30 回日本神経科学大会、2008.7 (横浜)
6. 伸張性収縮後の筋機械痛覚過敏の B2 受容体拮抗薬による抑制の機構. 水村和枝、妹尾詩織、片野坂公明、小崎康子、松田輝、第 30 回日本神経科学大会、2008.7 (横浜)

[その他] (計 1 件)

ホームページ等

<http://www.kinjo-u.ac.jp/kozaki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小崎 康子 (KOZAKI YASUKO)
金城学院大学・薬学部・准教授
研究者番号：20126882

(2) 研究分担者

林 弥生 (HAYASHI YAYOI)
金城学院大学・薬学部・教授
研究者番号：00117847
(H20→H21：連携研究者)

(3) 連携研究者

水村 和枝 (MIZUMURA KAZUE)
名古屋大学・環境医学研究所・教授
研究者番号：00109349