

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590280

研究課題名（和文） 知覚神経細胞の間のクロストークと神経ペプチド

研究課題名（英文） A crosstalk between sensory neurons and surrounding cells

研究代表者

仲田 義啓 (NAKATA YOSHIHIRO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40133152

研究成果の概要（和文）：

一次知覚神経の transient receptor potential ankyrin 1 活性化により細胞外の Ca^{2+} 流入および p38 MAPK のリン酸化を介し、一次知覚神経の中核、末梢端からサブスタンス P (SP) が遊離されることが示唆された。中枢端で遊離された SP は二次知覚神経の NK-1 受容体に作用することで疼痛、熱性痛覚過敏の伝達に関与し、また一次知覚神経の末梢端から遊離された SP は末梢組織に発現している SP の NK-1 受容体に作用することで、浮腫、熱性痛覚過敏が引き起こされることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To examine mechanisms underlying substance P (SP) release from primary sensory neurons in response to activation of the nonselective cation channel transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1), SP release from cultured rat dorsal root ganglion (DRG) neurons was measured, using radioimmunoassay, by stimulating TRPA1 with allyl isothiocyanate (AITC). The data suggest that activation of TRPA1 evokes SP release from the primary sensory neurons through phosphorylation of p38 MAP kinase, subsequent nociceptive behaviors and inflammatory responses. Furthermore, the data also indicate that blocking the effects in periphery tissue of TRPA1 activation leads to significant antinociception.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経薬理学, 疼痛制御機構

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：知覚神経, 神経ペプチド, 後根神経節細胞, サブスタンス P, クロストーク

1. 研究開始当初の背景

サブスタンス P (SP) は, Arg-Pro-Lys-

Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ の 11 個のアミノ酸残基からなる構造を有し, 知覚

神経（C 繊維）の細胞体が存在する後根神経節細胞（DRG）で生合成される。合成された SP は、末梢組織側と脊髄・脳の中核側の神経終末部に軸索輸送され、刺激に応じて両終末部から遊離する。ペプチド性神経伝達物質の遊離機構に関しては、SP も含め、アミン・アミノ酸系の伝達物質とは異なり、再取り込み機構がなく、拡散により情報が伝達されることが知られている（Volume transmission）。

一次知覚神経はその細胞体の大きさにより、大型細胞、中型細胞、小型細胞の 3 種類に大きく分類される。大型細胞は有髄の A β 線維を有するが SP のような神経ペプチドは含有していない。中型細胞は、有髄の A δ 線維をもち、一部の中型細胞は SP を含有しているが、神経伝達物質としてグルタミン酸を主に利用する。一方、小型細胞は細い無髄の C 線維を有し、SP、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（calcitonin gene-related peptide: CGRP）などの神経ペプチドやグルタミン酸を含有している。機能的には、大型細胞（A β 線維）は触覚や圧覚などの非侵害性刺激を伝達するのに対し、A δ 線維と C 線維は侵害性刺激を受容し伝達する。さらに、中型細胞（A δ 線維）と小型細胞（C 線維）は、前者が即時性の刺すような鋭い痛みを、後者が遅延性の焼けつくような鈍い痛みを伝達すると考えられている。これらの大型細胞（A β 線維）、中型細胞（A δ 線維）および小型細胞（C 線維）の細胞体は後根神経節細胞（DRG）で非神経細胞と共に共存しているが、DRG 内で各神経間の情報伝達機構の存在（クロストーク）についての研究は行われていない。一次知覚神経の活動指標としての培養後根神経節細胞（DRG）の有用性を考慮し研究課題の遂行に用いた。

DRG は初代培養が可能であり、知覚神経からの SP 遊離機能を評価でき、神経ペプチドの生合成細胞として遊離機構の研究にも利用できる。申請者は、後根神経節細胞内で細胞体間での情報伝達機構が存在し、知覚神経活動の制御が生体の求心性情報処理に重要な役割を演じていると想定し、ラットの DRG 初代培養細胞からの SP 遊離実験とマウスの行動実験から知覚神経細胞間のクロストークの可能性を検討した。

2. 研究の目的

後根神経節細胞（DRG）内の神経細胞間の情報伝達機構の解析

DRG の神経細胞は形態的に大型細胞、中型細胞、小型細胞に顕微鏡下で区別できる。本研究では、それぞれの細胞を特異的に刺激した場合、他の神経細胞および非神経細胞に対

する作用を解析し、DRG 内での知覚神経の Intra-ganglionic-transmission (IGT) の存在とその機能を in vitro および in vivo 系の実験で明らかにする。

DRG 内グリア細胞の SP 遊離機構に対する生理学的意義の解明

DRG 内グリア細胞などの非神経細胞は、知覚神経からの SP 遊離に重要な役割を果たしているが、その作用機序は不明である。DRG 内の非神経細胞の知覚神経伝達に対する機能を SP の遊離を指標に明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ラット DRG 初代培養細胞の作製：5 週齢の Wistar 系雄性ラットから DRG を取り出し酵素処理分散法により作製した。
- (2) ラット DRG 初代培養細胞からの SP 遊離量の測定：6 日間培養したラット DRG 初代培養細胞を TRPA1 のアゴニストである AITC で処置し、ラジオイムノアッセイにより SP 遊離量を測定した。
- (3) タンパク質発現量解析：DRG 細胞を RIPA buffer に溶解させることでタンパク質を抽出した。これらを SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース膜に転写させた後、特異的抗体を用いて目的タンパク質を検出し、Image Gauge (Fuji Film)により定量した。
- (4) AITC 投与における疼痛及び炎症反応の測定：5~6 週齢 ddy 系雄性マウスの後肢足蹠に AITC を投与後、疼痛反応観察、浮腫率、52°C のホットプレートテストを用いて熱性痛覚過敏を測定した。

4. 研究成果

- (1) TRPA1 活性化によるラット DRG 初代培養細胞からの SP 遊離
DRG 細胞において TRPA1 活性化による SP 遊離の増加を検討した。その結果、AITC 処置により時間・濃度依存的な SP 遊離が認められた。
- (2) TRPA1 活性化による SP 遊離に対する細胞外 Ca²⁺、Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 阻害剤の影響

AITC 誘発性 SP 遊離の増加は TRPA1 選択的阻害剤である HC-030031 (HC:50 μ M)及び、細胞外 Ca²⁺ を除去することによりほぼ完全に抑制された(図 1 上)。この結果から、DRG 細胞の TRPA1 を活性化することによる細胞外からの Ca²⁺ 流入を介して SP が遊離されることが示唆された。

DRG 細胞における TRPA1 活性化を介した SP の遊離に影響を及ぼす MAPK について検討を行った。その結果、p38 MAPK 阻害剤である SB203580 (SB:10 μ M)により AITC 誘発性 SP 遊離は有意に抑制された(図 1 上)。しかし

ながら, MAPK/ERK kinase (MEK) 阻害剤の中, c-Jun N-terminal kinase (JNK) 阻害剤では有意な抑制効果は認められなかった(データ省略). またウエスタンブロッティング法を用い, AITC (10 μ M) 処置による p38 MAPK のリン酸化の検討を行った. その結果, AITC (1-10 分間, 10 μ M) 処置により 5 分以降で p38 MAPK の有意なリン酸化が認められた(データ省略). このリン酸化は SB, HC, 細胞外 Ca^{2+} 除去によりほぼ完全に抑制された(図 1 下). この結果から AITC 処置による SP 遊離には細胞外の Ca^{2+} に依存した p38 MAPK のリン酸化が関与していることが示唆された.

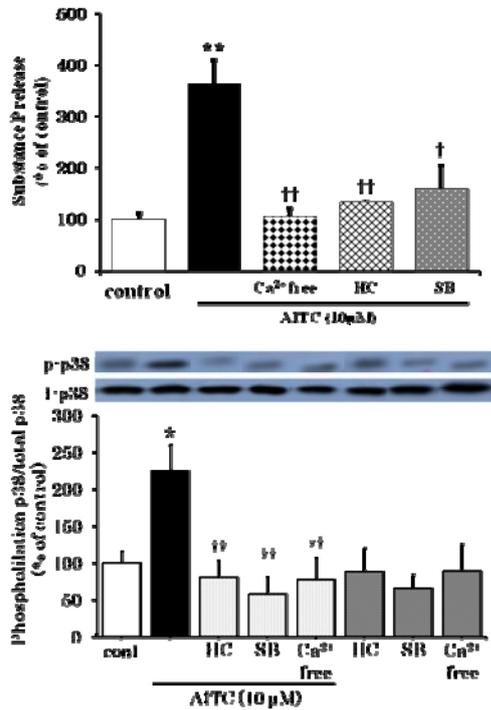


図 1 ラット後根神経節培養細胞からの AITC 刺激による SP 遊離量の変化

上図 細胞外のカルシウムイオンの効果

下図 MAPK 阻害剤の効果

(3) AITC 誘発性マウス炎症性疼痛反応に対する NK-1 受容体阻害剤, p38 MAPK 阻害剤後肢足蹠投与の効果

AITC (0.25 nmol) 後肢足蹠投与により浮腫, 疼痛, 熱性痛覚過敏が惹起された(Fig. 3). これらの反応は HC-030031 (HC: 2.5 nmol) を AITC 投与前に後肢足蹠投与することによりほぼ完全に抑制された. AITC 誘発性の浮腫, 熱性痛覚過敏は SP 受容体である NK-1 受容体に対する阻害剤である CP96345 (CP: 2.5 nmol) を AITC 投与前に後肢足蹠投与するこ

とにより有意に抑制された. しかしながら疼痛反応においては無影響だった. また SB203580 (SB: 0.25 nmol) を AITC 投与前に後肢足蹠投与することにより浮腫, 熱性痛覚過敏, 疼痛反応のいずれの反応に対して有意な抑制効果が認められた. これらの結果から AITC 誘発性の浮腫及び熱性痛覚過敏は一次知覚神経の末梢側からの p38 MAPK 活性化に依存した SP 遊離により引き起こされ, 一方, 疼痛反応は一次知覚神経の末端側からの SP 遊離は関与していない可能性が示唆された.

(4) AITC 誘発性マウス炎症性疼痛反応に対する NK-1 阻害剤脊髄くも膜下腔内前投与の効果

AITC 誘発性の炎症性疼痛反応は AITC 投与前に CP96345 を脊髄くも膜下腔内投与することにより熱性痛覚過敏, 疼痛反応いずれの反応も有意な抑制効果が認められた(図 2). この結果から AITC 誘発性の熱性痛覚過敏, 疼痛反応は一次知覚神経の中枢端の SP 遊離により引き起こされることが示唆された.

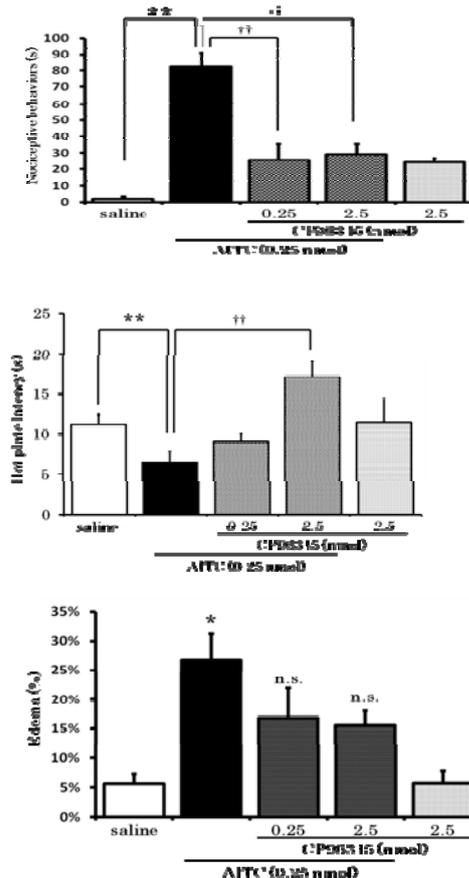


図 2 AITC 誘発性マウス炎症性疼痛反応に対する NK-1 阻害剤脊髄くも膜下腔内前投与の効果(上図; 侵害刺激反応, 中図; 熱刺激反応, 下図; 浮腫反応)

本研究により, 一次知覚神経の末梢端の TRPA1 活性化により細胞外の Ca^{2+} 流入および p38 MAPK のリン酸化を介し, 一次知覚神経の中核, 末梢端から SP が遊離されることが示唆された. 中枢端で遊離された SP は二次知覚神経の NK-1 受容体に作用することで疼痛, 熱性痛覚過敏の伝達に関与し, また一次知覚神経の末梢端から遊離された SP は末梢組織に発現している NK-1 受容体に作用することで, 浮腫, 熱性痛覚過敏が引き起こされ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 2 件)

1. Yoki Nakamura, Yujiro Une, Kanako Miyano, Hiromi Abe, Kazue Hisaoka Norimitsu Morioka, and Yoshihiro Nakata, Activation of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Evokes Nociception through Substance P Release from Primary Sensory Neurons, Journal of Neurochemistry, 120, 1036-1047, 2012 (査読有)

2. Kanako Miyano Norimitsu Morioka, Tatsuhiko Sugimoto, Seiji Shiraishi, Yasuhito Uezono, Yoshihiro Nakata, Activation of the neurokinin-1 receptor in rat spinal astrocytes induces Ca^{2+} release from IP_3 -sensitive Ca^{2+} stores and extracellular Ca^{2+} influx through TRPC3 Neurochemistry International, 57, 923 - 4934, 2010 (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. 中村庸輝, 宇根裕次郎, 安部裕美, 久岡一恵, 森岡徳光, 仲田義啓
ラット脊髄後根神経節初代培養細胞における TRPA1 受容体活性化によるサブスタンス P 遊離への p38MAP kinase の関与
第 84 回日本薬理学会年会, 横浜市, 2011 年 3 月 22-24 日

2. 宇根裕次郎, 中村庸輝, 安部裕美, 久岡一恵, 森岡徳光, 仲田義啓
TRPA1 刺激による知覚神経からのサブスタンス P 遊離機構の解明
第 118 回日本薬理学会近畿部会, 大阪市, 2010 年 11 月 19 日

3. 宮野加奈子, 中村庸輝, 唐和斌, 森岡徳光, 井上敦子, 仲田義啓
脊髄後根神経節初代培養細胞におけるパクリタキセルおよびビノレルビンのサブスタンス P 遊離に対する効果,
第 82 回日本薬理学会年会, 横浜市, 2009 年 3 月 16-18 日

[図書] (計 1 件)

1. ニューロペプチド総論: 作用機序: 古典的神経伝達物質との比較
仲田 義啓, 森岡 徳光, 月刊 臨床神経科学 (Clinical Neuroscience) 30 巻 2 号, 140-143, 2012 年 中外医学社

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/pha>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲田 義啓 (NAKATA YOSHIHIRO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 40133152

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

森岡 徳光 (MORIOKA NORIMITSU)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号: 20346505