

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791849

研究課題名（和文） 歯髄炎の疼痛制御を目指した炎症性疼痛の分子メカニズムの解析

研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanism of inflammatory pain for pain control of pulpitis

研究代表者

永山 智崇（NAGAYAMA TOMOTAKA）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60456944

研究成果の概要（和文）：炎症の局所環境を想定し、末梢神経におけるプロトンによる TRPV1 の活性化から発痛物質 CGRP の発現調節ならびに細胞外分泌に至るまでの分子メカニズムについて検索を行った。詳細な解析により、プロトンによる TRPV1 の活性化が、CREB-CaMK 経路を介して CGRP の発現を誘導することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The regulation mechanism of CGRP expression and secretion induced by acid activation of TRPV1 signaling in DRG neurons, assuming local environment of inflammation, were investigated. Detailed analysis revealed that acid activation of TRPV1 lead to an up-regulation of CGRP expression via CREB-CaMK cascade.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯学、シグナル伝達、神経科学、疼痛、炎症

1. 研究開始当初の背景

歯髄炎は主にう蝕からの細菌感染を原因として歯髄が不可逆性の炎症性変化を起こすことであるが、激しい疼痛が伴うために患者は大きな苦痛を被ることになる。歯髄炎に対する治療としては、疼痛誘発のメカニズムが不明であるために、結果として歯髄の全部除去である抜髄が行われている。このように、疼痛はヒトと主観的で情動的な感覚であるために客観的に把握することが非常に難しく、また疼痛を受容する分子実体が不明であったために、その科学的追究が非常に困難で

あった。

ところが近年、トウガラシの辛味成分であるカプサイシンの受容体として発見された TRPV1 が疼痛（酸や熱などの侵害刺激）を受容することが明らかとなり、分子生物学的な研究が盛んに行われるようになってきた。申請者もこれまでに遺伝子欠損マウスを用いた実験により、炎症性疼痛には炎症局所で増加する酸（プロトン）による TRPV1 の活性化が関与することを証明し、後根神経節（DRG）において発痛物質である CGRP の産生が、TRPV1 依存性に促進される可能性

があることを報告した。さらに、TRPV1 はヒト歯髄においてもその発現が確認されており、う蝕に罹患した歯の歯髄における侵害受容に TRPV1 が関与していることや、酸や熱によって歯髄からの CGRP の分泌が促進されることが示されている。したがって、歯髄炎の疼痛誘発についてもプロトンによる TRPV1 の活性化および CGRP の産生増加が関与している可能性が推察される。しかしながら、歯髄炎による疼痛に関しては、動物モデルおよび疼痛の評価法、また疼痛受容に関与する細胞の特定や株化といった解析方法の確立が遅れていることから、現在のところ疼痛誘発の分子メカニズムはほとんど解明されていない。

このような背景のもとに、申請者は、歯髄炎による疼痛の分子レベルでのメカニズムの解明ならびにそれに基づいた疼痛制御法の開発を実現するためには、まず一般的な炎症性疼痛の分子メカニズムを解明し、その手法を歯髄分野に還元していくアプローチが必要不可欠であると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、炎症において局所が酸性化すること、ならびに TRPV1 が酸（プロトン）を感受することに着目し、末梢神経におけるプロトンによる TRPV1 の活性化から発痛物質 CGRP の発現調節ならびに細胞外分泌に至るまでの分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DRG における TRPV1、CGRP およびリン酸化 CREB 発現の免疫組織学的検索

末梢神経の細胞体の集合である DRG の凍結切片を作製し、TRPV1 と CGRP、TRPV1 とリン酸化 CREB、CGRP とリン酸化 CREB の蛍光二重染色をそれぞれ行った。そして同一ニューロンに両者が共発現する比率を検討した。

(2) CREB のリン酸化に対する酸刺激の効果

Sango の方法により、DRG 細胞の初代培養を 8 ウェルチャンバースライド上で (3000 個/ウェル) 3 日間行った後、酸刺激 (pH5.5 の培養液) を 2 分間行った。そして CREB の蛍光免疫染色を行い陽性神経細胞数を計数し、コントロール (pH7.4 の培養液) との比率を比較検討した。さらに、TRPV1 のアンタゴニストである I-RTX (1 μM, 5 μM) を作用させたものと比較し、CREB のリン酸化

化に対する酸刺激の効果が TRPV1 を介しているか否かについても検討した。

(3) CGRP 遺伝子のプロモーター活性に対する CREB の関与

CGRP のプロモーター領域の解析は UCSC Genome Infomatics Database を用いて行う。そして CREB 結合配列である cAMP Response Element (CRE) が高度に保存されている領域を検索した (図 1)。さらに CGRP 遺伝子の転写開始点からこの CRE 領域を含むプロモーター領域、CRE を含まないプロモーター領域、および変異を導入した CRE を含むプロモーター領域を組み込んだレポーターコンストラクトをそれぞれ作製し (図 2)、DRG 様細胞株である F11 に TRPV1 を安定発現させた F11/TRPV1 を用いて酸刺激 (pH5.5 の培養液) に対する CGRP 遺伝子のプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにて測定することにより、CGRP 遺伝子プロモーター活性における CRE の重要性を検した。さらに I-RTX (1 μM, 5 μM) を作用させたものと比較し、酸刺激が TRPV1 の活性化を介して CREB の転写活性を促進し、CGRP の発現を誘導しているか否かについても検討した。

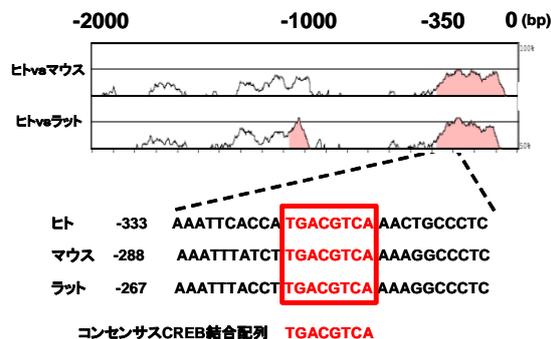


図 1. CGRP 遺伝子プロモーター領域の解析

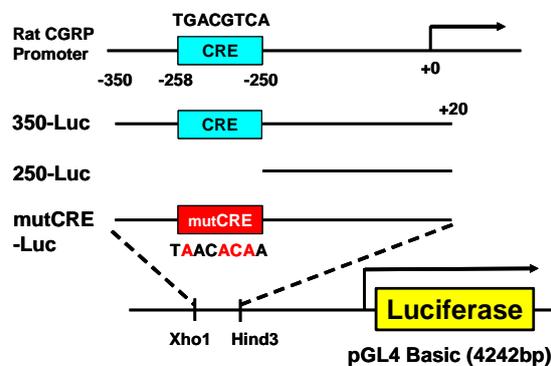


図 2. ルシフェラーゼアッセイ

(4) 酸刺激誘導性の CREB 転写活性促進作用における CaMKII の関与

DRG の凍結切片を作製し、TRPV1 と CGRP、TRPV1 とリン酸化 CREB、CGRP とリン酸化 CREB の蛍光二重染色をそれぞれ行った。そして同一ニューロンに両者が共発現する比率を検討した。さらに F11/TRPV1 を用いて酸刺激 (pH5.5 の培養液) に対する CREB 転写活性をルシフェラーゼアッセイにて測定し、CaMKII 特異的阻害剤である KN-93 (1 μM, 5 μM) を作用させたものと比較することにより、酸刺激誘導性の CREB 転写活性促進作用における CaMKII の関与の有無について検討した。

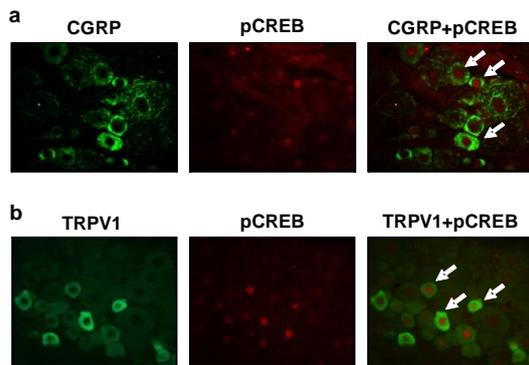
(5) CGRP 分泌に対する酸刺激の効果

初代培養 DRG 細胞に酸刺激 (pH5.5 の培養液) を 10 分間行い、培養上清中への CGRP の分泌を ELISA 法 (ラット CGRP EIA KIT, SPI-BIO, France) にて測定した。さらに I-RTX (10 μM) を作用させたものと比較し、酸刺激が TRPV1 の活性化を介して CGRP の分泌を促進しているか否かについても検討した。

4. 研究成果

(1) DRG における TRPV1、CGRP、リン酸化 CREB およびリン酸化 CaMKII 発現の免疫組織学的検索

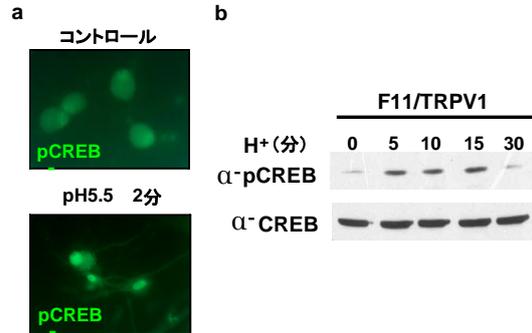
同一ニューロンにおいて、TRPV1 と CGRP、TRPV1 とリン酸化 CREB、CGRP とリン酸化 CREB それぞれが共局在を示すことが確認された。



(2) CREB のリン酸化に対する酸刺激の効果

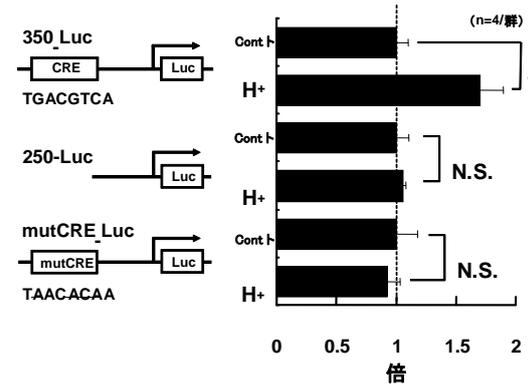
pH5.5 の酸刺激は、DRG 由来初代培養細胞において CREB のリン酸化を顕著に促進した。さらに、F11/TRPV1 細胞においても、酸刺激により CREB のリン酸化が誘導され

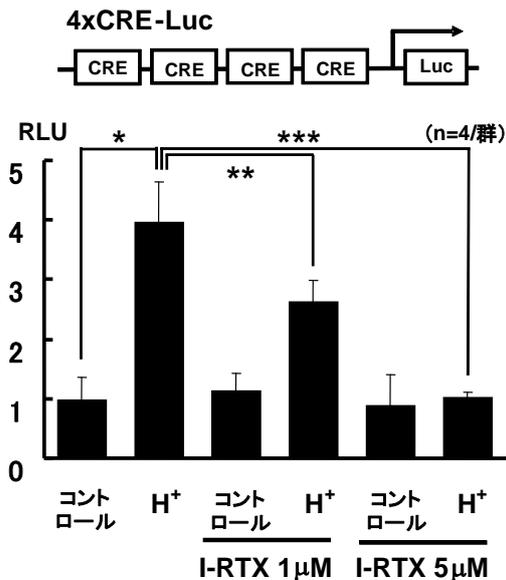
ることがウエスタンブロッティング法により明らかとなった。以上の結果より、酸刺激による CREB のリン酸化が CGRP 遺伝子の発現調節に関与している可能性が示された。



(3) CGRP 遺伝子のプロモーター活性に対する CREB の関与

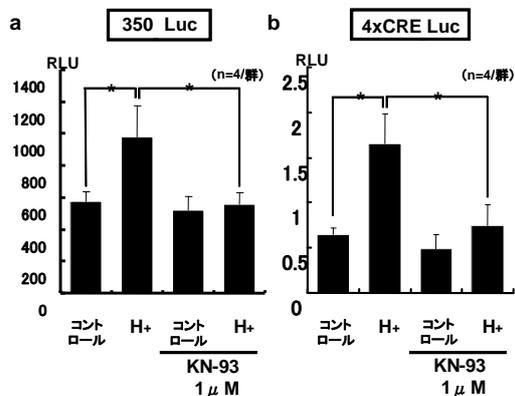
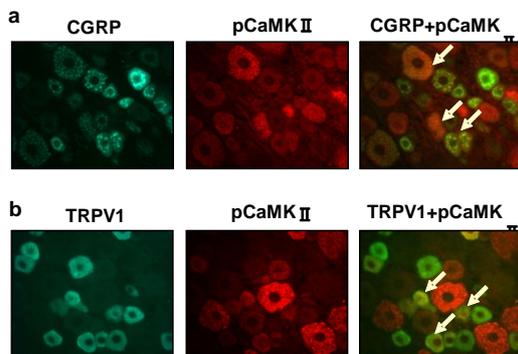
ルシフェラーゼアッセイの結果、CRE を有する 350-Luc のみ酸刺激によるプロモーター活性の促進が見られ、250-Luc や mutCRE-Luc では酸刺激により CGRP 遺伝子のプロモーター活性は影響を受けなかった。さらに、CRE のみを 4 回繰り返した配列を有するレポーターコンストラクト (4xCRE-Luc) を用いて同様にアッセイを行ったところ、酸刺激は CREB の転写活性を著明に促進し、この効果は TRPV1 の選択的アンタゴニスト I-RTX により濃度依存的に抑制された。以上の結果より、酸刺激は TRPV1 の活性化を介して CREB の転写活性を促進し、CGRP の発現を誘導していることが示された。





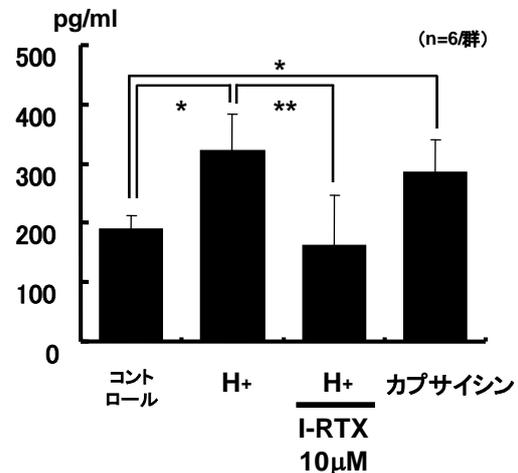
(4) 酸刺激誘導性の CREB 転写活性促進作用における CaMKII の関与

同一ニューロンにおいて、TRPV1 とリン酸化 CaMKII、CGRP とリン酸化 CaMKII それぞれが共局在を示すことが確認された。さらに CaMKII 特異的阻害剤 KN-93 は、F11-TRPV1 細胞において酸刺激により誘導される CGRP プロモーター活性ならびに CREB の転写活性促進を抑制した。以上の結果より、酸刺激誘導性の CREB 転写活性促進作用には、少なくとも一部は CaMKII が関与していることが示唆された。

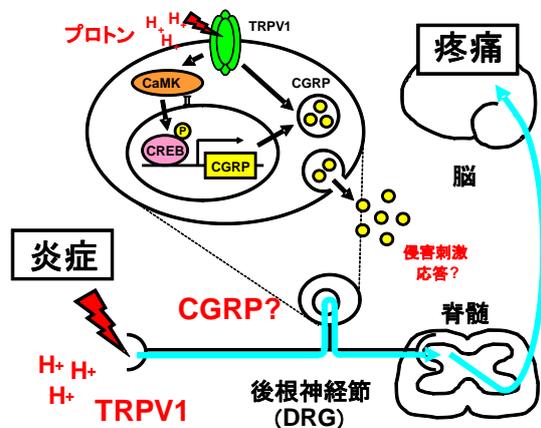


(5) CGRP 分泌に対する酸刺激の効果

酸刺激はカプサイシン刺激と同様に CGRP 分泌を促進し、またこの分泌促進作用は TRPV1 の選択的アンタゴニスト I-RTX により抑制された。以上の結果より、酸刺激は TRPV1 の活性化を介して CGRP 分泌を促進することが示された。



以上より、炎症局所において放出されるプロトンによる TRPV1 の活性化は、転写因子 CREB の転写活性促進を介した発痛物質 CGRP の産生、ならびに CGRP の細胞外分泌を促進することが明らかとなった。



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 1 件)

Masako Nakanishi, Kenji Hata, Tomotaka Nagayama, Teruhisa Sakurai, Toshihiko Nishisho, Hiroki Wakabayashi, Toru Hiraga, Shigeyuki Ebisu, and Toshiyuki Yoneda. Molecular Biology of the Cell, 査読有, Vol.21, 2568-2577, 2010

〔学会発表〕（計 1 件）

Tomotaka Nagayama. et al.
TRPV1-dependent CGRP expression
regulates inflammatory pain. 88th General
Session and Exhibition of the IADR,
2010.6.15, Barcelona, Spain.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永山 智崇 (NAGAYAMA TOMOTAKA)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60456944