

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25年 5月30日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22600013

研究課題名（和文） 神経因性疼痛における新規 K チャネルと交感神経の役割に関する研究

研究課題名（英文） Study of a role of sympathetic nerves on a novel K⁺ channel in 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）：神経因性疼痛の発生原因を調べる目的で、脊髄後根神経節ニューロン（DRG）を用いて、熱刺激で活性化される新規 K⁺チャネル（K_{heat}）の役割を観察した。末梢神経傷害によって DRG に投射された交感神経終末から放出されるノルアドレナリンは、アドレナリン受容体（α1 および β）を介して K_{heat} を抑制した。この K_{heat} の抑制によって、DRG の興奮性が高められ、神経因性疼痛の発生要因となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To study the mechanism of generation of neuropathic pain, a role of a novel heat-activated K⁺ channel (K_{heat}) in dorsal root ganglion neurons was examined. K_{heat} was inhibited by noradrenaline (NA) that is released from injured sympathetic nerve terminals through both alpha and beta adrenergic receptors. From the result, it is suggested that inhibition of K_{heat} by NA increases the excitability of the neuron, leading to generation of neuropathic pain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：神経因性疼痛、脊髄後根神経節、K⁺チャネル、熱、交感神経、アドレナリン受容体

1. 研究開始当初の背景

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℃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。我々が、この受容体につ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があることを発見した。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⁺チャネル（K_{heat}）により発生しているということが判明した。

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発生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の発生を決める因子となる。TRPV1 受容体は細胞の興奮性を高め、K_{heat} チャネルは逆に興奮性を抑制することを考えると、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。即ち、TRPV1 受容体の増強もしくは K_{heat} チャネルの抑制が起きれば、神経細胞の興奮性が高まり、神経因性疼痛が発生すると考えられる。我々の研究では、ノルアドレナリン (NA) は K_{heat} チャネルを抑制することで DRG 神経細胞の興奮性を増加させるということを明らかにしているが、この研究結果は、健常動物の神経細胞を用いて得られたものであるため、神経因性疼痛モデルにおける K_{heat} チャネル及びそれに対する NA の作用を明らかにしなければ、神経因性疼痛の発生機序を解明できない。

2. 研究の目的

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」という報告がある。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) がアドレナリン受容体を介して DRG 神経細胞の K_{heat} チャネルや TRPV1 受容体に作用して神経因性疼痛が発生し、これが神経因性疼痛モデル動物では特に増強されているのではないか」と考えた。

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脱分極しなければならない。そこで、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 K_{heat} チャネルの抑制

体温付近の温度である程度開いている K_{heat} チャネルが、アドレナリン受容体を介した蛋白キナーゼの作用によって抑制され、脱分極が発生する。(K_{heat} チャネルが体温付近の温度である程度開いているということは既に判明している。)

② TRPV1 受容体の活性化閾値の低下

アドレナリン受容体を介した蛋白キナーゼの作用により、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されるようになり、脱分極が発生する。即ち、TRPV1 受容体の温度に対する活性化閾値が NA によって低下する。

本研究は「我々が発見した新規 K^+ チャネル (K_{heat}) が神経因性疼痛の発生に関与する」、「神経因性疼痛モデル動物では TRPV1 受容体の温度に対する活性化閾値が低下する」と仮説を立てた点に特色があり、さらに「神経因性疼痛の発生源が DRG 神経細胞の発生する活動電位にある」と考えた点が独創的である。上記①と②の可能性について、健常動物ならびに神経因性疼痛モデル動物を用いて比較検討し、神経因性疼痛モデル動物では、①もしくは②がより増強されていることを証明

することで難治性疼痛である神経因性疼痛の病態が解明され、治療法が進歩すると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 神経因性疼痛モデル動物の作製と DRG 神経細胞の単離

麻酔下に、生後 4 週齢のラットの左坐骨神経を露出し、これを結紮・切離した神経因性疼痛モデル動物を作製する。対照動物は麻酔と坐骨神経の露出のみを行う。10 週後、麻酔下に左側 L4/5 の脊髄後根神経節 (DRG) を摘出し、コラゲナーゼで処理した後、ピペティングにより DRG 神経細胞を単離する。単離神経細胞を培養液中で 6 時間静置してカバーガラスに接着させ、実験に用いる。

(2) 神経因性疼痛モデルにおける K_{heat} チャネル発現量の変化

K_{heat} チャネルは新規に発見されたイオンチャネルであるため、mRNA や蛋白質の量を測定することで発現量を調べることが出来ない。そこで、 K_{heat} チャネルの活性化によって発生する電流 ($I_{K_{heat}}$) の単位膜面積当たりの密度 (電流密度) を測定することにより、 K_{heat} チャネルの機能的発現量を調べて、その経時的変化を観察する。

① 全膜容量の測定

パッチクランプ法を用いて、小型 DRG 神経細胞にランプ波通電を行い、単一細胞の電気的膜容量を測定する。(これにより単一神経細胞の全膜面積を測定することができる)

② $I_{K_{heat}}$ の測定

①を測定した後、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、 $I_{K_{heat}}$ のみを記録する。
※熱刺激の方法：熱刺激装置 (自作) を取り付けた灌流チャンバー内に置かれた神経細胞を、通常は 25°C の細胞外液で灌流するが、熱刺激時は数秒間で 45°C まで上昇させる。

③ $I_{K_{heat}}$ 密度の測定と比較

熱刺激によって発生した $I_{K_{heat}}$ を単一細胞の全膜容量で除することにより、単位膜面積当たりの $I_{K_{heat}}$ を計算し、 K_{heat} チャネル発現量のデータとする。神経因性疼痛モデル動物と対照動物から得られたデータを統計処理して比較することにより、 K_{heat} チャネル発現量の変化を調べる。

④ K_{heat} チャネル発現量の経時的変化

上記方法を用いて神経傷害後の K_{heat} チャネル発現量の経時的変化を観察し、次年度以降に行う K_{heat} チャネルに対する NA の作用を観察するための基礎データを蓄積する。

(3) K_{heat} チャネルに対するノルアドレナリンの作用

「NA の作用によって DRG 神経細胞の興奮性が、特に神経因性疼痛モデルにおいて増加する」ということを立証する実験を K_{heat} チャネルを

対象に行う。即ち、「NAによる K_{heat} チャネルの抑制が神経因性疼痛モデルで顕著である」ということを証明する。

①NAによる K_{heat} チャネルの抑制

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た実験で観察し、健常動物よりも神経因性疼痛モデルの方が強く抑制されるということを確認する。さらに、各種阻害薬を用いて、その抑制がどのアドレナリン受容体サブタイプを介したもので顕著であるか、どの蛋白キナーゼに依存しているのか、を詳細に調べる。

② K_{heat} チャネルの温度依存性の変化

NAの作用が、単に K_{heat} チャネルを抑制したものであるのか、温度依存性を変化させたものであるのか、について両動物群で調べ、比較検討する。

③以上の結果と平成22年度に得られた K_{heat} チャネル発現量の変化との相関を検討する。

(4) TRPV1受容体に対するノルアドレナリンの作用

「NAの作用によってDRG神経細胞の興奮性が、特に神経因性疼痛モデルにおいて増加する」ということを立証する実験をTRPV1受容体を対象に行う。即ち、「NAによるTRPV1受容体の増強作用が神経因性疼痛モデルで顕著である」ということを証明する。

①TRPV1受容体電流の記録

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

②NAによるTRPV1受容体の活性化閾値の低下
 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て体温付近の温度(36°C)でも活性化することを確認し、これが神経因性疼痛モデルで顕著であることを証明する。さらに、各種阻害薬を用いて、その活性化閾値の低下がどのアドレナリン受容体サブタイプを介したもので顕著であるか、どの蛋白キナーゼに依存しているのか、を詳細に調べる。

③以上の結果と K_{heat} チャネル発現量の変化との相関を検討する。

4. 研究成果

(1) K_{heat} チャネル発現量の変化

単一のDRG神経細胞における「 K_{heat} チャネルの発現量」について、パッチクランプ法を用いて電気生理学的に測定・検証した。「 K_{heat} チャネルの発現量」は「単位細胞膜面積当たりにおける K_{heat} チャネル電流量」で評価した。その結果、熱刺激に対して反応するDRG神経細胞は、①TRPV1受容体チャネルのみを発現

するもの、② K_{heat} チャネルのみを発現するもの、③TRPV1受容体チャネルと K_{heat} チャネルの両方を発現するもの、の3種類に分類できた。(図1)

それぞれを発現している細胞の割合を調べたところ、①約5%、②約40%、③約55%、であることが判明した。(図2)

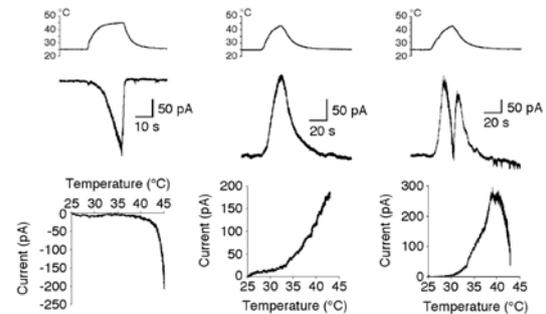


図1 脊髄後根神経節ニューロンにおける熱誘起性電流の記録

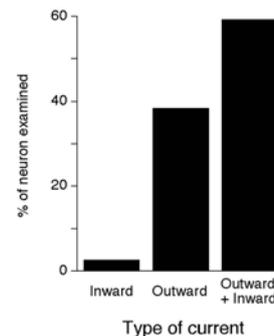


図2 脊髄後根神経節ニューロンにおける熱誘起性電流の分類

(2) K_{heat} チャネルに対するノルアドレナリンの作用

「 K_{heat} チャネルが活性化して発生する膜電流(IK_{heat})」について、ノルアドレナリン(NA)の作用を調べた。その結果、①NA(10 μ M)は IK_{heat} を約30%抑制することが分かった。(図3) ②NAによる IK_{heat} 抑制の機序について、各種agonists及びantagonistsを用いて薬理的に詳しく調べたところ、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体及び β アドレナリン受容体を介して(図4)、それぞれPKC及びPKAの活性化を経由して(図5)、NAが IK_{heat} を抑制していることが判明した。

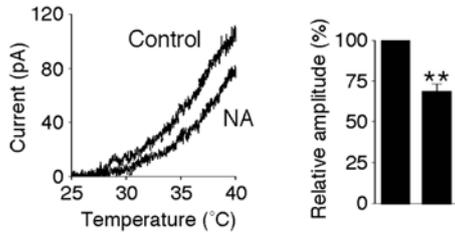


図3 熱誘起性K⁺電流に対するノルアドレナリンの作用

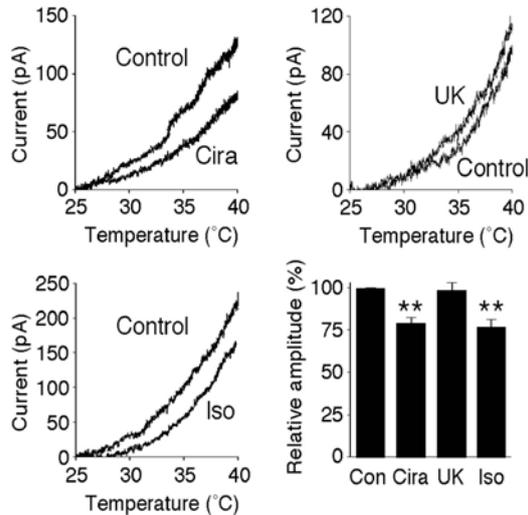


図4 熱誘起性K⁺電流に対するアドレナリン受容体作動薬の効果

Con: コントロール, Cira: $\alpha 1$ アドレナリン受容体作動薬 Cirazoline, UK: $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬 UK14304, Iso: β アドレナリン受容体作動薬 Isoproterenol

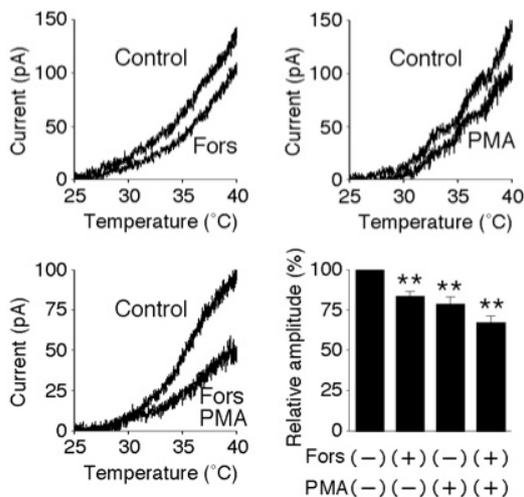


図5 熱誘起性K⁺電流に対する蛋白キナーゼの関与

Fors: アデニル酸シクラーゼ活性化薬 Forskolin, PMA: 蛋白キナーゼC活性化薬 12-myristate13-acetate

(3) TRPV1受容体に対するノルアドレナリンの作用

K_{heat} チャンネルを発現している DRG 神経細胞を用いて, TRPV1 受容体の活性化によって発生した電流 (I_{TRPV1}) について NA の作用を調べた. その結果, ① DRG 神経細胞を熱刺激すると, 多くの細胞において, 「K_{heat} チャンネルの活性化による電流 (I_{K_{heat}})」と「TRPV1 受容体の活性化による電流 (I_{TRPV1})」が混在した膜電流が観察された. 殆どの場合, I_{K_{heat}} が大きく, I_{TRPV1} はマスクされていたため, I_{TRPV1} のみを記録するためには K_{heat} チャンネルを抑制する必要がある. また, I_{TRPV1} のみを発生する細胞は非常に数が少なかった. ② I_{TRPV1} に対する NA の作用を調べようと試みたが, ①に記載したように, I_{TRPV1} のみを発生する細胞は少数であったこと, I_{TRPV1} は I_{K_{heat}} にマスクされて観察が困難だったこと, により NA の作用を検証するには効率が悪く, 十分な検証を行うことが出来なかった.

(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 TRPV1 受容体と熱誘起性 K⁺チャンネル (K_{heat} チャンネル) に注目して NA の作用を検討した. 殆どの DRG ニューロンは K_{heat} チャンネルを発現しており, NA は PKA 及び PKC の活性化を經由して K_{heat} チャンネルを抑制していた. K_{heat} チャンネルの抑制は, 細胞の興奮性を高める作用があるため, これが神経因性疼痛の発生原因になっている可能性が示唆された. 一方, TRPV1 受容体を発現している細胞は, 予想に反して非常に少数であり, 今回の研究機関では, この受容体に対する NA の作用を明らかにするまでには至らなかった. TRPV1 受容体に対する NA の作用については, 今後も実験を継続する.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Yu L, Wang S, Kogure Y, Yamamoto S, Noguchi K, Dai Y. Modulation of TRP channels by resveratrol and other stilbenoids. Mol Pain. Vol. 9, 3-13, 2013, 査読有, DOI:10.1186/1744-8069-9-3

② Yoshida N, Kobayashi K, Yu L, Wang S, Na R, Yamamoto S, Noguchi K, Dai Y. Inhibition of TRPA1 channel activity in sensory neurons by the glial cell line-derived neurotrophic factor family member, artemin. Mol Pain. Vol. 7, 41-50, 2011, 査読有, DOI:10.1186/1744-8069-7-41

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

(2)研究分担者

田中 康一 (TANAKA KOHICHI)
兵庫医療大学・薬学部・助教
研究者番号：30274848

(3)連携研究者

戴 毅 (DAI TSUYOSHI)
兵庫医療大学・薬学部・准教授
研究者番号：20330441
小暮 洋子 (KOGURE YOKO)
兵庫医療大学・薬学部・助手
研究者番号：60548684