

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590729

研究課題名(和文)PKAおよびカルシニューリンによるT型カルシウムチャネル機能調節を介した疼痛制御

研究課題名(英文)Pain regulation by PKA and calcineurin through functional modulation of T-type calcium channels

研究代表者

川畑 篤史(KAWABATA, Atsufumi)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：20177728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：T型カルシウムチャネルの3つのサブタイプのうち、Cav3.2は侵害受容ニューロンの末梢終末に豊富に発現し、痛みの情報伝達に重要な役割を果たしている。今回は、Cav3.2のリン酸化および脱リン酸化による機能調節とそれによる疼痛制御の分子メカニズムを解析した。その結果、プロスタグランジンEP4受容体刺激により活性化されるPKAが、足場タンパクAKAP150依存的にCav3.2をリン酸化し、チャネル機能を増強することで痛覚過敏を誘起すること、また、脱リン酸化酵素であるカルシニューリンはCav3.2の機能を抑制していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Among three isoforms of T-type calcium channels, Cav3.2 expressed abundantly in the peripheral ending of nociceptors plays a critical role in nociceptive processing. We thus examined molecular mechanisms for functional regulation of Cav3.2 by phosphorylation and dephosphorylation, and its impact on pain signals. Our data show that PKA, activated by stimulation of prostaglandin EP4 receptors in an AKAP150-dependent manner, phosphorylates and functionally upregulates Cav3.2, leading to hyperalgesia, and that calcineurin, a phosphatase, negatively regulates Cav3.2 functions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：カルシウムチャネル PKA カルシニューリン 痛み 神経突起伸長

1. 研究開始当初の背景

電位依存性カルシウムチャンネルは、高電位活性化型 (HVA) と低電位活性化型 (T 型カルシウムチャンネル) に分類されるが、鎮痛薬開発のための標的分子としてはこれまで HVA チャンネルに関する研究が重点的に行われてきた。一方、2001 年、Todorovic らは T 型カルシウムチャンネルが痛みの情報伝達に参与するとの知見を初めて報告した。その後、私達のグループを含む複数の研究者により、T 型カルシウムチャンネルの 3 つのサブタイプ Cav3.1 ~ 3.3 のうち、知覚神経に最も豊富に発現する Cav3.2 が痛みの情報伝達に重要な役割を果たすこと、また神経障害性疼痛の病態に参与することが明らかにされていた。一方、私達は、Cav3.2 T 型カルシウムチャンネルが内因性ガス状情報伝達物質である硫化水素 (H<sub>2</sub>S) の標的分子として痛みの情報伝達に重要な役割を果たすことを報告しており、H<sub>2</sub>S 以外の経路を介した Cav3.2 の機能調節の分子メカニズムを明らかにするため、Cav3.2 のリン酸化および脱リン酸化による機能制御に着目した。

2. 研究の目的

上述のように、Cav3.2 のリン酸化および脱リン酸化による機能制御に参与する分子として、今回は、protein kinase A (PKA) とカルシニューリンに着目し、これらの酵素による Cav3.2 のリン酸化および脱リン酸化の分子メカニズムを解析し、これらが痛みの情報伝達に及ぼす影響を明らかにすることを目的として研究に着手した。

3. 研究の方法

(1) T 型カルシウムチャンネル依存電流の測定: Cav3.2 T 型カルシウムチャンネルを発現することが知られている未分化 NG108-15 細胞あるいはラット脊髄後根神経節 (DRG) 細胞を用いてホールセルパッチクランプ法によりバリウム電流を測定した。

(2) Cav3.2、AKAP150、リン酸化 Cav3.2 の検出: Cav3.2 および AKAP150 はウエスタンブロット法で検出した。また、Cav3.2 と AKAP150 の分子間結合は、免疫沈降後にウエスタンブロットを行うことで検討した。リン酸化 Cav3.2 は Cav3.2 を免疫沈降させた後、抗リン酸化抗体で検出した。

(3) 痛覚過敏の検出: ラットの機械的痛覚閾値を後肢足圧法により測定した。

4. 研究成果

(1) NG108-15 細胞において dibutyryl cAMP (db-cAMP) あるいは PGE<sub>2</sub> は T 型カルシウム電流を促進する。

NG108-15 細胞において、T 型カルシウムチャンネルを介する膜連流が検出され、これは T 型カルシウムチャンネル阻害薬である NNC55-0396 (NNC) により抑制されることを確認した (図 1A, B)。この T 型チャンネル

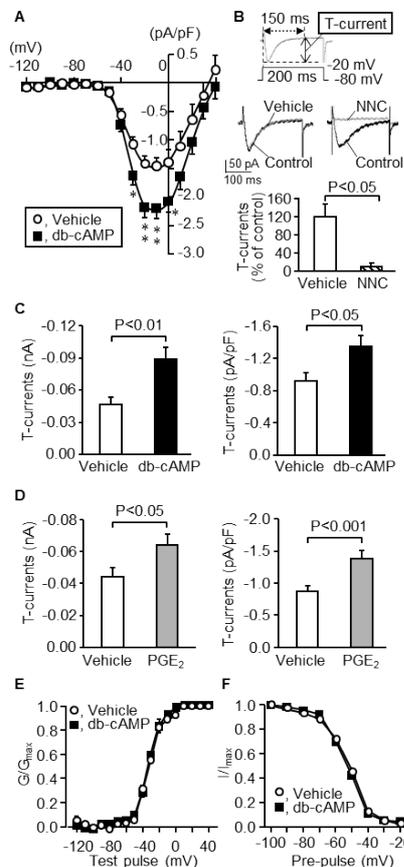


図 1 NG108-15 細胞における T 型カルシウム電流に及ぼす dibutyryl cAMP あるいは PGE<sub>2</sub> の促進効果

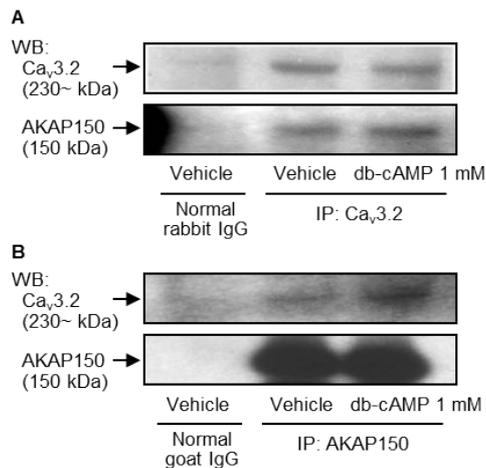


図 2 NG108-15 細胞における Cav3.2 と AKAP150 の共沈殿

電流は、db-cAMP あるいは PGE<sub>2</sub> によって増強された (図 1C, D) が、チャンネルの電気生理学的性質は影響されなかった (図 1E, F)。

(2) db-cAMP および PGE<sub>2</sub> による T 型チャンネル機能増強は AKAP に依存した PKA の作用によって生じる。

NG108-15 細胞において、db-cAMP あるいは

はPGE<sub>2</sub>によるTチャンネル電流の増強効果は、PKAとその足場タンパク AKAP との結合を阻害する AKAPI、PKA 阻害薬 KT5750、あるいはプロスタグランジン EP4 受容体拮抗薬 RQ-00015986 (RQ) により抑制された。

(3) db-cAMP による T チャンネル電流増強への AKAP の関与

ラットの DRG 細胞においても db-cAMP による T チャンネル電流促進効果が認められ、これは AKAPI によって抑制された。

(4) NG108-15 細胞における Cav3.2 と AKAP150 の分子間結合について

NG108-15 細胞ホモジネートでは、抗 Cav3.2 抗体で免疫沈降を行った場合には AKAP150 が共沈殿され、抗 AKAP150 抗体で免疫沈降を行った場合には Cav3.2 が共沈殿された。また、これらの共沈殿の程度は、db-cAMP 刺激による影響を受けなかった(図2)。

(5) NG108-15 細胞における Cav3.2 リン酸化状態に及ぼす db-cAMP および PGE<sub>2</sub> の影響とその性質

NG108-15 細胞において、db-cAMP 刺激によって Cav3.2 のリン酸化が増強され、これは AKAPI により抑制された(図3A) また、PGE<sub>2</sub> 刺激によっても Cav3.2 のリン酸化が促進され、これは EP4 拮抗薬である RQ により抑制された(図3B)。

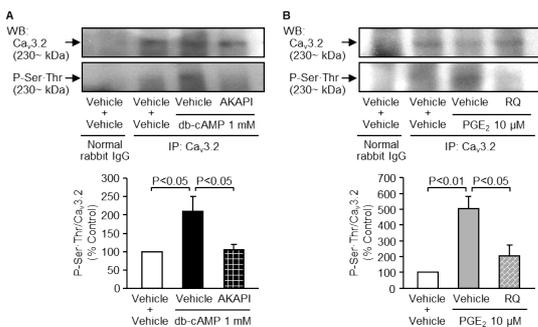


図3 db-cAMP は NG108-15 細胞における Cav<sub>3.2</sub> のリン酸化を促進する

(6) ラットにおける db-cAMP あるいは PGE<sub>2</sub> 足底内投与により誘起される機械的痛覚過敏への AKAP および EP4 受容体の関与

ラットにおいて、db-cAMP あるいは PGE<sub>2</sub> の足底内投与によって機械的痛覚過敏が誘起され、これは AKAPI あるいは EP4 受容体拮抗薬 RQ により抑制された。

(7) ラットにおける db-cAMP 誘起痛覚過敏への Cav<sub>3.2</sub> T 型カルシウムチャンネルの関与

ラットの足底内へ db-cAMP を投与することにより誘起される機械的痛覚過敏は、T 型カルシウムチャンネル阻害薬である NNC およびエトスクシミド (Etho)、T チャンネルの 3 つの isoform のうち Cav<sub>3.2</sub> のみを選択的に

阻害する Zinc、あるいは N 型カルシウムチャンネル阻害薬である  $\omega$ -コノトキシン GVIA によって抑制されたが、L 型カルシウムチャンネル阻害薬であるベラパミル (Vera) によっては影響されなかった(図4A, B, C, D, E)。一方、同用量の Vera は皮膚血流を増加させた(図4F)。

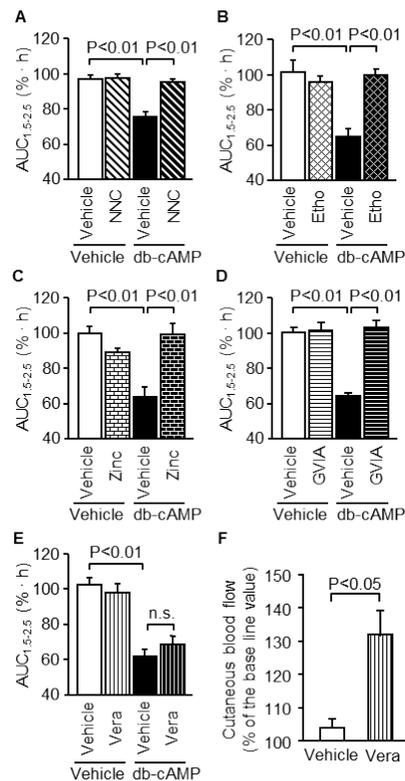


図4 ラットにおける db-cAMP 誘起痛覚過敏への Cav<sub>3.2</sub> T 型カルシウムチャンネルの関与

(8) ラットにおける PGE<sub>2</sub> 誘起痛覚過敏への Cav<sub>3.2</sub> T 型カルシウムチャンネルの関与

ラットにおいて PGE<sub>2</sub> の足底内投与により誘起される痛覚過敏は、NNC あるいは Zinc により有意に抑制された。

(9) db-cAMP あるいは PGE<sub>2</sub> により誘起される機械的痛覚過敏には TRPV1 は関与しない

ラットにおいて db-cAMP あるいは PGE<sub>2</sub> により誘起された機械的痛覚過敏は、TRPV1 チャンネル阻害薬である SB366791 により抑制されなかった。

(10) PGE<sub>2</sub> 誘起機械的痛覚過敏はカルシニューリン阻害薬 FK506 によって増強される

ラットにおいて、単独では作用を示さない低用量の PGE<sub>2</sub> の足底内投与による痛覚過敏効果はカルシニューリン阻害薬 FK506 の前投与により有意に増強された(図5)。

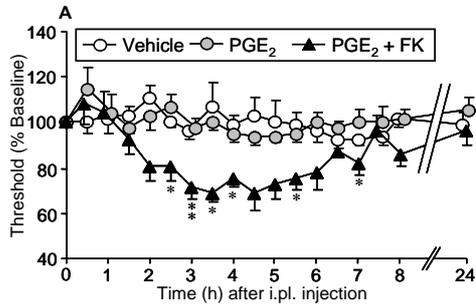


図5 ラットにおける低用量 PGE<sub>2</sub>による機械的痛覚過敏に対するカルシニューリン阻害薬 FK506 (FK) の増強効果

(11) マウスにおける PGE<sub>2</sub> 誘起痛覚過敏のメカニズム

マウスの足底内へ PGE<sub>2</sub> や db-cAMP を投与することによって誘起される痛覚過敏にも Ca<sub>v</sub>3.2 が関与するとの知見が得られた。

(12) マウスにおけるカプサイシン結腸内投与により誘起される内臓痛におけるカルシニューリンの役割

マウスの結腸内へ TRPV1 アゴニストであるカプサイシンを投与することで誘起される内臓痛が、脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの阻害薬であるタクロリムスの前処置によって増強されること証明した。一方、T型カルシウムチャンネルを活性化させる硫化水素供与体の結腸内投与による内臓痛は、タクロリムスによる影響を受けないことが判明した。

(13) NG108-15 細胞およびマウス脊髄後根神経節 (DRG) 細胞における検討

NG108-15 細胞およびマウス DRG 細胞において、cAMP/PKA 系を介する神経突起伸長には、内因性硫化水素と Ca<sub>v</sub>3.2 が関与することを明らかにした。

(14) 結論

上記結果より、PGE<sub>2</sub> は EP4 受容体を介して cAMP/PKA 系を活性化し、この PKA により AKAP 依存的にリン酸化された Ca<sub>v</sub>3.2 はより活性化しやすくなると考えられる(図6)。また、侵害受容ニューロンの末梢終末において、PGE<sub>2</sub>/EP4/cAMP/PKA/ Ca<sub>v</sub>3.2 系は炎症性痛覚過敏の発現に重要な役割を果たしていることが本研究により明らかとなった(図7)。さらに脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの阻害薬が PGE<sub>2</sub> 誘起痛覚過敏を増強したことより、Ca<sub>v</sub>3.2 のリン酸化と脱リン酸化のバランスが侵害受容ニューロンの興奮性制御に重要な役割を演じているものと推察される。一方、マウスにおいても Ca<sub>v</sub>3.2 が体性痛や内臓痛の発現に関与していること、また、カルシニューリンが疼痛抑制的に機能していることを示唆する知見も得られたほか、神経突起伸長における内因性硫化水

素、PGE<sub>2</sub>、PKA、Ca<sub>v</sub>3.2 の役割も示唆された。

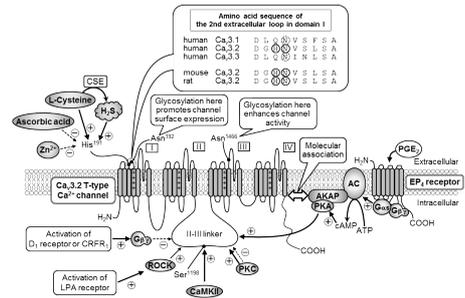


図6 Ca<sub>v</sub>3.2 T型カルシウムチャンネルの分子機能修飾

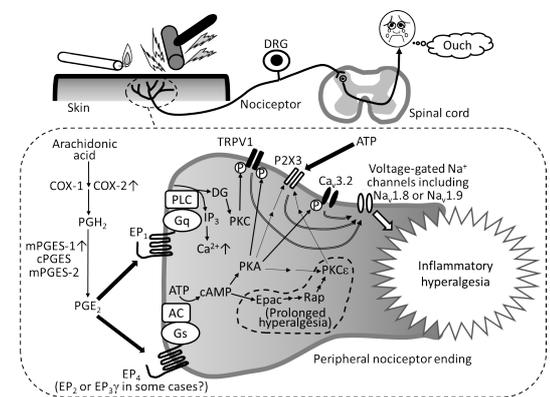


図7 侵害受容ニューロン終末における PGE<sub>2</sub>/EP4/cAMP/PKA/ Ca<sub>v</sub>3.2 系の活性化と炎症性痛覚過敏

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 3件)

Sekiguchi, F., Kawabata, A., T-type calcium channels: functional regulation and implication in pain signaling. *J. Pharmacol. Sci.*, 査読有, Vol. 122, 244-250 (2013)  
DOI: 10.1254/jphs.13R05CP

Sekiguchi, F., Aoki, Y., Nakagawa, M., Kanaoka, D., Nishimoto, Y., Tsubota-Matsunami, M., Yamanaka, R., Yoshida, S. and Kawabata, A., AKAP-dependent sensitization of Ca<sub>v</sub>3.2 channels via the EP<sub>4</sub> receptor/cyclic AMP pathway mediates prostaglandin E<sub>2</sub>-induced mechanical hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, 査読有, Vol. 168, 734-745 (2013).  
DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02174.x

Kawabata, A., Prostaglandin E<sub>2</sub> and pain: an update. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, Vol. 34, 1170-1173 (2011).

〔学会発表〕(計 15 件)

寺田侑加, 坪田真帆, 関口富美子, 和田恭一, 柴原 健, 高田充隆, 川畑篤史. カルシニューリン阻害薬タクロリムスはカプサイシン誘起結腸痛を増強する. 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 19-21 日, 仙台

竹中秀, 中村早織, 坪田真帆, 関口富美子, 川畑篤史. マウスにおいて prostaglandin E<sub>2</sub> により誘起される T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルを介する機械的痛覚過敏の特徴: EP<sub>2</sub>/PKA 経路における足場タンパク AKAP150 の重要性と EP<sub>1</sub>/PKC 経路の関与について. 第 124 回日本薬理学会近畿部会 2013 年 11 月 1 日, 京都.

竹田優希, 金岡大樹, 関口富美子, 吉田繁, 川畑篤史. NG108-15 細胞における dibutyryl cyclic AMP 誘起神経分化への内因性硫化水素と Ca<sub>v</sub>3.2 T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルの関与. 生体機能と創薬シンポジウム 2013 2013 年 8 月 29-30 日, 福岡

Kawabata, A. Modulation of Ca<sub>v</sub>3.2 T-type calcium channels by endogenous mediators: impact on pain signals and others. 3<sup>rd</sup> International Calcium Channel Conference, 2013 年 3 月 24-29 日, Krabi, Thailand.

金岡大樹, 山中瑠美, 関口富美子, 吉田繁, 川畑篤史. NG108-15 細胞とラット後根神経節細胞における Ca<sub>v</sub>3.2 T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル機能の cyclic AMP 依存性増強メカニズムの解析. 第 122 回日本薬理学会近畿部会 2012 年 11 月 16 日, 豊中.

前田貴史, 山縣亮介, 三谷健治, 田中友香里, 関口富美子, 川畑篤史. 知覚神経細胞における cyclic AMP 誘起神経突起伸長に対する T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルおよび K<sup>+</sup>チャネルの関与. 第 122 回日本薬理学会近畿部会 2012 年 11 月 16 日, 豊中.

Maeda, T., Mitani, K., Yamagata, R., Sekiguchi, F., Kawabata, A. Molecular mechanisms for the neurite outgrowth caused by prostaglandin E<sub>2</sub> in mouse dorsal root ganglion cells. Neuroscience 2012, 2012 年 10 月 13-27 日, New Orleans, USA.

Kanaoka, D., Takeda, Y., Sekiguchi, F., Yoshida, S., Kawabata, A. Roles of endogenous hydrogen sulfide in the cyclic AMP-induced neuronal differentiation in NG108-15 cells. Neuroscience 2012, 2012 年 10 月 13-27 日, New Orleans, USA.

山縣亮介, 前田貴史, 三谷健治, 関口富美子, 川畑篤史. マウス脊髄後根神経節培養細胞のプロスタグランジン E<sub>2</sub>/cyclic AMP 系を介する神経突起伸長における T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルおよび K<sup>+</sup>チャネルの役割. 生体機能と創薬シンポジウム 2012, 2012 年 8 月 30-31 日, 神戸.

Kanaoka, D., Sekiguchi, F., Nakagawa, M., Aoki, Y., Nishimoto, Y., Yoshida, S., Tsubota-Matsunami, M., Kawabata, A. Prostaglandin E<sub>2</sub>-induced sensitization of T-type Ca<sup>2+</sup> channels: a mechanism for mechanical hyperalgesia. A Satellite Symposium of IUPHAR-GI Section, International Ulcer Week 2012, 2012 年 7 月 12 日, 東京.

金岡 大樹, 竹田 優希, 関口 富美子, 吉田 繁, 川畑 篤史. NG108-15 細胞の cyclic AMP を介した神経分化への内因性硫化水素の役割. 第 121 回日本薬理学会近畿部会, 2012 年 6 月 29 日, 徳島.

中村早織, 坪田真帆, 川畑篤史. マウスにおける prostaglandin E<sub>2</sub> 誘起機械的痛覚過敏の発現には Ca<sub>v</sub>3.2 T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル活性化が関与する ~ プロテインキナーゼ A および C の役割 ~. 第 121 回日本薬理学会近畿部会, 2012 年 6 月 29 日, 徳島. Sekiguchi, F., Kanaoka, D., Nakagawa, M., Aoki, Y., Nishimoto, Y., Yoshida, S., Matsunami, M., Kawabata, A. AKAP-dependent modulation of phosphorylation levels of Ca<sub>v</sub>3.2 T-type calcium channels by protein kinase A and calcineurin: implications for mechanical pain sensitivity. Neuroscience 2011, 2011 年 11 月 12-16 日, Washington, DC.

Kanaoka, D., Sekiguchi, F., Nakagawa, M., Aoki, Y., Nishimoto, Y., Yoshida, S., Matsunami, M., Kawabata, A. Sensitization of T-type calcium channels by prostaglandin E<sub>2</sub> via the EP4 receptor/cyclic AMP/protein kinase A pathway: a possible mechanism for mechanical hyperalgesia. Neuroscience 2011, 2011 年 11 月 12-16 日, Washington, DC.

関口富美子, 松波真帆, 川畑篤史. PGE<sub>2</sub> 誘起機械的痛覚過敏には EP4 受容体 / PKA 系による Ca<sub>v</sub>3.2 T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルの AKAP 依存性リン酸化が寄与する. 第 33 回日本疼痛学会, 2011 年 7 月 22-23 日, 松山.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.kindai.ac.jp/byoutai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川畑 篤史 (KAWABATA, Atsufumi)  
近畿大学・薬学部・教授  
研究者番号: 20177728

(2) 研究分担者

関口 富美子 (SEKIGUCHI, Fumiko)  
近畿大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 90271410

坪田 真帆 (TSUBOTA, Maho)

近畿大学・薬学部・助教  
研究者番号：90510123