

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580426

研究課題名(和文) 疼痛伝達脊髄二次ニューロンにおけるガスメッセンジャーの機能解明

研究課題名(英文) Analysis of gaseous messenger functions in the spinal dorsal horn.

研究代表者

高橋 賢次 (Takahashi, Kenji)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00400143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：硫化水素は、火山性ガスに含まれる有毒ガスとしてよく知られているが、同様に有毒ガスとして知られている一酸化炭素、一酸化窒素とともに生体内で産生され、重要な役割を担っていることが明らかとなった。本研究では、痛みを認識するセンサーの一つであるTRPA1チャンネルに作用する硫化水素が酸性条件下で細胞内に移行しやすくなり、その反応性を高めることが明らかとなった。また、脊髄での知覚神経の伝達では、硫化水素が増強あるいは抑制に働き、複雑な調節を行う可能性が示された。生体内の硫化水素の産生を調節することは鎮痛薬を開発する糸口となりうるかも知れない。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen sulfide, a toxic volcanic gas, functions as a gaseous physiological and pathophysiological molecule similar to other ones, such as a carbon monoxide and a nitric monoxide. In this study, we demonstrated that the acidic condition enhanced the diffusion of hydrogen sulfide into the cytosol and the activation of TRPA1, a nociceptor. In addition, hydrogen sulfide enhanced and/or attenuated the spontaneous excitatory postsynaptic currents in lamina II neurons in spinal cord slices. These results suggest that the regulation of hydrogen sulfide production may be a target for a development of analgesic drugs.

研究分野：獣医学

キーワード：ガスメッセンジャー 知覚神経 侵害受容器 疼痛

1. 研究開始当初の背景

痛みは末梢にある侵害受容器が活性化されインパルスを発生し、神経線維を伝導したのち、脳で知覚する。神経線維は、脊髄後根に存在する背根神経節から一次求心性ニューロンが伸展し自由神経終末において侵害受容器を形成する。もう一方では脊髄後角へ侵入し、シナプスを形成して二次ニューロンに接続している。そして二次ニューロンは脊髄内を上行し脳内に収束する。

痛みは危機状態を認識する上では不可欠であるものの、時としてストレスとなりうるものである。そして、外傷をはじめとした様々な治療を行う上でも障害となるばかりでなく、抑うつ状態を引き起こすこともある。メカニズムを明らかにするだけでなく痛みを軽減するための鎮痛薬の開発に向けて多くの研究がなされてきた。

侵害刺激を認識するイオンチャネルや受容体はこれまでも多数明らかにされ、トウガラシに含まれる辛味成分であるカプサイシンの受容体である transient receptor potential (TRP) V1 チャネルが痛みの刺激となる熱や酸をも認識するポリモーダル受容体として知られるようになった。また炎症組織で放出されるサイトカインや脂質、プロトンなどの様々な因子がチャネルや受容体を介して侵害刺激を発生させることも明らかとなり、痛みを認識する分子実体の解明は大きく進展している。

一方、一酸化炭素 (CO) や一酸化窒素 (NO) は早くからその生理的意義について議論されおり、生体内ガスメッセンジャーとして血管拡張・血管新生作用などがあることが明らかとなっている。加えて、同じく有毒ガスとしてよく知られる硫化水素 (H₂S) もまた生体内で生成されることが明らかになり、第3のガスメッセンジャーとしてその意義について世界から注目されるようになった。

2. 研究の目的

これまでは痛みを感受する分子実体と機能の解明に多くの成果が得られ、痛みを認識する仕組みは明らかになりつつある。しかしながら、二次ニューロンに乗りかえる脊髄においても複雑な調節が働いていると考えられているものの、その詳細は未だに乏しい。

一方では、一酸化炭素や一酸化窒素に加えて有害ガスとして知られる硫化水素は生体内で生成されるガスメッセンジャーとして生理活性を有し、TRP チャネルファミリーの1つである TRPA1 チャネルの活性化を介して疼痛を引き起こす他、病態においても重要な役割を果たしていることが報告されているが、侵害刺激伝達に対するそれ

らの作用は未だ議論の余地がある。

そこで本研究では、硫化水素が TRPA1 チャネルを活性化するまでの動態を明らかにするとともに、脊髄内の知覚神経二次ニューロンにおける機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用細胞

恒常的に TRPA1 を発現している、ラット膀胱がん由来 RIN-14B 細胞は DS Pharma Biomedical (大阪) より購入した。10%ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地 (Life Technologies Japan, 東京) により培養した。

(2) 使用動物

Sprague Dawley ラット (オス、5 ~ 7 週齢) (清水実験材料株式会社、京都) を使用した。動物実験は、鳥取大学動物実験委員会の承認のもと実験動物の授受に関するガイドラインに従って実施した。

(3) 使用試薬類

NaHS (Strem Chemicals, Inc., Newburyport, MA, USA) (DW, 1 M)、HEPES 緩衝液 (134 mM NaCl, 6 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH7.4)、Krebs 液 (117 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaCO₃, 11 mM glucose)。

(4) 細胞内カルシウム濃度 ([Ca²⁺]_i) 測定

[Ca²⁺]_i 測定には、蛍光指示薬 fura-2 を用いたイメージング法を実施した。

細胞はあらかじめカバーガラス上に播種し、HEPES 緩衝液で 10 μM fura-2 AM を 37 °C で 40 分間インキュベーションし細胞に導入した。

検出は、還流装置を組み込んだ蛍光顕微鏡下で実施し、Aquacosmos (浜松ホトニクス、浜松) でデータ取得と解析を行った。

(5) 細胞内 pH (pH_i) 測定

pH_i 測定には、蛍光指示薬 2,7-biscarboxyethyl-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF) を用いたイメージング法を実施した。

細胞はあらかじめカバーガラス上に播種し、HEPES 緩衝液で 5 μM BCECF-AM を 37 °C で 30 分間インキュベーションし細胞に導入した。

検出は、還流装置を組み込んだ蛍光顕微鏡下で実施し、Aquacosmos (浜松ホトニクス、浜松) でデータ取得と解析を行った。

(6) 細胞内硫化水素測定

RIN-14B 細胞に硫化水素 (1 mM) を適用したのち、洗浄し、細胞を回収した。10%トリクロル酢酸 (0.25 mL) と 1%酢酸亜鉛 (0.25 mL) を混合し、細胞内の硫化水素を回収した。硫化水素量の定量にはメチレンブルー法を用いた。

(7) 脊髄スライス標本の作成

ウレタン麻酔下のラットから脊髄を採取し、スライサー (堂阪イーエム、京都) で 500 μm の薄切標本を作製した。標本を灌流装置に

固定し、顕微鏡下で観察のもと、パッチクランプ解析 (Axopatch200B, インターメディカル, 大阪) を行った。

ホールセルパッチクランプ法によって、脊髄内の二次ニューロンに自発的に発生する内向き電流 (固定電位: -70 mV) を測定した。

4. 研究成果

(1) 酸性環境下における硫化水素の細胞内透過性の促進と TRPA1 活性化の増強作用

硫化水素は有毒物質であるだけでなく、生体内で産生されると細胞保護作用を有することが報告されている。それらに加えて、侵害受容器の一つである TRPA1 に作用し、疼痛発生に関与することは既に我々を含め、いくつかのグループによる報告がある。しかしながら、硫化水素はガス状の物質であるものの、細胞内浸潤性や細胞外 pH の影響について不明なため、これを解析した。

図 1 に示すように、硫化水素 (0.1 mM) は細胞外 pH の低下 (pH6.8) により TRPA1 をより強く活性化した。

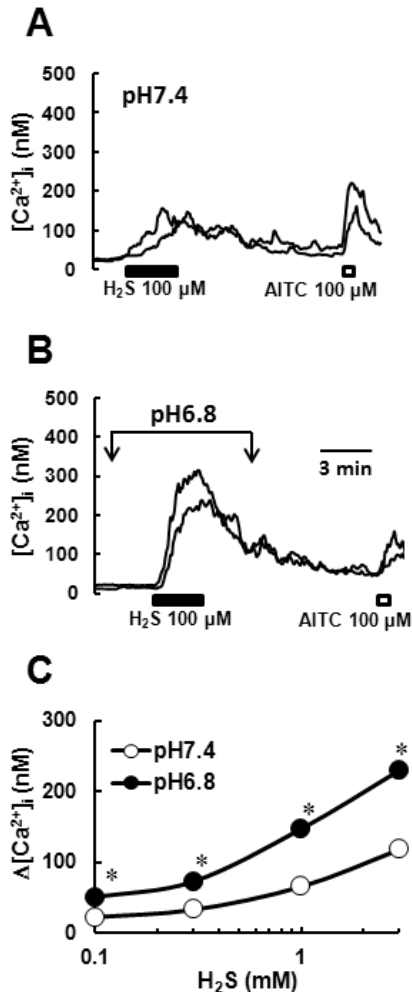


図 1 TRPA1 チャンネルを介した硫化水素による細胞内 Ca²⁺濃度の増加反応
RIN-14B 細胞に硫化水素 (H₂S; 0.1 mM) を適用したときの Ca²⁺反応, (A) 細胞外 pH の中性条件 (pH7.4), (B) 細胞外 pH の酸性条件

(pH6.8), AITC は TRPA1 チャンネルの作動薬。(C) 細胞外 pH に依存した濃度 - 反応関係

また、硫化水素は弱酸性であることから、適用により細胞内の pH が低下する可能性が考えられたため、細胞内の pH を測定した (図 2)。硫化水素 (1 mM) を適用すると中性のコントロール状態で、0.29±0.01 細胞内の pH が低下した。これは硫化水素が細胞内へ拡散浸透したのち、解離したことによる低下だと考えられた。一方、細胞外を pH6.8 の条件下で硫化水素を適用すると、pH が 0.61±0.02 低下した。細胞外液 pH6.8 に換えても細胞内の pH はほとんど変わらず、この低下は硫化水素が中性条件のときよりも多く透過したと考えられた。TRPA1 は弱酸によって活性化することが報告されているが、pH5 以下で生じることが示されている。それゆえ酸性条件下で適用した硫化水素による細胞内の pH 低下が TRPA1 活性化の要因ではなかった。

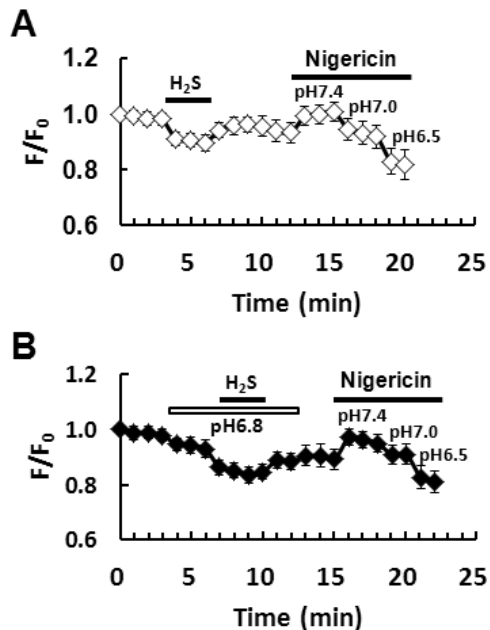


図 2 硫化水素による細胞内 pH の低下
RIN-14B 細胞に硫化水素 (H₂S; 1 mM) を適用した, (A) 細胞外 pH の中性条件 (pH7.4), (B) 細胞外 pH の酸性条件 (pH6.8)。

そこで、酸性条件により硫化水素の細胞内以降が増加することが考えられたため、中性条件 (pH7.4) と酸性条件 (pH6.8) で硫化水素 (1 mM) を適用したときの細胞内の硫化水素量を測定したところ、酸性条件下で細胞内の硫化水素量は中性条件の 1.6 倍となった (図 3)。従って、細胞外が酸性となると硫化水素が細胞内へ透過しやすくなることが明らかとなった。硫化水素の解離定数は 6.9 であり、酸性条件によって非解離型の硫化水素が増えたため、細胞内に拡散以降しやすくなったことが考えられた。硫化水素による TRPA1 の活性化は細胞内の N 末端に存在する

システイン残基の修飾が必要であり、酸性条件下でより多くの硫化水素が細胞内へと浸透し、TRPA1 の活性化を増強することが明らかとなった。炎症病態組織では酸性状態となることから、炎症組織中での硫化水素の産生は TRPA1 を介した疼痛刺激を増強する可能性が示唆された。

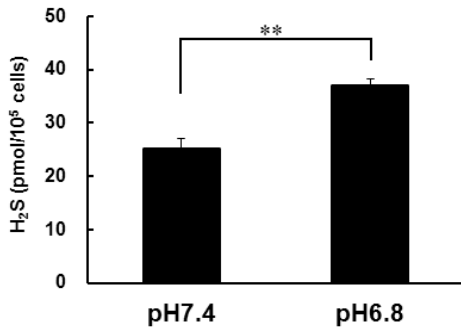


図3 細胞内硫化水素量
RIN-14B 細胞に硫化水素 (H₂S; 0.1 mM) を適用した, (A) 細胞外 pH の中性条件 (pH7.4), (B) 細胞外 pH の酸性条件 (pH6.8)。

(2) 脊髄二次ニューロンにおける硫化水素の作用

脊髄二次ニューロンは自発的な活性を示し, spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) を発生させている。二次ニューロンに接続する一次ニューロンの神経終末には TRPA1 チャンネルが発現していることが報告されており, TRPA1 チャンネルを介した硫化水素による作用が予測された。

硫化水素 (1 mM) の適用によってこの自発的な活性が一過性に増強するニューロンが存在していた (図4)。硫化水素により自発的な活性の頻度が増加した。このニューロンはその後, TRPA1 チャンネルの作動薬として知られる allyl isothiocyanate (AITC) によって同様に活性化を受けたことから, TRPA1 チャンネルの活性化を介していることが考えられた。

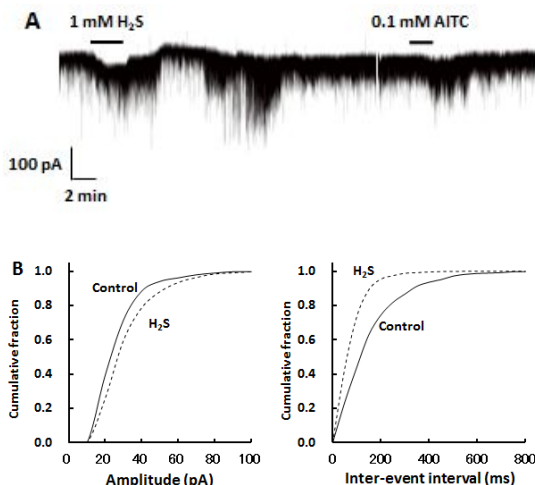


図4 ラット脊髄スライス標本の硫化水素による sEPSCs の増強作用
(A) sEPSCs の連続測定記録 (無処置[Control], 硫化水素[H₂S], TRPA1 作動薬[AITC]), (B) 累積分布解析 (左: Amplitude, 右: Inter-event interval)

一方では, 硫化水素適用によって sEPSCs が抑制されるニューロンも検出された (図5)。硫化水素は, K_{ATP} チャンネルに作用することが報告されており, K_{ATP} チャンネルの開口による過分極を起こしている可能性がある。検出したニューロンをまとめると4つのパターンが存在し, 硫化水素が働くことで複雑な調節が行われている可能性が示された。

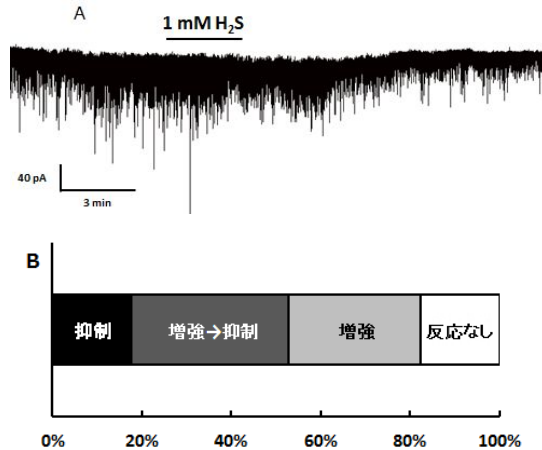


図5 硫化水素による sEPSCs の抑制
(A) sEPSCs の連続測定記録 (典型例)
(B) 硫化水素による各応答を示すニューロンの割合

抑制: 抑制作用だけを示したニューロン
増強 抑制: 増強作用を示したのち, 抑制作用を示したニューロン
増強: 増強作用だけを示したニューロン
変化なし: 硫化水素による作用が認められなかったニューロン

以上のことから, ひとたび炎症が生じると, 組織中は酸性状態となり, そこで硫化水素が産生されると正常状態よりも細胞内に移行しやすくなり, 知覚神経の TRPA1 チャンネルにより強く作用することで疼痛発生を増強する可能性が示唆された。また, この知覚神経の興奮の伝達においても, 硫化水素が作用し, この場合, 興奮の増強と抑制が見られたことから, 様々な感受性をもつニューロンが複雑に相互作用した結果が脳へと伝達する可能性が示された。これら硫化水素の調節することは鎮痛薬開発のための1つの標的となると考えられた。

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 11 件)

Heat and noxious chemical sensor, chicken TRPA1, as a target of bird repellents and identification of its structural determinants by multispecies functional comparison. S. Saito, N. Banzawa, N. Fukuta, CT. Saito, K. Takahashi, T. Imagawa, T. Ohta, and M. Tominaga, *Mol. Biol. Evol.*, (査読有) 31: 708-722, 2014.

Molecular mechanism of 2-APB-induced Ca^{2+} influx in external acidification in PC12. K. Takahashi, M. Yokota and T. Ohta, *Exp. Cell Res.*, (査読有) 323: 337-345, 2014.

Identification of molecular determinants for a potent mammalian TRPA1 antagonist by utilizing species differences. K. Nakatsuka, R. Gupta, S. Saito, N. Banzawa, K. Takahashi, M. Tominaga and T. Ohta, *J. Mol. Neurosci.*, (査読有) 51: 754-762, 2013.

Involvement of TRPA1 activation in acute pain induced by cadmium in mice. S. Miura, K. Takahashi, T. Imagawa, K. Uchida, S. Saito, M. Tominaga and T. Ohta, *Mol. Pain*, (査読有) 9: 7, 2013.

Inflammatory acidic pH enhances hydrogen sulfide-induced transient receptor potential ankyrin 1 activation in RIN-14B cells. K. Takahashi and T. Ohta, *J. Neurosci. Res.*, (査読有) 91: 1322-1327, 2013.

Low pH enhances 2-aminoethoxydiphenyl borate-induced cell death of PC12 cells. K. Takahashi, T. Ohta, *Toxicol. Lett.*, (査読有) 215: 161-166, 2012.

Caspase-independent apoptosis induction of quorum-sensing autoinducer analogs against chronic myeloid leukemia K562. M. Hazawa, M. Kudo, T. Iwata, K. Saito, K. Takahashi, J. Igarashi, H. Suga and I. Kashiwakura, *Invest. New Drugs*, (査読有) 30: 862-869, 2012.

Quality-assessments of characteristics of placental/umbilical cord blood associated with maternal age- and parity-related factor. A. Omori, M. Hirai, T. Chiba, K. Takahashi, S. Yamaguchi, T.A. Takahashi and I. Kashiwakura, *Transfus. Apher. Sci.* (査読有) 46: 7-13, 2012.

Functional properties of synthetic N-acyl-L-homoserine lactone analogs of quorum-sensing gram-negative bacteria on the growth of human oral squamous carcinoma cells. H. Chai, M. Hazawa, N. Shirai, J. Igarashi, K. Takahashi, Y. Hosokawa, H. Suga and I. Kashiwakura, *Invest. New Drugs*, (査読有) 30: 157-163, 2012.

H(2)S functions as a nociceptive messenger through transient receptor

potential ankyrin 1 (TRPA1) activation. H. Ogawa, K. Takahashi, S. Miura, T. Imagawa, S. Saito, M. Tominaga and T. Ohta, *Neuroscience*, (査読有) 218: 335-343, 2012.

Analysis of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in frogs and lizards illuminates both nociceptive heat and chemical sensitivities and coexpression with TRP vanilloid 1 (TRPV1) in ancestral vertebrates. S. Saito, K. Nakatsuka, K. Takahashi, N. Fukuta, T. Imagawa, T. Ohta and M. Tominaga, *J. Biol. Chem.*, (査読有) 287: 30743-30754, 2012.

[学会発表](計 6 件)

Takahashi K., Ohta T. IL-1 α induces TRPA1 sensitization in lung cell line, A549. 第 88 日本薬理学会, 2015 年 3 月 20 日, 名古屋国際会議場(名古屋市)

高橋賢次, 横田緑苗, 太田利男, 細胞外酸性条件下 PC12 細胞における 2-APB 誘発性 Ca^{2+} 流入の分子メカニズム, 第 36 回日本生物学的精神医学会 / 第 57 回日本神経化学会, 2014 年 9 月 30 日, 奈良県文化会館(奈良市)

Takahashi K., Yokota M., Ohta T. Molecular mechanism of 2-APB-induced Ca^{2+} influx in external acidification in PC12. 第 87 日本薬理学会, 2014 年 3 月 20 日, 仙台国際センター(仙台市)

高橋賢次, 横田緑苗, 太田利男, 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2APB) は酸依存性にストア作動性 Ca^{2+} チャネル $Orai3$ を活性化する, 第 156 回日本獣医学会, 2013 年 9 月 20 日, 岐阜大学(岐阜市)

高橋賢次, 横田緑苗, 太田利男, 2-Aminoethoxydiphenyl borate による PC12 細胞の酸依存性細胞死誘発作用, 第 155 回日本獣医学会, 2013 年 3 月 30 日, 東京大学(東京)

Takahashi K., Ohta T. External low pH enhances TRPA1-mediated acute pain by hydrogen sulfide. 第 86 日本薬理学会, 2013 年 3 月 21 日, 福岡国際会議場(福岡市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 賢次 (TAKAHASHI KENJI)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号：00400143

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究

太田 利男 (OHTA TOSHIO)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号：20176895