

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850204

研究課題名(和文)「肌と肌の触れ合い」の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of pleasant tactile sensation.

## 研究代表者

山口 聡一郎(YAMAGUCHI, Soichiro)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・助教

研究者番号：50596864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マウスにおいて心地よい触覚を感知する知覚神経であると報告されているMrgprB4陽性後根神経節神経がどのように触覚を感知しているのかを明らかにすることを目的としている。低張圧の細胞外液を適用し、細胞を膨化させる方法で機械刺激を行った時の細胞内カルシウム濃度変化を測定した。すると、低張圧の細胞外液の適用により、細胞内カルシウム濃度の上昇が確認された。この反応はPiezoチャンネルの阻害薬で阻害された。免疫染色によってもMrgprB4陽性神経においてPiezo2チャンネルの発現が示された。よって、分離MrgprB4陽性神経においてPiezo2チャンネルが機能的に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to reveal how MrgprB4 positive DRG neurons detect a massage-like pleasant tactile sensation in mice. The neurons were mechanically stimulated by application of hypotonic solutions during intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) measurement. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was increased by the application of hypotonic solutions. The increase of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was inhibited by Piezo channel inhibitors. Immunocytochemistry showed that MrgprB4 positive neurons express Piezo2 channel. In conclusion, it was suggested that Piezo2 may be functionally expressed in the isolated MrgprB4 positive neurons.

研究分野：基礎獣医学

キーワード：生理学 機械受容チャンネル

## 1. 研究開始当初の背景

Mas 関連 G タンパク質共役受容体 (Mrgpr) は後根神経節に発現する受容体であり、近年、その発現する種類によって、後根神経節神経の機能が識別できることが明らかにされて来ている。本研究で研究対象とする、Mrgpr の一つである MrgprB4 を発現する MrgprB4 陽性後根神経節神経は、マウスにおいて、撫でられるような心地よい触覚刺激に反応する神経であるという報告がなされた (文献 )。しかし、分離した MrgprB4 陽性神経は電気生理学的測定により、直接的な機械刺激に反応しないということも報告されていた (文献 )。よって、MrgprB4 陽性神経がどのようにして触覚刺激を感受しているのかは不明であった。

### <引用文献>

Vrontou S., *et. al.* Nature. 2013, 31; 493(7434): 669-73.

Liu Q., *et. al.* Nature Neuroscience. 2007, 10(8): 946-8.

## 2. 研究の目的

そこで本研究は、マウスにおいて撫でられるなどの心地よい触覚を感知する知覚神経であると報告されている MrgprB4 陽性後根神経節神経がどのように触覚を感知しているのかを明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

米国 The Jackson Laboratory 社より、MrgprB4 陽性神経に mtdtomato という赤色蛍光タンパク質を発現するよう遺伝子改変されたマウス (B6N.129S1-Mrgprb4tm3(cre)And/J) を導入した。

### (2) 背根神経節神経の分離取得

安楽殺した上記マウス (成体) から後根神経節を摘出した。摘出した後根神経節をコラゲナーゼ処置、続いてトリプシン処置を行うことにより神経細胞を分離した。遠心し、酵素液を除去した後、細胞培養用培地に懸濁した。Poly-L-lysine でコートしたカバーガラス上に播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で一日培養した後、実験に使用した。

分離した後根神経節神経の中から MrgprB4 陽性神経を mtdtomato による赤色蛍光 (図 1) で識別し、MrgprB4 陽性神経を対象として以下の実験を行った。

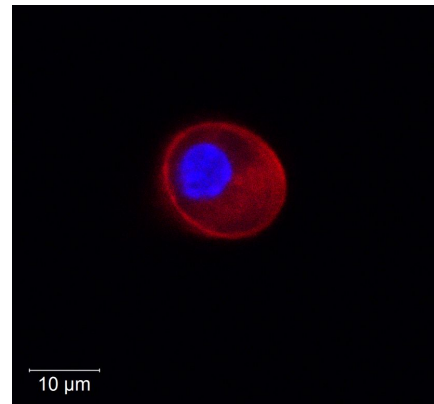


図 1 mtdtomato の赤色蛍光を示す MrgprB4 陽性後根神経節神経

### (3) 細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度測定

Ca<sup>2+</sup>濃度に応じて蛍光特性が変化する Ca<sup>2+</sup>インジケーターの一つである Fura2 を用いて細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を測定した。細胞膜を透過できる Fura2-AM を 10 μM 含む溶液に一時間処置し、Fura2 を細胞内に導入した。励起波長を 340 nm と 380 nm とに連続的に切り替え、510 nm の蛍光を測定した。励起波長 340 nm と 380 nm による蛍光の比率を細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度へと変換するために、別途カルシウムイオノフォアであるイオノマイシンによる最大比率と、カルシウムキレーターである BAPTA-AM を用いた最小比率とを MrgprB4 陽性神経を用いて測定した。得られた値を用いて比率を細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度へと変換した。

用いた標準的な灌流溶液の組成は以下の通り (mM)、NaCl (140)、KCl (5)、HEPES (10)、D-glucose (10)、CaCl<sub>2</sub> (1)、MgCl<sub>2</sub> (1)。pH は NaOH を用いて 7.4 に調整した。

### (4) 免疫染色

分離した後根神経節神経を前述の通り、カバーガラス上に播種し、1 日培養した。カバーガラスを培養液から取り出し、PLP 固定液に浸漬して 4 度で固定した。ブロッキングを行った後、4 度オーバーナイトで抗 Piezo2 ウサギ抗体 (Santa Cruz, sc-84763, 0.2 μg/ml) と反応させた。二次抗体として Alexa 488 付加抗ウサギ IgG 抗体を用いて標識した。洗浄の過程で DAPI による核染色も同時に行った。封入剤でスライドガラス上に封入し、共焦点顕微鏡で観察した。

抗原前吸収試験を行う際には Santa cruz 社より購入した抗体作成時に使用した抗原 (0.4 μg/ml) と抗体を混ぜ合わせ、4 度でオーバーナイト転倒混和させながら反応させたものを抗原前吸収済み抗体として用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 低張圧溶液適用による細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度上昇

まず、MrgprB4 陽性神経は直接的な機械刺激によっては反応しないという報告があったが、それを自分でも実験的に確認することにした。神経の反応の指標として細胞内  $Ca^{2+}$  濃度測定を行った。すると報告とは異なり、ガラス棒で神経の細胞体を押す刺激により、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が認められた。しかしガラス棒で押す方法は同じ刺激を再現性良く与えることが難しかったため、神経を機械的に刺激する方法として、低張圧溶液を灌流することで浸透圧差により、細胞を膨張させる方法を用いることにした。

灌流液を 50 mM の NaCl を除いた (NaCl (90)) に置換すると細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇がみられた (図 2)。一方で 50 mM の NaCl の代わりに 100 mM のマンニトールを添加することで浸透圧を保った溶液 (NaCl (90) マンニトール (100)) に置換した場合は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇はほぼ認められなかった。以上のことより、NaCl が低濃度の溶液による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇は NaCl の濃度変化自体が起こしたのではなく、浸透圧の低下によるものであることが示唆された。高濃度 (60 mM) の KCl を含む溶液による急峻な細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇はこの細胞が興奮性細胞であることを示す。これらの結果から、MrgprB4 陽性神経において低張圧刺激による細胞膨張によって細胞内  $Ca^{2+}$  が上昇することが示唆された。

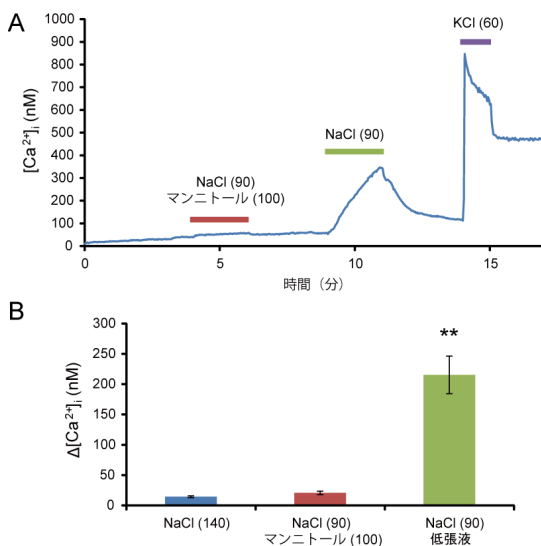
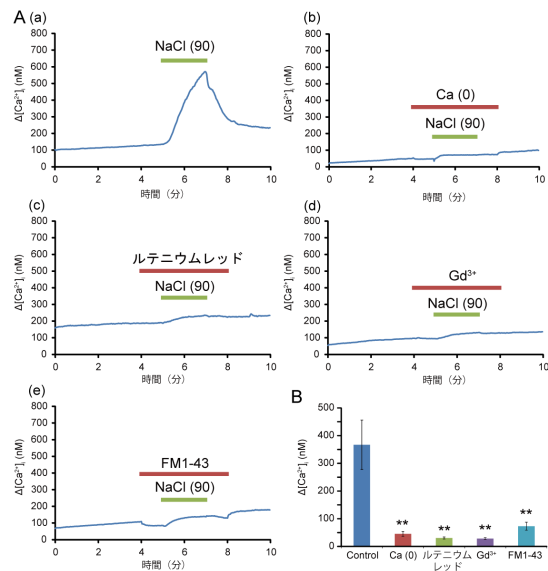


図2 低張圧溶液による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化 (A) 細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化の代表的な一例を示す。(B) 各溶液を灌流したときの 2 分間における細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化量を平均値と標準誤差で示す。\*\*はダネット検定により、NaCl (140) の群と  $p < 0.01$  となる有意差があったことを示す。

##### (2) 細胞外 $Ca^{2+}$ 除去並びに Piezo チャンネル阻害薬適用の効果

低張圧刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が細胞内  $Ca^{2+}$  ストアからの放出に因るのか、細胞外からの  $Ca^{2+}$  の流入に因るのかを調べるため、細胞外液の  $Ca^{2+}$  を除去した条件 (キレーターである EGTA を 5 mM 含む) で低張圧刺激を行った。すると細胞外液に  $Ca^{2+}$  を含まない条件では低張圧刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇は著しく減弱した (図 3)。この結果から低張圧刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇は主に細胞外からの  $Ca^{2+}$  の流入に起因することが示された。

流入する経路となるチャンネルの分子基盤を明らかにしていくため、薬理学的特性の解析を行った。非選択的な阻害薬であるが、Piezo チャンネルという機械受容チャンネルに対する阻害薬である、ルテニウムレッド (10  $\mu$ M)、ガドリニウム (30  $\mu$ M)、FM1-43 (20  $\mu$ M) 存在下では低浸透圧刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇は有意に抑制された (図 3)。



##### 図3 細胞外 $Ca^{2+}$ 除去並びに Piezo チャンネル阻害薬適用の効果

(A) 各条件における低浸透圧刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化の代表的な一例を示す。(a) 対照群、(b) 細胞外  $Ca^{2+}$  除去、(c) 10  $\mu$ M ルテニウムレッド存在下、(d) 30  $\mu$ M ガドリニウム ( $Gd^{3+}$ ) 存在下、(e) 20  $\mu$ M FM1-43 存在下。(B) 各条件における低浸透圧溶液を灌流したときの 2 分間における細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化量を平均値と標準誤差で示す。\*\*はダネット検定により、Control の群と  $p < 0.01$  となる有意差があったことを示す。

##### (3) 機械刺激に反応する TRP チャンネルの阻害薬の効果

後根神経節神経における、低浸透圧溶液の灌

流による細胞膨張によって引き起こされる細胞内への  $Ca^{2+}$  の流入経路として、非選択的陽イオンチャネルである TRP チャネルの一つである TRPV4 チャネルの関与が報告されている (Lechner SG. *et. al.* neuron 2011, 27; 69(2): 332-44)。TRPV4 チャネルはルテニウムレッドによっても阻害される。そこで、TRPV4 チャネル阻害薬の効果を検討した。選択的 TRPV4 選択的阻害薬である HC067047 (1  $\mu$ M) 存在下において低浸透圧刺激を与えたところ、対照群と同様に細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇がみられた (図 4A)。

さらにルテニウムレッドで阻害され、機械刺激により活性化される可能性が示唆されている TRP チャネルである TRPV2 チャネルと TRPA1 チャネルの阻害薬の効果も検討した。TRPV2 チャネル阻害薬である Trani last (100  $\mu$ M) あるいは TRPA1 選択的阻害薬である HC030031 (10  $\mu$ M) 存在下において低浸透圧刺激を与えたところ、対照群と同様に細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇がみられた (図 4B)。

以上の結果から MrgprB4 陽性神経における低浸透圧刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇は上記の TRP チャネルによっては担われていないことが示唆された。

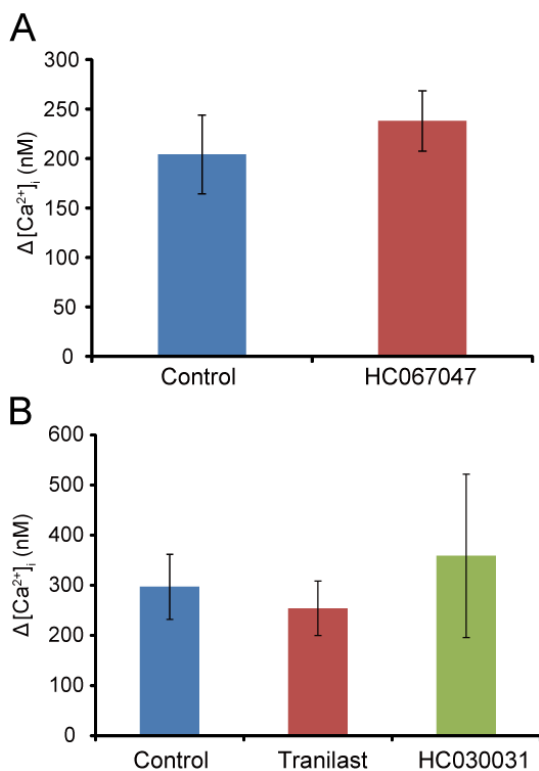
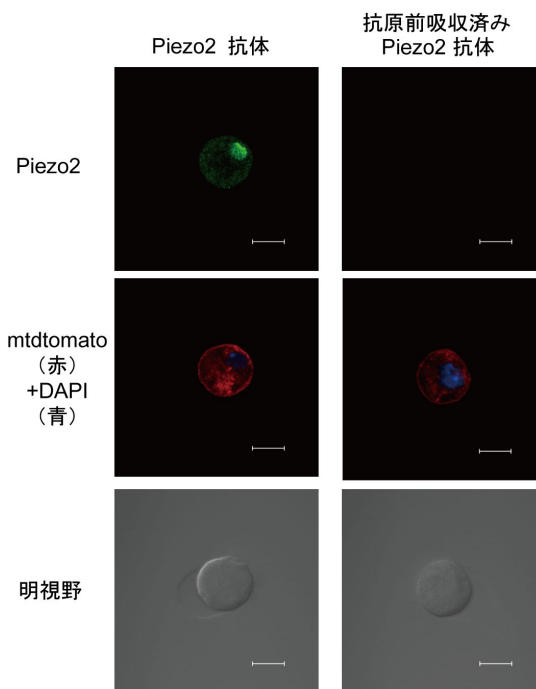


図 4 TRP チャネル阻害薬の効果  
各条件における低浸透圧溶液を灌流したときの 2 分間における細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化量を平均値と標準誤差で示す。(A) 対照群あるいは選択的 TRPV4 選択的阻害薬である HC067047 (1  $\mu$ M) 存在下。(B) 対照群あるいは TRPV2 チャネル阻害薬である Trani last (100  $\mu$ M) あるいは TRPA1 選択的阻害薬である HC030031 (10  $\mu$ M) 存在下。

#### (4) 免疫染色による検討

抗 Piezo2 抗体による染色で mtdtomato の赤色の蛍光を示す MrgprB4 陽性神経において Piezo2 チャネルの染色が観察された (図 5)。一方で、抗原前吸収済みの抗体を用いた場合には Piezo2 チャネルの染色は減弱したことから、抗 Piezo2 抗体が正しく抗原を認識したことによる染色であることを確認した。この結果から MrgprB4 陽性神経において Piezo2 チャネルが発現していることが示唆された。



#### 図 5 免疫染色による検討

分離した MrgprB4 陽性神経を抗 Piezo2 抗体 (左) あるいは抗原前吸収済みの抗体 (右) で反応させた。上段は Piezo2 の染色を示す、Alexa488 のシグナル。中段は mtdtomato の赤色の蛍光と、DAPI による核染色 (青色) の結果を示す。下段は明視野像。バーは 10  $\mu$ m。

#### (5) 結論

以上の結果から MrgprB4 陽性神経において Piezo2 チャネルが低浸透圧刺激によって開くチャネルとして機能的に発現している可能性が示唆された。これはすなわち、マウスの MrgprB4 陽性神経において心地よい刺激を感受する機械受容チャネルとして Piezo2 チャネルが機能している可能性をも示唆する成果となる。ただし、それを立証するためには *in vivo* の実験などより多くの検討が必要である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第 93 回日本生理学会大会  
(2016/3/24 北海道札幌市)  
発表者：山口聡一郎、乙黒兼一  
発表課題：MrgprB4 陽性後根神経節神経における細胞膨張による  $Ca^{2+}$  流入経路

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

山口 聡一郎 (YAMAGUCHI, Soichiro)  
北海道大学・大学院獣医学研究科・比較形態機能学講座・薬理学教室・助教  
研究者番号：50596864