

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861253

研究課題名(和文)冷痛覚過敏の治療標的としてのTRPV3チャネル機能解析

研究課題名(英文)Analysis of TRPV3 function for therapeutic target of the cold pain

研究代表者

丸山 基世 (Maruyama, Motoyo)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：60709757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：冷痛覚過敏はオキサリプラチン等の抗がん薬を使用する患者において高頻度で発現するが、未だ有効な治療手段は確立されていない。我々は33℃以上の温度刺激により活性化するTRPV3チャネルの機能獲得型変異を有するラットにおいて侵害的な冷刺激に対する痛覚行動が亢進していることを見出した。TRPV3は一次感覚神経において、主に痛みを伝達する神経細胞に発現していることが明らかとなった。また、TRPV3チャネルは冷感受性に重要なTRPA1チャネルとの相互作用を介して冷痛覚に関与する可能性が示唆された。TRPV3の機能解析は冷痛覚の分子メカニズムの理解及び新規治療標的の同定に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cold hyperalgesia occurs frequently in patients using anticancer drugs such as oxaliplatin, but effective therapeutic strategy remains to be established. The response to noxious cold stimuli was increased in a gain-of-function mutant rat of TRPV3 gene which is involved in the warm sensation. TRPV3 was expressed in the primary sensory neuron that especially transmits pain sensation. It was suggested that TRPV3 channel may be involved in cold pain through the interaction with TRPA1 channel, which is important for cold sensitivity. Functional analysis of TRPV3 may help the understanding of the molecular mechanism and provide a novel target for medication of cold pain.

研究分野：実験動物学

キーワード：冷痛覚過敏 TRPV3

1. 研究開始当初の背景

(1) 冷痛覚過敏は、オキサリプラチン等の抗がん薬の使用による末梢神経障害を呈する患者において非常に高頻度で発現し、患者の苦痛につながるのみでなく、がん治療薬の変更や減量と与儀なくする用量規定毒性としてがん治療そのものの成績に影響している。しかしながら、冷刺激を検出して痛みを生じさせる細胞基盤や分子メカニズム自体に不明な点が多い。さらに、病的な冷痛覚過敏の発症メカニズムに至ってはほとんど明らかになっておらず、冷痛覚過敏に有効な治療手段は全く確立されていないのが現状である。

(2) 温度感覚において近年、transient receptor potential (TRP) チャンネルが注目を浴びており、侵害的な冷刺激の受容において TRPA1 や TRPM8 の関与が現在までに明らかにされているが、これらの受容体のみでは冷痛覚全てを説明しきれないことが明らかになっている。TRPV3 は 33 以上の温度刺激やオレガノ等の様々な天然物によって活性化され、痛みを伴わない温かい感覚を伝えると考えられている一方で、TRPV3 のノックアウトマウスは侵害的な高温刺激への反応に欠陥を示すことが報告されている。また、ヒトでは乳房痛患者において皮膚角質細胞での発現増加が報告されており、痛覚過敏への関与が示唆されている。しかしながら、TRPV3 に特異的に作用する薬物はアゴニスト及びアンタゴニスト共に利用できないため、TRPV3 の詳細な生理学的機能の解析はあまり進んでいない。さらに、TRPV3 は皮膚角質細胞において一貫して高い発現が認められているが、感覚刺激を検出し、中枢へと伝達する一次感覚神経における発現の有無については報告により異なっている。すなわち、TRPV3 は痛覚過敏に関与する可能性が示唆されているが、その分子・細胞基盤の理解に必須となる TRPV3 の発現や機能に関する基本情報が不足している。

(3) 我々は TRPV3 チャンネルのカルシウム透過性が亢進する遺伝子変異を有するラット (WBN/Kob-Ht) において、侵害的な冷刺激による痛みが亢進していることを見出した。TRPV3 の代表的なアゴニストであるカンフルは冷感を誘発することが知られている。一方、TRPV3 のノックアウト研究では痛みを伴わない涼しい温度 (15 以上) の感受性は野生型マウスと同様であったが、それより低い温度への感受性は調べられていない。TRPV3 チャンネルの温度感受性を電気生理学的に検討した一連の研究においても 15 より低い温度では全く調べられていない。すなわち、TRPV3 チャンネルの冷痛覚における関与は全く検討されていない。TRPV3 に特異的なアゴニスト及びアンタゴニストが利用できないことから、TRPV3 の機能解析を困難にしていることから、我々は TRPV3 の遺伝子変異を有するラットを

利用することで、TRPV3 の冷痛覚への役割を検討することが可能になるのではないかと考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では冷痛覚受容における TRPV3 チャンネルの役割及び TRPV3 発現細胞の性質を網羅的に解析することで、冷痛覚過敏に対する新規の治療標的の同定を目指した。以下の項目を中心に解析を進めた。

1) TRPV3 チャンネルの発現解析

一次感覚神経には主に痛みを伝達する神経細胞と、触覚を伝達する神経細胞が混在しているが、TRPV3 チャンネルがどの種の神経細胞に発現しているかは明らかになっていない。TRPV3 陽性神経の性質を明らかにすることは、チャンネルと冷痛覚との関連性を解析する上で必要不可欠である。従って、TRPV3 を発現する一次感覚神経の分布ならびに特性を明らかにする。

2) 冷痛覚における TRPV3 チャンネルの行動学的評価

冷感覚受容における TRPV3 チャンネルの役割を多角的に検討する。TRPV3 の機能を特異的に促進または阻害する薬物が無いため、TRPV3 遺伝子の機能獲得型変異を持つ WBN/Kob-Ht ラットを利用して、冷痛覚における TRPV3 の関与を行動学的に評価する。

3) TRPV3 チャンネルと冷感受性 TRP チャンネルとの相互作用の検討

TRP チャンネルは四量体で機能的なチャンネルを形成する。実際に、TRPV3 チャンネルは TRPV1 チャンネルとヘテロチャンネルを形成し、元のチャンネルとは異なる温度感受性をもつようになることが報告されている。TRPV3 は同様に冷刺激を受容する TRPA1 チャンネルとヘテロ四量体を形成することで、冷刺激の受容に寄与する可能性も考えられる。TRPA1 チャンネル機能に対する TRPV3 チャンネルの影響を行動学的に評価する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

動物実験は日本医科大学の動物実験委員会の承認を得て実施した (承認番号 ; 26-029、27-037)。全ての実験に雄性ラットを使用した。発現解析には Wistar ラットを、行動解析及び薬物投与には TRPV3 遺伝子の変異をホモ型に持つ WBN/Kob-Ht ラットと対照群として変異を持たない野生型の WBN/Kob ラットを用いた。神経障害性疼痛モデルの作製には Sprague-Dawley ラットを用いた。全ての処置はイソフルランの吸入による麻酔下で実施した。

(2) RT-PCR

ラットの後根神経節、脊髄、脳、皮膚、結

腸、脾臓、筋肉等の組織から RNAiso plus を用いて total RNA を抽出した。Oligo dT プライマーを用いて逆転写し、TRPV3 遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物は 1% アガロースゲルを用いて電気泳動により分離した。

(3) ウェスタンブロッティング

後根神経節及び皮膚のタンパクを SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動により分離し、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンは TRPV3 に対する抗体と反応させ、HRP 標識の 2 次抗体により検出した。

(4) 免疫染色

ラットを深麻酔下で 4% パラホルムアルデヒドの心臓灌流により組織を固定し、後根神経節の凍結切片 (10 μ m) を作製した。切片は TRPV3 に対する抗体と反応させ、蛍光標識の 2 次抗体により可視化した。

(5) 行動解析

機械刺激に対する痛覚行動は von Frey テストを用いて測定した。温度刺激に対する疼痛行動は、後肢足底に対してプランターテスト、ホットプレートテスト (42-48)、コールドプレートテスト (0) を用いて、尾に対してはテイルフリックテスト (プランターテスト)、テイルイマージョンテスト (42-48 の湯または冷却したアセトン) を用いて測定した。

(6) 神経障害性疼痛モデルの作製

脊髄神経結紮モデルは、左側の第 5 腰髄神経を 1 mm の間隔で 2 箇所完全結紮して作製した。絞扼性神経損傷モデルは、左側の坐骨神経を 1 mm の間隔で 4 箇所を緩く結紮して作製した。いずれも右側を無処置の対照とした。処置の 0、3、7、14 日後の機械的刺激または熱刺激及び冷刺激に対する痛覚行動の発現を確認した。

(7) 定量的 PCR

神経障害性疼痛モデルの後根神経節より total RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて逆転写を行った。TRPV3 遺伝子に特異的なプライマーを用いて TRPV3 の mRNA 発現を SYBR Green 法により定量した。

(8) TRPA1 アゴニストの投与

TRPA1 アゴニストであるマスタードオイルをラットの後肢足底に投与し、自発痛として投与直後に足を持ち上げる回数を 5 分間測定し、投与の 30 分後に von Frey テストを、45 分後にプランターテストを行った。

4. 研究成果

(1) TRPV3 チャンネルの発現解析

RT-PCR 法により、TRPV3 mRNA は後根神経節、脊髄後角及び脳の各部位において検出さ

れた。また、過去の論文と一致して結腸や皮膚組織において高い発現が認められた。ウェスタンブロッティングにより、後根神経節における TRPV3 の発現をタンパクレベルで確認した。また、免疫染色の結果から TRPV3 は後根神経節において主に小型から中型の細胞に発現していることが明らかになった。

(2) TRPV3 遺伝子変異による痛覚への影響

WBN/Kob-Ht ラットは機械刺激に対する痛覚閾値は野生型ラットと同等であった。侵害的な熱刺激に対しては、ホットプレートテスト及びテイルイマージョンテストにおいて WBN/Kob-Ht ラットの痛覚閾値が有意に減少した。プランターテストを用いた熱刺激では足底と尾の両方で野生型ラットと同等の閾値を示した。コールドプレートテスト及びテイルイマージョンテストを用いた侵害的な冷刺激に対しては、WBN/Kob-Ht ラットにおいて痛覚行動が亢進した。

(3) 神経傷害下における TRPV3 発現の変化

脊髄神経結紮モデルにおいて、神経傷害の 14 日後の後根神経節における TRPV3 発現は増加傾向にあったが顕著な変化では無かった。絞扼性神経損傷モデルでは、冷痛覚過敏を発症したが、傷害後のいずれの時期にも有意な発現変化は認められなかった。

(4) 温度感受性 TRP チャンネルとの相互作用の解析

TRPA1 チャンネルのアゴニストであるマスタードオイルの投与直後に自発痛は観察されなかったが、投与 30 分後の機械的刺激に対する痛覚閾値が WBN/Kob-Ht ラットにおいて有意に減少した。一方、熱刺激に対する痛覚閾値は野生型と同等であった。

(5) 今後の展望

TRPV3 チャンネルが一次感覚神経において mRNA 及びタンパクレベルで発現し、主に小型から中型の痛みを伝達する神経細胞に発現していることが明らかとなった。このことは、TRPV3 チャンネルは末梢の皮膚において温かい温度刺激を受容するだけでなく、一次感覚神経において痛みの伝達にも関与する可能性も示唆している。

TRPV3 チャンネルの機能獲得型の遺伝子変異を有するラットにおいて、熱刺激に対してだけでなく冷刺激に対する痛覚行動が亢進していたことから TRPV3 チャンネルの冷痛覚過敏への関与が示唆された。冷痛覚を引き起こす神経障害性疼痛モデルにおいて TRPV3 の顕著な発現変化は認められなかったが、mRNA やタンパクの合成や分解には影響せず、チャンネルの細胞内分布や活性が変化している可能性が考えられるため、今後さらに詳細な解析が必要である。

また、TRPV3 チャンネルの遺伝子変異ラットを用いた実験により、TRPV3 チャンネルの機能

亢進は TRPA1 チャンネルの機能に影響を与えることが示され、TRPV3 は冷感受性に重要な TRPA1 チャンネルとの相互作用を介して冷痛覚過敏に關与する可能性が示唆された。このような遺伝子変異を有するラットを用いることで、TRPV3 チャンネルに特異的な薬物が利用できない研究手法上の欠点を補うことが可能であると考えられる。冷痛覚における TRPV3 チャンネルの役割を包括的に検討することは、新たな視点からの冷痛覚過敏の分子メカニズムの理解に役立つと期待される。

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 1 件)

伊藤尚美、坂井 敦、三宅紀子、丸山基世、岩崎宏俊、三宅弘一、岡田尚巳、坂本篤裕、鈴木秀典、British Journal of Pharmacology、miR-15b mediates oxaliplatin-induced chronic neuropathic pain through BACE1 down-regulation、査読有、174(5)、386-395 (2017)

[学会発表](計 10 件)

丸山基世、坂井 敦、鈴木秀典、神経障害性疼痛における長鎖ノンコーディング RNA の発現解析、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

坂井 敦、丸山基世、鈴木秀典、感覚神経傷害による miR-21 の細胞外放出の上昇、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

坂井 敦、伊藤尚美、丸山基世、三宅紀子、岩崎宏俊、三宅弘一、岡田尚巳、坂本篤裕、鈴木秀典、miR-15b role in the oxaliplatin-induced neuropathic pain、16th World Congress on Pain、2016 年 9 月、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

坂井 敦、三宅紀子、丸山基世、三宅弘一、島田 隆、岡田尚巳、鈴木秀典、神経障害性疼痛における miR-17-92 クラスターによる電位依存性カリウムチャンネル調節、第 39 回日本神経科学大会、2016 年 7 月、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

坂井 敦、丸山基世、三宅紀子、齋藤 文仁、三宅弘一、島田 隆、岡田尚巳、鈴木秀典、神経障害性疼痛における miR17-92 クラスターによるカリウムチャンネルの調節、第 38 回日本疼痛学会、2016 年 6 月、(北海道・札幌市)

坂井 敦、三宅紀子、丸山基世、三宅弘一、島田 隆、岡田尚巳、鈴木秀典、miR-17-92 クラスターによる神経障害性疼痛及び軸索伸長の調節、第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

坂井 敦、三宅紀子、丸山基世、三宅弘一、島田 隆、岡田尚巳、鈴木秀典、神経傷害に

伴う疼痛及び軸索伸長における miR-17-92 クラスターの機能解析、BMB2015 第 38 日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会 合同大会、2015 年 12 月、(兵庫県・神戸市)

坂井敦、武藤友美、木村茉莉子、丸山基世、坂本篤裕、鈴木秀典、下行性ノルアドレナリン神経伝達の増強を指向した神経障害性疼痛治療の検討、第 37 回日本疼痛学会、2015 年 7 月、市民会館崇城大学ホール(熊本県・熊本市)

丸山基世、坂井敦、鈴木秀典、秋元敏雄、機能獲得型変異ラットの解析による TRPV3 の痛覚への関与の検討、第 62 回日本実験動物学会総会、2015 年 5 月、京都テルサ(京都府・京都市)

丸山基世、坂井敦、秋元敏雄、鈴木秀典、TRPV3 遺伝子機能獲得型変異ラットにおける痛覚行動解析、第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

[その他]

ホームページ等

研究室ホームページ(薬理学教室)

<http://www2.nms.ac.jp/nms/pharmacol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 基世 (MARUYAMA, Motoyo)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：60709757