

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09045

研究課題名(和文) NIPSNAP1によるTRPV2を介した機械刺激応答制御と線維筋痛症との関連

研究課題名(英文) Regulation of NIPSNAP1 on mechanical stimulus response via TRPV2 and its relation to fibromyalgia

研究代表者

芦高 恵美子 (Ashitaka, Emiko)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：50291802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Transient receptor potential V2 (TRPV2)は機械刺激応答に重要な役割担っているが、機械刺激受容の疼痛への関与やその制御機構などは不明な部分が多い。我々は、疼痛制御ペプチド・ノシスタチンの結合分子NIPSNAP1がTRPV2と結合することを見出し、細胞膜移行やチャネル活性制御への関与を明らかにした。また、エーラス・ダンロス症候群の原因遺伝子の一つであるテネイシンXの遺伝子欠損マウスにおいて、機械刺激に対する応答過敏(機械的アロディニア)や有髄神経応答過敏が見られることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TRPV2は神経突起の伸長や心臓の構造や機能維持に関する機械刺激受容に重要な役割をもつ。疼痛制御分子のNIPSNAP1とTRPV2との相互作用は、TRPV2のチャネル活性制御を担っており、新しい機械刺激応答制御機構につながると考えられる。また、エーラス・ダンロス症候群患者の慢性疼痛は、原因不明の線維筋痛症などの全身性疼痛と類似性が報告されている。機械刺激に対する応答過敏を顕著に示したテネイシンX欠損マウスの疼痛メカニズムの解明は、エーラス・ダンロス症候群の慢性疼痛の治療薬や治療法の開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Transient receptor potential V2 (TRPV2) plays an important role in the response to mechanical stimuli. NIPSNAP1, a binding molecule of the pain-regulating peptide nocistatin, bound to TRPV2, and it regulated the translocation of TRPV2 to the plasma membrane and the channel activity. Tenascin-X deficiency leads to Ehlers-Danlos syndrome. Tenascin-X-deficient mice exhibited mechanical allodynia and hypersensitization of myelinated fibers.

研究分野：生化学，疼痛学，神経科学

キーワード：TRPV2 NIPSNAP1 機械刺激応答 エーラス・ダンロス症候群 テネイシンX 神経障害性疼痛 ノシスタチン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

Transient receptor potential V2 (TRPV2)は、神経突起の伸長や心臓の構造や機能維持に関する機械刺激受容に重要な役割をもつ。しかし、TRPV2 アゴニストの後脚や髄腔内投与により機械刺激に対する疼痛反応が認められるが、TRPV2 遺伝子欠損マウスでは機械刺激に対する反応には変化がみられないなど、TRPV2 の機械刺激受容の疼痛への関与やその制御機構などは不明な部分が多い。

我々は、4-nitrophenylphosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like protein homolog 1 (NIPSNAP1)が TRPV2 と結合することを見出した。NIPSNAP1 は、疼痛制御ペプチド・ノシスタチンに結合する分子として同定し、本来痛みとして感じない触覚刺激が疼痛となるアロディニア制御に関与することを明らかにした (Okuda-Ashitaka E, et al., J Biol Chem, 287:10403-13, 2012)。NIPSNAP1 は、腎臓や小腸での Ca^{2+} 吸収に関与する TRPV6 と複合体を形成し、細胞内への Ca^{2+} 透過性を抑制することが報告されている (Schoeber JPH, et al., Eur J Physiol 457:91-101, 2008)。しかし、NIPSNAP1 と TRPV2 との相互作用の分子機構は明らかではない。

他方、我々は、細胞外マトリックスであるテネイシン X 遺伝子欠損マウスにおいて、DNA マイクロアレイ解析では後根神経節で TRPV2 mRNA の発現が上昇していること、機械刺激に対する応答閾値が顕著に低下することを見出した。テネイシン X は遺伝性結合組織疾患であるエーラス・ダンロス症候群の原因遺伝子の一つである。エーラス・ダンロス症候群は、コラーゲンやその修飾酵素、コラーゲン線維形成に関わる細胞外マトリックスなどの遺伝子変異による遺伝性結合組織疾患である。皮膚や関節の過伸展性、皮膚や血管の脆弱性が見られるほか、患者の約 90% に、線維筋痛症や複合性局所疼痛症候群と類似した全身性疼痛、神経障害性疼痛、筋痛や関節痛などの慢性疼痛が見られる。しかし、エーラス・ダンロス症候群の慢性疼痛メカニズム、TRPV2 や NIPSNAP1 との関連などの詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

NIPSNAP1 と TRPV2 との相互作用のチャネル活性と機械刺激応答の制御、エーラス・ダンロス症候群の慢性疼痛との関連に焦点をあて、機械刺激応答制御に基づく疼痛増強機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 結合ドメイン解析

NIPSNAP1 と TRPV2 の N 末端、C 末端、細胞内領域欠損などのタグ付加変異体を作製し、Cos7 細胞に共発現させた。タグ抗体による免疫沈降により、結合ドメインを解析した。また、結合ドメインのペプチドを合成し、タンパク導入試薬を用いて細胞に導入し、免疫沈降による阻害評価を行なった。

(2) 後根神経節細胞の培養

C57BL/6J マウス、NIPSNAP1 欠損マウス、テネイシン X 欠損マウスから後根神経節を採取し、コラゲナーゼ処理により得られた細胞をラミニンコートしたガラスボトムディッシュまたはストレッチチャンバー(ストレックス)で3日間培養した。

(3) 細胞内 Ca^{2+} 濃度測定

細胞に蛍光プローブ Fura-2AM または Fluo-8AM を導入し、2-APBなどを添加し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化をカルシウム顕微鏡や共焦点顕微鏡の経時変化解析を用いて測定した。

(4) 伸展による細胞への機械刺激

細胞を培養したストレッチチャンバーを伸展装置(ストレックス)にセットし、伸展刺激を行った。伸展刺激後、細胞内 Ca^{2+} 濃度測定と Western blotting を行った。

(5) 疼痛解析

von Frey 試験による機械刺激、ホットプレート試験による熱刺激、ホルマリン試験による化学刺激に対するマウスの疼痛反応を測定した。

(6) ニューロメーターを用いた正弦波刺激

ニューロメーターを用いてマウスに 5 Hz、250 Hz、2000 Hz の正弦波刺激を行った。後脚の屈曲反応が認められた値を応答閾値とした。

(7) 免疫組織染色と神経型一酸化窒素酵素活性測定

脊髄切片を、ニューロン活性化指標であるリン酸化 extracellular signal-regulated kinase (ERK) 抗体による免疫組織染色と NADPH ジアフォラーゼ活性測定による神経型一酸化窒素酵素活性を解析した。NADPH ジアフォラーゼは、NADPH とニトロブルーテトラゾリウム存在下で、青色を呈するニトロブルーテトラゾリウムフォルマザンを産生する。その発色を顕微鏡で観察し、Image J で定量した。

4. 研究成果

(1) NIPSNAP1 と TRPV2 との相互作用のチャネル活性と機械刺激応答の制御

本研究では、NIPSNAP1 と TRPV2 との結合ドメイン、NIPSNAP1 が TRPV2 の細胞膜への移行や細胞内 Ca^{2+} 流入を制御していることを明らかにした。

① 結合ドメイン

TRPV2 の N 末端、C 末端、細胞内領域欠損などの変異体を作製し、Cos7 細胞に HA タグ付加 NIPSNAP1 と共発現させた。HA 抗体による免疫沈降により、結合ドメインを解析した。その結果、TRPV2 の N 末端領域と NIPSNAP1 の N 末端領域が結合することを見出した。また、結合ドメインに対する 5 種類のペプチドを NIPSNAP1 と TRPV2 共発現細胞へ導入し、免疫沈降法で結合阻害を解析し、NIPSNAP1 と TRPV2 の結合阻害を示すペプチドの創出を試みた。

② TRPV2 の細胞膜移行

Cos7 細胞に TRPV2 と NIPSNAP1 とを共発現させ、細胞表面をビオチン標識し、細胞膜に存在する TRPV2 を解析した。TRPV2 と NIPSNAP1 との共発現細胞では、TRPV2 発現量には変化はないが、細胞膜に存在する TRPV2 が有意に減少した。また、TRPV2 の N 末端細胞内領域は、細胞膜へのターゲティングに必要な領域であることが報告された (Doate-Macian P, et al., Biochem Biophys Res Commun 462 221-6, 2015)。これらのことから、NIPSNAP1 は TRPV2 の細胞膜へのターゲティングを抑制している可能性が示唆された。

③ TRPV2 のチャネル活性

NIPSNAP1 欠損マウスを用い、内因性に TRPV2 と NIPSNAP1 が発現している感覚神経の細胞体である後根神経節に着目し、細胞内 Ca^{2+} 濃度測定を行った。NIPSNAP1 欠損マウスの後根神経節から単離した神経細胞では、TRPV2 のアクティベーターである 2-APB 添加により、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が野生型細胞より有意に亢進した。

(2) NIPSNAP1 と TRPV2 との相互作用の機械刺激応答の制御

機械刺激に対する細胞応答の *in vitro* 評価系を確立した。ストレッチチャンバーに培養した後根神経節細胞に伸張刺激を加えると、TRP チャネルを介した Ca^{2+} 流入が生じることを明らかにした。また、細胞内 Ca^{2+} 流入に起因する ERK のリン酸化上昇が見られ、TRP チャネル阻害剤 Ruthenium Red や TRPV2 アンタゴニスト Trilast はそのリン酸化上昇を抑制した。確立した *in vitro* の機械刺激細胞応答評価系を NIPSNAP1 欠損後根神経節の神経細胞へ適応した。

(3) ノシスタチンによる制御

NIPSNAP1 と TRPV2 との相互作用へのノシスタチンの関与を解析するため、ノシスタチンフォトアフィニティープローブを開発した。

(4) エーラス・ダンロス症候群の原因遺伝子テネイシン X 欠損の慢性痛

本研究では、エーラス・ダンロス症候群のモデルマウスとして、原因遺伝子の 1 つであるテネイシン X 欠損マウスを用いた疼痛解析を行い、患者と同様の神経障害性疼痛が生じること、有髄神経の応答過敏と中枢性感作が見られることを明らかにした。

① テネイシン X 欠損マウスの疼痛解析

テネイシン X 欠損マウスでは、野生型マウスと比較したところ、von Frey 試験の機械的的刺激に対する疼痛閾値が低下し、機械的アロディニアが認められた。一方、Hot plate 試験の熱刺激ではテネイシン X 欠損マウスと野生型マウスで同程度の疼痛反応を示した。また、テネイシン X 欠損マウスでは、Formalin による化学刺激応答を示す第 I 層 (1-5 分) とそれに続く炎症反応の第 II 層の初期 (16-30 分) に疼痛反応が増強した。

テネイシン X 欠損マウスの機械刺激の応答閾値低下は、神経障害性疼痛を抑制する抗てんかん薬 Gabapentin の経口投与、MOR オピオイド受容体アゴニスト DAMGO の髄腔内投与によって阻害された。一方、非ステロイド性消炎鎮痛薬 Indometacin や TRP チャネル阻害剤では影響を受けなかった。

② テネイシン X 欠損マウスの神経線維応答

テネイシン X 欠損マウスでは、Hot plate 試験の熱刺激と von Frey 試験の機械刺激の応答が異なっていたことから、一次求心性線維に着目した。神経線維応答については、マウスの後脚に経皮的正弦波刺激 (5、250、2000 Hz) を加え、逃避反応がみられた電流値を応答閾値として測定した。テネイシン X 欠損マウスでは、5 Hz (無髄 C 線維) には変化がないが、250 Hz ($A\delta$ 線維) と 2000 Hz ($A\beta$ 線維) の正弦波刺激に有意な応答閾値低下が見られた。テネイシン X 欠損マウスでは、有髄の A 線維の応答が過敏であった。

③ テネイシン X 欠損マウスの中枢性感作

テネイシン X 欠損マウスの脊髄は、野生型に比べ、Lamina I, II 層および Lamina III-V 層で神経活性化マーカーであるリン酸化 ERK の陽性細胞数と蛍光強度が有意に上昇した。また、テネイシン X 欠損脊髄では、神経型一酸化窒素酵素の活性化マーカーである NADPH ジアフォラーゼ活性の上昇も見られた。テネイシン X 欠損マウスの脊髄では、中枢性感作が認められた。

テネイシン X 欠損マウスの有髄神経の応答過敏や脊髄の中枢性感作と疼痛発症との関連は今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okuda-Ashitaka E, Kakuchi Y, Kakumoto H, Yamanishi S, Kamada H, Yoshida T, Matsukawa S, Ogura N, Uto S, Minami T, Ito S, Matsumoto KI.	4. 巻 10
2. 論文標題 Mechanical allodynia in mice with tenascin-X deficiency associated with Ehlers-Danlos syndrome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-63499-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Harada M, Minami T, Ito S, Okuda-Ashitaka E	4. 巻 501
2. 論文標題 Development of a novel photoaffinity probe for labeling nocistatin receptor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 514-519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.05.028.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 鎌田浩輝, 角地宥香, 吉津貴文, 南敏明, 伊藤誠二, 松本健一, 芦高恵美子
2. 発表標題 エーラス・ダンロス症候群原因遺伝子テネイシンX欠損マウスの中樞性感作
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芦高恵美子, 角地宥香, 角本寛明, 鎌田浩輝, 山西翔太, 宇戸禎仁, 南敏明, 伊藤誠二, 松本健一
2. 発表標題 エーラス・ダンロス症候群原因遺伝子テネイシン-X欠損マウスにおける機械的アロディニア
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芦高恵美子, 角地宥香, 角本浩明, 鎌田浩輝, 山西翔太, 宇戸禎仁, 南敏明, 伊藤誠二, 松本健一
2. 発表標題 類古典型エーラス・ダンロス症候群モデルマウスにおける神経障害性疼痛
3. 学会等名 第1回エーラス・ダンロス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鎌田浩輝, 角地宥香, 南敏明, 伊藤誠二, 松本健一, 芦高恵美子
2. 発表標題 類古典型エーラス・ダンロス症候群モデルマウスにおける脊髄の中樞性感作
3. 学会等名 第1回エーラス・ダンロス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鎌田浩輝, 角地宥香, 吉津貴文, 南敏明, 伊藤誠二, 松本健一, 芦高恵美子
2. 発表標題 エーラス・ダンロス症候群原因遺伝子テネイシンX欠損マウスの中樞性感作
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芦高恵美子, 角地宥香, 角本寛明, 鎌田浩輝, 山西翔太, 宇戸禎仁, 南敏明, 伊藤誠二, 松本健一
2. 発表標題 エーラス・ダンロス症候群原因遺伝子テネイシン-X欠損マウスにおける機械的アロディニア
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芦高恵美子, 角地宥香, 角本浩明, 鎌田浩輝, 山西翔太, 宇戸禎仁, 南敏明, 伊藤誠二, 松本健一
2. 発表標題 類古典型エーラス・ダンロス症候群モデルマウスにおける神経障害性疼痛
3. 学会等名 第1回エーラス・ダンロス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鎌田浩輝, 角地宥香, 南敏明, 伊藤誠二, 松本健一, 芦高恵美子
2. 発表標題 類古典型エーラス・ダンロス症候群モデルマウスにおける脊髄の中枢性感作
3. 学会等名 第1回エーラス・ダンロス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Okuda-Ashitaka E, Kakumoto H, Yamanishi S, Kakuchi Y, Kamada H, Uto S, Matsumoto KI.
2. 発表標題 Mechanical allodynia in tenascin-X-deficient mice associated with the Ehlers-Danlos syndrome.
3. 学会等名 The Ehlers-Danlos Society, Scientific Meeting of the Rarer Types of Ehlers-Danlos Syndoromes (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角地宥香, 角本寛明, 山西翔太, 宇戸禎仁, 松本健一, 芦高恵美子
2. 発表標題 エーラス・ダンロス症候群原因遺伝子テネイシンX欠損マウスの疼痛反応と神経線維解析
3. 学会等名 第66回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芦高恵美子, 角本寛明, 山西翔太, 角地宥香, 宇戸禎仁, 南敏明, 松本健一
2. 発表標題 エーラス・ダンロス症候群原因遺伝子テネインX欠損マウスの疼痛解析
3. 学会等名 Neuro2019 (第42回日本神経科学大会, 第62回日本神経化学会大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西秀平, 川端健太, 芦高恵美子
2. 発表標題 脊髄後角における神経ペプチド・ノシスタチンによるJNK抑制
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西秀平, 川端健太, 芦高恵美子
2. 発表標題 脊髄における神経ペプチド・ノシスタチンのPI3Kを介したJNK抑制
3. 学会等名 第65回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小西秀平, 川端健太, 芦高恵美子
2. 発表標題 脊髄後角における神経ペプチド・ノシスタチンのシグナル伝達機構
3. 学会等名 日本生物高分子学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Harada M, Minam T, Ito S, Okuda-Ashitaka E
2. 発表標題 Identification of two nocistatin-binding proteins by using a novel photoaffinity probe
3. 学会等名 Society for Neuroscience, The 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Okuda-Ashitaka E, Matsuoka E, Ohtsu I, Waki M, Yano Y
2. 発表標題 Involvement of 4-nitrophenylphosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like protein homolog 1 on the mitochondrial functions in mouse dorsal root ganglion neurons
3. 学会等名 Society for Neuroscience, The 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sugimoto T, Matsuyama J, Ishida T, Okuda-Ashitaka E
2. 発表標題 Mechanical stretch stimulus activates extracellular signal-regulated kinase via TRP channels and P2X receptor in dorsal root ganglion neurons
3. 学会等名 Society for Neuroscience, The 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村俊介, 今村知樹, 芳賀慧, 芦高恵美子
2. 発表標題 疼痛制御分子NIPSNAP1によるTRPチャネル制御
3. 学会等名 日本生物高分子学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤原武史, 川端健太, 芦高恵美子
2. 発表標題 脊髄における神経ペプチド・ノシセプチンによるCaMK の活性化
3. 学会等名 日本生物高分子学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原田雅士, 南敏明, 伊藤誠二, 芦高恵美子
2. 発表標題 フォトアフィニティープローブによるノシスタチン結合タンパク質の同定
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年會, 第90回日本生化学大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉本峻輝, 松山純一, 石田剛士, 芦高恵美子
2. 発表標題 神経細胞における高閾値機械刺激応答
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年會, 第90回日本生化学大会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪工業大学工学部生命工学科分子生体機能学研究室ホームページ
<http://www.oit.ac.jp/bio/labo/~ashitaka/home.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊藤 誠二 (ITO Seiji) (80201325)	大阪医科大学・その他部局等・客員教授 (34401)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	杉本 俊輝 (SUGIMOTO Toshiki)		
研究協力者	原田 雅士 (HARADA Masashi)		
研究協力者	小西 秀平 (KONISHI Shuhei)		
研究協力者	鎌田 浩輝 (KAMADA Hiroki)		
連携研究者	富永 真琴 (TOMINAGA Makoto) (90260041)	大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授 (82648)	
連携研究者	松本 健一 (MATSUMOTO Kenichi) (30202328)	島根大学・総合科学研究支援センター・教授 (15201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------