

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590740

研究課題名（和文）シグナル伝達分子を用いた内臓知覚伝達経路の解明

研究課題名（英文）Visceral pain and activation of MAPK in sensory neurons after noxious gastric distension

研究代表者

田中 淳二（TANAKA JUNJI）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：90412022

研究成果の概要：

胃が痛い、胃が重いなどの上腹部を中心とする症状を訴える患者は多いが、このような症状を有する約半数の患者にはその原因を説明できる器質的疾患が認められない。このような症状発現の機序の一つとして内臓知覚過敏の存在が指摘されている。胃の知覚は一般的に脊髄神経系を介する経路と、迷走神経を介する経路とが考えられているが、この2つの異なる経路の働きの違いなど、内臓知覚に対する研究は少なく、未だ不明な点が多い。一方、MAPK の一員である ERK1/2 や p38 MAPK は、細胞内情報伝達に関与し、その活性化が脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) や脊髄などで認められ、痛みの発生やそれに伴う変化に重要であるとされている。最近、我々はラットの胃に侵害性伸展刺激を加えると、DRG および迷走下神経節 (nodose ganglion: NG) において ERK1/2 の活性化だけではなく p38 MAPK の活性化も誘導されることを見いだした。侵害性伸展刺激によるこれら MAPK のリン酸化は、2 分がピークであり、TRPV1、TRPA1、ASIC3 陽性の小型ニューロンが中心であった。DRG だけではなく、NG においても ERK1/2 や p38 MAPK の活性化がみられることを考えると、機械的刺激による侵害受容に迷走神経系も関与している可能性が考えられる。内臓知覚における脊髄神経系と迷走神経系の役割の相違については更なる検討を要するものの、我々の知見は急性内臓痛発生のメカニズムには脊髄ニューロンだけではなく、一次知覚ニューロンにおける MAPK の活性化も重要な役割を担っていること、さらに多種多様の侵害刺激に対して反応する一次知覚ニューロンの活性化を細胞内情報伝達分子の動態より解析できる可能性を示唆している。これらの成果は Gastroenterology 等、数多くの国際誌に発表した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：TRPV1, TRPA1, ASIC3, DRG, NG, MAPK, ERK. p38

1. 研究開始当初の背景

機能性胃腸症 (functional dyspepsia ; FD) は消化管に器質的疾患を認めないものの、胃痛、腹部不快感、腹部膨満感、食後早期の満腹感、食欲低下、嘔気、嘔吐、胸焼けなどの上部消化器症状が持続的・断続的に認められる疾患である。FD の発症には胃排泄遅延、胃受容弛緩反応の異常、胃酸分泌異常、消化管知覚過敏や心理的要因などが複雑に関与するものと考えられている。FD の臨床症状はさまざまであるものの、胃受容弛緩の不全に基づく膨満感や知覚過敏など、それらの多くは知覚神経系の異常に起因することが考えられる。胃の知覚は一般的に脊髄神経系を介する経路と、迷走神経系を介する経路とが考えられているが、この2つの異なる経路における働きの違いなど、内臓知覚神経系の研究は体性感覚系のそれと比較して非常に少なく、未だその詳細については明らかではない。

一方、MAP kinase の一員である Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) は、細胞内情報伝達に関与し、その活性化が脊髄後根神経節 (DRG) や脊髄後角などで認められ、痛みの発生やそれに伴う変化に重要であるとされる。ペインリサーチの分野では、DRG ニューロンの活性化を示す分子マーカーの発見が熱望されていたが、我々はラットの後肢に各種の侵害刺激を加えたとき、DRG においてシグナル伝達分子の一員である ERK1/2 がリン酸化して末梢の感作 (peripheral sensitization) に関与していることを発見し、Journal of Neuroscience 誌で発表した (下図参照)。さらに、この DRG における ERK1/2 のリン酸化は末梢からの刺激情報に対して 1~2 分という応答時間で活性化することを発見した。この結果は末梢からの疼痛刺激に特異的に反応している DRG ニューロンを具体的に可視化することが可能となり、疼痛刺激と分子の対応関係を調べることができることを意味する。

2. 研究の目的

最近、胃の伸展刺激に対する疼痛関連動作の指標として僧帽筋の筋電図が有用であるとされている。今回の申請では、まず第1に、胃に伸展刺激を加えることにより、DRG および迷走神経節 (NG) において ERK1/2 の活性化が生じるかどうかを検討し、第2に、僧帽筋の筋電図を指標にして ERK1/2 の活性化と伸展刺激に伴う痛みとの間に関連性があるかどうかについて解明すること、さらに、内臓知覚における脊髄神経系と迷走神経系の役割の相違を調べることを目的としている。

3. 研究の方法

雄性 S-D ラット (190-260g) を用いた。最近、胃の伸展刺激に対する疼痛関連動作の指標として僧帽筋の筋電図が有用であるとされている。そこで胃内にバルーンを留置した後、浅麻酔下でバルーン内に液体を注入し、各内圧 (0、40、60、80、100、120mmHg) によって誘発される僧帽筋での筋電図を記録した。また、各内圧 (0、40、60、80、100 mmHg) で胃への伸展刺激を加えた 2 分後に、Th9、10 の DRG、および NG を摘出し、ERK1/2 活性化の指標であるリン酸化 ERK1/2 に対する polyclonal 抗体を用いた免疫染色を施行した。さらに様々な受容体 (TRPV1、ASIC3) との二重染色を行い、ERK1/2 の活性化がどのような受容体を有するニューロンで生じているのかを検討した。過去の報告では、化学的刺激に対する侵害受容には迷走神経系が、機械的刺激に対する侵害受容には脊髄神経系が関与していると推測されている。そこで内臓神経切除、または迷走神経切除を行ったモデルラット作成し、手術後 7 日目に、100mmHg で胃への伸展刺激を加え、誘発される僧帽筋の筋電図を測定した。さらに、ERK1/2 活性化阻害剤 (U0126) を髄腔内投与し、疼痛関連動作 (僧帽筋の筋電図) と DRG における ERK1/2 活性化との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) DRG および迷走神経節 (NG) における ERK1/2 の発現

我々はラットの胃に侵害性伸展刺激 (60、80、100 mmHg) を加えると、DRG および NG において ERK1/2 の活性化が誘導されることを見いだした。リン酸化 ERK1/2 陽性細胞は圧依存的に増加し、これは筋電図の変化と関連していた。

(2) DRG および迷走神経節 (NG) における ERK1/2 の時間経過

侵害性伸展刺激による ERK1/2 のリン酸化は 2 分がピークであった。

(3) 胃の伸展刺激に関わる受容体の同定

DRG および NG とともに、TRPV1、ASIC3 陽性の小型ニューロンを中心に活性化していることが分かった。

(4) 脊髄神経切除および迷走神経切除の疼痛関連動作 (僧帽筋筋電図) に及ぼす影響

DRG だけではなく、NG においても ERK1/2 の活性化がみられることを考えると、機械的刺激による侵害受容に迷走神経系も関与している可能性が考えられた。しかし、過去の報告と同様、内臓神経切除によって侵害伸展

刺激 (100mmHg) に伴う疼痛関連動作は有意に減弱したが、迷走神経切除では明らかな変化は認められなかった。

(5) ERK1/2 活性化阻害剤の疼痛関連動作 (僧帽筋筋電図) に及ぼす影響

ERK1/2 活性化阻害剤である U0126 を髄腔内投与すると、侵害伸展刺激に伴う疼痛関連動作は著明に減弱し、DRG におけるリン酸化 ERK1/2 陽性細胞数は有意に減少していた。

(6) 考察

臨床における FD の診断および治療は未だに確立されていないが、患者数は年々増加の一途をたどっている。一方、この数年間で内臓痛モデルを含め、様々な動物モデルを用いて一次知覚神経節や脊髄後角における蛋白あるいは遺伝子発現レベルでの変化が報告されるようになった。また遺伝子操作を用いたノックアウトマウスの解析などより、一次知覚ニューロンに特異的に発現する受容体に関する新しい知見が次々と得られている。しかし、消化管特有の侵害受容体の感作機構 (痛みの局在がはっきりしないことや関連痛が存在することなど) や、機械的侵害受容器と痛みとの関連など、内臓痛だけではなく、体性痛も含めて多くの課題を有しているのも事実である。内臓知覚における脊髄神経系と迷走神経系の役割の相違については更なる検討を要するものの、我々の知見は急性内臓痛発生のメカニズムには脊髄ニューロンだけではなく、一次知覚ニューロンにおける ERK1/2 の活性化も重要な役割を担っていること、さらに多種多様の侵害刺激に対して反応する一次知覚ニューロンの活性化を細胞内情報伝達分子の動態より解析できる可能性を示唆している。

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 9 件)

- ① Miyoshi, K., Obata, K., Kondo, T., Okamura, H. and Noguchi, K. (2008) IL-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury. *J. Neurosci.*, 28, 12775-12787. 査読有
- ② Katsura, H., Obata, K., Miyoshi, K., Kondo, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Sakagami, M. and Noguchi, K. (2008) Transforming growth

factor-activated kinase 1 induced in spinal astrocytes contributes to mechanical hypersensitivity after nerve injury. *Glia*, 56, 723-733. 査読有

- ③ Kobayashi, K., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Dai, Y., Obata, K. and Noguchi, K. (2008) P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain, *J. Neurosci.*, 12, 28, 2892-902. 査読有
- ④ Obata, K., Katsura, H., Miyoshi, K., Kondo, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Akira, S. and Noguchi, K. (2008) Toll-like receptor 3 contributes to spinal glial activation and tactile allodynia after nerve injury. *J. Neurochem.*, 105, 2249-2259. 査読有
- ⑤ Sakurai, J., Obata, K., Ozaki, N., Tokunaga, A., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Kondo, T., Miyoshi, K., Sugiura, Y., Matsumoto, T., Miwa, H. and Noguchi, K. (2008) Activation of extracellular signal-regulated protein kinase in sensory neurons after noxious gastric distention and its involvement in acute visceral pain in rats. *Gastroenterology*. 134(4):1094-103. 査読有
- ⑥ Dai, Y., Wang, S., Tominaga, M., Yamamoto, S., Fukuoka, T., Higashi, T., Kobayashi, K., Obata, K., Yamanaka, H. and Noguchi, K. (2007) Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J. Clin. Invest.*, 117, 1979-1987. 査読有
- ⑦ Katsura, H., Obata, K., Mizushima, T., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T., Sakagami, M. and Noguchi, K. (2007) Activation of

extracellular signal-regulated protein kinases 5 in primary afferent neurons contributes to heat and cold hyperalgesia after inflammation. *J. Neurochem.*, 102, 1614-1624. 査読有

⑧ Obata, K., Katsura, H., Mizushima, T., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T. and Noguchi, K. (2007) Roles of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in spinal microglia and primary sensory neurons for neuropathic pain. *J. Neurochem.*, 102, 1569-1584. 査読有

⑨ Yamanaka, H., Obata, K., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., and Noguchi, K. (2007) Alternation of the cell adhesion molecule L1 expression in a specific subset of primary afferent neurons contributes to neuropathic pain. *Eur. J. Neurosci*, 25, 1097-1111. 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① Miyoshi, K., Obata, K., and Noguchi, K. (2008) IL-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury. The 38th Annual Meeting Society for Neuroscience, 11.15-19, Washington, DC., U.S.A.
- ② Kondo, T., Obata, K., Miyoshi, K., Sakurai, J., Miwa, H. and Noguchi, K. (2008) TRPA1 mediates gastric distension-induced visceral pain in rats. The 38th Annual Meeting Society for Neuroscience, 11.15-19, Washington, DC., U.S.A.
- ③ 近藤隆, 小畑浩一, 櫻井淳, 三輪洋人, 野口光一 (2008) ラット胃伸展刺激後の急性内臓痛とTRPA1を介したERKの活性化. 第1回J-FD研究会, 11.8, 東京.
- ④ 近藤隆, 小畑浩一, 櫻井淳, 三輪洋人, 野口光一 (2008) ラット胃伸展刺激に伴う内臓痛におけるTRPA1の関与. 第50回日本消化器病学会大会, 10.1-4, 東京.
- ⑤ 近藤隆, 小畑浩一, 櫻井淳, 三輪洋人, 野口光一 (2008) ラット胃伸展刺激

に伴う内臓痛におけるTRPA1の関与. 第7回日本Neurogastroenterology (神経消化器病)学会, 9.30, 東京

- ⑥ 近藤隆, 小畑浩一, 櫻井淳, 三輪洋人, 野口光一 (2008) ラット胃伸展刺激後の一次知覚ニューロンにおけるp38MAPKの活性化. 第30回日本疼痛学会, 7.19-20, 福岡.
- ⑦ 近藤隆, 小畑浩一, 三輪洋人, 野口光一 (2008) TRPA1はラット胃伸展刺激後の急性内臓痛に関与する. 第31回日本神経科学大会, 7.9-11, 東京.
- ⑧ Obata, K., Katsura, H., Miyoshi, K. and Noguchi, K. (2007) Activation of Toll-like receptor 3 in spinal microglia is required for tactile allodynia after nerve injury. 37th Annual Meeting Society for Neuroscience, 11.3-7, San Diego, U.S.A.
- ⑨ 小畑浩一, 野口光一 (2007) 脊髄マイクログリアにおけるTLR3の活性化と神経因性疼痛. 第30回日本神経科学大会, 9.10-12, 横浜.

[図書] (計1件)

- ① 小畑浩一, 野口光一 (2007) 痛みのメカニズム. 運動器の痛み診療ハンドブック, (山下敏彦 編), 南江堂, 東京, 2-17.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 淳二 (TANAKA JUNJI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90412022

(2) 研究分担者

小畑 浩一 (OBATA KOICHI)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 70368538

(3) 連携研究者

なし