

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20602019

研究課題名(和文) TRPチャネルを中心とした腰痛の疼痛機序解明に向けた細胞内痛みセンサーの解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of lumber pain that focused in pain sensor such as TRP channels.

研究代表者

横山 徹 (Yokoyama Toru)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：80425321

研究成果の概要(和文)：

腰痛をはじめとする疼痛機序解明を目的にTRPチャネルを中心に細胞内痛みセンサーの解析を行った。皮膚や脊髄などでは、痛み刺激に反応するTRPV1やTRPA1が中枢神経系では、水分調節に関係する視索上核の存在するバゾプレッシン産生細胞に興奮性に作用することをはじめて見出した。また、下肢の痛みなどではバゾプレッシンの分泌が増加し、痛みとバゾプレッシンに密接な関係がある可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

We demonstrated pain sensor TRPV1 is essential for osmo-regulation in central nerves systems. TRPA1 agonists potentiate excitatory synaptic inputs to the SON. We found the possibility that vasopressin strongly participated in a pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：疼痛学

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

(1) “痛み”の克服は我々人類にとって重要な課題である。その中でも腰痛は国民の多くが悩んでいる疼痛である。厚生労働省国民生活基礎調査によると、20歳を超えてから徐々に増加して高齢者では人口千人あたり150人以上が腰痛を訴えている。腰痛などの疼痛改善は危急な国民的問題であるが、その疼痛の発生機序について科学的な検討は未だに進んでいない。

(2) 脊髄後根神経節(Dorsal Root Ganglia, DRG)細胞は多くの神経ペプチドを含み、疼痛への関与が強く示唆され腰痛への関与が注

目を集めている。その疼痛機序においてはG蛋白共役型受容体(GPCR)などの様々な受容体やチャネル疼痛機序の一つとして考えられている。

(3) 現在、痛みセンサーとしてtransient receptor potential(TRP)vanilloid subfamily member 1(TRPV1)をはじめとした温度感受性TRPチャネルが注目されてきた。また、痛みセンサーの中枢への影響については殆ど検討がされていない。腰を暖めると腰痛が改善するというよく言われている事実に科学的な根拠を与えられ、DRGや中枢神経系におけるTRPチャネルの活性化の状

態をつかむことで、腰痛の診断・疼痛治療に有益な情報を与えることが出来るのではないかとと思われる。

2. 研究の目的

主観的・画像的診断が主であった腰痛をはじめとした疼痛管理を、DRG および中枢神経系における TRP チャンネルをはじめとしたチャンネル・受容体の関与を科学的に解明することにより、今後の治療薬の開発や腰痛などの疼痛発生予防の検討を含めて、疼痛克服にむけた新たな展開をもたらすこと目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラット(野生型)およびマウス(野生型および TRPV1 KO マウス)の脳スライス(視床下部視索上核)や DRG 細胞に発生している、TRP チャンネルを中心に、NMDA 受容体、Na⁺チャンネルをスライスパッチクランプ法などを用いて、中枢神経系と末梢、または障害時ではその役割、作用等にどのような違いがあるかを電気生理学的に検討する。

(2) 免疫組織化学的染色法、RT-PCR 法、*in situ* ハイブリダイゼーション法による、TRP チャンネルをはじめとした、腰部・下肢疼痛時の痛覚に関与するチャンネル・受容体を検索する。

(3) 疼痛に関係するとされる受容体やチャンネルをオオサイト卵母細胞に発現させ、発現させたチャンネル・受容体に対する鎮痛剤や吸入麻酔薬などの作用を、電気生理学的に検討する。

4. 研究成果

(1) 視床下部視索上核に存在するバゾプレッシンを産生する大細胞性ニューロンにホールセル・パッチクランプ法を用いて電気生理学的検討を行った。マンニトール負荷による高浸透圧刺激は、大細胞性ニューロンへの興奮性シナプス入力の頻度を振幅に変化を与えず、有意に増加させた。この反応は TRP チャンネルの阻害剤であるルテニウムレッドで抑制された。TRPV1 のアゴニストであるカプサイシンは影響を与えず、また、カンナビノイド受容体阻害剤前投与下では、興奮性シナプス入力の頻度の増加がさらに有意に増強していた。

さらに TRPV1 KO マウスを用いた実験では、TRPV1 KO マウスではマンニトールによる高浸透圧刺激による興奮性シナプス入力の頻度は増加するものの、この頻度の増加は、野生型マウスに比して有意に減少していることを明らかにした(図1)。

これらのことから、中枢神経系の視索上核には、カプサイシン非感受性の TRPV1 バリエーションが存在し、この TRPV1 バリエーションによる高浸透圧感受性に関与していることを明らかにした。さらに浸透圧の感受性にはカンナビノイドも関係していることも明らかにした。

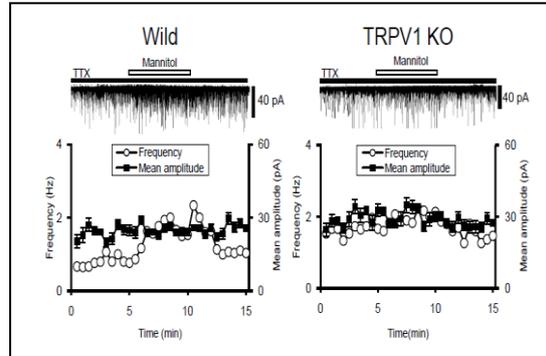


図1：高浸透圧刺激による視索上核大細胞性ニューロンへの興奮性シナプス入力の結果。TRPV1KO マウスでは、野生型マウスに比べて興奮性シナプス入力の頻度の増加が有意に減少している。

DRG 細胞には、TRPV1 と TRPA1 が共存していることが既に報告されているが、培養 DRG 細胞では、それぞれのアゴニストであるカプサイシン、AITC で反応が認められた。しかし、中枢神経系視床下部視索上核のように浸透圧では反応がなく、中枢と末梢では TRPV1 のタイプが異なり、生理学的な役割も異なることを明らかにした(図2)。

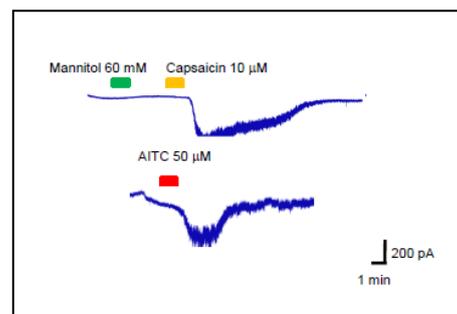


図2：培養 DRG 細胞における反応。DRG にはカプサイシン感受性の TRPV1 が TRPA1 と共発現している。この TRPV1 は浸透圧感受性には関与しておらず、中枢と末梢では同じ TRPV1 でも、タイプが異なることを示している。

また、飲水などに関連し、自らも視索上核大細胞性ニューロンに作用するアンジオテンシン II や、摂食関連ペプチドであり摂食を惹起するグレリンも TRPV1 チャンネルを介して視索上核のバゾプレッシンニューロンに興奮性に作用することも明らかにした(図3)。

DRG 細胞などで、TRPV1 と共発現していることが多い TRPA1 のアゴニストがバゾプレッシン産生ニューロンを興奮させることを発見した (図 4)。これまで、バゾプレッシンは痛み閾値に関与しているのではと報告されていたが、今回の結果から、バゾプレッシンは、抗利尿ホルモンとして知られる水分保持という役割のほか、中枢においても TRP チャンネル関与することで痛みに関与している可能性が示唆される。癌による疼痛では、摂食行動や飲水行動などに影響するが、痛みとグレリンなどが TRPV1 を介してバゾプレッシンに関与していることが明らかとなった。体液保持や栄養摂取が癌性疼痛をはじめとする痛みの改善に繋がる可能性がある。

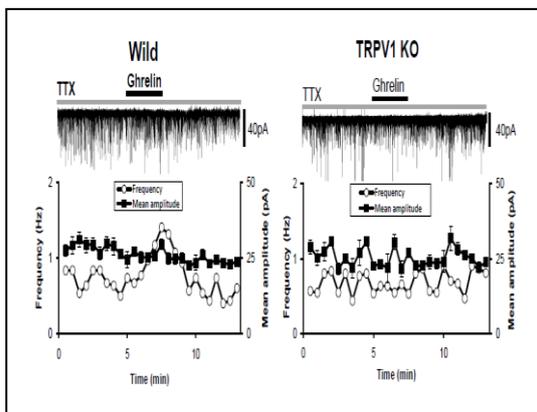


図 3 : 摂食関連ペプチドであるグレリン投与による視索上核大細胞性ニューロンへの興奮性シナプス入力の結果。TRPV1KO マウスでは、野生型マウスに比べてグレリン投与による興奮性シナプス入力の頻度の増加が有意に減少している。

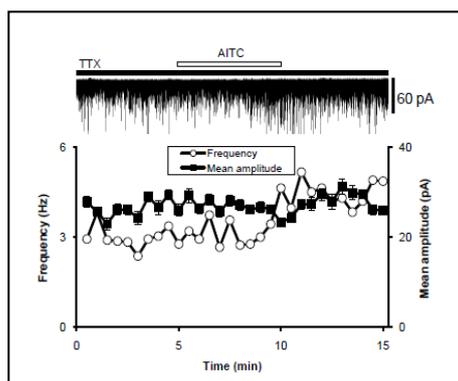


図 4 : TRPA1 の選択的アゴニストである AITC は視索上核大細胞性ニューロンへの興奮性入力の頻度を有意に増強させた。この反応は TRPA1 阻害剤存在下では認められなかった。これらの結果は、TRPA1 が SON に存在することを示唆する。

(2) 腰痛症などでは神経圧迫など重症になった場合、下肢の感覚障害や痛みを伴うことがあるが、急性下肢疼痛モデルとして、TRPA1 アゴニストで急性疼痛を引き起こす代表物質であるホルマリンをラット下肢に注射した。(1) に関係した視床下部視索上核などを免疫組織化学的染色法、RT-PCR 法、*in situ* ハイブリダイゼーション法にて観察した。結果として、ホルマリンによる急性疼痛刺激は、バゾプレッシンの分泌を有意に増加させた。バゾプレッシンはこれまで、慢性的なストレスに対して反応するといわれていたが、この結果から急性疼痛および急性疼痛のストレスに関して、バゾプレッシンが密接に関与している事を明らかにした。

(3) 痛み関係しているとされるチャンネル・受容体をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させて、鎮痛剤投与時のインワードカレントを観察した。鎮痛剤として使用されるトラマドールが、サブスタンス P 受容体に抑制的に作用することを見出した。また、活動電位の発生や痛みなどに Na⁺チャンネルが関与しているとされるが、オオサイト卵母細胞に発現させた Na⁺チャンネルで、吸入麻酔薬の1つであるセボフルレンは高濃度でインワードカレントを抑制することも見出した。本研究で最も着目した TRP チャンネルのうち、TRPV1 についてもアフリカツメガエル卵母細胞発現系における検討を行った結果、麻酔薬や鎮痛薬が TRPV1 に影響する可能性を示唆する結果を得た。

本研究では、皮膚や DRG 細胞で痛みセンサーとして知られている TRPV1、TRPA1 が中枢神経系視索上核に存在し、TRPV1 は浸透圧や飲水や摂食にも関係していることを初めて見出した。また、下肢の急性疼痛刺激でバゾプレッシンの分泌が増加することから、バゾプレッシンは痛み・痛みストレスを緩和する方向に密接に関係している可能性も見出した。その、痛みによるバゾプレッシン分泌にも TRP チャンネルが関与している可能性が高いことを見出した。

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 6 件)

- ① Yokoyama T, Saito T, Ohbuchi T, Suzuki H, Otsubo H, Okamoto T, Fujihara H, Nagatomo T, Ueta Y. Ghrelin potentiates miniature excitatory postsynaptic currents in supraoptic magnocellular neurones. *Journal of Neuroendocrinology* 21(11): 910-920, 2009 査読有

- ② Suzuki H, Kawasaki M, Ohnishi H, Ohbuchi T, Katoh A, Hashimoto H, Yokoyama T, Fujihara H, Dayanithi G, Murphy D, Nakamura T, Ueta Y. Exaggerated response of a vasopressin-enhanced green fluorescent protein transgene to nociceptive stimulation in the rat. *Journal of Neuroscience* 29(42); 13182-13189, 2009 査読有
- ③ Yokoyama T, Saito T, Ohbuchi T, Hashimoto H, Suzuki H, Otsubo H, Fujihara H, Nagatomo T, Ueta Y. TRPV1 gene deficiency attenuates miniature EPSC potentiation induced by mannitol and angiotensin II in the supraoptic magnocellular neurons. *Journal of Neuroscience* 30(3); 876-884, 2010 査読有
- ④ Yokoyama T, Ohbuchi T, Saito T, Sudo Y, Fujihara H, Minami K, Nagatomo T, Ueta Y. Allyl isothiocyanates and cinnamaldehyde potentiate miniature excitatory postsynaptic inputs in the supraoptic nucleus in rats. *European Journal of Pharmacology* 655; 31-37, 2011 査読有
- ⑤ Minami K, Yokoyama T, Ogata J, Uezono Y. The tramadol metabolite o-desmethyl tramadol inhibits substance p-receptor functions expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Pharmacological Sciences* 115; 421-424, 2011 査読有
- ⑥ Yokoyama T, Minami K, Sudo Y, Horishita T, Ogata J, Yanagita T, Takeuchi M, Uezono Y. Effects of Sevoflurane on Voltage-gated Sodium Channel $Na_v1.8$, $Na_v1.7$ and $Na_v1.4$ Expressed in *Xenopus* Oocytes. *Journal of Anesthesia*; in press, 2011 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 横山徹、齋藤健、大淵豊明、橋本弘史、鈴木仁士、大坪広樹、上田陽一。ラット視索上核大細胞性神経分泌ニューロンへの興奮性シナプス入力に対するアンジオテンシン II およびグレリンの影響、第81回日本内分泌学会学術総会、2008年5月17日。青森市
- ② Yokoyama T, Minami K, Okamoto T, Ueta Y. Pain sensor TRPV1 facilitates excitatory synaptic inputs to the magnocellular neurons in the supraoptic nucleus of rat. The 3rd Asian Pain Symposium. 19, July, 2008. Fukuoka
- ③ 横山徹、大淵豊明、長友敏寿、上田陽一。視索上核大細胞性神経分泌細胞の浸透圧感受性における TRPV1 の関与。第32回日本神経科学大会。2009年9月18日。名古屋市
- ④ 横山徹、大淵豊明、上田陽一。視索上核大細胞性神経分泌ニューロンへの興奮

性シナプス入力に対するグレリンの効果は TRPV1 によって調節される、第20回日本病態生理学会大会。2010年1月24日。奈良

- ⑤ 横山徹、大淵豊明、齋藤健、藤原広明、長友敏寿、上田陽一。ラット視索上核大細胞神経分泌ニューロンへの興奮性シナプス入力に対する TRPA1 アゴニストの効果。第88回日本生理学会大会。2011年3月29日。パシフィコ横浜 (横浜)

[図書] (計1件)

- ① 横山徹。西村書店。脳とホルモンの行動学 (近藤保彦、小川園子他 編)。2010 pp:158-162

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 徹 (Yokoyama Toru)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：80425321

(2) 研究分担者

南 浩一郎 (Minami Kouichiro)
研究者番号：70279347

上田 陽一 (Ueta Yoichi)
研究者番号：10232745