

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21600004

研究課題名（和文）

侵害的温度刺激による侵害受容器興奮機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of nociceptor excitation by noxious temperature.

研究代表者

片野坂 公明 (KATANOSAKA KIMIYAKI)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：50335006

研究成果の概要（和文）：冷痛覚や熱痛覚を担う痛み受容器における、低温や高温の温度受容の仕組みについて調べた。培養細胞と麻酔下動物において、一次知覚神経細胞（痛み受容器を含む）の温度感受性を調べ、知覚神経細胞の温度感受性と、温度受容体の有力候補とされる TRP イオンチャネルの発現との間に必ずしも強い相関が見られず、これらの TRP 以外の温度受容機構の存在が示唆された。また、改良した冷痛覚行動試験法を用いて、これまで曖昧であった健常動物の冷痛覚行動と炎症病態時の冷痛覚過敏が明瞭に観察可能となった。

研究成果の概要（英文）：The mechanisms of heat- and cold-nociception in the nociceptive sensory neurons were examined in rat and mice. No clear correlation between temperature sensitivities of the primary sensory neurons in dorsal root ganglion (DRG) and expression of molecular candidates for nociceptive cold and heat receptors, such as TRPA1 and V2 channels, was observed in cultured DRG neurons and anesthetized animals. The data suggested the involvement of other mechanisms independent of these candidate molecules. In addition, I have improved a cold pain assay (cold plate test) to clearly observe the cold pain-related behavior in normal rats and cold hyperalgesia in inflamed rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野： 感覚生理学、疼痛学

科研費の分科・細目： 時限、 疼痛学

キーワード： 温度受容、痛覚、TRP チャネル、侵害受容器、一次知覚ニューロン

1. 研究開始当初の背景

15°C以下の低温や 50°C以上の高温は、痛み刺激の受容に働く一次知覚ニューロンである「C-,Aδ-侵害受容器(痛み受容器)」を興奮させ、痛みとして知覚される。最近の10数年で一次知覚ニューロンに発現する温度感受性 TRP (Transient receptor potential)

チャネルが続々と発見され、その温度特性とヒトの主観的な温度痛覚閾値との一致から、TRPV1,V2, A1 等の TRP チャネルが温度による痛みを担う侵害的温度受容体そのものであろうと考えられてきた。

極端な低温で生じる冷痛覚に関しては、TRPA1 の関与が示唆されているが、遺伝子

欠損マウスの冷痛覚行動の解析から、その痛覚への関与には否定的な見解も多かった。しかし、当時実施されていた冷痛覚行動試験では、健常動物においても痛覚行動が明瞭ではなく評価が難しいという問題点があり、結論を出すには不十分であった。一方、50°Cを超える極端な高温で生じる熱痛覚に関しては、TRPV2 の関与が予想されていたが、当時の学会発表レベルの報告では TRPV2 欠損マウスの熱痛覚行動に明瞭な異常は見られず、その熱痛覚への関与は疑問視され始めていた。

このように、温度受容体としてのコンセンサスが得られたものもある一方で、一部の TRP では、痛覚への関与に否定的な結果も多く、侵害的高温・低温受容と情報変換の仕組みは、混沌として良くわからない状況にあった。

2. 研究の目的

本研究は、侵害レベルの温度が生体組織でどのように受容され、侵害受容器の神経活動へと情報変換されるのか、その仕組みを解明することを目的として行なった。特に、我々が痛みを感じる温度域の中でも、不明瞭な点の多い低温 (15°C以下) および高温 (50°C以上) による侵害受容器の興奮に関して、既知の温度感受性 TRP チャンネルの関与の検証と、既知の温度感受性 TRP 以外の受容メカニズムの関与の検討を行ない、侵害レベルの温度受容機構に関する新たな知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 実験方針の概要

①、冷痛覚行動試験の改良と持続性炎症時の冷痛覚過敏への TRP の関与の検討 -

動物の冷痛覚の評価に用いられるコールドプレート試験装置の改良と測定条件の最適化により、冷痛覚関連行動の検出力の改善を試みた。この方法を用いて、単関節炎モデルラットの冷痛覚行動を調べ、冷痛覚過敏と冷アロディニアの出現、およびその際の TRP 遺伝子の発現と、脊髄後根知覚神経節細胞 [Dorsal root ganglion neuron (DRG ニューロン)] の反応を調べ、冷痛覚過敏とこれらのチャンネルの関連を調べた。

②、培養 DRG 神経細胞の温度感受性と発現 TRP 受容体との相関 -

培養 DRG ニューロンと、HEK293 細胞異所発現系において、細胞内カルシウムイメー

ジング法とパッチクランプ法により、温度感受性 TRP イオンチャンネルの各種アゴニストに対する応答と、細胞の温度応答とを調べ、両者の間の相関を調べた。また、高温感受性細胞に関しては、温度応答を記録した後の細胞をバラホルムアルデヒドで固定し、抗 TRPV2 抗体への反応性の有無を免疫細胞化学的に調べた。

③、免疫組織化学的な高温感受性ニューロンの同定と TRPV1,V2 との共局在の解析 -

50°Cを超える侵害的熱受容への TRPV2 の関与の有無を検証するため、熱刺激直後に侵害受容性 DRG ニューロンで見られる ERK (Extracellular signal-regulated kinase) のリン酸化(pERK の出現)を指標として、DRG の高温感受性ニューロンを免疫組織化学的に同定した。本法で観察される pERK 陽性細胞での TRPV1, TRPV2 の発現の有無を調べ、これらの TRP チャンネルと熱感受性の関連を調べた。

(2)、実験方法

①、動物

8 週令以上の雄性の S D ラット(日本 SLC)、C57BL/6j マウス(日本チャールズ・リバー)、および TRPV1KO マウス(岡崎統合バイオサイエンスセンター富永教授より分与)を使用。全ての動物使用は、所属部局の動物実験委員会の承認を受け、大学の動物実験等に関する取り扱い規定に従い、使用する動物数の削減、および動物の苦痛の軽減に最大限配慮して実施した。

②、コールドプレートテスト

冷痛覚行動の計測で良く用いられるコールドプレートテスト装置および、本装置上で試験動物を入れるためのアクリル製のケージを自作し、動物の冷痛覚行動の変化の検出力の改善を試みた。薄いステンレス製のプレート下に 20%エチレングリコールの冷媒を還流させて、プレートの温度を低温に維持した。室温 24°C で、低温プレート上に設置した透明のアクリルケージにラットを入れた後、3-6 分間の行動を 2 台のビデオカメラで撮影した。実験終了後、ビデオ再生画像で足上げ行動と足舐め行動の頻度を計測した。

③、アジュバント関節炎モデル

炎症性の冷痛覚過敏を調べるため、ラットの左足関節にフロイント完全アジュバントを 50 μ L 注入し、持続性の単関節炎を惹起させた。アジュバント接種前の 6, 3 日および接種直前 (0 日)、さらに接種後 5, 8, 11, 14, 21 日にコールドプレートテストを実施した。また、別グループのラットから、アジ

ュバント接種後 0, 5, 11, 14 日後に DRG を
剖出し、半定量的 RT-PCR により、低温感受
性 TRP である TRPM8 と TRPA1 の mRNA
の発現量を比較した (n= 4/ day)。またアジ
ュバント接種 14 日後の DRG ニューロンを培養
し、TRPM8、TRPA1 のアゴニストに対する
反応性をカルシウムイメージングにより調
べた。

④、細胞生理学実験

ラットの DRG からコラゲナーゼおよびト
リプシン処理により知覚ニューロンを単離
し、B27 supplement 添加 Neurobasal-A 培
地(Invitrogen) 中で 1-2 日間培養後、カル
シウムイメージング法と全細胞パッチクラ
ンプ法により、細胞の温度応答を記録した。
カルシウムイメージング法は、蛍光カルシ
ウム指示薬として 10 μ M Fura2-AM(DOJIN)
を用い、AQUACOSMOS システム(浜松ホ
トニクス)にて記録するか、あるいは 2.5-5
 μ M Fluo4-AM を用いて Oz/Intervision
(Noran)で測定した。温度刺激は、細胞応答
の記録チャンパー中に、高温あるいは低温の
細胞外液を灌流することで与えた。パッチク
ランプ法による熱感受性電流の観察には、短
時間の熱刺激により熱による細胞のダメ
ージを少なくして、熱応答の繰り返し記録が可
能となるよう、局所灌流装置を自作し、1.5
秒間で細胞近傍の温度が 52°C に達するよ
うに高速熱刺激を与えた。

⑤、免疫組織化学

Dai et al. (2002) の方法に基づいて行った。
ペントバルビタール深麻酔下のマウスの後
肢を 32-60°C の温水に浸けて 2 分間の温度刺
激を行い、その直後に 4%パラホルムアルデ
ヒドによる急速灌流固定を行なった。単離し
た腰部 DRG(L4-6)から凍結切片を作成し、抗
pERK 抗体と、抗 TRPV1,あるいは抗 TRPV2
抗体との蛍光二重染色を行ない、両者の共局
在を調べた。TRP 抗体による染色にはチラミ
ド増感法を用いた。

4. 研究成果

(1)、冷痛覚行動試験の改良と持続性炎症 時の冷痛覚過敏への TRP の関与の検討 -

コールドプレート実験装置を自作し、健常
ラットでの冷痛覚行動が明瞭に観察できる
よう、温度・測定時間・動物を入れるアクリ
ルケージのサイズ等の至適条件を検討した。
動物の立ち上がりを防ぐように高さを制限
したケージを用いて、5°C、0°C、-3°C、-5°C
のプレート温度で、6 分または 3 分の測定時
間を設定し比較したところ、プレート温度
-3°C、測定時間 3 分の場合に、明瞭で適度な

頻度の痛み行動が観察された。5°C、6 分ある
いは 0°C、6 分では、明瞭な痛覚行動を示さ
ない個体が多かった。一方、-5°C、3 分では
痛み行動の頻度が高過ぎ、組織傷害の危険性
も増すため、病態の違いによる冷痛覚行動の
変化を検出するには不適當であると判断し、
-3°C、3 分の条件でコールドプレートテスト
を実施することとした。

持続性炎症を惹起したアジュバント単関
節炎モデルラットにおいて冷痛覚の変化を
観察した。炎症誘発後の 2-3 週後の持続性
炎症期に、冷痛覚の増悪が見られた。この際、
冷アロディニア(通常痛みを感じない温度域
での冷痛覚)だけでなく、冷痛覚過敏(通常
冷痛覚を引き起こす温度での痛覚レベルの
増悪)が生じていることが明らかとなった。

持続性炎症期(アジュバント接種後 14 日)
の DRG ニューロンでは、TRPM8,TRPA1 の
アゴニストに感受性を示す細胞の割合が有
意に増加しており、これらが冷痛覚過敏に関
与している可能性が示唆された。しかし、こ
の時期の DRG における TRPM8 と TRPA1
イオンチャネルの発現量を RT-PCR 法によ
り調べたところ、両者共に明瞭な発現量の変
化は観察されなかった。本病態の冷痛覚過敏
は、これら TRP の mRNA の増加ではなく、
タンパク質翻訳以降の発現調節または機能
修飾を介している可能性が考えられた。

(2)、培養 DRG ニューロンの温度感受性と 発現 TRP 受容体との相関 -

細胞内カルシウムイメージング法により
ラット・マウスの DRG ニューロンと、
HEK293 培養細胞異所発現系において、温度
感受性 TRP の温度応答への関与を薬理的
に検討した。侵害的冷受容体候補である
TRPA1 の活性化剤(マスタードオイル)へ
の応答と冷応答の間の相関は、TRPA1 発
現 HEK293 細胞では強くみられたものの、
培養 DRG ニューロンにおいては明瞭ではな
かった。また、高温感受性の TRPV2 に関
して、その活性化剤である Probenecid へ
の感受性と熱応答との相関は、両細胞系と
もで低かった。このように、DRG ニュー
ロンにおいてはこれらの TRP 分子だけでは
侵害的温度的受容機能には十分ではないこと
が示唆された。これらの TRP タンパク質は
分子の特性あるいは細胞環境に応じて、潜
在的には温度感受性を有するが、知覚ニュー
ロンでの温度受容には関与していないか、あ
るいは他の補助因子が必要である可能性が
考えられた。

次いで全細胞パッチクランプ法を用いて、
既知の TRP 阻害剤の中で、TRPV2 の熱応
答を阻害する物質を検索した。異所的に
TRPV2 を発現させた HEK293 細胞におい
て約 50°C の高温刺激による活性化電流を
阻害する物質を調べたところ、ガドリニウ
ムイオ

ンの抑制効果が最も高かった。そこで、このガドリニウムイオンを用いて、ラット DRG ニューロンの高温応答が阻害されるかどうかを検討したところ、完全ではないものの有意な高温電流の抑制が確認され、ガドリニウム感受性の因子の関与が示唆された。しかしながら、本実験で高温感受性が確認できた培養 DRG 細胞について、TRPV2 タンパク質の発現を免疫細胞化学的に調べたところ、そのほとんどが抗 TRPV2 抗体陰性であり、高温応答と TRPV2 タンパク質発現との間に相関が見られなかった。このように、DRG 細胞の高温応答においては、TRPV2 以外のガドリニウム感受性の別のタンパク質が関わっている可能性が示唆された。

(3) 免疫組織化学的な高温感受性ニューロンの同定と TRPV1, V2 との共局在の解析 - 深麻酔下のマウス生体を用いて、後肢への高温刺激後に一過性の pERK 陽性を示す高温感受性 DRG ニューロンを免疫組織化学的に同定した。野生型マウスにおいては、皮膚温レベルの 32°C の熱刺激後で約 4.7% の DRG ニューロンが pERK 陽性を示したが、60°C の熱刺激後には 24.4% もの DRG ニューロンで pERK が観察され、これらが熱感受性ニューロンであると考えられた。その大部分は小型ニューロンであった。さらに主に中型～大型ニューロンに属する抗 TRPV2 抗体陽性細胞においては、熱刺激による pERK 出現頻度は低かった。もう 1 つの熱受容体である TRPV1 の遺伝子欠損マウスにおいても同様に調べたところ、60°C 熱刺激後の pERK は DRG ニューロンの 10% 以下の細胞でしか観察されず、しかもそのほとんどが抗 TRPV2 抗体に陰性であった。このことから、野生型マウスの高温感受性 pERK 陽性細胞は、その多くが TRPV1 発現ニューロンであると考えられた。一方、TRPV1・V2 陰性の細胞で高温感受性を示す細胞が DRG に少なからず存在することが明らかとなった。さらに、この細胞は概ね小型のニューロンであった。

以上の結果から、侵害的温度受容体の強力な候補とされていた既知の温度感受性 TRP チャンネルだけでは、侵害受容体の温度受容を十分に説明できず、TRP に依存しない他の温度受容の仕組みの存在が明らかとなった。さらに、高温依存性の pERK を指標として、高温受容に関わる知覚神経細胞をマウス脊髄後根神経節中に同定した。今後、この高温感受性細胞の組織化学的なキャラクター化と生理機能の解析を行うことで、責任温度受容体を含めた侵害的温度受容のメカニズムに迫って行くことが可能であると考えられる。

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 2 件)

- ① Mandani S, Sokabe T, Shibasaki K, Katanosaka K, Mizuno A, Moqrich A, Patapoutian A, Fukumi-Tominaga T, Mizumura K, Tominaga M, TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP., *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 458(6):1093-1102, 2009, (査読あり)
- ② Mizumura K, Sugiura T, Katanosaka K, Banik RK, Kozaki Y, Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: What do we know? *Experimental Brain Research* 196(1): 53-65, 2009, (査読なし)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Katanosaka K, Ota T, Hirose T, Mori K, Mizumura K, The chemical sensitivities and expression of cold-sensitive ionchannels in sensory neurons in the persistently inflamed rat., The 8th International Congress on Comparative Physiology and Biochemistry, June 2-4, 2011, Nagoya Congress Center (Nagoya, JAPAN)
- ② Murase S, Ota H, Katanosaka K, Kubo A, Queme F, Matsuda T, Taguchi T, Mizumura K, Role of TRPV1 in mechanically induced pain., International Symposium on Mechano-biology (The Fifth Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular biology), Nov. 5, 2011, Huashia Hotel (Shanghai, CHINA), (招待講演)
- ③ Nasu T, Katanosaka K, Mizumura K, Sex difference of repeated cold stress (RCS)-induced cutaneous and muscular mechanical hyperalgesia in rats., 第 87 回日本生理学会大会, 2010.5.20, 盛岡市民文化ホール (盛岡)
- ④ 那須輝顕, 片野坂公明, 水村和枝, 繰り返し寒冷ストレスによる機械痛覚過敏における性差, 第 49 回日本生気象学会大会, 2010.11.5, 文化女子大学 (東京)
- ⑤ Kozaki Y, Suzuki Y, Katanosaka K, Mori M, Mizumura K, プロスタグランジンは EP3 受容体を介して、内在化したブラジキニン B2 受容体のリサイクリングに作用する可能性がある, 第 33 回日本神経科学会 (Neuro 2010),

2010.9.2-4, 神戸コンベンションセンター (神戸)

- ⑥ 小崎康子, 鈴木義明, 片野坂公明, 森雅美, 水村和枝, プロスタグランジン EP3 受容体の活性化による内在化ブラジキニン B2 受容体の細胞膜へのリサイクリングの促進, 日本薬学会第 130 年会, 2010.3.28-31, 岡山コンベンションセンター (岡山)
- ⑦ Katanosaka K, Ota T, Hirose T, Mori K, Mizumura K, Behavioral hypersensitivity to noxious cold and functional changes of DRG neurons of the rats suffering from persistent joint inflammation., The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009), Jul. 29, 2009, Kyoto International Conference Center (KYOTO, JAPAN)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片野坂 公明 (KATANOSAKA KIMIYAKI)
名古屋大学・環境医学研究所・助教
研究者番号：50335006

(2) 研究分担者

片野坂 友紀 (KATANOSAKA YUKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科
・助教
研究者番号：60432639
(H21-H22)

(3) 連携研究者

水村 和枝 (MIZUMURA KAZUE)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号：00109349

田口 徹 (TAGUCHI TORU)
名古屋大学・環境医学研究所・助教
研究者番号：90464156

片野坂 友紀 (KATANOSAKA YUKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科
・助教
研究者番号：60432639
(H21-22：研究分担者)