

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 29 日現在

機関番号：33910

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15204

研究課題名(和文) 熱性疼痛の末梢機構解明にむけた高温感受性一次感覚ニューロンの同定と単離手法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the way to identify and isolate the heat-sensitive primary sensory neurons for understanding the peripheral mechanisms of heat pain.

研究代表者

片野坂 公明 (KATANOSAKA, Kimiaki)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号：50335006

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)：侵害受容器で見られる熱依存的なERKリン酸化反応を利用して、50以上の高温感受性をもつ一次感覚ニューロンの同定を試みた。TRPV1欠損マウスのDRGでは、pERK陽性細胞は概ね50以上の熱刺激により出現したことから、これらが高温特異的なニューロンだと考えられた。その多くはCGRP陽性のペプチド作動性ニューロンであり、IB4陰性であった。さらに、培養DRGニューロンを用いて、50以上に温度閾値を持つ細胞を調べたところ、すべてが抗TRPV2抗体に陰性であった。以上より、pERKを指標に特定の刺激感受性を持つ侵害受容性ニューロンの同定に成功し、未知の高温感受性ニューロンの特徴が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this research, we utilized heat-dependent phosphorylation of ERK kinase in nociceptive primary sensory neurons, to explore an unknown heat-sensitive neuron that detects noxious heat higher than 50 degree C. In DRG neurons of TRPV1-KO mice, phosphorylated ERK (pERK) was emerged after heat stimuli over 50 degree C, suggesting that these neurons would be the nociceptors specific to intensive heat. A substantial part of these pERK-positive neurons in TRPV1-KO mice were CGRP-positive peptidergic neurons, but IB4-negative. In addition, all of the cultured DRG neurons that exhibited heat threshold higher than 50 degree C were completely TRPV2-negative as far as we examined. As shown in these results, using pERK as an indicator of nociceptor activation, we succeeded in identification of a certain type of nociceptor specialized to detect a particular stimulus. And thus, we have finally identified and characterized the intensive heat-sensitive nociceptor, which is independent of TRPV1 and V2.

研究分野：疼痛学、感覚生理学、神経生理学

キーワード：温度受容体 熱痛覚 一次感覚ニューロン 侵害受容器 TRPV1 TRPV2 CGRP DRG

1. 研究開始当初の背景

これまでに、一次感覚ニューロンに発現する高温受容体タンパク質が幾つか同定されているが、既知の受容体だけでは、50°C以上の高温で生じる鋭い痛みを説明できず、熱性疼痛の分子機構は依然として謎である。

温度感受性 TRP(transient receptor potential)イオンチャネルである TRPV1 と V2 は、それぞれ小型(C線維)と中型(A δ 線維)の一次感覚ニューロンに局在し、各々が 43°C および 52°C の高温で開く。この温度は、ヒトの熱痛覚の主観的閾値とよく一致することから、両イオンチャネルは、侵害受容器(痛覚に関わる一次感覚ニューロン)において熱痛覚を担っている温度受容体だと考えられてきた。現在、TRPV1 は生理的な熱痛覚及び炎症痛への関与が示されているが、その遺伝子欠損マウスにおいても熱逃避行動や侵害受容器の熱応答が完全には消失せず、他の熱受容機構の存在が示唆されていた(Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000)。発見当初、もう一つの熱痛覚受容体と考えられた TRPV2 については、申請者らを含む二つのグループにより遺伝子欠損マウスの熱痛覚行動が正常であることが示され、現在では熱性疼痛への関与は否定的に捉えられている(Park *et al.*, 2011; Katanosaka *et al.*, 日本生理学会大会, 2014)。本研究の開始当時、TRP チャネルの 1 種である TRPM3 や、Ca²⁺ 感受性クロライドチャネルの ANO1 が温度感受性を有し、熱痛覚に関与すると報告されたが、これらの遺伝子欠損マウスでも高温感受性は部分的に残存していた(Vriens *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2012)。加えて、TRPM3 と ANO1 は一次感覚ニューロンに広範に発現し、高温受容に関与するとされる中型細胞に限局しておらず、その閾値温度も 45°C 付近と高温熱痛覚の閾値(52°C)よりも低いことから、50°C 以上の高温での痛覚を担う侵害受容器とその熱受容体は明らかになっていなかった。

一方、侵害受容器の活動に依存して、ERK (Extracellular signal regulating kinase)等の MAPK (Mitogen-activated protein kinase)に一過性のリン酸化が生じることが、兵庫医療大学の戴博士らにより報告されている(Dai *et al.*, 2002)。さらにこれとは別に、感覚器に多く発現する TRP チャネルや機械感受性チャネルにおいて、比較的大きなサイズのスチリル系蛍光色素等を活動依存的に通過させるものが知られている(Meyers *et al.*, 2003)。そこで我々は、本研究において、これらの神経活動依存的なリン酸化反応と、チャネルの色素透過性を応用して、高温の熱痛覚に関与する一次感覚ニューロンを同定することを試みた。さらに、同定した細胞での発現分子の解析から、熱痛覚のメカニズムの理解を目指した。

2. 研究の目的

免疫組織化学的手法と生理学的手法を組み合わせた新たな実験手法を取り入れることにより、現在理解の進んでいない 50°C 以上の高温による熱痛覚を担う一次感覚ニューロン(侵害受容器)を同定し、熱痛覚のメカニズムの一端を理解することを目的とした。この手法により、一次感覚神経というヘテロな細胞集団の中から、特定の生理機能を担う神経細胞を見いだすことを可能にし、これをモデルケースとして、他の痛覚受容体研究への応用を目指した。

具体的には、以下の 3 つの実験により、新たな高温感受性ニューロンを特定し、その特徴を明らかにすることを目的とした。

- (1), 高温感受性一次感覚ニューロンの同定
- (2), 高温感受性一次感覚ニューロンの細胞タイプの分類
- (3), 生きた状態での高温感受性一次感覚ニューロンの同定

3. 研究の方法

(1), 研究方法の概要

①, 高温感受性一次感覚ニューロンの組織化学的同定: 神経活動依存的なマーカーの一つであるリン酸化 pERK を指標として、新しい高温感受性ニューロンを同定した。

②, 高温受容感受性一次感覚ニューロンでの発現分子の解析: 同定した高温感受性ニューロンがどのようなタイプの細胞なのかを明らかにするため、蛍光二重染色による神経特異的分子の発現解析を実施した。

③, 高温感受性ニューロンの生細胞の同定と単離: 脊髄後根神経節(DRG)から分散培養した一次感覚ニューロン(以後 DRG ニューロン、DRG 細胞)において、高温での神経活動依存的な蛍光色素の取込みの有無を検討した。

④, 高温感受性ニューロンの生細胞の機能的同定と発現受容体の解析: 培養 DRG ニューロンからのパッチクランプ記録により、高温熱刺激に対する電流応答がみられた細胞を固定した後、蛍光免疫染色を行うことにより、TRPV2 の発現を調べた。

(2), 実験方法

①, 動物:

C57Bl6/J マウス(WT)、および TRPV1 knock-out マウス(KO)の雄の成獣(2-4 ヶ月齢)を用いた(チャールズブリバーより購入)。全ての動物実験は、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と動物の苦痛の軽減に最大限配慮して実施した。

②, 免疫組織化学:

Dai(2002)ら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の温水に漬け、2 分間の熱刺激を行い(10 s 浸漬・10 s 休憩を 6 回)、直後に 1%パラホルムアルデヒド 10 ml、および 4%パラホルムアルデヒド 20 ml による急速灌流固定を行なった。熱刺激終了後、灌流開始までは 2-3 分とした。単離した腰部 DRG(L4-6)を OCT コンパウンドに包埋して凍結切片(厚さ 10 μ m)を作成し、各種の一次感覚神経マーカー分子に対する一次抗体または蛍光標識レクチン (抗 TRPV2 抗体、抗 CGRP[カルシトニン遺伝子関連ペプチド]抗体、抗 TrkA 抗体、IB4-Alexa488 等) と抗 pERK 抗体による蛍光二重染色を行ない、両者の共局在を調べた。抗体の交叉反応を減らすため、蛍光二重染色での神経マーカー抗体による染色には、非常に低濃度の抗体(1:10,000~100,000)を用いて、チラミドシグナル増感法(TSA 法)により増感し FITC で染色した。その後、抗 pERK 抗体(1:200)、次いで Alexa555 標識 2 次抗体で染色し、蛍光顕微鏡 BZ-9000(Keyence)で観察した。

③, マウス DRG 細胞の初代培養:

マウスの DRG を無固定で単離し、コラゲナーゼおよびトリプシン処理後、機械的に神経細胞を分散させた後、B27supplement と神経成長因子(NGF) 100 μ g/ml を添加した Neuro basal-A 培地(Invitrogen)で 1-2 日間培養した。

④, 細胞への蛍光色素の取込み:

TRPV1KO マウスの DRG 初代培養細胞を、スチリル系蛍光色素 AM1-43 を含む HEPES-Ringer 液に浸し、37, 50, 55°Cの温水槽で 3-10 分間保温した。その後、HEPES-Ringer 液でリンスし、4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定後、蛍光顕微鏡により観察した。

⑤, パッチクランプ法:

マウス DRG 細胞の熱応答は、全細胞パッチクランプにより、-60 mV の電位固定下で記録した。細胞の温度刺激は、自作の急速局所灌流装置に改良を加えて、高温の細胞外液の灌流により約 1.5 秒間で細胞近傍の温度が 52°Cに安定して達することを確認後使用した。温度変化は、細胞から 100 μ m 以内に設置した微小熱電対により測定した。

4. 研究成果

(1), 高温感受性一次感覚ニューロンの組織化学的同定: 後肢に異なる温度の熱刺激 (32, 40, 45, 50, 55, 60°C) を与えた直後のマウス

を急速固定し、抗 pERK 抗体を用いた蛍光免疫染色により、WT マウスと TRPV1-KO (以後 KO) マウスの DRG での pERK 陽性細胞を比較した。WT, KO ともに、32°Cでは pERK 陽性 DRG 細胞の割合が低く、それ以上の温度では pERK 陽性細胞の比率に温度依存性が見られたことから、神経活動に依存して出現する pERK が DRG 細胞の熱応答の指標となることが確かめられた。WT では 40-50°Cで 11.6-12.4%、45-60°Cでは 23.7-26.5%の細胞が pERK 陽性であった。一方 KO では、pERK 陽性細胞の割合は 45°C以下で 1.3-1.8%と低く、50-60°Cで 8.4-13.3%と優位に高くなった。以上の結果より、40-45°Cの pERK 陽性細胞は、TRPV1 依存性の熱感受性細胞であること、KO で見られる pERK 陽性細胞は 43°Cの熱受容体である TRPV1 に依存しない高温感受性細胞であり、その反応温度は 50-60°Cであることが明らかとなった。我々が目的とする 50°C以上の高温に応答する細胞であり、高温での熱痛覚に関与する可能性が考えられた。

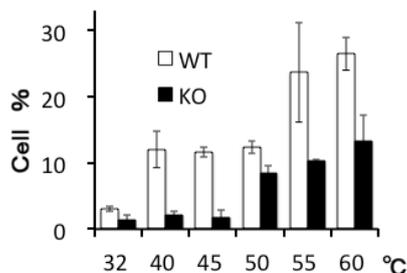


図 1, 異なる温度の熱刺激後の pERK 陽性 DRG 細胞の割合: WT と TRPV1-KO (KO) の比較 (平均 \pm SD, n=4)

(2), 高温受容感受性一次感覚ニューロンの発現分子の解析: 同定した高温感受性ニューロンの細胞タイプを調べるため、TRPV1-KO マウスで 60°Cの熱刺激により出現する pERK 陽性 DRG 細胞 (TRPV1 非依存性の高温感受性細胞) の蛍光二重染色を行った。その結果、KO マウスの pERK 陽性細胞のうち、CGRP 陽性率が 76.8 \pm 6.8%と高値であり (図 2)、IB4 陽性率は 25.8 \pm 5.9%であった (n=4)。神経成長因子受容体の一つである TrkA や、ANO1 等の温度感受性受容体の陽性率についても同様に調べたが、信頼に足る免疫染色像は得られていない。上記の結果から、50°C以上の高温感受性ニューロンには、神経ペプチドである CRRP 含有細胞が多く含まれ、IB4 陰性のものが多いことが明らかとなった。

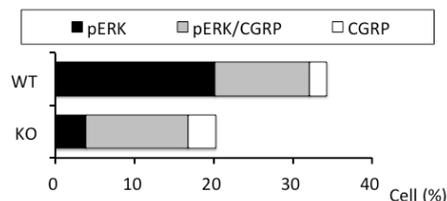


図 2, 60°C熱刺激後の DRG での pERK, CGRP 各陽性細胞の割合 (pERK/CGRP は二重陽性, 平均値, n=4)

CGRP 陽性 IB4 陰性の細胞群には、TRPV1 を発現し、43°C 程度の比較的穏やかな熱で活性化する C 線維侵害受容器が含まれることが知られている。TRPV1 を欠損したマウスで、この細胞群に高温熱応答が見られるということは、50°C 以上の高温熱受容の仕組みが TRPV1 と共存している可能性も考えられる。今後のさらなる解析が必要である。

(3), 高温感受性ニューロンの生細胞の同定と単離の試み: TRPV1-KO マウスから単離培養した DRG ニューロンへの高温刺激による AM1-43 の取り込みの検討では、細胞形態の異常な細胞や死細胞が、色素で染色されたのみであった。いくつかのプロトコル変更 (時間や温度) を試したが、生細胞への色素取り込みは観察できなかった。色素取り込みが報告されている TRPV1 とは異なり、本研究でターゲットとしている高温受容体は色素取り込み能を有していない可能性がある。

(4), 高温感受性ニューロンの生細胞の機能的同定と発現受容体の解析: WT マウスの培養 DRG ニューロンからのパッチクランプ記録により、50°C 以上に閾値を持つ高温感受性細胞を 10 個得た。そのうち、抗 TRPV2 抗体陽性細胞は 0 個であった。TRPV2 は DRG ニューロンの高温感受性に寄与しないことが示唆された。

(5), まとめと展望

以上の実験により、50°C 以上の熱に反応する高温感受性ニューロンの多くは、CGRP を含有するペプチド作動性ニューロンであり、侵害受容器の特徴を有することが明らかとなった。また、本研究では限られた細胞を対象としているものの、特定の刺激に反応する細胞のみを標識できる今回の方法 (pERK を指標とした神経標識) が、一次感覚ニューロンというヘテロな細胞集団のマス解析において有効な手法であることを示した。

今後、化学固定された細胞での解析だけでなく、生細胞においても高温感受性をもつ細胞集団の同定と単離を進め、熱刺激の受容・情報変換に関わる分子の特定へとつなげていきたい。

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 3 件)

①, Hayashi, K., Katanosaka, K., Abe, M., Yamanaka, A., Nosaka, K., Mizumura, K., Taguchi, T., Muscular mechanical hyperalgesia after lengthening contractions in rats depends on stretch velocity and range

of motion., *European Journal of Pain* 21 (1):125-139, (2017), (査読有), DOI: 10.1002/ejp.909.

②, Takagishi, Y., Katanosaka, K., Mizoguchi, H., Murata, Y., Disrupted axon-glia interactions at the paranode in myelinated nerves cause axonal degeneration and neuronal cell death in the aged Caspr mutant mouse shambling., *Neurobiology of Aging* 43:34-46, (2016), (査読有) DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2016.03.020

③, 片野坂公明、水村和枝、温度感覚と熱痛覚の末梢メカニズム、中部大学生命健康科学研究科紀要 Vol. 11 (2015)、(査読有), URL: http://www3.chubu.ac.jp/research_life_health/

[学会発表] (計 5 件)

①, Wakatsuki, K., Matsubara, T., Katanosaka, K., Yamanaka, A., Nishijo, H., Mizumura, K., Taguchi, T., Peripheral pain mechanisms via neurotrophic factors in a rat reserpine-induced fibromyalgia model., 第 94 回日本生理学会大会、2017 年 3 月 30 日、アクトシティー浜松 (静岡県・浜松市)

②, Katanosaka, K., Takatsu, S., Mizumura, K., Naruse, K., Katanosaka, Y., The role of transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) in mechanosensation of adult mice., 日本比較生理生化学会第 38 回大会、2016 年 9 月 2-3 日、玉川大学 (東京都・町田市)

③, 水村和枝、林 功栄、片野坂公明、田口徹、伸張性筋運動は筋損傷を伴わずに筋細胞/衛生細胞の痛覚感作物質産生を増大させ、遅発性筋痛を生じる。第 2 回日本筋学会学術集会、2016 年 8 月 5-6 日、国立精神・神経医療研究センター (東京都・小平市)

④, Hayashi, K., Katanosaka, K., Abe, M., Yamanaka, A., Mizumura, K., Taguchi, T., Nerve growth factor-mediated mechanism, but not muscle damage, is required for the induction of delayed onset muscle soreness in rats., 第 38 回日本神経科学学会、2015 年 7 月 28 日、神戸国際会議場・国際展示場 (兵庫県・神戸市)

⑤, Katanosaka, Y. and Katanosaka, K. TRPV2 is crucial for cardiac structure and function Gordon Research Conferences, Muscle: Excitation-Contraction Coupling. 2015.6.3-4, Newly, ME (USA)

〔図書〕（計 1 件）

①, 片野坂公明、水村和枝：化学同人、「メカノバイオロジー 細胞が力を感じ応答するしくみ (DOJIN BIOSCIENCE SERIES)」、曾我部正博編、第 16 章 痛みのメカノバイロロジー：機械刺激と痛み、pp. 203-216、2015

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chubu.ac.jp/about/faculty/profile/e38e3bb33c48f5abf808a528fe9137979809b01f.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片野坂 公明 (KATANOSAKA, Kimiaki)
中部大学・生命健康科学部・准教授
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

(3) 研究協力者

日比野 雄平 (HIBINO, Yuhei)
中部大学大学院・生命健康科学研究科・
大学院生 (M1)

清水 理絵 (SHIMIZU, Rie)
中部大学・生命健康科学部・研究補助員