

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03933

研究課題名（和文）末梢感覚神経レベルでの疼痛緩和システムの解明

研究課題名（英文）Analysis of pain relief systems at peripheral sensory nerves

研究代表者

北村 直樹（KITAMURA, Naoki）

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：80301951

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,700,000円

研究成果の概要（和文）：末梢感覚神経レベルでアドレナリン作動系とTRPV1の機能的連関により疼痛抑制が生じるか検討した。ラット後肢足底に投与したcapsaicinによる疼痛行動量は同箇所投与したnoradrenaline (NA)やclonidineにより減少したが、反対側に投与した場合には無効であった。一次感覚神経には α_2 受容体とTRPV1が共発現していることが免疫組織化学により明らかになった。単離した感覚神経の細胞体で生じるcapsaicin反応はNAやclonidineにより強力に抑制された。

一次感覚神経繊維の末梢端での α_2 受容体によるTRPV1活性抑制が疼痛抑制の基盤機構となっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Clonidineなどの α_2 作動薬が鎮痛作用を示すことが知られていたが、その作用機序は不明であった。脊髄にはnoradrenalineに依る下降性疼痛抑制系という疼痛緩和システムが備わっており、 α_2 作動薬もこれに作用すると考えられてきた。しかし本研究により、末梢感覚神経のレベルで α_2 受容体の活性化が、侵害受容神経繊維において痛み刺激を受容するとされているTRPV1チャネルの活性を抑制することで、末梢性に鎮痛作用を示しうることが明らかとなった。 α_2 作動薬の主な作用は中枢性の鎮静作用であるが、末梢性の鎮痛作用が明らかになったことは、臨床上の薬物の選択や投薬方法の戦略構築の一助となる成果である。

研究成果の概要（英文）：We examined whether functional associations between adrenergic systems in peripheral sensory systems and TRPV1 caused analgesia. Although, nociceptive behaviors induced by capsaicin injected into rat hind paws were reduced by noradrenaline (NA) and clonidine, a selective α_2 agonist, injected into the same site, they were not affected when adrenergic agents were injected into contralateral hind paws. Immunohistochemical experiments revealed α_2 receptors and TRPV1 were co-expressed in the cell body of the primary sensory neurons. Electrophysiological capsaicin responses observed in isolated primary sensory neurons recorded by the patch clamp method were extensively inhibited by NA and clonidine, and these effects were inhibited by yohimbine, a selective α_2 antagonist.

These results suggest that inhibition of TRPV1 activity by α_2 adrenoceptors on sensory peripheral nerve terminals causes the analgesic effect.

研究分野：神経生理学

キーワード：疼痛 鎮痛 アドレナリン作動系 TRPV1 noradrenaline clonidine capsaicin 末梢神経

1. 研究開始当初の背景

生体にとって痛みを感知することは、有害な刺激から生命を守るために非常に重要である。脊椎動物において、皮膚で感知された痛み信号は一次感覚神経によって脊髄まで伝えられ、脊髄背角で二次神経に伝達される。そしてこの情報は脊髄内の伝導路を上行して視床を経て大脳皮質の感覚野に投射し、「痛み(疼痛)」として認識される。また、生体にはこのような疼痛を感知する機構に加えて、その痛みを「緩和する機構」も備わっている。中枢神経系にある下降性疼痛抑制系(descending antinociceptive system, DAS)は痛み緩和機構の代表例であり、5-HTやnoradrenaline (NA)はこの機構を仲介する神経伝達物質である。5-HTやNAは脊髄背角で一次感覚神経の中枢末端と二次感覚神経の細胞体に作用することが報告されている。NAは脊髄背角に伸長している一次感覚神経の中枢端に発現している α_2 アドレナリン受容体に作用し、一次感覚神経繊維からの興奮性神経伝達物質の放出を抑制し、鎮痛効果を発揮する。一方、末梢組織では、 α_2 受容体作動薬であるclonidineの局所投与により熱刺激によって誘発された疼痛関連行動が抑制されること、 α_2 受容体拮抗薬であるyohimbineがclonidineの鎮痛作用を阻害することが報告されている。副腎髄質においては血中にNAとadrenalineが分泌されること、皮下にアドレナリン作動性神経繊維が分布していることを踏まえると、アドレナリン作動系が末梢神経組織レベルにおいても鎮痛作用を発揮している可能性が考えられる。しかし、この現象の基盤となる機構は不明である。

2. 研究の目的

体表面において痛みの原因となる侵害刺激を受容する分子の代表例として非選択性陽イオンチャネルであるTransient receptor potential subfamily V, member 1 (TRPV1)が挙げられる。ラット背根神経節ニューロンの細胞体において、TRPV1活性化薬であるcapsaicinにより誘発される電流応答を α_2 受容体の活性化が抑制すること、一次感覚神経中枢端からのcapsaicin誘発性の神経伝達物質の放出が α_2 受容体の活性化により抑制されること、その細胞内機構がカルモジュリン依存性キナーゼIIに依存していることが報告された。しかしながら、脊椎内にある一次感覚ニューロンの細胞体で観察されたこのような現象が一次感覚神経末梢端の局所でも生じるかは不明である。本研究では、末梢感覚神経繊維レベルで局所性に α_2 受容体を介したTRPV1の抑制が生じ、その結果として鎮痛作用を発揮するかを行動学的実験によって、そしてその相互作用の詳細な機構を電気生理学的実験、生化学的実験、免疫組織化学的実験により検討した。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

全ての動物実験を鳥取大学のガイドラインに則り実施した。本研究では7-10週齢の雄性ウィスター系ラットを用いた。ラットは室温22-24℃、12時間の明暗周期に制御された飼育室で、摂食、飲水が自由な環境で飼育した。

(2) 疼痛関連行動の計測

ラットの後肢、足底にcapsaicin (250 pmol)を投与し、投与後10分間に示した疼痛関連行動の時間を計測した。Capsaicin投与は1日空けて2回行い、2回目の投与は選択的 α_2 受容体アゴニスト(clonidine)またはTRPV1抑制薬(capsazepine, JNJ-17203212)を処置した上で行った。Capsaicinテストの他、Hargreave'sテストにより熱刺激に対する応答性、ホルマリンテストによりホルマリンに対する応答性についても検討した。

(3) リアルタイムRT-PCRによる α_2 受容体mRNAの定量

ラット背根神経節よりmRNAを抽出し、cDNAに逆転写してリアルタイムPCRを行った。内因性対照としてGAPDHを用いて、 α_{2A} 、 α_{2B} 、 α_{2C} アドレナリン受容体のmRNAレベルを $\Delta\Delta Ct$ 法により比較定量した。

(4) 免疫組織化学による α_2 受容体とTRPV1の発現解析

ラット背根神経節組織のパラフィン包埋切片を作製し、抗 α_{2A} 抗体、抗 α_{2C} 抗体を用いて免疫染色を行った。 α_2 受容体を検出した切片の連続切片に対して抗TRPV1抗体を用いた免疫染色を行

い、各 α_2 受容体とTRPV1が共発現しているかを検討した。

(5) 電気生理学的実験によるTRPV1活性の計測

ラット背根神経節より酵素処理により細胞を単離して3-7日間培養した後に、パッチクランプ法による全細胞電位固定記録により細胞膜電流を計測した。TRPV1の活性は保持電位-60 mVでcapsaicin (1 μ M)により生じる内向き電流の振幅を基準に評価した。Capsaicin反応は反復刺激により徐々に振幅が減少する脱感作反応を示すため、1回目の反応の振幅に対する2回目の反応の振幅の相対値を基準に、各種 α_2 アゴニストの作用を評価した。

4. 研究成果

(1) 疼痛関連行動に対するclonidineの局所性作用

ラットの後肢足底にcapsaicin (250 pmol)を投与したところ、およそ10分間にわたって疼痛関連行動を示した。翌日に反対側の後肢に同量のcapsaicinを投与した場合の行動量に差は見られなかったため、1日目の行動量を対照として、2日目の各種薬物存在下での行動量を評価した。Clonidine (50 nmol)ならびに、TRPV1抑制薬であるcapsazepine (5 nmol)、JNJ-17203212 (5 nmol)を、capsaicinを投与した側の足底に投与した後のcapsaicin反応は有意に小さかった(図1A,C)。また、clonidineとcapsazepineまたはJNJ-17203212を併用した場合の疼痛関連行動量はそれぞれを単独で投与した場合と有意差はなかった(図1D)。Clonidineをcapsaicinとは反対側の足底に投与した場合には、capsaicin誘発性の行動量に差は見られず、clonidineの鎮痛作用は片側性であった(図1B)。

Hargreave'sテストにより熱刺激に対する応答性を検討したところ、clonidineとcapsazepineは片側性に熱刺激に対する反応を減弱させた。

足底に投与したホルマリンは投与直後の15分に第1相、それ以降に第2相の疼痛反応を示す。ホルマリンを投与した側の反対側にclonidine (25 nmol)またはcapsazepine (30 nmol)を投与しても、第1相反応の量に差は無かったが、同側に投与したところいずれの場合にも疼痛関連行動量が有意に減少した。

これら一連の成績は、clonidineが片側性に三種類の刺激による疼痛関連行動を抑制することを示しており、clonidineにより活性化される一次感覚神経の末梢端の α_2 アドレナリン受容体の活性化がTRPV1の活性化に起因した疼痛に対する鎮痛作用に関わっていることを示唆している。

(2) 背根神経節組織に発現する α_2 受容体サブタイプ

3つの α_2 アドレナリン受容体(α_{2A} 、 α_{2B} 、 α_{2C})のうち、どのサブタイプの受容体が背根神経節に優勢に発現しているのかをリアルタイムRT-PCRにより相対的に検討した。GAPDHを内部標準として計算した Δ Ct値は α_{2C} が最も小さく、以降 α_{2A} 、 α_{2B} の順で小さかった。 α_{2C} 受容体と比較した場合の α_{2A} と α_{2B} の Δ Ct値はそれぞれ 3.21 ± 0.31 (n = 8)、 6.24 ± 0.26 (n = 8)であった(平均値 \pm 標準誤差)。この成績は背根神経節に最も優勢に発現しているmRNAは α_{2C} 受容体であり、 α_{2A} 受容体がそれに続くものであることを示している。

(3) 一次感覚ニューロンにおける α_2 アドレナリン受容体とTRPV1の共発現

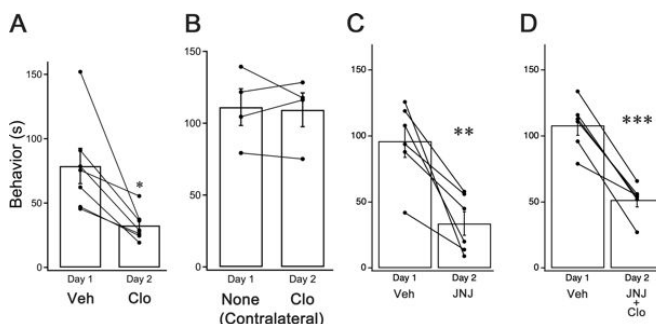


図1 Capsaicinに対する疼痛関連行動に対するclonidineとJNJ-17203212の作用

(A) Clonidineはcapsaicin反応を有意に減弱させた。(B) Capsaicinとは反対側に注射したclonidineは影響なしだった。(C) JNJ-017203212 (JNJ)はcapsaicin反応を有意に減弱させた。(D) ClonidineとJNJを併用しても抑制作用に差は見られなかった。

ラット背根神経節組織から連続パラフィン切片を作製し、抗 α_{2A} 抗体、抗 α_{2C} 抗体、抗TRPV1抗体を用いた免疫染色を行った。背根神経節ニューロンはその細胞体のサイズに応じて、小型、中型、大型に分類される。明瞭なTRPV1様の免疫原性は小型と中型のニューロン細胞体で確認された(図2A左、B左)。 α_{2A} と α_{2C} アドレナリン受容体様免疫原性も小型と中型と細胞体に見られた(図2B右、A右)。また、TRPV1と α_{2A} 受容体、TRPV1と α_{2C} 受容体の免疫原性像はそれぞれ同一のニューロン細胞体で検出された。抗 α_{2B} 抗体を用いた染色も行ったが、十分な免疫陽性像は確認出来ず、発現密度が他のサブタイプと比較して非常に低いと考えられた。これらの成績は、一次感覚神経において、TRPV1と α_{2C} あるいは α_{2A} アドレナリン受容体が共発現していることを示しており、末梢神経繊維末端においても同様にTRPV1と2種の α_{2} 受容体と同じ神経繊維に発現している可能性を示唆している。

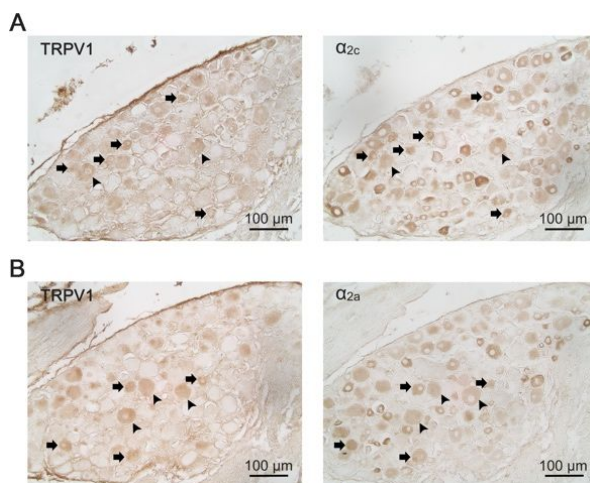


図2 一次感覚神経節(背根神経節)におけるTRPV1、 α_{2A} 、 α_{2C} 受容体の免疫染色像
TRPV1(A左、B左)、 α_{2A} (B右)、 α_{2C} (A右)の免疫応答性をDABで可視化した。矢印:陽性の小型ニューロン。矢頭:陽性の中型ニューロン。

(4) 細胞レベルでのTRPV1と α_{2} アドレナリン受容体の機能的連関

ラット背根神経節より単離し培養したニューロンからパッチクランプ法による全細胞電位固定記録により電流応答を記録した。ニューロンを-60 mVに電位固定し、capsaicin (1 μ M)によりTRPV1を活性化したところ、一部の細胞では陽イオンの細胞内への流入を反映する内向き電流が誘発された。NAの前適用によりcapsaicin電流の振幅は減少した。この作用はNA濃度依存性であり、0.1 pM以上の濃度で有意な抑制作用が確認され、最大抑制率は $87.3 \pm 16.2\%$ (n = 6)であった(平均値 \pm 標準誤差)。

NAによるcapsaicin電流抑制作用は、 α_{2} 受容体の特異的拮抗薬であるyohimbineにより有意に阻害された。また、clonidine (1 pM)とdexmedetomidine (1 pM)によってもcapsaicin電流は強力に抑制され(図3A,C)。このclonidineの作用もyohimbineによって阻害された(図3B,C)。

また、NAによるcapsaicin電流抑制作用は、GTP結合タンパク質の作用を抑制するGDP Sと百日咳毒素、プロテインキナーゼAの触媒サブユニット、脱リン酸化酵素抑制薬であるオカダ酸によって減弱した。これらの成績は、背根神経節ニューロンにおいて、TRPV1の活性を α_{2} アドレナリン受容体が抑制的に制御していることを示しており、単一細胞レベル、単一神経繊維レベルで α_{2} 受容体の活性化がTRPV1の活性を抑制している可能性が示唆された。

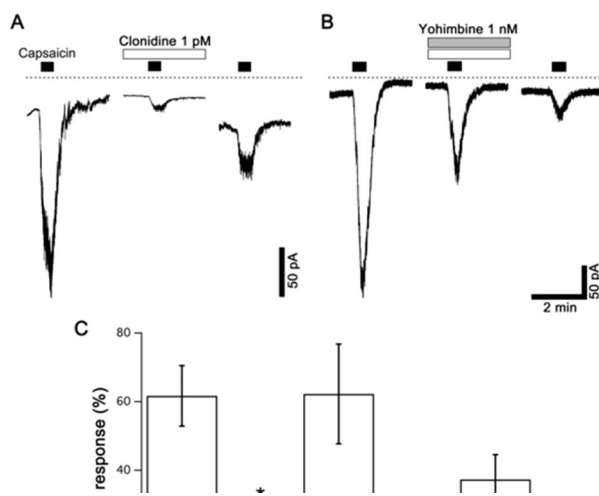


図3 Capsaicin電流に対するclonidineとdexmedetomidineの作用
(A) Clonidine存在下ではcapsaicin電流の振幅は大きく減少した。(B) Yohimbineはclonidineのcapsaicin電流減弱作用を抑制した。(C) Dexmedetomidineもclonidineと同様にcapsaicin電流を減弱させた。

一連の成績により、一次感覚神経繊維の末梢端で生じる α_{2} アドレナリン受容体によるTRPV1活性の抑制が、末梢組織でのアドレナリン作動系で生じる疼痛抑制の基盤機構となっている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Matsushita Yumi, Manabe Miki, Kitamura Naoki, Shibuya Izumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Adrenergic receptors inhibit TRPV1 activity in the dorsal root ganglion neurons of rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0191032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0191032	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 MATSUSHITA Yumi, KITAMURA Naoki, HIGUCHI Masashi, Z HOSAKA Yoshinao, SHIBUYA Izumi	4. 巻 39
2. 論文標題 Neuron-like cells in the chick spinal accessory lobe express neuronal-type voltage-gated sodium channels	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 189 ~ 196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.39.189	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 Kitamura Naoki, Nagami Erika, Matsushita Yumi, Kayano Tomohiko, Shibuya Izumi	4. 巻 5
2. 論文標題 Constitutive activity of transient receptor potential vanilloid type 1 triggers spontaneous firing in nerve growth factor-treated dorsal root ganglion neurons of rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 IBRO Reports	6. 最初と最後の頁 33 ~ 42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibror.2018.08.002	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 Izumisawa Yu, Tanaka-Yamamoto Keiko, Ciriello John, Kitamura Naoki, Shibuya Izumi	4. 巻 1704
2. 論文標題 The cytosolic Ca ²⁺ concentration in acutely dissociated subfornical organ (SFO) neurons of rats: Spontaneous Ca ²⁺ oscillations and Ca ²⁺ oscillations induced by picomolar concentrations of angiotensin II	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 137 ~ 149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2018.10.005	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 該当する

1. 著者名 Kayano Tomohiko, Sasaki Yuto, Kitamura Naoki, Harayama Nobuya, Moriya Taiki, Dayanithi Govindan, Verkhatsky Alexei, Shibuya Izumi	4. 巻 79
2. 論文標題 Persistent Na ⁺ influx drives L-type channel resting Ca ²⁺ entry in rat melanotrophs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 11 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceca.2019.02.001	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 該当する

1. 著者名 Izumisawa Yu, Tanaka-Yamamoto Keiko, Ciriello John, Kitamura Naoki, Shibuya Izumi	4. 巻 1718
2. 論文標題 Persistent cytosolic Ca ²⁺ increase induced by angiotensin II at nanomolar concentrations in acutely dissociated subfornical organ (SFO) neurons of rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 137 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2019.05.014	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 該当する

1. 著者名 Izumisawa Yu, Ito Kenji, Sugita Keisuke, Arai Tazuyo, Kokudo Hina, Kitamura Naoki, Shibuya Izumi	4. 巻 1763
2. 論文標題 Mechanisms of GABA-mediated inhibition of the angiotensin II-induced cytosolic Ca ²⁺ increase in rat subfornical organ neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 147451 ~ 147451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2021.147451	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 泉澤有, 北村直樹, 澁谷泉
2. 発表標題 脳弓下器官におけるアンジオテンシンIIによる持続性Ca ²⁺ 濃度上昇機構
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高原栄美香, 北村直樹, 澁谷泉
2. 発表標題 ラットTRPV1とそのN端欠損バリエーションとの機能比較
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松下有美, 北村直樹, 樋口雅司, 保坂善真, 澁谷泉
2. 発表標題 鶏脊髄accessory lobe内の神経様細胞には機能的な神経型電位依存性Na ⁺ チャンネルが発現している
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松下有美, 真鍋美樹, 樋口雅司, 保坂善真, 北村直樹, 澁谷泉
2. 発表標題 末梢組織の局所で完結する 2アドレナリン受容体を介したTRPV1の抑制による鎮痛作用
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 別宮璃子, 北村直樹, 樋口雅司, 澁谷泉
2. 発表標題 N末端を変異させたラットTRPV1分子の浸透圧感知能の解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子岳大, 北村直樹, 樋口雅司, 澁谷泉
2. 発表標題 4分子のTRPV1をリンカー配列で連結したコンカテマーの作製と機能解
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yumi Matsushita, Miki Manabe, Naoki Kitamura, Izumi Shibuya
2. 発表標題 The activation of alpha 2 adrenergic receptors inhibits pain behavior related to TRPV1 at the peripheral nerve level
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (北米神経科学学会年次大会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Kitamura, Erika Nagami, Yumi Matsushita, Tomohiko Kayano, Izumi Shibuya
2. 発表標題 NGF induces constitutive activity of TRPV1 triggering spontaneous firing in sensory neurons
3. 学会等名 9th FAOPS (Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies) Congress (第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yumi Matsushita, Miki Manabe, Naoki Kitamura, Izumi Shibuya
2. 発表標題 TRPV1 inhibition by α 2 adrenergic receptors on peripheral sensory neurons causes analgesia.
3. 学会等名 9th FAOPS (Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies) Congress (第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yumi Matsushita, Miki Manabe, Naoki Kitamura, Izumi Shibuya
2. 発表標題 Noradrenaline suppresses TRPV1 currents by activation of α_2 adrenergic receptors in sensory neurons.
3. 学会等名 Neuroscience 2017, ワシントンDC (米国) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yumi Matsushita, Miki Manabe, Naoki Kitamura, Izumi Shibuya
2. 発表標題 Noradrenaline Inhibits Trpv1 Current Through α_2 Adrenergic Receptor in The Dorsal Root Ganglion Neurons of Rats.
3. 学会等名 International Symposium in Veterinary Science 2018, ジョグジャカルタ (インドネシア) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumi Matsushita, Miki Manabe, Naoki Kitamura, Izumi Shibuya
2. 発表標題 Activation of α_2 adrenergic receptors inhibits TRPV1 activities resulting in analgesia
3. 学会等名 Symposium in Veterinary Science: Strengthening the Collaboration Between Indonesia and Japan Veterinary School (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yu Izumisawa, Keiko Tanaka-Yamamoto, John Ciriello, Naoki Kitamura, Izumi Shibuya
2. 発表標題 The dynamics of the cytosolic Ca^{2+} concentration in acutely dissociated subfornical organ neurons of rats and the effect of angiotensin II
3. 学会等名 The 5th Symposium of Association of Japan-Indonesia Veterinary Education 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	保坂 善真 (HOSAKA Yoshinao) (00337023)	鳥取大学・農学部・教授 (15101)	
研究分担者	澁谷 泉 (SHIBUYA Izumi) (50162649)	鳥取大学・農学部・教授 (15101)	
研究分担者	樋口 雅司 (HIGUCHI Masashi) (70614791)	鳥取大学・農学部・准教授 (15101)	

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
---------	---------