

機関番号：34533

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20602017

研究課題名（和文）：炎症性メディエーターによる DRG ニューロンの感作メカニズム

研究課題名（英文）：Sensitization of DRG neurons by inflammatory mediators

研究代表者：

戴 毅 (DAI YI)

兵庫医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：20330441

研究成果の概要（和文）：

炎症性疾患において、局所に多数の炎症性メディエーターが放出され、その近傍にある感覚神経を刺激あるいは感作させることで、炎症性疼痛を引き起こす。本研究は炎症性メディエーターブラジキニンやトリプターゼなどによる疼痛関連受容体 (TRPA1 及び P2X3) の機能増強機構を解析し、炎症性疼痛の発症における疼痛関連受容体感作のメカニズムを解明した。主な研究成果として、①ブラジキニンや PAR-2 受容体アゴニストによる TRPA1 及び P2X3 チャンネルの活性増強を明らかにした。②機能増強メカニズムには細胞内 PKA や PLC が重要な役割を担っていることを解明した。③TRPA1 や P2X3 チャンネルを介した疼痛行動が PAR-2 アゴニストによる増強効果が *In vivo* レベルにおいて確認された。これらのデータによって炎症性疼痛発症の新しい分子メカニズムが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The TRPA1/P2X₃ ion channel is localized on nociceptors of sensory neurons. Both bradykinin receptor 2 (B2R) or Proteinase-activated receptor-2 (PAR-2) are expressed in a subset of primary afferent neurons and is involved in inflammatory nociception. In this study, the functional interaction of the B2R or PAR-2 and TRPA1/P2X₃, was investigated by morphological, molecular-biological and electrophysiological analyses in rat dorsal root ganglion (DRG) neurons or HEK cells transfected with TRPA1 or P2X₃. We found that many TRPA1s or P2X₃s were functionally co-expressed with the B2R or PAR-2 in rat DRG neurons. Using whole-cell patch clamp technique, we observed that B2R / PAR-2 activation increased the TRPA1 / P2X currents evoked by allyl isothiocyanate or alpha beta-methylene adenosine 5' -triphosphate in DRG neurons, respectively. Inhibitors of phospholipase C (PLC), or protein kinase A (PKA) suppressed these potentiations. Application of a PLC activator or a PKA activator mimicked the B2R / PAR-2 mediated potentiation of TRPA1 or P2X current, respectively. Thus, the increased TRPA1 or P2X sensitivity may be due to the activation of PLC and/or PKA, which are downstream of the B2R and PAR-2 signal. These findings indicate that in inflammatory disease, Bradykinin or PAR-2 agonists may potentiate TRPA1 or P2X₃ ion channels to induce pain; the mechanism of this potentiation is likely to be a result of activation of PLC or PKA signals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学、疼痛学
 科研費の分科・細目：疼痛学
 キーワード：TRPA1, P2X3, PAIN, Inflammation

1. 研究開始当初の背景

炎症性疼痛には感覚神経終末に発現されている TRP(transient receptor potential)ファミリーのメンバー、とくに TRPV1 チャンネルの関与が我々および他のグループの報告より示唆された(Dai et al., 2004) (戴 et al. 医学のあゆみ 2004)。近年新しく発見された同ファミリーの TRPA1 チャンネルは、マスタードやニンニク、シナモンなどの刺激性化学成分により活性化されることや、炎症時末梢神経における遺伝子発現が上昇することから、炎症性疼痛への関与が強く示唆された。われわれは炎症性疼痛における TRPA1 の関与を着目し、炎症時における TRPA1 の発現変化、発現および機能調節機構などを研究し、その成果を発表してきた(Dai et al., 2007; Obata et al., 2005)。予備実験により、TRPA1 はラット後根神経節 (DRG) ニューロンの小型細胞に特異的に発現し、炎症性メディエーターの bradykinin や prostaglandin などの受容体と同一ニューロンで共存する結果が得られた。また、実験動物の足裏に痛みを引き起こさない低濃度の bradykinin を事前注射すると、TRPA1 の activator による疼痛行動を著明に増強した。これにより、炎症時 TRPA1 は炎症性メディエーターの調節を受け、疼痛過敏の発症に関与する可能性が強く示唆された。

2. 研究の目的

炎症性疾患において、局所に bradykinin や prostaglandin など多数の炎症性メディエーターが放出され、その近傍にある感覚神経を刺激あるいは感作させることで、炎症性疼痛が引き起こされる。感覚神経終末に発現する TRPA1 チャンネル、P2X3 チャンネルなどは痛み関連分子の重要かつ新しいメンバーとして近年注目されている。そこで本研究は炎症性メディエーターによる TRPA1 および P2X3 チャンネルの機能調節を着目し、炎症性疼痛の発症メカニズムにおける TRPA1 チャンネルの役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 免疫染色法や *In situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、*in vivo* で炎症性メディエーター受容体と TRPA1、P2X3 の共存を確認した
- (2) 行動学的実験で炎症性疼痛の発生過程上の TRPA1 と P2X3 の関与を確認した。
- (3) Ca²⁺ imaging 法を用いて炎症性メディエーターによる TRPA1 チャンネル機能調節を解析した。

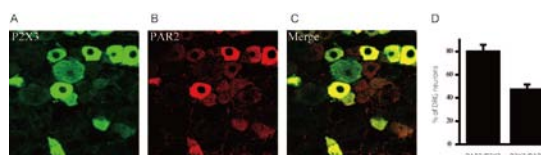
エーターによる TRPA1 チャンネル機能調節を解析した。

- (4) Patch Clamp 法を用いて炎症性メディエーターによる TRPA1 チャンネル機能調節を解析した。
- (5) *In vivo* 疼痛行動実験で細胞内シグナリングを確認した。

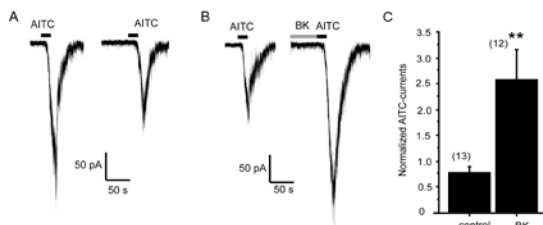
4. 研究成果

本研究は炎症性メディエータートリプターゼなどによる疼痛関連受容体 (TRPA1 及び P2X3) の機能調節を調べ、炎症性疼痛の発症メカニズムにおける疼痛関連受容体感作のメカニズムを解明した。主な研究成果を以下にまとめる。

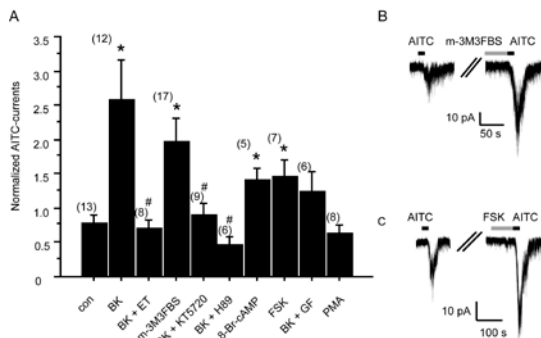
- (1) B2R/PAR-2 受容体と TRPA1 および P2X3 の共存を確認した。



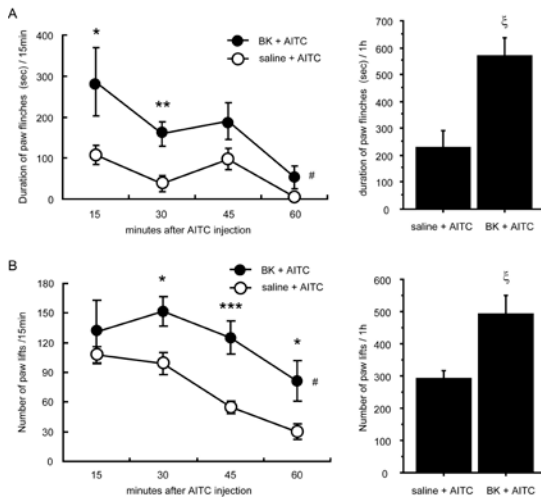
- (2) ブラジキニンや PAR-2 受容体アゴニストによる TRPA1 及び P2X3 チャンネルの活性増強が認められた。



- (3) 機能増強メカニズムには細胞内 PLC や PKA などが重要な役割を担っていることを明らかにした。



- (4) TRPA1 や P2X3 チャネルを介した疼痛行動が PAR-2 アゴニストによる増強効果が In vivo レベルにおいて確認された。



これらのデータによって TRPA1 および P2X3 を介した、炎症性疼痛発症の新しい分子メカニズムが解明された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- (1) Kim YS, Son JY, Kim TH, Paik SK, Dai Y, Noguchi K, Ahn DK, Bae YC. (2010) Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn. *J Comp Neurol.* 518(5):687-98. (査読有)
- (2) Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Fukuoka T, Dai Y, Noguchi K. (2010) Expression of leukotriene receptors in the rat dorsal root ganglion and the effects on pain behaviors. *Mol Pain.* 6(1):57. (査読有)
- (3) 戴 毅、野口光一、ブラジキニン他 — 痛み受容器への作用を中心に、関節リュウマチ (第 2 版)、日本臨床 69 巻増刊号 5 (通巻 978 号) 93-96、2010. 5. 20 (査読無)
- (4) Wang S, Dai Y, Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Obata K, Cui X, Tominaga M, Noguchi K. (2008) Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain, *Brain.* 131(Pt 5):1241-1251. (査読有)
- (5) Cui XY, Dai Y, Wang SL, Yamanaka H, Kobayashi K, Obata K, Chen J, Noguchi K. (2008) Differential activation of p38 and extracellular signal-regulated kinase in spinal

cord in a model of bee venom-induced inflammation and hyperalgesia. *Mol Pain.* 30;4(1):17. (査読有)

- (6) Fukuoka T, Kobayashi K, Yamanaka H, Obata K, Dai Y and Noguchi K. (2008) Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.*, 10, 510, 188-206 (査読有)
- (7) Sakurai J, Obata K, Ozaki N, Tokunaga A, Kobayashi K, Yamanaka H, Dai Y, Kondo T, Miyoshi K, Sugiura Y, Matsumoto T, Miwa H, 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)
- (8) 戴 毅、野口光一、TRP ファミリー受容体と痛み (基礎)、痛みのメカニズムとその制御, *BIO Clinica*, Vol. 23, 436-441、2008。 (査読無)

[学会発表] (計 9 件)

- (1) Yoshida N, Dai Y, Kobayashi K, Na R, Noguchi K. Inhibition of TRPA1 channel activity by glial cell line-derived neurotrophic factor family member, artemin. 40th annual meeting of neuroscience 2010. 11. 13
- (2) Na R, Dai Y, Shao H, Noguchi K. Pinosylvin Methyl Ether activates small-sized primary afferent neurons, 7th East-West Pain Conference. Beijing, China, 2010. 10. 11
- (3) Dai Y, Wang s, Kobayashi k, Noguchi k. Potentiation of alpha, beta methylene-atp induced p2x3 currents in primary afferent by par-2 signals is unlikely to involve receptor phosphorylation. 13th world congress on pain, Montreal, Canada, 2010. 9. 1
- (4) Dai Y, Sensitization of TRP channels by GPCR signals contributes to the sensation of inflammatory pain. Japan-Canada Joint Health Research Program Symposium 2010. Tokyo. Japan, 2010. 2. 20
- (5) Kobayashi K, Yamanaka M, Okubo M, Dai Y, Noguchi K. Transient expression of TNF alpha in the rat spinal cord following peripheral nerve injury. 39th Annual Meeting Society for

- Neuroscience, Chicago, U.S.A. 2009
- (6) Dai Y, Kobayashi K, Wang S and Noguchi K. Purinergic signaling in neuropathic and inflammatory pain. The 3rd International Symposium of Academic Exchange between Hyogo College of Medicine and Tianjin Medical University. Nishinomiya, Japan, 2009
 - (7) Dai Y, Wang S, Yoshida N, and Noguchi K. Sensitization of P2X3 by PAR-2 in primary afferent through PKC/PKA pathways contributes to inflammatory pain. 38th Annual Meeting Society for Neuroscience, Washington DC, U.S.A. 2008
 - (8) Cui XY, Dai Y, Wang S, Chen J, Noguchi K. Differential activation of p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in spinal cord dorsal horn of rats with bee venom-induced inflammatory pain hypersensitivity. 3rd Asian Pain Symposium. Fukuoka, Japan. 2008. 7. 19
 - (9) Wang S, Dai Y, Noguchi K. Sensitization of P2X3 by PAR-2 in primary afferent contributes to inflammatory pain. 3rd Asian Pain Symposium. Fukuoka, Japan. 2008. 7. 19

[図書] (計 1 件)

- (1) 遠山正彌、木山博資、戴 毅、神経性調節と刺激の受容、「人体の解剖・生理学」(遠山正彌、高辻功一、木山博資 編集)、金芳堂 東京 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戴 毅 (DAI YI)

兵庫医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：20330441