

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 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21658096

研究課題名（和文）

ニューロパチックペイン発生の分子基盤の解明と新規痛覚シグナル解析の確立

研究課題名（英文）

Analysis of molecular mechanisms of neuropathic pain and nociceptive signaling

研究代表者

太田 利男 (OHTA TOSHIO)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：20176895

研究成果の概要（和文）：

知覚神経細胞に発現している侵害受容体である Transient Receptor Potential (TRP) チャネル群がニューロパチックペインや炎症性疼痛に関与する可能性について検討した。そのため、TRPV1 及び TRPA1 チャネル蛋白質と蛍光蛋白質を融合させたプラスミドを構築し、その機能調節機構について検討した。これらチャネル遺伝子を異所性に発現させた哺乳動物培養細胞並びに知覚神経ニューロン、動物個体における内因性発痛物質によるチャネル活性への影響を調べた。その結果、炎症時に生体内で遊離・産生されるヒスタミンや硫化水素による疼痛発現には TRPV1 や TRPA1 チャネルの活性化が関与することが明らかになった。それ故、TRP チャネル分子は疼痛管理のための重要な分子ターゲットであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate functional significance of Transient Receptor potential V1 (TRPV1) and TRPA1 which are expressed in sensory neurons as neuropathic and inflammatory pain signaling, fluorescent protein-fused expressing vectors were constructed and heterologously expressed in mammalian cells. Their functions were compared to those obtained from sensory neurons. Histamine and hydrogen sulfide, which are synthesized and released under inflammatory conditions, potentiated and stimulated these channels, and elicited pain signaling through the activation of TRPV1 and TRPA1, respectively. These results suggest that TRP channels are important molecular targets for pain-regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年	1,700,000	0	1,700,000
2010 年	900,000	0	900,000
2011 年	600,000	180,000	780,000
総計	3,200,000	180,000	3,380,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：薬理、疼痛

1. 研究開始当初の背景

痛みは生体への警告系として有用な生体信号であるが、神経の損傷や炎症により生じる痛みは難知性病態痛であり、それ自身が治療の対象となる。近年、痛み受容シグナルに

関する研究が進み、多くの侵害受容チャネルが見出されているが、その機能的役割や制御機構には未だ不明の点が多い。

これまで遺伝子クローニングされ侵害受容体として注目されている Transient

Receptor Potential (TRP) チャネル群のうち、TRPV1 と TRPA1 は知覚神経での発現が報告されている非選択的陽イオンチャネルである。前者は唐辛子の辛み成分であるカプサイシンや酸、熱によって活性化され、後者は冷刺激やカラシの辛み成分であるマスタードオイルを始めとする、多くの刺激性化学物質や酸化ストレスによって活性化することが明らかにされている。

2. 研究の目的

本研究の目的は侵害受容チャネルである TRPV1 や TRPA1 に対する生体内疼痛メディエーターによる調節機構を明らかにすることである。

ヒスタミンは炎症時に肥満細胞から放出され、痛みや痒みを引き起こすオータコイドとして機能することが知られている。また、炎症時に産生が増加する硫化水素も痛覚過敏を引き起こすことが分かっている。しかし、現在までこれら発痛メディエーターの作用する分子基盤は明らかにされていない。そこで、本研究では侵害受容性チャネルである TRPV1 及び TRPA1 チャネルに対するこれらメディエーターの機能的役割について調べた。そのため、TRPV1 及び TRPA1 の活性化を測定できる蛍光蛋白融合プラスミド（ベクター）を構築して、ヒト胎児由来腎細胞（HEK293 細胞）に異所性に発現させその機能解析を行った。また、実験動物としてマウスより分離した知覚神経細胞におけるヒスタミンや硫化水素の作用についても調べ、遺伝子発現細胞と比較した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

野生型 (wild)、TRPV1 遺伝子欠損 (TRPV1^{-/-})、TRPA1 遺伝子欠損 (TRPA1^{-/-}) マウスを使用した。炎症性モデル動物の作成のためカラゲニン及び Freund Complete Adjuvant (CFA) をマウス足底内に投与した。ニューロパッチクペインモデル動物の作成のため、ペントバルビタール麻酔下で坐骨神経部分結紮を行った。

(2) 知覚神経細胞の分離培養

コラゲナーゼとトリプシンにより酵素分離した背根神経節 (Dorsal Root Ganglion, DRG) ニューロンを初代培養した。

(3) TRP 遺伝子クローニングと発現ベクターの構築

ゲノム情報に従ってマウス背根神経節 cDNA より TRPV1 及び TRPA1 遺伝子を PCR クローニングした。これら遺伝子を蛍光蛋白質である変異型 GFP を共発現するプラスミドに組み換え、蛍光蛋白質融合発現ベクターを構築した。

(4) チャネル機能解析

チャネル活性を細胞内Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 変化として解析するため、Ca蛍光色素である fura-2 を負荷した細胞を用いて、二波長蛍光切り替え装置と CCD カメラを装着した蛍光顕微鏡並びに画像解析ソフトを用いて、[Ca²⁺]_i イメージングを行った。パッチクランプ増幅器 (Axopatch200B) を用いて、ホールセルパッチクランプ法により細胞膜電位を測定した。

(5) 痛み行動解析

熱性痛覚過敏の測定のために Hargreaves 法による足底赤外線照射による plantar test を行った。また、発痛物質を直接マウス足底内に投与し、疼痛行動数を計測した。

4. 研究成果

(1) ヒスタミンによる TRPV1 受容体の活性化とそのメカニズムの解明

①酸刺激により野生型マウス DRG ニューロンにおいて [Ca²⁺]_i 増加反応が生じたが、TRPV1^{-/-}マウス DRG ニューロンでは生じなかった (< pH5.0) (図 1)。酸による [Ca²⁺]_i 増加反応 (図 2) 及び膜電位増加 (脱分極) はヒスタミン (1 μM) により増大した (図 3)。

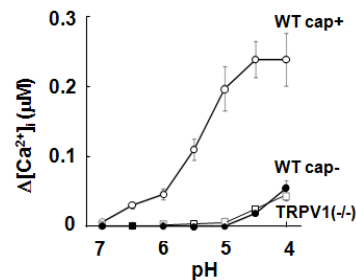


図 1 マウス DRG ニューロンにおける酸による [Ca²⁺]_i 増加反応

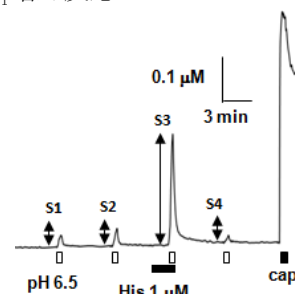


図 2 ヒスタミン存在下での酸 (pH6.5) による [Ca²⁺]_i 増加反応の増大

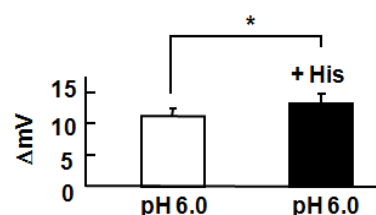


図 3 ヒスタミン存在下での酸 (pH6.0) による脱分極反応の増大

②マウス DRG にはヒスタミン H1~H4 受容体が発現していた。H1 受容体作動薬はヒスタミンと同様に、酸による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応を増大させたが、H2~H4 受容体作動薬では増加させなかった。ヒスタミンによる TRPV1 活性化作用は H1 受容体阻害薬でのみ抑制された。

③TRPV1 活性増加に関わる細胞内メッセンジャーを調べた。ヒスタミンによる酸で生じる $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応の増強は Phospholipase C (PLC) 阻害薬 (U73122) 及び Protein Kinase C (PKC) 阻害薬 (Bis-I, Go6983) により抑制されたが、Lipoxygenase 阻害薬 (NDGA) や Protein Kinase A 阻害薬 (H89) では影響を受けなかった (図 4)。

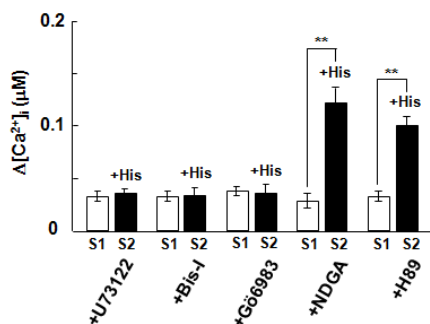


図 4 ヒスタミン存在下での酸 (pH6.5) による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応の増強に対する細胞内情報伝達阻害薬の効果

④カラゲニンや CFA により熱性痛覚過敏が生じたが、これらの条件でもヒスタミンによる TRPV1 活性化の増強は変化しなかった。また坐骨神経部分結紮により作成したニューロパッチクペインモデル動物においても、ヒスタミンによる TRPV1 活性化作用は無処置動物と同程度であった。

以上の結果より、ヒスタミンは知覚神経細胞に発現している H1 受容体を刺激し、PLC/PKC 経路を介して TRPV1 チャンネルを活性化させること、これがヒスタミンによる疼痛発生メカニズムの原因の一つであることが示唆された。

(2) 硫化水素による TRPA1 受容体の活性化による発痛作用

①硫化水素は野生型マウス DRG ニューロンにおいて $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応を引き起こし、この反応は非選択的 TRP 阻害薬 (Ruthenium Red)、選択的 TRPA1 阻害薬 (HC-030031) で抑制されたが、TRPV1 阻害薬 (BCTC) や T 型 Ca チャンネル阻害薬 (Mibefradil) によっては影響を受けなかった (図 5)。

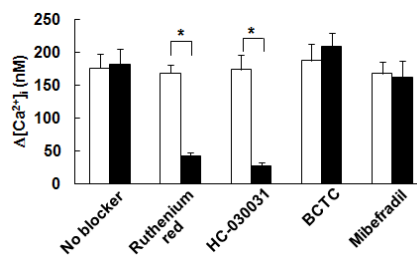


図 5 硫化水素によるマウス DRG ニューロンにおける $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応に対する阻害薬の影響

②硫化水素による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は TRPV1^{-/-}マウス DRG ニューロンでは生じたが、TRPA1^{-/-}マウスでは消失していた (図 6)。

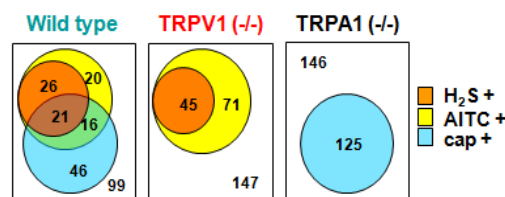


図 6 野生型マウス、TRPV1 欠損、TRPA1 欠損マウス DRG ニューロンにおける硫化水素感受性細胞と TRPA1 作動薬 (AITC)、TRPV1 作動薬 (cap) 反応性細胞の関係

③硫化水素はマウス TRPA1 発現 HEK293 細胞を活性化させたが、マウス TRPV1 発現細胞には影響を与えなかった (図 7)。また、硫化水素の作用は AITC 感知部位として知られている TRPA1 チャンネル分子の N 末端細胞内ドメインのシステインをアラニンに置換した遺伝子変異体の発現により消失した。

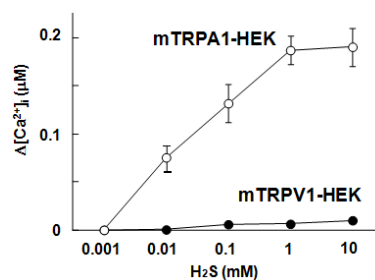


図 7 マウス TRPA1 及び TRPV1 発現 HEK293 細胞における硫化水素による $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応の濃度依存性

④炎症病態では組織は酸性になるため、硫化水素の作用に対する細胞外酸性化の影響を調べた。その結果、野生型及び TRPV1^{-/-}マウス DRG における硫化水素による TRPA1 活性化作用は細胞外酸性化により増大した。

⑤マウス足底への硫化水素の投与により野生型及び TRPV1^{-/-}マウスでは発痛作用が生じたが、TRPA1^{-/-}マウスでは著しく減弱していた (図 8)。また、硫化水素による疼痛反応も細胞外酸性化により増大した。

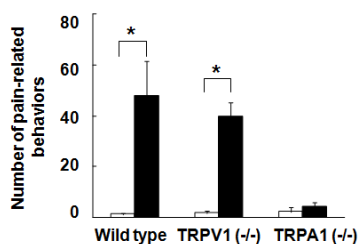


図8 硫化水素による急性疼痛作用

以上の成績から、硫化水素はTRPA1チャネルを活性化させ疼痛作用を生じることが明らかになった。更に細胞外酸性化によりその作用が増大したことから、硫化水素は炎症性疼痛を増悪させる生体内ガスメッセンジャーとして機能していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ①Ogawa H, Takahashi K, Miura S, Imagawa T, Saito S, Tominaga M, Ohta T, H₂S functions as a nociceptive messenger through transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) activation. *Neuroscience*, in press (2012). 査読有 doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.05.044
- ②Ohkita M, Saito S, Imagawa T, Takahashi K, Tominaga M, Ohta T. Molecular Cloning and Functional Characterization of *Xenopus tropicalis* Frog Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Reveal Its Functional Evolution for Heat, Acid, and Capsaicin Sensitivities in Terrestrial Vertebrates. *J Biol Chem.* 287(4) 2388-97. (2012) doi: 10.1074/jbc.M111.305698 査読有
- ③Ohta T, Ohba T, Suzuki T, Watanabe H, Sasano H, Murakami M. Decreased calcium channel currents and facilitated epinephrine release in the Ca²⁺ channel beta3 subunit-null mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 394(3):464-469. (2010) doi: 10.1016/j.bbrc.2010.01.036 査読有
- ④Kajihara Y, Murakami M, Imagawa T, Otsuguro K, Ito S, Ohta T. Histamine potentiates acid-induced responses mediating transient receptor potential V1 (TRPV1) in mouse primary sensory neurons. *Neuroscience*, 166(1):292-304. (2010) doi:10.1016/j.neuroscience.2009.12.001 査読有

[学会発表] (計9件)

- ①小川ひとみ、高橋賢次、三浦冴子、太田利

男：細胞外酸性下における硫化水素の発痛増強作用とその機構について、第153回日本獣医学会学術集会 2012.3.28 (埼玉)

- ②大北真嗣、齋藤茂、高橋賢次、富永真琴、太田利男：両生類TRPV1遺伝子クローニングと機能解析によるポリモーダル感受性の進化、第85回日本薬理学会年会 2012、3.15 (京都)
- ③小川ひとみ、高橋賢次、三浦冴子、齋藤茂、富永真琴、太田利男：硫化水素はTRPA1の活性化を介してマウスに疼痛反応を引き起こす 第39回薬物活性シンポジウム 2012.11.22 (福岡)
- ④高橋賢次、太田利男：酸性条件下における2-aminoethoxydiphenyl borateによるPC12細胞の細胞死誘発作用 第64回日本薬理学会西南部会 2011.11.20 (福岡)
- ⑤小川ひとみ、高橋賢次、三浦冴子、齋藤茂、富永真琴、太田利男：硫化水素によるTRPA1受容体を介したマウス知覚神経の活性化 第152回日本獣医学会学術集会 2011、9.21 (大阪)
- ⑥小川ひとみ、高橋賢次、齋藤茂、富永真琴、太田利男、マウス知覚神経における硫化水素による細胞内Ca増加反応について、第84回日本薬理学会年会、2011、3、16 (横浜)
- ⑦村上 学、大場貴喜、根本隆行、柳田俊彦、太田利男、電位依存性カルシウムチャンネルβ欠損マウスにおけるエピネフリン分泌亢進、第84回日本薬理学会年会、2011、3、16 (横浜)
- ⑧大北真嗣、齋藤茂、今川敏明、高橋賢次、太田利男 (2010) *Xenopus Tropicalis* TRPV1遺伝子クローニングと発現・機能解析 第150回日本獣医学会学術集会 2010、9、16 (帯広)
- ⑨太田利男、今川敏明、伊藤茂男 (2010) MethylsalicylateによるTransient Receptor Potential Vanilloid1 (TRPV1)活性化と鎮痛作用について 第149回日本獣医学会学術集会 2010、3、26 (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 利男 (OHTA TOSHIO)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号：20176895

(2) 連携研究者

今川 敏明 (IMAGAWA TOSHIKI)
北海道大学・理学研究科・准教授
研究者番号：20142177

高橋 賢次 (TAKAHASHI KENJI)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号：00400143