

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590725

研究課題名(和文)多機能メカノセンサーTRPV2の成体知覚神経細胞における機能と疼痛への関与の精査

研究課題名(英文) Investigation of a role for multifunctional mechanosensor TRPV2 in adult sensory neuron and 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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、体性感覚を担う一次知覚神経での機能が不明な陽イオンチャネルTRPV2について、一次知覚神経特異的遺伝子欠損マウスを作成し、その機能の解明を試みた。我々が作成したTRPV2欠損マウスでは、一次知覚神経の種類・形態・数および神経軸索の発達に明瞭な異常はみられなかった。しかし個体レベルでは、侵害的な(痛みを生じる高強度の)機械刺激に対する逃避行動が減弱していた。一次知覚神経初代培養細胞の細胞応答では、正常マウスで見られた強い伸展刺激に感受性を示す細胞が、TRPV2欠損マウスで有意に減少していた。これらの個体レベルと細胞レベルの結果から、TRPV2の機械痛覚への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this research, we explored an unknown function of TRPV2, a nonselective cation channel, in adult primary sensory neurons by construction and analysis of a primary sensory neuron-specific conditional knock-out mice of TRPV2 (cKO). There was no apparent difference in number, population, and morphology of the primary sensory neurons, and their axonal development between the cKO mice and normal littermates. However, the nocifensive behavior of the mice against noxious mechanical stimuli and the incidence of stretch-sensitive primary sensory neurons with relatively high-thresholds were significantly reduced in cKO mice compared to the normal mice. These results suggest that TRPV2 in the adult primary sensory neurons is involved in the mechanical nociception.

研究分野：疼痛学

キーワード：TRPV2 疼痛 機械受容 侵害受容器 一次知覚神経 脊髄神経節

## 1. 研究開始当初の背景

痛み刺激は、体性一次知覚神経の一種である侵害受容器で受容され、痛みの感覚と様々な生体応答を引き起こす。近年、侵害受容器に存在する温度や機械刺激の情報変換分子として、TRP (transient receptor potential ion channel)、ASICs (acid-sensing ion channels)、Piezo 等、多数報告されている。これらの中には、受容体として働くことが証明されたものもある一方で、遺伝子欠損マウスで感覚機能異常が見られない分子、あるいは異所的発現系で機能が再現できない分子も多く、痛覚刺激受容のしくみは未だに明らかになっていない。

このうち TRPV2 は、43 の熱受容体である TRPV1 の類縁体であり、52 以上の温度で開く熱感受性イオンチャネルとして同定された。TRPV1 は比較的穏やかな熱の痛みを、TRPV2 は高温による鋭い痛みをそれぞれ担う情報変換分子であると考えられていた。しかし、TRPV2 の熱性疼痛への関与には否定的な報告も多く知られていた。我々が実施した、一次知覚神経初代培養細胞でのパッチクランプ記録においても、約 50 の閾値で高温応答を示す細胞で TRPV2 の発現はほとんど見られなかった (日本比較生理生化学会第 34 回大会) また、全身性の TRPV2 遺伝子欠損マウス、および TRPV1/TRPV2 の二重欠損マウスの熱痛覚行動は正常であるという結果も報告された (Park, 2011)。このように、侵害受容器における 50 以上の熱刺激の情報変換機構は依然として謎であった。

TRPV2 は、末梢神経系以外に中枢神経系、筋、骨、マクロファージなど、多様な組織で発現している。心筋や骨格筋の TRPV2 は、筋の伸展によって筋肥大が生じる際に重要な、カルシウムの細胞内流入を担う機械感受性チャネルである (Iwata, 2003, Muraki, 2003)。また、破骨細胞の細胞分化 (Kajiya, 2010)、マクロファージの貪食作用 (Link, 2010) 神経発生時の伸展刺激による神経軸索伸長の促進 (Shibasaki, 2010)、腸管神経叢での腸管伸展の検知と腸管運動の調節 (Mihara, 2010) など、伸展を伴う細胞活動への TRPV2 の関与を示す実験結果が相次いで報告されている。これらのことから、細胞レベルでの機械感受性は、TRPV2 の基本的な役割の一つであると考えられた。

しかしながら、成体 (adult) の一次知覚神経における TRPV2 の機能については、熱受容への関与が否定されつつあった本研究開始当時には全く不明であった。TRPV2 は、胎児期にはほぼ全ての一次知覚神経細胞で発現して軸索伸長を促進するが、出生後に発現細胞は減少し、成体においては約 15% の知覚神経細胞と一部の運動神経細胞に明瞭に限局する (Shibasaki, 2010)。こ

の発現パターンからは、感覚神経細胞に広く共通する機能を担うとは考えにくく、何らかの特別な感覚機能に関わっていることが推測される。

## 2. 研究の目的

本研究は、成体の体性一次知覚神経細胞における TRPV2 の役割を明らかにすることを目的として実施した。

そのため本研究では、まず「一次知覚神経特異的 TRPV2 神経系特異的 TRPV2 欠損マウス」を樹立した。次いで、本マウスを用いて「感覚機能を調べる動物行動試験」を実施し、その表現系から TRPV2 の役割を解明する。また、「単離一次知覚神経の培養系を用いた細胞生理学的機能解析」を実施し、TRPV2 発現細胞の免疫組織化学的特徴と合わせて、細胞レベルから TRPV2 の機能を明らかにした。さらに、神経損傷に伴う神経障害性疼痛やその回復過程への TRPV2 の関与についても検討した。

## 3. 研究の方法

(1)、一次知覚神経特異的 TRPV2 遺伝子欠損マウス系統の樹立:

Cre-loxP システムを利用し、一次知覚神経特異的 TRPV2 欠損マウスを樹立した。TRPV2 遺伝子に Cre 遺伝子組み換え酵素の認識配列である loxP を挿入した TRPV2 flox/flox マウス (Katanosaka Y., 2014) と、体性一次知覚神経細胞特異的 Cre 発現マウス (Wnt1-Cre トランスジェニックマウス) とを交配することにより作成した。Flox-TRPV2 マウスは、連携研究者の片野坂友紀助教 (岡山大学) より供与を受け、Wnt1-Cre マウスは米国ジャクソン研究所より入手した。全ての実験には、TRPV2 flox/flox マウスと TRPV2 flox/flox; Wnt-Cre+ マウス (TRPV2 遺伝子欠損個体、TRPV2-cKO 表記) の間での交配によって産まれた同腹仔を用いた。産仔のうち、TRPV2 flox/flox マウスを正常個体として対照実験に用いた。実験には雌雄両方を使用した。

(2)、免疫組織化学:

マウスを 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定後、脊髄後根神経節 (DRG) の凍結切片を作成し、各種一次抗体と蛍光標識二次抗体により免疫染色を行った。

(3)、電子顕微鏡観察:

マウスの腓腹神経を 2% グルタルアルデヒドおよびオスミウム酸により固定後、エポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を作成して透視型電子顕微鏡により観察した。

(4)、痛覚行動試験:

「研究機関等における動物実験等の実施に

関する基本指針(文部科学省)、および実験実施機関(中部大学、名古屋大学、および岡山大学)の「動物実験等に関する取り扱い規定」に従い、所属部局の動物実験委員会の承認を受けた上で、使用動物数の削減、動物の苦痛の軽減に最大限配慮して実施した。

いずれの行動試験も、3日間の模擬試験により実験環境への馴化をおこなった後に実施した。実験者にはマウス個体の遺伝子型を伏せた状態で実施した(ブラインド試験)。

、ホットプレートテスト:

50-60 のホットプレート上でマウスが逃避行動を示すまでの時間を計測した。組織の傷害を避けるため、逃避行動を示した後は速やかに実験を終了した。

、プランターテスト(Hargreaves法):

マウスの後肢足底皮膚に対して赤外線照射による熱刺激を与え、マウスが後肢を挙上するまでの時間を計測した。

、フォン・フライ・ヘアテスト:

マウス後肢足底皮膚に対してナイロンフィラメントによる機械刺激を与え、マウスが後肢を挙上する回数を計測した。ナイロンフィラメントは、0.01、0.04、0.16、0.32、0.6、1.0、2.0 g のものを使用し、各 10 回の刺激を行った。

、テール・プレッシャーテスト(Randall-Selitto法):

マウス尾部に漸増的に荷重をかけ、マウスが尾を払いのけた時点の荷重を機械疼痛閾値として記録した。

(5). カルシウムイメージング:

5 週齢のマウスの DRG を、37 °C での酵素処理 (0.2% collagenase 30分, 0.05% trypsin 15分) およびピペッティングにより分散し、単離された DRG neuron (一次知覚神経細胞体) をラミニンコートしたシリコン製ストレッチチャンパー上で培養した。Neurobasal-A 培地(Invitrogen)に、各種添加物 (B27 supplement; NGF 100 ng/mL; GDNF, BDNF, NT-3, NT-4 各 50 ng/mL) を加えて 2-6 時間培養し、その後 2 μM Fura-2 を 30 分間負荷してカルシウムイメージングに用いた。ストレッチチャンパーの伸展により、DRG 細胞に機械刺激を与え、細胞内カルシウムレベルの上昇を Fura-2 カルシウムイメージング法によって観察した。刺激は 5-35% の伸展率で 3 秒間与え、高感度デジタルカメラ (ORCA-Flash 2.8; 浜松ホトニクス) と MetaFluor ソフトウェア (Molecular Devices) で記録と解析を行った。また、化学物質による刺激は、ストレッチチャンパー内への薬液灌流投与により行った。

(6). 神経損傷モデルマウスの作成と RT-PCR 法による TRPV2 発現変化の解析:

神経枝結紮損傷モデルマウスの作成では、Shields らの方法に従い左後肢のみに結紮処置を行った(Shields, 2003)。術後 7 日目に、処置側の L4-6 レベルの DRG を回収し、TRPV2 の RT-PCR を行なった。サンプル間の標準化には GAPDH を用い、半定量的な解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1). 一次知覚神経特異的 TRPV2 遺伝子欠損マウスの樹立:

作成した TRPV2 flox/flox マウスと TRPV2 flox/flox; Wnt-Cre+ マウスの交配で生まれた TRPV2 欠損系統 (TRPV2-cKO) について、脊髄後根神経節 (DRG) での TRPV2 の発現を確認した。免疫組織化学およびウエスタンブロッティング法により調べたところ、TRPV2 の発現が消失していることを確認した。小径の侵害受容器に発現する TRPV1、無髄神経線維に発現する peripherin、有髄神経線維に発現するニューロフィラメント 200 の発現細胞の数については、同腹の正常個体との間で有意な差異は観察されなかった。また、TRPV2 は神経発生時の末梢神経の軸索伸張に関与することから(Shibasaki, 2010)、マウス腓腹神経の軸索の形態と数を電子顕微鏡観察により確認した。その結果、8 週齢の TRPV2 欠損個体の腓腹神経では、無髄神経、有髄神経共に、正常個体との違いは観察されなかった。この結果から、発生期の TRPV2 は末梢神経軸索の発達に関与するとしても、少なくとも 8 週齢以降の軸索の発達には大きく影響しないことが示唆された。このように、成体の一次知覚神経 (DRG neuron) において、安定して TRPV2 が欠損するマウス系統の樹立に成功した。

(2). 痛覚行動試験:

成体一次知覚神経の TRPV2 は、熱痛覚あるいは機械感覚に関与することが考えられる。そこで、樹立した一次知覚神経特異的 TRPV2 欠損マウスで、各種痛覚行動試験を実施し、熱および機械刺激に対する痛覚の異常の有無を調べた。ホットプレートテストおよびプランターテストにおいては、TRPV2 欠損マウス (TRPV2-cKO) の熱痛覚行動は、正常個体と違いが見られなかった。一方、機械刺激に対する行動試験については、足底のフォン・フライ・ヘアテストにおける TRPV2 欠損マウスの逃避行動が、正常の同腹仔と比べて減弱していた。特に、痛覚を生じると考えられる高強度の刺激 (侵害的機械刺激) で有意差が見られた。さらに、テール・プレッシャーテストでも、マウス尾部への機械刺激に対する逃避閾値が上昇していた。これらの結果から、TRPV2 の成体末梢神経系での役割として、機械痛覚への関与が示唆された。

また、上記の結果は、TRPV2 の熱痛覚への関与を支持するものではなかった。

(3) , 単離知覚神経細胞の機械応答 :

また、TRPV2 の機能を細胞レベルで調べるため、培養 DRG neuron の機械応答を調べた。マウスの DRG neuron を単離してシリコン薄膜上で培養し、シリコン薄膜の伸展によって生じる細胞の機械応答を Fura2 カルシウムイメージング法により測定した。正常マウスの細胞においては、伸展刺激後の細胞内カルシウムレベルの回復が速いタイプと遅いタイプの細胞が観察された。伸展応答からの回復が早いタイプの細胞は、TRPV2 を活性化する Probenecid に感受性を持つ細胞を多く含み、機械閾値は高く(伸展率 30%)、細胞のサイズは小型から中型(直径  $32.4 \pm 0.61 \mu\text{m}$ )であった。一方、回復の遅いタイプは、Probenecid 感受性の細胞を含まず、機械閾値は低く(伸展率 10%)、細胞サイズも比較的大きかった(直径  $36.4 \pm 0.61 \mu\text{m}$ )。これらの2つのタイプの細胞は、薬剤感受性・機械閾値などの点から異なる細胞集団であることが示唆された。これに対して、TRPV2 欠損マウスの DRG neuron では、回復の速い高閾値タイプのストレッチ応答を示す細胞の割合が顕著に減少していた(正常マウス 11.3%; TRPV2-cKO マウス 0.9%)。以上の結果は、TRPV2 が一次知覚神経細胞の高閾値機械応答に関与することを示唆しており、行動試験の結果とも良く対応するものである。

(4) , 高強度(侵害的)機械刺激感受性 DRG neuron の免疫組織化学的同定 :

侵害受容器が興奮すると、DRG の細胞体では ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase)の一過性のリン酸化(pERK)が生じる。これを利用して、ペントバルビタール麻酔下のマウス足底皮膚に高強度の機械刺激(止血鉗子での把持)を与え、これに反応する細胞を pERK 陽性細胞として免疫組織化学的に同定した。抗 pERK 抗体での免疫染色と合わせて、抗 TRPV2 抗体による二重染色を行ったところ、強い機械刺激への感受性を持つ pERK 陽性細胞の約 36%が TRPV2 陽性であった。TRPV2 と侵害的機械受容器との関連性が示唆されたものの、TRPV2 陰性の pERK 陽性細胞も多く存在することから、機械的痛覚には複数の受容器が関与すると考えられた。

(5) , 神経損傷後の DRG における TRPV2 の発現解析 :

TRPV2 は、神経軸索伸長や炎症病態への関与も報告されている。そこで、神経損傷モデルマウスの知覚神経節において TRPV2 発現の変化があるかどうかを調べた。座骨神経枝結紮損傷モデル(SNIモデル)マウスにおいて、痛覚過敏が顕著に現れる術後7日目の TRPV2 mRNA の発現を RT-PCR 法により

調べたところ、発現レベルの増減はみられなかった。少なくとも、本モデルにおいて、TRPV2 発現の変化を通じた神経損傷病態の形成や、損傷治癒への寄与は高くないと考えられた。

<引用文献>

, Park U et al. TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *J Neurosci.* 2011. 31(32):11425-36.

, Muraki K et al. TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res.* 2003. 93: 829-38.

, Iwata Y, Katanosaka Y, et al. A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca<sup>2+</sup>-permeable growth factor-regulated channel. *J Cell Biol.* 2003. 161:957-67.

, Kajiya H et al. RANKL-induced TRPV2 expression regulates osteoclastogenesis via calcium oscillations. *Cell Calcium.* 2010. 48:260-9.

, Link TM et al. TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis. *Nat Immunol.* 2010. 11:232-9.

, Shibasaki K et al. TRPV2 enhances axon outgrowth through its activation by membrane stretch in developing sensory and motor neurons. *J Neurosci.* 2010. 30:4601-12.

, Mihara H et al. Involvement of TRPV2 activation in intestinal movement through nitric oxide production in mice. *J Neurosci.* 2010. 30:16536-44.

, Shields SD et al. Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. *J Pain.* 2003. 4:465-70.

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 5 件)

, 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紀要(WEB版) Vol.11, 2015. (査読有)

URL : [http://www3.chubu.ac.jp/research\\_life\\_health/](http://www3.chubu.ac.jp/research_life_health/)

, Taguchi, T., Katanosaka, K., Yasui, M., Hayashi, K., Yamashita, M., Wakatsuki, K., Kiyama, H., Yamanaka, A., Mizumura, K.: Peripheral and spinal mechanisms of

nociception in a rat reserpine-induced pain model. *Pain*. 156(3):415-27. 2015. (査読有)  
DOI:10.1097/01.j.pain.0000460334.49525.5e.

, Katanosaka Y., Iwasaki, K., Ujihara, Y., Takatsu, S., Nishitsuji, K., Kanagawa, M., Sudo, A., Toda, T., Katanosaka K., Mohri S., Naruse, K.: TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice. *Nature Commun.*, 5:3932. 2014. (査読有)  
DOI:10.1038/ncomms4932

, Ota, H., Katanosaka K., Murase, S., Kashio, M., Tominaga, M., Mizumura, K.: TRPV1 and TRPV4 play pivotal roles in delayed onset muscle soreness. *PLoS ONE* 8(6): e65751. 2013. (査読有)  
DOI: 10.1371/journal.pone.0065751

, Kubo, A., Katanosaka K., Mizumura, K.: Extracellular matrix proteoglycan plays a pivotal role in sensitization by low pH of mechanosensitive currents in nociceptive sensory neurons. *The Journal of physiology*. 590(Pt 13):2995-3007. 2012. (査読有)  
DOI: 10.1113/jphysiol.2012.229153.

[学会発表](計 17 件)

, Katanosaka K., Takeda K, Katanosaka Y., Kashio M, Tominaga M, Mizumura K. The immunohistochemical characterization of the new heat-sensitive primary sensory neuron in mouse dorsal root ganglia. 第 92 回日本生理学会大会・第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会, 2015 年 3 月 21 ~ 23 日. 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸)

, 片野坂公明, 高津理美, 水村和枝, 成瀬恵治, 片野坂友紀. 成体一次感覚ニューロンに発現する TRPV2 の機械痛覚における役割. 平成 26 年度生理学研究所研究会『痛みと痛覚情動連関の神経機構』. 2014.12.10-11. 生理学研究所 (愛知県・岡崎)

, 片野坂公明, 高津理美, 水村和枝, 成瀬恵治, 片野坂友紀: 組織特異的遺伝子欠損マウスを用いた成体一次知覚神経での TRPV2 の生理的機能の解析. 第 91 回日本生理学会大会, 2014.3. 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県・鹿児島)

, 太田大樹, 片野坂公明, 村瀬詩織, 加塩麻紀子, 富永真琴, 水村和枝. 遅発性筋痛における TRP チャネル V1、V4 の役割. 第 6

回日本運動器疼痛学会. 2013 年 12 月 7 ~ 8 日. 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸)

, 片野坂公明, 高津理美, 成瀬恵治, 片野坂友紀. 培養 DRG ニューロンのストレッチ応答への TRPV2 の関与. 第 60 回中部日本生理学会. 2013 年 10 月 25 日. 岐阜大学医学部 (岐阜県・岐阜)

, 片野坂公明, 高津理美, 成瀬恵治, 片野坂友紀. Classification of mechanosensitive primary sensory neurons based on an analysis of unidirectional stretch-evoked calcium responses. 伸展刺激誘発性カルシウム応答の解析による機械感受性一次求心性ニューロンの分類. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuro2013). June 20-23. 2013. 京都国際会議場 (京都府・京都)

, 田口徹, 片野坂公明, 安井正佐也, 水村和枝, 木山博資. レセルピン誘発性モデルを用いた線維筋痛症の末梢・脊髄神経機構の探索. 日本線維筋痛症学会第 4 回学術集会. 2012 年 9 月. 長崎ブリックホール (長崎県・長崎)

, 片野坂公明, 高津理美, 水村和枝, 成瀬恵治, 片野坂友紀. A role for transient receptor potential vanilloid 2 in mechanical nociception and a stretch-evoked response of primary afferent neurons. 第 35 回日本神経科学学会大会. 2012 年 9 月. 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋)

, 太田大樹, 片野坂公明, 加塩麻紀子, 富永真琴, 水村和枝. Involvement of TRPV1 and TRPA1 in the generation of mechanical hyperalgesia after exercise (delayed muscle soreness, DOMS). 第 35 回日本神経科学学会大会, 2012 年 9 月. 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋)

10, 久保亜抄子, 片野坂公明, 水村和枝. Chondroitin sulfate proteoglycan is involved in low pH-induced sensitization of mechanical response in cultured IB4-positive nociceptive dorsal root ganglion neurons of rats. 第 35 回日本神経科学学会大会. 2012 年 9 月. 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋)

11, 片野坂公明. マウス高温感受性一次知覚ニューロンの免疫組織化学的探索. 第 4 回光操作研究会. 2012 年 9 月. 生理学研究所 (愛知県・岡崎)

12, 片野坂公明, 竹田和弘, 片野坂友紀, 高津理美, 加塩麻紀子, 富永真琴, 水村和枝. Immunohistochemical detection of heat-sensitive primary afferent neurons and

their correlation with transient receptor potential vanilloid 1 and 2 in mice . 日本比較生理生化学会第34回大会. 2012年7月. 総合研究大学院大学葉山キャンパス(神奈川県・葉山)

〔その他〕

(1) 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  
(名古屋大学・環境医学研究所・助教  
より所属変更、平成26年4月)

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

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

### (4) 研究協力者

成瀬 恵治(NARUSE Keiji)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科  
・教授

高津 理美(TAKATSU, Satomi)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科  
・博士研究員

水村 和枝(MIZUMURA, Kazue)  
中部大学・生命健康科学部・教授