

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460731

研究課題名(和文) 神経因性疼痛における新規KチャンネルとATPの役割に関する研究

研究課題名(英文) Study of a role of ATP on a novel K<sup>+</sup> channel in neuropathic pain.

## 研究代表者

山本 悟史 (YAMAMOTO, Satoshi)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：60220464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経因性疼痛の発生原因を調べる目的で、ラット脊髄後根神経節ニューロンを用いて、熱刺激で活性化される新規K<sup>+</sup>チャンネル(Kheat)に対するアデノシン三リン酸(ATP)の役割を、パッチクランプ法を用いて検証した。Ba<sup>2+</sup>あるいはtetraethylammoniumでKheat電流を単離したのち、ATPによるKheatの制御機構を調べたが、Kheatの制御は確認出来なかった。同様に、TRPV1受容体の制御も確認できなかった。今回の研究では正常ラットを用いて実験を行ったため、ATPによる制御機構を確認出来なかった可能性があるため、末梢神経傷害モデルラットを用いて同様の実験を引き続き行う予定である。

研究成果の概要(英文)：To study the mechanism of generation of neuropathic pain, a role of adenosine-triphosphate (ATP) on a novel heat-activated K<sup>+</sup> channel (Kheat) in dorsal root ganglion neurons of the rat was examined using a patch-clamp technique. Kheat was isolated by Ba<sup>2+</sup> or tetraethylammonium. Under the isolation of Kheat, ATP did not affect to Kheat, as well as to TRPV1 receptors. The reason of the less effect of ATP might be attribute to using normal rats but not neuropathic pain model rats in this study. To clear the problem, similar experiments will be continue in neuropathic pain model rats.

研究分野：神経生理学

キーワード：神経因性疼痛 脊髄後根神経節 K<sup>+</sup>チャンネル 熱 ATP ATP受容体

1. 研究開始当初の背景

TRPV1受容体は、脊髄後根神経節 (DRG) 神経細胞に多く発現している受容体で、疼痛の情報伝達に関与していることが知られている。この受容体は40 以上の熱によって活性化され、その活性化の程度はパッチクランプ法による実験で内向き電流として記録出来る (図1A)。我々は、この受容体に関する実験中、偶然、熱によって活性化される外向き電流を発見した (図1B)。詳細に調べたところ、この電流は熱によって活性化される新規のK<sup>+</sup>チャンネル (K<sub>heat</sub>) によって発生しており、DRG神経細胞は、TRPV1受容体のみを持つ細胞 (図1A)、K<sub>heat</sub>チャンネルのみを持つ細胞 (図1B)、及びその両者を持つ細胞 (図1C) の3種類に分類されることを明らかにした (Yamamoto et al., *Life Sci* 2009)。

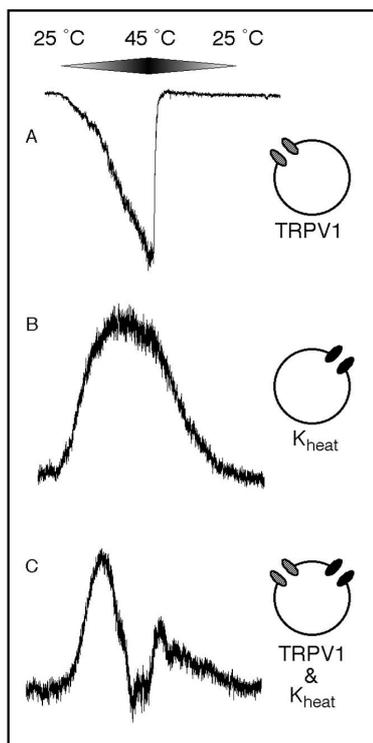


図1 熱刺激によってDRG神経細胞に誘起される膜電流

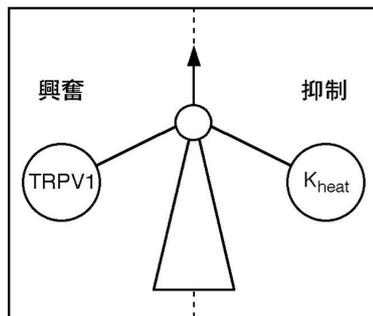


図2 DRG神経細胞の興奮性調節

DRG 神経細胞が自発的に活動電位を発生し、これが神経因性疼痛の発生原因になっていると仮定した場合、神経細胞の興奮性が疼痛の発生を決める因子となる。TRPV1 受容体は細胞の興奮性を高め、K<sub>heat</sub> チャンネルは逆に興

奮性を抑制することを考えると、この2つの分子の活性化の程度によって細胞の興奮性が決定されると言える (図2)。即ち、TRPV1 受容体の増強もしくはK<sub>heat</sub> チャンネルの抑制が起きれば、神経細胞の興奮性が高まり、神経因性疼痛が発生すると考えられる。我々は、ノルアドレナリン (NA) が K<sub>heat</sub> チャンネルを抑制して DRG 神経細胞の興奮性を増加させることを明らかにした (Yamamoto et al., *Life Sci* 2009) が、NA と同様に疼痛発生への関与が指摘されている ATP にも K<sub>heat</sub> チャンネルを抑制する作用があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

神経因性疼痛の発生機序の一つに交感神経の関与が指摘されている。即ち、「末梢神経傷害が交感神経節後細胞の発芽を誘起し、その軸索が DRG 神経細胞に到達している」という報告がある。我々は、交感神経から放出されるノルアドレナリン (NA) が K<sub>heat</sub> チャンネルを抑制することを報告しており、また NA は DRG 神経細胞から ATP を放出させることが示されている。そこで今回の研究では、「ATP が P2Y 受容体を介して K<sub>heat</sub> チャンネルや TRPV1 受容体に作用し、神経因性疼痛の発生要因になっているのではないかと考えた (図3)。

DRG 神経細胞が疼痛シグナル (活動電位) を発生するためには、DRG 神経細胞の膜電位が活動電位の発生閾値まで脱分極しなければならない。そこで、P2Y 受容体を介した ATP の作用によって脱分極電位が発生する機序として次の仮説を立てた。

(1) K<sub>heat</sub> チャンネルの抑制による脱分極

体温付近の温度である程度開いている K<sub>heat</sub> チャンネルが、P2Y 受容体を介した蛋白キナーゼの作用によって抑制され (図4)、脱分極が発生する。(K<sub>heat</sub> チャンネルが体温付近の温度で開いていることは確認済み。)

(2) TRPV1 受容体の閾値低下との相乗作用による脱分極

P2Y 受容体を介した蛋白キナーゼの作用により、TRPV1 受容体がリン酸化され、通常 40 以上でしか活性化されない受容体 (図5) が体温付近の温度で活性化されるようになる (TRPV1 受容体の閾値低下) (図6)、との報告があることより、この現象が上記 (1) と同時に生じれば、相乗的に脱分極が起こり、体温付近の温度でも神経細胞がより興奮しやすくなる。

本研究では、上記 (1) と (2) の仮説を実証する実験を行い、神経因性疼痛発生機序の解明を目指す。

本研究は「ATP が K<sub>heat</sub> チャンネルを抑制すれば疼痛発生の要因となる」と仮説を立てた点に特色があり、さらに「神経因性疼痛の発生源が DRG 神経細胞の発生する活動電位にある」と考えた点が独創的である。本研究結果が明らかになれば、難治性疼痛である神経因

性疼痛の病態が解明され、治療法の開発に役立つと考えられる。

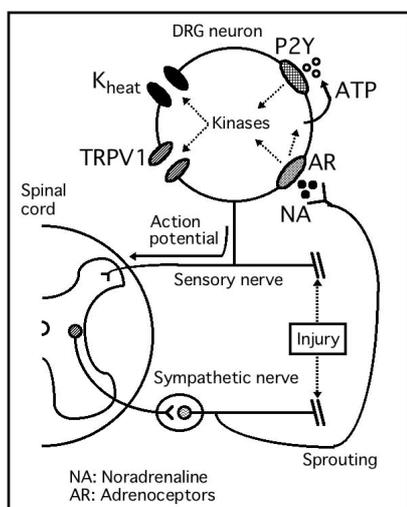


図3 末梢神経傷害による交感神経の発芽とDRG神経細胞の機能調節

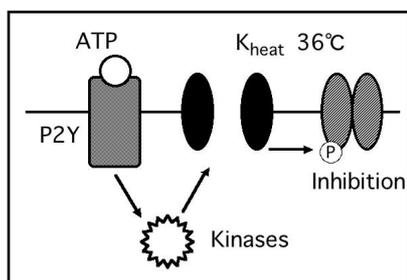


図4 ATPによる $K_{heat}$ 抑制機序

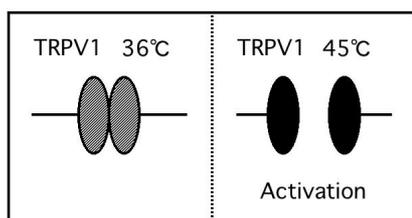


図5 TRPV1活性化機序 (通常)

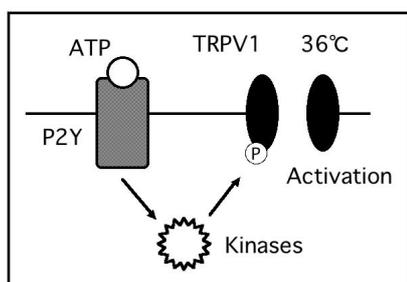


図6 TRPV1活性化機序 (ATP存在下)

### 3. 研究の方法

#### (1) ATPによる $K_{heat}$ チャンネル機能の抑制

「ATPが、P2Y受容体を介して $K_{heat}$ チャンネルを抑制し、DRG神経細胞の興奮性を亢進させる」という仮説を立証する実験を行う。

#### $K_{heat}$ チャンネル電流の記録

成熟ラットより単離したDRG神経細胞を対

象に、パッチクランプ法を用いて、熱刺激によって誘起される全膜電流を測定する。実験はTRPV1受容体の阻害薬存在下に行い、 $K_{heat}$ チャンネルの活性化によって発生した電流 ( $I_{K_{heat}}$ )のみを記録する。

#### ATPによる $K_{heat}$ チャンネル機能の抑制

P2Y受容体を介したATPの作用によって $I_{K_{heat}}$ が抑制されることをパッチクランプ法を用いて確認する。さらに、各種阻害薬を用いて、抑制作用がどのATP受容体サブタイプを介したのか、どの蛋白キナーゼを介したのか、を調べる。

#### (2) ATPによる $K_{heat}$ チャンネル温度依存性の変化

P2Y受容体を介したATPの $K_{heat}$ チャンネル抑制作用が、単に $K_{heat}$ チャンネルを抑制したもののなのか、それとも温度依存性を変化させたもののなのか、について検討する。

#### 熱刺激と温度データの記録

神経細胞への熱刺激は、灌流液の温度を急激に変化させることのできる熱刺激装置 (自作) を用いて行い、細胞の温度は、細胞の近傍に設置した高感度温度計でモニターする。温度データはデジタル変換してリアルタイムでコンピューターに記録し、 $K_{heat}$ チャンネル温度依存性のデータとして使用する。

#### $K_{heat}$ チャンネル温度依存性の測定

熱刺激によって誘起される $I_{K_{heat}}$ とで測定した温度データを用いて、 $K_{heat}$ チャンネルの温度依存曲線を描き、P2Y受容体を介した $I_{K_{heat}}$ の抑制がチャンネルの温度依存性変化によるものなのかどうか、を検証する。

#### (3) ATPによるTRPV1受容体の閾値低下

「NAの作用によってDRG神経細胞の興奮性が、特に神経因性疼痛モデルにおいて増加する」ということを立証する実験を $K_{heat}$ チャンネルを対象に行う。即ち、「NAによる $K_{heat}$ チャンネルの抑制が神経因性疼痛モデルで顕著である」ということを証明する。

#### TRPV1受容体電流の記録

NAによって $I_{K_{heat}}$ が抑制されることをパッチ単離DRG神経細胞を対象に、パッチクランプ法を用いて、熱刺激によって誘起される全膜電流を測定する。実験は $K_{heat}$ チャンネルの阻害薬存在下に行い、TRPV1受容体の活性化によって発生した電流 ( $I_{TRPV1}$ )のみを記録する (現在、 $K_{heat}$ チャンネルは $Ba^{2+}$ によって抑制されることが判明している)。

#### ATPによるTRPV1受容体機能の制御

P2Y受容体を介したATPの作用によって、体温付近でも $I_{TRPV1}$ が発生するようになることを確認するとともに、TRPV1受容体の温度依存曲線を描き、膜電位を測定する以下の実験の刺激温度を決める際の参考とする。

#### (4) TRPV1受容体の閾値低下との相乗作用による脱分極

「ATPが、P2Y受容体を介して $K_{heat}$ チャンネル

を抑制することに加えてTRPV1受容体の温度に対する閾値を低下させ、DRG神経細胞の興奮性が相乗的に亢進し、体温付近の温度でもより興奮しやすくなる」という仮説を立証する実験を行う。

#### 膜電位の記録

パッチクランプ法による記録をカレントクランプモードにすることにより、単離DRG神経細胞の膜電位を測定できる状態にする。

#### $K_{heat}$ チャネルの抑制による脱分極

$I_{TRPV1}$ の温度依存性を調べ、熱に対するTRPV1受容体の阻害薬存在下において、熱刺激によって $K_{heat}$ チャネルの活性化による過分極が発生することを記録し、P2Y受容体を介したATPの作用によって過分極の抑制・脱分極が起こることを確認する。

TRPV1受容体の閾値低下による脱分極の増強

$K_{heat}$ チャネルの阻害薬存在下において、熱刺激によってTRPV1受容体の活性化による脱分極が発生することを記録し、P2Y受容体を介したATPの作用によって脱分極の増強・閾値の低下が起こることを確認する。

#### ATPによる相乗的脱分極

TRPV1受容体・ $K_{heat}$ チャネルに対する阻害薬の非存在下における実験を(1)と(2)の実験と同様に行い、 $K_{heat}$ チャネルの抑制とTRPV1受容体の閾値低下が同時に起きることにより、DRG神経細胞の興奮性が相乗的に亢進することを証明する。また、この相乗作用により、体温に近い温度でもより容易に細胞が興奮することを立証する。

### 4. 研究成果

#### (1) $K_{heat}$ チャネル電流の記録

単一のDRG神経細胞における $K_{heat}$ チャネルの活性化によって発生する $K_{heat}$ チャネル電流について、パッチクランプ法を用いて電気生理学的に測定・検証した。その結果、熱刺激に対して反応するDRG神経細胞は、TRPV1受容体チャネルのみを発現するもの、 $K_{heat}$ チャネルのみを発現するもの、TRPV1受容体チャネルと $K_{heat}$ チャネルの両方を発現するもの、の3種類に分類できた。(図7) それぞれを発現している細胞の割合を調べたところ、約5%、約40%、約55%、であることが判明した。(図8)

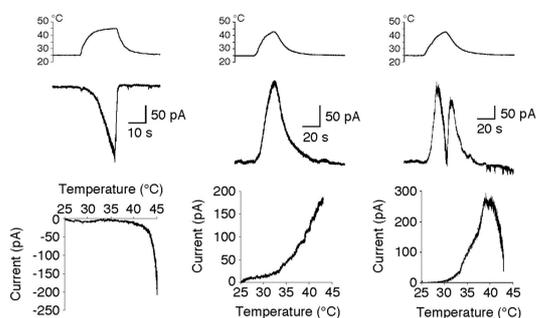


図7 DRG神経細胞における熱誘起性電流

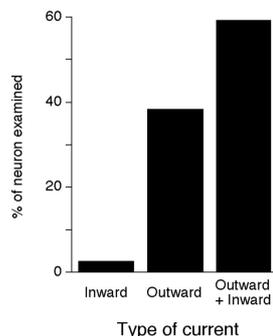


図8 DRG神経細胞における熱誘起性電流の分類

#### (2) $K_{heat}$ チャネルの温度依存性

$K_{heat}$ チャネルのみを発現している細胞について、 $K_{heat}$ チャネルの温度依存性を調べた。その結果、 $K_{heat}$ チャネルは25~33℃までは殆ど活性化されず、33℃以上の温度で急激に活性化されることが判明した。(図9)

#### (3) $K_{heat}$ チャネル電流およびTRPV1受容体電流の単離

DRG神経細胞には、TRPV1受容体と $K_{heat}$ チャネルが混在して発現している。それぞれの機能を観察するためには、この2者のうち1者のみを測定する実験条件を求めなければならない。それぞれを独立して阻害する条件を調べたところ、TRPV1受容体は ruthenium red (RR)にて(図9A,D)、 $K_{heat}$ チャネルは  $Ba^{2+}$  および tetraethylammonium (TEA)にて(図9B,D)、それぞれ阻害できることがわかった。また、 $K_{heat}$ チャネル電流は、-90mVに逆転電位をもち、電流-電圧関係は整流性がない linear な性質をもっていることが判明した(図9C)。

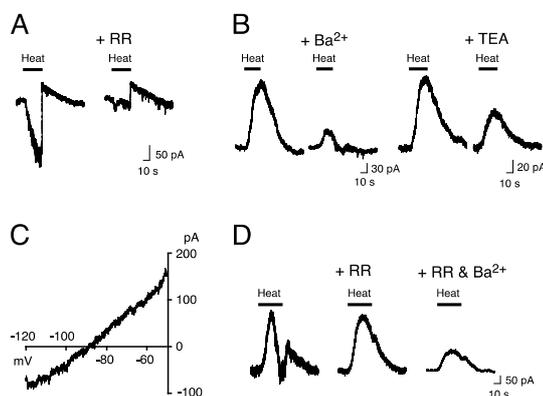


図9 DRG神経細胞における $K_{heat}$ チャネル電流およびTRPV1受容体電流の単離

#### (4) ATPによる $K_{heat}$ チャネル機能の制御

DRG神経細胞には、ATP受容体として、P2X受容体およびP2Y受容体が発現している。このうち、P2Y受容体は代謝型受容体であることから、 $K_{heat}$ チャネル機能を制御してい

る可能性があるため、P2Y 受容体による  $K_{heat}$  チャネルの機能変化について調べた。その結果、P2Y 受容体を介した  $K_{heat}$  チャネルの機能変化は確認できなかった。

#### (5) ATP による TRPV1 受容体の制御

DRG 神経細胞には、熱刺激により活性化される TRPV1 受容体が発現している。上記(4)と同様に、ATP が P2Y 受容体を介して TRPV1 受容体を制御する可能性について調べた。その結果、P2Y 受容体を介した TRPV1 受容体の機能変化は確認できなかった。

#### (6) まとめ

末梢神経傷害後に発生する神経因性疼痛は、創傷治癒後に持続する難治性疾患である。この疼痛に關与する分子として、DRG ニューロンにおける TRPV1 受容体と  $K_{heat}$  チャネルに注目して ATP の作用を検討した。しかしながら、現時点で ATP による TRPV1 受容体と  $K_{heat}$  チャネルの機能制御については確認できていない。その原因およびそれに対する対応として、下記の考察をした。

神経因性疼痛は、末梢神経が傷害された際に観察される病態である。今回の研究では、末梢神経が傷害されていない実験動物を対象に実施したため、ATP による TRPV1 受容体と  $K_{heat}$  チャネルの機能制御を観察出来ていない可能性がある。よって、今回の研究を末梢神経傷害モデル動物を使用して行い、ATP による TRPV1 受容体と  $K_{heat}$  チャネルの機能制御について引き続き検証したい。

TRPV1 受容体に対する ATP の作用を確認できなかった原因として、TRPV1 受容体を発現している細胞は、予想に反して非常に少数であったこと、また、TRPV1 受容体電流は、大きさが小さく、ATP による TRPV1 受容体の制御を観察することは困難であったこと、が考えられる。

### 5. 主な発表論文等

#### [雑誌論文](計2件)

Iwaoka E, Wang S, Matsuyoshi N, Kogure Y, Aoki S, Yamamoto S, Noguchi K, Dai Y. Evodiamine suppresses capsaicin-induced thermal hyperalgesia through activation and subsequent desensitization of the transient receptor potential V1 channels. J Nat Med, 70(1), 1-7, 2016. 査読有 DOI: 10.1007/s11418-015-0929-1

Wang S, Dai Y, Kogure Y, Yamamoto S, Zhang W, Noguchi K. Etodolac activates and desensitizes transient receptor potential ankyrin 1. J Neurosci Res. 91, 1591-1598, 2013, 査読有, DOI: 10.1002/jnr.23274

#### [学会発表](計1件)

Wang S, Iwaoka E, Kogure Y, Aoki S,

Yamamoto S, Noguchi K, Dai Y. Evodiamine activates transient receptor potential V1 as a partial agonist. The 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Nov 15-19, 2014. Washington DC (USA).

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

山本 悟史 (YAMAMOTO, Satoshi)  
兵庫医療大学・薬学部・教授  
研究者番号: 60220464

#### (2) 研究分担者

田中 康一 (TANAKA, Kohichi)  
兵庫医療大学・薬学部・助教  
研究者番号: 30274848

#### (3) 連携研究者

戴 毅 (DAI, Tsuyoshi)  
兵庫医療大学・薬学部・教授  
研究者番号: 20330441

小暮 洋子 (KOGURE, Yoko)  
兵庫医療大学・薬学部・助教  
研究者番号: 60548684