

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：33910

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670288

研究課題名(和文)細胞外マトリクスプロテオグリカンを介する新規の感作機構の解明

研究課題名(英文) Novel sensitizing mechanism for nociceptors through extracellular matrix proteoglycans

研究代表者

水村 和枝 (MIZUMURA, Kazue)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：00109349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：機械痛覚過敏の末梢性機構は不明な点が多い。細胞外マトリクスプロテオグリカンである versican の末梢性痛覚感作における役割を解明することを目的として本研究を実施した。ラットにおいて、酸による培養痛み受容器細胞の機械感受性増強にも、酸による筋痛み受容器線維の機械反応増強にも、versican の関与が示された。一方、MCP-1 は versican を介して感作作用を及ぼすことが報告されていたが、培養痛み受容器細胞レベルでも、組織レベルで皮膚痛み受容器線維の記録でも、versican の関与を示すことはできなかった。MCP-1 による感作には神経以外の細胞の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the role of an extracellular matrix proteoglycan, versican, in peripheral sensitization of nociceptors to mechanical stimulation. Decrease by low pH in the activation threshold of mechanically activated currents (MAC) was observed in cultured DRG neurons that showed augmented MAC by low pH and were versican (+). Sensitization of mechanical responses in muscle thin-fiber receptors were blocked by injection of chondroitin sulfate. These results confirmed an involvement of versican in acid-induced mechanical sensitization at cellular as well as at tissue levels. On the other hand, MCP-1, a chemokine, which was reported to induce mechanical hyperalgesia through versican, failed to induce sensitization of cultured DRG neurons to mechanical stimulation, and sensitized only presumably versican (-) cutaneous thin-fiber receptors. These results would not support the idea that MCP-1 sensitizes nociceptors through versican.

研究分野：神経生理学

キーワード：感作機構 機械的反応 細胞外マトリクス プロテオグリカン 酸 MCP-1 ケモカイン versican

## 1. 研究開始当初の背景

昨今、細胞外マトリクスは、中枢神経系における再生や、シナプス再構築において重要な役割を果たしているとして、注目を浴びている。しかし、末梢感覚受容器機能における役割は知られていない。

侵害受容系の入り口である侵害受容器は、ペプチドを持ち NGF の高親和性受容体である TrkA を発現しているグループと、*Griffonia simplicifolia* 由来の植物レクチン Iso-lectinB4 (IB4) との結合能をもち、多くは GDNF の受容体である Ret, GFR $\alpha$ 1,2 を発現している(1,2) グループの 2 つに大きく分けられる。2005 年に Bogen ら(3)によって、IB4 が細胞膜表層にある chondroitin sulfate proteoglycan の 1 つである versican と結合することが明らかにされた。しかし、versican を持つことがそれら受容器の反応性にどのように影響しているかは不明であった。一方、申請者水村らは、培養後根神経節細胞からの whole cell patch clamp 記録により機械感受性電流を記録して、酸による感作機構を調べていたところ、酸による機械感受性電流の感作が IB4(+) な細胞でより高頻度に起こること、また、細胞内情報伝達機構を介さないことを見出した(4)。この結果より、versican が機械感受性の感作に大きな役割を担っていることが推定された。

## 2. 研究の目的

細胞外マトリクスプロテオグリカンの 1 つである versican に着目し、細胞内情報伝達機構を介さない新規の感作機構の存在を明らかにし、その末梢性感作における役割を解明することを目的とする。IB4 との結合性を持つ (つまり versican を持つ) 痛み受容器の感作に、versican がどのように関与しているかを、パッチクランプ法による機械感受性電流の解析により調べ、さらに細径線維受容器からの単一神経記録により組織レベルで調べる。

MCP-1 (CCL2) はケモカインの 1 つで、単球/マクロファージの遊走に重要な役割を果たすことが知られている小型タンパク質で

ある。MCP-1 は感覚神経の一部に発現しており、それとその受容体 (CCR2) の発現は、末梢神経損傷や炎症で増強されることが報告されている (8-10)。Bogen ら (2005) は、MCP-1 の末梢投与により、機械痛覚過敏が生じ、それには IB4(+) の感覚神経が関与していること、その際、CCR2 の活性化が必要ないことを示唆した(3)。Bogen らは受容器の反応性が MCP-1 でどのように影響を受けるかについての解析はしていない。そこで、本研究では細胞外プロテオグリカンの感作における役割の解析のために、われわれが以前に解析した酸と MCP-1 とを選んだ。

## 3. 研究の方法

### 1) 培養後根神経節細胞の機械電流の記録

生後 3 週齢までのラットから取り出し、培養した後根神経節細胞を用いた(4)。機械感受性電流 (MAC) は、ピエゾ効果を利用したマイクロマニピュレータで培養後根神経節細胞を定量的に圧迫 (細胞に当たったプローブ先端を変位させる) したときに生じる電流(4,5,6) を、whole cell patch clamp 法により記録する。IB4(+) の細胞か (-) の細胞かは、実験終了後 IB4-Alexa fluor によって染色して確認する (記録前に染色すると細胞の状態が悪くなるので、実験の効率が悪くなるが染色は記録終了後に行う)。酸および MCP-1 は、Y チューブ法(7)を用い、細胞に直接振りかける。versican の関与の有無は、chondroitin sulfate (ゼリア新薬工業(株)より提供を受けた) の過剰投与と、chondroitinase ABC の投与により調べる。

### 2) 皮膚—神経標本、筋—神経標本からの細径線維受容器の単一神経記録

深麻酔下のラットより取り出した皮膚—伏在神経標本、長指伸筋—総腓骨神経標本を用い、dissection 法により、細径線維受容器活動を記録した(8)。記録した線維が IB4(+) の線維であるかどうかは、P2X3 受容体アゴ

ニスト ( $\alpha,\beta$ -methylene ATP、metATP と略す) に対する反応性から推定した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 培養後根神経節細胞(DRG 細胞)の機械感受性電流の酸による増強

これには、文献4に報告したように、細胞内情報伝達系ではなく、versican が重要な役割を担っていることを確認した。また、DRG 細胞の機械感受性電流が酸によって感作される場合、電流量が増大するばかりでなく、活性化閾値も低下することを明らかにした (図1)。皮膚侵害受容器の機械反応の増強を起こすものはいろいろと知られていたが、閾値を低下させるものとしては酸のみが報告されていた(11)。本結果はそれを支持するものとなった。

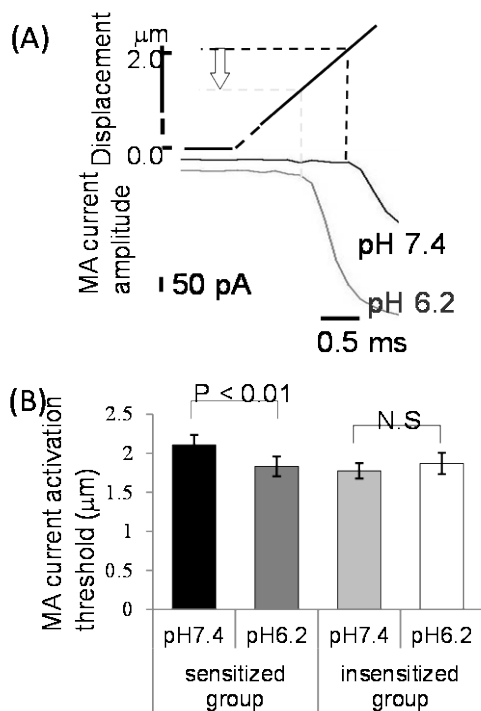


図1. 培養後根神経節細胞の機械感受性電流の活性化閾値の低下 (A) 変位量(displacement)と機械感受性電流の関係(生記録の1例)、活性化閾値を破線で示す。(B)感作群(sensitized group)でのみ有意な(p < 0.01)活性化閾値の低下が見られた。(発表文献②)

また、酸による筋細径線維受容器の機械反応の増強(閾値の低下、放電数の増加)は、chondroitin sulphate 0.3 % (5 $\mu$ l) の筋注後には見られなかった (論文準備中)。この結果は、酸による機械反応の感作に、versican が関与していることを組織レベルでも明らかにしたものと考えられる。

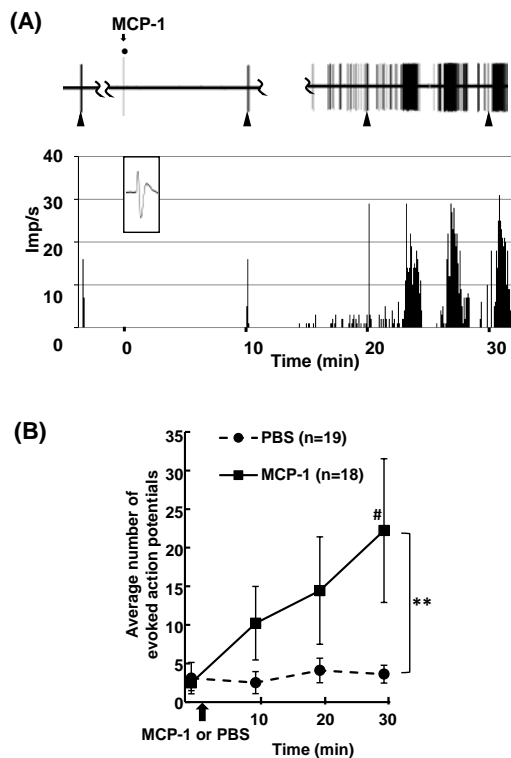


図2. 皮膚細径線維受容器の MCP-1 による興奮の1例(A)とまとめ(B)

Aの上段は、1つの受容器の放電の生記録。▲は機械刺激を与えた時点。下段は、1秒あたりの放電数の経時的ヒストグラム。Bは1回の機械刺激で生じた放電の数。●はPBS投与群、■はMCP-1投与群の反応。両群の反応の大きさには有意な差が見られた (\*\*, p < 0.01)。30分時点のMCP-1群の反応は、PBS群の反応より有意に大きかった (#, p < 0.05) (発表文献①)

##### 2) MCP-1による感作機構

取り出し皮膚一伏在神経標本から機械感受性C-線維受容器活動を記録し、MCP-1 100 ng/ml を30分間投与したところ、15分後あたりから、時に激しい興奮を引き起こした。これは記録した約半数の線維で見られた (図2)。これには metATP に対する感受性の有

無による差は見られなかった (metATP 感受性(+)線維では 3 例中 7 例が、metATP 非感受性(-)線維では 6 例中 11 例が MCP-1 に反応した, Fisher's exact probability test で有意差なし)。低濃度 (10 ng/ml) では約 25% の線維に興奮が見られた。

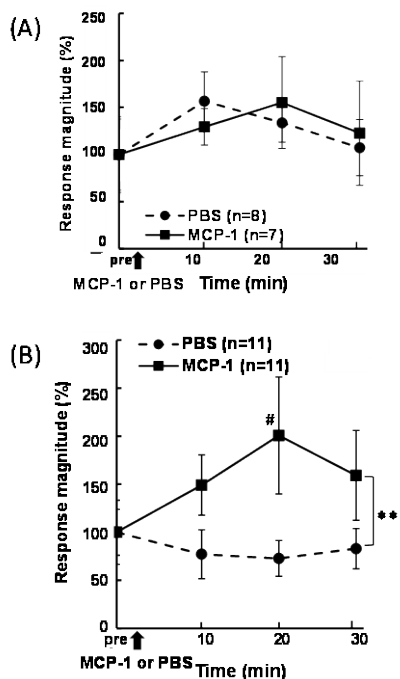


図 3. 皮膚細径線維受容器の機械反応の MCP-1 による増強  
A: metATP に反応した群。PBS 投与群と MCP-1 投与群との間に有意差なし。B: metATP に反応しなかった群。MCP-1 投与群の反応が有意に大きかった (\*\*,  $p < 0.01$ )。 (発表文献①)

一方、機械刺激に対する反応は metATP(-) 線維群では MCP-1 による反応の増強が見られたが(図 3B)、metATP(+)線維群では有意な増強は見られなかった(図 3A)。しかし、MCP-1 によって興奮が生じた群と生じなかった群の間には、MCP-1 による機械感作に違いは見られなかった (図 4)。さらに、MCP-1 効果の細胞内・外機構を明らかにするため、DRG 細胞の機械感受性電流に対する MCP-1 の効果を調べたが、明らかな増強は見られなかった (図 5)。

これらの事実は、MCP-1 の痛み受容器に対する効果には、他の細胞が関与している可

能性があることを示唆する。

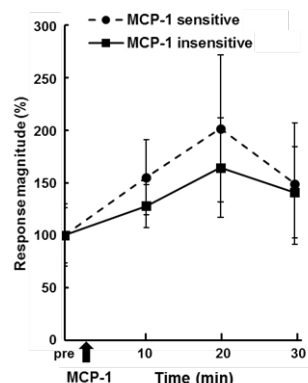
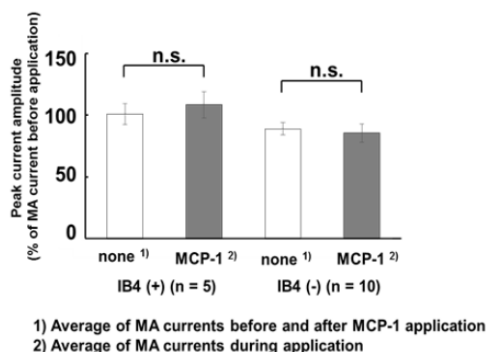


図 4. 皮膚細径線維受容器の機械反応の MCP-1 による増強  
MCP-1 による興奮の有 (●) 無 (■) によって分けた群間に有意な差はなかった。(発表文献①)

これらの結果より、細径線維受容器の機械反応の酸による感作は、versican が関与する細胞外機構を介して生じていることが確認された。MCP-1 による感作は、予想とは異なり、組織レベル (皮膚-神経標本) でしか見られず、培養後根神経節細胞では見られなかったことから、神経以外の他の細胞が関与している可能性があることが示唆された。しかし、酸以外にこの新規の感作機構による感作があるかどうか、今回の結果からは残念ながら明らかにならなかった。この感作機構が、他の感作物質にも存在するかどうかについては、今後のさらなる研究が必要である。



1) Average of MA currents before and after MCP-1 application  
2) Average of MA currents during application

図 5. 培養後根神経節細胞の機械感受性電流に対する MCP-1 の効果  
IB4(+), IB4(-)群とも、感作(増強)は見られなかった。(発表文献①)

## <引用文献>

- 1) Averill et al, Eur. J. Neuroci, 7: 1484-1494, 1995.
- 2) Bennett et al. Eur. J. Neuroci, 8: 2204-2208, 1996.
- 3) Bogen et al. FEBS J, 272: 1090- 1102, 2005.
- 4) Kubo et al. J. Physiol. 590: 2995-3007, 2012.
- 5) Drew et al. J. Neurosci. 22: RC228, 2002
- 6) Hu & Lewin, J.Physiol.577; 815-828, 2006
- 7) Murase et al. Neurosci. Lett, 103, 56-63, 1989
- 8) Tanaka et al. Neurosci. Res. 48:463-469, 2004.
- 9) White et al. Proc Natl Acad Sci USA 102:14092-14097, 2005.
- 10) Zhang et al. J. Pain 14 :1031-1044, 2013.
- 11) Steen et al. J.Neurosci. 12:86-95, 1992.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① A. Kubo, T. Taguchi, K. Mizumura, Monocyte chemoattractant protein-1-induced excitation and sensitization to mechanical stimulation of mechanosensitive C-fiber afferents in rat skin. Neuroscience Research 査読有 91: 13-18, 2015, 10.1016/j.neures.2014.10.014
- ② N. Hotta, A. Kubo, K. Mizumura, Effect of protons on the mechanical response of rat muscle nociceptive fibers and neurons in vitro. Neuroscience Research, 査読有 92 : 46-52, 2015, 10.1016/j.neures.2014.11.001

[学会発表] (計 3 件)

- ① K. Mizumura, N. Hotta, A. Kubo. Extracellular matrix proteoglycan plays a pivotal role in mechanical sensitization by

low pH of thin muscle afferent fibers. 3 月 18 日、2013 年、第 91 回日本生理学会大会、鹿児島大学 (鹿児島)

- ② A. Kubo T. Taguchi, K. Mizumura. Mechanosensitive C-fiber afferents in rat skin was excited and sensitized to mechanical stimulation by monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). 第 37 回日本神経科学大会、9 月 11-13 日、2014、パシフィコ横浜 (横浜)
- ③久保 亜抄子、田口 徹, 水村 和枝 ラット皮膚機械感受性求心性 C 線維に対する MCP-1 の作用 第 36 回日本疼痛学会 6 月 21 日、2014、KKR ホテル大阪 (大阪)

[その他]

ホームページ

中部大学大学理学療法学科水村研究室  
<http://www.isc.chubu.ac.jp/myalgia/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水村 和枝 (MIZUMURA, Kazue)  
中部大学・生命健康科学部・教授  
研究者番号 : 00109349

### (2) 研究協力者

久保 亜抄子 (KUBO, Asako) 中部  
大学・生命健康科学部・水村研究  
室・研究員 (現日本大学・歯学部・  
研究員)

堀田 典生 (HOTTA, Norio) 中部  
大学・生命健康科学部・講師

田口 徹 (TAGUCHI, Toru) 名古  
屋大学・環境医学研究所・講師