

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460348

研究課題名(和文)末梢性代謝型グルタミン酸受容体による熱痛覚過敏および鈍麻の分子機構解明

研究課題名(英文) Mechanisms of heat hyper- and hypoalgesia by peripheral metabotropic glutamate receptors

研究代表者

西尾 眞友 (NISHIO, Matomo)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：80156041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：末梢組織におけるグルタミン酸は炎症や組織障害によって細胞外に放出されることが知られている。本研究では、グルタミン酸が後根神経節細胞の代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1/5)に作用して、侵害受容性神経におけるTRPV1機能亢進、電位依存性カルシウムチャネルの抑制や機能的TRPV1発現神経細胞の増加を引き起こすことを明らかにした。また、これらの作用はグルタミン酸による多相性の痛みの調節と深く関連していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Wounds and inflammation cause glutamate release from primary sensory nerve afferents and damaged cells in the peripheral tissue. In this study, we have revealed that glutamate acts on metabotropic glutamate receptors 1 and 5 (mGluR1/5) in dorsal root ganglion neurons, resulting in potentiation of TRPV1 activities, inhibition of voltage-gated calcium channels and increase of neurons expressing functional TRPV1. These effects are closely associated to multiphasic modulation by glutamate of pain.

研究分野：薬理学

キーワード：代謝型グルタミン酸受容体 後根神経節 痛覚過敏 TRPV1

## 1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸受容体には、イオン型ならびに代謝型受容体が存在し、代謝型グルタミン酸受容体は 8 種類(mGluR1-8)のサブタイプが同定されている。特に、mGluR1 および mGluR5 は共に Gq/11 蛋白質に共役するグループ I mGluRs に分類されており、神経系において神経細胞の膜興奮性やシナプス伝達効率を調節する鍵分子のひとつである。これら受容体は記憶・情動など高次脳機能の制御に重要であることがよく知られているが、近年、感覚情報の受容・伝達、特に痛覚の制御に関与していることが明らかになってきた。末梢組織におけるグルタミン酸は炎症や組織障害によって細胞外に放出されて、自発痛の発生や痛覚の増強に関与していると考えられていることから、感覚神経上に発現するグルタミン酸受容体の機能を理解することは、痛覚の調節ならびに疼痛病態を理解するうえで重要である。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、これまでにマウス後肢足底にグルタミン酸受容体作動薬を皮下投与すると、熱性痛覚の一過性増強の後に鈍麻を起こすことを明らかにした。この二相性の作用は、mGluR5 拮抗薬を同時に投与することにより完全に抑制されることから、グルタミン酸は mGluR5 受容体に作用することによって相反する作用を引き起こすことが判明した。本研究では、後根神経節の初代培養細胞を用いて、このような mGluR5 受容体を介した痛覚応答の多彩な制御機構のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

1 週齢のマウスより後根神経節を摘出し、コラーゲナーゼ処理によって細胞を分散させたのち、PLL コートしたカバーガラス上で培養した。初代培養細胞は 1-3 日間培養したのち、蛍光イメージングによる細胞内カルシウム動態の解析ならびにホールセルパッチクランプ法による膜電流応答の測定を実施した。

## 4. 研究成果

Fura-2 色素をロードした後根神経節初代培養細胞において、グルタミン酸作動薬を灌流時のカルシウム動態を測定したところ、有意な変化はいずれの細胞においても見られなかった。しかし、侵害熱受容器である transient receptor potential cation channel

subfamily V member 1 (TRPV1) をカプサイシンによって刺激した際に見られる細胞内カルシウム濃度上昇は、グルタミン酸受容体作動薬存在下で増強し、一方でグルタミン酸受容体作動薬 washout 後では抑制されることが明らかとなった。また、この反応は mGluR5 拮抗薬によって消失したことから、mGluR5 を介した熱性痛覚応答の制御が後根神経節細胞上でも再現されることが確認できた。

次に、詳細な分子機構を解析するため TRPV1 を介する電流応答に対する mGluR5 リガンドの効果をホールセル記録により検討した。その結果、TRPV1 電流はリガンドによる mGluR5 刺激によって一過性に増強するが、リガンド washout 後では電流応答が元の大きさに戻るだけでそれ以上減少することはなかった。そこで、mGluR5 刺激後のカプサイシン誘発細胞内カルシウム応答の減弱に関与する分子について検討した。電位依存性カルシウムチャネルの非選択的阻害薬のカドミウム存在下では、mGluR5 によるカプサイシン誘発細胞内カルシウム応答の抑制は観察されないことが判明した。また、電位依存性カルシウム電流を計測したところ、mGluR5 が刺激されることにより不可逆的に抑制されることが明らかになった。したがって、(1) mGluR5 による熱性痛覚応答の増強ならびに細胞内カルシウム応答の増強は、TRPV1 チャネルの機能亢進に起因し、(2) mGluR5 刺激後の熱性痛覚応答の鈍麻ならびに細胞内カルシウム応答の抑制は、電位依存性カルシウムチャネルの不可逆的抑制に起因していることを明らかにすることができた。(発表論文)

生体内でのグルタミン酸濃度の上昇は、炎症時には数時間に及ぶことが知られている。そこで、後根神経節のグルタミン酸受容体を持続的に刺激することにより、侵害受容器の機能がどのように変化するか検討した。後根神経節培養細胞を 4 時間以上持続的にグルタミン酸に暴露することにより、mGluR1 および mGluR5 の活性化を介して機能的に TRPV1 を発現する神経細胞の割合を増加させることが明らかになった。この変化は、特にポリモダル受容器のひとつである TRPA1 チャネルを発現する細胞群で顕著であった。また、本作用はホスホリパーゼ C (PLC) およびプロテインキナーゼ C、ERK、MAPK の活性化を介していることも明らかにした。また、in vivo において高用量のグルタミン酸リガンドを投与した際に示す持続的な熱性

痛覚過敏を引き起こし、この作用が mGluR1 および mGluR5 いずれの拮抗薬でも抑制されることが確認できた。以上の結果から、末梢における持続的なグルタミン酸濃度の上昇は、侵害受容性神経における機能的 TRPV1 の発現を増加させて、侵害熱に対する痛覚過敏を引き起こすことが示唆された。(発表論文)

最後に、炎症性疾患時にグルタミン酸を介する痛覚応答が変化するか検討を行った。完全フロイトアジュバンドを後脚足底に投与して作製した炎症性疼痛モデル動物において、mGluR1 および mGluR5 を刺激することにより誘発される痛覚関連行動が、炎症誘発後3日目から顕著に増加することが明らかになった。この作用は、神経栄養因子受容体 Trk の拮抗薬 K252a によって完全に抑制された。本現象と類似した応答が後根神経節培養細胞でも観察された。すなわち、対照群では mGluR1/5 を刺激しても細胞内カルシウム濃度上昇が起きる細胞はほとんど見られないが、神経栄養因子のひとつである NGF を3日間処置した培養細胞では mGluR1/5 刺激により約 12%の細胞で細胞内カルシウム濃度上昇が起きることが判明した。したがって、炎症病態時には、神経栄養因子を介するシグナルによって侵害受容性神経における mGluR1/5 を介するグルタミン酸応答が増強していることが示唆された。

本研究から、末梢性グルタミン酸は侵害受容性神経の mGluR1/5 に作用することにより、正常な痛みの制御や炎症疾患時の疼痛発生に深く関与していることが明らかになった。

#### 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8件)

Masuoka T, Kudo M, Yamashita Y, Yoshida J, Imaizumi N, Muramatsu I, Nishio M, Ishibashi T. TRPV1 channels modify TRPV1-mediated current responses in dorsal root ganglion neurons. *Front Physiol.* 8: 272, 2017. doi: 10.3389/fphys.2017.00272. 査読有

Muramatsu I, Yoshiki H, Uwada J, Masuoka T, Sada K, Taniguchi T, Nishio M. Pharmacological evidence of specific acetylcholine transport in rat cerebral cortex and other brain regions. *J Neurochem.* 139(4):566-575, 2016. doi: 10.1111/jnc.13843. 査読有

Masuoka T, Kudo M, Yoshida J, Ishibashi T, Muramatsu I, Kato N, Imaizumi N, Nishio M. Long-term activation of group I metabotropic glutamate receptors increases functional TRPV1-expressing neurons in mouse dorsal root ganglia. *Front Cell Neurosci.* 10: 79, 2016. doi: 10.3389/fncel.2016.00079. 査読有

Masuoka T, Nakamura T, Kudo M, Yoshida J, Takaoka Y, Kato N, Ishibashi T, Imaizumi N, Nishio M. Biphasic modulation by mGlu5 receptors of TRPV1-mediated intracellular calcium elevation in sensory neurons contributes to heat sensitivity. *Br J Pharmacol.* 172(4): 1020-1033, 2015. doi: 10.1111/bph.12962. 査読有

Masuoka T, Ishibashi T, Nishio M. Biphasic modulation of noxious heat sensitivity in sensory neurons by peripheral metabotropic glutamate receptors. *Inflamm Cell Signal.* 2: e602, 2015. doi: 10.14800/ics.602. 査読有

吉田純子、石橋隆治、益岡尚由、今泉範子、西尾真友 .カルシウムシグナル分子 STIM1/Orai1 とがん .金沢医科大学雑誌, 40(2-3): 69-77, 2015. 査読有

Yoshiki H, Uwada J, Anisuzzaman AS, Umada H, Hayashi R, Kainoh M, Masuoka T, Nishio M, Muramatsu I. Pharmacologically distinct phenotypes of  $\alpha 1B$ -adrenoceptors: variation in binding and functional affinities for antagonists. *Br J Pharmacol.* 171(21): 4890-4901, 2014. doi: 10.1111/bph.12813. 査読有

Uwada J, Yoshiki H, Masuoka T, Nishio M, Muramatsu I. Intracellular localization of the M1 muscarinic acetylcholine receptor through clathrin-dependent constitutive internalization is mediated by a C-terminal tryptophan-based motif. *J Cell Sci.* 127(14):3131-3140, 2014. doi: 10.1242/jcs.148478. 査読有

[学会発表](計13件)

益岡尚由、工藤麻希子、吉田純子、山下優香、今泉範子、西尾真友、石橋隆治 炎症による代謝型グルタミン酸受容体アゴニスト誘発痛覚行動の増強における神経成長因子関与 第90回日本薬理学会年会、

長崎ブリックホール(長崎県長崎市)  
2017年3月15日

Masuoka T, Kudo M, Ishibashi T, Nishio M. TRPA1 channel modifies membrane current induced by TRPV1 channels activation in dorsal root ganglion neurons. Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA, 2016年11月12-16日

益岡尚由、吉田純子、工藤麻希子、今泉範子、西尾真友、石橋隆治。神経成長因子による知覚神経のグルタミン酸受容体機能変化。第67回日本薬理学会北部会、北海道大学学術交流会館(北海道札幌市) 2016年9月30日

Masuoka T, Ishibashi T, Nishio M. Possible contribution of glutamate receptors in ocular hyperalgesia. International Society for Eye Research, 京王プラザホテル(東京都新宿区) 2016年9月25-29日

村松郁延、吉木はつみ、宇和田淳介、益岡尚由、定清直、谷口隆信、西尾真友。中枢における新規アセチルコリン伝達機構。第20回活性アミンに関するワークショップ、ホテルマークワンつくば研究学園(茨城県つくば市) 2016年8月20日

村松郁延、吉木はつみ、宇和田淳介、益岡尚由、定清直、谷口隆信、西尾真友。中枢におけるコリン作動性伝達機構。第18回応用薬理シンポジウム、名古屋大学医学部(愛知県名古屋市)、2016年8月5、6日

益岡尚由、工藤麻希子、石橋隆治、西尾真友。TRPA1を発現する後根神経節細胞におけるTRPV1を介した細胞応答の電気生理学的特徴第89回日本薬理学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016年3月10日

工藤麻希子、益岡尚由、村松郁延、西尾真友。不可逆的コリンエステラーゼ阻害薬による海馬シナプス伝達長期増強の促進における細胞内アセチルコリン受容体の関与。第89回日本薬理学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016年3月10日

益岡尚由、工藤麻希子、吉田純子、石橋隆治、今泉範子、西尾真友。短時間および長時間のグルタミン酸受容体活性化による後根神経節細胞のcapsaicinに対する応答性変化。第66回日本薬理学会北部会、富山国際会議場(富山県富山市) 2015年9月18日

村松郁延、吉木はつみ、宇和田淳介、益岡尚由、定清直、谷口隆信、西尾真友。中枢神経におけるアセチルコリンの取り込み。第19回活性アミンに関するワークショップ小名浜オーシャンホテル(福島県いわき市) 2015年8月20-21日

Masuoka T, Gallar J, Belmonte C. Effects of sodium channel blocker amitriptyline on the spontaneous and stimulus-evoked activity of corneal cold-sensitive nerve terminals in intact and tear-deficit guinea-pig eye. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Denver, CO, USA, 2015年5月3日

今泉範子、吉田純子、石橋隆治、益岡尚由、西尾真友。レスベラトロールはA431細胞のカベオリン1をダウンレギュレートする。第88回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市) 2015年3月19日

Gallar J, Masuoka T, Belmonte C. Effects of amitriptyline on the spontaneous and stimulus-evoked activity of corneal cold-sensitive nerve terminals. Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics, Charleston, SC, USA, 2015年2月26日-3月1日

#### [図書](計1件)

Muramatsu I, Yoshiki H, Sada K, Uwada J, Taniguchi T, Masuoka T, Nishio M. Binding method for detection of muscarinic acetylcholine receptors in receptor's natural environment. Myslivecek J and Jakubik J (eds.) /Muscarinic Receptor: From Structure to Animal Models, Neuromethods, vol. 107, page 69-81 (chapter 4), 2015, Springer (Humana Press)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

西尾 真友 (NISHIO, Matomo)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 80156041

##### (2)研究分担者

益岡 尚由 (MASUOKA, Takayoshi)  
金沢医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 80509307