

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 12 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：2014～2016

課題番号：26460713

研究課題名(和文) TRPチャンネルを介したAMPキナーゼによる疼痛制御とその分子機構の解明

研究課題名(英文) pain modulation by AMP kinase through TRP channels and its molecular mechanism

研究代表者

戴 毅 (DAI, YI)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：20330441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：AMPキナーゼは、細胞内AMP濃度の上昇によって活性化し、グルコースや脂肪酸の利用、遺伝子発現、タンパク合成など多様な生理機能に関与し、細胞のエネルギー恒常性の最上位の調節因子として重要な役割を担っている。一方、TRPチャンネルは感覚神経に存在する痛みの受容に関わる重要なセンサータンパクとして知られている。

本研究では一次感覚神経におけるAMPKの活性化によるTRPチャンネルの機能調節に着目し、疼痛発症におけるAMPKの役割と、その疼痛制御の分子機構を解明した。

研究成果の概要(英文)：AMP activated protein kinase (AMPK) is a widely expressed intracellular energy sensor that monitors and modulates energy expenditure. AMPK is activated in response to ATP consumption, and upon activation, AMPK phosphorylates a broad range of downstream targets, which results in a reduction in energy usage and an increase in energy production. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel is a widely recognized chemical and thermal sensor that plays vital roles in pain transduction.

Here, we discovered a functional link between AMPK and TRPA1 in dorsal root ganglion (DRG) neurons, in which AMPK activation rapidly inhibit TRPA1 channel activity within minutes. These observation demonstrated an important role and the molecular mechanism of AMPK in pain generation.

研究分野：Pain Research

キーワード：AMPK TRPA1 Pain

1. 研究開始当初の背景

感覚神経終末に発現する TRP (とくに TRPV1、TRPA1 と TRPM8) チャンネルは、温度、化学物質、機械刺激など種々な痛み刺激を受容するセンサーであり、痛みの発生において重要な役割を担っている。研究代表者らは 10 数年前から慢性・難治性疼痛における TRP チャンネルの関与に着目し、炎症や神経障害時における TRPV1、TRPA1 の発現変化、およびそのチャンネル活性増強・抑制機構を解明してきた。

一方、AMPK は、低グルコースや低酸素状態、虚血、熱ショックなど、細胞への ATP 供給を枯渇させるようなストレスに応答して活性化し、糖の取り込み・脂肪酸酸化といったエネルギー産生を促進する一方、脂肪合成・タンパク質合成などのエネルギー消費経路を抑制し、結果的に細胞内のエネルギーを回復させる方向へと導く (Hardie et al., Nat Rev. 2012)。神経細胞がグルコースをその主なエネルギー源としていることから、脳虚血やアルツハイマー病などにおける AMPK の機能をよく調べられてきた一方、疼痛の受容、伝達、疼痛過敏における AMPK の役割に関する知見が極めて少ない。ごく最近、炎症性疼痛は AMPK の activator 投与によって緩和するデータが報告されたが、そのメカニズムや TRP チャンネルとの関連が不明である (Russe et al., J Pain. 2013)。研究代表者らの直近の実験データでは、AMPK の activator が TRPA1 チャンネルの機能を抑制し、疼痛行動を軽減することが示された (Yu et al., Mol Pain. 2013)。これらのデータにより、AMPK シグナルは TRPA1 チャンネルを介して、疼痛受容の制御に関与する可能性が強く示唆された。そこで、研究代表者が疼痛受容における AMPK の活性化と感覚神経に広く発現するセンサータンパクである TRP チャンネルとの機能連関に着目し、慢性炎症性疼痛、神経障害性疼痛および糖尿病性末梢神経障害におけるエネルギー代謝と疼痛制御との関連性とその分子機構を解明する。

ギー代謝と疼痛制御との関連性とその分子機構を解明する。

2. 研究の目的

本研究は AMPK シグナルによる TRP チャンネル型受容体の機能調節に着目し、疼痛受容における AMPK の役割とその分子メカニズムを解明する。具体的な目的を下記に述べる。

(1) 慢性疼痛モデル (炎症性、神経障害性および糖尿病性神経障害) 実験動物を用いて、痛みを生じる病的状態における AMPK の活性化変化とその下流シグナルを明らかにする。

(2) TRP チャンネルを介した AMPK シグナルによる疼痛制御の有無とその制御機序を明らかにする。

(3) 一次求心性ニューロンにおける AMPK の活性化と TRP チャンネル (TRPV1、TRPA1 と TRPM8 を中心に) との物理的、機能的 interaction を解明する。

(4) 発現系 HEK 細胞やラット一次求心性ニューロンにおける AMPK による TRP チャンネル活性の調節の細胞内メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) In vivo 研究: 慢性疼痛モデル動物を作成し、免疫染色法や insitu ハイブリダイゼーション法など形態学的手法と、遺伝子ノックダウン (siRNA) など分子生物的手法と行動薬理学的手法を併用した機能解析によって、AMPK の役割および TRP チャンネルとの関連性を検証する。

(2) In vitro 研究: Ca²⁺ imaging 法および Patch Clamp 法を用いて AMPK による TRP チャンネル機能調節の細胞内分子メカニズムを解析する。さらにウェスタンブロッティング法や免疫沈降法を用いて TRP チャンネルの AMPK バインディングサイトとリン酸化サイトを同定し、TRP タンパクのリン酸化修飾や膜インサート制御の可能性を含めた AMPK の細胞内調節機構を解明する。

4. 研究成果

(1) CFA 炎症性疼痛モデルにおける AMPK の活性化変化

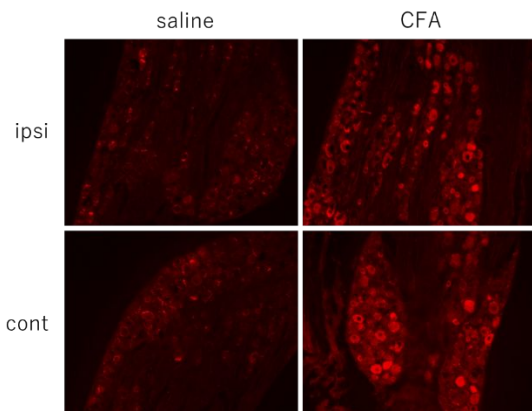


図1: DRG におけるリン酸化 AMPK の発現。コントロール群の Saline ラットに比べて、炎症性疼痛モデル (CFA) ラットでは、AMPK リン酸化の増加が認められた。

(2) DRG ニューロンにおける TRPA1 チャンネルとリン酸化 AMPK の共存

DRG ニューロンにおける TRPA1 チャンネル蛋白の発現を正確に染色できる抗体がなかったため、共存が確認できていません。

(3) AMPK アゴニストが TRP チャンネルを介した細胞内カルシウム流入への影響

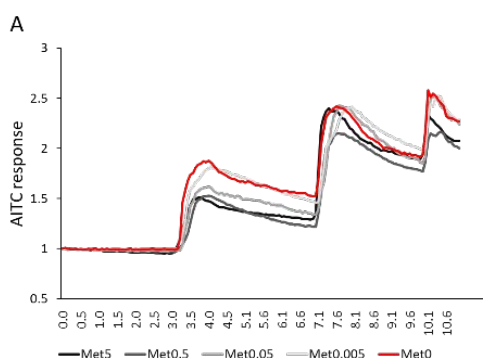


図2: メトフォルミン (Met, AMPK アゴニスト) の用量依存的抑制作用が Fura2 を用いたカルシウムイメージング法によって確認された。

(4) AMPK アゴニストが TRP チャンネルを介した内向き電流への影響

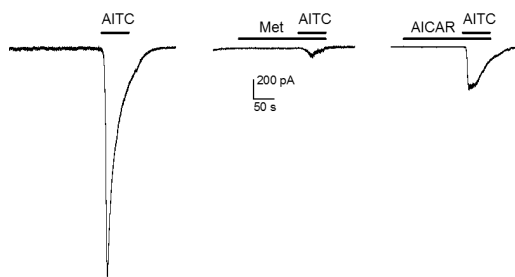


図3: AITC 誘発 TRPA1 内向き電流に対する AMPK アゴニスト Met と AICAR の抑制作用が認められた。

(5) 低、高グルコース条件下における DRG ニューロン内 AMPK の活性化と不活性化

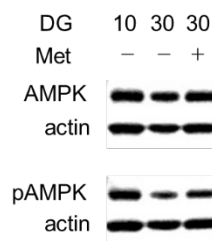


図4: 培養液のグルコース濃度は、DRG ニューロンにおける AMPK 活性化を調節することを明らかにした。(低グルコース: 強、高グルコース: 弱)

(6) TRP チャンネルの AMPK バインディングサイトとリン酸化サイトの同定

免疫沈降実験において、TRPA1 のバインディングが確認できなかった。(抗体の問題があるため、バインディングサイトの有無について判定できなかった)

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 7 件)

戴 毅、野口光一、痛みの Clinical Neuroscience 痛みに対する漢方とニューロサイエンス、最新医学 71 巻, 11 号 Page2134-2138, 2016.11, 査読無

Kogure Y, Wang S, Tanaka KI, Hao Y, Yamamoto S, Nishiyama N, Noguchi K, Dai Y. Elevated H2O2 levels in TNBS-induced colitis rats contributes to visceral hyperalgesia through interaction with the TRPA1 cation channel. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016 Jun; 31(6):1147-1153. doi: 10.1111/jgh.13226., 査読有

戴 毅、【痛みとかゆみ】総合的対応痛みに対する薬物治療、*JOHNS (Journal of Otolaryngology, Head and Neck Surgery)* Vol.32, No.5, 617-621, 2016.5, 査読無

Wang S, Yamamoto S, Kogure Y, Zhang W, Noguchi K, Dai Y. Partial Activation and Inhibition of TRPV1 Channels by Evodiamine and Rutaecarpine, Two Major Components of the Fruits of *Evodia rutaecarpa*. *J Nat Prod*. 2016 May 27;79(5):1225-1230. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00599. Epub 2016 May 9., 査読有

Dai Y. TRPs and pain. *Semin Immunopathol*. 2016 May;38(3):277-291. doi: 10.1007/s00281-015-0526-0. Epub 2015 Sep 15. Review, 査読無

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*. 2016 Jan;70(1):1-7. doi: 10.1007/s11418-015-0929-1. Epub 2015 Jul 19., 査読有

戴 毅、野口光一、イオンチャネルと痛み、*Locomotive Pain Frontier*、Vol.4 No.1, 18-24, 2015.4, 査読無

〔学会発表〕(計 6 件)

Wang S, Kobayashi K, Yamanaka H, Kogure Y, Yamamoto S, Noguchi K, Dai Y;

Modulation of TRPA1 activation by AMP activated protein kinase. 46th annual meeting of neuroscience 2016, San Diego Convention Center (San Diego, CA, U.S.A.), 2016. 11. 13

Wang S, Kojima Y, Kogure Y, Yamamoto S, Noguchi K, Dai Y; TRPA1 is involved in vincristine induced cold allodynia. 16th world congress on pain, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2016. 9. 30

Wang S, Yamamoto S, Kogure Y, Zhang W, Noguchi K, Dai Y. Partial activation and inhibition of TRPV1 channels by evodiamine and rutaecarpine, two major components of *evodiae fructus*. 18th International congress of oriental medicine 2016, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市), 2016. 4. 16

HAO Y, WANG S, KOGURE Y, YAMAMOTO S, MIWA H, NOGUCHI K, DAI Y; TRPA1, but not TRPV1 contributes to the colonic motility-dependent visceral pain in rats. 44th annual meeting of neuroscience 2014, Walter E. Washington Convention Center (Washington D.C., U.S.A.), 2014. 11. 18

KOGURE Y, WANG S, TANAKA K-I, YAMAMOTO S, NISHIYAMA N, NOGUCHI K, DAI Y; Role of hydrogen peroxide and TRPA1 in visceral hyperalgesia in trinitrobenzene sulphate-induced colitis. 44th annual meeting of neuroscience 2014, Walter E. Washington Convention Center (Washington D.C., U.S.A.), 2014. 11. 18

WANG S, IWAOKA E., KOGURE Y, AOKI S., YAMAMOTO S, NOGUCHI K, DAI Y; Evodiamine activates transient receptor potential V1 as a partial agonist. 44th annual meeting of neuroscience 2014, Walter E. Washington Convention Center (Washington D.C., U.S.A.), 2014. 11. 16

6 . 研究組織

(1)研究代表者

戴 毅 (Dai Yi)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号 : 20330441

(2)連携研究者

山本 悟史 (Yamamoto Satoshi)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号 : 60220464

野口 光一 (Noguchi Koichi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 10212127

王 勝蘭 (Wang Shenglan)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号 : 50714359

小暮 洋子 (Kogure Yoko)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号 : 60548684