

脊椎動物感覚ニューロンの  
興奮性調節に寄与する  
イオンチャネルと細胞膜受容体

山口大学大学院連合獣医学研究科

松下 有美

2021年3月

山口大学博士（獣医学）学位論文

脊椎動物感覚ニューロンの  
興奮性調節に寄与する  
イオンチャネルと細胞膜受容体

山口大学大学院連合獣医学研究科

松下 有美

2021年3月

指導教員 北村 直樹 准教授

# 目次

## 第1章

末梢感覚神経終末における $\alpha_2$ アドレナリン受容体を介したTRPV1の抑制による

鎮痛効果とそのメカニズムの解明…………… 1

要約…………… 2

緒論…………… 5

材料と方法…………… 8

    使用動物と組織標本…………… 8

    行動学的実験…………… 8

    生化学的実験…………… 11

    免疫組織化学的実験…………… 14

    電気生理学的実験…………… 16

    使用薬物…………… 23

    解析と統計処理…………… 29

実験成績	30
Capsaicinによって誘発される疼痛関連行動に対するアドレナリン作動薬の作用	30
熱刺激誘発性の疼痛関連行動に対するクロニジンの作用	38
Formalin誘発性の疼痛関連行動に対するクロニジンの作用	40
DRGに発現する $\alpha_2$ アドレナリン受容体サブタイプmRNAの検討	46
DRGにおけるTRPV1と $\alpha_2$ 受容体の発現の免疫組織化学的検討	46
ノルアドレナリンによるcapsaicin誘発電流の濃度依存的な抑制作用	49
ノルアドレナリンによるcapsaicin電流抑制に対する選択的なアドレナリン受容体拮抗薬及び作動薬の作用	53
ノルアドレナリンによるcapsaicin電流の抑制に寄与する細胞内メカニズムの検討	59
ノルアドレナリンによるcapsaicin電流の抑制作用におけるGタンパク質の活性化の関与	64
考察	68
行動学的解析からみた末梢レベルでの $\alpha_2$ 受容体活性化を介したTRPV1の抑制による鎮痛効果	68

細胞レベルでのTRPV1と $\alpha_2$ 受容体の機能的関連性の検討 .....	72
末梢レベルでの $\alpha_2$ 受容体を介したTRPV1の活性抑制による鎮痛の生理的 意義 .....	79
参考文献 .....	82
第2章	
ニワトリ脊髄のaccessory lobeに存在する神経様細胞には神経型の電位依存性ナ トリウムチャンネルが発現している .....	90
要約 .....	91
緒言 .....	93
材料と方法 .....	96
使用動物と組織標本 .....	96
ウエスタンブロット法による電位依存性Na <sup>+</sup> チャンネルタンパク質の検出の ためのニワトリ脳組織、accessory lobeとラット大脳組織の採取 .....	96

組織のホモジナイズ	97
ホモジネートのタンパク質濃度測定及び濃度調整	98
泳動サンプルの調整	99
SDS-PAGE	100
セミドライウエスタンブロッティング	101
免疫組織化学の為の組織の固定と切片の作製	103
H.E.染色	104
蛍光抗体法	105
RT-PCR法による電位依存性Na <sup>+</sup> チャネルタンパク質の検出の為のニワトリ 脳組織、accessory lobeとラット大脳組織の採取	107
RT-PCR	108
使用溶液の組成	111
使用抗体と薬物	115
実験成績	118
ニワトリ脊髄とALの構造	118
ALにおけるVGSCアイソフォームの発現	121
ニワトリVGSCの一次抗体の選定	124

ラットとニワトリ間の抗VGSC抗体の交差性について .....	127
ニワトリ脊髄切片における抗VGSC抗体に対する免疫応答性の検討 .....	130
考察 .....	132
参考文献 .....	139
謝辞 .....	143

## 第1章

末梢感覚神経終末における $\alpha_2$ アドレナリン受容体を介した  
TRPV1の抑制による鎮痛効果とそのメカニズムの解明



## 要約

生体には危険を回避するための信号である「痛みを感知する機構」に加えて「痛みを緩和する機構」も備わっている。下行性疼痛抑制系は中枢神経系の疼痛緩和機構の代表例であり、ノルアドレナリン (noradrenaline, NA)はこの機構を担う伝達物質の一つである。侵害刺激を受容する分子の代表的な分子として非選択的陽イオンチャネルであるTransient Receptor Potential 1 (TRPV1)が挙げられる。中枢神経レベルだけでなく末梢神経レベルでもアドレナリン作動系による鎮痛メカニズムの存在が示唆されるが、その詳細は明らかではない。本研究では、行動学的実験、電気生理学的実験、生化学的実験、組織化学的実験により末梢神経レベルでのアドレナリン作動系とTRPV1の機能的関連性について検討した。

まず初めに、疼痛関連行動解析によりアドレナリン作動系とTRPV1の相互作用を検討した。TRPV1を活性化するカプサイシンや熱、ホルマリンによる刺激をラットの後脚足底あるいは甲へ与え、それによって生じる疼痛関連行動を観察した。Capsaicinの後脚足底への投与によって疼痛関連行動が誘発され、この反応は

刺激を与えた同箇所へのクロニジン ( $\alpha_2$ アドレナリン受容体作動薬)の前投与によって有意に抑制された。また、反対側の足にクロニジンを投与しても疼痛行動の抑制は見られなかった。一方、capsaicin投与側および反対側の後脚へのノルアドレナリン (NA)の前投与によって疼痛関連行動の増強が見られた。熱刺激によって誘発される疼痛関連行動はTRPV1拮抗薬であるcapsazepineまたはクロニジンの前投与により局所性に抑制された。Formalinによって誘発される疼痛関連行動も同様にcapsazepineまたはクロニジンによって局所性に抑制された。これらの結果は末梢神経レベルで $\alpha_2$ 受容体がTRPV1の活性化に関連する疼痛行動を抑制することを示唆している。

この現象のメカニズムを検討するために、ラットから単離し、培養した背根神経節 (dorsal root ganglion, DRG)ニューロンを用いてパッチクランプ法によりTRPV1とアドレナリン受容体の機能的関連性について検討した。DRGニューロンにcapsaicin (1  $\mu$ M)を適用すると内向き電流が生じ、その反応はNA (1 pM)によって有意に抑制された。また、この抑制作用は濃度依存性に強くなった。 $\alpha_1$ 受容体拮抗薬であるプラゾシン (10  $\mu$ M)はNAの抑制作用に影響を与えなかったが、 $\alpha_2$ 受容体拮抗薬であるヨヒンビン (10  $\mu$ M)と $\beta$ 受容体拮抗薬であるプロプラノロ

ール(10  $\mu$ M)はNAの抑制作用を阻害した。 $\alpha_2$ 受容体作動薬であるクロニジン (1 pM)及びデクスメドミジン (1 pM)はcapsaicin誘発電流を抑制したが、 $\beta$ 受容体作動薬であるイソプロテレノールは抑制しなかった。細胞内へのプロテインキナーゼA (PKA)の触媒サブユニット (250 U/mL)の添加、または $G_{i/o}$ 型G蛋白を不活化させる百日咳毒素の細胞への前処置によってNAのcapsaicin誘発電流に対する抑制作用は減弱した。 $\alpha_2$ 受容体は $\alpha_{2a}$ 、 $\alpha_{2b}$ 、 $\alpha_{2c}$ 受容体の3つのサブタイプに分けられる。リアルタイムPCRによりDRGでの $\alpha_2$ 受容体サブタイプのmRNAの発現量を定量解析したところ、 $\alpha_{2c}$ 受容体の発現レベルが高く、続いて $\alpha_{2a}$ 、 $\alpha_{2b}$ 受容体の順であった。DRGの組織切片を用いてTRPV1と $\alpha_2$ 受容体の免疫染色を行なったところ、TRPV1と $\alpha_{2a}$ 受容体、TRPV1と $\alpha_{2c}$ 受容体の陽性シグナルがそれぞれの同一のDRGニューロン細胞体で検出された。

以上の実験成績から、侵害刺激を受容する皮膚直下に伸長する末梢神経繊維終末でTRPV1と $\alpha_2$ 受容体が共発現しており、 $\alpha_2$ 受容体を介してTRPV1活性の抑制された結果、鎮痛作用が生じることが示唆された。

## 緒言

体内外の有害な刺激から身を守るために、生体にとって痛みを感知することは非常に重要である。脊椎動物において、皮膚で受容された疼痛の信号は一次感覚ニューロンによって脊髄まで伝導され、脊髄背角で二次ニューロンに伝達される。そしてこの情報は脊髄内の伝導路を上行して視床を経て大脳皮質の感覚野に投射し、疼痛として認識される。また、生体には疼痛を知覚する機構だけでなく疼痛を緩和する機構も備わっており、その代表的な例として中枢神経系の下行性疼痛抑制系がある [1,2]。下行性疼痛抑制系を担う神経伝達物質にはセロトニン (5-hydroxytryptamine, 5HT)とノルアドレナリン (noradrenaline, NA)がある。脳幹正中部に位置する縫線核に細胞体を持ち脊髄へ下行する繊維からは5HTが、橋の青斑核に細胞体を持ち脊髄へ下行する繊維からはNAが分泌される。この二つの神経伝達物質は脊髄背角で一次感覚ニューロンの中枢末端側と二次ニューロンに作用することが報告されている [3-5]。NAは脊髄背角に伸長する一次感覚ニューロン神経中枢端に発現する $\alpha_2$ アドレナリン受容体に作用し、一次感覚ニューロンからの興奮性神経伝達物質の放出を抑制し、鎮痛効果を発揮する [4, 6-9]。一方末梢組織では、 $\alpha_2$ 受容体作動薬であるクロニジンの局所的な投与によ

り侵害性の熱によって誘発された疼痛関連行動を抑制すること、そして $\alpha_2$ 受容体拮抗薬であるヨヒンビンがクロニジンの鎮痛作用を阻害することが報告されている [10]。副腎髄質から血中へNAとアドレナリンが分泌されること、そして皮下にアドレナリン作動系神経繊維が分布していること [11]を踏まえると、アドレナリン作動系が末梢組織において鎮痛に寄与している可能性が考えられる。しかし、この現象と基盤となるメカニズムの詳細は不明である。

A $\delta$ 繊維やC繊維などの一次感覚ニューロンに発現し、熱や酸、カプサイシンを含む様々な化学物質などの侵害刺激を受容してその情報を細胞内で伝達できる電気化学的な情報に変化する代表的な分子として非選択的陽イオンチャネルであるTRPV1 (Transient Receptor Potential 1)がある [12–14]。近年、Chakrabortyらはラットの背根神経節ニューロン細胞体においてcapsaicin誘発性の膜電流応答を $\alpha_2$ 受容体の活性化が抑制すること、一次感覚ニューロン中枢端からのcapsaicin誘発性神経伝達物質の放出が $\alpha_2$ 受容体の活性化によって抑制されること、その細胞内メカニズムがカルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII (CAMKII)に依存していることを報告した [15]。Chakrabortyらはニューロン細胞体と一次感覚ニューロン中枢端での $\alpha_2$ 受容体とTRPV1の機能的関連性を示した

が、このメカニズムが侵害刺激を受容する一次感覚神経繊維の局所でも起こりうる現象なのかは明らかではない。本研究では、末梢感覚神経繊維レベルで局所性に $\alpha_2$ 受容体を介したTRPV1の抑制が生じ、その結果鎮痛作用を発揮するのかを行動学的実験によって、そしてその相互作用の詳細なメカニズムを電気生理学的実験、生化学的実験、免疫組織学的実験により検討した。

## 材料と方法

### 使用動物と組織標本

全ての動物実験は鳥取大学のガイドラインに則って行い、本研究は鳥取大学動物実験委員会の承認を得て行った。本実験では7-10週齢の雄性Wistar系ラットを用いた。ラットは7週齢で入手し、温度を $22\pm 2$ 度にコントロールした12時間明暗周期（明期7:00-19:00）の飼育室で摂食および飲水は自由とし、動物飼育施設に導入後、2匹/ケージで1週間以上飼育した。

### 行動学的実験

#### Capsaicin test

Capsaicin testは2日間に渡って行った。ガラス板上に計測用のアクリル製チャンバー（20 cm×20 cm×20 cm）を置き、ラットをチャンバーに入れて測定開始まで20分以上環境に馴化させた。実験一日目（Day 1）にはcapsaicin投与に先行してラットの後肢足の裏皮下にBDロードーズ TMインスリン皮下投与用針付注射筒3/10 mL, 30 G, 8 mm (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey,

USA) を用いて溶媒を50  $\mu$ L前投与し、投与後すぐに測定用チャンバーにラットを戻した。投与した足での足を振る・舐める・噛む等の疼痛関連行動をガラス板の下に置いた鏡越しに目視で観察した。前投与から10分後、同側後肢足の裏皮下にcapsaicin (100  $\mu$ M, 50  $\mu$ L)を投与し、同様に疼痛関連行動を10分間観察した。実験二日目 (Day 2)では組織損傷による影響を避けるため、1日目とは反対側の足に各被験物質を投与し、その足の疼痛関連行動を観察した。ラットを計測用チャンバーに入れて測定開始まで20分以上環境に馴化させた。前投与から10分後、被験物質を投与した後肢と同側の足の裏皮下にcapsaicin (100  $\mu$ M, 50  $\mu$ L)を投与し、疼痛関連行動を10分間観察した。capsaicin投与とは反対側に被験物質を投与する場合には1日目の前投与は行わずにcapsaicinによる疼痛行動のみを観察し、2日目に1日目と同側の足 (2日目のcapsaicin投与とは反対側の足) に前投与を行った後、capsaicinによる疼痛行動を観察した。記録にはアナログ/デジタル・デジタル/アナログ・コンバーター (Power Lab, AD Instruments, Dunedin, New Zealand)、ソフトウェア (Lab Chart 7, AD Instruments, New Zealand)、パーソナルコンピューター (Macintosh, Apple, Cupertino, California, USA) を用いた。Power Labのoutputとinput (1)端子をボタン付き回路で繋ぎ、ボタンを押して回路が繋がると5 Vの外部出力



電位が入力され、Lab Chart上で電圧変動が記録されるように設定した。目視によってラットが示す疼痛関連行動を確認し、ラットが疼痛関連行動を示している間はボタンを押し続け、経時的にLab Chart上で疼痛関連行動の記録を行った。

### Hargreave's test

Hargreave's testは2日間に渡って行った。Hargreave's法に基づいて、熱刺激に対して忌避行動を示すまでの時間を計測した。ラットの後肢足の裏に徐々に強度が強くなる赤外線による温熱刺激を与え、刺激を与え始めてから反応までに要した時間 (s)を刺激に対する後肢屈曲反応の閾値として評価した。刺激はHargreave's test装置 (Hargreaves Apparatus, Ugo Basile, Varese, Italy) を用いて行った。capsaicin testを行ったときに使用した計測用チャンバーと同じものを使用し、ラットをチャンバーに入れて測定開始まで20分以上環境に馴化させた。刺激強度 (Intensity)を50に設定した刺激装置の熱源をラットの後肢の足の裏の下に置き、熱刺激を与えた。7回の試行を行い、刺激に反応するまでの時間が最短のものとして最長のものを除いた5回分の平均値を求めた。各刺激の間隔は10分以上とし、組織傷害を防ぐために30秒をcut off値とした。実験一日目は対照実験として何も

処置せずに左右の足でHargreave's testを行った。実験二日目は溶媒あるいは被験物質をそれぞれの後肢足の裏に50  $\mu$ L皮下投与し、投与10分後からHargreave's testを開始した。反応は後肢を挙上して舐める、刺激側の後肢を挙上しながら振り返るなどの動作をした場合に忌避反応として評価した。歩き始めたり毛づくろいしたりする中の一連の動作の中で後肢を挙上した場合などは、刺激とは無関係な動作としてその試行の結果は除外した。

#### Formalin test

Capsaicin testやHargreave's testと同様にラットの足底に5% formalinを投与すると激しい腫脹が起これ疼痛関連行動の観察ができなかったため、ラットの後肢足の甲に10  $\mu$ Lの5% formalinを投与して疼痛関連行動を観察した。Formalin testはcapsaicin testで用いた装置を使用し、疼痛関連行動の定量も同様の方法で解析した。溶媒及び被験物質 (各30  $\mu$ L)はformalin投与の10分前にformalinを投与する後肢足の甲に前投与した。Formalin投与後90分間、疼痛関連行動を観察、記録した。

#### 生化学的実験

## リアルタイムPCR

7-10週齢の雄性Wistar系ラットを4-5%イソフルランで深麻酔し、断頭により安楽死させた。外科用鉗により頸部から尾部までの皮膚を剥離し、鉗で腰椎L2-L6を含む後背部組織を摘出した。背部組織の余分な筋肉を除去し、脊椎を長軸方向に縦に二分割した。分割した脊椎中の脊髄組織を除去し、実体顕微鏡下で椎骨中間に位置するL2-L6のDRGを眼科用ピンセット、眼科用鉗を用いて切り出し、氷冷したリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS, 組成後述)を入れたサンプルチューブに回収した。RNAの抽出にはPureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)を用いた。摘出したDRG組織にTRIzol試薬を加えてホモジナイザーですり潰し、21G注射針をつけた1 mLシリンジで5-10回出し入れしてDNAを切断してその後室温で5分間静置した。クロロホルムを加え、15秒間激しく振り混ぜた後、室温で3分間静置し、12,000×g、15分、4℃で遠心した。遠心後、無色の上部水相を新しいチューブに回収し、等量の75%エタノールを添加して、しっかりボルテックスした。RNA抽出キットに含まれるcollection tubeにspin cartridgeをセットし、サンプルを乗せて12,000×g、15秒間、室温で遠心した。Wash Buffer Iを添加し、室温で12,000×g、15秒間遠心

した後、cartridgeを新しいcollection tubeに装着し、DNase添加して室温で15分静置した。Wash Buffer Iを添加して室温で12,000×g、15秒間遠心した後、cartridgeを新しいcollection tubeに装着した。Wash Buffer IIを添加し、室温で12,000×g、15秒間遠心し、再びこの作業を繰り返し、室温で12,000×g、1分間遠心して、メンブレンを乾燥させた。Spin cartridgeをrecovery tubeに装着してRNase-free waterをメンブレンの中央に滴下して1分間静置し、その後室温で12,000×g、2分間遠心してRNAを回収した。mRNAの逆転写はReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan)を用いた。10 µgの全RNAからオリゴdTプライマー、ReverTra Aceにより30°Cで10分、42°Cで60分、99°Cで5分インキュベーションし、逆転写を行い。cDNAサンプルとした。リアルタイムPCRは0.5 µLのcDNA、 $\alpha_{2a}$ 、 $\alpha_{2b}$  and  $\alpha_{2c}$ の3つの $\alpha_2$ アドレナリン受容体サブタイプとglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を認識する4ペアのプライマー (表1)、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo, Japan)を用いて行った。リアルタイムPCRの条件は熱変性を95°Cで15秒、アニーリングを60°Cで15秒、伸長反応を72°Cで45秒とし、この一連の反応を40サイクルに設定してStep Oneシステム (Thermo Fisher Scientific, USA)でPCR反応を行なった。プライマーの増幅効率テンプレートcDNAを段階希釈して定量した。 $\alpha_{2a}$ 、 $\alpha_{2b}$ 、 $\alpha_{2c}$ 、GAPDH

のプライマーペアの増幅効率はいずれも $96.0 \pm 2.5\%$  ( $n = 3$ ),  $100.6 \pm 5.5\%$  ( $n = 3$ ),  $98.4 \pm 2.1\%$  ( $n = 3$ ) and  $95.4 \pm 1.7\%$  ( $n = 3$ )となったため、すべてのプライマーの増幅効率は100%とした。試料としたcDNAに含まれる目的のDNA量はGAPDHをコントロールとして用いて $\Delta\text{Ct}$ 法により定量、解析した。

**表 1. RT-PCR で使用したプライマーの配列**

Target	Forward	Reverse	Product size (bp)	Accession #
$\alpha_2\text{a}$	5'-GCACCACTTGCCCCAGTAA-3'	5'-AGCACACCCACCCGTTCTTCTT-3'	93	NM_012739.3
$\alpha_2\text{b}$	5'-GATATAACCAGTTCCACCCAGCTCAGAA-3'	5'-AGTTGGGAAGACAACCAGGAGGTAGA-3'	113	NM_138505.2
$\alpha_2\text{c}$	5'-CGCGAGAAACGCTTCACCTT-3'	5'-CACGGCAGATGCCATACAGG-3'	103	NM_138506.1
GAPDH	5'-TTCAGGAGCGAGATCCCGCTAAC-3'	5'-TTCAGGTGAGCCCCAGCCTTCT-3'	110	NM_017008.4

## 免疫組織化学的実験

### 免疫組織染色

7-10週齢の雄性Wistar系ラットを4-5%イソフルランで深麻酔し、断頭により安楽死させた。外科用鋏により頸部から尾部までの皮膚を剥離し、鋏で腰椎L2-L6を含む後背部組織を摘出した。背部組織の余分な筋肉を除去し、脊椎を長軸方向に縦に二分割した。分割した脊椎中の脊髄組織を除去し、実体顕微鏡下で椎骨中

間に位置するL2-L6のDRG組織を眼科用ピンセット、眼科用鉗を用いて切り出し、氷冷したPBSを入れたサンプルチューブに回収した。DRG組織をPBSで希釈した4%パラホルムアルデヒド溶液で1時間固定し、その後PBSで洗浄した。希釈した70%アルコールから順に、80%、90% 各々60分間、100%×3回の順 (上昇アルコール系列)に組織を各々90分間ずつ浸漬し、組織の脱水を行い、その後、組織をキシレンに15分間×3回浸漬し、透徹を行った。包埋前に60°Cのパラフィンに20分間×3回浸漬し、パラフィンに組織を静置した。一晩以上乾燥させてから、これをミクロトーム (大和光機、RUB-2100H)で6  $\mu\text{m}$ の厚さに薄切し、35°Cの水に浮かべた後、MAS-GP TypeA コートスライドガラス (Matsunami Glass, Osaka, Japan)に静かに乗せた。組織切片を貼付したスライドガラスはをマッペ上で1日以上乾燥させた。薄切標本をキシレン×3回、100%アルコール×3回、95%、90%、80%、70%の順 (脱パラフィン系列)に、各々10秒間浸漬して脱パラフィン作業をし、その後流水中に5分間静置した。続いて使用する抗体に合わせたブロッキング液 (TRPV1, 5% skim milk in PBS;  $\alpha_{2a}$  receptor, 10% normal goat serum in PBS;  $\alpha_{2c}$  receptor, 1% skim milk in PBS)を用いて30分間室温でブロッキングした。ブロッキング後、PBSで1:50に希釈したモルモット抗TRPV1抗体 (Merck Millipore corporation,

Burlington, Massachusetts, USA, Cat# AB5566, Lot# 3135959)、PBSで1:100に希釈したウサギ抗 $\alpha_{2a}$ 抗体 (Cusabio Technology, Houston, Texas, USA, Cat# CSB-PA007424, Lot# G1229Y)、PBSで1:100に希釈したウサギ抗 $\alpha_{2c}$ 抗体 (Cusabio Technology, USA, Cat# CSB-PA000916, Lot# G1229Y)を切片上に添加して4°Cで一晩インキュベーションした。PBSで洗浄した後、PBSで1:100に希釈したHRP標識ヤギ抗モルモットIgG抗体 (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA & Canada, Cat# 6090-05, Lot# G0014-MB76L)をTRPV1に対して、PBSで1:100に希釈したHRP標識抗ウサギIgG抗体 (Histofine kit, Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan, Cat# H1902)を $\alpha_{2a}$ と $\alpha_{2c}$ 受容体に対して適用し、室温で30分間インキュベーションした。PBSで標本を洗浄し、HRP活性を3,3'-ジアミノベンジジン テトラヒドロクロライドによって可視化し、Eukitt包埋液 (ORSAtec GmbH, Bobingen, Germany)によって標本を包埋した。ネガティブコントロールの染色を行う際には一次抗体をPBSで置き換えて同様の操作をした。ネガティブコントロールでは非特異的な染色反応は見られなかった。

## 電気生理学の実験

## 細胞の単離及び培養

7-10週齢の雄性Wistar系ラットを4-5%イソフルランで深麻酔し、断頭により安楽死させた。外科用鉗により頸部から尾部までの皮膚を剥離し、鉗で頸椎から腰椎までの脊椎と脊髄を含む後背部組織を摘出した。後背部組織の余分な筋肉を除去し、脊椎を長軸方向に縦に二分割した。分割した脊椎中の脊髄組織を除去し、実体顕微鏡下で椎骨中間に位置するDRGを眼科用ピンセット、眼科用鉗を用いて切り出し、PBSを入れたシャーレに回収した。実体顕微鏡下で回収した神経節に付着した神経束、硬膜、結合組織、血餅などをシャーレ上で出来る限り除去した。以降の操作は全て無菌的に行った。回収した神経節を滅菌済みの遠心チューブに移し、細菌等の混入を最小限に抑えるために滅菌PBSで数回洗浄した。その後、神経節をバイアル瓶に移し、滅菌PBSで再度数回洗浄した後に滅菌PBSを除去し、collagenase酵素液 (組成後述)を4 mL加え、37°C恒温槽中で100 rpmで振盪しながら2時間インキュベーションした。インキュベーション後、バイアル瓶を静置して組織を底に沈降させ、上部の酵素液を含む液をアスピレーターで吸引除去した。滅菌PBSで1回洗浄し、trypsin酵素液 (組成後述)を3 mL加えて37°Cの恒温槽中で100 rpmで振盪しながら10分間インキュベーションした。インキュ



ベーション後、酵素反応を停止させるために10%牛胎子血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)を1 mL加えた後、滅菌済みの遠心チューブ内でシリコン加工したパスツールピペットを用いてピペッティングを約20回行った。試験管内の組織が消化、分散され、混濁液状になっていることを確認し、遠心 (1000 rpm、5分間)を行った。遠心後、上清を除去し、沈渣に培養液3 mLを添加してピペッティングを15回行った。その後遠心 (1000 rpm、5分間)を行った。遠心後上清を除去し、ピペッティングを10回行い、シリンジに回収し、125  $\mu\text{m}$ のナイロンメッシュフィルターを通過させて余分な未消化組織を取り除いた。その後遠心 (1000 rpm、5分間)を行った。遠心後上清を除去し、培養液を3 mLを加えて細胞浮遊液とした。滅菌済みのカルチャーディッシュに11 mm円形カバーガラス (丸11, No. 0, Matsunami, Japan)を7枚ずつ並べ、カバーガラス1枚毎に上述の細胞浮遊液を50  $\mu\text{L}$ ずつ滴下し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で5% CO<sub>2</sub>、95% 空気、37°Cという条件下で単層培養を開始した。培養液にはDMEMに10% FBS、100 U/mL penicillin、100 mg/mL streptomycinを添加したものを使用した。培養開始の翌日に培養液をカルチャーディッシュ内に1 mL追加し、以降2日毎に全量新しい培養液に交換し

た。培養開始から3-7日目のDRGニューロンを以下の実験に用いた。

#### パッチクランプ法

パッチクランプ用電極 (パッチ電極)は芯入りガラス管 (GD-1.5, Narishige, Tokyo, Japan)を微小電極作製器 (P-97, Sutter Instrument, Novato, California, USA)を用いて4段引きにより作製した。芯入りガラス管は予めその両端をガスバーナーで熱して融かし、ガラス管の切り口の角をとった。微小電極作製器の設定は先端抵抗が4-7 M $\Omega$ のパッチ電極を作製できるように調整した。実験槽を倒立顕微鏡のステージの上に設置した。実験槽の底面にはマイクロカバーガラスをシリコングリースによりアクリル板と密着させ、容量約1 mLの実験槽とした。この実験槽の端に、先端の直径が約1 mmのポリエチレンチューブを固定し、8チャンネルペリスタポンプ (Minipuls 3, Gilson, Middleton, Wisconsin, USA)によって新鮮な実験液が常に約 2 mL/minの灌流速度になるように設定して実験槽内を灌流した。また槽の反対の端には、空気と液体を同時に吸引できるように先端を加工した注射針を設置して廃液ボトルと吸引ポンプに接続し実験液の吸引除去を行った。不関電極は、塩橋として2%アガロースを含む154 mM NaCl液をポリエチレ

ン管に充填して作製した。不関電極の銀線は、パッチクランプ用増幅器のプローブの不関電極入力部に接続した。プローブに電極ホルダーを接続しプローブ本体を三次元マニピュレーター (ONU31P, Olympus, Tokyo, Japan)に固定した。また、銀線をプローブのパッチ電極入力部に接続し、パッチ電極装着時には電極ホルダーを通して銀線先端が電極内液に浸るようにした。分極を抑えるためパッチ電極及び不関電極用の銀線は、塩素系漂白剤液中に静置することにより塩化銀化加工を施したものを使用した。また、電極ホルダーの側管に直径1.5 mm程度のシリコンチューブを介して三方活栓と5 mLの注射筒を接続し、電極内圧を調節できるようにした。パッチ電極と不感電極間の電圧あるいは電流を制御しながら、両電極間を流れる電流並びに電圧を記録した。記録はホールセルモード(以下、Whole-cell)で行い、パッチ電極より検出される電流反応はパーソナルコンピュータ (Macintosh, Apple, USA)で制御されたアナログ/デジタル・デジタル/アナログ・コンバーター (Power Lab, AD Instruments, New Zealand)に接続したパッチクランプ用増幅器(EPC10, HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht, Germany)で測定し、ソフトウェア (Lab Chart 7, AD Instruments, New ZealandおよびPatch Master, HEKA Elektronik GmbH, Germany)で経時的に電流応答をサンプリング周

波数10 kHzで記録した。細胞が接着したカバーガラスを実験槽底部に固定し、拡大倍率400倍で適当な細胞を選択し視野の中央付近に見えるように顕微鏡のステージを調節した。パッチ電極の先端から0.5~1 cmの位置まで電極内液を満たし、電極ホルダーに装着した。電極内液を充填する際には、ポリエチレンチューブを加熱し細長く引いたものを導入管として使用し、電極後部から1 mL注射筒を用いて注入した。パッチ電極内に気泡が生じた場合、電極の横を指先で軽く叩いて除去した。パッチ電極の実験槽液中への挿入に先立ち、パッチ電極先端への異物の付着、細胞外液のパッチピペット内への混入を避けるため、電極ホルダー側管につないだ注射筒より陽圧をかけながら三方活栓を閉じてパッチ電極内を陽圧にした。パッチ電極先端が目的の細胞と同一視野に入るようにマニピュレーターを操作し、パッチ電極と不関電極との間に流れる電流が0 pAとなるように調節して一段目のフィルターを100 kHz、二段目のフィルターを2.9 kHzに設定した。次に、パッチ電極に電圧パルス (5 mV, 5 ms)を与えて生じた電流波形から計算した電極抵抗が、適当な電極抵抗 (4-7 M $\Omega$ )であることを確認した。パッチ電極先端が目的の細胞に触れると、電極先端抵抗の増加を反映して画面上の電流波形がわずかに減少するのが確認でき、次いで三方活栓を操作しパッチ電極

内の陽圧を解除すると更に抵抗は増大した。そして、緩やかに吸引をかけること  
によって抵抗値を更に増大させると細胞はパッチ電極先端に密着し、最終的に  
抵抗値は1 G $\Omega$ 以上に上昇した (ギガシールの形成)。このギガシールは注射筒を  
用いて電極内に陰圧を加えることにより徐々に形成される場合と、陽圧の解除  
を行うだけで形成される場合があった。パッチ電極の容量性電流 (C-fast)を補正  
して電極内電圧を-60 mVに固定した。記録モードをWhole-cellに切り替え、電  
流の記録範囲 (Gain)を $\pm 1$  nAに設定した。この状態で更にパッチ電極に陰圧を  
かけることによりパッチ膜を破壊すると、パッチ電極内と細胞内の電気的接触  
により容量性電流波形が再び現れた。これは、電極内と細胞内が電気的に通じる  
ことにより、細胞全体の容量性電流を検出するようになったためである。この電  
流が見られれば直ちに吸引をやめ、細胞膜容量 (C-slow)と直列抵抗 ( $R_{series}$ )によ  
り生じる電流を補正した。細胞内液が電極液と十分に入れ替わったと考えられ  
た後、Lab Chartのフィルターを1.0 kHzに設定し記録される電流応答を測定した。  
細胞外液としてNormal液、細胞内液としてK<sup>+</sup>電極液を用いた。電位固定した細  
胞が興奮性の神経細胞であることを確認するために、-60 mVから0 mVまでの  
脱分極パルスを細胞に与えて内向きのNa<sup>+</sup>電流の発生を確認した。

## 使用薬物

以下に示した組成の試薬及び実験液を使用した。

### Capsaicin test

Capsaicinは0.9% NaCl、1 % DMSO、0.5% Tween-20という組成の水溶液を溶媒として用いて100  $\mu$ Mになるように溶解した。クロニジン (clonidine, Clo)、イソプロテレノール (isoproterenol, Iso)、フェニレフリン (phenylephrine, Phe)、ノルアドレナリン (noradrenaline, NA)は500  $\mu$ Mになるように、ヨヒンビン (yohimbine, Yoh)は250  $\mu$ Mになるようにcapsaicinに用いたものと同じ溶媒に溶解した。すべての試薬は使用するまで $-30^{\circ}\text{C}$ で保管した。これらの実験液はすべて50  $\mu$ Lずつラット後肢の足の裏皮下に投与した。疼痛関連行動がcapsaicin投与直後に誘発されてその後10分以内に収まり、かつ組織にダメージを与えないcapsaicin濃度を予備実験により決定した。クロニジンの濃度も予備実験により決定した。50 nmolのクロニジンをラット後肢の足の裏に投与すると全身性の鎮静作用を引き起こしてしまうため、本実験では全身作用を起こさなかった25

nmolのクロニジンを使用した。この他のアドレナリン作動薬にはクロニジンと同じ濃度を採用した。25 nmolのヨヒンビンはそれ自身でcapsaicin誘発性の疼痛関連行動を抑制したため、ヨヒンビン単独では何も作用を起こさない12.5 nmolを用いた。

#### Hargreave's test

クロニジンは10 mMになるように0.9% NaClに溶解した。Capsazepineは10 mMになるようにDMSOに溶解した。クロニジンとcapsazepineのストック液は使用するまで-30°Cで保管した。クロニジン投与液 (100  $\mu$ M)とcapsazepine投与液 (100  $\mu$ M)はストック液を0.9% NaClで希釈して作製した。投与薬はそれぞれ50  $\mu$ Lずつラットの後肢足の裏の皮下に投与した。CapsaicinとcapsazepineのTRPV1に対する親和性は類似していることが報告されているので (IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology, <http://www.guidetopharmacology.org>)、capsazepineはcapsaicinよりも1-10倍高い濃度の溶液を使用した。

#### Formalin test

Formalinは5% (1.85% formaldehyde)になるように0.9% NaClで希釈し、遮光して室温保存した。クロニジン濃縮液は10 mMになるように0.9% NaClに溶解し、使用時まで-30°Cで保管した。Hargreave's testで用いたcapsazepineストック液を0.9% NaClで希釈すると白濁してしまったため、formalin testで用いたcapsazepine投与液は1 mMになるように0.9% NaCl、8%のDMSO、0.5%のTween-20の組成の溶媒に溶解し、使用時まで-30°Cで保管した。クロニジンの濃縮液は使用直前に融解し、投与液にするために0.9% NaClで833  $\mu$ Mとなるように希釈した。クロニジン (30  $\mu$ L, 25 nmol)、capsazepine (30  $\mu$ L, 30 nmol)、formalin (10  $\mu$ L)はラット後肢の甲に投与した。

#### 細胞単離用溶液

リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS)

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### Collagenase IV液

滅菌したPBSにウシ血清アルブミン (BSA, 1 mg/mL, Sigma)、Collagenase Type IV



(300 U/mL, Worthington, USA)、DNase I (0.2 mg/mL, Sigma)を添加し、シリンジ  
フィルター (0.2  $\mu$ m, IWAKI, Shizuoka, Japan)でろ過滅菌した。

#### Trypsin酵素液

滅菌したPBSにウシ血清アルブミン (BSA 1mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis,  
Missouri, USA)、Trypsin (0.25% w/v, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)を添  
加し、3 mLずつ試験管に分注して $-30^{\circ}\text{C}$ で保管した。使用直前に解凍し、シリン  
ジフィルターでろ過滅菌した。

#### パッチクランプ記録用溶液

#### 細胞外液

#### Normal液

144 mM NaCl, 10 mM NaOH, 6 mM KCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  
D-Glucose, 10 mM HEPES (pH = 7.4にHClで調整)

#### 細胞内液

## K<sup>+</sup>電極液

10 mM Na-gluconate, 130 mM K-gluconate, 20 mM KOH, 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.74 mM

CaCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES (pH=7.3にTrisで調整)

Capsaicinは1 mMになるようにDMSOに溶解して60 μLずつ分注し−30°Cで凍結保存した。使用直前に融解し、細胞外液で必要な濃度に希釈した。

Clonidine hydrochlorideは10 mMになるように蒸留水に溶解して50 μLずつ分注し−30°Cで凍結保存した。使用直前に融解し、細胞外液で必要な濃度に希釈した。

N-Hexanol-D-sphingosine (C6 ceramide, Sigma, USA)は10 mMになるようにDMSOに溶解して5 μLずつ分注し−30°Cで凍結保存した。使用直前に融解し、細胞外液で必要な濃度に希釈した。

Guanosine 5' – [β-thio] diphosphate trilithium salt (GDPβS, Sigma, USA)は40 mMに蒸留水に溶解して2 μLずつ分注し−30°Cで凍結保存した。使用直前に融解し、細胞内液で必要な濃度に希釈した。

DL-Norepinephrine hydrochloride (noradrenaline, Sigma, USA)は10 mMになるように蒸留水に溶解して10 μLずつ分注し−30°Cで凍結保存した。使用直前に融解し、

細胞外液で必要な濃度に希釈した。

Prazosin hydrochloride (prazosin, Sigma, USA)は10 mMになるように蒸留水に溶解して50  $\mu$ Lずつ分注し $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。使用直前に融解し、細胞外液で必要な濃度に希釈した。

( $\pm$ )-Propranolol hydrochloride (propranolol, Sigma, USA)は10 mMになるように蒸留水に溶解して50  $\mu$ Lずつ分注し $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。使用直前に融解し、細胞外液で必要な濃度に希釈した。

Protein Kinase Catalytic Subunit From Bovine Heart (cPKA, Sigma, USA)は250 U/mLになるように細胞内液に溶解して50  $\mu$ Lずつ分注し $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

Pertussis Toxin solution (PTX, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)は6  $\mu$ Lずつ分注し $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。使用直前に融解し、細胞培養液で必要濃度に希釈した。

Okadaic acid (Sigma, USA)は1 mMになるようにDMSOに溶解した後に細胞内液で1  $\mu$ Mになるように希釈し、 $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

Yohimbine hydrochloride (yohimbine, Sigma, USA)は10 mMになるようにDMSOに溶解して50  $\mu$ Lずつ分注し $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。使用直前に融解し、細胞外液

で必要な濃度に希釈した。

#### 統計処理と解析

解析はLab Chart (AD Instruments, New Zealand)、Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA)及びIgor Pro (WaveMetrics, Portland, Oregon, USA)を用いて行った。本文中、図中には平均値±標準誤差 (n=例数)を示した。有意差検定にはStudentのt検定またはanalysis of variance (ANOVA) with a *post hoc* Tukey HSD testを用い、有意水準は5%以下とした。

## 実験成績

### Capsaicinによって誘発される疼痛関連行動に対するアドレナリン作動薬の作用

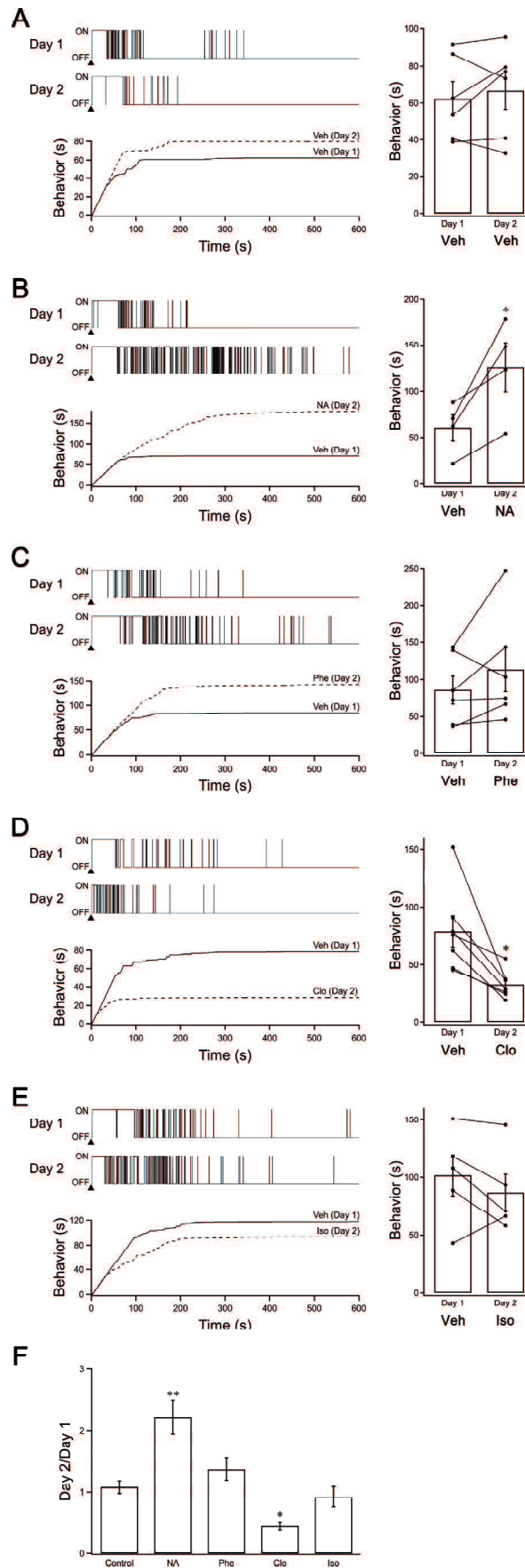
TRPV1はcapsaicinや43°C以上の侵害性の熱、酸、脂質、刺激性バニロイドによって活性化され、感覚神経末梢端において痛みを感知する侵害受容器として働く[12, 14]。末梢神経レベルの疼痛感知においてTRPV1とアドレナリン作動系に機能的な相互作用があるのかを検証するために、ラットの後肢足の裏にcapsaicin (5 nmol) を投与して誘発される足を舐める、噛む、振るなどの疼痛関連行動に対するノルアドレナリン (25 nmol)、フェニレフリン (25 nmol)、クロニジン (25 nmol)、イソプロテレノール (25 nmol)の作用を検討した。

ラットはコントロール群、フェニレフリン投与群、クロニジン投与群、イソプロテレノール投与群に分けた (図1A-E)。薬物はラット後肢の足の裏皮下に投与した。すべてのアドレナリン作動薬はそれ自身が疼痛関連行動を誘発することにはなかった。Day 1で観察された疼痛行動量に対するDay 2の疼痛行動量の割合を図1Fに示した。コントロール群ではDay 1とDay 2で観察された疼痛行動量に有意な差は見られなかった。フェニレフリン (25 nmol)、イソプロテレノール (25

nmol)の前投与はcapsaicin誘発性の疼痛関連行動に影響を与えなかったが (図1C, E)、ノルアドレナリン (25 nmol)の前投与は4匹中2匹のラットで他群のラットと比較して長時間持続するcapsaicin誘発性疼痛関連行動を引き起こし、合計の疼痛関連行動量は有意に増加した (図1B)。一方、クロニジンの前投与によってcapsaicin誘発性疼痛関連行動量は有意に減少した (図1D)。

クロニジンとノルアドレナリンの作用が薬物を投与した足の裏皮下の限局した範囲で生じているのかを検討するために、capsaicinを投与する足とは反対側の足にこれらの薬物を前投与し、capsaicin誘発性の疼痛関連行動を観察した (図2)。Day 1にはコントロールとしてクロニジンもしくはノルアドレナリンの前投与無しでcapsaicin誘発性の疼痛行動量を測定した。Day 2はクロニジンあるいはノルアドレナリンをcapsaicin投与10分前にDay 1でcapsaicinを投与した側 (Day 2でcapsaicinを投与する足とは反対側)の足の裏に前投与し、capsaicinによって誘発される疼痛関連行動を観察した。Capsaicinを投与した足とは反対側にクロニジン (25 nmol)を前投与してもcapsaicin誘発性の疼痛関連行動に影響を与えなかった (図2A)。対照的に、同様にノルアドレナリンを前投与するとDay 2の疼痛行動量はDay 1のものと比較して有意に増大していた (図2B)。さらに、クロニジン (25

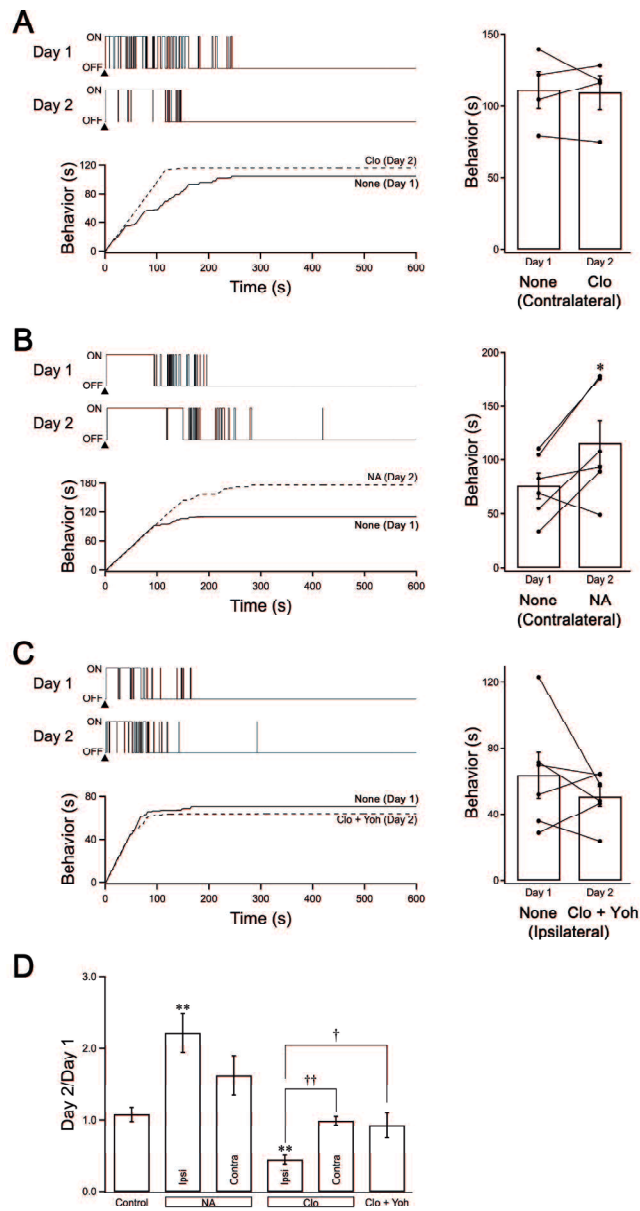
nmol)の作用に対する $\alpha_2$ アドレナリン受容体拮抗薬であるヨヒンビン (12.5 nmol)の作用を検討したところ、ヨヒンビンはクロニジンによる疼痛行動量の減少を抑えた。Day 1で観察された疼痛行動量に対するDay 2の疼痛行動量の割合を図2Dに示した。





## 図1 Capsaicin testにおけるアドレナリン受容体作動薬の効果

(A-E) ラット後肢の足の裏皮下にCapsaicin (5 nmol)を投与し、10分間疼痛関連行動を観察した。Day 1に溶媒を前投与したとき (それぞれ左図の上段)、Day 2にcapsaicin投与10分前にcapsaicin投与側足へそれぞれの薬物 (A, vehicle, n = 6; B, noradrenaline, NA, 25 nmol, n = 4; C, phenylephrine, Phe, 25 nmol, n = 6; D, clonidine, Clo, 25 nmol, n = 7; E, isoproterenol, Iso, 25 nmol, n = 5)を前投与したとき (それぞれ左図の中段)に観察された疼痛関連行動を継時的にモニターして得られた典型的な例を示す。図中のON及びOFFはそれぞれラットが疼痛行動を起こしているか、起こしていないかを示す。それぞれの左図下段はcapsaicin投与後にラットが示した疼痛行動の累積時間を表す。シンボルと線は個々のラットの反応を示し、カラムは各群の平均値±標準誤差を示している 有意差検定にはStudent's paired *t*-testを用い、各群でのDay 1とDay 2を比較した (\* P < 0.05)。 (F) Day 1に対するDay 2の疼痛行動量を割合で標準化した。各群、平均値±標準誤差を示した。有意差検定にはANOVA with a *post hoc* Tukey HSD testを用いた。 (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01)



## 図2 Capsaicin testにおける反対足へのノルアドレナリンまたはクロニジン前投与の効果

(A, B) ラット後肢の足の裏皮下にCapsaicin (5 nmol)を投与し、10分間疼痛関連行動を観察した。Day 1に溶媒を前投与したとき (それぞれ左図の上段)、Day 2にcapsaicin投与10分前にcapsaicin投与側足へクロニジン (Clo, 25 nmol, n = 4)またはノルアドレナリン (NA, 25 nmol, n = 6) を前投与したとき (それぞれ左図の中段)に観察された疼痛関連行動を継時的にモニターして得られた典型的な例を示す。左図の上段と中段のトレースは継時的な疼痛関連行動の推移を表している。図中のON及びOFFはそれぞれラットが疼痛行動を起こしているか、起こしていないかを示す。それぞれの左図下段はcapsaicin投与後にラットが示した疼痛行動の累積時間を表している。シンボルと線は個々のラットの反応を示し、カラムは各群の平均値±標準誤差を示している。有意差検定にはStudent's paired *t*-testを用い、各群でのDay 1とDay 2を比較した (\* P < 0.05)。(C) A, Bと同様に、ラット後肢の足の裏皮下にCapsaicin (5 nmol)を投与し、10分間疼痛関連行動を観察した。A, Bと同様に、Day 1に溶媒を前投与したとき (それぞれ左図の上段)、Day 2にcapsaicin投与10分前にcapsaicin投与側足へクロニジン (Clo, 25

nmol)とヨヒンビン (Yoh, 12.5 nmol)のカクテルを前投与したとき (それぞれ左  
図の中段)に観察された疼痛関連行動を継時的にモニターして得られた典型的な  
例を示す(n = 6)。(D) Day 1に対するDay 2の疼痛行動量を割合で標準化した。コ  
ントロール、NA (Ipsi)、Clo (Ipsi)は図1と同一である。NA (Contra)、Clo  
(Contra)、Clo+YohはA-Cを基にして解析した。各群、平均値±標準誤差を示し  
た。有意差検定にはANOVA with a *post hoc* Tukey HSD testを用いた。(\*\* P < 0.01  
対溶媒投与群; † P < 0.05, 対クロニジン同側投与群, †† P < 0.01, 対クロニジン同  
側投与群)。

## 熱刺激誘発性の疼痛関連行動に対するクロニジンの作用

TRPV1は43°C以上の熱刺激に対しても応答することがよく知られている。 $\alpha_2$ 受容体の活性化により熱誘発性疼痛関連行動が抑制されるかどうかを検証するために、Hargreave's testによってクロニジンの作用を検討した。Capsaicin testと同様に、Hargreave's testも2日間に渡って行った。Day 1に薬物を投与せずに左右の後肢に熱刺激を与え、それぞれのコントロール反応を記録した。ラットの中には左右の足から得られたコントロール反応に有意な差がみられる個体もいたため、そのようなラットのデータは解析対象から除外した。熱誘発性の疼痛関連行動にTRPV1が関与しているのかを検討するために、TRPV1拮抗薬であるcapsazepineの熱誘発性応答に対する作用を調べた。Capsazepineを投与していない無処置の足ではDay 1及びDay 2の熱刺激に応答するまでの時間 (withdrawal latency)に有意な差は見られなかったが、capsazepineを投与した足ではDay 1とDay 2でwithdrawal latencyが延長した (図3A)。Capsazepineと同様に、クロニジンもDay 2にのみ片方の足に投与した。クロニジンを投与した足ではwithdrawal latencyが有意に延長した (図3B)。

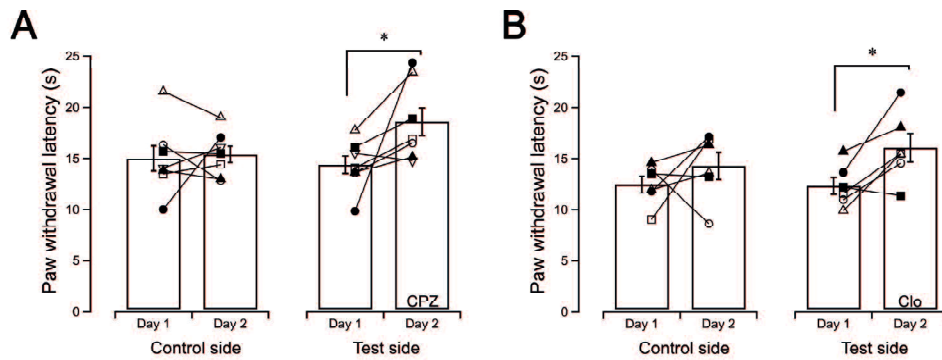


図3 熱刺激誘発性の疼痛関連行動に対するcapsazepineとクロニジンの作用

熱刺激はHargreave's test装置を用いてラット後肢の足の裏に適用した。Day 1とDay 1の両側の足のpaw withdrawal latencyを示す。シンボルと線は個々のラットの反応を示し、カラムはそれぞれの平均値±標準誤差を示している。(A)

Capsazepine (CPZ, 5 nmol)はDay 2の片足にのみ投与した (n = 7)。(B) クロニジン (Clo, 5 nmol)はDay 2の片足にのみ投与した (n = 6)。有意差検定にはStudent's paired *t*-testを用い、各群でのDay 1とDay 2を比較した (\* P < 0.05)。

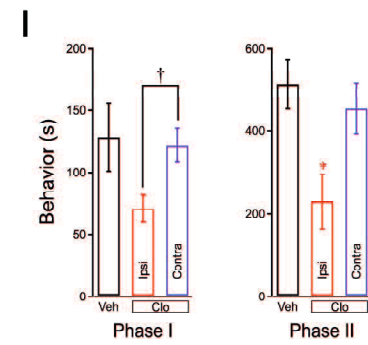
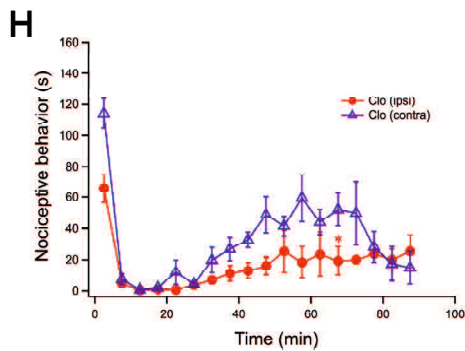
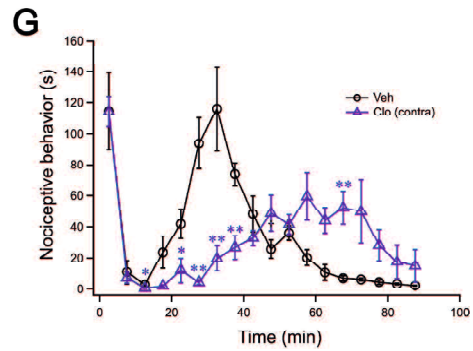
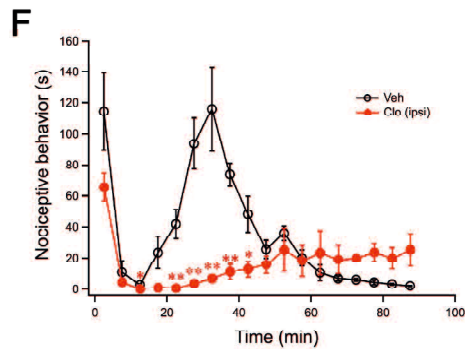
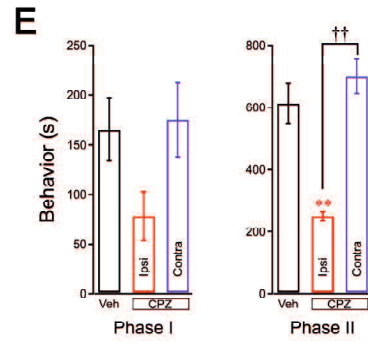
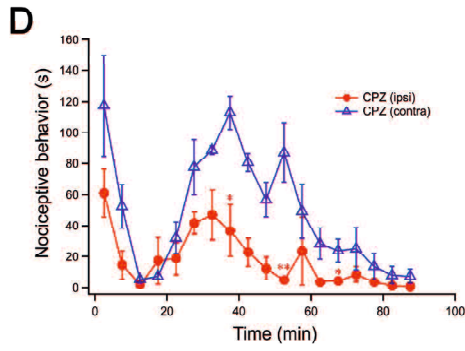
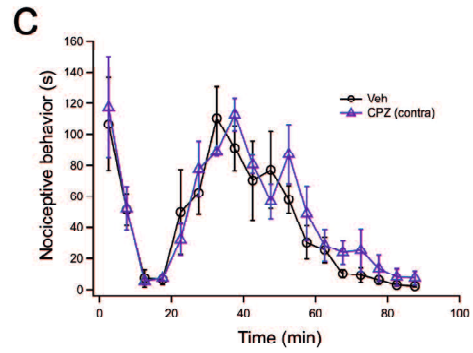
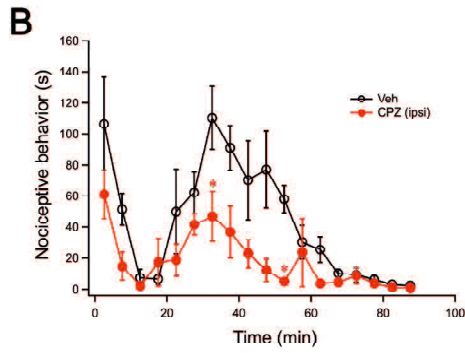
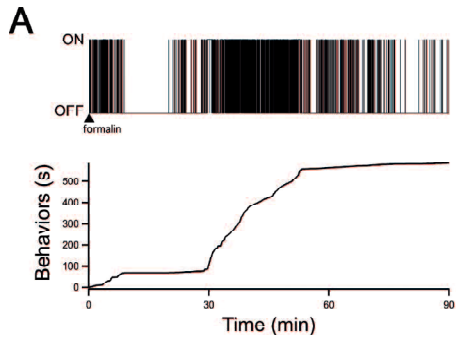
## Formalin誘発性の疼痛関連行動に対するクロニジンの作用

TRPV1はバニロイドや炎症性メディエータなどの様々な化学物質によっても活性化される。しかし、ホルマリン誘発性の疼痛関連行動にTRPV1が関与しているかどうかは明らかではない。ホルマリンを足の裏に投与するとPhase IとPhase IIと呼ばれる二峰性の反応が惹起されることが知られており、Phase Iはformalinが直接侵害受容ニューロンに作用して生じる応答であること、Phase IIはformalin投与後に生じる炎症によるものであることが報告されている [16-20]。TRPV1の活性化がphase IとPhase II応答に関与しているという報告 [21, 22] もあれば、関与していないという報告 [23, 24]もあるため、まず初めにcapsazepineを用いてformalin誘発性疼痛関連行動にTRPV1の関与について検討した。5% formalinをラット後肢の足の甲に投与し、誘発された疼痛関連行動を90分間観察し、その累積時間を解析した (図4A)。図4B-Dは5分毎の疼痛行動の時間を示している。溶媒を投与したコントロール群ではPhase I応答がformalin投与後の15分間で観察され、投与直後から5分後までの5分間で最大の疼痛行動量を示した。Phase II応答はformalin投与15分後から観察され、最大疼痛行動量は投与後30-35分で見られた (図4B, C, F, Gの黒線)。Formalinを投与した足とは反対

側の足にcapsazepine (30 nmol)を投与してもPhase IとPhase IIの反応に何も影響を与えなかった (図4C, Dの青線)。Capsazepineをformalinを投与した足と同側に前投与すると、コントロール群及びcapsazepine反対側投与群と比較して5分毎の疼痛行動時間は減少傾向であった (図4B, Dの赤線)。Capsazepine同側投与群の合計の疼痛行動時間はコントロール群とcapsazepine反対側投与群と比較して減少傾向であった (Fig. 4E)。続いて、クロニジンがformalin誘発性の疼痛関連行動に影響を与えるかどうかを検討した。クロニジン (25 nmol)のformalin投与側の足と反対側の足への前投与はPhase I応答に影響を与えなかった (図4G)。一方、クロニジン反対側投与群のPhase II応答は最大反応が見られる時間がコントロール群と比較して遅れて出現し、5分間で観察される最大の疼痛行動時間が減少していたが、90分間における合計疼痛行動時間にはコントロール群と有意な差は見られなかった (図4G, I)。クロニジンをformalin投与側の足と同側に前投与するとPhase I応答は減少する傾向が見られた (図4F)。一方、phase IIはformalin投与25分後から観察され、90分間緩やかに続いた。コントロール群と比較してクロニジン同側投与群のPhase IIの最大疼痛行動量を示す時間は遅れて出現し、90分間の合計疼痛行動時間は減少した (図4F, I)。クロニジン反対側投与群と比



較すると、クロニジン同側投与群の5分毎の疼痛行動量はformalin投与80分後まで少ない傾向だった (図4H)。クロニジン同側投与群のPhase I及びPhase IIの合計疼痛行動時間はクロニジン反対側投与群と比較して減少傾向であった (図4I; Phase I,  $p = 0.18$ ; Phase II,  $p = 0.073$ ; ANOVA with a *post hoc* Tukey HSD testにより検定)。これらの結果はクロニジンによるPhase II応答のピークの後方シフトが全身性作用によるものであることを示している。加えて、formalin投与側と同側に前投与したクロニジンは局所的な作用により鎮痛効果を発揮した。



#### 図4 Formalin誘発性の疼痛関連行動に対する capsazepine とクロニジンの作用

(A) Formalin投与10分前にラット後肢の足の裏に溶媒を前投与したときに得られた典型的な波形。疼痛関連行動はformalin投与後90分間モニターした (上段)。上段のトレースは継時的な疼痛行動の出現を示している。図中のON及びOFFはそれぞれラットが疼痛行動を起こしているか、起こしていないかを示す。Formalin投与後の時間を横軸にとり、90分間で観察された累積的な疼痛行動時間を示した (下段)。(B-D) 5分毎の疼痛行動時間をシンボルで示した。コントロールとして溶媒 (Veh, 黒丸, n = 4)をformalin投与側のラット後肢の足の甲に前投与した。Capsazepineはformalin投与側 (CPZ, ipsi, 赤丸, n = 4)もしくは反対側 (CPZ, ipsi, 青三角, n = 4)のラット後肢の足の甲に前投与した。有意差検定にはANOVA with a *post hoc* Tukey HSD testを用い、5分毎の値を群ごとに比較した(\* P < 0.05, \*\* P < 0.01)。(E) コントロール群、capsazepine同側投与群、capsazepine反対側投与群で観察されたFormalin誘発性のphase I (0-15分)とPhase II (15-90分)の合計疼痛行動時間。各群、平均値±標準誤差を示した。有意差検定にはANOVA with a *post hoc* Tukey HSD testを用いた(\*\* P < 0.01, 対溶媒投与群; ††P < 0.01)。(F-H) 5分毎の疼痛行動時間をシンボルで示した。コントロールと

して溶媒 (Veh, 黒丸, n = 4)をformalin投与側のラット後肢の足の甲に前投与した。クロニジンはformalin投与側 (Clo, ipsi, 赤丸, n = 4)もしくは反対側 (Clo, ipsi, 青三角, n = 4)のラット後肢の足の甲に前投与した。有意差検定にはANOVA with a *post hoc* Tukey HSD testを用い、5分毎の値を群ごとに比較した(\* P < 0.05, \*\* P < 0.01)。(I) コントロール群、クロニジン同側投与群、クロニジン反対側投与群で観察されたFormalin誘発性のphase I (0-15分)とPhase II (15-90分)の合計疼痛行動時間。各群、平均値±標準誤差を示した。有意差検定にはANOVA with a *post hoc* Tukey HSD testを用いた(\* P < 0.05, 対溶媒投与群; † P < 0.05)。

## DRGに発現する $\alpha_2$ アドレナリン受容体サブタイプmRNAの検討

$\alpha_2$ アドレナリン受容体は主に3つのサブタイプ ( $\alpha_{2a}$ 、 $\alpha_{2b}$ 、 $\alpha_{2c}$ アドレナリン受容体)に分類される。これらのうち、どのサブタイプがDRGに優勢に発現しているのかを明らかにするためにリアルタイムPCRによって相対的な $\alpha_{2a}$ 、 $\alpha_{2b}$ 、 $\alpha_{2c}$ 受容体の発現レベルを検討した。 $\alpha_2$ 受容体とGAPDHをターゲットとしてリアルタイムPCRにより増幅した際に得られた、代表的な増幅曲線を図5A左図に示す。 $\alpha_2$ 受容体サブタイプのうち、Threshold cycle (Ct)値は $\alpha_{2c}$ 受容体が最も小さかった。GAPDHに対する $\alpha_{2a}$ 、 $\alpha_{2b}$ 、 $\alpha_{2c}$ 受容体の $\Delta$ Ct値を図5A右図に示す。この結果から、DRGにおいて $\alpha_{2c}$ 受容体が $\alpha_{2a}$ 、 $\alpha_{2b}$ 受容体よりも優勢に発現していることが示された。 $\alpha_{2c}$ 受容体と比較したときの $\alpha_{2a}$ の $\Delta$ Ct値の差はそれぞれ $3.21 \pm 0.37$  (n = 8) and  $6.24 \pm 0.26$  (n = 8)であった (平均値 $\pm$ 標準誤差)。

## DRGにおけるTRPV1と $\alpha_2$ 受容体の発現の免疫組織化学的検討

リアルタイムPCRにより、 $\alpha_{2c}$ 受容体とmRNAレベルが $\alpha_{2a}$ 、 $\alpha_{2b}$ 受容体と比較して最も高いことが明らかとなった。TRPV1と $\alpha_2$ 受容体が同一のDRGニューロンに発現しているのかを検討するために、免疫染色を行なった。DRGニューロン

は小型、中型、大型のニューロンに分けられることが一般的に知られている。

連続した切片において、抗TRPV1抗体と抗 $\alpha_{2a}$ -、抗 $\alpha_{2c}$ -受容体抗体に対して陽性反応を示したDRGニューロンを図5B, Cに示す。明らかなTRPV1様の陽性像は小型と中型のDRGニューロンに見られた。 $\alpha_{2a}$ 、 $\alpha_{2c}$ 受容体様の陽性反応も小型と中型のDRGニューロンに見られた。また小型と中型のDRGニューロンにおいて、TRPV1と $\alpha_{2a}$ 受容体、TRPV1と $\alpha_{2c}$ 受容体の陽性像はそれぞれ同一のニューロンで検出された。

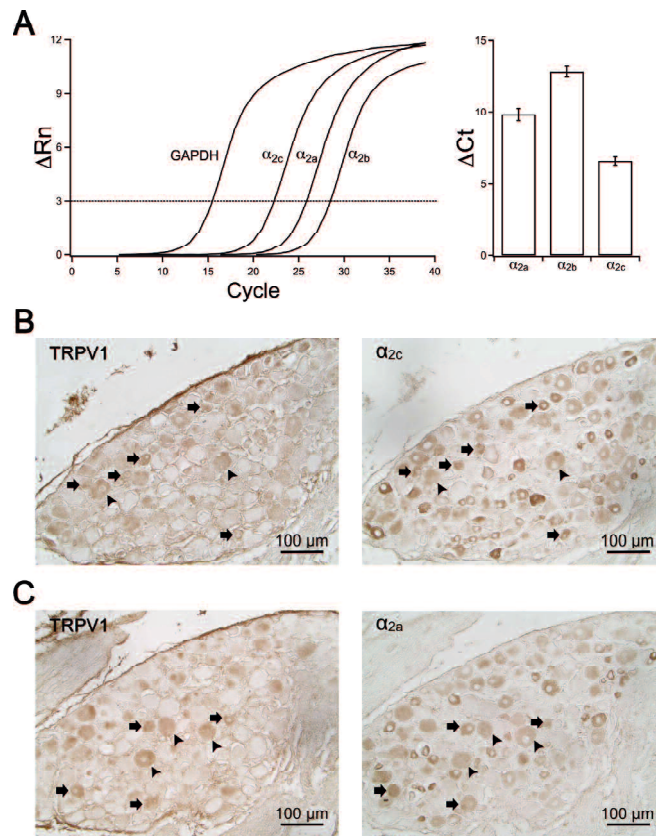


図5 DRGにおける $\alpha_2$ アドレナリン受容体のサブタイプ

(A) リアルタイムPCR増幅曲線を左図に示す。リアルタイムPCR反応の閾値は3とし、GAPDHと $\alpha_2$ 受容体のCt値を求めた。GAPDHに対する $\alpha_{2a}$  (n = 8)、 $\alpha_{2b}$  (n = 8)、 $\alpha_{2c}$  (n = 8)受容体の $\Delta Ct$ 値を算出した結果を右図に示す。カラムは平均値 $\pm$ 標準語差を表す。(B, C) DRG組織におけるTRPV1、 $\alpha_{2a}$ 、 $\alpha_{2c}$ 受容体の免疫応答性の像。TRPV1、 $\alpha_{2a}$ 、 $\alpha_{2c}$ 受容体様の免疫応答性はDABによって可視化した。

矢印: 小型ニューロンの陽性像、矢頭: 中型ニューロンの陽性像。

行動学的実験によって $\alpha_2$ 受容体の活性化がTRPV1関連性の疼痛関連行動を緩和することが明らかとなり、個体レベルでのTRPV1と $\alpha_2$ 受容体の機能的関連性が示唆された。この現象の原因となる細胞内メカニズムを解明するために、ラットのDRG組織から単離したDRGニューロンを用いて電気生理学的手法によりTRPV1に対するアドレナリン作動系の作用を検討した。*In vitro*の実験では培養3-7日目の直径30  $\mu\text{m}$ 以下の小型のラットDRGニューロンを使用した。

#### ノルアドレナリンによるcapsaicin誘発電流の濃度依存的な抑制作用

$\text{K}^+$ 電極液を用いたパッチクランプ記録によりギガシール形成後、パッチ膜を破壊し、Whole-cellモードで膜電位を-60 mVに固定して膜電流応答を記録した。DRGニューロンにcapsaicin (1  $\mu\text{M}$ )を30秒間適用すると、capsaicin適用開始から20秒以内に内向き電流の振幅は最大となり、その後減少した。本実験ではcapsaicin適用によって100 pA以上の電流を生じたニューロンを解析対象とした。Capsaicinを除去すると電流はcapsaicin適用前と同程度にまで回復した。TRPV1は繰り返しのcapsaicin刺激に対して脱感作する性質を有しているため、15分間隔で3回capsaicin刺激を繰り返すと電流の最大振幅は徐々に減弱した (図



1A)。電流の振幅の大きさは細胞ごとに異なっているため、1回目のcapsaicin刺激によって得られた反応の振幅に対する2回目の反応の大きさの割合を算出して標準化し、定量的な解析を行った。Capsaicin以外の薬物非存在下でのコントロール実験で得られた1回目のcapsaicin応答に対する2回目のcapsaicin応答の大きさの割合は $68.5 \pm 14.9\%$  (n=5)だった。Capsaicin電流に対するノルアドレナリン (NA)の作用を検討するために、2回目のcapsaicin刺激の2分前からNA (1 pM)を前適用したところ、capsaicin誘発電流の振幅は大きく減弱した (図1B)。同様の実験を0.1 fM-1 nMの各濃度のNAで行ったところ、NAによるTRPV1電流の抑制作用は濃度依存性に強くなり、0.1 pM、1 pM、1 nMで有意な抑制作用が見られた(図1C)。NAによるcapsaicin誘発電流の振幅の抑制は0.1 pMのNAで最大となり、その抑制率は $87.3 \pm 16.2\%$  (n = 6)だった。

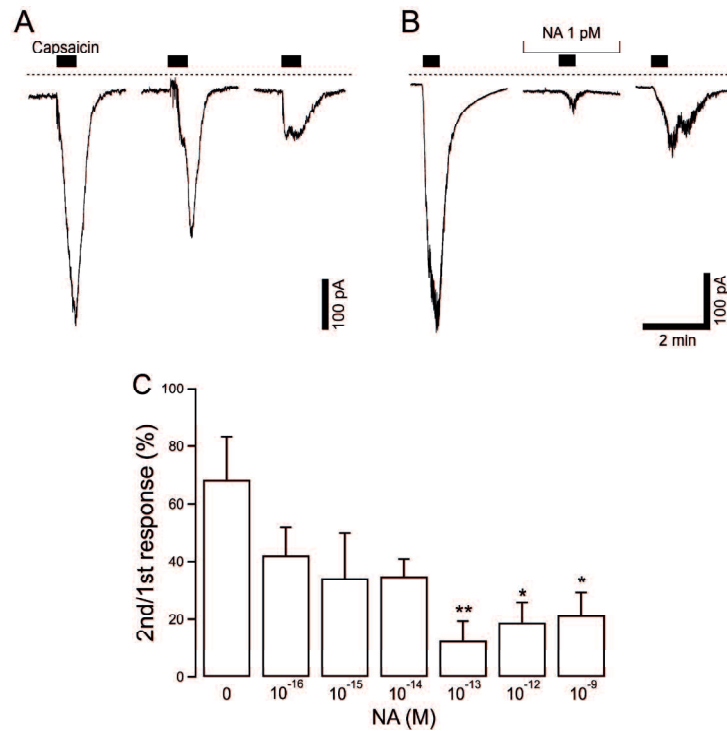


図6 NAによるcapsaicin電流の抑制

(A) NA非存在下でのcapsaicinに対するコントロール応答の代表例。Capsaicin (1  $\mu$ M)は同一のニューロンに対して15分間隔で30秒間ずつ3回適用した。(B) NA (1 pM)を2回目のcapsaicin適用時に前適用した代表例。NAはcapsaicin適用2分前から適用し、4.5分間処置した。AとBの図中の点線は電流がゼロのベースラインを示している。(C) NAによるcapsaicin電流の濃度依存的な抑制。Capsaicin適用1回目に対する2回目の電流の相対的な大きさ (2nd/1st response)をニューロンごとに算出し、カラムにまとめた。それぞれのカラムは平均値 $\pm$ 標準誤差を示し、

有意差検定にはANOVA with a *post hoc* Tukey HSD testを用いた (左からn = 5, 6, 5, 5, 6, 8, 5; \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, 対NA非存在下)。

## ノルアドレナリンによる capsaicin 電流抑制に対する選択的なアドレナリン受容

### 体拮抗薬及び作動薬の作用

アドレナリン受容体は共役するGタンパク質によって $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ 受容体の3つのサブタイプに分けられ、NAはこれらすべてのサブタイプに作用する。DRGでのNAによるcapsaicin電流の抑制にどのサブタイプを介しているのかを明らかにするために、それぞれの受容体の選択的な拮抗薬のNAによる抑制作用に対する作用を検討した。図6と同様のプロトコルを用いて、同一のニューロンに3回capsaicinを適用し、2回目のcapsaicin刺激はNAと各受容体拮抗薬存在下で行なった。NA単独、あるいはNA及びプラゾシン (prazosin, 10 nM,  $\alpha_1$ 受容体拮抗薬)またはヨヒンビン (yohimbine, 10 nM,  $\alpha_2$ 受容体拮抗薬)またはプロプラノロール (propranolol, 10 nM,  $\beta$ 受容体拮抗薬)存在下でのcapsaicin応答の代表例を図7A-Dにそれぞれ示す。1回目のcapsaicin刺激によって得られた反応の振幅に対する2回目の反応の大きさの割合を算出した結果を図7Eに示す。プラゾシン存在下ではNAによるcapsaicin電流の抑制作用はアドレナリン受容体拮抗薬非存在下でのNA適用時と有意な差はみられず、NA非存在下のコントロールと同様に有意なNAによるcapsaicin誘発電流の抑制がみられた。一方、ヨヒンビンおよびプロプ

ラノロール存在下でのNAによるcapsaicin電流の抑制作用はNA単独適用時と有意な差がみられ、コントロールと同程度にまでcapsaicin電流の振幅が回復した(図7E)。

$\alpha_2$ 受容体拮抗薬と $\beta$ 受容体拮抗薬がNAによるcapsaicin電流の抑制作用を解除したので、 $\alpha_2$ 受容体作動薬と $\beta$ 受容体作動薬のcapsaicin電流に対する作用を検討した。NAと同様に、クロニジン (clonidine,  $\alpha_2$ 受容体作動薬, 1 pM)、デクスメドミジン (dexmedetomidine,  $\alpha_2$ 受容体作動薬, 1 pM)、イソプロテレノール (isoproterenol,  $\beta$ 受容体作動薬, 1 pM)を図1と同一のプロトコルに従ってニューロンに適用した。クロニジン (図8A, 8C)とデクスメドミジン (図8C)は有意にcapsaicin電流を抑制したが、イソプロテレノール (図8C)ではみられなかった。さらに、クロニジンによるcapsaicin電流の抑制作用はヨヒンビン (1 nM)によって解除された (図8B)。

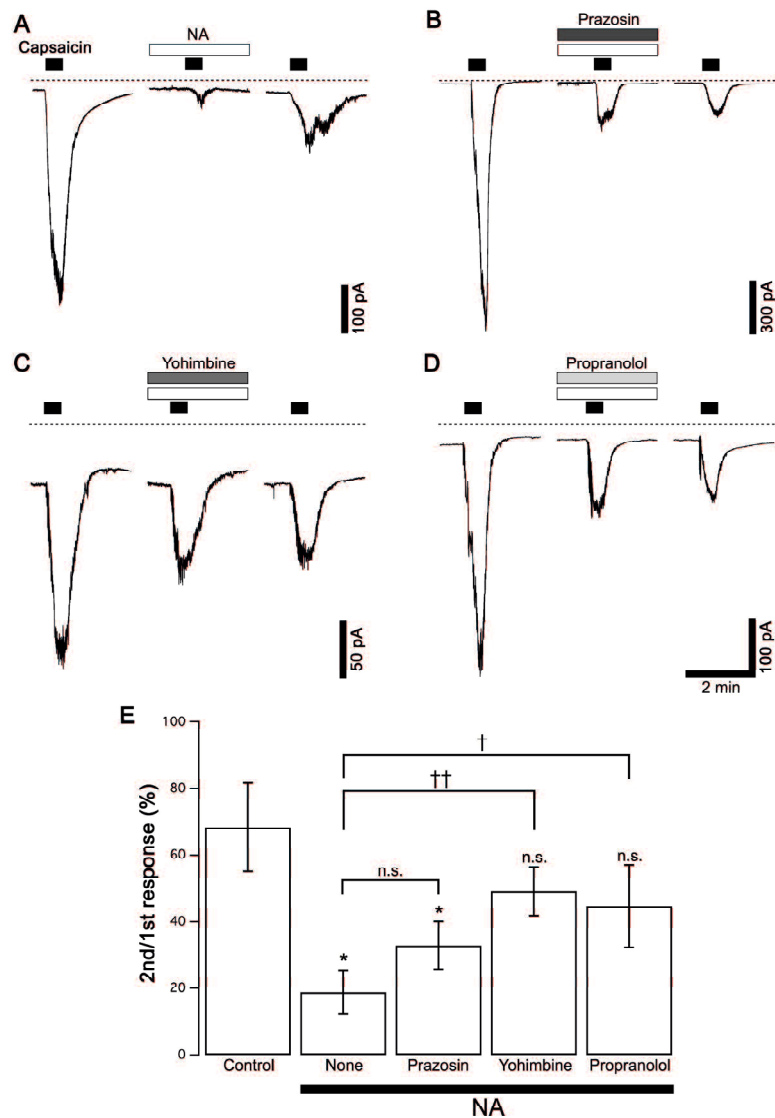


図7 NAによるcapsaicin電流の抑制に対するアドレナリン受容体拮抗薬の作用

(A) NA (1 pM)単独適用時の代表的なcapsaicin応答 (図1Bと同一)。 (B-D) プラズシン (prazosin, 10 nM)、ヨヒンビン (yohimbine, 10 nM)、プロプラノロール (propranolol, 10 nM)をNA (1 pM)と同時に適用した際に得られた代表例。図中の

点線は電流がゼロのベースラインを示している。(E) Capsaicin刺激1回目で得られた応答に対する2回目の応答の割合 (2nd/1st response)をニューロンごとに算出し、カラムにまとめた。それぞれのカラムは平均値±標準誤差を示し、有意差検定にはANOVA with a *post hoc* Tukey HSD testを用いた (左からn = 5, 8, 5, 6; \* P < 0.05, 対NA非存在下; † P < 0.05, †† P < 0.01, 対拮抗薬非存在下.)。

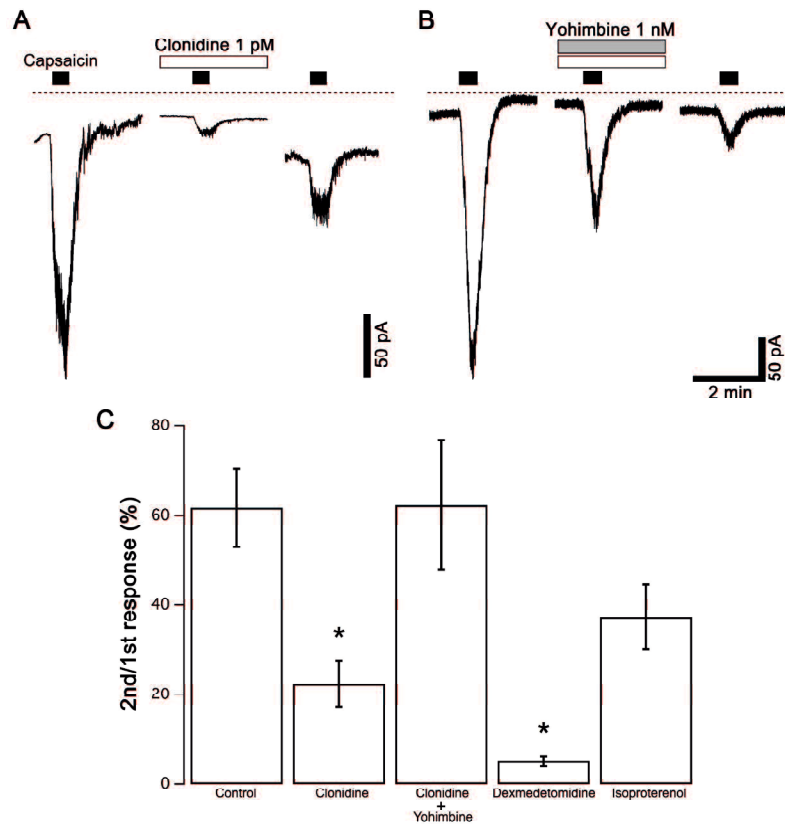


図8 Capsaicin電流に対するアドレナリン受容体の作用

(A) クロニジン (1 pM)存在下のcapsaicin電流の代表例。(B) クロニジン (1 pM)とヨヒンビン (1 nM)を同時に前適用した際のcapsaicin電流の代表例。図中の点線は電流がゼロのベースラインを示している。(C) Capsaicin刺激1回目で得られた応答に対する2回目の応答の割合 (2nd/1st response)をニューロンごとに算出し、カラムにまとめた。デクスメデトミジン (1 pM)及びイソプロテレノール (1 pM)存在下でのcapsaicin電流の2nd/1st responseも示している。それぞれのカラ



ムは平均値±標準誤差を示し、有意差検定にはANOVA with a *post hoc* Tukey HSD testを用いた (左からn = 9, 10, 5, 4; \* P < 0.05, 対アドレナリン作動薬非存在下)。

## ノルアドレナリンによる capsaicin 電流の抑制に寄与する細胞内メカニズムの検

### 討

アドレナリン受容体はそのサブタイプによらず、すべてGタンパク質共役型受容体であるが、それぞれ共役しているGタンパク質が異なっている。 $\alpha_2$ 受容体は $G_{i/o}$ タンパク質と共役し、受容体が活性化するとアデニル酸シクラーゼ (adenylate cyclase, AC)の活性が低下する。一方、 $\beta$ 受容体は $G_s$ タンパク質と共役し、受容体が活性化するとACの活性が亢進する。細胞内cAMP濃度の増加はcAMP依存性タンパクリン酸化酵素 (protein kinase A, PKA)を活性化させ、細胞内cAMPの減少はPKAの活性を低下させる。細胞内PKAの活性がcapsaicin電流の調節に関与しているのかを明らかにするために、細胞内液を介してPKAの触媒サブユニット (catalytic subunits of PKA, cPKA)または脱リン酸化酵素阻害剤であるオカダ酸 (okadaic acid, OA)を細胞内に適用し、capsaicin電流に対する作用を検討した。OA (1  $\mu$ M)を細胞内に適用すると、NAの単独適用で内向き電流を発生させることがしばしばあった。そのため、capsaicinを繰り返し3回適用し、2回目のcapsaicin刺激時にNAを適用する従来のプロトコルではOAの作用を正確に評価することができない。そこで、capsaicinを4分間持続的に適用してみら

れる電流に対するNAの作用を確かめ、この条件下でcPKAおよびokadaic acidのNAによる抑制作用への影響を検討した。Whole-cell形成後3分以上経過してからcapsaicinを4分間適用し続けたところ、capsaicin適用開始から10秒以内に内向き電流の振幅は最大となり ( $-75 \pm 13$  pA/pF,  $n = 45$ )、その後徐々に脱感作し、2分後には最大反応に対して  $58 \pm 3\%$  ( $n = 45$ )まで減少した (図9A左上)。Capsaicin適用開始から2分後に30秒間、1 nMのNAを適用すると内向き電流の振幅は減少し、NAを除去すると振幅は回復した (図9A右上)。細胞内にcPKAまたはOAを適用してもcapsaicinは最大反応がそれぞれ  $-49 \pm 11$  pA/pF ( $n = 16$ )、 $-29 \pm 9$  pA/pF ( $n = 18$ )となる一過性の内向き電流を発生させた。また、capsaicin適用開始から2分間で減少した内向き電流の割合はcPKAを細胞内液に適用した時は  $55 \pm 4\%$  ( $n = 16$ ,  $P > 0.05$ )、OAを細胞内液に適用した時は  $44 \pm 5\%$  ( $n = 18$ ,  $P < 0.05$ )となった。この結果はOAを細胞内に適用することによりTRPV1の脱感作が減弱したことを示唆している。cPKAまたはOAを細胞内に適用したニューロンにおいて、NAはcapsaicin誘発性の持続的な電流に対して抑制作用を示さなかった (図9A下段)。定量的な評価を行うために、NA適用直前のcapsaicin電流の振幅の大きさに対するNA適用直後のcapsaicin電流の振幅の大きさの割合を算出し、図9B

に示す。NA非存在下のコントロール反応 (None)もcPKAまたはOAの作用を確認したニューロンと同じディッシュで培養したニューロンを用いて記録した。通常の細胞内液を使用した時はNAは有意に持続的なcapsaicin電流を抑制したが、cPKAあるいはOAを細胞内に適用した時はみられなかった。

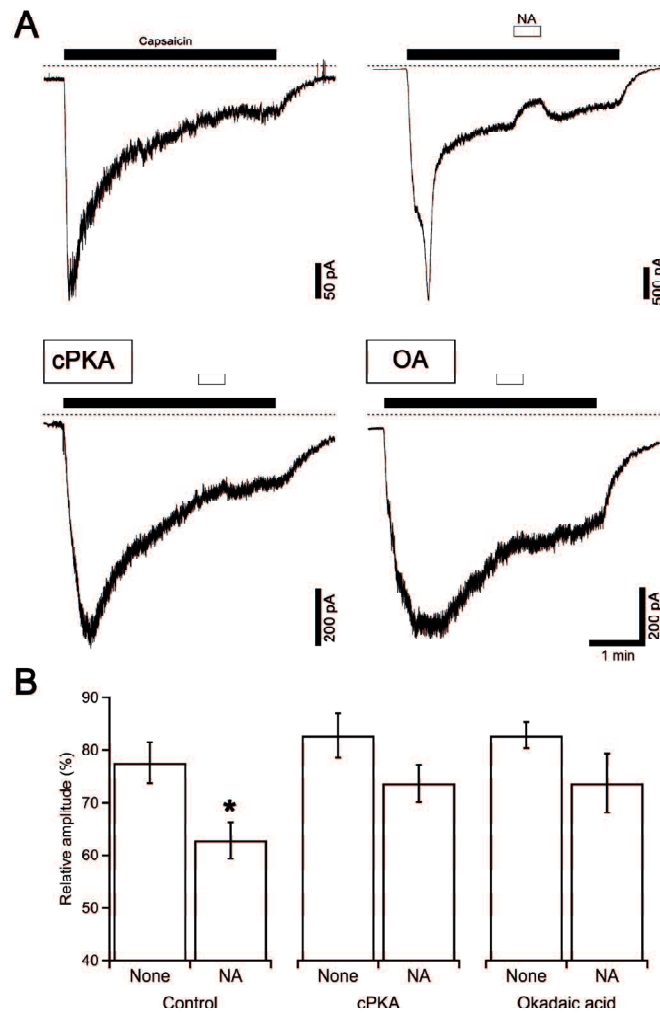


図9 NAのcapsaicin電流抑制作用に対するcPKAとOAの効果

(A) Capsaicin (1  $\mu$ M)を4分間適用し続けた際に生じるcapsaicin電流の代表例を左上に示す。NA (1 nM)はcapsaicin適用開始から2分後に30秒間適用した (右上)。下図はcPKA (250 U/ml, 左)またはOA (1  $\mu$ M, 右)を細胞内液に適用したニューロンを用いて、capsaicin電流に対するNAの作用を記録した代表例である。

図中の点線は電流がゼロのベースラインを示している。(B) NA適用開始直前の電流の大きさに対するNA適用直後の電流の大きさの割合を示す。それぞれのカラムは平均値±標準誤差を示し、有意差検定にはStudent's *t*-testを用いた (左からn = 12, 33, 5, 11, 10; \* P < 0.05, 対NA非存在下)。

## ノルアドレナリンによるcapsaicin電流の抑制作用におけるGタンパク質の活性化の関与

### 化の関与

Gタンパク質の活性化がノルアドレナリンによるcapsaicin電流の抑制に関与しているのかを明らかにするために、すべてのサブタイプのGタンパク質を不活化する非水解性GDP類似物質であるGDPβSを細胞内液に適用、あるいはG<sub>i/o</sub>タンパク質を選択的に不活化する百日咳毒素 (pertussis toxin, PTX)をニューロンに前処置し、その作用を検討した。GDPβSは最終濃度が200 μMとなるように細胞内液に溶解した。PTX (100 g/mL)は細胞培養液に添加し、ニューロンはPTX含有培養液で24時間培養した後実験で使用した。図6のプロトコルのようにcapsaicin適用を3回繰り返し、NAは2回目のcapsaicin刺激2分前から適用した。GDPβSの細胞内適用処置とPTXの前処置をしたニューロンはcapsaicinの適用により未処置のニューロン同様に脱感作を伴った電流を生じ、また、これらのニューロンはNAによるcapsaicin電流の抑制作用は見られなかった (図10A, B)。未処置ニューロン、GDPβSを細胞内に適用したニューロン、PTXを前処置したニューロンについて、1回目のcapsaicin刺激によって得られた反応の振幅に対する2回目の反応の大きさの割合を算出した結果を図10Cに示す。NAによるcapsaicin

電流の有意な抑制作用はGDPβS及びPTXによってみられなくなった。



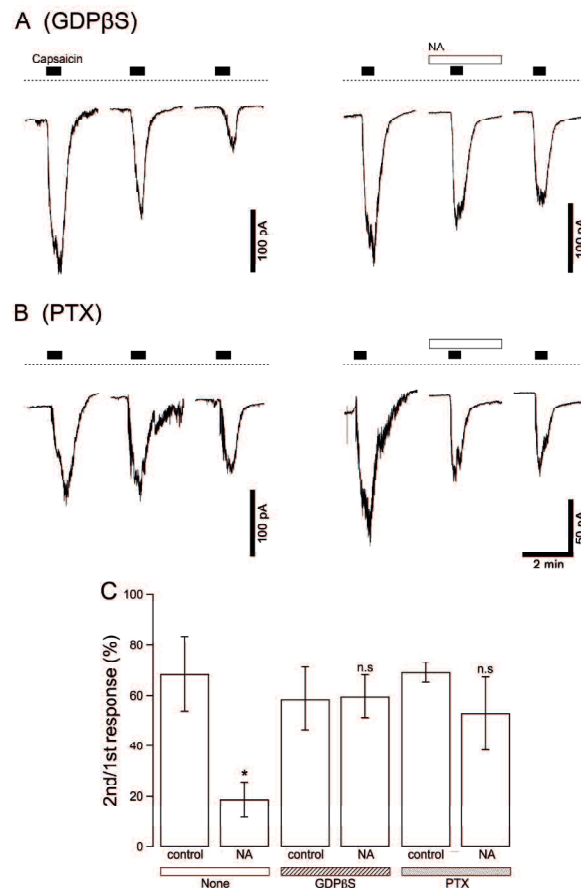


図10 NAによるcapsaicin電流の抑制におけるGタンパク質活性の寄与

(A-B) GDPβS (200 μM, A)を細胞内適用したニューロン及びPTX (100 μg/mL)を前処置したニューロンで得られた代表的な電流応答。Capsaicin (1 μM)は15分間隔で3回繰り返し適用した (左図)。NAは2回目のcapsaicin刺激の2分前から4.5分間適用した (右図)。図中の点線は電流がゼロのベースラインを示している。

(C) Capsaicin刺激1回目で得られた応答に対する2回目の応答の割合 (2nd/1st response)をニューロンごとに算出し、カラムにまとめた。それぞれのカラムは

平均値±標準誤差を示し、有意差検定にはStudent's *t-test*を用いた (左からn = 5, 8, 5, 6, 5, 5; \* P < 0.05, 対NA非存在下)。

## 考察

### 行動学的解析からみた末梢レベルでの $\alpha_2$ 受容体活性化を介したTRPV1の抑制に

#### よる鎮痛効果

本研究では、行動学的実験により capsaicin、侵害性の熱、ホルマリンによって誘発される疼痛関連行動に対するアドレナリン作動薬の効果を検討した。これまでに capsaicin 誘発性の疼痛関連行動が TRPV1 拮抗薬である capsazepine によって抑制されることが報告されている [25]。本実験では、侵害性の熱または formalin をそれぞれラット後肢の足の裏または足の甲に投与することで誘発された疼痛関連行動が capsazepine を同箇所の前処置することによって抑制されることが明らかになった。この結果は侵害性の熱や formalin 誘発性の疼痛関連行動に TRPV1 の活性化が関与している可能性を示唆している。Capsaicin をラット後肢の足の裏に投与すると疼痛関連行動が誘発され、同箇所へのクロニジンの前処置はこの疼痛関連行動を抑制し、ヨヒンビン はクロニジンの抑制作用を解除した。また、クロニジンを capsaicin 投与側の後肢とは反対側の後肢足の裏に投与しても capsaicin 誘発性の疼痛関連行動は影響を受けなかった。これらの結果は後

肢足の裏の皮下に伸張する末梢神経末端に発現する $\alpha_2$ 受容体の活性化が局所的にTRPV1の活性化を抑制し、その結果として疼痛行動量の抑制、つまり鎮痛作用を引き起こしたことを示唆している。Capsaicin誘発性の疼痛関連行動に対するデクスメデトミジンやST-91などのクロニジン以外の $\alpha_2$ 受容体作動薬の作用についても検討したが、デクスメデトミジンとST-91の両者とも使用したクロニジンの濃度よりも低濃度で鎮痛作用よりも強力な鎮静作用を示した。そのため、正常な疼痛関連行動が観察できずcapsaicin testではこれらの試薬の鎮痛作用を検討することはできなかった。本実験で、NAはcapsaicin誘発性の疼痛行動を増強する一方でクロニジンは抑制した。これまでに非選択的な $\alpha_1/\alpha_2$ 受容体拮抗薬であるフェントラミンがcapsaicinによって誘発された尻込み行動を有意に抑制すること [25]、フェントラミンと $\alpha_1$ 受容体拮抗薬であるプラゾシンがcapsaicinの皮内投与によって誘発された機械的アロディニアを減弱させること [26]が報告されている。もしかすると、本実験で観察されたNAによるcapsaicin誘発性の疼痛関連行動の増加はTRPV1に対する $\alpha_1$ 受容体の活性亢進作用を反映しているのかもしれない。また、capsaicin投与側の後肢とは反対側の肢にNAを投与してもcapsaicin誘発性の疼痛関連行動が増加したので、後肢へ投与したNAは何かしらの全身性

の作用によって疼痛関連行動影響を与えていると考えられる。

TRPV1は43°C以上の侵害性の熱刺激に対して応答する [12, 14]。これまでに、マウスの尾に赤外線刺激を与えて生じる反応を観察するテールフリック法では経皮浸漬によるクロニジンの局所適用が鎮痛効果を示すことが報告されている [10]。本実験で用いたHargreave's testではcapsazepineあるいはクロニジンの投与に関わらずDay 1の左右間の反応とDay 2の左右間の反応に差は見られなかった。実験に使用したラットの中には右後肢と左後肢間で有意に応答性 (withdrawal latency)が異なる個体もいたので、左右の後肢の反応を統計的に比較した際に個々の後肢の感受性のばらつきが投与した薬物の作用を見えなくしてしまい、Day 2の左右を比較しても差が検出されなかったのかもしれない。Capsazepineとクロニジンはともにwithdrawal latencyを有意に延長し、この作用は片側性であった。このことから熱刺激誘発性の疼痛関連行動にTRPV1が関与していること、そしてクロニジンが局所性に熱誘発性の疼痛関連行動を抑制することが示唆される。末梢神経繊維末端に存在する $\alpha_2$ 受容体の活性化は同一繊維上にあるTRPV1の活性を抑制し、その結果鎮痛作用を発揮するのかもしれない。

Formarinは二相性 (Phase I, Phase II)の疼痛関連行動を誘発する。Phase I応答は

formalinの主要な構成成分であるホルムアルデヒドが直接感覚神経に発現する侵害受容分子に作用することで引き起こされ、Phase II応答は二次的な炎症によって誘発される [20, 27, 28]。本研究では、capsazepineはPhase IとPhase IIの両者の疼痛関連行動を抑制した。またこれらの抑制作用は片側性であり、この結果はformalinが投与された皮下に伸長する末梢神経繊維に発現するTRPV1の活性化がPhase IとPhase II応答に含まれることを示唆している。クロニジンもPhase I応答を抑制した。この鎮痛作用はクロニジンをformalin投与側の足に前投与した場合に観察され、反対側への投与では見られず、この結果はformalinを投与したその局所に存在する $\alpha_2$ 受容体の活性化が鎮痛作用を引き起こしたことを示している。また、クロニジンをformalin投与側とは反対側に投与した場合にはPhase II応答の最大反応の出現が後方シフトした。この後方シフト作用はクロニジンをformalin投与した側の足に投与した場合にも観察されたことから、何らかのクロニジンの全身性作用によってこの現象が引き起こされた可能性が考えられる。formalin投与反対側へクロニジンを投与した際に見られたPhase II応答よりもformalin投与側へ投与した際のPhase II応答は減少しており、この部分はクロニジンによって生じる末梢性の鎮痛作用を表している。これらの結果を踏まえると、

この末梢性の鎮痛作用は $\alpha_2$ 受容体の活性化を介したTRPV1の抑制によるものなのかもしれない。三種類の行動学的実験で得られたすべての結果は一貫して末梢神経繊維末端の局所で $\alpha_2$ 受容体を介したTRPV1の抑制作用が起こり、その結果鎮痛が起こることを示している。

#### 細胞レベルでのTRPV1と $\alpha_2$ 受容体の機能的関連性の検討

行動学的実験により末梢の感覚神経繊維レベルでTRPV1と $\alpha_2$ 受容体が機能的に相互作用していることが示唆された。この現象のメカニズムを明らかにするために、ラットから単離し、初代培養したDRGニューロンを用いてTRPV1と $\alpha_2$ 受容体の機能的関連性について電気生理学的手法により検討した。DRGニューロンの中にはcapsaicinに応答するものとしらないものが存在しており、capsaicin応答性DRGニューロンはTRPV1を発現していると考えられる。本実験により、capsaicinによって誘発されたTRPV1の活性化が非常に低濃度のNAによって抑制されることが明らかとなった。NAはcapsaicinによって誘発される電流の発生にも、capsaicinによって誘発された持続的な電流に対しても抑制作用を示した。このcapsaicin応答はNAの洗浄後に再び回復したため、NAの抑制作用は可逆的だと

考えられる。TRPV1の活性をcapsaicinに応答するニューロンのうちほとんどがNAに対する感受性を有していたが、中には非感受性のものもあった。これはDRG組織に含まれるニューロンがヘテロな集団であり、それぞれのニューロンに発現するアドレナリン受容体の密度が異なっているためにNAの感受性が細胞ごとに違うためかもしれない。NAのアドレナリン受容体に対する親和性 ( $pKd$  または  $pKi$ ) は 4.1 – 9.1 であるが (IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology, <http://www.guidetopharmacology.org>)、本実験では非常に低濃度 (1 pM)のNAがcapsaicin誘発電流を抑制した。DRGニューロンの細胞膜上の限局された領域でアドレナリン受容体とTRPV1が近接しており、capsaicinによって誘発されたTRPV1の活性化は少量のアドレナリン受容体の活性化によって抑制できるのかもしれない。

アドレナリン受容体は共役するGタンパク質によって $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\beta$ の3つのサブタイプに分類される。 $\alpha_1$ 受容体はGq共役型受容体であり、活性化するとホスホリパーゼC (PLC)の活性化を介してホスファチジルノシトール二リン酸 (PIP2)からのイノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>)およびジアシルグリセロール (DG)の産生が促進される。DGはプロテインキナーゼC (PKC)を活性化してIP<sub>3</sub>は細胞内Ca<sup>2+</sup>ストア



である小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出を引き起こしてCa<sup>2+</sup>カルモジュリンキナーゼ (Ca/CaMK)の形成を促進する。α<sub>2</sub>受容体はGi共役型受容体であり、活性化されるとアデニル酸シクラーゼ (AC)の活性低下、ATPからのcAMP産生の抑制、それに続くプロテインキナーゼA (PKA)の活性低下を引き起こす。反対に、β受容体はGs共役型受容体であり、活性化によりAC活性の亢進、cAMPの産生促進に引続くPKAの活性の増強が起こる。これらすべてのアドレナリン受容体サブタイプがDRGニューロンに発現していることが報告されている [29]。本実験では、選択的なアドレナリン受容体作動薬と拮抗薬を用いてNAの抑制作用に関わるアドレナリン受容体の特定を試みた。これらのアドレナリン受容体サブタイプのうち、α<sub>1</sub>受容体拮抗薬であるプラゾシンはNAのcapsaicin電流に対する抑制作用に影響を与えなかったことから、α<sub>1</sub>受容体はNAの抑制作用には関与していないと推測される。細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の測定実験により、α<sub>1</sub>受容体の活性化はTRPV1の脱感作を弱めることによりcapsaicin応答を増強することが報告されている [30]。しかしながら、本実験で用いたホールセル・電位固定記録法ではNAのcapsaicin応答に対する抑制作用が主に観察された。いくつかのDRGニューロンではNAによるcapsaicin電流の抑制が観察されなかったが、このようなニューロンではNA

の抑制作用と増強作用が拮抗していたのかもしれない。

$\alpha_2$ 受容体拮抗薬であるヨヒンビンと $\beta$ 受容体拮抗薬であるプロプラノロールがNAの抑制作用を弱めたことから、 $\alpha_2$ 受容体と $\beta$ 受容体がNAのcapsaicin応答に対する抑制に関与していることが予測される。しかし、 $\alpha_2$ 受容体と $\beta$ 受容体の活性化後に生じる細胞内シグナル伝達、つまりACの作用とPKAの活性は真逆の反応を生じる。そこで、AC/cAMP/PKA経路がどのようにcapsaicin電流を調節しているのかを特定するために、PKAの触媒サブユニット (cPKA)と脱リン酸化酵素阻害剤であるOAのNAの抑制作用に対する影響を検討した。ニューロンに発現するタンパク質の多くはcPKAとOAを含むピペット内液で細胞内透析されることでリン酸化されると予想される。このような状況でもcapsaicin誘発性の内向き電流は無処置ニューロンでみられるものと差はなかった。持続的にcapsaicinを4分間投与している間、一過性の速い内向き電流が発生し、その後徐々に電流の振幅は減少した。この電流の振幅の減少はTRPV1の脱感作によるものだと考えられる。OA存在下ではcapsaicin電流の持続相の減衰率は無処置ニューロンよりもゆっくりとしていた。この結果はリン酸化レベルの上昇がTRPV1の脱感作を抑えるというこれまでの報告と一致する。例えば、Gs共役型受容体であるEP<sub>4</sub>受容体はプ

ロスタグランジンE<sub>2</sub>によって活性化されると細胞内のPKA活性が高まり、最終的にTRPV1がリン酸化されることによりcapsaicin電流は増強する [31]。TRPV1にはPKAによってリン酸化されるいくつかのサイトが存在しており、なかでも116番目のセリンもしくは370番目のスレオニンがPKAによってリン酸化されるとcapsaicin応答が増強することが報告されている [32–34]。これらの報告と本実験結果を合わせると、PKAによるTRPV1もしくは関連するタンパク質のリン酸化はTRPV1活性の低下を引き起こさないと考えられる。ゆえに、β受容体の活性化に続いて引き起こる細胞内シグナル経路とPKAの活性化は本実験で観察されたDRGニューロンにおけるNAのcapsaicin電流抑制作用には関わっていないだろう。

G<sub>i/o</sub>タンパク質と共役するソマトスタチン受容体やμオピオイド受容体はTRPV1活性を抑制し、鎮痛作用を起こすことが報告されている [35, 36]。ヨヒンビンがNAの抑制作用を抑えたこと、そしてクロニジンがcapsaicin電流を抑制したことはα<sub>2</sub>受容体の活性化がTRPV1活性を抑制したことを示唆しており、これらの結果はα<sub>2</sub>受容体の活性化によるTRPV1の活性抑制作用が疼痛緩和の役割を担う可能性を予測させる。さらに、細胞内へのGDPβSの添加とニューロンへの

PTXの前処置はNAによるcapsaicin電流の抑制作用を阻害したことから、 $\alpha_2$ 受容体の活性化と引続く $G_{i/o}$ タンパク質の活性化がNAのcapsaicin電流に対する抑制作用に関与していることが強く示唆される。

近年、NAあるいはクロニジンによって活性化された $\alpha_2$ 受容体が持続的なcapsaicin電流を抑制すること、この抑制作用がCAMKIIの活性に依存していることが報告された [15]。これ以前にドーパミン受容体であるD1受容体とD5受容体がTRPV1の活性を同様の機構で抑制することが報告されている [37]。我々もCAMKII拮抗薬であるKN-93を用いてNAのcapsaicin抑制作用に対する影響を検討した。しかし本実験系で用いた培養DRGニューロンではKN-93の作用は観察できなかった。Chakrabortyらが用いた標本と本実験で用いた標本で異なるKN-93の作用が見られた理由は明らかではないが、ニューロンの単離法や培養法の違いによってこの差が生じたのかもしれない。Chakrabortyらが主張するCAMKII依存性メカニズムに加え、本実験で我々が明らかにしたPKA依存性の機構もNAによるTRPV1活性の抑制に寄与していると考えられる。NAは $\alpha_2$ 受容体の活性化に続くAC活性の低下とPKA活性の低下を介し、結果的にTRPV1や関連する細胞内タンパク質を脱リン酸化状態とすることでcapsaicin電流の抑制作用を起こしてい

たのだろう。

$\alpha_2$ 受容体は $\alpha_{2a}$ 、 $\alpha_{2b}$ 、 $\alpha_{2c}$ アドレナリン受容体の3つのサブタイプに分類される。

リアルタイムPCRの結果から、DRGニューロンには $\alpha_{2c}$ 受容体のmRNA発現が最も強く、続いて $\alpha_{2a}$ 、 $\alpha_{2b}$ 受容体となることが明らかとなり、これまでの報告とも一致している [38]。さらに、免疫染色によって $\alpha_{2a}$ 受容体と $\alpha_{2c}$ 受容体がそれぞれ小型と中型のDRGニューロンにTRPV1と共発現することがわかった。 $\alpha_{2b}$ 受容体の抗体を用いたDRG標本の染色にも挑戦したが、はっきりとした $\alpha_{2b}$ 受容体様の免疫応答性を検出することはできなかった。リアルタイムPCRの結果を踏まえると、 $\alpha_{2b}$ 受容体の発現レベルは免疫組織学的に検出可能なレベルよりもはるかに低いかもしれない。本実験ではDRG組織だけではなく坐骨神経での免疫組織化学的染色にも挑戦したが、信頼性のあるTRPV1-、 $\alpha_2$ 受容体様の免疫応答性を確認することはできなかった。坐骨神経はDRGニューロンの細胞体と比較してTRPV1や $\alpha_2$ 受容体の発現密度が低いために本実験で用いた抗体では検出することができなかったのかもしれない。しかしながら、DRGニューロンの細胞体においてTRPV1と $\alpha_2$ 受容体が共発現していたので、同一のニューロンの樹状突起に沿って輸送されたTRPV1と $\alpha_2$ 受容体が末梢神経終末の細胞膜上に発現してい

ることは十分に考えられる。

#### 末梢レベルでの $\alpha_2$ 受容体を介したTRPV1の活性抑制による鎮痛の生理的意義

これまでに人工的な疼痛モデルラットを用いた実験において $\alpha_2$ 受容体が鎮痛に寄与することが報告されている。例えば、坐骨神経障害モデルラットでは侵害性の機械刺激に対する侵害受容応答をクロニジンが減弱させること [39,40]、絞扼性神経損傷モデルラットではセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害剤であるベンラファキシンが $\alpha_2$ 受容体を介して熱過敏症を抑制すること [41]が報告されている。しかしながら非損傷動物での $\alpha_2$ 受容体を介した鎮痛作用の詳細なメカニズムについてはあまり研究されていなかった。本実験では、刺激の種類に関わらず、クロニジンが一次感覚神経の末梢神経末端に発現するTRPV1の活性化に関連する疼痛行動を抑制することを明らかにした。今回明らかとなった皮下に伸長する末梢感覚神経末端での $\alpha_2$ 受容体によるTRPV1の抑制を基盤とする疼痛抑制メカニズムは生体内において中枢神経系の下行性疼痛抑制系と同様に機能しているのかもしれない。

本実験で外因性の $\alpha_2$ 受容体作動薬 (クロニジン)が末梢レベルで疼痛関連行動

を抑制することが明らかとなったが、NAやアドレナリンなどの内因性の $\alpha_2$ 受容体リガンドが同様のメカニズムを引き起こすのか、そして末梢神経繊維に発現する $\alpha_2$ 受容体に作用するアドレナリン作動系アゴニストがどこから来るのかは明らかとなっていない。これまでに、カテコールアミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素を発現する交感神経繊維が皮下に分布することが報告されている [11]。したがって、皮下に分布する交感神経繊維から分泌されたNAがTRPV1と $\alpha_2$ 受容体を発現する一次感覚神経に作用し、 $\alpha_2$ 受容体を介してTRPV1活性を抑制する機構が存在するのかもしれない。また、副腎髄質から分泌されて血中を循環するアドレナリンやNAが $\alpha_2$ 受容体媒介性の鎮痛に寄与している可能性もある。本実験では様々な全身性作用により皮下に投与したNAがcapsaicin誘発性の疼痛関連行動を抑制することを示すことはできなかった。しかし、我々は細胞レベルでの検討により1 pM以下のNAが培養したDRGニューロンでcapsaicin誘発性のTRPV1電流を抑制することを明らかにした。また、ラットの血漿NA濃度は0.9–1.5 nMであることが報告されている [42]。これらを合わせると、循環血液に由来するアドレナリンやNAがTRPV1の活性化によって生じる疼痛を抑制する可能性もあると考えられる。私たちは身体運動時や感情的な興奮時などの

血中アドレナリン濃度が増加する状況では痛み刺激に対して鈍くなることを経験的に知っている。中枢神経系の下行性疼痛抑制系に加えて、本実験で提唱する末梢性の鎮痛メカニズムもこの現象に貢献しているのかもしれない。



## 参考文献

1. Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol.* 2002;**66**(6):355-474.
2. Stamford JA. Descending Control of Pain. *Brit J Anaesth.* 1995;**75**(2):217-27.
3. Feng YP, Yang K, Li YQ. Norepinephrine depresses the capsaicin-evoked miniature excitatory postsynaptic currents in substantial gelatinosa of the rat spinal cord. *Neurosci Lett.* 2002;**322**(2):99-102.
4. Pan YZ, Li DP, Pan HL. Inhibition of glutamatergic synaptic input to spinal lamina II<sub>o</sub> neurons by presynaptic  $\alpha_2$  adrenergic receptors. *J Neurophysiol.* 2002;**87**(4):1938-47.
5. Tomoyose O, Kodama D, Ono H, Tanabe M. Presynaptic Inhibitory Effects of Fluvoxamine, a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor, on Nociceptive Excitatory Synaptic Transmission in Spinal Superficial Dorsal Horn Neurons of Adult Mice. *J Pharmacol Sci.* 2014;**126**(2):136-45.
6. Kamisaki Y, Hamada T, Maeda K, Ishimura M, Itoh T. Presynaptic alpha 2 adrenoceptors inhibit glutamate release from rat spinal cord synaptosomes. *Journal of neurochemistry.* 1993;**60**(2):522-6.

7. Ono H, Mishima A, Ono S, Fukuda H, Vasko MR. Inhibitory effects of clonidine and tizanidine on release of substance P from slices of rat spinal cord and antagonism by alpha-adrenergic receptor antagonists. *Neuropharmacology*. 1991;**30**(6):585-9.
8. Pertovaara A. The noradrenergic pain regulation system: a potential target for pain therapy. *Eur J Pharmacol*. 2013;**716**(1-3):2-7.
9. Takano M, Takano Y, Yaksh TL. Release of calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P (SP), and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) from rat spinal cord: modulation by  $\alpha_2$  agonists. *Peptides*. 1993;**14**(2):371-8.
10. Dogrul A, Uzbay IT. Topical clonidine antinociception. *Pain*. 2004;**111**(3):385-91.
11. Haas S, Capellino S, Phan NQ, Bohm M, Luger TA, Straub RH, et al. Low density of sympathetic nerve fibers relative to substance P-positive nerve fibers in lesional skin of chronic pruritus and prurigo nodularis. *J Dermatol Sci*. 2010;**58**(3):193-7.
12. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;**389**(6653):816-24.
13. Cortright DN, Szallasi A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor

TRPV1. An update. *Eur J Biochem.* 2004;**271**(10):1814-9.

14. Tominaga M, Tominaga T. Structure and function of TRPV1. *Pflüg Arch.* 2005;**451**(1):143-50.

15. Chakraborty S, Elvezio V, Kaczocha M, Rebecchi M, Puopolo M. Presynaptic inhibition of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) receptors by noradrenaline in nociceptive neurons. *J Physiol.* 2017;**595**(8):2639-60.

16.Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain.* 1993;**52**(3):259-85.

17. Dickenson AH, Sullivan AF. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. *Neurosci Lett.* 1987;**83**(1-2):207-11.

18. Raboisson P, Dallel R, Clavelou P, Sessle BJ, Woda A. Effects of subcutaneous formalin on the activity of trigeminal brain stem nociceptive neurones in the rat. *J Neurophysiol.* 1995;**73**(2):496-505.

19. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic

biphasic pain response. *Pain*. 1989;**38**(3):347-52.

20. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992;**51**(1):5-17.

21. Santos AR, Calixto JB. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neurosci Lett*. 1997;**235**(1-2):73-6.

22. Tian LJ, Du YR, Xiao Y, Lv ZM, Yu YQ, Cui XY, et al. Mediating roles of the vanilloid receptor TRPV1 in activation of rat primary afferent nociceptive neurons by formaldehyde. *Sheng Li Xue Bao*. 2009;**61**(5):404-16.

23. Bölcskei K, Helyes Z, Szabó A, Sándor K, Elekes K, Németh J, et al. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain*. 2005;**117**(3):368-76.

24. Sałat K, Filipek B. Antinociceptive activity of transient receptor potential channel TRPV1, TRPA1, and TRPM8 antagonists in neurogenic and neuropathic pain models in mice. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2015;**16**(3):167-78.

25. Sawynok J, Reid A, Meisner J. Pain behaviors produced by capsaicin: influence of inflammatory mediators and nerve injury. *J Pain*. 2006;**7**(2):134-41.

26. Kinnman E, Levine JD. Involvement of the sympathetic postganglionic neuron in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in the rat. *Neuroscience*. 1995;**65**(1):283-91.
27. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 1987;**30**(1):103-14.
28. Porro CA, Cavazzuti M. Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. *Prog Neurobiol*. 1993;**41**(5):565-607.
29. Maruo K, Yamamoto H, Yamamoto S, Nagata T, Fujikawa H, Kanno T, et al. Modulation of P2X receptors via adrenergic pathways in rat dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury. *Pain*. 2006;**120**(1-2):106-12.
30. Filippi A, Caruntu C, Gheorghe RO, Deftu A, Amuzescu B, Ristoiu V. Catecholamines reduce transient receptor potential vanilloid type 1 desensitization in cultured dorsal root ganglia neurons. *J Physiol Pharmacol*. 2016;**67**(6):843-50.
31. Lopshire JC, Nicol GD. The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *J Neurosci*. 1998;**18**(16):6081-92.
32. Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RWt. cAMP-dependent

protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron*. 2002;**35**(4):721-31.

33. Mohapatra DP, Nau C. Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J Bio Chem*. 2003;**278**(50):50080-90.

34. Mohapatra DP, Wang SY, Wang GK, Nau C. A tyrosine residue in TM6 of the Vanilloid Receptor TRPV1 involved in desensitization and calcium permeability of capsaicin-activated currents. *Mol Cell Neurosci*. 2003;**23**(2):314-24.

35. Endres-Becker J, Heppenstall PA, Mousa SA, Labuz D, Oksche A, Schafer M, et al. Mu-opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain. *Mol Pharmacol*. 2007;**71**(1):12-8.

36. Gorham L, Just S, Doods H. Somatostatin 4 receptor activation modulates TRPV1[correction of TPRV1] currents in dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett*. 2014;**573**:35-9.

37. Chakraborty S, Rebecchi M, Kaczocha M, Puopolo M. Dopamine modulation of

transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) receptor in dorsal root ganglia neurons. *J Physiol.* 2016;**594**(6):1627-42.

38. Shi TS, Winzer-Serhan U, Leslie F, Hökfelt T. Distribution and regulation of  $\alpha_2$ -adrenoceptors in rat dorsal root ganglia. *Pain.* 2000;**84**(2-3):319-30.

39. Lavand'homme PM, Eisenach JC. Perioperative administration of the  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist clonidine at the site of nerve injury reduces the development of mechanical hypersensitivity and modulates local cytokine expression. *Pain.* 2003;**105**(1-2):247-54.

40. Romero-Sandoval A, Eisenach JC. Perineural clonidine reduces mechanical hypersensitivity and cytokine production in established nerve injury. *Anesthesiology.* 2006;**104**(2):351-5.

41. Hajhashemi V, Banafshe HR, Minaiyan M, Mesdaghinia A, Abed A. Antinociceptive effects of venlafaxine in a rat model of peripheral neuropathy: role of alpha2-adrenergic receptors. *Eur J Pharmacol.* 2014;**738**:230-6.

42. Kawada T, Akiyama T, Li M, Zheng C, Turner MJ, Shirai M, et al. Acute arterial baroreflex-mediated changes in plasma catecholamine concentrations in a chronic rat

model of myocardial infarction. *Physiol Rep.* 2016;**4**(15).



## 第2章

ニワトリ脊髄のaccessory lobeに存在する神経様細胞には  
神経型の電位依存性ナトリウムチャンネルが発現している

## 要約

鳥類の脊椎腰膨大側部にはaccessory lobes (AL)と呼ばれる鳥類特有の10対の結節上構造物が存在している。組織学的にはAL内には神経様細胞があることが示されており、行動学的にはALsは二足歩行時の歩行制御を担う平衡感覚器官として働くことが示唆されている。山中らはALから単離した細胞の中に電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネル (voltage-gated sodium channel, VGSC)を発現する興奮性細胞が存在することを電気生理学的に明らかにした。しかしながら、どのアイソフォーム(サブタイプ)のVGSCがALに発現しているのか、そしてどのような形態の細胞にVGSCが発現しているのかは明らかではない。そこで本研究では、これらの点を明らかにするために生化学的手法と免疫組織化学的手法により検討した。RT-PCRにより、ALにおいてNa<sub>v</sub> 1.1–1.7までのVGSCサブタイプのmRNAの発現が確認できた。なかでも、Na<sub>v</sub> 1.1と1.6のシグナル強度が他のサブタイプに比べて強かった。ウエスタンブロッティングにより、ラットVGSCのエピトープタンパク

質に対する抗体が鶏組織に対して交差反応を有していることを確認し、その抗体とアストロサイトのマーカーである *glial fibrillary acidic protein (GFAP)* を認識する抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。AL領域において、VGSC陽性シグナルは神経様の大型の細胞の細胞質と細胞膜で、GFAP陽性シグナルは神経様細胞の間を埋めるように存在する細いフィラメント状の構造で検出された。これら両シグナルは重ならず、GFAP陰性の細胞でのみVGSC陽性シグナルを確認した。

本研究成果により、主に神経型のVGSCがAL内の神経様細胞に発現していることが明らかとなった。これらの知見はAL内に存在する中型の細胞が活動電位を発生しうる機能的なニューロンであることを示し、鳥類においてALニューロンが歩行時の平衡感覚保持を担う器官であるという仮説と矛盾のないものである。

## 緒言

地上に生息する脊椎動物の多くは四足歩行するのに対し、ヒトや鳥類は二足歩行する。同じ二足歩行でもヒトの場合は直立二足歩行であり、体の重心は地面から足の付け根の延長線上に位置しているため体を安定させやすくなっている。

一方、鳥類の場合は体の重心が後肢の付け根よりも吻側にあり、加えて地面に対して背骨をほぼ水平にした状態で二足歩行をする。これらのことから、鳥類の二足歩行には複雑なバランス制御が必要であると考えられており [1-3]、鳥類の体幹部には何らかの平衡感覚器官が存在しているのではないかと推測されてきた [4]。鳥類は腰椎、仙椎、下肢帯が融合した複合仙骨を持ち、この部位の中央部にはグリコーゲンを多く含んだグリコーゲン細胞のみで構成される glycogen body (GB) が存在している [5]。また、このGBが存在するあたりの脊髄の腹外側には accessory lobe (AL) と呼ばれる10対の結節状構造物があり、形態学的に中型サイズのニューロン様の細胞 (直径約30-40  $\mu\text{m}$ )、ミエリン化された軸索 (希突起膠細胞の存在を意味する)、ミエリン化されていない軸索、毛細血管、GBの中のグリコーゲン細胞と類似したグリコーゲン細胞が確認されている [6]。神経様細胞

はグリコーゲン細胞とともに点在しており、形態学的には皮膚の機械受容器と類似した指状の樹状突起を持つことが分かっており、機械受容性ニューロンの特性を有している [6, 7]。形態学的、組織学的、行動学的実験により、ALは体性感覚器として機能し、地上での歩行時の平衡感覚を保持する上で重要な役割を持つことが示唆されてきた [4, 8]。

AL組織にはコリン作動性神経繊維、GABA作動性神経繊維、グルタミン酸作動性神経繊維が存在することが報告されているが [9-11]、ALに存在する細胞自身が神経としての機能を有していることを示す報告はほとんどなかった。山中らはこれまでに、ニワトリのALから単離した細胞の中に電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネル (voltage-gated sodium channel, VGSC) とK<sup>+</sup>チャンネルを発現し、脱分極刺激によって活動電位を発生する細胞が存在することをホールセル・パッチクランプ法により明らかにした [12]。これらの結果はALにはVGSCを発現し、活動電位を発生する機能的な神経細胞が存在することを示している。哺乳類のVGSCと比べて鳥類のVGSCの同定と分類は未確立である。VGSCはポアを形成する $\alpha$ サブユニットとそこに結合する $\beta$ 1と $\beta$ 2サブユニットで構成されるタンパク質である。哺乳類ではVGSCの $\alpha$ サブユニットは9つのサブタイプがNa<sub>v</sub> 1.1-1.9に同定されており、

Nav 1.1, 1.2, 1.6が中枢神経系 (the central nervous system, CNS)と末梢神経系 (the peripheral nervous system, PNS)の両者に、Nav 1.3は主にCNSに、Nav 1.7–1.9は主にPNSに発現している。一方、Nav 1.4と1.5はそれぞれ主に骨格筋と心筋に発現している [13]。ニワトリのVGSCはNav1.1–1.7と1.9のcDNAの塩基配列がNational Center for Biotechnology Informationに登録されており、Nav 1.2 [14], Nav 1.4 [15], Nav 1.5 [15], Nav 1.7 [14] and Nav 1.9 [15]については同定されたcDNAの塩基配列が登録されている。一方で、Nav 1.1, 1.3, 1.6はGnomonによるゲノムの自動計算法によって予測された塩基配列として登録されている。山中らは以前、機能的なVGSCを発現する細胞がALの中に存在することを報告しているが、どのサブタイプのVGSCが発現しているのか、そしてどのような形態の細胞に発現しているのかは明らかではない。そこで本研究ではこれらの点を明らかにするために、VGSCの $\alpha$ サブユニットをターゲットとしたRT-PCRと免疫組織化学染色により検討した。

## 材料と方法

### 使用動物と組織標本

全ての動物実験は鳥取大学のガイドラインに則って行い、本研究は鳥取大学動物実験委員会の承認を得て行った。本実験では孵卵16-18日目のニワトリ胚子と7-10週齢の雄性Wistar系ラットを用いた。ニワトリの有精卵（ジュリア鶏種, Ghen Corporation, Gifu, Japan）をクールインキュベーター（CN-25B, Mitsubishi Electronics, Tokyo, Japan）内で15°Cで孵卵開始まで保存した。そして少なくとも採卵後10日以内に孵卵を開始した。有精卵の孵卵は孵卵機（P008, Showa Furanki, Saitama, Japan）内で転卵（1回/1時間）させながら、37°Cで実験に用いるまで孵卵した。ラットは7週齢で入手し、温度を22±2度にコントロールした12時間明暗周期（明期7:00-19:00）の飼育室で摂食および飲水は自由とし、動物飼育施設に導入後、2匹/ケージで1週間以上飼育した。

ウエスタンブロット法による電位依存性Na<sup>+</sup>チャネルタンパク質の検出のため

のニワトリ脳組織、accessory lobeとラット大脳組織の採取

孵卵14-18日目のニワトリ胚子を断頭した後、頭部の頭蓋骨を鉗で切り、脳を露出させた。ピンセットを用いて大脳皮質を採取し、氷上で冷やしておいた薬皿に静置した。頸部以下の体を後腹位に静置し、胸部から尾部までの皮膚を剥離して脊椎から腰膨大部とGBを含む脊髄組織をハサミで摘出した。腰仙髄の両側に存在する10対のALを眼科用ピンセットとバネ鉗を用いて実体顕微鏡下で慎重に脊髄から単離した。また、脊椎を長軸方向に縦に二分割して脊椎中の脊髄組織を除去し、実体顕微鏡下で椎骨中間に位置する背根神経節 (dorsal root ganglion, DRG)を眼科用ピンセットと眼科用バネ鉗を用いて切り出して摘出した。ラットは4-5%のイソフルランによる深麻酔し、断頭して安楽殺した。直ちに大脳を摘出した。全ての組織は氷冷したホモジナイズバッファ- Triton (+) (組成後述)を入れたサンプルチューブにそれぞれ回収した。

### 組織のホモジナイズ

採取したニワトリ脳、ラット脳は、あらかじめ1 mlのホモジナイズバッファ- Triton (+)を注入したポッターエルベウジェム型ホモジナイザーを氷中で冷やしておき、大脳皮質の湿重量を約100 mgになるように鉗で細切したものをその中



に浸漬した。氷中で冷やししながらホモジナイザーを泡立たないようにゆっくり上下させて、脳組織をすり潰した。この作業を10回繰り返し、さらに超音波破碎機 (UD-201, TOMY, Tokyo, Japan) をoutput 5、duty 5 に設定し、ホモジナイザーを氷中で冷やししながら1分間処理した。その後ホモジネートをサンプルチューブ2本に等量になるように分注し、冷却遠心分離機で4°C、600×gで10分遠心した。この遠心分離操作によって核分画が沈殿するので、上澄み液をピペットで回収して再び4°C、8,000×gで10分間遠心した。この操作でミトコンドリア画分が沈殿するので、細胞質成分のみを含む上澄み液を回収して電気泳動に用いるホモジネートサンプルとした。採取したALも同様に、プラスチック製のホモジナイザーを用いて1.5 mlサンプルチューブ内のAL組織を氷中で冷やししながら10回すり潰した。その後超音波破碎機でoutput 5、duty 5 に設定して1.5 mlサンプルチューブを氷中で冷やししながら1分間破碎した。できたホモジネートを冷却遠心分離機で4°C、8,000×gで10分間遠心した。ここから回収した上澄み液をALの電気泳動用のホモジネートとした。

#### ホモジネートのタンパク質濃度測定及び濃度調整

BSAを用いて0、100、200、500、1,000、2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の標準試料を作製した。続いてホモジネートをDWで10倍希釈、100倍希釈したものを作製し、Bradford法によりタンパク濃度を測定した。Protein Quantification Kit-Rapid CBB solution (Dojindo, Kumamoto, Japan) を1 ml、サンプルチューブに注入し、0、100、200、500、1,000、2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整したBSA 標準試料と10倍、100倍希釈したホモジネート液からそれぞれ40  $\mu\text{l}$ ずつとってCBB solutionを入れたサンプルチューブに加えた。BlankはBSA濃度0として、吸光度計で600nmの吸光度を測定した。各希釈列からタンパク質濃度の標準曲線を算出し、ホモジネートのタンパク濃度を算出した。ニワトリ脳、ラット脳のホモジネートはタンパク濃度2,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにホモジナイズバッファ-Triton (+)で希釈して $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。なお、AL組織のホモジネートは泳動直前に組織を採取し、ホモジナイズバッファ-Triton (+)でタンパク質濃度約7,500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した。

### 泳動サンプルの調整

ホモジネートを解凍後、2 $\times$ sample buffer (組成後述)をホモジネートと等量加えてボルテックスミキサーで攪拌した。このサンプルチューブの蓋が開かないよ

うキャップキーパーを装着し、これを沸騰した水浴中で3分間加熱した。加熱後再び攪拌、冷却し、泳動用サンプルとした。

## SDS-PAGE

ゲル板、シリコンチューブ、クリップ (ATTO, Tokyo, Japan)で泳動用のゲルを作製し、ゲル板を組み立てた。6% 分離ゲル溶液作製のため、あらかじめ作製したゲル溶液 (30% Acrylamide mixture 3 ml、DW 4.3 ml、0.75-M Tris-HCl (pH 8.8) 7.5 ml、10% SDS 150  $\mu$ l N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) 12  $\mu$ l) を混合した後、25% APSを50  $\mu$ l加えてよく攪拌し、組み立てたゲル板の上端から3 cm付近のところまで流し込んだ。さらにその上から静かにDWを重層して10~20分間静置した。DWとゲルの境界線が明瞭に見えてきたら重層した純DWを捨て、さらに上から25% APSを25  $\mu$ l直前に加えて攪拌した3% 濃縮ゲル溶液 (30% Acrylamide mixture 0.75 ml、DW 2.9 ml、0.25 M Tris-HCl (pH 6.8) 3.75 ml、10% SDS 75  $\mu$ l、TEMED 6  $\mu$ lを混合) を流し込んだ後、コームを差し込んで30分間静置した。濃縮ゲルが固まったらコームとシリコンチューブを外し、泳動槽にセットした。泳動槽の上下に泳動バッファー (組成後述)を満たし、分子量マーカー

(RPN800E, GE Healthcare, Chicago, IL, USA)を5  $\mu$ lと、10–20  $\mu$ lの泳動サンプルをウェル内に注入した。その後、電源 (AE-8130, ATTO)を接続してミニゲル1枚あたり20 mAに設定し、90分間泳動した。泳動が終了したらへらを使ってゲルをゲル板から外し、不要な部分をカットした後、ブロッキング溶液B (組成後述)の入った容器に浸漬した。

#### セミドライウエスタンブロッティング

Polyvinyliden difluoride (PVDF)メンブレン (ATTO)を100% メタノールに30秒浸漬し、水分を弾かなくなるまで、30分以上転写バッファーB (組成後述)に浸漬した。同じくブロッキング濾紙 (ATTO)をブロッキング溶液A、B、C液 (組成後述)に各々2枚、1枚、3枚浸漬し、ブロッキング装置 (AE-6677, ATTO) 以下から順に、ブロッキング溶液A浸漬濾紙2枚、ブロッキング溶液B浸漬濾紙1枚、メンブレン、泳動終了後のゲル、ブロッキング溶液C浸漬濾紙3枚を積層した。その後、ゴム手袋をした手で中心を軽く圧迫し、続いて四隅を軽く圧迫した。ブロッキング装置の蓋を下ろし、75 mAで1時間通電した。通電が終了したらメンブレンを取り出し、DWで1度濯いだ。メンブレンの不要な部分を鋏で

カットし、非特異的な反応を防ぐために冷蔵庫で震盪しながら1晩、プラスチック容器内で 5% スキムミルクT-PBS (組成後述)でブロッキングを行った。ブロッキング後、ブロッキング液を捨てて、滅菌T-PBS (組成後述)で震盪しながら15分間メンブレンを洗った。その後、メンブレンを別のパラフィルムを敷いたプラスチック容器に移し、10,000 g× 5分間遠心した5% スキムミルク含有T-PBSの上澄みをろ過滅菌した液で、電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネルを認識する抗VGSC抗体 (Rabbit Anti-Pan Voltage-Gated Sodium Channel, Merck Millipore, Burlington, MA, USA)を1,000倍希釈し、メンブレン上にマウントし、4°Cで1晩反応させた。反応後、希釈液を捨てて、滅菌T-PBSで15分×4回震盪させながらメンブレンを洗った。新しいプラスチック容器にメンブレンを静置し、二次抗体であるHRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (GE Healthcare)を滅菌T-PBSで3,000倍希釈した液を容器内に入れ、室温で震盪させながら1時間反応させた。反応後、震盪機で10分間×3回、滅菌T-PBSでメンブレンを洗った。室温に戻したHRP発光試薬 (ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare)のsolution Aとsolution Bを40対1の割合で混合したものを1 ml作製し、パラフィルムを敷いた容器内で遮光した状態で5分間反応させた。メンブレン上の発光試薬をキムワイプで吸い取り、ECL miniカメラ (GE

Healthcare) で撮影した。

### 免疫組織化学の為の組織の固定と切片の作製

孵卵16-18日目のニワトリ胚子を卵から摘出した後断頭し、頸部以下の体を後腹位に静置した。胸部から尾部までの皮膚を剥離した後、鋏で脊髄腰膨大を含む脊椎部分を摘出した。摘出した組織は、PBS (組成後述) を入れたシャーレに回収した。次に、シャーレ内で脊髄を5 mm角に横断し、脊髄組織が底になるように置き、実態顕微鏡下で剃刀の刃で脊髄組織を傷つけないように脊椎に切り込みを入れて、脊椎と脊髄周囲の結合組織を除去した。4% paraformaldehyde 固定液 (後述) を入れた遠心管に5 mm角の脊髄を浸漬し、1時間静置して組織を固定した。続いて70%から順に、80%、90% 各々60分間、100%×3回の順 (上昇アルコール系列)に組織を各々90分間ずつ浸漬し、組織の脱水を行った。脱水後、組織をキシレンに15分間×3回浸漬し、透徹を行った。そして包埋前に60°Cのパラフィンに20分間×3回浸漬し、ガスバーナーで熱した陶器製の皿にパラフィンを入れ、脊髄の頭尾方向が上下になるように皿の底に組織を静置した。パラフィンが固まってきたら流水中で1時間静置し、完全に固まったら組織の包埋してある周

囲5 mmを残してパラフィンを除去し、流動パラフィンで台木に接着した。一晩以上乾燥させてから、これをマイクロトーム (RUB-2100H, Yamato Kohki, Saitama, Japan)で5  $\mu\text{m}$ の厚さに薄切し、35°Cの水に浮かべた後、APSコートスライドガラス (Matsunami Glass, Osaka, Japan)にとって、伸展器にのせて伸展させた。その後マッペに入れて1日以上乾燥させた。同様の方法で、ニワトリ胚子の脊椎を除去しなかった脊髄切片も作製した。

### H.E.染色

ニワトリ胚子切片の脊椎を除去したものと、しなかったものの2種類の切片をキシレン×3回、100%アルコール×3回、95%、90%、80%、70%の順 (脱パラフィン系列) に、各々10秒間浸漬し、流水中に5分間静置した。続いてヘマトキシリンに10秒浸漬し、流水中で30分間色出しした。一度純水で洗った後、エオジンに3分間浸漬した。その後70%アルコール、80%、90%、95%、に各々30秒間、100%×3回各々1分間、キシレン×3回 (30秒間×2回、1分間×1回、脱水系列)に浸漬した。最後に切片周囲の余分なキシレンをキムワイプで拭き取り、組織が完全に乾く前に封入剤 (Entellan neu, Merck Millipore)を1滴垂らし、気泡の入らないよう

にカバーガラスを被せて顕微鏡で観察した。

### 蛍光抗体法

H.E染色の要領で脱パラフィンしたラット脊髄切片を二種類の一次抗体（抗VGSC抗体、Cy3 標識マウス抗glial fibrillary acid protein (GFAP)抗体 (Sigma, St. Louis, MO, USA)）のpositive controlとして実験に供した。脱パラフィン後、PBSを浸した耐熱プラスチック容器内に切片をセットし、オートクレーブで温度105°C、5分間加熱し、切片組織の賦活化処理を行った。常温近くまで温度が下がったら、切片周囲の余分な水分をキムワイプで拭き取り、liquid blockerで組織の周囲を囲んだ。PBSで軽く洗った後、0.5% 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA)、10% 正常ヤギ血清(normal goat serum, NGS)含有T-PBSを組織にマウントし、ブロッキングを行った。震盪しながらT-PBS で10分+5分×2回洗った後、一次抗体として10% NGS-T-PBSで2000倍希釈した抗VGSC抗体、そして同じく10% NGS-T-PBSで1000倍希釈した抗GFAP抗体、またその両方の一次抗体をマウントした3種類の切片を用意した。両方の一次抗体を含む溶液も同様に、抗VGSC抗体は2000倍、抗GFAP抗体は1000倍の濃度になるように希釈した。これ



らの切片を遮光したプラスチック容器内に静置し、4°Cで一晩反応させた。その後、遮光、震盪しながらT-PBSで10分+5分×2回洗った。そして抗VGSC抗体に反応する二次抗体としてAlexa Flour 488標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (Thermofisher Scientific, USA) を滅菌PBSで1,000倍希釈して、抗VGSC抗体を反応させた2種類の切片にマウントし、遮光しながら室温で1時間反応させた。その後、蛍光顕微鏡 (光源, U-LH100HGAPO; カメラ, DP71; 顕微鏡, IX71S1F-3; Olympus, Osaka, Japan)で各切片を観察した。ニワトリ胚子切片は、賦活化処理、liquid blocker、ブロッッキング、とラット脊髄切片と同様の操作を行った後、T-PBS で10分+5分×2回洗い、ラット脊髄切片と同様に、一次抗体として抗VGSC抗体だけをマウントした切片、抗GFAP抗体だけをマウントした切片、その両方をマウントした切片の3種類の切片を用意した。抗体の濃度も抗VGSC抗体は10% NGS-T-PBSで2,000倍希釈、抗GFAP抗体は10% NGS-T-PBSで1,000倍の濃度で使用した。両方の一次抗体を含む溶液も同様に、10% NGS-T-PBSで抗VGSC抗体は2,000倍、抗GFAP抗体は1,000倍の濃度になるように希釈した。遮光したプラスチック容器内に静置し、4°Cで1晩反応させた。これらの切片を遮光、震盪しながらT-PBSで10分+5分×2回洗った後、抗VGSC抗体に反応する二次抗体としてAlexa Flour 488標識ヤギ

抗ウサギ IgG抗体を滅菌PBSで1,000倍希釈し、抗VGSC抗体を反応させた切片2枚にマウントして、遮光しながら室温で1時間反応させた。一次抗体にCy3標識マウスGFAP抗体のみをのせた切片には対照として滅菌PBSをマウントした。遮光しながら室温で1時間反応させた後、滅菌PBSで遮光、震盪しながら10分間+5分間×2回洗った後、蛍光顕微鏡で各切片を観察した。また、抗VGSC抗体のpre-absorption試験として、抗VGSC抗体とその抗原であるRabbit X Pan Sodium Channel Control Antigen (0.4 mg/ml, Merck Millipore) と、抗VGSC抗体 (1 mg/ml) を1 µlずつ混合したものと、Cy3標識マウスGFAP抗体1 µlを10% NGS-T-PBSで1,000倍希釈し、一次抗体として切片にマウントし、4°Cで一晩静置した。その後、二次抗体にAlexa Flour 488標識ヤギ抗ウサギ IgG抗体をT-PBSで1,000倍希釈したものをマウントし、1時間室温で反応させた後、同様に切片を観察した。また、negative controlとして抗VGSC抗体の代わりに10% NGS-T-PBSをマウントした切片に、Alexa Flour 488標識ヤギ抗ウサギ IgG抗体を滅菌PBSで1,000倍希釈したものをマウントした切片も同様に観察を行った。

RT-PCR法による電位依存性Na<sup>+</sup>チャネルタンパク質の検出の為のニワトリ脳

## 組織、accessory lobeとラット大脳組織の採取

上述したように、ニワトリ胚子から大脳皮質とALを採取した。また、心臓と大腿部を体幹から切り取り、心室筋と骨格筋も同様に単離した。全ての組織は摘出後直ちに氷冷したリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBSを入れたサンプルチューブに回収した。

## RT-PCR

RNAの抽出にはPureLink™ RNA Mini Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いた。RT-PCR用に採取したニワトリ胚子のAL、DRG、大脳皮質、心筋、骨格筋は全て氷冷し、TRIzol試薬を加えてホモジナイザーで組織をすり潰した。21G注射針をつけた1 mLシリンジで5-10回出し入れしてDNAを切断し、その後室温で5分間静置した。クロロホルムを加え、15秒間激しく振り混ぜた後、室温で3分間静置し、12,000×g、15分、4 °Cで遠心した。遠心後、無色の上部水相を新しいチューブに回収し、等量の75%エタノールを添加して、ボルテックスミキサーでしっかり攪拌した。RNA抽出キットに含まれるcollection tubeにspin cartridgeをセットし、サンプルを乗せて12,000×g、15秒間、室温で遠心した。Wash Buffer I

を添加し、室温で12,000×g、15秒間遠心した後、cartridgeを新しいcollection tubeに装着し、DNaseを添加して室温で15分静置した。Wash Buffer Iを添加して室温で12,000×g、15秒間遠心した後、cartridgeを新しいcollection tubeに装着した。Wash Buffer IIを添加し、室温で12,000×g、15秒間遠心し、再びこの作業を繰り返し、室温で12,000×g、1分間遠心して、メンブレンを乾燥させた。Spin cartridgeをrecovery tubeに装着してRNase-free waterをメンブレンの中央に滴下して1分間静置し、その後室温で12,000×g、2分間遠心してRNAを回収した。mRNAの逆転写はSuper-Script III Reverse Transcriptase (Life Technologies)を用いた。2 μgの全RNA、オリゴdTプライマー、ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan)により30°Cで10分、42°Cで60分、99°Cで5分インキュベーションし、逆転写を行なった。PCRは1 μLのfirst-strand cDNA、8つのサブタイプのVGSC (Nav 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.9)を認識するように設計した8ペアのプライマー (表1)とPrimeSTAR GXL (Takara Bio, Shiga, Japan)を用いて行なった。PCR条件は熱変性を95°Cで10秒、アニーリングを60°Cで15秒、伸長反応を68°Cで1分とし、この一連の反応を28サイクルに設定した。50 ppmのMidori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics, Tokyo, Japan)を含む1.5%のアガロースゲル (Agarose S; Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いて増幅

したPCR産物と100 bpのDNAラダー (New England Biolab, Ipswich, MA, USA)を  
Tris-acetate EDTAバッファーで電気泳動した。泳動したDNAのバンドのシグナル  
はUVライトで励起し、撮影した。

## 使用溶液の組成

### 組織採取用溶液

- ホモジナイズバッファ- Triton(+)

150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% TritonX100 (Sigma)、5 mM HEPES (Sigma) と

なるように DW に溶解後、pH=7.4 に NaOH で調整した。

- ホモジナイズバッファ- Triton (-)

150 mM NaCl、1 mM EDTA、5 mM HEPES となるように DW に溶解後、

pH=7.4 に NaOH で調整した。

- リン酸緩衝液 (PBS)

137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> になるように

DW に溶解した。

### SDS-PAGE 用溶液

- 30% Acrylamide mixture

29.2% Acrylamide (Sigma) 0.8%N-N'-Methylenebisacrylamide (Sigma)を DW に溶解し、4°Cで保存した。

- 0.75 M Tris-HCl (HCl で pH 8.8 に調整し、4°Cで保存した)
- 0.25 M Tris-HCl (HCl で pH 6.8 に調整し、4°Cで保存した)
- 10% Sodium dodecylsulfate (SDS, Fujifilm Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)

SDS を DW で溶解し、室温で保存した。

- 25% Ammonium peroxidisulfate (APS) solution (Sigma)

APS を DW で溶解し、遮光しながら 4°Cで保存した。

- 2×sample buffer 液

0.125 M 0.25 M-Tris-HCl (pH6.8)、10% 2-Mercaptoethanol (Sigma)、4% SDS、10% Sucrose、0.01% Bromophenol blue (Sigma) を DW で溶解し、4°Cで保存した。

- Running buffer

25 mM Tris base (Sigma、USA)、192 mM Glycine (Fujifilm Wako Pure Chemical)、0.1% SDS を DW に溶解し、室温で保存した。

- 6%分離ゲル組成(2枚分)

30% Acrylamide mixture 3ml、DW 4.3ml、0.75 M Tris-HCl (pH 8.8) 7.5 ml、  
10% SDS 150  $\mu$ l N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)、12  $\mu$ l (Sigma)  
を混合し、使用直前に 25% APS を加えて重合させた。

- 濃縮ゲル (2 枚分)

30% Acrylamide mixture 0.75 ml、DW 2.9 ml、0.25 M Tris-HCl (pH 6.8) 3.75  
ml、10% SDS 75  $\mu$ l、TEMED 6  $\mu$ l を混合し、使用直前に 25% APS を加えて重  
合させた。

ウエスタンブロッティング用溶液

- Tween PBS (T-PBS)

137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1%

Tween 20 (Sigma)を DW に溶解し、室温で保存した。

- 5%スキムミルク T-PBS

スキムミルク (Megmilk Snow Brand, Tokyo, Japan)を上記の T-PBS で溶解  
し、4°Cで保存した。

- ブロッティング溶液 A



Tris base を 300 mM、Methanol を 5%になるように DW で調整し、室温で保存した。

- ブロットイング溶液 B

Tris base を 25 mM、Methanol を 5%になるように DW で調整し、室温で保存した。

- ブロットイング溶液 C

Tris base を 25 mM、6-Amino hexanoic acid (Sigma)を 40 mM、Methanol を 5%になるように DW で調整し、室温で保存した。

免疫染色用溶液

- 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fujifilm Wako Pure Chemical)を PBS で 3%になるように調整した。

## 使用抗体と薬物

本実験では以下の抗体を用いた。

- ウサギ抗VGSC抗体 (Merck Millipore, ABS5210-50UL)
- HRP標識ヤギ抗ウサギIgG 抗体(GE Healthcare, RPN-2124)
- Cy3 標識マウス抗glial fibrillary acid protein (GFAP) 抗体(Sigma, C9205)
- Alexa Flour 488標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Life Technologies, A11008)

プロテアーゼインヒビターとして以下の薬物を用いた。

- PepstatinA (Sigma, P4265) 1  $\mu\text{g/ml}$  になるようにDMSOに溶解した。
- Leupeptin hemisulfate salt (Sigma, L2884) 1  $\mu\text{g/ml}$  になるようにDWに溶解した。
- Aprotinin (Sigma, A1153) 1  $\mu\text{g/ml}$  になるようにDWに溶解した。
- PefablocSC (Fluka, CH 76307) 0.2 mM になるようにDWに溶解した。
- Benzamidine hydrochloride hydrate (Sigma, B6506) 0.1 mg/ml になるようにDWに溶解した。

- Calpain Inhibitor I (Sigma, A6185) 8  $\mu\text{g/ml}$  になるようにMethanolに溶解した。
- Caipain Inhibitor II (Sigma-Aldrich, A6060) 8  $\mu\text{g/ml}$  になるようにEthanolに溶解した。

なお、上記のプロテアーゼインヒビターは全て $-30^{\circ}\text{C}$ で保管した。

- 10% NGS-T-PBS

NGS濃度が10%になるようにT-PBSで希釈した。

- 0.5% BSA 10% NGS-T-PBS

BSAが濃度0.5% になるように10% NGS-T-PBSに溶解した。

- Eosin (Sigma)

- Hematoxyrin (Sigma)

- 0.1% DAB-PBS

3,3'-diaminobenzidine (Dojindo)濃度が0.1% になるようにPBSで希釈し、使用直前まで $-30^{\circ}\text{C}$ で保管した。

- 4% paraformaldehyde 固定液

Paraformaldehyde 2 g、DW 10 ml、5 M-NaOH 40  $\mu$ lをビーカーに加え、60°C  
に加温しながら、paraformaldehyde を溶解し、10 $\times$ PBS 5 mlを加えた後、DW  
を50 ml手前まで加え、HClで pH 7.4に調整した後、DWで50 mlに調製した。

## 実験成績

### ニワトリ脊髄とALの構造

ニワトリ脊髄の腰膨大部の垂直切片を観察すると、脊髄の背側には大きなGBが、側方には結節状のALが見られた (図1A)。GBは脊髄灰白質に食い込んでおり、中心管に達していた。灰白質に存在するニューロン様の形態を持った細胞は腹角に位置していた (図1B矢印)。ALは腹角と連結しており、ニューロン様の形態の大きな細胞質を持つ細胞 (図1B矢頭)とGBのグリコーゲン細胞に似た形態を持つ細胞があった (図1B)。切片を作製する過程でALのグリコーゲン細胞に含まれるグリコーゲンは抜け落ち、細胞膜と濃縮された核及び細胞内小器官のみが残っていた。抗GFAP抗体に対するGBとALの免疫応答性はいくらか異なっていた。ALではニューロン様細胞とグリコーゲン細胞の隙間を埋める様に位置するフィラメント状の構造物にGFAP陽性免疫応答が見られたが (図2)、GBでは観察されなかった。

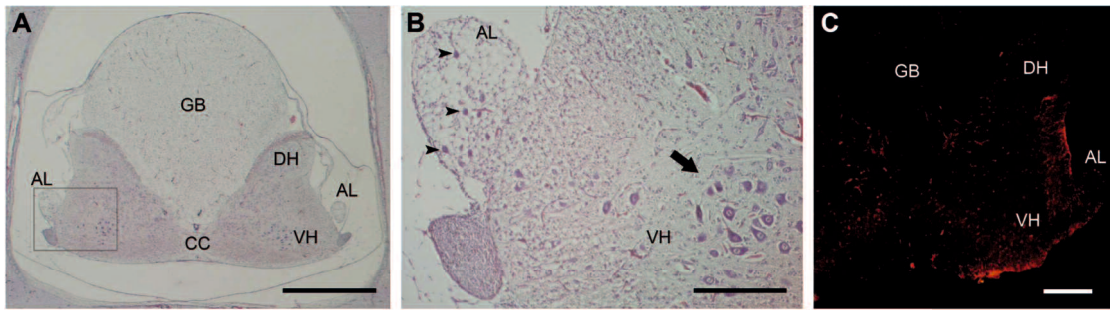


図1

ニワトリ脊椎腰部のH.E.染色像とGFAP様免疫応答性。孵卵17日齢のニワトリ胚子の脊椎腰部をパラフィンに包埋して薄切した標本を作製した。(A) 脊椎腰部のH.E.染色像。(B)ALと脊椎腹角 (ventral horn, VH)領域 (図Aで灰色の四角で囲んだ部分)のH.E.染色像の拡大図。矢印: 脊椎灰白質のニューロン、矢頭: ALのニューロン様細胞。(C)Cy3-抱合型一次抗体によって可視化したGFAP様の免疫応答性。AL: accessory lobe、CC: 中心管、DH: 背角、GB: グリコーゲン・ボディ、VH: 腹角、スケールバー: A, 1 mm; B, 100  $\mu$ m; C, 500  $\mu$ m。

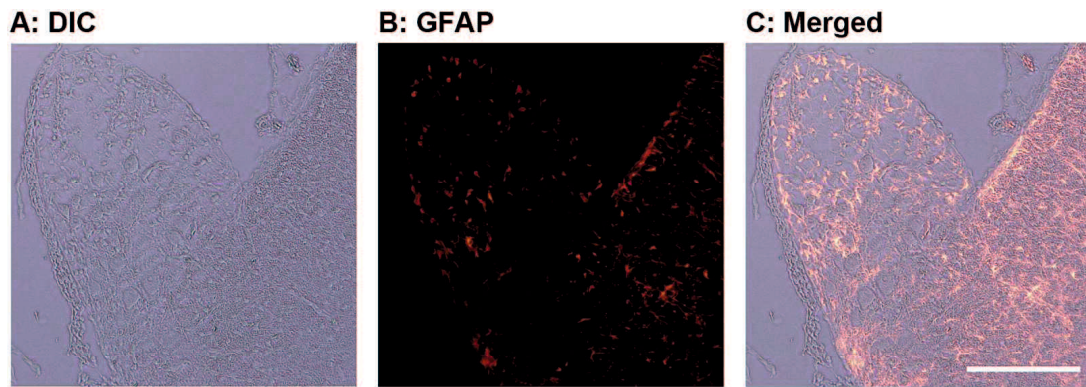


図2

AL領域のGFAP様免疫応答性。(A)AL領域の微分干渉観察像。(B) Cy3-抱合型一次抗体によって可視化したGFAP様の免疫応答性。(C)図AとBを重ねた像。スケールバー: 100  $\mu\text{m}$ 。

## ALにおけるVGSCアイソフォームの発現

哺乳類では9つのVGSCアイソフォーム ( $\text{Na}_v$  1.1–1.9)が同定されている [13]。これらのサブタイプのうち、 $\text{Na}_v$  1.1–1.7はテトロドトキシン (TTX)感受性であり、 $\text{Na}_v$  1.8と1.9はTTX非感受性である。ニワトリのALにVGSCのどのサブタイプが発現しているのかをRT-PCR法により検討した。本実験で使用した各プライマーの配列は表1に記載した。プライマーはPrimer3 software (Howard Hughes Medical Institute, MD, USA)を用いて設計した。ポジティブコントロールとしてニワトリ胚子から単離したDRG、大脳皮質、心筋、骨格筋から抽出したtotal RNAを用いてRT-PCRを行なった (図3)。全てのプライマーペアで予測されるサイズの特異的なPCR産物が得られ、各泳動レーン中の最も強いシグナルとして検出された。骨格筋では $\text{Na}_v$  1.4が、心筋では $\text{Na}_v$  1.5のシグナルが強く検出された。大脳皮質では $\text{Na}_v$  1.1、1.3と1.6の強いシグナルが検出された。また、DRGでは $\text{Na}_v$  1.6、1.7と1.9のシャープなバンドが検出された。ALでは $\text{Na}_v$  1.1–1.7で特異的な産物が検出されたが $\text{Na}_v$  1.9は検出されず、特に $\text{Na}_v$  1.1と1.6で他のものと比較して強いシグナルが検出された。同様の結果が他のニワトリ胚子から抽出したtotal RNAからのRT-PCRでも得られた。



Target	Sequences	Product size (bp)	Accession #
Nav 1.1	Forward: 5'-gtagttcatagcctgcaaagg-3' Reverse: 5'-gtcgcatagtagaacacctg-3'	495	XM_003641586
Nav 1.2	Forward: 5'-ccacaataagtgtagttgcaagc-3 Reverse: 5'-cccacctcttctttgttc-3'	529	NM_001293281
Nav 1.3	Forward: 5'-agtggcagcagcatcagttg-3' Reverse: 5'-cgggaagggtgaccactc-3'	535	XM_015289740
Nav 1.4	Forward: 5'-gagaacctggcagctcaa-3' Reverse: 5'-cttgctgtgccgtacat-3'	603	NM_001318445
Nav 1.5	Forward: 5'-ccatattgcgacccaaacct-3' Reverse: 5'-ctcgaggatgctgccgtaaa-3'	642	NM_001318446
Nav 1.6	Forward: 5'-tctctgtgctgcgatcttcc-3' Reverse: 5'-ttctccacgctgctccaattc-4'	709	XM_424477
Nav 1.7	Forward: 5'-agccaacgccaataatgac-3' Reverse: 5'-gaacagctgcagtccaatca-3'	665	NM_001293282
Nav 1.9	Forward: 5'-gtgcttccatgctatga-3' Reverse: 5'-gctcttccagatgaacgg-3'	725	NM_030875

表1

ニワトリ (*Gallus gallus*)のVGSCアイソフォームに対する各RT-PCRプライマーの配列。ニワトリVGSCアイソフォームのNav 1.1-1.7と1.9に対する各PCRプライマーの配列と予測されるPCR産物のサイズを示した。

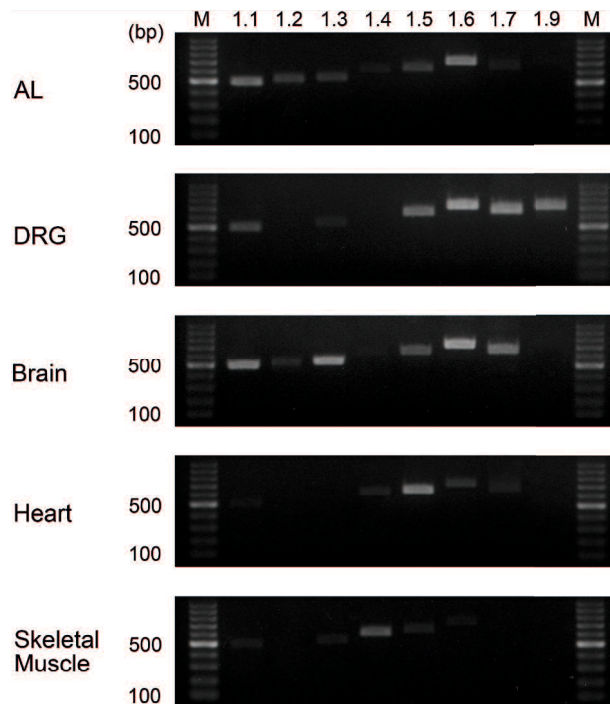


図3

ニワトリVGSCの8つのアイソフォーム ( $\text{Na}_v$  1.1-1.7、1.9)のRT-PCR解析。AL、脳 (大脳皮質)、心臓 (心室筋)、骨格筋から抽出した全mRNAを逆転写し、表1に示したプライマーを用いてPCRによってcDNAを増幅した。 $\text{Na}_v$  1.1-1.7と1.9のcDNAに特異的なプライマーを用いた。「M」レーンのシグナルは100 bpごと分子量マーカを示している。

## ニワトリVGSCの一次抗体の選定

VGSCの8つのサブタイプ ( $Na_v$  1.1–1.7)のcDNA配列とアミノ酸配列はデータベースに予測配列を含め登録されているが、ニワトリのVGSCに対する特異的抗体は製造、販売されていない。また、一般的に市販されているラットなどの抗体には、一般的に交差性の確認されている種が明記されており、抗体の種類によって、他の種と全く交差性のないもの、いくつかの種と交差するものなど様々である。上記のような理由から、ニワトリで交差性が確認されている抗VGSC抗体も市販されていない。そこでまず始めに、ニワトリと交差性のありそうな抗VGSC抗体を検索した。RT-PCRによりALには $Na_v$  1.9が発現していないことが示唆されたので、 $Na_v$  1.1–1.7が共通して保有するアミノ酸配列を認識する抗体を選択した。本研究で用いたCHEMICON社の抗VGSC抗体 (Anti-Pan, AB5210-50UL)はRat type1  $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列 (aa)1500-1518 (Accession# NM\_030875)を抗原として作られたポリクローナル抗体である。このアミノ酸配列“MTEEQKKYYN AMKKL GSKK”はラット $Na_v$  1.1の $\alpha$ サブユニットのリピートIIIとリピートIVのつなぎ目にあたる細胞内部に突出している領域に位置しており、ニワトリ $Na_v$  1.1–1.7の予測アミノ酸配列にも保存されている (表2)。そこで、この抗体

がニワトリの組織においてもVGSCタンパク質を認識すると予想し、ウエスタン  
ブロットにより交差性を確認した。

Molecular Identity	Amino acid sequence	AA Position	Accession #
Rat Nav 1.1	gqdiMTEEQ KKYYNAMKKL GSKKpqkpi	1500-1518	NM_030875
Mouse Nav 1.1	gqdiMTEEQ KKYYNAMKKL GSKKpqkpi	1500-1518	NM_001313997
Chick Nav 1.1	gqdiMTEEQ KKYYNAMKKL GSKKpqkpi	1481-1510	XM_003641586
Chick Nav 1.2	gqdiMTEEQ KKYYNAMKKL GSKKpqkpi	1491-1509	NM_001293281
Chick Nav 1.3	gqdiMTEEQ KKYYNAMKKL GSKKpqkpi	1497-1515	XM_015289740
Chick Nav 1.4	gkdiMTEEQ KKYYNAMKKL GSKKpqkpi	1304-1322	NM_001318445
Chick Nav 1.5	gqdiMTEEQ KKYYNAMKKL GSKKpqkpi	1510-1528	NM_001318446
Chick Nav 1.6	gqdiMTEEQ KKYYNAMKKL GSKKpqkpi	1471-1497	XM_424477
Chick Nav 1.7	gqdiMTEEQ KKYYNAMKKL GSKKpqkpi	1480-1498	NM_001293282

表2

免疫応答性領域周辺のアミノ酸配列の比較。四角で囲んだラット Nav 1.1 に対する一次抗体として製造されたエピトープ領域を示す。このアミノ酸配列がニワトリ (*Gallus gallus*) の Nav 1.1-1.7 のすべてに同一のアミノ酸配列が含まれていた。

## ラットとニワトリ間の抗VGSC抗体の交差性について

ラット脳とニワトリ脳をホモジネートにした後、SDS-PAGEで泳動し、ウエスタンブロットによる抗VGSC抗体の交差性の確認を行った。一次抗体に抗VGSC抗体を用い、二次抗体でHRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体を用いて、ECL発光試薬による化学発光法でVGSCタンパク質を検出した。ラット脳 (大脳皮質, 5  $\mu$ g/ウェル)、ニワトリ脳 (大脳皮質, 10  $\mu$ g/ウェル)、ニワトリAL (35  $\mu$ g/ウェル)のライセートをSDS/PAGEで電気泳動した。分離したタンパク質はPVDF膜に転写し、PVDF膜上で抗VGSC抗体に対する免疫応答性を確認した (図4)。ラット脳のレーンにおいて、約260 kDaの二つの異なるシグナルが検出された。一つは小さい分子量で幅の広いバンドが検出され、もう一つはそれよりも大きい分子量でシャープなバンドが見られた。これらの分子量はラットVGSCの $\alpha$ サブユニットの分子量 (約260 kDa)と一致しており、また、他のサイズのシグナルは検出されなかった。ニワトリ脳では約260 kDaの位置に強いシグナルが、約130 kDaの位置に弱いシグナルが確認できた。ニワトリALも同様に幅の広いシグナルが約260 kDaに、相対的にシャープなシグナルが約130 kDaの位置に検出された。ニワトリ脳とALにおいて、このほかに異なる分子量のシグナルは検出されなかった。同様の結果

がそれぞれ異なるラット及びニワトリから採取した組織から作製したライセートを用いた検討でも得られた。SDS/PAGEで用いたニワトリALライセートのタンパク量が少なかったため、弱いシグナルしか検出しかできなかった。

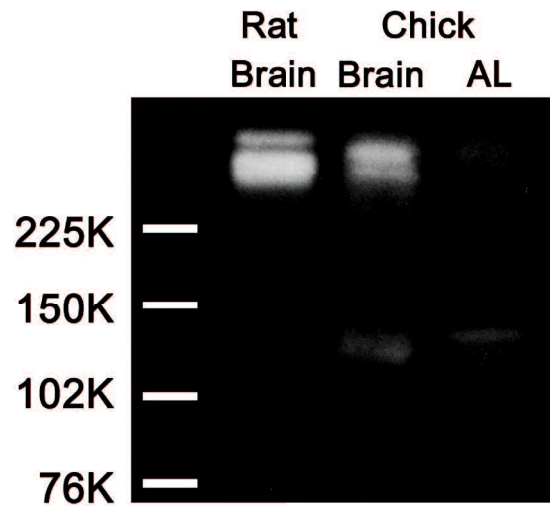


図4

抗ラットVGSC抗体によるウエスタンブロッティング解析。ラット及びニワトリ脳 (大脳皮質)、ニワトリALから調整したライセートをSDS/PAGEによって分離し、PVDF膜に転写した。抗VGSC抗体に対するシグナルは化学発光検出システムにより検出した。



## ニワトリ脊髄切片における抗VGSC抗体に対する免疫応答性の検討

AL領域の同一切片で、抗VGSC抗体と抗GFAP抗体に対する免疫応答が検出された (図5)。細胞の大きさに関わらず、ニューロン様細胞では核と細胞質にVGSC陽性シグナルが見られた (図5A, 白矢印)。一方、グリコーゲン細胞では核や細胞内小器官が濃縮された細胞辺縁でVGSC陽性シグナルが見られ、グリコーゲンが詰まっていたと考えられる領域にシグナルは検出されなかった (図5A, 赤矢印)。また、VGSC様の免疫応答性はALと脊髓腹角を繋ぐ領域で検出された (図5A, 矢頭)。BG領域を除く標本のほぼ全域にわたり、フィラメント状の構造物は赤色のシグナルとしてGFAP陽性像が検出された (図1C, 図5B)。AL領域のニューロン様細胞とグリコーゲン細胞の間の領域にGFAP様の免疫応答性がみられた。図5Aと図5Bを重ね合わせると、強い自家蛍光を持つ赤血球 (アスタリスクで示したもの)を除いて、緑色のシグナルと赤色のシグナルは重ならなかった (図5C)。ネガティブコントロールの標本ではコントロール抗原 (0.4 mg/mL, 抗原:抗体=1:1)で吸収実験を1時間、または一次抗体を適用せずに行なった。ネガティブコントロールの標本では非特異的なシグナルはほとんど検出されなかった。

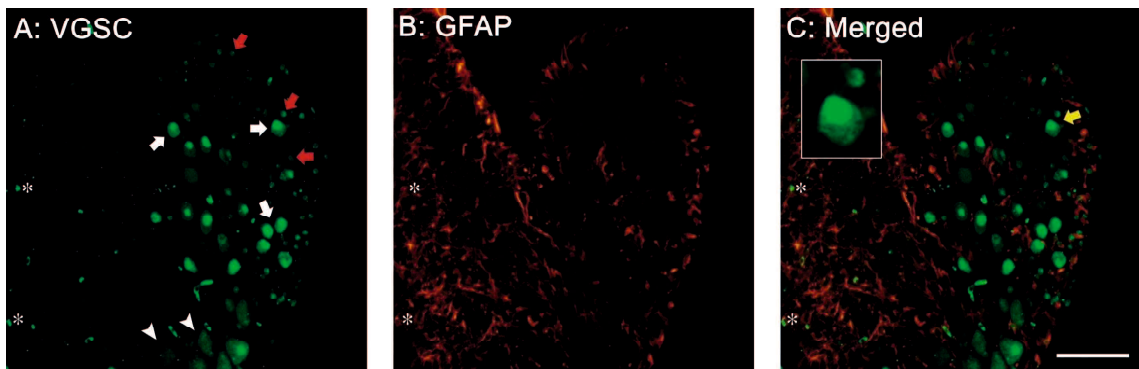


図5

AL領域のVGSC、GFAP様の免疫応答性。(A)VGSC様の免疫応答性はAlexa-488  
 抱合型二次抗体により可視化した。(B)GFAP様の免疫応答性はCy3-抱合型一次抗  
 体により可視化した。(C)図AとBを重ね合わせた像。挿入図は黄色矢印で示す細  
 胞を拡大した像である。白矢印: 陽性シグナルを示すニューロン様細胞、赤矢印:  
 陽性シグナルを示すグリコーゲン細胞、矢頭: ALと腹角の間の領域に存在する細  
 胞の陽性像、アスタリスク: 赤血球、スケールバー: 50  $\mu\text{m}$ 。

## 考察

山中らはこれまでに、ニワトリ胚子のALから酵素処理によって単離した細胞が脱分極応答性の $\text{Na}^+$ 電流を生じることを電気生理学的手法により明らかにしている [12]。また、ニワトリ胚子のALから単離したニューロン様細胞の細胞内 $\text{Cl}^-$ 濃度は成熟した鶏のニューロンのものよりも低いことが報告されている [16]。これらの事実は孵卵16-18日目のニワトリ胚子のニューロンの発育段階が成熟個体のものと類似していることを示唆している。これまでの研究に続いて、ニワトリ胚子を用いてALのニューロン様細胞にVGSCのmRNAとタンパク質の発現があるかどうかを検討した。AL領域には大きな細胞体を持つニューロン様の細胞とグリコーゲン細胞が存在し、両者ともGFAP様の免疫応答性は見られなかった。GFAPは中間径フィラメントタンパク質の一つでありアストロサイト系統の細胞で特異的に発現する。これまでに、ハトの脊髄とALに存在するアストログリア細胞が抗GFAP抗体によって染色されることが報告されている [6],[11]。GBとALのグリコーゲン細胞はアストログリア細胞由来であると考えられているが [17]、ハトのGBとALのグリコーゲン細胞はGFAP陽性ではないことが報告されて

いる [6],[11]。本研究で示したように、ニワトリもハトと同様にグリコーゲン細胞はGFAPに対して免疫応答性を示さなかった。ALにおいて、ニューロン様細胞とグリコーゲン細胞の間を埋めるように存在するフィラメント状の構造物はGFAP様の免疫応答性を示した。これはハトと同様に、ニワトリALにおいてもアストロサイトが存在することを示唆している。グリコーゲン細胞は短い突起を有していることが報告されており [6]、グリコーゲン細胞はグリア細胞由来だと考えられていることを踏まえると、グリコーゲン細胞の細胞体から伸びたフィラメント状の突起がGFAP様の免疫応答性を示した可能性も考えられる。この可能性を検討するためには、より詳細な解析が必要である。

RT-PCR解析により、ALには $\text{Na}_v$  1.1-1.7のmRNAが発現することを確認した。この結果は、山中らが報告したALから単離した細胞にTTX感受性のVGSCが存在するという結果と一致している [12]。データベースに記載されていた予測塩基配列を基に設計したプライマーを用いて増幅した $\text{Na}_v$  1.1、1.3、1.6のPCR産物が本実験で使用したcDNAで検出された。この結果はニワトリ組織に予測配列と一致するmRNAが実際に発現していること、そしてこれらの塩基配列が正しいことを示唆している。ALの $\text{Na}_v$  1.1、1.6のシグナル強度はDRGと脳のものと同程度で

あった。哺乳類においてはNav 1.1、1.6は中枢神経系と末梢神経系に特に強く発現していることが知られており、本成績はALがニューロンを含む組織であるという仮説をさらに支持するものとなった。さらに、哺乳類の感覚神経に特異的に発現することが知られているNav 1.9 [13]はALに発現しておらず、この点はDRGと異なっていた。ALにおけるVGSCサブタイプの発現パターンがDRGよりも脳のものに似ていることから、ALに存在するニューロンの機能的特性は末梢神経系のニューロンとは異なっているのかもしれない。

山中らはニワトリのALから酵素処理によって単離した細胞がTTX感受性VGSC電流を流すこと、そして活動電位を発生することを電気生理学的に証明した [12]。これらの結果はALに含まれる細胞がVGSCを発現していることを明らかにしたが、AL内のどの様な形態の細胞がVGSCを発現しているのかは不明であった。本実験では、ニワトリのTTX感受性VGSCの $\alpha$ サブユニットの予測アミノ酸配列にも保存されているラットVGSCの $\alpha$ サブユニットのエピトープ・ペプチドに対する一次抗体をウエスタンブロッティングと免疫蛍光染色に用いた。ウエスタンブロッティングではラットとニワトリの脳でほぼ同じサイズの免疫応答性シグナルが検出された。これは本実験で用いた一次抗体がニワトリVGSC

と交差性を持ち、ニワトリ組織でのVGSCタンパク質の検出に適切であることを示している。ラットとニワトリの両者が複数のサブタイプのVGSC $\alpha$ サブユニットを発現しており、本実験で用いた抗体に応答性を持つあるアミノ酸配列がサブタイプや動物種に関わらず保存されていることから、ウエスタンブロットの結果では約260 kDaのサイズの位置にバンドが検出されたのだと考えた。ラット脳において、約260 kDaの位置にシャープで大きいサイズのバンドとブロードな小さいサイズのバンドが検出された。中枢神経系ではNav 1.1、1.2、1.3が優位に発現していることが報告されており [13]、これらの若干異なる分子量を示す二つのシグナルは異なるサブタイプのVGSC $\alpha$ サブユニットが発現していることを反映しているのかもしれない。ラット脳の結果と類似して、約260 kDaの位置に複数のバンドがニワトリ脳でも検出された。RT-PCRとウエスタンブロットの結果はニワトリ大脳皮質にもいくつかのサブタイプのVGSC $\alpha$ サブユニットが発現していることを示唆している。約130 kDaの位置にあるブロードで弱いシグナル強度のバンドはニワトリ脳とALでは検出されたがラット脳では検出されず、なぜこのサイズのバンドが出現したかは不明である。AL内のニューロン様細胞とグリコーゲン細胞の核は抗VGSC抗体に対して免疫応答性を示したが、ラット脳

の切片では核に対するVGSC陽性シグナルは検出されなかった。VGSCは細胞膜に発現してイオンチャネルとして機能していることから、ニワトリALにおける抗VGSC抗体に対する細胞核の免疫応答性はVGSCタンパク質に依存しない非特異的なシグナルなのかもしれない。そのため、ウエスタンブロットの結果ではニワトリ組織の細胞核に存在する由来不明のタンパク質が約130 kDaのシグナルとして検出されたとも考えられる。また、内在性のプロテアーゼがVGSC  $\alpha$ サブユニットを消化し、免疫応答性を有する領域を含むVGSC  $\alpha$ サブユニットタンパク質の断片が約130 kDaの位置に免疫応答性を示した可能性も考えられる。この他に非特異的なシグナルは異なるサイズでは検出されず、この結果は本実験で用いた抗VGSC抗体がニワトリ組織の標本でもVGSC  $\alpha$ サブユニットを認識していることを示唆している。脳よりもALではニューロン様細胞の密度が低く全体量としても少ないことから、SDS/PAGEではかなり多くの量のタンパク質を使用したにもかかわらず弱いシグナルしか検出できなかったのかもしれない。しかし、ニワトリ脳においてもVGSC  $\alpha$ サブユニットを認識していると予測されるシグナルが確認できたことと他に非特異的なシグナルが検出されなかったことを踏まえると、本実験で選択した抗VGSC抗体はAL領域にあるVGSCタンパク質に対し

て特異的に結合していると考えられる。

本実験において、我々は抗ラットVGSC抗体を用いたニワトリVGSC $\alpha$ サブユニットの免疫染色法を確立した。AL領域においてニューロン様細胞の細胞質と核は明らかなVGSC様の免疫応答性を示し、GFAP陽性シグナルは検出されなかった。この結果はニューロン様細胞がVGSCタンパク質を発現していることを示唆している。グリコーゲン細胞は細胞辺縁の小領域に位置する濃縮された細胞内小器官と核もVGSC様の免疫応答性を示したがGFAP陽性シグナルは検出されず、この結果はグリコーゲン細胞も同様にVGSCタンパク質を発現していることを示唆している。山中らはALから単離し、大量の細胞内構造物を含む細胞がVGSC電流を発生することを電気生理学的手法により明らかにしている [12]。この報告と本実験結果を合わせると、少なくともAL領域のニューロン様の形態を持つ細胞は神経型のVGSCサブタイプを発現しており、ニューロンとしての機能を示すことが示唆された。一方で、グリコーゲン細胞はグリア細胞由来であると考えられているが [6]、本実験ではグリコーゲン細胞もニューロン様の免疫応答性を持つことが示された。これまで単離したグリコーゲン細胞を用いてパッチクランプ法にて電気生理学的な応答を得ようと試みたことがあったが、記録電極と



して使用するガラスの先端をグリコーゲン細胞に当てた瞬間にグリコーゲン細胞が破裂してしまうため応答は得られなかった。グリコーゲン細胞の細胞膜に機能的なVGSCが発現しているのかを明らかにするために、さらなる解析が必要だろう。

ALは平衡感覚器官として地上を二足歩行する際にバランスを保つ役割を持つと推測されている [4],[8],[18]。また、ALのニューロンは脊髄の対側に位置する運動ニューロンに投射している [19]。故に、ALニューロンは同一の脊髄分節の対側に位置するニューロンに伝播する活動電位の発生に必要である。本実験結果とこれまでの報告を合わせて考えると、ALに存在する細胞が活動電位を発生し、ALの細胞が運動系に感覚情報を送るという仮説が支持される。ALニューロンが鳥類の体幹バランスをどのように感知しているのかは不明であるが、ALニューロン自身が機械受容器としての役割を持つ可能性、あるいは他の感覚受容機能を持つ細胞から平衡感覚情報がALニューロンに伝えられている可能性があるだろう。このメカニズムを明らかとするために、さらなる組織学的、機能的な解析が必要である。

## 参考文献

1. Biederman-Thorson M, Thorson J. Rotation-compensating reflexes independent of the labyrinth and the eye. *J Comp Physiol.* 1973;**83**(2):103-22.
2. Bilo D, Bilo A. Wind stimuli control vestibular and optokinetic reflexes in the pigeon. *Naturwissenschaften.* 1978;**65**(3):161-2.
3. Delius JD, Vollrath FW. Rotation compensating reflexes independent of the labyrinth. *J Comp Physiol.* 1973;**83**(2):123-34.
4. Necker R. Specializations in the lumbosacral vertebral canal and spinal cord of birds: evidence of a function as a sense organ which is involved in the control of walking. *J Comp Physiol A.* 2006;**192**(5):439-48.
5. De Gennaro L, D. The glycogen body. *Avian biology*, 1982, ed. Farner D, King J & Parkers K, pp. 341-371. Academic, New York.
6. Rosenberg J, Necker R. Ultrastructural characterization of the accessory lobes of Lachi in the lumbosacral spinal cord of the pigeon with special reference to intrinsic mechanoreceptors. *J Comp Neurol.* 2002;**447**(3):274-85.

7. Rosenberg J, Necker R. Fine structural evidence of mechanoreception in spinal lumbosacral accessory lobes of pigeons. *Neurosci Lett*. 2000;**285**(1):13-6.
8. Necker R, Janßen A, Beissenhirtz T. Behavioral evidence of the role of lumbosacral anatomical specializations in pigeons in maintaining balance during terrestrial locomotion. *J Comp Physiol A*. 2000;**186**(4):409-12.
9. Milinski T, Necker R. Histochemical and immunocytochemical investigations of the marginal nuclei in the spinal cord of pigeons (*Columba livia*). *Brain Res Bull*. 2001;**56**(1):15-21.
10. Necker R. Distribution of choline acetyltransferase and NADPH diaphorase in the spinal cord of the pigeon. *Anat Embryol (Berl)*. 2004;**208**(3):169-81.
11. Necker R. Histological and immunocytochemical characterization of neurons located in the white matter of the spinal cord of the pigeon. *J Chem Neuroanat*. 2004;**27**(2):109-17.
12. Yamanaka Y, Kitamura N, Shibuya I. Chick spinal accessory lobes contain functional neurons expressing voltage-gated sodium channels generating action potentials. *Biomed Res*. 2008;**29**(4):205-11.

13. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* 2005;**57**(4):411-25.
14. Friedel RH, Schnurch H, Stubbusch J, Barde YA. Identification of genes differentially expressed by nerve growth factor- and neurotrophin-3-dependent sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;**94**(23):12670-5.
15. Zakon HH, Jost MC, Lu Y. Expansion of voltage-dependent Na<sup>+</sup> channel gene family in early tetrapods coincided with the emergence of terrestriality and increased brain complexity. *Mol Biol Evol.* 2011;**28**(4):1415-24.
16. Yamanaka Y, Kitamura N, Shinohara H, Takahashi K, Shibuya I. Analysis of GABA-induced inhibition of spontaneous firing in chick accessory lobe neurons. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 2012;**198**(3):229-37.
17. Lee K, Makino S, Imagawa T, Kim M, Uehara M. Effects of adrenergic agonists on glycogenolysis in primary cultures of glycogen body cells and telencephalon astrocytes of the chick. *Poultry science.* 2001;**80**(12):1736-42.
18. Necker R. Mechanosensitivity of spinal accessory lobe neurons in the pigeon.

*Neurosci Lett.* 2002;**320**(1-2):53-6.

19. Necker R. Projections of the marginal nuclei in the spinal cord of the pigeon. *J*

*Comp Neurol.* 1997;**377**(1):95-104.

## 謝辞

本研究及び論文の作成を進めるに当たり、懇切丁寧なご指導及びご助言を頂きました鳥取大学 獣医生理学研究室 北村直樹准教授、澁谷泉教授、鳥取大学 獣医解剖学研究室 割田克彦准教授、保坂善真教授、鳥取大学 獣医生化学研究室 樋口雅司講師、山口大学 獣医薬理学研究室 佐藤晃一教授、鹿児島大学 基礎獣医学講座 白石光也教授、内藤清惟准教授に心より深く感謝致します。また、本論文を作成するにあたり多大なる御協力を頂きました鳥取大学獣医生理学教室の皆様にも心より感謝致します。最後に、本実験を遂行するに当たり、尊い命を提供してくれました動物達に心より感謝し、ご冥福をお祈り致します。