

痛み・温度感覚の分子生物学

富永真琴

(三重大学医学部生理学第一講座)

はじめに

痛みは、生体にとって外部からの侵害刺激、傷害の発生やその部位を知らせる警戒信号である。痛み刺激を受容する感覚神経を侵害受容神経(nociceptor)と呼び、主に無髄のC線維や有髄のA δ 線維がこれにあたる(一次求心性線維)。これらの神経の細胞体は頸部以下では後根神経節に存在し、一次求心性線維は後根を経て脊髄後角の表層に投射する。そこで刺激信号はシナプスを介して二次求心性線維に伝達され、脊髄を上行して(脊髄視床路)、最終的に大脳皮質の感覚野に投射して痛みとして認識される。これまで、痛み受容の最初の入り口である感覚神経特異的に発現して侵害刺激を受容する分子実体は不明であった。しかし、分子生物学の進歩により痛み受容に関わるいくつかのイオンチャネル型の受容体遺伝子がクローニングされた。イオンチャネル型ATP受容体(P2X受容体)やプロトン感受性チャネル、カプサイシン受容体を含むTRPチャネルなどである(1)。イオンチャネル型の受容体は感覚神経終末で侵害刺激を受容してチャネルが開くことで脱分極を引き起こし、神経細胞の興奮により侵害刺激信号の伝達を可能にする。これらのイオンチャネル型受容体の中でも、1997年にクローニングされたカプサイシン受容体は、カプサイシン、熱、酸という三つの痛み刺激を受容する受容体で、痛み受容の中心的役割を果たす分子として注目されている。近年、明らかにされつつある痛み受容・温度受容の分子機構についてカプサイシン受容体とそのホモログを中心に紹介したい。

1. TRPチャネル

transient receptor potential (*trp*)遺伝子は、1989年にショウジョウバエの光受容器異常変異株の原因遺伝子として同定された。*trp*変異株では、光応答電位が一過性で細胞外からのCa²⁺流入が減弱する。電気生理学的な解析から*trp*のコードするタンパク質(TRP)はCa²⁺チャネルとして機能することが確認された。Ca²⁺チャネルは、電位作動性チャネル・リガンド作動性チャネル・受容体活性化チャネルに大別されるが、TRPは受容体活性化Ca²⁺チャネルの分子実体と考えられており、最近では、受容体活性化のみならず温度や細胞内因子などさまざまな刺激に応答して活性化されることが明らかになってきている。現在までに多くのTRPホモログが発見されてきており、TRPスーパーファミリーは、TRPC、TRPV、TRPMに大きく分けられる。

2. TRPV1 (カプサイシン受容体)

トウガラシの主成分であるカプサイシン(capsaicin)は辛み成分であるとともに発痛物質でもある。1997年、カプサイシン投与による細胞内 Ca^{2+} の濃度上昇を指標とした発現クローニング法を用いてカプサイシン受容体遺伝子がクローニングされた(2)。カプサイシン受容体はそのアミノ酸配列から6回の膜貫通領域を有するイオンチャネルであろうと推定された。カプサイシンはその構造に vanillyl 基を有することから RTX などの類縁体とともに vanilloid と総称されており、クローニングされた受容体は vanilloid receptor subtype 1 (VR1) と命名された。現在では、他の五つのサブタイプとともに TRP サブファミリー TRPV を形成するために、TRPV1 と分類されている。

ヒト由来培養細胞 (HEK293 細胞) に TRPV1 を発現させてパッチクランプ法を用いて電気生理学的な機能解析が行われ、TRPV1 が外向き整流性を有する Ca^{2+} 透過性の高い非選択性陽イオンチャネルであることが明らかとなった。また、TRPV1 はカプサイシンのみならず、生体に痛みを惹起させる酸 (プロトン) や熱 (43 度以上) といった複数の侵害刺激によって活性化されることも分かった(2,3) (図1)。さらに、単一チャネル電流の解析によって、TRPV1 が細胞内セカンドメッセンジャーを介さず恐らく直接活性化されるであろうことが判明した。カプサイシンは痛みを惹起する物質であるが、鎮痛薬として糖尿病性神経症やリウマチ性神経症の痛みを軽減する目的で使われている。これはカプサイシンに暴露された感覚神経終末が他の痛み刺激に対して応答しなくなること、つまり脱感作によると理解されている。培養細胞に TRPV1 を強制発現させた異所性発現系において細胞外 Ca^{2+} 存在下でカプサイシンの長時間あるいは繰り返し投与に対して TRPV1 電流の減少(脱感作と呼ばれる)が観察され、カプサイシンが鎮痛薬として使われる細胞レベルのメカニズムの一つであろうと推測された(3)。

[図1]

図 1

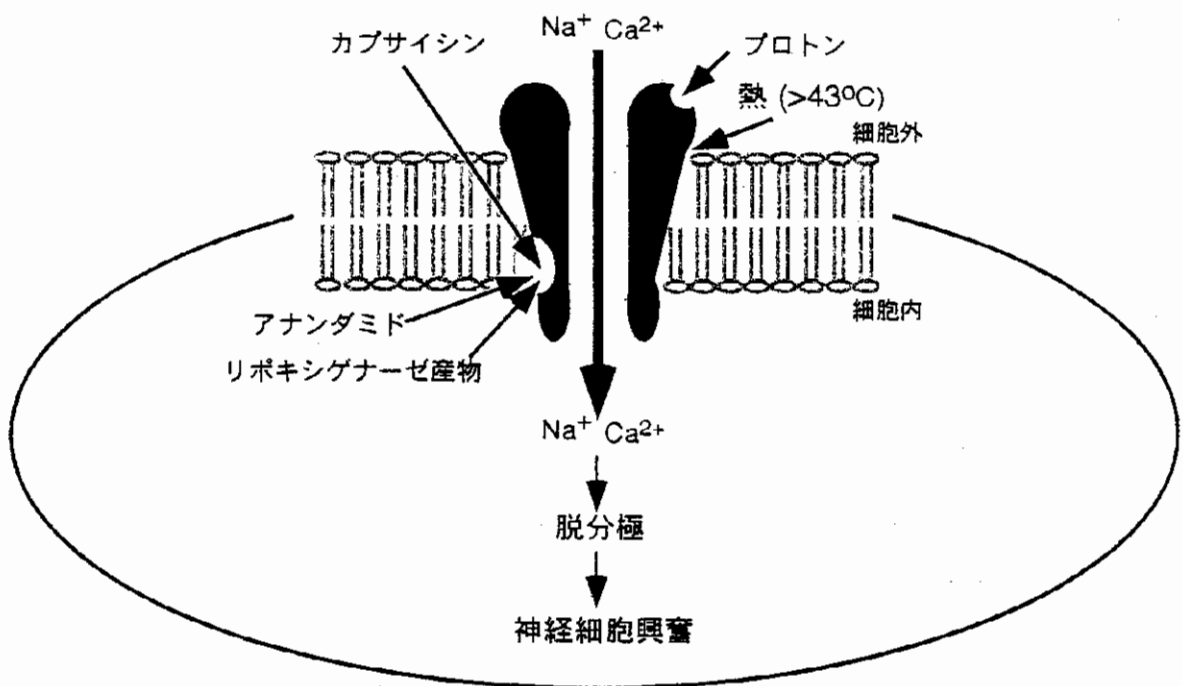


図 1. 神経細胞膜上の TRPV1 の機能モデル

カプサイシン、プロトン、熱の三つの異なる刺激を受容してイオンチャネルが開口して陽イオンが流入する。その結果、脱分極から神経細胞興奮が引き起こされる。カプサイシンの結合部位には膜脂質から誘導されるアナンダミドやリポキシゲナーゼ産物も作用してチャネルを開口させると推定されている。

ノーザンブロット法や *in situ* ハイブリダイゼーション法、特異的抗体を用いた免疫組織化学的な解析によって、TRPV1 の遺伝子およびタンパク質レベルでの発現が検討された。TRPV1 は感覚神経特異的に発現しており、後根神経節や三叉神経節の中の小から中径の神経細胞(おそらく無髄の C 線維および A δ 線維の細胞体)にのみ発現していた(2)。また、これらの神経の投射先である脊髄後角の表層(第 I, II 層)と尾側三叉神経核においても発現が確認された(3)。

異所性発現系での電気生理学的な機能解析によって TRPV1 が痛みの多刺激受容体として機能することが明らかになったが、TRPV1 欠損マウスの解析によって個体レベルでも TRPV1 が広範囲の痛み刺激受容体として機能することが確かめられた(4,5)。TRPV1 欠損マウスの感覚神経細胞は、カプサイシン、プロトン、熱のいずれの刺激にも反応しなかった。行動解析においても TRPV1 欠損マウスはカプサイシン投与による痛み反応を示さず、熱刺激感受性も低下していた。

組織損傷や炎症、神経損傷時に増加する神経栄養因子や様々な炎症関連物質によって TRPV1 の感受性が増大し、それが疼痛発生や痛覚異常に関与することが想定されている。炎症関連物質である細胞外 ATP やブラジキニンがカプサイシンやプロトンによって活性化された TRPV1 電流を増大させることが明らかとなった(6,7)。さらに、ATP やブラジキニンによって TRPV1 の活性化温度閾値は約 42°C から 35°C 以下に低下することから、他のリガンドが存在しなくても体温によって TRPV1 が活性化して炎症時の疼痛発生に関与することが示唆された。この TRPV1 活性の増強作用は PKC 依存的であり、Gq タンパク質共役型受容体 (P2Y, BK1, BK2 受容体) に結合して phospholipase C を介して PKC を活性化し、TRPV1 をリン酸化することが推測された。生化学的なアプローチから TRPV1 の 502 番目 (第 1 細胞内ループ) と 800 番目 (カルボキシル末端) のセリンが PKC によるリン酸化の基質であることが明らかとなった(8)。急性期の炎症においては、TRPV1 の全体量は変化せずに、リン酸化された TRPV1 が増加して炎症性疼痛の発生を引き起こしていることが推測される。TRPV1 欠損マウスでは ATP による熱性痛覚過敏は減弱しており、ATP と TRPV1 の機能連関が個体レベルで明らかになった。様々な炎症関連物質の最終的なターゲットが TRPV1 であることは、TRPV1 に作用する薬剤が炎症性疼痛に有効である可能性を示唆し、cyclooxygenase 阻害薬を中心とする NSAID (nonsteroid anti-inflammatory drug) に代わる鎮痛薬の開発という視点からも興味深い。

3. 温度感受性を有する TRP チャネル

日本に暮らす私たちは1年を通して四季折々様々な温度を感じて過ごしていて、私たちが感じる温度を表す言葉を挙げてみると、「冷たい(寒い) (cold)」「涼しい (cool)」「暖かい (warm)」「熱い(暑い) (hot)」などが多い。温度受容が感覚神経で行われていることは容易に想像できるが、どのようなメカニズムで起こっているかは長い間謎であった。感覚神経が温度刺激を電気信号(活動電位)に変換してその情報が中枢へと伝達されることは明らかだが受容体分子が明らかでなかったのである。カプサイシン受容体 TRPV1 は痛み受容体であるとともに、初めて分子実体の明らかになった温度受容体である。TRPV1 を含めて TRP スーパーファミリー(特に TRPV サブファミリー)に属する分子が温度受容を担うことが明らかになってきている(図2)。

[図2]

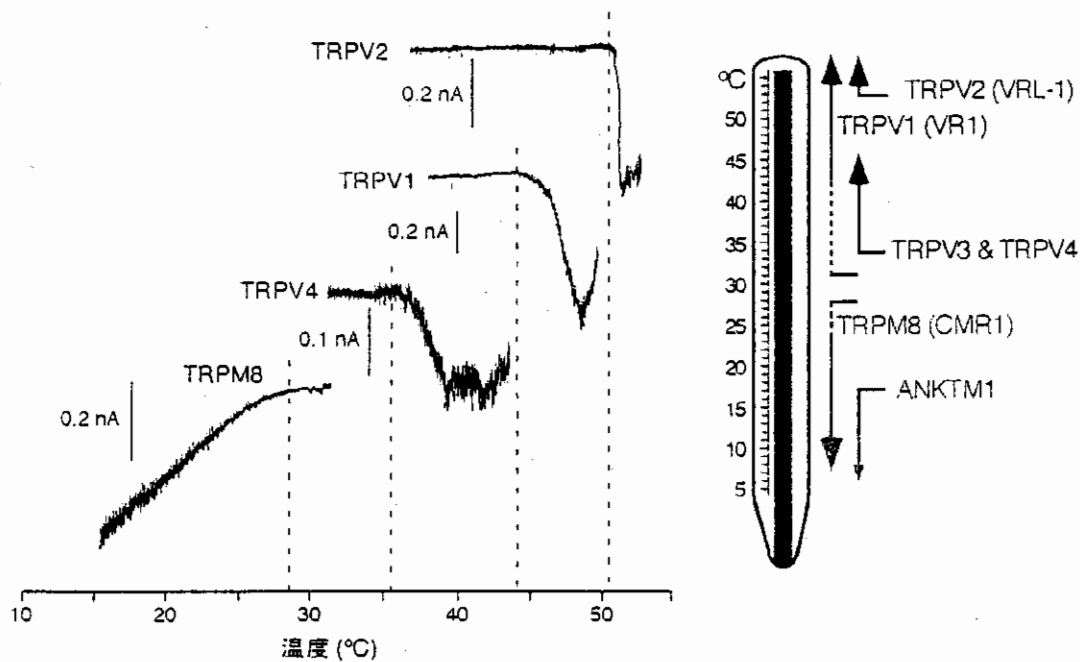


図2. 2. 4つの温度受容体チャネル電流の温度依存曲線(左)と知られている温度受容体のカバーする温度(右)

左: 保持電位-60 mVでの全細胞電流。下向きが活性化して細胞内に流入する内向き電流を示す。点線は活性化温度閾値を示す。カプサイシン受容体 TRPV1 は約43度以上、TRPV2 は約52度以上、TRPV4 は約35度以上、TRPM8 は約28度以下で活性化する。

右: 冷から熱の温度刺激を感知する5つのTRPファミリーメンバー温度受容体とANKTM1を示す。TRPV4を除く5つのチャネルは温度痛み刺激受容に関与することが推定されている。TRPV1の低温側、TRPM8の高温側の点線は、受容体の機能制御によって活性化温度閾値が変化するを示す(本文参照)。

高熱刺激受容体：TRPV2 (VRL-1)

TRPV2 は TRPV1 のホモログとしてクローニングされ、当初、vanilloid receptor-like protein 1 (VRL-1)と呼ばれた(9)。TRPV2 は TRPV1 とアミノ酸レベルで約 50%の相同性を持ち、TRPV1 と同様に 6 回膜貫通型のイオンチャネルであろうと推定されている。TRPV2 は、カプサイシンやプロトンには感受性を持たないが、熱によって活性化されることが判明し、熱活性温度閾値は約 52℃であった。特異的抗体を用いた解析により、A δ 線維に TRPV2 の発現が認められた。痛みは本来、外部からの侵害刺激から生体を防御する警戒信号として働くので、より強い侵害刺激に対する受容体がより伝達速度の速い A δ 線維に発現するのは、非常に合理的といえる。

温刺激受容体：TRPV3, TRPV4 (VR-OAC)

約 30 度以上の温かい温度域において、TRPV3 と TRPV4 の 2 つの TRP スーパーファミリー受容体が活性化することが最近報告された。TRPV3 については、報告によって活性化温度閾値が少し異なり、32-39 度である(10,11,12)。TRPV4 はもともと低浸透圧で活性化する浸透圧感受性受容体 (VR-OAC, vanilloid receptor-related osmotically activated channel)として見つかったが、温度感受性(約 35 度以上)も有することが新たに発見された(13)。浸透圧と温度という 2 つの有効刺激間でクロストークが存在し、低浸透圧下では活性化温度閾値が低下した。TRPV4 は、角質細胞と視床下部で蛋白質レベルでの発現が確認された。角質細胞で感覚神経のように温度が受容されるのか、また仮に角質細胞で温度受容されるとして角質細胞から感覚神経へどのような情報伝達がなされるのかは不明である。しかし、皮膚は外界の温度に直接暴露される部位であり、そこに温刺激受容体が存在するのは興味深い。また、視床下部は体温調節に重要な器官であり、中枢での温度受容や調節に関与すると思われ、今後の検討が待たれる。

涼冷刺激受容体：TRPM8 (CMR1), ANKTM1

熱刺激と同様に冷刺激も痛みを惹起するが、昨年、冷刺激受容体遺伝子がクローニングされた(14,15)。クローニングされた受容体は TRP スーパーファミリーに属しており、冷刺激と冷感をもたらすメントール(ミントの主成分)に感受性を持つことから、cold- and menthol-sensitive receptor 1 (CMR1), TRPM8 として報告されている。TRPM8 を発現させた細胞での電気生理学的な解析から、TRPM8 が外向き整流性をもつ Ca²⁺透過性の高い非選択性陽イオンチャネルであることが明らかとなり、8-28 度の冷刺激で活性化することが判明した。もう一つの刺激であるメントールにより、活性化温度閾値の上昇(より高い温度で冷たいと感じることになる)と活性化電流の増大が観察された。このように有効刺激間にクロストークが存在することや細胞外 Ca²⁺存在下で脱感作が生じることなど TRPM8 は TRPV1 と似た性質を持つ。TRPM8 遺伝子は後根神経節や三叉神経節の中の小径から中径の感覚神経細胞(おそらく C 線維や A δ 線維)に発現していた。ごく最近、侵害性冷刺激閾値(約 15 度)を説明する TRP チ

チャンネルに似た構造の新たな冷刺激受容体 ANKTM1 が報告された(16)。ANKTM1 は、感覚神経のみに発現し、17 度以下の低温で活性化されるという。また、後根神経節で TRPV1 と共発現しているようである。同じ感覚神経に熱刺激を感知する受容体と冷刺激を感知する受容体の両方が発現しているとき、私たちはどのようにしてその温度を区別しているのでしょうか。温度受容以降の情報統合の機構の違いによると考えられているが、非常に冷たいドライアイスに触ったときに「冷たい」ではなく「熱い」と感じることはその情報統合機構のせいかもしれない。

どのようにして温度刺激がイオンチャンネルを開口させるのか

イオンチャンネルのゲーティングが温度依存性であることはよく知られているが、その Q_{10} はふつう 5 以下である。しかし、TRPV1, TRPV3, TRPV4 は 10 を越える Q_{10} 値(10-30)を示しており、これらのチャンネルが温度によって開口すると結論しても問題はないと思われる。温度はどのようにして受容体を活性化させるのであろうか。熱は細胞膜脂質の流動性やほかの細胞内蛋白質にも影響すると思われるが、TRPV1, TRPV3 では excised patch で温度刺激によって単一チャンネル電流が観察されたことから温度による直接のチャンネルの活性化が推定されている。しかし、チャンネルに強く結合した附属蛋白質等の関与は否定できず、purified channel protein を用いた人工膜でのチャンネル開口の観察が必要かもしれない。同じ TRP スーパーファミリーに属する複数のチャンネルが温度感受性を有すること、また、TRPV1 の 1 つのアミノ酸変異が大きな活性化温度閾値の変化をもたらすこと(17)は、チャンネル蛋白質自身が温度を受容していることを示唆する。温度受容体のアミノ酸配列のアラインメントから温度感受部位を同定するのは難しいようである。もっとグローバルなチャンネル構造が温度によって大きく変化しているのかもしれない。

おわりに

カプサイシン受容体 TRPV1 の発見は、多刺激痛み受容体の分子実体が明らかになったことで注目を浴び、「分子からアプローチする痛み研究」の進展に大きく貢献した。また、温度という物理的刺激の受容研究にも衝撃をもたらした。細胞の生存、分化・増殖にきわめて重要な役割を果たす受容体活性化 Ca^{2+} 流入を担う TRP チャンネルファミリーに属する TRPV チャンネル研究が、今後の痛み刺激受容機構、温度受容機構の解明につながるものと期待される。

文献

- (1) Julius D and Basbaum A.I: Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203-210, 2001.
- (2) Caterina M.J, Schumacher M.A, Tominaga M, Rosen T.A, Levine J.D and Julius D: A The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824, 1997.
- (3) Tominaga M, Caterina M.J, Malmberg A.B, Rosen T.A, Gilbert H, Skinner K, Raumann B.E, Basbaum A.I and Julius D: The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531-543, 1998.
- (4) Caterina M.J, Leffler A, Malmberg A.B, Martin W.J, Trafton J, Petersen-Zeitz K.R, Koltzenburg M, Basbaum A.I and Julius D: Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-313, 2000.
- (5) Davis J.B, Gray J, Gunthorpe M.J, Hatcher J.P, Davey P.T, Overend P, Harries M.H, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes S.A, Rance K, Grau E, Harper A.J, Pugh P.L, Rogers D.C, Bingham S, Randall A and Sheardown S.A: Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405:183-187, 2000.
- (6) Tominaga M, Wada M and Masu M: Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6951-6956, 2001.
- (7) Sugiu T, Tominaga M, Katsuya H and Mizumura K: Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol* 88: 544-548, 2002.
- (8) Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H and Tominaga M: Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by PKC ϵ and identification of two target serine residues. *J Biol Chem* 277: 13375-13378, 2002.
- (9) Caterina M.J, Rosen T.A, Tominaga M, Brake A.J and Julius D: A capsaicin receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398: 436-441, 1999.
- (10) Xu H, Ramsey I.S, Kotecha S.A, Moran M.M, Chong J.A, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano P.S, Curtis R and Clapham D.E: TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418: 181-186, 2002.
- (11) Smith G.D, Gunthorpe M.J, Kelsell R.E, Hayes P.D, Reilly P, Facer P, Wright J.E, Jerman J.C, Walhin J.P, Ooi L, Egerton J, Charles K.J, Smart D, Randall A.D, Anand P and Davis J.B: TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418: 186-190, 2002.
- (12) Peier A.M, Reeve A.J, Andersson D.A, Moqrich A, Earley T.J, Hergarden A.C, Story G.M, Colley S, Hogenesch J.B, McIntyre P, Bevan S and Patapoutian A: A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296: 2046-2049, 2002.
- (13) Güler A, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M and Caterina M: Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* 22: 6408-6414, 2002.
- (14) McKemy D.D, Neuhauser W.M and Julius D: Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416: 52-58, 2002.

- (15) Peier A.M, Moqrich A, Hergarden A.C, Reeve A.J, Andersson D.A, Story G.M, Earley T.J, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S and Patapoutian A: A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108: 705-715, 2002.
- (16) Story G.M, Peier A.M, Reeve A.J, Eid S.R, Mosbacher J, Hricik T.R, Earley T.J, Hergarden A.C, Andersson D.A, Hwang S.W, McIntyre P, Jegla T, Bevan S and Patapoutian A: ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112: 819-29, 2003.
- (17) Jordt S-E, Tominaga M S-E and Julius D: Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8134-8139, 2000.

〒514-8507

三重県津市江戸橋 2-174

Phone & Fax: 059-231-5004

E-mail: tominaga@doc.medic.mie-u.ac.jp