

感覚機能の制御における

末梢・中枢神経細胞 TRP チャネルの役割に関する研究

2024

戸堀 翔太

目次

緒言	1
第1章 快刺激感受性一次感覚神経サブセットにおける TRPA1 の役割	3
実験方法	4
実験結果	7
考察	9
第2章 神経障害性疼痛における脊髄後角神経 TRPC3 の病態生理学的役割	12
実験方法	13
実験結果	20
考察	28
総括および結論	34
謝辞	35
発表論文目録	36
参考文献	37

緒言

感覚機能は自らを取り巻く外部環境を認識する上での根幹となる機能として、ヒトを含む多くの生物に備わっている生存に必要不可欠な機能である。例えば、皮膚を撫でるような触覚刺激により惹起される心地よい感覚は他個体とのコミュニケーション等において重要な役割を果たし、痛みは組織の傷害から自らを守るための警告システムとしての機能を担う。

感覚障害はこれらの感覚機能に異常が生じた状態であり、刺激に対する感覚が亢進する感覚過敏、あるいは減弱する感覚鈍麻、刺激に対し通常生じる感覚とは異なった感覚を生じる錯感覚、刺激がないにもかかわらず不快感覚が生じる異常感覚などに分類される。これらの感覚障害は主に外部刺激を直接受容する一次感覚神経から感覚情報の処理を司る大脳皮質に至るまでの体性感覚神経系における機能障害が原因であると考えられている。感覚障害を伴う疾患の例として、先天性無痛症においては温度覚と痛覚が消失しており、外傷に気付いて適切な処置を行うことができないために重篤化しやすい、環境温度に合わせた体温調節が困難なために熱中症や低体温症を引き起こしやすい、他者の温度や痛みの感覚が理解できないため他者とのコミュニケーションに困難が生じやすいなどの問題点が存在する。また、神経障害性疼痛などの末梢神経障害では組織に損傷がないにもかかわらず痛みやしびれなどの不快な情動を伴う感覚が増大した状態が続くことで患者の日常生活に支障をきたす。このように感覚障害の病態下では多くの場合患者の QOL を著しく損なうことから精力的に取り組むべき医療上の課題となっているが、その創薬開発の多くは難航している。

Transient receptor potential (TRP) チャネルは非選択的カチオンチャネルの一群であり、その一部は末梢および中枢の体性感覚神経系に広く分布する。体性感覚神経系に発現する TRP チャネルのうち、いくつかのチャネルは機械刺激・熱刺激・化学刺激等により活性化されることから、物理的・化学的刺激を電気信号すなわち神経活動へと変換する感覚センサーとして様々な感覚機能に直接的に寄与することが知られている。例として一次感覚神経の侵害受容線維に発現する TRP vanilloid 1 (TRPV1) はカプサイシン・43°C 以上の熱刺激・プロトン等により活性化され、TRP ankyrin 1 (TRPA1) はアリルイソチオシアネートなどの刺激性物質・活性酸素種等により活性化されることで、侵害受容センサーとしての役割を果たしている。一方で、TRP canonical 3 (TRPC3) などのように体性感覚神経系で発現することが報告されているものの感覚機能に対しどのような役割を果たしているのかが不明であるチャネルも存在する。そこで本研究では、第 1 章では快刺激感受性一次感覚神経サブセットにおける TRPA1 に着目し、第 2 章では脊髄後角神経における TRPC3 に着目し、感覚機能の制御分子としての TRP チャネルの機能について検討を行い、以下の知見を得た。

第 1 章では、快刺激感受性一次感覚神経サブセットに TRPA1 が発現し、不快感の緩和に TRPA1 が関与することを明らかにした。第 2 章では、神経障害性疼痛およびホスホリパーゼ C により誘発される機械痛覚過敏の形成に対して脊髄後角神経細胞の TRPC3 が促進的に寄与することを明らかにした。

これらの研究成果について、以下に論述する。

なお、本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AAV	adeno-associated virus	m-3M3FBS	2,4,6-Trimethyl- <i>N</i> -(3-trifluoromethyl-phenyl)-benzenesulfonamide
AM	acetoxymethyl ester	miRNA	micro ribonucleic acid
ATP	adenosinetriphosphate	MrgprB4	Mas-related G protein-coupled receptor B4
ATF3	activating transcription factor 3	mRNA	messenger ribonucleic acid
ANOVA	analysis of variance	NeuN	neuronal nuclei
CMV	cytomegalovirus	OL	oligodendrocyte lineage cells
DAG	diacylglycerol	PB	phosphate-buffer
DIO	double-floxed inverted open reading frame	PBS	phosphate-buffered saline
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	pSNL	partial sciatic nerve ligation
DRG	dorsal root ganglion	PFA	paraformaldehyde
EmGFP	emerald green fluorescence protein	PLC	phospholipase C
FACS	fluorescence-activated cell sorting	QOL	quality of life
GFAP	glial fibrillary acidic protein	SNP	single nucleotide polymorphism
GFP	green fluorescence protein	SNT	spinal nerve transection
GPCR	G protein-coupled receptor	TG	trigeminal ganglion
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid	TNF α	tumor necrosis factor α
hSyn	human synapsin	TRP	Transient receptor potential
Iba1	ionized calcium-binding adapter molecule 1	TRPA	Transient receptor potential ankyrin
IL1 β	interleukin 1 β	TRPC	Transient receptor potential canonical
IL6	interleukin 6	TRPM	Transient receptor potential melastatin
KD	knockdown	TRPV	Transient receptor potential vanilloid
KO	knockout	WT	wild type

第1章 快刺激感受性一次感覚神経サブセットにおける

TRPA1 の役割

生体には周囲の環境変化を感知するためのシステムとして体性感覚神経系が備わっている。体性感覚神経系のうち直接外部刺激を受容する一次感覚神経にはイオンチャネルなどの「感覚センサー」として機能する様々な分子が発現しており、これらを介することで特定の刺激を感知し応答することが可能になっている (1-3)。例として、カチオンチャネルファミリーの一群である TRP チャネルの中には、熱刺激センサーや機械刺激センサーとして機能するサブタイプが存在する (4)。TRPA1 はアリルイソチオシアネート (AITC) やシンナムアルデヒド (CA) などの刺激性物質、活性酸素種・活性窒素種などの反応性化学物質、侵害性冷刺激など、幅広い外部刺激により活性化される Ca^{2+} 透過性カチオンチャネルである (5)。TRPA1 は一次感覚神経において発現しており、侵害性冷刺激受容器および機械受容器の実体となる分子の候補として報告された (6, 7) が、*in vivo* において TRPA1 が侵害性受容器または機械受容器として機能するかどうかについては相反する報告 (8-11) が存在しており、現在でも明らかにはなっていない。

Mas 関連 G タンパク質共役型受容体 (Mrgpr) は、50 以上のメンバーから構成される G タンパク質共役型受容体 (GPCR) ファミリーである (12, 13)。Mrgpr は四肢動物において発展した分子群であり、四肢動物は腕や脚を獲得したことで皮膚に付着した有害な物質を自力で取り除けるようになり、周囲の環境に適応して進化してきた (13)。これまでの研究で Mrgpr は主に一次感覚神経の侵害受容線維において発現しており、かゆみや痛みの感覚に寄与することが明らかにされてきた (14-16) が、一方で一部の Mrgpr は快い感覚として知覚される皮膚感覚に寄与する。例えば MrgprB4 はマウスにおいて一部の無髄線維サブセットに発現しているオーファン GPCR である (17) が、MrgprB4 陽性一次感覚神経は皮膚の有毛部を神経支配し、皮膚をマッサージしたり撫でたりするような心地よさを生む機械刺激を感知している (18)。これまで MrgprB4 陽性一次感覚神経はげっ歯類でしか存在が確認されていない (13) もの、ヒトに存在している C 触覚線維と生理学的・機能的に類似している (17, 19)。ヒトの C 触覚線維は、皮膚を撫でるような快感をもたらす動的機械刺激を感知する (20-26)。また、C 触覚線維に対する刺激は島皮質 (27) を活性化し、情動制御に関与する皮質 (28) ヘシグナルを伝達することが示唆されている。MrgprB4 陽性一次感覚神経には機械感受性イオンチャネル Piezo2 を発現している (29) が、機械刺激の受容メカニズムにおける MrgprB4 自体の役割は明らかにされていない。

本章では、MrgprB4 発現細胞を赤色蛍光タンパク質 tdTomato で標識したトランスジェニックマウス (18) を用い、*in vitro* において様々な TRP チャネルアゴニストに対する MrgprB4 陽性一次感覚神経の応答を解析した。また、MrgprB4 ノックアウト (KO) マウスを用いて、*in vivo* において MrgprB4 の欠損が痛みやその他の不快な感覚刺激により誘発される行動に対しどのような影響を及ぼすかを評価した。

実験方法

動物実験

すべての動物実験は、京都大学動物実験委員会および日本薬理学会の倫理指針に従って実施された。C57BL/6J マウスは日本 SLC から購入した。Mrgprb4^{tm3(cre)And/J} マウスおよび TRPA1 欠損 (KO) マウスは The Jackson Laboratory から購入し、表現型に対するバックグラウンドの影響を排除するために、C57BL/6 J マウスと 10 世代にわたって戻し交配を行った。なお、Mrgprb4^{tm3(cre)And/J} マウスは、Mrgprb4 遺伝子のオープンリーディングフレーム全体を mtdTomato-2A-NLSCre-Frt-PGK-neomycin-FRT カセットで置換した系統である。Mrgprb4^{tm3(cre)And} ヘテロ接合体およびホモ接合体マウスをそれぞれ MrgprB4-tdTomato マウスおよび MrgprB4-KO マウスとして用いた。野生型 (WT) マウスとして C57BL/6J マウスを用いた。すべてのマウスは、12 時間の明暗サイクル下で 22±2°C の一定の周囲温度で飼育され、水と飼料を自由に摂取させた。実験には 6–9 週齢の雄性および雌性マウスを使用した。

初代培養マウス三叉神経節 (TG) ニューロン

成体 MrgprB4-tdTomato マウスから両側の TG を採取し、0.3%コラゲナーゼおよび 0.4%ディスペーゼを含む Hank's balanced salt solution (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 5.6 mM D-glucose, 2.4 mM HEPES; NaOH により pH 7.4 に調整) 中で、37°C で 1 時間インキュベートした。Percoll 勾配を用いて TG ニューロンをミエリンおよび神経断片から以下のように分離した。まず 30%と 60%の Percoll 溶液を L15 培地で調製した。30% Percoll 溶液を 60% Percoll 溶液の上に静かに添加し、細胞懸濁液を Percoll 勾配の上に静かに添加した。1,800 × g で 10 分間遠心した後、細胞を Percoll 界面から回収して 8 mL の L15 培地に懸濁し、1,800 × g で 5 分間再度遠心した。上清を除去し、細胞ペレットを 10%熱不活性化ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich)、ペニシリン G (100 U/mL)、ストレプトマイシン (100 µg/mL) を含む 70 µL のダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (D6046; Sigma) に懸濁した。細胞をラミニン (Life Technologies) でコーティングしたカバースリップに播種し、5% CO₂ 加湿環境にて 37°C で 4 時間インキュベート後、1.5 mL の DMEM を加え、細胞を再び 37°C、5% CO₂ 加湿環境で一晩培養した。

細胞内 Ca²⁺イメージング

0.005% Cremophor EL を含む Krebs-Ringer 溶液 (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM D-glucose, 10 mM HEPES) 中で、初代培養マウス TG ニューロンに 5 µM Fura-2 アセトキシメチルエステル (Fura-2 AM; 同仁化学研究所) を 30–40 分間処置した。蛍光画像は、AQUACOSMOS/ORCA-AG イメージングシステム (浜松ホトニクス) を用いて、340 nm および 380 nm で交互に励起し、510 nm の蛍光を 5 秒ごとに撮影した。実験は室温で実施した。340 nm/510 nm の励起/発光 (F₃₄₀) と 380 nm/510 nm の励起/発光 (F₃₈₀) の蛍光強度の比 (F₃₄₀/F₃₈₀) を算出し、細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) を評価した。薬物処置前のベースラインにおける F₃₄₀/F₃₈₀ 比が 1.5 を超える細胞は

除外した。

行動実験

すべての行動実験において、動物を1時間以上実験環境へ馴化させた。それぞれの検討において、同一の実験者がすべての動物に対する評価を担当した。

カプサイシン誘発疼痛様行動の評価では、マウスを透明なアクリル筒に馴化させた後、10 µg または 0.5 µg のカプサイシン (20%エタノールおよび 7% Tween 80 を含む生理食塩水で希釈) を含む溶液 10 µL をそれぞれ頬部皮下または後肢足底内に投与した。投与後 10 分間の頬を前肢で拭う行動 (wiping) の回数、または後肢の足舐め・噛み行動の持続時間を測定した。

侵害性の熱刺激に対する反応性は、ホットプレートテストまたはテールイマージョンテストにより評価した。ホットプレートテストでは、52°C に設定されたホットプレート痛覚測定装置 (Ugo Basile) の中央にマウスを 1 匹ずつ入れ、ジャンプ・後肢を舐める・後肢を振るなどの逃避反応が認められるまでの潜時を 0.1 秒単位で測定した。測定後、マウスはすぐにホットプレートから回収され、ケージに戻された。テールイマージョンテストでは、マウスを 50 mL コニカルチューブ内に拘束してチューブから出た尾を 44°C に保たれた水槽に浸し、チューブ内をよじ登ろうとする反応が認められるまでの潜時を測定した。

アセトンテストは、既報 (30) にわずかに修正を加えて実施した。マウスを金網に乗せ、1 mL シリンジを用いてアセトンを一滴 (約 30 µL)、頬または後肢足底に塗布した。塗布後 5 分間の頬に対する wiping 行動、または後肢の足振り・舐め行動の回数を測定した。3 回の試験における平均値を算出した。

クロロキン誘発搔痒様行動の評価では、マウスを透明なアクリル筒に馴化させた後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈した 100 µg のクロロキンを含む溶液 10 µL を頬部皮下に投与した。投与後 40 分間の頬を後肢で発作的に数回搔く一連の行動 (bouts of scratching) の回数を測定した。

スクロース噴霧テストでは、マウスを透明なアクリル筒に馴化させた後、小型スプレーを用いて 10% (w/v) スクロース水溶液を頬部に噴霧した。噴霧後 10 分間の wiping 回数を測定した。

免疫蛍光染色法

マウスをペントバルビタール (64.8 mg/kg; 腹腔内注射) により麻酔したのち、K⁺ 不含 0.1 M PBS を用いて経心灌流により脱血し、4% パラホルムアルデヒド (PFA) を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (PB) を灌流して固定した。TG、第 12 胸椎 (T12) または第 4 腰椎 (L4) の後根神経節 (DRG) を採取したのち 4% PFA 固定液中で 3 時間保存した後、15% スクロースを含む 0.1 M PB 溶液中で 4°C で一晩以上静置した。組織は O.C.T. Compound (Tissue-Tek) に包埋し、クリオスタット (Leica Biosystems) を使用して 16 µm 厚の固定凍結組織切片を作製した。切片を 3% ウシ血清アルブミンおよび 0.1% Triton X-100 を添加した PBS で 40–60 分間ブロッキングした後、ウサギ抗 DsRed (tdTomato) 抗体 (1:500; Clontech) またはマウス抗 MAP2 抗体 (1:500; Chemicon) の各一次抗体を処置し 4°C で一晩インキュベートした。次に、切片に Alexa Fluor 標識ロバ抗ウサギ IgG (594) および抗マウス IgG (488) (1:500; Invitrogen) 二次抗体を処置し、暗所で 1 時間室温にて静置した。蛍光画像は、FluoView FV10i 共焦点顕微鏡 (Olympus) で撮影した。

統計解析

統計解析は Prism 9 (GraphPad Software) を使用して実施した。単一の実験群と対照群との比較には対応のない t 検定を使用した。危険率 5%未満の場合には、統計的に有意な差であると判定した。データは平均 ± 標準誤差として示した。各実験のサンプルサイズは、図の凡例に記載した。すべての実験において、実験条件について盲検化された状態で評価を行った。

実験結果

MrgprB4 陽性一次感覚神経の分布

MrgprB4 陽性一次感覚神経が存在する部位を明らかにするために、MrgprB4-tdTomato マウス (18) の神経節における tdTomato 発現を評価した。tdTomato 発現細胞は TG および T12、L4 DRG に存在していた (図 1-1)。特に TG で多くの tdTomato 発現細胞が認められたため、以降では TG における MrgprB4 陽性ニューロンを用いて検討を行った。

TG MrgprB4 陽性ニューロンの特徴

MrgprB4-tdTomato マウス由来 TG 細胞において、tdTomato が神経細胞マーカーMAP2 と共発現していたことから、MrgprB4 陽性細胞が神経細胞であることが確認された (図 1-2A)。次に、MrgprB4 陽性ニューロン (MrgprB4⁺) と MrgprB4 陰性 (MrgprB4⁻) ニューロンの細胞体直径の分布を測定した。TG ニューロン全体は 10–40 μm の間の様々な細胞体サイズのニューロンで構成されていたが、MrgprB4 陽性ニューロンの平均細胞体直径は $17.8 \pm 0.62 \mu\text{m}$ であり、MrgprB4 陽性ニューロンは小径の一次感覚神経であることが示された (図 1-2B)。続いて MrgprB4 陽性ニューロンにおける TRP チャネルの機能的発現を明らかにするため、MrgprB4-tdTomato マウス由来 TG ニューロンを用いて Ca^{2+} イメージングを行った (図 1-2C, D)。54 個の MrgprB4 陽性ニューロンのうち 41 個 (75.9%) が選択的 TRPA1 アゴニストであるシンナムアルデヒドに反応したのに対し、選択的 TRPV1 アゴニストであるカプサイシンに反応した細胞は 1 個 (1.9%) のみであった。さらに、MrgprB4 陽性ニューロンのうち TRP melastatin 8 (TRPM8) アゴニストであるメントールまたは TRP vanilloid 4 (TRPV4) アゴニストである GSK1016790A に反応する細胞は認められなかった (図 1-2E)。

MrgprB4-KO マウスは、無毛部に対する刺激に対して正常な反応を示す

これまで MrgprB4 欠損に伴う表現型の異常は報告されていない (17, 18) が様々な感覚刺激に対する MrgprB4-KO マウスの反応性は明らかになっていないため、まず疼痛などの感覚機能研究において広く用いられる足底 (18) や尾への刺激反応性に対する MrgprB4 欠損の影響を検討した。以前に MrgprB4 陽性一次感覚神経は無毛部である足底部皮膚を神経支配しないことが報告されており (17)、カプサイシンによる化学刺激、ホットプレートやテールイマージョンによる熱刺激、アセトン

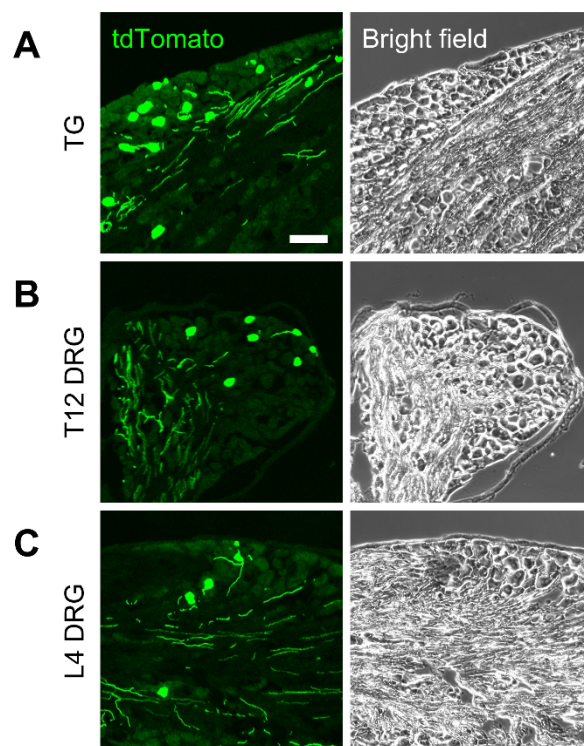


図 1-1. TG と DRG における MrgprB4 の発現
(A-C) MrgprB4-tdTomato マウスの TG (A)、T12 DRG (B) および L4 DRG (C) における tdTomato に対する免疫染色 (左) および明視野 (右) の代表画像。Scale bar: 100 μm .

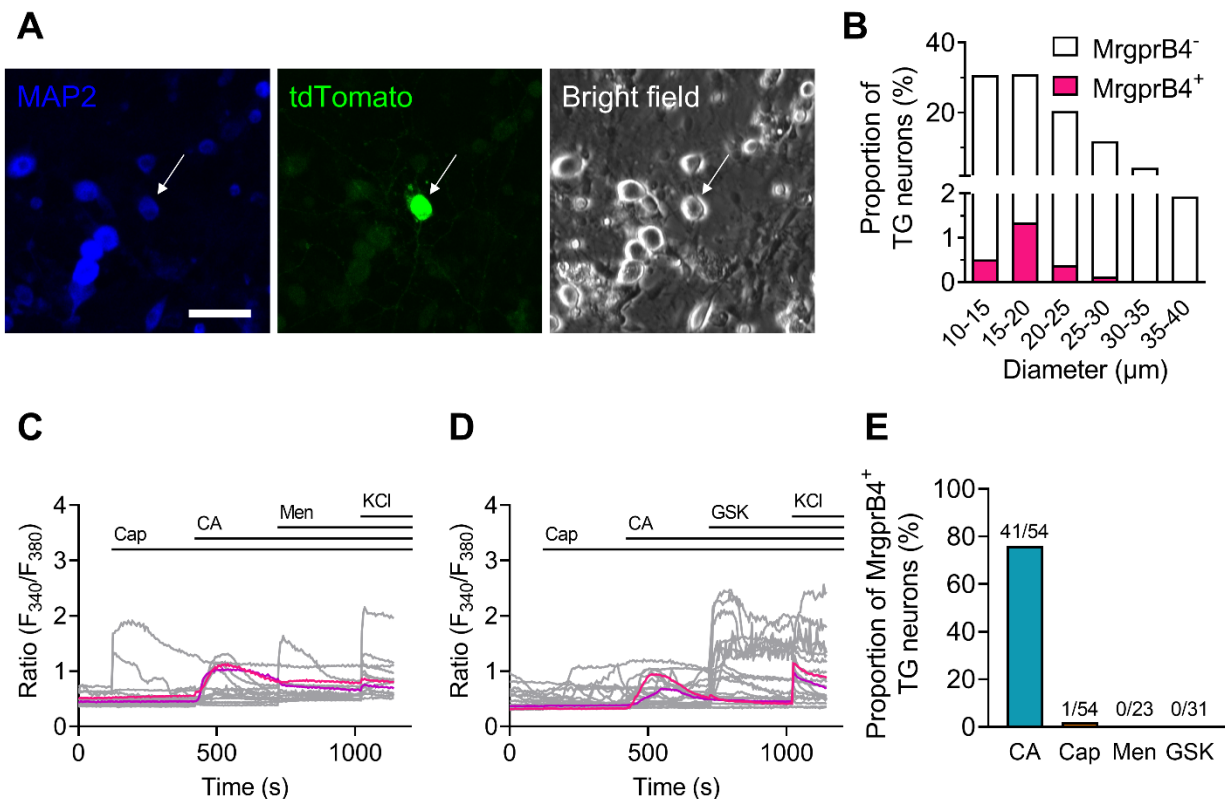


図 1-2. MrgprB4 発現 TG ニューロンは小径ニューロンであり、TRPA1 刺激にのみ反応する

(A) MrgprB4-tdTomato マウス由来培養 TG 細胞における MAP2 (左) または tdTomato (中) の免疫染色と明視野 (右) の代表画像。矢印は同一の細胞を示す。Scale bar: 50 μm. (B) MrgprB4-tdTomato マウス由来培養 TG ニューロンの細胞体直径の分布。MrgprB4⁺および MrgprB4⁻ニューロンの細胞体平均直径は、それぞれ 17.8 μm ($n=37$ cells) および 19.3 μm ($n=1,768$ cells) であった。(C, D) Fura-2 Ca²⁺イメージングにおけるトレースの代表例。各トレースは、個々の MrgprB4⁺ (カラー、 $n=2$ cells) または MrgprB4⁻ (グレー、 $n=13-18$ cells) ニューロンから取得された。カプサイシン (Cap; TRPV1 アゴニスト; 0.3 μM)、シンナムアルデヒド (CA; TRPA1 アゴニスト; 100 μM)、メントール (Men; TRPM8 アゴニスト; 0.5 mM)、GSK1016790A (GSK; TRPV4 アゴニスト; 1 μM)、KCl (50 mM)。(E) 各選択的 TRP チャンネルアゴニストに対する反応を示す MrgprB4⁺ニューロンの割合 ($n=54$ cells)。

塗布による冷刺激に対する反応性において WT マウスと MrgprB4-KO マウスの間に有意差は認められなかった (図 1-3A-D)。また、TRPA1 は以前に侵害性冷刺激受容器として報告されている (10) が、アセトン塗布に対する反応においては WT マウスと TRPA1-KO マウスの間に有意差は認められなかった (図 1-3E)。

MrgprB4 欠損は皮膚有毛部における不快な感覚を増大させる

TG は有毛部である頬部を神経支配する (31) ことから、MrgprB4 陽性一次感覚神経の神経支配領域として頬部に着目し、刺激反応性に対する MrgprB4 欠損の影響を検討した。頬部へのカプサイシン投与により誘発される wiping 行動の回数は WT マウスと MrgprB4-KO マウスの間で差は認められなかった (図 1-4A)。同様に、MrgprA3 アゴニストであり TRPA1 活性化を介して急性の痒みを惹起するクロロキンの投与により誘発される scratching 行動も、WT マウスと MrgprB4-KO マウスの間に有意差は認められなかった (図 1-4B)。しかし、アセトン塗布に対する wiping 行動は、MrgprB4-KO マウスで有意に増加した (図 1-4C)。興味深いことに、粘着性を生じるスクロース溶液噴霧によって誘発される wiping 行動においても MrgprB4-KO マウスで増加が認められた (図 1-4E)。さらに、TRPA1-KO マウスにおいても、MrgprB4-KO マウスと同様に頬部へのアセトン塗布やスクロース溶液噴霧により誘発される wiping 行動回数の有意な増加が認められた (図 1-4D, F)。

考察

本章では、MrgprB4 が TG および DRG ニューロンの一部に発現していること、MrgprB4 陽性 TG ニューロンのほとんどが TRPA1 アゴニストに反応するが、TRPV1、TRPM8、TRPV4 アゴニストには反応しないことを明らかにした。さらに、行動実験の結果から、TG ニューロンに発現する MrgprB4 が、頬部へのアセトン塗布やスクロース溶液の噴霧により誘発される不快な感覚を制御している可能性が示された。これらの結果は、MrgprB4 陽性一次感覚神経において MrgprB4 は TRPA1 と協調的に機能し不快な感覚を制御しうることを示唆するものである。

本章で明らかになった、TG のニューロンの一部のみが MrgprB4 を発現しており、MrgprB4 ニューロンが小径ニューロンであるという結果は既報 (17, 18, 29) と一致している。また、これらの既報では免疫組織化学染色により MrgprB4 陽性一次感覚神経は TRPV1 陰性であると報告している (17, 32)。一方 Huang ら (33) は MrgprB4 の転写レベルは DRG ニューロンよりも TG ニューロンにおいて高く、DRG ニューロンの約半数が MrgprB4 陽性かつ TRPV1 陽性であると報告しており、MrgprB4 陽性一次感覚神経における TRPV1 の発現については現在も議論が続いている。本章では TRP チャネルアゴニストを用いて、TG の MrgprB4 陽性ニューロンのほとんどが TRPA1 アゴニストに感受性があるが、TRPV1 アゴニストに感受性がないことを明らかにした。近年のマウス DRG ニューロンにおけるシングルセル RNA シーケンス解析 (34) により、MrgprB4 陽性ニューロンは DRG ニューロンの中では希少なサブセットであることが明らかにされた (全 622 細胞中 10 細胞が MrgprB4 陽性で、うち 6 個が TRPA1 を、2 個が TRPV1 を発現しており、TRPV4 と TRPM8 は発現していなかった)。本章での TRP チャネルアゴニストに対する応答の結果は既報と一致してお

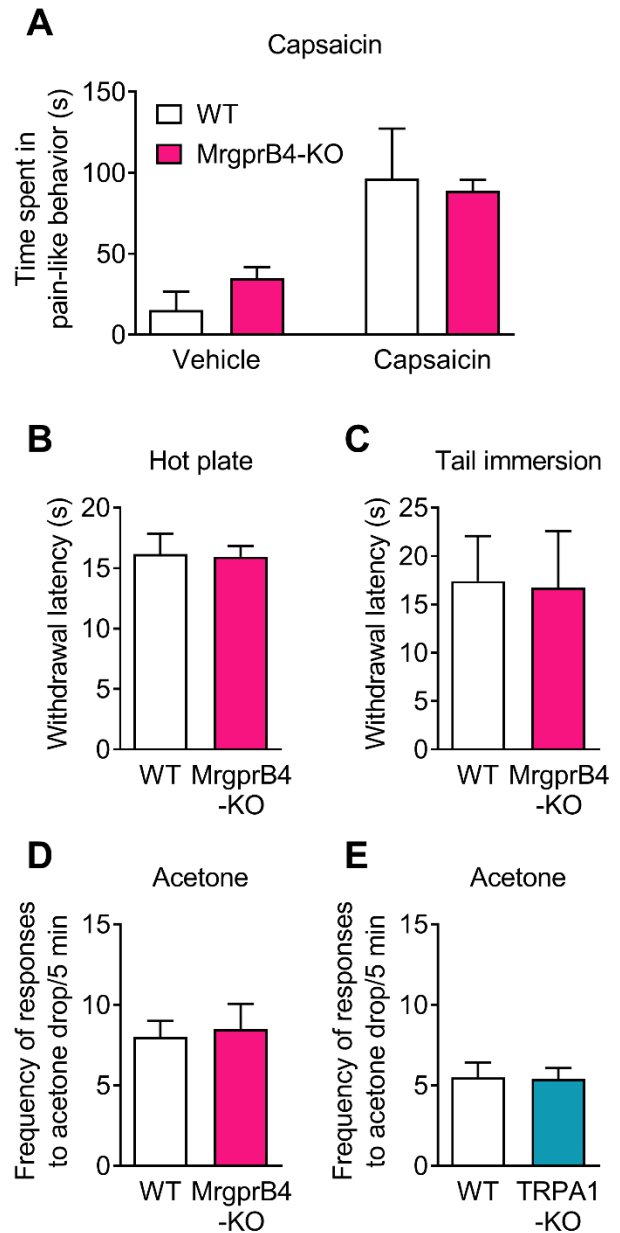


図 1-3. 無毛部である足底部への侵害刺激に対する反応性

(A) カプサイシン (0.5 μ g) 足底内投与により誘発される疼痛様行動 (足舐め・噛み) の持続時間を 10 分間測定した ($n=4-5$)。 (B, C) 有害な熱刺激に対する反応性をホットプレートテスト (B; $n=6$) およびテールイマージョンテスト (C; $n=3-5$) における逃避潜時により評価した。 (D, E) WT マウスと MrgprB4-KO マウス (D; $n=3-4$) および TRPA1-KO マウス (E; $n=5-6$) の足底部に約 30 μ L のアセトンを塗布した直後の反応回数を 5 分間測定した。

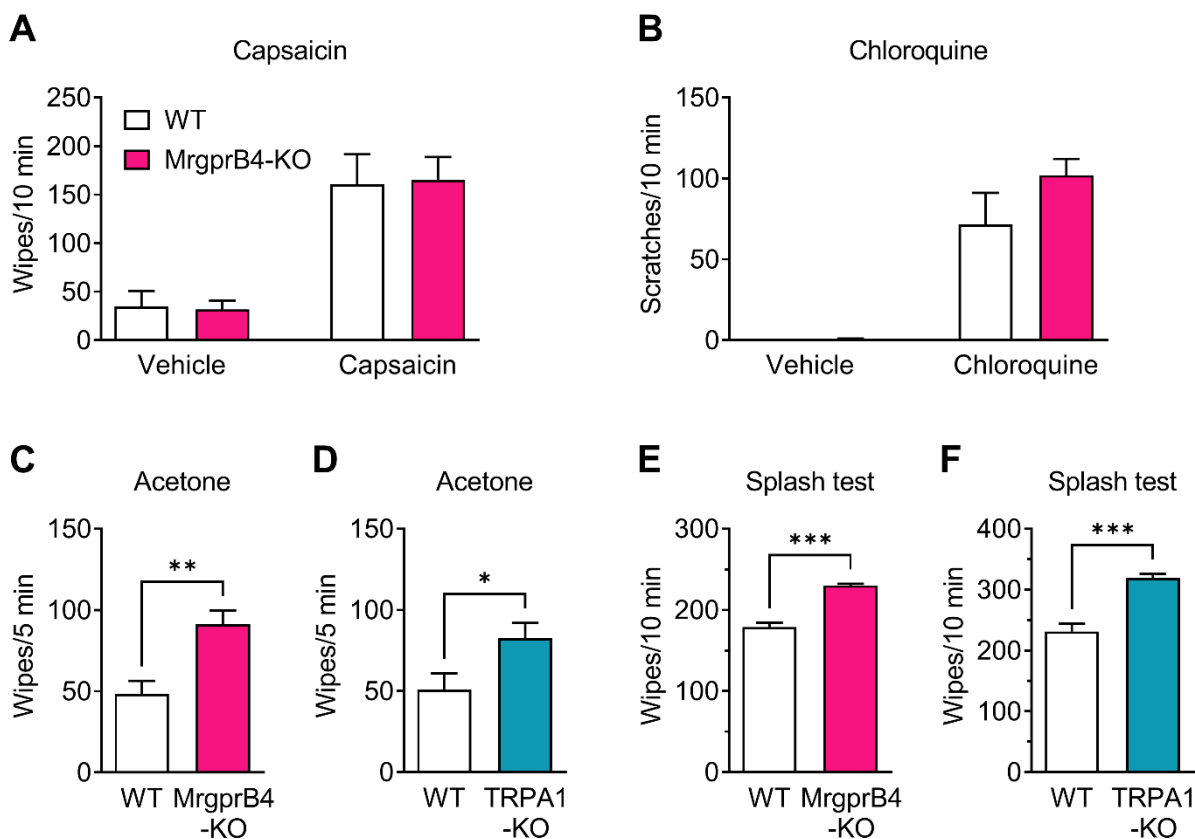


図 1-4. 有毛部である頬部における侵害刺激および不快な感覚刺激に対する反応性

(A, B) マウス頬部にカプサイシン (A; 10 μ g; $n = 5-6$) またはクロロキン (B; 100 μ g; $n = 4-7$) を皮下投与し、それぞれ 10 分間または 40 分間、wiping 行動または scratching 行動の回数を測定した。(C, D) WT マウスと MrgprB4-KO マウス (C; $n = 10$) または TRPA1-KO マウス (D; $n = 7-8$) の頬部にアセトン (約 30 μ L) を塗布し、5 分間の wiping 行動回数を測定した。(E, F) WT および MrgprB4-KO (E; $n = 4-5$) または TRPA1-KO (F; $n = 6$) マウスの頬部に 10% スクロース溶液をスプレーで噴霧し、10 分間の wiping 行動回数を測定した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

り、TG 感覚ニューロンのごく一部が MrgprB4 陽性かつ TRPA1 陽性であるが TRPV1 は陰性であることを示している。これまでに TRPA1/TRPV1 陽性ニューロンの研究は数多く行われてきたが、TRPA1 陽性かつ TRPV1 陰性であるニューロンの特性については明らかではなかった。また、本章では TRPA1 アゴニストおよび Ca^{2+} イメージングのみを用いて MrgprB4 陽性ニューロンにおける TRPA1 の機能的発現を評価しているため、MrgprB4 陽性ニューロンにおいて TRPA1 が機能的に発現するどうかを詳細に解析するためにはさらなる研究が必要である。

本章では、MrgprB4-KO マウスと TRPA1-KO マウスはともに、頬部アセトン塗布による wiping 行動回数の増加を示すことを明らかにした。しかし、アセトン塗布に対する反応性の増大は冷刺激に対する感受性の亢進 (冷過敏) とも解釈されうる。TRPA1 欠損は寒冷刺激に対する感受性を変化させないが (8-11)、一方で TRPA1-KO マウスは温暖環境への嗜好性が高く (35, 36)、寒冷環境に対する感受性が亢進している可能性がある。しかし本章においては、TRPA1-KO マウスでは無毛部である足底部へのアセトン塗布に対する反応性の亢進は認められなかったことから、有毛部である頬部へのアセトン塗布に対する反応性の亢進は冷過敏が原因ではないと考えられる。MrgprB4 および TRPA1 を発現する TG ニューロンは有毛部である頬部を神経支配しており、MrgprB4 陽性一次感覚神経の刺激は心地よい感覚を生じることが示唆されている (18) ことを踏まえると、MrgprB4-KO マウスや TRPA1-KO マウスでは頬部へのアセトン塗布により誘発される不快感覚が wiping 行動によっ

て緩和されにくくなっており、結果として wiping 行動の回数が増加している可能性がある。同様に、冷刺激ではなく粘着性により不快感覚を誘発すると考えられるスクロース溶液噴霧においても wiping 行動回数の増加が観察された。これらの結果は、wiping 行動のような動的な触覚刺激によって活性化された MrgprB4 陽性一次感覚神経により伝達される快い感覚が有毛部における不快な感覚を制御している可能性がある仮説を支持するものである。しかし、MrgprB4 はリガンドが未知のオーファン受容体であるため、どのような入力 MrgprB4 を刺激し活性化するのかについてはさらなる研究が必要である。

一方、MrgprB4 はカプサイシンによる化学刺激や、熱刺激、MrgprB4 陽性ニューロンが神経支配しない足底部に対する冷刺激などの侵害刺激感受性には寄与しないことが明らかになった。これは既報 (18, 37) の結果と一致している。MrgprB4 の欠損が頬部カプサイシン投与により誘発される疼痛様行動に影響しなかったことと、MrgprB4 陽性ニューロンがカプサイシン処置に対して応答しなかったことから、MrgprB4 欠損による不快な感覚の増強は TRPV1 陽性侵害受容線維の刺激により誘発される痛みの感覚には影響しないと考えられる。同様に、MrgprB4 欠損による不快な感覚の増強はクロロキンにより誘発される搔痒様行動に影響しないことを示唆している。クロロキンは、MrgprA3 を介して TRPA1 を活性化することにより急性の強い痒みを誘発する (15) ため、MrgprB4 欠損による不快な感覚の増強により誘発される行動変化が、クロロキンにより誘発される強い痒みによる行動変化でマスクされている可能性がある。

結論として、本章での研究により有毛部を神経支配する MrgprB4 陽性一次感覚神経の多くが TRPA1 を発現し、MrgprB4 は TRPA1 と協調的に機能して有毛部の不快な感覚を制御している可能性があることを示した。本研究成果は、快感と不快感の関係について新たな知見を与えるとともに、侵害受容センサーとしての役割が主に研究されてきた TRPA1 の感覚機能に対する生理学的役割を再考する機会になりうると考えられる。

第2章 神経障害性疼痛における脊髄後角神経 TRPC3 の 病態生理学的役割

「痛み」という感覚は生体が組織の損傷を防ぐための警告システムとしての役割を担っている (38)。しかし、慢性疼痛の病態下では組織の損傷がないにもかかわらず耐え難いほどの異常な疼痛が長期的に持続するため、患者の QOL を著しく損なう。神経障害性疼痛は慢性疼痛の一つであり、主に末梢感覚神経の損傷により発症する (39)。神経障害性疼痛の病態形成においては末梢および中枢における体性感覚神経系の感作が重要な役割を担っている。末梢神経感作は神経損傷部位に対してマクロファージ、好中球、マスト細胞といった末梢免疫細胞が浸潤・活性化することにより惹起される (40)。一方、中枢神経感作は脊髄におけるアストロサイト (41) およびミクログリア (42) 等のグリア細胞が活性化することにより惹起される。これらのプロセスにより侵害刺激に対する応答の増大および長期化が起こるだけでなく、通常であれば痛みを惹起しないような弱い刺激 (例：触覚刺激) に対して痛みを感じるアロディニアという症状が形成されることがこれまでの研究で明らかにされてきた (43, 44)。

TRP canonical 3 (TRPC3) は Ca^{2+} 透過性非選択的カチオンチャネルであり (45, 46)、一次感覚神経に機能的に発現しており侵害刺激に対する応答に関与する可能性があることが報告されている (47, 48)。また、TRPC3 はマクロファージ (49, 50) や T 細胞 (51) などの末梢免疫細胞において発現し増殖・活性化に関与する。TRPC3 は脊髄後角において発現しており (52)、*in vitro* では初代培養脊髄後角ニューロン (53) やアストロサイト (54) で発現する。また、アストロサイトに発現する TRPC3 は *in vitro* と *in vivo* の両方で神経炎症応答に関与することが示唆されている (55, 56)。さらに近年、ヒトを対象とした臨床研究において、TRPC3 遺伝子座のイントロン部分に存在する一塩基多型 (SNP) が慢性疼痛の発症と相関していることが報告されており (57)、TRPC3 を介した分子機構の解明が、神経障害性疼痛に対する治療薬創出に有望なアプローチとなりうる。

Gq タンパク質共役型受容体 (GPCR) は一次感覚神経の侵害受容線維 (58, 59) および脊髄 (60) における痛み情報の伝達に重要な役割を果たしている。TRPC3 は Gq の下流でホスホリパーゼ C (PLC) の活性化によって産生されるジアシルグリセロール (DAG) により直接活性化される。TRPC3 はサブスタンス P (54)、アデノシン三リン酸 (ATP)、プロテアーゼ (61)、エンドセリン-1、ブラジキニン (62) といった Gq 共役型受容体を介して痛みを惹起する物質のシグナリングに関与していることから、TRPC3 が Gq 共役型受容体を介して疼痛制御に関与する可能性がある。

本章では末梢神経損傷後の神経障害性疼痛に対する TRPC3 の病態生理学的役割の解明を目的として検討を行い、脊髄後角において TRPC3 がニューロンに発現しており、TRPC3 の欠損により神経障害性疼痛の発症が抑制されることを明らかにした。さらに、脊髄 TRPC3 の活性化により機械痛覚過敏が惹起されることと、TRPC3 が脊髄レベルでの Gq-PLC 経路を介した疼痛シグナリングに関与することを見出した。本成果は末梢神経損傷後の神経障害性疼痛および PLC の活性化により誘発される機械痛覚過敏の形成に対する脊髄 TRPC3 の関与メカニズムを初めて明らかにしたものである。

実験方法

動物実験

すべての動物実験は、第 1 章と同様に京都大学動物実験委員会および日本薬理学会の倫理指針に従って実施された。すべての動物実験および研究計画は、京都大学動物実験委員会の承認を得た (承認番号: 19-38, 19-39)。C57BL/6J マウスおよび C57BL/6-Tg (CAG-EGFP)10sb/J マウス (GFP マウス) は日本 SLC から購入した。TRPC3-KO マウスおよび TRPC6-KO マウスは Prof. Lutz Birnbaumer (National Institute of Environmental Health Sciences) および西田基宏 教授 (九州大学) より供与していただいた。B6.Cg-Tg (Gfap-cre) 77.6Mvs/2J マウス (Gfap^{cre} マウス) は The Jackson Laboratory から購入した。これらの遺伝子改変マウスについては表現型に対するバックグラウンドの影響を排除するために、C57BL/6J マウスと 10 世代にわたって戻し交配を行った。すべてのマウスは、12 時間の明暗サイクル下で $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の一定の周囲温度で飼育され、水と飼料を自由に摂取させた。実験には 8–12 週齢、体重 20–30 g の雄性マウス、および体重 18–22 g の雌性マウスを使用した。文中で明記されているものを除き、実験には雄性マウスを使用した。使用動物数は経験的に決定したものであり、過去の報告 (63-65) と同程度であった。

行動実験

機械刺激感受性は既報 (63, 66) にわずかに修正を加え、von Frey フィラメントを用いて後肢の逃避閾値を測定することにより評価した。測定前にマウスを金網の床に小型の箱を置いた装置に入れて 1 時間以上馴化させた。馴化後、7 種類の von Frey フィラメント (0.008、0.02、0.04、0.07、0.16、0.4、1.0 g; Stoelting) セットを使用して、フィラメントを数秒間わずかに曲がるまで後肢足底部に押し付けることで機械刺激感受性を評価した。すべての実験において、初めに 0.16 g のフィラメントを用いて測定を開始した。マウスが足を振る、持ち上げるなどの逃避反応を示した場合は、次に低い値のフィラメントを使用して同様に測定した。マウスが逃避反応を示さなかった場合は、次に高い値のフィラメントを使用して同様に測定した。まず逃避反応の有無が変化するまで測定を行い、逃避反応の有無が変化した後にさらに 4 回測定を行い、逃避閾値を計算した (66, 67)。

熱刺激感受性は既報 (63, 68) にわずかに修正を加え、Hargreaves 輻射熱装置 (IITC Life Science) を使用して評価した。測定前にマウスをガラスの床に小型の箱を置いた装置に入れて 1 時間以上馴化させた。馴化後、装置から照射される光をマウスの後肢足底部の中央付近に当て、後肢の逃避反応が起こるまでの潜時を記録した。照射光の強さは、naïve マウスを用いた際の平均逃避潜時が 9–11 秒程度になるように調整した。組織の損傷を防ぐため、カットオフ時間は 15 秒に設定した。5 分間隔で 3 回測定を行い、逃避潜時を算出した。

侵害性の熱刺激に対する反応性は、ホットプレート痛覚測定装置 (Ugo Basile) を使用して評価した。測定前にマウスを 1 時間以上装置に馴化させた。馴化後、 52°C または 55°C に設定されたホットプレートの中央にマウスを 1 匹ずつ入れ、ジャンプ・後肢を舐める・後肢を振るなどの逃避反応が認められるまでの潜時を測定した。測定後、マウスはすぐにホットプレートから回収され、ケー

ジに戻された。組織の損傷を防ぐため、カットオフ時間は 30 秒に設定された。

化学刺激感受性は既報 (69-71) にわずかに修正を加え、カプサイシンまたはアリルイソチオシアネート (AITC) の足底内投与により評価した。コーンオイルを溶媒としてカプサイシン溶液 (80 $\mu\text{g/mL}$ 、ナカライテスク) および AITC 溶液 (0.2%、ナカライテスク) を調製した。測定前にマウスをアクリル筒 (直径 25 cm、高さ 30 cm) の中で 1 匹ずつ 1 時間以上馴化させた。馴化後、10 μL のカプサイシン溶液 (0.8 $\mu\text{g/匹}$) または 0.2% AITC 溶液を右後肢の足底内に注入し、その後 10 分間の後肢を舐める・噛む行動の合計時間を記録した。

坐骨神経部分結紮 (partial sciatic nerve ligation; pSNL) モデルの作製

pSNL 処置は既報 (63, 72) にわずかに修正を加えて実施した。マウスを三種混合麻酔液 (メドミジン 0.3 mg/kg; 日本全薬工業、ミダゾラム 4.0 mg/kg; 富士製薬工業、ブトルファノール 5.0 mg/kg; Meiji Seika ファルマ) 腹腔内投与で麻酔させたのち大腿部の皮膚を約 5 mm 切開し、大腿二頭筋と半腱様筋が分岐する部位のすぐ遠位で右坐骨神経を露出させた。右坐骨神経の直径の約 1/3–1/2 を 9-0 絹糸 (河野製作所) で結紮し、筋肉および皮膚の層を縫合した。

脊髄神経切断 (spinal nerve transection; SNT) モデルの作製

SNT 処置は既報 (63, 73) にわずかに修正を加えて実施した。マウスを三種混合麻酔液で麻酔させたのち第 3 腰椎 (L3) から第 6 腰椎 (L6) に沿って皮膚を約 1.5 cm 切開した。左傍脊柱筋を上関節突起および横突起から分離し、L3 および L4 脊髄神経を露出させた。L3 脊髄神経を損傷させないように注意しつつ L4 脊髄神経を切断し、筋肉と皮膚の層を縫合して傷を閉じた。

骨髄キメラマウスの作製

TRPC3-KO マウスを GFP マウスと交配して、GFP^{+/+}; TRPC3^{+/+} マウスを作製した。その後、GFP^{+/+} TRPC3^{+/+} マウス同士を交配することで GFP^{+/+} TRPC3^{+/+} (WT-GFP) および GFP^{+/+} TRPC3^{-/-} (TRPC3-KO-GFP) マウスを作製し、これらをドナーマウスとした。骨髄移植は既報 (74) にわずかに修正を加えて実施した。レシピエントマウスには 5–6 週齢の雄性 C57BL/6J マウスまたは TRPC3-KO マウスを使用し、全身に放射線 (8 Gy, 10 分間) を照射して骨髄細胞を除去した。ドナーマウスである WT-GFP マウスまたは TRPC3-KO-GFP マウスを断頭により安楽死させ、大腿骨を単離して両端を切断しチューブに入れた。大腿骨を 400 $\times$ g で 10 分間遠心し、GFP⁺ 骨髄細胞のペレットを滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で懸濁してドナーマウス由来骨髄細胞液を調製した。レシピエントマウスに放射線を照射した 3–5 時間後に、尾静脈または眼窩静脈叢から 3.0×10^6 個のドナーマウス由来骨髄細胞を静脈内注射した。WT レシピエントマウスには、WT-GFP ドナーマウス由来骨髄細胞 (WT^{WT-BM}) または TRPC3-KO-GFP ドナーマウス由来骨髄細胞 (WT^{TRPC3-KO-BM}) を投与した。TRPC3-KO レシピエントマウスには、WT-GFP ドナーマウス由来骨髄細胞 (TRPC3-KO^{WT-BM}) を投与した。その後、オートクレーブ滅菌した水と飼料を自由に摂取可能な状態で specific pathogen free 環境で飼育し、骨髄移植 5–6 週間後 (12 週齢) に行動実験に使用した。

フローサイトメトリー

骨髄キメラマウスの血液中の GFP⁺細胞の割合を評価するため、既報 (75) にわずかに修正を加えてフローサイトメトリーによる分析を行った。骨髄移植の 5–6 週間後に、各骨髄キメラマウスの眼窩静脈叢から末梢血 (約 100 μ L) を採取した。次に、血液を 300 μ L の 3 倍希釈生理食塩水に約 10 秒間溶解して赤血球を溶血させ、1 mL の生理食塩水を加えて浸透圧を戻し、溶液を遠心分離 (2,000 $\times$ g、5 分間、室温) した。上清を除去した後、細胞を 1000 μ L の生理食塩水で洗浄し、遠心分離 (2,000 $\times$ g、5 分間、室温) した。再び上清を除去し、細胞を 1 mL の Fluorescence activated cell sorter (FACS) バッファー (0.02 M EDTA および 0.01% ウシ血清アルブミンを含む PBS) に再懸濁した。細胞は、細胞内固定/透過処理バッファーセット (Invitrogen) を使用して固定および透過処理し、アロフィコシアニン標識ラット抗 GFP 抗体 (Cat No. 338009, BioLegend) を用いて 4°C で 20 分間染色した。遠心分離 (350 $\times$ g、5 分、4°C) および上清除去後、細胞を 500 μ L の FACS バッファーに再懸濁した。GFP⁺細胞の割合は、セルソーター (SH800S, Sony Biotechnology) を使用して評価した。

定量的 RT-PCR

マウスの脊髄後角 (L3–L5) または L4 DRG から ISOGEN 試薬 (Nippon Gene) を用いてメーカープロトコルに従って RNA を抽出した。次に、脊髄後角由来 RNA 500 ng および L4 DRG 由来 RNA 1000 ng と ReverTra Ace® (Toyobo) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。定量的 RT-PCR は、StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies) を用いて実施した。最終反応容量は 10 μ L (12.5 ng cDNA + THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix, Toyobo) とした。PCR 条件は、95°C 10 分間のインキュベーション後、PCR サイクル (95°C 15 秒間、59°C 30 秒間、72°C 30 秒間) $\times$ 40 サイクルとした。実験で使用したオリゴヌクレオチドプライマーは表 2-1 に記載した。サンプル中の 18S rRNA の量を使用して、mRNA 含有量を正規化した (mRNA レベルは各実験における対照群の mRNA レベルと比較して表した)。

表 2-1. 定量的 RT-PCR で用いたオリゴヌクレオチドプライマーの配列

Target	Fw (5'–3')	Rv (5'–3')
<i>Trpc3</i>	GGGTGAAGACCACCCAGTTC	ACAGCTCCTTGCACTCAGAC
<i>Trpc6</i>	GCAGCTGTTTCAGGATGAAAAC	TTCAGCCCATATCATGCCTA
<i>Trpc7</i>	GTGAACTAAGCCCGTGGA	ATAAGAAGGGACTCAGGGGCA
<i>Tnfa</i>	TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC	GAGGCCATTTGGGAACCTTCT
<i>Il1b</i>	TGAGCACCTTCTTTTCCTTCA	TTGTCTAATGGGAACGTCACAC
<i>Il6</i>	GTGGCTAAGGACCAAGACCA	TAACGCACTAGGTTTGCCGA
<i>Atf3</i>	GCTGGAGTCAGTTACCGTCAA	CGCCTCCTTTTCCTCTCAT
18s rRNA	GCAATTATTCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA

In situ ハイブリダイゼーション (RNAscope)

In situ ハイブリダイゼーションは、既報 (76) にわずかに修正を加えて RNAscope を用いて実施した。マウスを断頭により安楽死させ、腰髄および L4 DRG を単離し、液体窒素で瞬間凍結した。組織は O.C.T. Compound (Tissue-Tek) に包埋し、クリオスタット (Leica Biosystems) を使用して 20 μ m

厚の新鮮凍結組織切片を作製した。RNAscope 染色は、RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 (Cat# 323110; Advanced Cell Diagnostics) および Probe-Mm-Trpc3-O3 (Cat# 572151; Advanced Cell Diagnostics) をメーカープロトコルに従って使用し実施した。RNAscope シグナルは、TSA Plus Fluorescein (Cat# NEL741001KT; Akoya Biosciences) を使用して可視化した。一部の実験では、RNAscope 染色の後に免疫組織化学染色を行った。蛍光画像は、FluoView FV10i 共焦点顕微鏡 (Olympus) を使用して各個体 3 セクション以上撮影した。5 つ以上のアンプリコンが認められる細胞を *Trpc3* mRNA 陽性であると判断した。

免疫組織化学染色

免疫組織化学染色は既報 (64) にわずかに修正を加えて実施した。マウスを三種混合麻酔薬で麻酔したのち、 K^+ 不含 0.1 M PBS を用いて経心灌流により脱血し、4% PFA を含む 0.1 M PB を灌流して固定した。腰髄 (L3–L5) または L4 DRG を採取したのち 4% PFA 固定液中で 3 時間保存した後、15% スクロースを含む 0.1 M PB 溶液中で 4°C で一晩以上静置した。組織は O.C.T. Compound (Tissue-Tek) に包埋し、クリオスタット (Leica Biosystems) を使用して 20 μ m 厚の固定凍結組織切片を作製した。3% ウシ血清アルブミンおよび 0.1% Triton X-100 を添加した PBS で切片を 40–60 分間ブロッキングした後、ウサギ抗 Iba1 (1:500; Cat No. 019-19741; 和光純薬)、ウサギ抗 GFAP (1:5000; Cat No. ab7260; Abcam)、マウス抗 NeuN (1:200; Cat No. MAB377B; Chemicon)、ウサギ抗 NeuN (1:200; Cat No. bs-1613R; Bioss)、およびウサギ抗 TMEM119 (1:250; Cat No. ab209064; Abcam) の各一次抗体を処置し 4°C で一晩インキュベートした。次に、切片に Alexa Fluor 標識ロバ抗ウサギ IgG (488; Cat No. A21206 または 594; Cat No. A21207) および抗マウス IgG (594; Cat No. A21203) (1:300; Invitrogen) 二次抗体を処置し、暗所で 1.5 時間室温にて静置した。細胞数の確認のため、細胞核を 4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates) で染色した。蛍光画像は、FluoView FV10i 共焦点顕微鏡 (Olympus) または BZ-X710 蛍光顕微鏡 (Keyence) を使用して各個体 3 セクション以上撮影した。脊髄後角における GFAP または Iba1 免疫反応性シグナルの強度を、ImageJ ソフトウェア (米国国立衛生研究所) を使用して 0.0450 mm² の視野内で定量した。

プラスミドベクターの構築

pAAV-CMV-DIO-EmGFP-miRNA-backbone は、pAAV-CMV-EmGFP-miRNA (77) 由来の EmGFP-miRNA フラグメントと pAAV-eF1 α -DIO-ChR2-mCherry (78) から得られた loxP/lox2272 フラグメントを、pAAV-CMV-EmGFP-miRNA 由来の AAV 骨格にライゲーションして作製した。

ネガティブコントロール (NC) miRNA 配列は、pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-neg Control (Invitrogen) を基に設計し、*Trpc3* (NM_019510.3) を標的とする miRNA 配列は、BLOCK-iTTM RNAi Designer (<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/>) を使用して設計した。miRNA 標的配列は表 2-2 に記載した。オリゴデオキシヌクレオチドプライマーは、Sigma-Aldrich から購入した。センス鎖とアンチセンス鎖をハイブリダイズし、BsaI で制限酵素処理した pAAV-CMV-EmGFP-miRNA-backbone、pAAV-CMV-DIO-EmGFP-miRNA-backbone、または pAAV-hSyn-mCherry-miRNA-backbone (79) にライゲーションした。

pCAG-*Trpc3* は、マウス腰髄由来 cDNA から *Trpc3* CDS フラグメントを PCR で増幅し、pCAG-

EGxxFP (Addgene) 骨格とライゲーションして作製した。

表 2-2. TRPC3 ノックダウン (KD) で用いた miRNA の標的配列

Name	Sequence (5'–3')
Negative control (NC)	GTCTCCACGCGCAGTACATTT
<i>Trpc3</i> #1	GGAGGTGGAAGCCATTCTGAA
<i>Trpc3</i> #2	TATCAAGTGTCTGGTCGTGTT
<i>Trpc3</i> #3	GTTGTGGAATGTGCTTGATTT

KD 効率の確認

KD 効率は定量的 RT-PCR によって評価した。まず、Lenti-X 293T 細胞 (Clontech) を 24 well プレートに播種し、細胞占有面積率が 50–60%になるまで増殖させた。TRPC3 過剰発現プラスミド (pCAG-*Trpc3*) 0.2 µg、KD プラスミド (pAAV-CMV-EmGFP-miRNA-NC、pAAV-CMV-EmGFP-miRNA-*Trpc3* #1、#2、#3 のいずれか) 0.6 µg、および lipofectamine 2000 (Thermo Fischer Scientific) 1.6 µL を 100 µL のダルベッコ改変イーグル培地に加えて 20 分間インキュベートした。このプラスミド溶液を細胞に処置し、37°C で 6 時間インキュベートした。その後培地を交換し、細胞を 37°C で 18–24 時間インキュベートし、メーカープロトコルに従って ISOGEN 試薬 (ニッポンジーン) を用いて全 RNA を単離し、定量的 RT-PCR を実施した。

AAV ベクターの精製

Lenti-X 293T 細胞 (Clontech) にポリエチレンイミン (“Max”, Polysciences) を使用して作製したプラスミドベクター、pHelper (Cell Biolabs)、pAAVDJ (Cell Biolabs) または pAAV6 (Cell Biolabs) をトランスフェクションした。60–72 時間インキュベートした後、細胞を回収し、4 回の凍結融解処理により細胞膜を破壊した。その後 DNA と RNA をベンゾナーゼヌクレアーゼ (Cat# E1014, Sigma-Aldrich) により除去して溶解液を得た。溶解液を 45°C で 15 分間インキュベートした後に 14,000 × g で 10 分間遠心し上清の AAV 溶液を採取した。AAV の力価は、表 2-3 に記載した。

表 2-3. TRPC3 KD で用いた AAV の力価

Name	Titer (genome copies/mL)
AAVDJ-CMV-EmGFP-miRNA-NC	4.04×10^{12}
AAVDJ-CMV-EmGFP-miRNA- <i>Trpc3</i>	4.75×10^{12}
AAVDJ-hSyn-mCherry-miRNA-NC	16.7×10^{12}
AAVDJ-hSyn-mCherry-miRNA- <i>Trpc3</i>	42.5×10^{12}
AAVDJ-CMV-DIO-EmGFP-miRNA- <i>Trpc3</i>	19.0×10^{12}
AAV6-hSyn-mCherry-miRNA-NC	2.70×10^{12}
AAV6-hSyn-mCherry-miRNA- <i>Trpc3</i>	1.17×10^{12}

AAV の注入

AAV の脊髄内注入は、既報 (80) にわずかに修正を加えて実施した。マウスを三種混合麻酔により麻酔し、第 12 胸椎 (Th12)–L3 に沿って約 1.5 cm 皮膚を切開した。Th13–L1 の椎骨間の空間に存

在する傍脊柱筋を除去し、30G 針を使用して硬膜とクモ膜を慎重に切開し小さな注入窓を作製した。AAVDJ 溶液を充填したガラス製マイクロピペットを脊髄後角 (正中線から右外側に 500 μm 、脊髄後角の表面から深さ 200 μm) に挿入し、自作のポンプを使用して溶液を約 500 nL 注入した。マイクロピペットを抜去後、皮膚を縫合した。

AAV の坐骨神経内注入は、既報 (81) にわずかに修正を加えて実施した。マウスを三種混合麻酔により麻酔し、pSNL 処置と同様の手順で右坐骨神経を露出させた。AAV6 溶液を充填したガラス製マイクロピペットを坐骨神経に挿入し、自作のポンプを使用して溶液を約 1 μL 注入した。マイクロピペットを抜去後、筋肉層と皮膚層を縫合した。

GSK1702934A の投与

GSK1702934A の髄腔内投与は次のように実施した。マウスを 1.5%イソフルランで吸入麻酔し、L5-L6 椎骨間から GSK1702934A (Focus Biomolecules; 5–50 pmol/5 μL) を髄腔内投与した。対照群には、溶媒 (10% DMSO および 1% Tween80 を含む生理食塩水) を投与した。GSK1702934A (50 pmol) の髄腔内投与後、引っ掻き行動などの自発的反応は観察されなかった。機械刺激感受性を投与 1 時間後に評価し、その結果を投与後 0 日目の結果として使用した。

GSK1702934A の足底内投与は次のように実施した。測定前にマウスをアクリル筒 (直径 25 cm、高さ 30 cm) の中で 1 匹ずつ 1 時間以上馴化させた。馴化後、GSK1702934A (100 pmol) または溶媒 10 μL を右後肢の足底内に注入し、その後 10 分間の足舐め・噛み行動の合計時間を記録した。また、機械刺激感受性を投与 1 時間後に評価し、その結果を投与後 0 日目の結果として使用した。

サブスタンス P の髄腔内投与

サブスタンス P の髄腔内投与は、既報 (82) にわずかに修正を加えて実施した。マウスを 1.5%イソフルランで吸入麻酔し、サブスタンス P (1 nmol, Sigma-Aldrich) または溶媒 (0.01 M 酢酸) を 5 μL 髄腔内投与した。投与後、引っ掻き行動などの自発的反応は観察されなかった。機械刺激感受性は投与 1 時間後に von Frey テストにより評価した。

m-3M3FBS の髄腔内投与

マウスを 1.5%イソフルランで吸入麻酔し、m-3M3FBS (Sigma-Aldrich; 5–50 pmol) または溶媒 (10% DMSO および 1% Tween80 を含む生理食塩水) を 5 μL 髄腔内投与した。m-3M3FBS (50 nmol) の髄腔内投与後、引っ掻き行動などの自発的反応は観察されなかった。機械刺激感受性を投与 1 時間後に評価し、その結果を投与後 0 日目の結果として使用した。

統計解析

統計解析は Prism 10 (GraphPad Software) を使用して実施した。単一の実験群と対照群との比較には Welch の t 検定を使用した。複数の実験群間の比較には、one-way ANOVA および Tukey's post-hoc test または two-way ANOVA または two-way RM ANOVA および Bonferroni's post-hoc test または Dunnett's post-hoc test を適宜使用した。危険率 5%未満の場合には、統計的に有意な差であると判定した。データは平均 $\pm$ 標準誤差として示した。各データポイントは、1 匹のマウスまたは 1 well の

細胞から得た 1 つのサンプル (特定の組織からの切片または抽出物など) を表す。各実験のサンプルサイズは、図の凡例に記載した。すべての実験において、実験条件について盲検化された状態で評価を行った。

実験結果

pSNL 処置後の疼痛様行動への TRPC3 欠損の影響

はじめに生理的条件下での感覚機能における TRPC3 の関与を検討するため、naïve WT マウスと TRPC3-KO マウスを使用して行動実験を実施した。TRPC3-KO マウスは、WT マウスと比較して正常な機械刺激感受性および熱刺激感受性を示した (図 2-1A-C)。さらに、化学刺激に対する感受性を評価するためにカプサイシンまたはアリルイソチオシアネート (AITC) の足底内投与を行ったところ、TRPC3 の欠損はカプサイシンまたは AITC の足底内投与によって誘発される自発痛様行動に影響を与えなかった (図 2-2A-C)。これらの結果から TRPC3-KO マウスは正常な感覚機能を有していることが示唆された。

次に TRPC3 が末梢神経損傷後の神経障害性疼痛の発症に必要などうかを明らかにするため、WT マウスおよび TRPC3-KO マウスに神経障害性疼痛モデルである pSNL 処置 (72) を行い、その後の疼痛様行動を評価した (図 2-1D)。pSNL 処置後の機械刺激感受性を von Frey テストにより評価したところ、WT マウスは pSNL 処置 3 日後から機械痛覚過敏を発症したが、TRPC3-KO マウスでは機械痛覚過敏が軽減された (図 2-1E, 2-3A)。同様に熱刺激感受性を Hargreaves テストにより評価したところ、WT マウスは pSNL 処置 3 日後に熱痛覚過敏が観察されたのに対し、TRPC3 の欠損により熱痛覚過敏が軽減された (図 2-1F, 2-3B)。

近年の研究により神経障害性疼痛を制御するいくつかの重要なメカニズムには性差が存在することが明らかになっている (83-85)。そのため、雌性マウスにおける pSNL 処置後の疼痛様行動に TRPC3 が必要であるかを検討した。雄性マウスと同様に、pSNL 処置後の雌性 TRPC3-KO マウスにおいても機械痛覚過敏が軽減された (図 2-3C, D)。さらに、TRPC3 の欠損は別の神経障害性疼痛モデルである SNT モデル (73) においても、pSNL モデルと同様に機械痛覚過敏を抑制した (図 2-3E, F)。

TRPC チャンネルファミリーのメンバーである TRPC6 は、TRPC3 と共役して機能的なヘテロ四量体を形成する (86)。以前の研究により TRPC6 は神経障害性疼痛に関与することが示唆されているため (87-89)、神経障害性疼痛の発症に対する TRPC6 の関与を TRPC6-KO マウスを用いて検討した。しかし、TRPC6 の欠損は pSNL 処置後の機械痛覚過敏および熱痛覚過敏に影響を与えなかった (図 2-1E, F)。これらの結果は、TRPC3 が末梢神経損傷後の神経障害性疼痛の発症に重要な役割を果たしているのに対し、TRPC6 は神経障害性疼痛の発症にほとんど影響しないことを示唆するものであった。

pSNL 処置後のグリア細胞の活性化および炎症性サイトカイン産生への TRPC3 欠損の影響

神経障害性疼痛の病態形成において脊髄グリア細胞の活性化が重要な役割を果たすことが明らかになっているため (41, 42)、免疫染色により脊髄グリア細胞の活性化を評価した。WT マウスと TRPC3-KO マウスの間では、pSNL 処置後の脊髄ミクログリアの活性化に有意な差は認められなかった (図 2-4A, B)。しかし、TRPC3-KO マウスではミクログリアの活性化のわずかな遅れが観察され

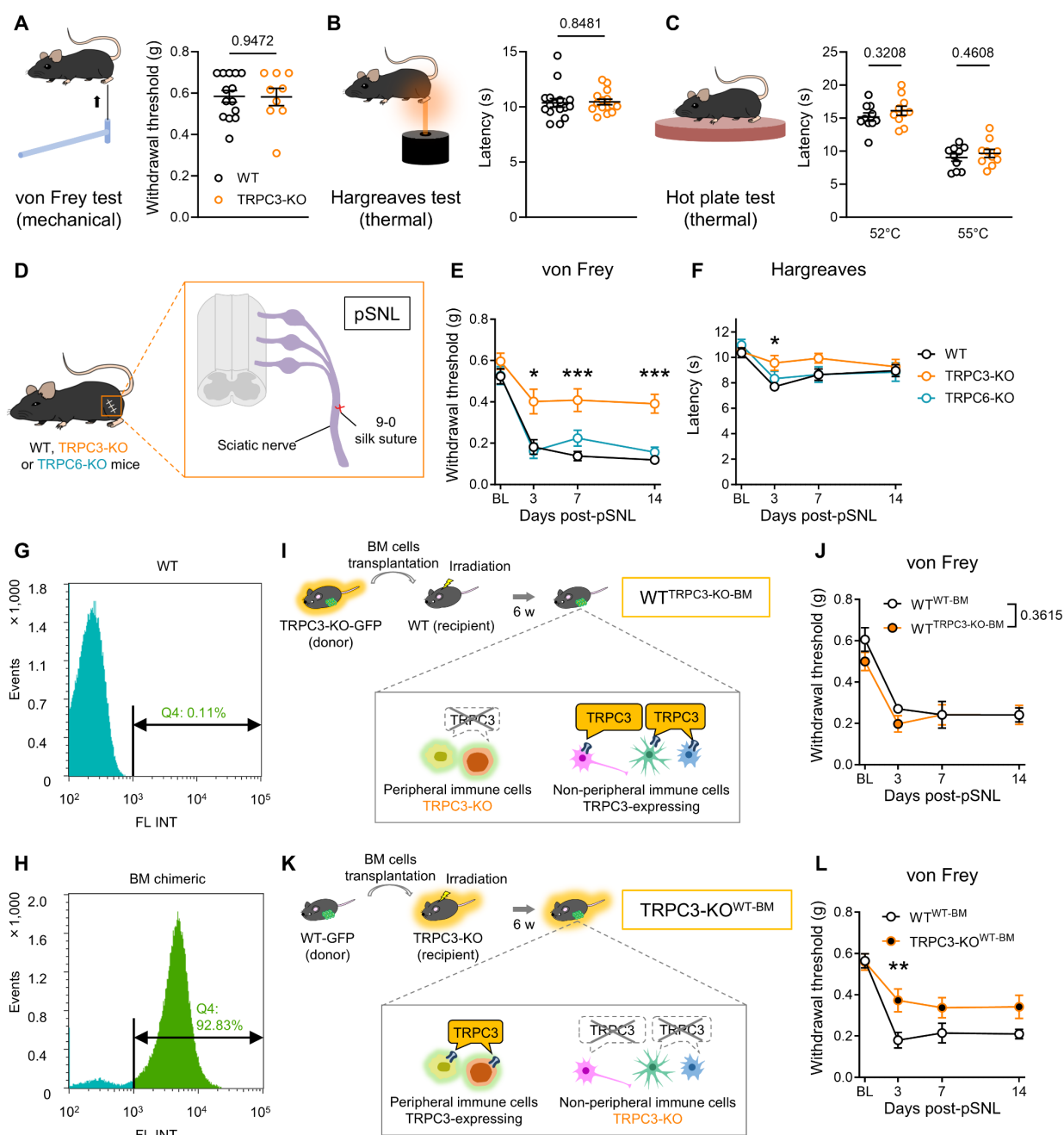


図 2-1. TRPC3 欠損は神経障害性疼痛の発症を抑制するが、末梢免疫細胞 TRPC3 は関与しない

(A-C) (左) von Frey (A)、Hargreaves (B)、ホットプレート (C) テストの模式図。(右) naïve WT マウスおよび TRPC3-KO マウスにおける機械刺激感受性 (A)、熱刺激感受性 (B)、有害な熱刺激に対する反応 (C)。(D) pSNL 処置の模式図。(E, F) WT、TRPC3-KO、TRPC6-KO マウスにおける pSNL 処置後の傷害側後肢の機械刺激感受性 (E) および熱刺激感受性 (F)。(G, H) WT (G) または骨髄キメラ (H) マウスの血液細胞におけるフローサイトメトリーヒストグラムの代表例。(I, K) 骨髄キメラマウス作製の模式図。TRPC3-KO-GFP (ドナー) マウスの骨髄細胞を WT マウス (レシピエント) に移植して、WT^{TRPC3-KO-BM} キメラマウス (I) を作製した。WT-GFP マウス (ドナー) の骨髄細胞を TRPC3-KO マウス (レシピエント) に移植して、TRPC3-KO^{WT-BM} マウス (K) を作製した。対照群となる骨髄キメラマウス (WT^{WT-BM}) は、WT-GFP マウス (ドナー) の骨髄細胞を WT マウス (レシピエント) に移植することによって作製した。(J, L) WT^{WT-BM} および WT^{TRPC3-KO-BM} (J) または TRPC3-KO^{WT-BM} マウス (L) における pSNL 処置後の傷害側後肢の機械刺激感受性。(A) $n = 9-14$, (B) $n = 15-16$, (C) $n = 10-14$, (E) $n = 10-14$, (F) $n = 11-16$, (J) $n = 6-7$, (L) $n = 12-14$. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs WT (E and F). ** $p < 0.01$ vs WT^{WT-BM} (L).

た (WT マウスでは pSNL 後 3 日目にミクログリアの活性化が観察されたのに対し、TRPC3-KO マウスでは pSNL 後 7 日目にミクログリアの活性化が観察された)。意外なことに、pSNL 処置後の脊髄後角で有意なアストロサイトマーカー GFAP に対し免疫染色を行ったところ蛍光強度の有意な

増大は観察されなかった (図 2-4C, D)。

さらに、pSNL 処置が TRPC3 の発現に影響を及ぼすか、あるいは TRPC3 欠損が疼痛形成に関わる主要な分子の発現に影響を及ぼすかどうかを定量的 RT-PCR を用いて評価した。脊髄後角 (図 2-5A) における TRPC3 発現は pSNL 処置の前後で変化しなかった (図 2-5B)。一方、L4 DRG (図 2-5F) における TRPC3 発

現は減少する傾向にあった (図 2-5G)。TRPC3 の欠損は、pSNL 処置後の DRG における神経損傷マーカー ATF3 (90) の mRNA 発現増加 (図 2-5H) や脊髄および DRG における主要な炎症性サイトカイン TNF α 、IL1 β 、IL6 の mRNA 発現増加 (図 2-5C-E, I-K) に影響しなかった。これらの結果は、TRPC3 が末梢神経損傷後の DRG または脊髄における神経炎症反応に関与していないことを示唆するものであった。

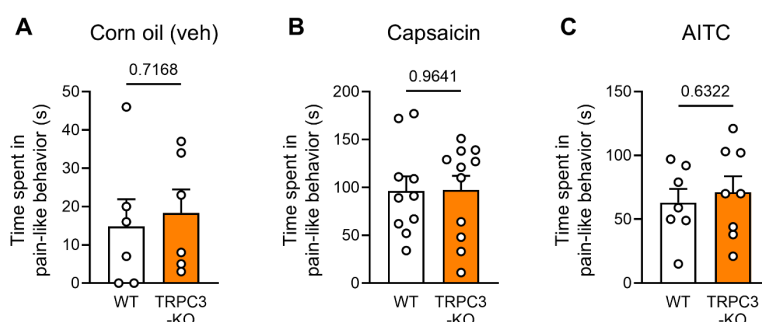


図 2-2. TRPC3 欠損が化学刺激誘発性疼痛様行動に及ぼす影響

(A-C) WT および TRPC3-KO マウスにコーンオイル (A; 溶媒)、カプサイシン (B; 0.8 μ g/匹) または 0.2% AITC 溶液 (C) を足底内投与した直後 10 分間の疼痛様行動 (足舐め・噛み) の合計時間。 (A) $n = 6$. (B) $n = 10-11$. (C) $n = 7-8$.

pSNL 処置後の疼痛様行動に対する末梢免疫細胞 TRPC3 の関与

TRPC3 は末梢および中枢性感覚に加えて末梢免疫細胞で機能的に発現している (49-51) ことを踏まえ、末梢免疫細胞に発現する TRPC3 が神経障害性疼痛の発症に寄与するかどうかを、骨髄キメラマウスを用いて検討した。フローサイトメトリーを用いた解析により、骨髄キメラマウス由来の血液細胞の 90% 以上がドナーマウス由来の GFP⁺細胞に置換されており、骨髄キメラマウスの作

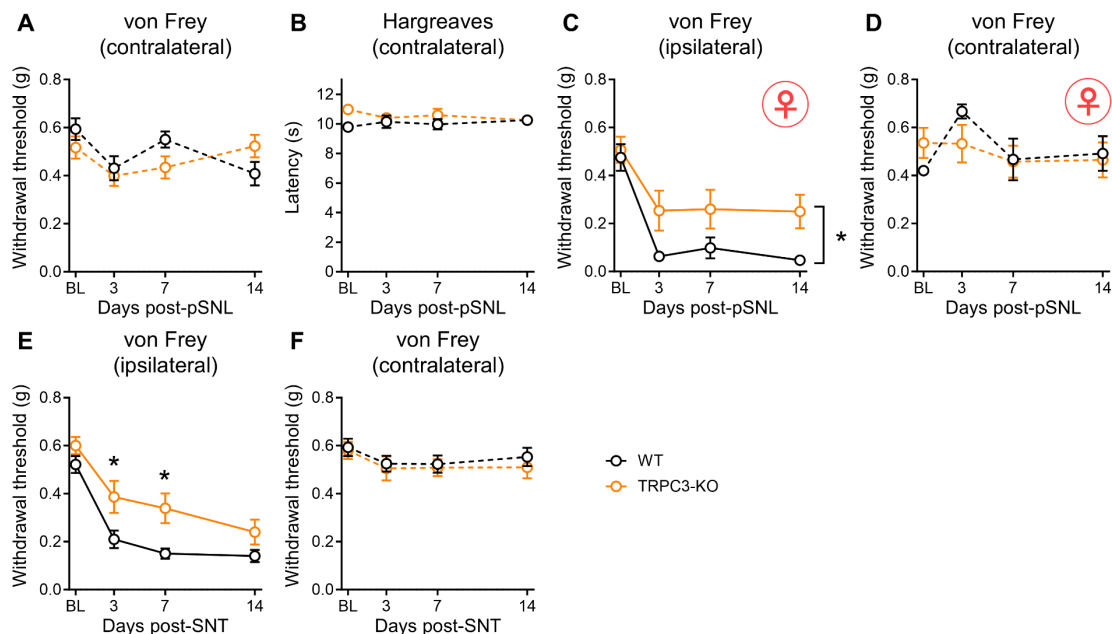


図 2-3. TRPC3 欠損が pSNL または SNT 処置後の疼痛に及ぼす影響

(A, B) WT および TRPC3-KO マウスにおける pSNL 処置後の反対側後肢の機械刺激 (A) および熱刺激 (B) 感受性。 (C, D) WT および TRPC3-KO 雌性マウスにおける pSNL 処置後の傷害側 (C) または反対側 (D) 後肢の機械刺激感受性。 (E, F) WT および TRPC3-KO マウスにおける SNT 処置後の傷害側 (E) および反対側 (F) 後肢の機械刺激感受性。 (A) $n = 13-14$. (B) $n = 15-16$. (C, D) $n = 5-7$. (E, F) $n = 13$ mice. * $p < 0.05$ (C). * $p < 0.05$ vs WT (E).

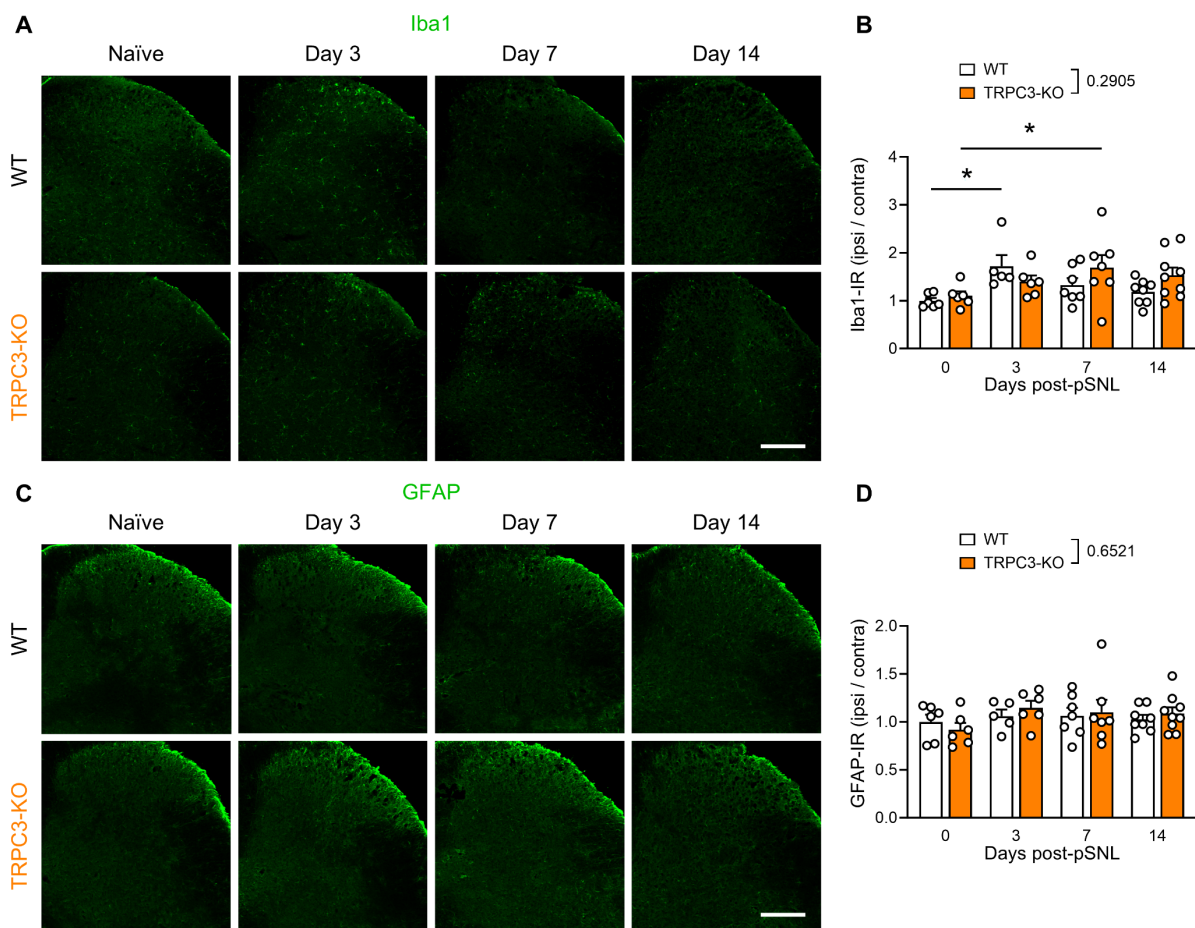


図 2-4. pSNL 処置後の脊髄グリア細胞活動性に対する TRPC3 欠損の影響

(A, B) WT および TRPC3-KO マウスでの pSNL 処置後の脊髄後角における Iba1⁺ミクログリアの代表画像 (A) および定量結果 (B)。 (C, D) WT および TRPC3-KO マウスでの pSNL 処置後の脊髄後角における GFAP⁺アストロサイトの代表画像 (C) および定量結果 (D)。 (B, D) $n = 5-9$. * $p < 0.05$ (B). Scale bars: 200 μm .

製に成功したことが確認された (図 2-1G, H)。末梢免疫細胞を含む骨髄系細胞のみで TRPC3 を欠損した骨髄キメラマウス (図 2-1I; WT^{TRPC3-KO-BM}) は pSNL 処置により対照群 (WT^{WT-BM}) と同程度に機械痛覚過敏を示した (図 2-1J, 2-6A)。対照的に、骨髄系細胞のみに TRPC3 を発現する骨髄キメラマウス (図 2-1K; TRPC3-KO^{WT-BM}) は、WT^{WT-BM} マウスと比較して pSNL 処置後の機械痛覚過敏が抑制されていた (図 2-1L, 2-6B)。これらの結果は、末梢免疫細胞 TRPC3 が神経障害性疼痛の発症に寄与しないことを示唆するものであった。

体性感覚神経系における TRPC3 の発現

TRPC3/6/7 は相同性の高い配列を有することから TRPC チャンネルファミリー内でサブグループを構成している (86)。しかし、TRPC3/6/7 の体性感覚神経系における発現は明らかではなかった。そこで、定量的 RT-PCR を用いて脊髄、DRG、坐骨神経における TRPC3/6/7 mRNA レベルを評価した。TRPC3 は脊髄においては TRPC6 の約 4 倍、DRG では約 2 倍高い発現レベルを示した (図 2-7A, B)。一方で、坐骨神経における TRPC3 の発現レベルは TRPC6 の半分以下であった (図 2-7C)。また、WT マウスと TRPC3-KO マウスの間で脊髄、DRG、坐骨神経における TRPC6/7 mRNA の発現レベルに有意差は認められなかった (図 2-8A-F)。これらの結果と pSNL 処置後の疼痛様行動が TRPC3-KO マウスでは抑制されたのに対し TRPC6-KO マウスでは抑制されなかったこと (図 2-1) を踏まえ、

TRPC3は脊髄またはDRGで機能して神経障害性疼痛の発症に寄与しているという仮説を立てた。TRPC3は一次感覚神経の非ペプチド作動性侵害受容線維で発現しており、ペプチド作動性線維、有髄線維およびサテライトグリアでは発現していないことが報告されている(91)。しかし、*in vivo*での脊髄においてTRPC3を発現する細胞種は明らかではなかった。

脊髄後角の表層(I層とII層)には一次感覚神経のうちA δ 線維とC線維が侵害性の機械刺激および熱刺激情報を伝達し、脊髄後角の深層(II-V層)にはC線維、A δ 線維およびA β 線維が非侵害性の機械刺激情報を伝達する(92)ことを踏まえ、脊髄切片においてRNAscopeを用いた*in situ*ハイブリダイゼーションを行い脊髄後角におけるTRPC3の発現を検討した(図2-7D)。TRPC3 mRNAは脊髄後角の表層と深層の両方に豊富に発現していた(図2-7E)。さらに*In situ*ハイブリダイゼーションと免疫組織化学染色の共染色を行ったところ、脊髄後角の表層と深層の両方でTRPC3 mRNAはニューロンマーカーNeuNと高い共局在を示したが(図2-7F-H)、アストロサイトマーカーGFAPとの共局在はわずかであった(図2-7I-K)。また、L4 DRGでは、TRPC3 mRNAは主にNeuN⁺小径ニューロンで発現しており(図2-9A)、この結果は以前の報告(91)と一致していた。TRPC3は初代培養脊髄後角ニューロンとアストロサイトで発現することが報告されている(53, 54)一方、ミクログリアにおけるTRPC3の発現については相反する報告が存在する

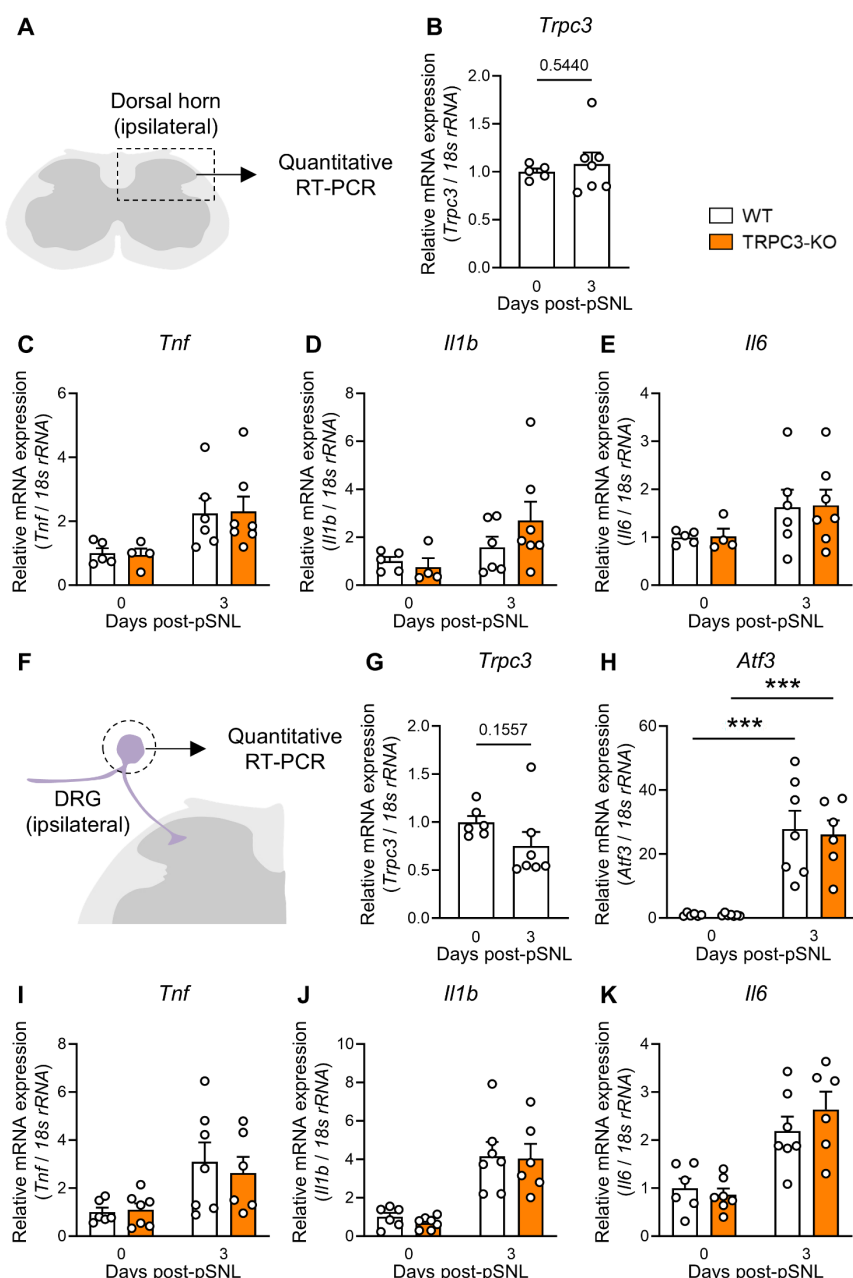


図2-5. pSNL 処置後の脊髄後角およびDRGにおける炎症性サイトカイン発現に対するTRPC3欠損の影響

(A, F) 脊髄後角 (A) および L4 DRG (F) の定量的 RT-PCR の模式図。(B, G) WT マウスにおける pSNL 処置 3 日後の傷害側脊髄後角 (B) および L4 DRG (G) における *Trpc3* mRNA の発現レベル。(C-E) WT および TRPC3-KO マウスにおける pSNL 処置 3 日後の傷害側脊髄後角における *Tnf* (C)、*Il1b* (D) および *Il6* (E) mRNA の発現レベル。(H-K) WT および TRPC3-KO マウスにおける pSNL 処置 3 日後の傷害側 L4 DRG における *Atf3* (H)、*Tnf* (I)、*Il1b* (J) および *Il6* (K) mRNA の発現レベル。(B) $n = 5-7$ 。(C-E) $n = 4-7$ 。(G) $n = 6-7$ 。(H-K) $n = 6-7$ 。*** $p < 0.001$ (H)。

H)、アストロサイトマーカーGFAPとの共局在はわずかであった(図2-7I-K)。また、L4 DRGでは、TRPC3 mRNAは主にNeuN⁺小径ニューロンで発現しており(図2-9A)、この結果は以前の報告(91)と一致していた。TRPC3は初代培養脊髄後角ニューロンとアストロサイトで発現することが報告されている(53, 54)一方、ミクログリアにおけるTRPC3の発現については相反する報告が存在する

(93, 94) が、脊髄後角 TMEM119⁺ミクログリアにおける TRPC3 mRNA の発現はわずかであった (図 2-9B)。これらの結果は、体性感覚神経系における TRPC3 発現細胞は主に一次感覚神経と脊髄後角ニューロンであることを示唆するものであった。

pSNL 処置後の疼痛様行動に対する組織・細胞種特異的 TRPC3 ノックダウン (KD) の影響

体性感覚神経系で発現する TRPC3 の神経障害性疼痛に対する関与をさらに詳細に解析するため、AAV ベクターと miRNA を使用して組織または細胞種特異的に TRPC3 を KD する検討を行った。まず TRPC3 を KD 可能な miRNA 配列を探索するため、TRPC3 を過剰発現する 293T 細胞を用いて miRNA による KD 効率を評価したところ、miRNA #2 の共発現により *Trpc3* mRNA の発現が約 80%減少し最も高い KD 効率を示した (図 2-10A)。そのため、miRNA #2 を以降の *in vivo* での実験に使用した (図 2-10B)。

はじめに脊髄 TRPC3 が神経障害性疼痛の発症に関与するかどうかを明らかにするために、AAVDJ-CMV-EmGFP-miRNA を脊髄後角に注入することで脊髄 TRPC3 を KD した (図 2-10C)。レポータータンパク質である EmGFP の蛍光が脊髄後角で観察され、脊髄後角での遺伝子導入の成功が確認された (図 2-10D)。脊髄 TRPC3-KD マウスは、対照群のマウスと比較して pSNL 処置後の機械痛覚過敏が抑制されていた (図 2-10E, 2-11A)。

TRPC3 は非ペプチド作動性侵害受容線維を含む一次感覚神経でも発現している (91) ため、AAV6-hSyn-mCherry-miRNA を坐骨神経内に注入し、一次感覚神経特異的な TRPC3 の KD を行った (図 2-10F)。レポータータンパク質である mCherry の蛍光が NeuN⁺ DRG ニューロンで観察され (図 2-10G)、約 40%の NeuN⁺ DRG ニューロンが mCherry を発現していた (図 2-11B, C)。脊髄 TRPC3-KD マウスとは対照的に、一次感覚神経特異的 TRPC3-KD マウスでは pSNL 処置後の機械痛覚過敏は抑制されなかった (図 2-10H, 2-11D)。これらの結果は、脊髄 TRPC3 は神経障害性疼痛の発症に必要なが、一次感覚神経 TRPC3 は必要ではないことを示唆するものであった。

脊髄後角において TRPC3 は主にニューロンで発現しているため (図 2-7)、脊髄後角ニューロンにおける神経障害性疼痛の発症における TRPC3 の関与を検討した。脊髄後角ニューロンの TRPC3 は、ニューロン特異的プロモーターである hSyn の制御下で miRNA およびレポータータンパク質 mCherry を発現する AAV を脊髄後角に注入し、ニューロン特異的に TRPC3 を KD した (図 2-10I)。大半の NeuN⁺脊髄後角ニューロンにおいて mCherry 蛍光が観察された (図 2-10J)。さらに、脊髄後角ニューロン特異的 TRPC3-KD マウスでは、pSNL 処置後の機械痛覚過敏が抑制されていた (図 2-10K, 2-11E)。また、Gfap^{cre} マウスの脊髄後角に AAV-CMV-DIO-EmGFP-miRNA を注入し、非神経細胞であるアストロサイトで TRPC3 を KD した。しかし、脊髄後角アストロサイト特異的 TRPC3-KD マウスでは pSNL 処置後の機械痛覚過敏を抑制しなかった (SI 付録、図 S8F および G)。これらの結果より、脊髄後角ニューロンに発現する TRPC3 が神経障害性疼痛の発症に重要な役割を果たしていることが示された。

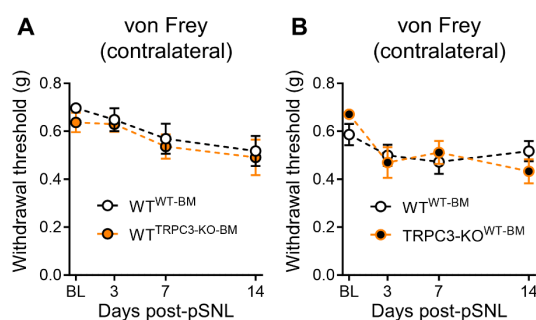


図 2-6. 骨髄キメラマウスにおける pSNL 処置後の反対側後肢の機械刺激感受性 (A, B) WT^{WT-BM} および WT^{TRPC3-KO-BM} (A) または TRPC3-KO^{WT-BM} (B) マウスにおける pSNL 処置後の反対側足の機械刺激感受性。 (A) *n* = 6–7. (B) *n* = 12–14.

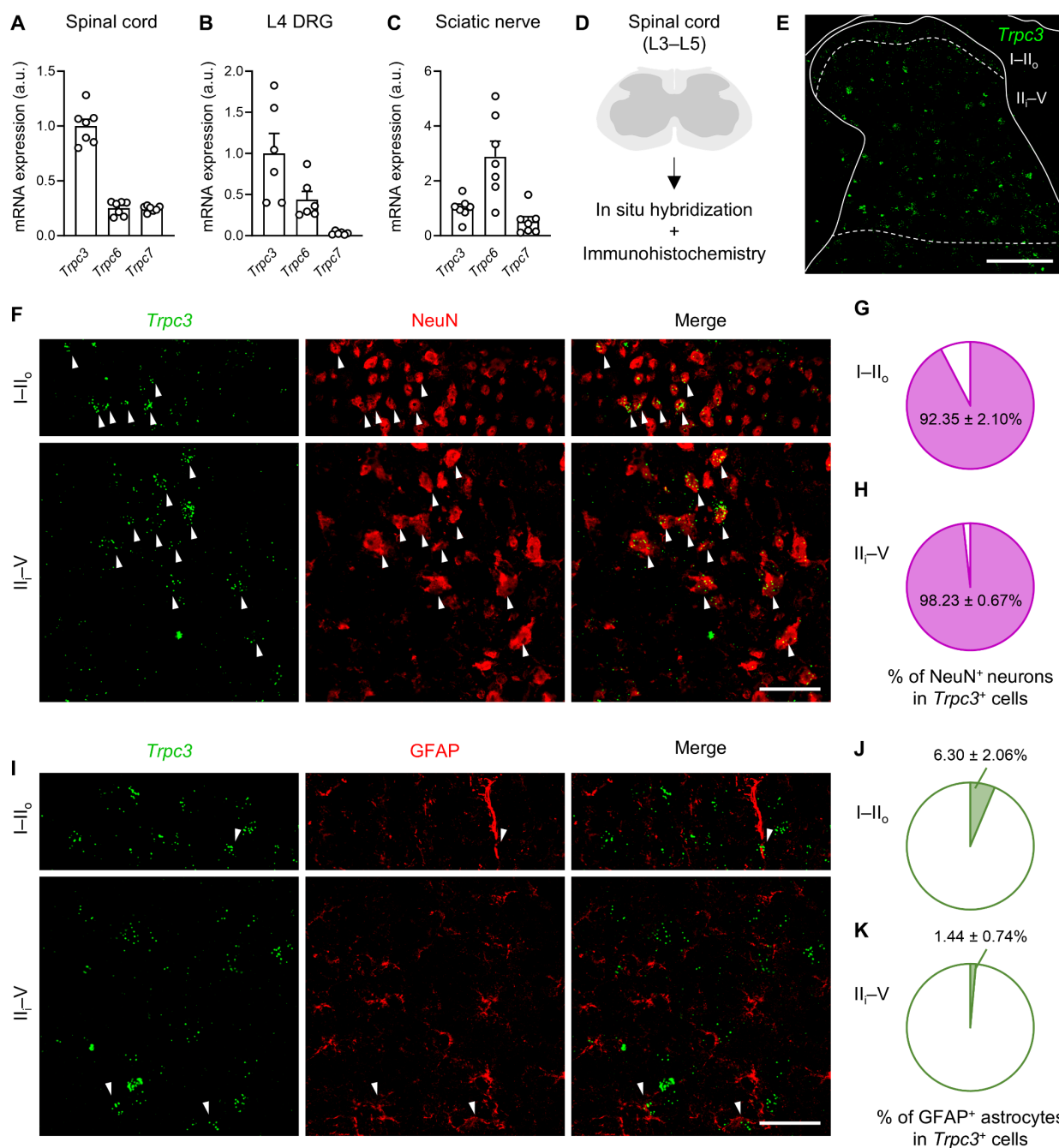


図 2-7. 体性感覚神経系における TRPC3 の発現

(A-C) Naïve WT マウスの脊髄 (A; L3-L5)、L4 DRG (B)、坐骨神経 (C) における *Trpc3*、*Trpc6*、*Trpc7* mRNA の発現レベル。(D) 脊髄切片における in situ ハイブリダイゼーション-免疫組織化学二重染色の模式図。(E) 脊髄後角における *Trpc3* mRNA の発現を示す in situ ハイブリダイゼーションの代表画像。II_o、II 層の表層部分、II_i、II 層の深層部分。Scale bar: 200 μm。(F-H) 脊髄後角の表層 (G; I 層および II_o 層) と深層 (H; II_i-V 層) における NeuN および *Trpc3* mRNA 発現の代表画像 (F) と定量結果 (G, H)。矢尻: *Trpc3*⁺ NeuN⁺ ニューロンの代表例。Scale bar: 50 μm。(I-K) 脊髄後角の表層 (J; I 層および II_o 層) と深層 (K; II_i-V 層) における GFAP および *Trpc3* mRNA 発現の代表画像 (I) と定量結果 (J, K)。矢尻: *Trpc3*⁺ GFAP⁺ アストロサイトの代表例。Scale bar: 50 μm。(A, C) *n* = 7。(B) *n* = 6。(G, H, J, K) *n* = 3。

脊髄 TRPC3 の活性化が機械刺激感受性に与える影響

神経障害性疼痛の発症には脊髄後角ニューロンに発現する TRPC3 が必要であることを踏まえ、脊髄 TRPC3 の活性化が疼痛様行動を誘発する可能性があるという仮説を立てた。この仮説を検証するために、TRPC3 アゴニストである GSK1702934A (GSK) を使用した (図 2-12A)。まず、一次感覚神経に発現する TRPC3 の活性化が疼痛様行動を誘発するかどうかを明らかにするため、GSK の足

底内投与を行った (図 2-12B)。GSK の足底内注射は自発痛様行動を誘発せず、機械刺激感受性も変化させなかった (図 2-12C, D)。これらの結果は一次感覚神経 TRPC3 の活性化は疼痛様行動を誘発しないことを示唆するものであった。一方で、GSK の髄腔内投与 (図 2-12E) は用量依存的に機械刺激に対する逃避閾値を低下させ、機械刺激感受性を亢進させた (図 2-12F)。機械刺激感受性の亢進は投与 1 日後には消失していた (図 2-12G)。さらに GSK の髄腔内投与により誘発される機械刺激感受性の亢進は TRPC3-KO マウスでは認められなかった (図 2-12H)。これらの結果は、脊髄 TRPC3 の活性化が機械痛覚過敏の形成に十分であることを示唆するものであった。

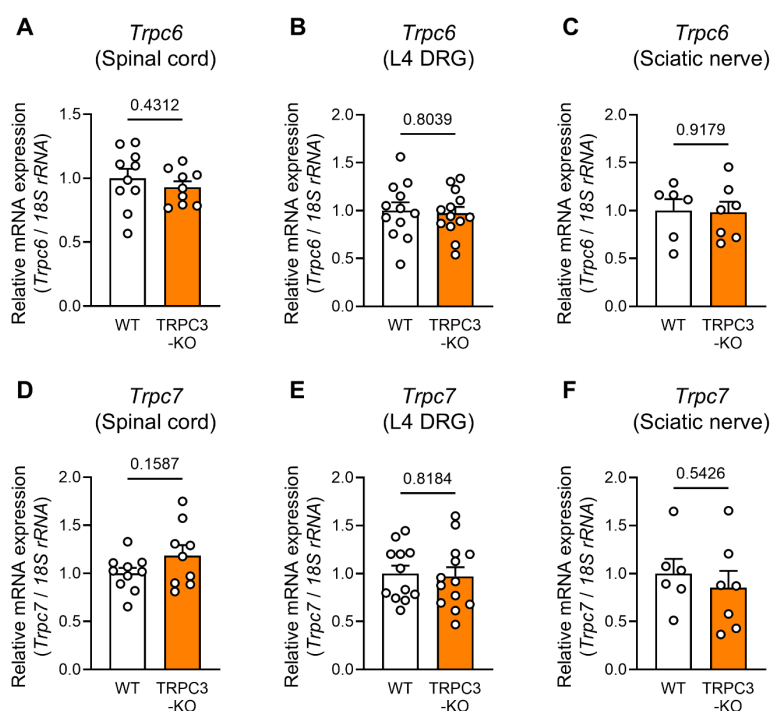


図 2-8. TRPC3-KO マウスの体性感覚神経系における TRPC6/7 の発現 (A-F) naïve WT マウスと TRPC3-KO マウスの脊髄 (A, D)、L4 DRG (B, E)、坐骨神経 (C, F) における *Trpc6* (A-C) および *Trpc7* (D-F) mRNA 発現レベル。 (A, D) $n = 9-10$. (B, E) $n = 12-13$. (C, F) $n = 6-7$.

脊髄 PLC 活性化により誘発される機械痛覚過敏に対する TRPC3 の関与

TRPC3 は PLC の下流で DAG を介して活性化されることを踏まえ、疼痛病態下における TRPC3 の上流因子を探索した。発痛物質であるサブスタンス P は一次感覚神経終末から脊髄後角に放出され、脊髄後角神経に発現する NK₁ 受容体に結合し主に Gq シグナルを介して疼痛を誘発する (95) (図 2-12I)。このことを踏まえ、サブスタンス P 誘発機械痛覚過敏における TRPC3 の関与を評価した。サブスタンス P の髄腔内投与は急性の機械痛覚過敏を誘発したが、TRPC3-KO マウスでは抑制されていた (図 2-12J)。この結果は、サブスタンス P が脊髄において TRPC3 を介して機械痛覚過敏症を誘発することを示唆するものであった。

サブスタンス P-NK₁ 受容体-Gq を含め、様々な Gq シグナルが脊髄後角で痛み情報の伝達を担う (60) ことから、TRPC3 が脊髄において Gq シグナルを介した機械痛覚過敏に関与しているという仮説を立てた。この仮説を検証するために、PLC 活性化薬 m-3M3FBS (96) を用いた (図 2-12K)。m-3M3FBS 投与による脊髄 PLC 活性化が機械刺激感受性に与える影響は明らかではなかったため、まず髄腔内に m-3M3FBS を投与し機械刺激感受性を評価した。m-3M3FBS の髄腔内投与により、投与 1 日後において用量依存的な機械刺激感受性の亢進が認められた (図 2-13A)。この機械刺激感受性の亢進は投与後 3 日間持続し、7 日目の時点では投与前と同じレベルまで回復していた (図 2-13B)。続いて TRPC3-KO マウスに m-3M3FBS を髄腔内投与したところ、機械刺激感受性の亢進は TRPC3-KO マウスで抑制されていた (図 2-12L)。これらの結果より、脊髄において PLC の下流で活性化された TRPC3 が機械痛覚過敏の形成を媒介することが示された。

考察

本章では、以下の3つの知見が明らかになった。

(i) 脊髄後角ニューロン TRPC3 の KD により末梢神経損傷後の神経障害性疼痛が抑制された。(ii) 脊髄 TRPC3 の活性化は機械痛覚過敏を誘発した。(iii) 脊髄 NK₁ 受容体または PLC の活性化によって誘発される機械痛覚過敏が TRPC3 欠損により抑制された。神経障害性疼痛の発症メカニズムにおいて、中枢における神経感作は侵害刺激に対する応答の増

強または非侵害刺激に対する異常な疼痛反応の形成の原因となる (97)。TRPC3 は Ca²⁺透過性カチオンチャネルであるため、脊髄後角ニューロンに発現する NK₁ 受容体などの Gq 共役型受容体の下流における TRPC3 の活性化は、神経障害性疼痛の病態形成において Ca²⁺流入を促進し、脊髄後角ニューロンの神経活動および疼痛シグナルを増強する可能性がある (図 2-14)。

神経障害性疼痛における TRPC3/6 の機能の相違

TRPC3/6 は TRPC チャンネルファミリーのメンバーであり、高い配列相同性を有する。TRPC3/6 は DAG によって活性化され、ヘテロ四量体として機能する (86)。しかし、本章では TRPC3 欠損のみが神経障害性疼痛を抑制し、TRPC6 の欠損は神経障害性疼痛を抑制しなかった (図 2-1)。さらに、脊髄において TRPC3 は TRPC6 の約 4 倍の発現レベルを示す (図 2-7) ことから、TRPC3 は脊髄における疼痛制御および神経障害性疼痛の発症において TRPC6 よりも主要な役割を果たしていることが示唆される。

本章の結果とは反対に、以前の研究では TRPC6 が神経障害性疼痛に関与していることが示唆されている。例えば、絞扼性神経損傷モデルでは DRG における TRPC6 発現の増加が観察され (88)、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドを用いた脊髄 TRPC6 のノックダウンは糖尿病性末梢神経障害モデル (89) および坐骨神経部分損傷モデル (87) における疼痛様行動を抑制した。これらの報告と本章における結果の矛盾は、動物種、神経障害性疼痛モデルおよび TRPC6 の阻害方法の違いによるものと考えられる。本章における研究は TRPC6-KO マウスを用いて神経障害性疼痛における

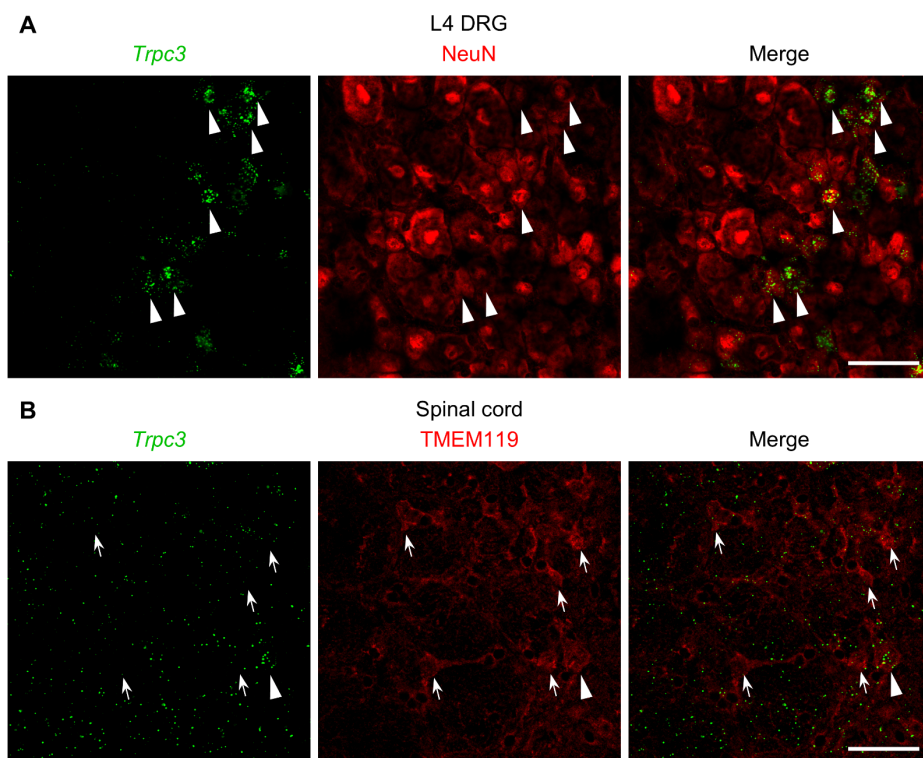


図 2-9. DRG および脊髄後角ミクログリアにおける *Trpc3* mRNA の発現 (A) naïve WT マウスの L4 DRG における NeuN および *Trpc3* mRNA 発現の代表画像。矢尻: *Trpc3*⁺ NeuN⁺ニューロンの代表例。(B) naïve WT マウスの脊髄後角における TMEM119 および *Trpc3* mRNA 発現の代表画像。矢尻: *Trpc3*⁺ TMEM119⁺ミクログリアの代表例。矢印: *Trpc3*⁺ TMEM119⁺ ミクログリアの代表例。Scale bars: 50 μm.

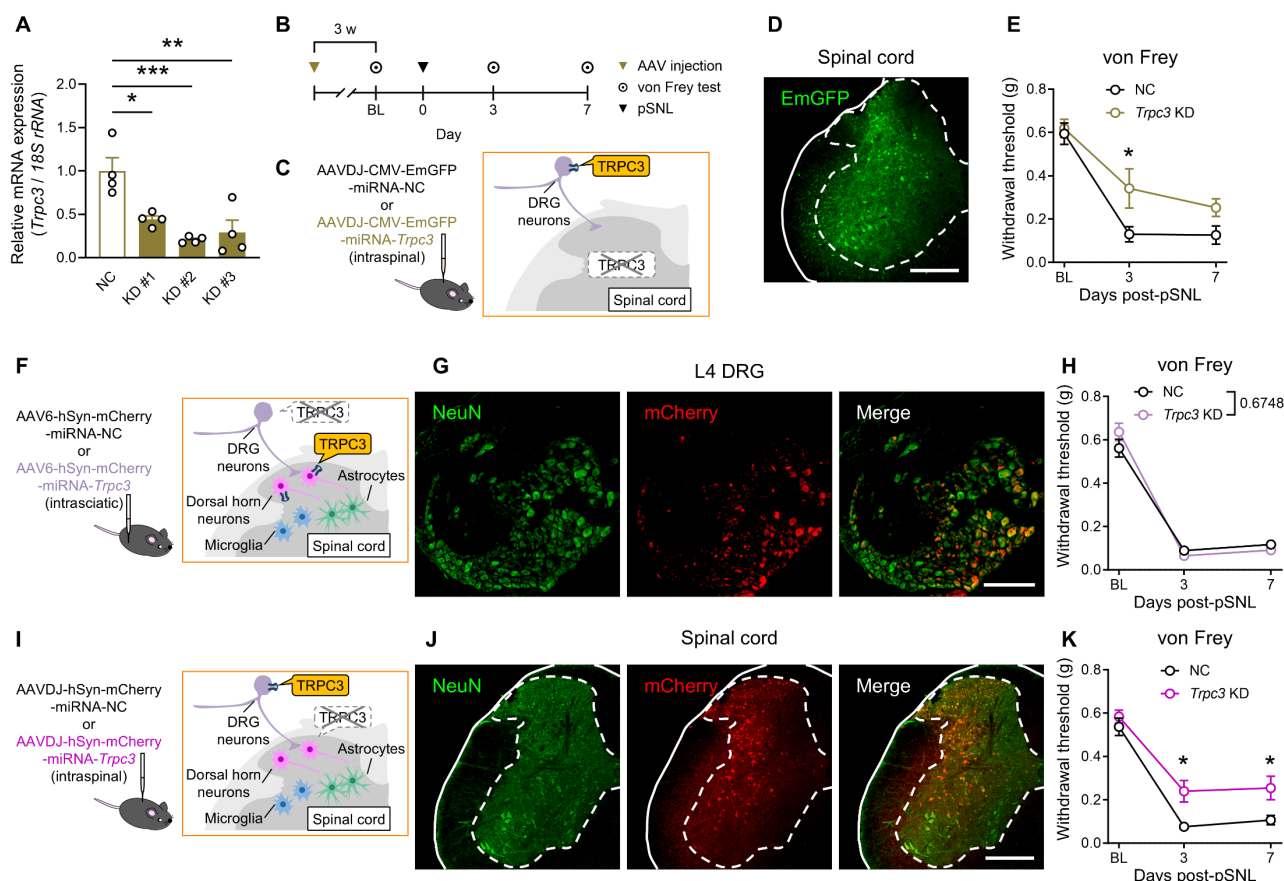


図 2-10. pSNL 処置後の機械痛覚過敏に対する脊髄後角および一次感覚神経 TRPC3 の関与

(A) TRPC3 過剰発現プラスミド (pCAG-*Trpc3*) および KD プラスミド (pAAV-CMV-EmGFP-miRNA-NC, pAAV-CMV-EmGFP-miRNA-*Trpc3* #1、#2、#3 のいずれか) を共処置した 293T 細胞における *Trpc3* mRNA 発現レベル。(B) in vivo KD 実験のタイムコース。行動実験は AAV 注入の 3 週間後に開始した。(C) 脊髄後角 TRPC3-KD マウスの作製の模式図。(D) 脊髄後角における EmGFP 発現の代表画像。Scale bar: 300 μ m。(E) NC マウスまたは脊髄後角 TRPC3-KD マウスにおける pSNL 処置後の傷害側後肢の機械刺激感受性。(F) 一次感覚神経 TRPC3-KD 作製の模式図。AAVDJ-hSyn-mCherry-miRNA を脊髄後角に注入した。(G) L4 DRG NeuN⁺ニューロンにおける mCherry 発現の代表画像。Scale bar: 200 μ m。(H) NC または一次感覚神経 TRPC3-KD マウスにおける pSNL 処置後の傷害側後肢の機械刺激感受性。(I) 脊髄後角ニューロン特異的 TRPC3-KD マウスの作製の模式図。AAVDJ-hSyn-mCherry-miRNA を脊髄後角に注入した。(J) 脊髄後角 NeuN⁺ニューロンにおける mCherry 発現の代表画像。Scale bar: 300 μ m。(K) NC または脊髄後角ニューロン特異的 *Trpc3*-KD マウスにおける pSNL 処置後の傷害側後肢の機械刺激感受性。(B) $n = 4$ 。(E) $n = 8-10$ 。(H) $n = 9-10$ 。(K) $n = 11-14$ 。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (A)。* $p < 0.05$ vs NC (E, K)。

TRPC6 の関与を調査した最初の研究であると考えられる。

pSNL 処置後の脊髄ミクログリア活性化における TRPC3 の関与

TRPC3-KO マウスでは、pSNL 処置後の脊髄後角におけるミクログリア活性化のわずかな遅延が認められた (図 2-4)。脊髄ミクログリアにおいて TRPC3 がほとんど発現しない (図 2-9) ことを考慮すると、ミクログリア活性化の上流シグナル伝達が遅延に関与している可能性がある。オリゴデンドロサイト系列細胞 (OL) は神経障害性疼痛の病態形成に関与することが知られている。末梢神経損傷後、脊髄 OL はインターロイキン 33 (IL33) を産生し、IL33 はミクログリアを活性化して神経障害性疼痛の発症を促進する (98, 99)。さらに、ミクログリアとオリゴデンドロサイトは、血小板活性化因子 (PAF) 産生酵素である LPLAT9 を発現する (100)。PAF 受容体は脊髄において主にミクログリアで発現し神経障害性疼痛に関与する (100)。ラット脳ではオリゴデンドロサイトが TRPC3 を発現しており (101)、脊髄においても OL が TRPC3 を発現する可能性がある。これらの知見を踏まえると、TRPC3-KO マウスでは OL における IL33 および PAF の産生が変化している可能性があり、こ

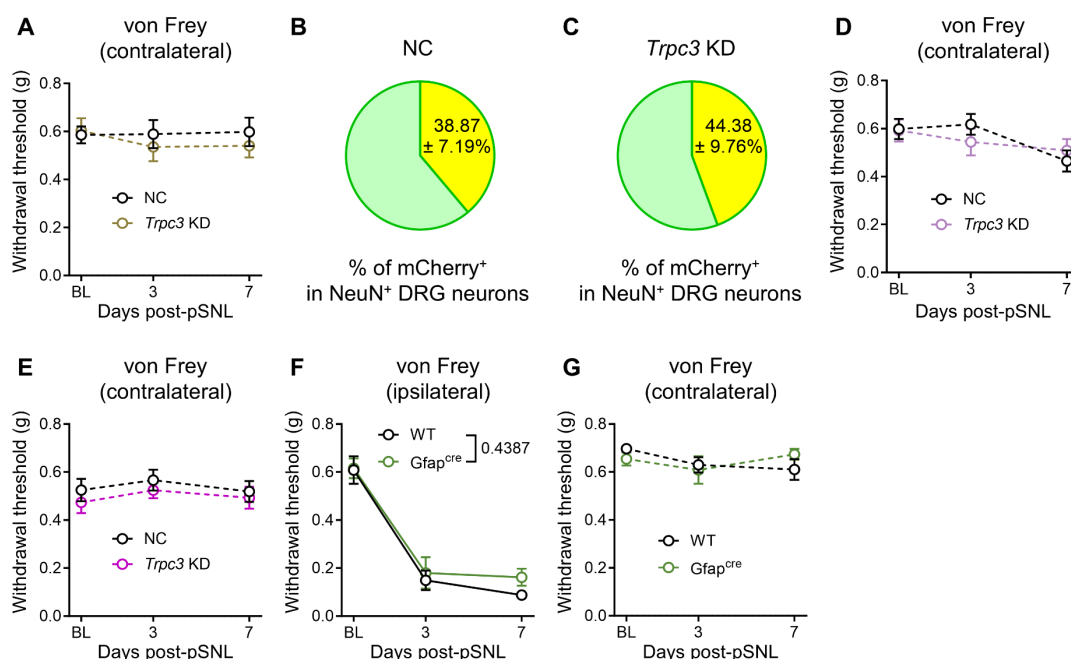


図 2-11. pSNL 処置後の機械痛覚過敏に対する組織・細胞種特異的 TRPC3-KD の影響

(A) ネガティブコントロール (NC) または脊髄後角 TRPC3-KD マウスにおける pSNL 処置後の反対側後肢の機械刺激感受性。(B, C) NC マウス (B) または一次感覚神経 TRPC3-KD (C) マウスの L4 DRG NeuN⁺ニューロンにおける mCherry 陽性細胞割合の定量結果。(D, E) NC または一次感覚神経 TRPC3-KD マウス (D) および NC または脊髄後角ニューロン特異的 TRPC3-KD マウス (E) における pSNL 処置後の反対側後肢の機械刺激感受性。(F, G) WT および Gfap^{cre} マウスにおける pSNL 処置後の傷害側 (F) または反対側 (G) 後肢の機械刺激感受性。AAVDJ-CMV-DIO-EmGFP-miRNA を脊髄後角に注入してから 3 週間後に行動テストを実施した。(A) $n = 8-10$. (B) $n = 4$. (C) $n = 3$. (D) $n = 9-10$. (E) $n = 11-14$. (F, G) $n = 7$.

れが pSNL 処置後のミクログリア活性化の遅延につながり、本章で明らかにした脊髄後角ニューロンを介するメカニズムに加えて疼痛抑制に寄与している可能性がある。この機序の疼痛への寄与は比較的小さいと考えられるが、TRPC3 が脊髄 OL で発現しているかどうか、また TRPC3 欠損が OL の IL33 および PAF 産生に影響を及ぼし、ミクログリア活性化を介して神経障害性疼痛に寄与しているかどうかを明らかにするにはさらなる研究が必要である。

体性感覚神経系における TRPC3 発現細胞

TRPC3 は一次感覚神経で機能的に発現する。初代培養 DRG ニューロンでは、TRPC3 は FcγRI 複合体 (48)、P2Y₂、PAR₂ (61)、ET_{A/B}、B_{1/2} 受容体 (62) といった主に Gq-PLC 経路を活性化する受容体の下流で活性化される。さらに、TRPC3 は DRG の非ペプチド作動性無髄線維で発現する (91)。この既報と一致して、Trpc3 mRNA は L4 DRG において主に NeuN⁺小径ニューロンで発現していた (図 2-9)。しかし、本章の結果から、一次感覚神経 TRPC3 は神経障害性疼痛の発症には必要ではないことが明らかになった。TRPC3 は、痒み情報を伝達する一次感覚神経サブセットである MrgprA3⁺神経線維で発現する (102)。さらに、起痒物質は主に Gq タンパク質の活性化を介して一次感覚神経を刺激することで痒みを誘発する (102)。これらの知見を考慮すると、一次感覚神経に発現する TRPC3 は痛みではなく痒み情報の伝達に寄与している可能性がある。

GSK の足底内投与による一次感覚神経 TRPC3 の刺激は疼痛様行動を誘発しなかった (図 2-12)。しかし、Liu ら (91) はマウス頬部に GSK を皮下投与すると疼痛様行動である前肢 wiping 行動が誘発されることを示している。この結果の相違は GSK の投与部位の違いに起因する可能性がある。足

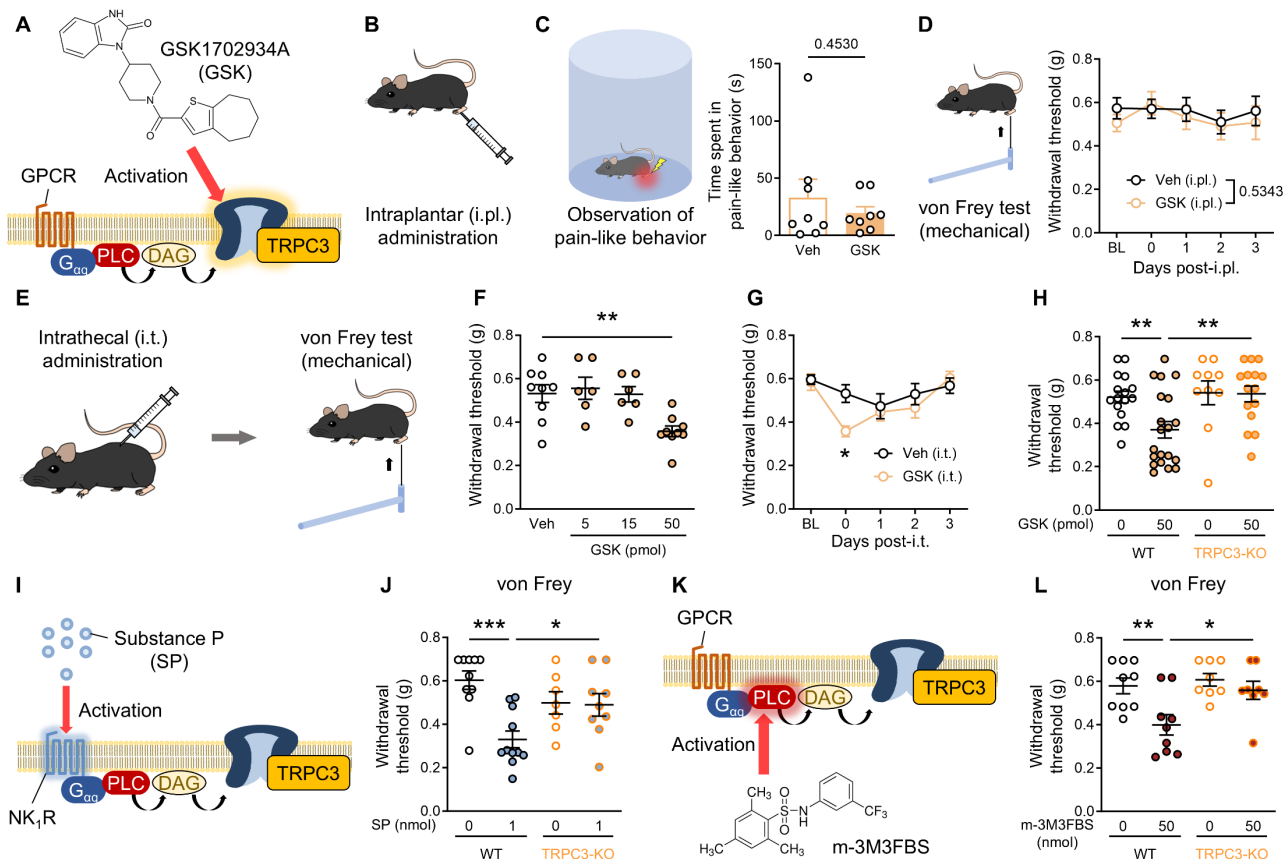


図 2-12. 脊髄 TRPC3 および上流因子の活性化による機械刺激感受性への影響

(A) TRPC3 アゴニスト GSK1702934A (GSK) の模式図および構造式。(B) GSK 足底内投与の模式図。(C) (左) 自発痛様行動観察の模式図。(右) WT マウスに GSK (100 pmol) を足底内投与した直後 10 分間の疼痛様行動 (足舐め・噛み) の合計時間。(D) (左) von Frey テストの模式図。(右) WT マウスに GSK (100 pmol) を足底内投与した後の同側後肢における機械刺激感受性の経時変化。(E) GSK 髄腔内投与および von Frey テストの模式図。(F) WT マウスに GSK を髄腔内投与した 1 時間後の後肢における機械刺激感受性。(G) WT マウスに GSK (50 pmol) を髄腔内投与した後の後肢における機械刺激感受性の経時変化。(H) WT および TRPC3-KO マウスに GSK (50 pmol) を髄腔内投与した 1 時間後の後肢における機械刺激感受性。(I) サブスタンス P による NK_1R 受容体活性化の模式図。(J) WT および TRPC3-KO マウスにサブスタンス P (1 nmol) を髄腔内投与した 1 時間後の後肢における機械刺激感受性。(K) PLC 活性化薬 m-3M3FBS の構造式および Gq-PLC-DAG-TRPC3 シグナルカスケードの模式図。(L) WT および TRPC3-KO マウスに m-3M3FBS (50 nmol) を髄腔内投与した 1 日後の後肢における機械刺激感受性。(C, D) $n = 8$. (F) $n = 6-9$. (G) $n = 9$. (H) $n = 10-20$. (J) $n = 7-11$. (L) $n = 8-9$. * $p < 0.01$ (F). * $p < 0.05$ vs vehicle (G). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (H, J and L).

底は腰椎部 DRG によって神経支配されるが、頬は三叉神経節 (TG) によって神経支配されており、TRPC3 の発現パターンは DRG ニューロンと TG ニューロン間で異なる可能性がある。さらに、一次感覚神経における TRPC3 の細胞内局在は明らかになっていないため、TRPC3 が DRG ニューロンの自由神経終末で機能的に発現しておらず GSK 足底内投与では一次感覚神経 TRPC3 を刺激できていない可能性もある。そのため、DRG ニューロンにおける TRPC3 の正確な局在パターンをさらに解明する必要がある。

これまで、*in vivo* での脊髄における TRPC3 の発現パターンについては明らかではなかった。過去の研究では *in vitro* での初代培養脊髄ニューロン (53) およびアストロサイト (54) における TRPC3 の発現が報告されている。本章では、naïve マウスの脊髄後角において *Trpc3* mRNA がニューロンで発現し、アストロサイトやミクログリアではほとんど発現しないことを明らかにした。以前の報告で大脳皮質において TRPC3 は生理的条件下ではニューロンで発現し、アストロサイトではほとんど発現しないことが示されており (55)、この結果は本章での脊髄後角における検討の結果と一致している。また、脊髄後角ニューロンにおける TRPC3 の KD は神経障害性疼痛を抑制したが、ア

ストロサイトにおける TRPC3 の KD は神経障害性疼痛に影響しなかった。これらの結果は、*in vivo* における脊髄アストロサイトの TRPC3 発現は低レベルで維持されており、疼痛制御には関与していないことを示唆している。

TRPC3 の上流分子

TRPC3 は PLC と共役して活性化され、Gq-PLC-DAG シグナルを介してさまざまな Gq 共役型受容体と相互作用する。神経障害性疼痛の発症に PLC が関与していること (103) を踏まえると、TRPC3 は PLC 活性化依存的な神経障害性疼痛

の発症メカニズムに寄与する可能性がある。発痛物質として広く知られるサブスタンス P は、NK₁ 受容体を介して主に Gq シグナルを介して疼痛を惹起する (95)。さらに、サブスタンス P は神経障害性疼痛の病態に深く関与することが報告されており、ラット神経障害性疼痛モデルの脊髄においてサブスタンス P レベルの上昇が観察されている (104)。また、一次感覚神経の大径有髄神経線維は非侵害性の機械刺激を伝達しており通常はグルタミン酸作動性であるが、脊髄神経結紮処置後の大径有髄線維はサブスタンス P を発現することが報告されている (105)。本章では、TRPC3-KO マウスにおいてサブスタンス P の髄腔内投与によって誘発される機械痛覚過敏が抑制されることを示した。この結果は、脊髄後角ニューロン TRPC3 がサブスタンス P-NK₁ 受容体の下流で活性化され、Ca²⁺流入を促進し、神経障害性疼痛の病態下で脊髄後角ニューロンの神経活動亢進につながることを示唆している。

TRPC3 は脊髄後角ニューロンで発現する他の Gq 共役型受容体、例えば group I mGluR (mGluR_{1/5}) を介して疼痛発症に関与する可能性がある。mGluR_{1/5} は神経障害性疼痛の発症に関与することが知られている (106, 107)。以前の報告では TRPC3 が脊髄ニューロンにおいて mGluR_{1/5} の下流での Ca²⁺流入に寄与しないことが示唆されている (53) が、この既報では TRPC3 の KD 効率が約 30%の siRNA を使用して検討を行っているため、TRPC3 を介した Ca²⁺流入を正確に観察できていない可能性がある。本章では PLC 活性化薬 m-3M3FBS の髄腔内投与を行い PLC 活性化により誘発される機械痛覚過敏における TRPC3 の関与を実証しており、TRPC3 が Gq-PLC-DAG シグナルの下流で機能し神経障害性疼痛の発症に寄与する可能性を示している。しかし、TRPC3 の下流分子および TRPC3 を介した脊髄後角ニューロン活性化の分子メカニズムを解明するにはさらなる研究が必要である。

神経障害性疼痛における TRPC3 の発現レベル

本章の結果では pSNL 処置後の脊髄後角における TRPC3 発現レベルはほぼ変化しなかった。しかし、TRPC3 の上流分子が増加することによって TRPC3 の活性化が起こり、神経障害性疼痛に関与している可能性がある。例えば、pSNL 処置後の脊髄後角において NK₁ 受容体 (108) および B_{1/2} 受容体 (109) の発現レベルは増加する。これは、NK₁ 受容体や B_{1/2} 受容体などの Gq 共役型受容体によって媒介される Gq-PLC-DAG シグナルカスケードが神経障害性疼痛下で増強されることで TRPC3

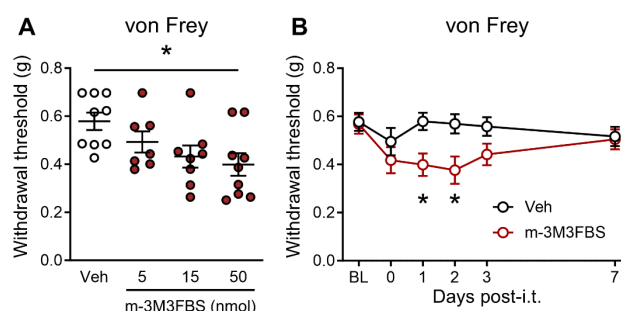


図 2-13. PLC 活性化薬 m-3M3FBS の髄腔内投与による機械刺激感受性への影響

(A) WT マウスに m-3M3FBS を髄腔内投与した 1 日後の後肢における機械刺激感受性。(B) WT マウスに m-3M3FBS (50 nmol) を髄腔内投与した後の後肢における機械刺激感受性の経時変化。(A) $n = 7-9$. (B) $n = 9$. * $p < 0.05$ (A). * $p < 0.05$ vs vehicle (B).

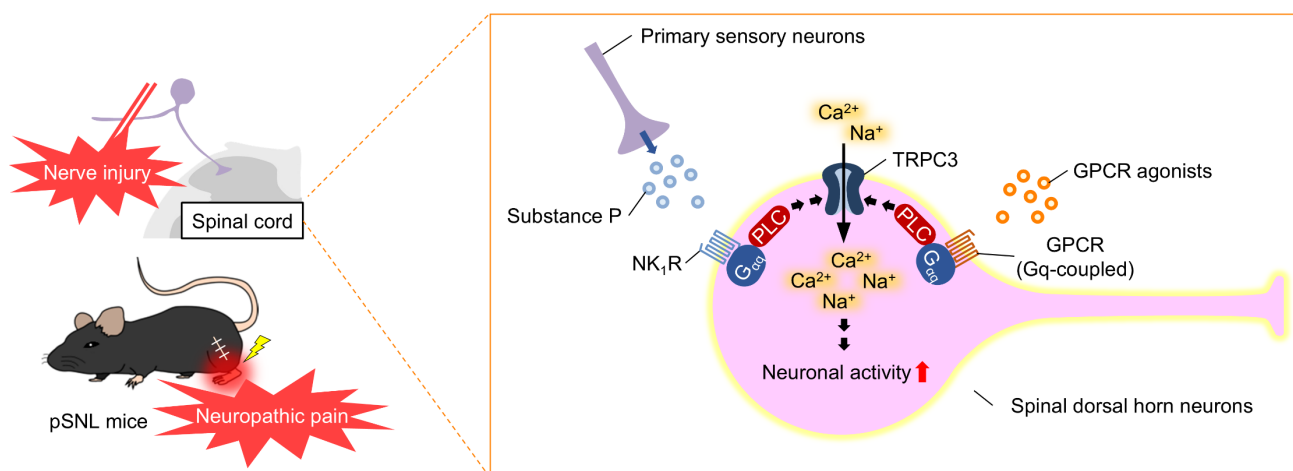


図 2-14.神経障害性疼痛に対する脊髄後角ニューロン TRPC3 の寄与
末梢神経損傷後の神経障害性疼痛の病態形成における TRPC3 の役割とメカニズムの仮説模式図。

の活性化を促進し、脊髄後角ニューロンの興奮性増大につながる可能性があることを示している。

Aoki ら (57) は、*TRPC3* 遺伝子の SNP である rs11726196 と慢性疼痛との関連を示している。この SNP は *TRPC3* 遺伝子のイントロン部分に存在し、転写調節に関与している可能性がある。*TRPC3* mRNA の発現レベルは末梢神経系を含むほとんどの末梢組織における rs11726196 の遺伝子型に依存する (TT>GG)。この SNP が腰髄後角における *TRPC3* 発現レベルに影響を及ぼすかどうかは明らかにされていないものの、TT 遺伝子型の患者では腰髄後角ニューロンにおける *TRPC3* 発現が増加することで神経活動が亢進し、神経障害性疼痛の発生に関与している可能性がある。この SNP が腰髄後角での *TRPC3* 発現レベルに影響するかどうか、および慢性疼痛が *TRPC3* 発現の変化に起因しているかどうかを判断するには、さらなる研究が必要である。

結論として、本章での研究により脊髄後角ニューロンで発現する *TRPC3* が末梢神経損傷後の神経障害性疼痛の発症に対し重要な制御因子として機能することを明らかにした。本研究成果は神経障害性疼痛の病態形成メカニズムに関する新たな知見を提供し、*TRPC3* が神経障害性疼痛の治療における有望な新規治療標的となりうることを示すものである。

総括および結論

本研究において著者は、感覚機能の制御における末梢・中枢神経細胞 TRP チャネルの役割について検討を行い、以下の新規知見を得た。

第 1 章

- MrgprB4 陽性一次感覚神経において TRPA1 が機能的に発現しており、TRPV1, TRPV4, TRPM8 の発現は認められなかった。
- MrgprB4 欠損マウスは不快感を惹起する頬アセトン塗布および頬へのスクロース溶液噴霧に対する応答が増加した。
- TRPA1 欠損マウスにおいても MrgprB4 欠損マウスと同様に、頬への不快感を惹起する刺激に対する応答が増加した。

第 2 章

- 神経障害性疼痛モデルである pSNL 処置による機械痛覚過敏および熱痛覚過敏が TRPC3 欠損により抑制された。
- 骨髄系細胞でのみ TRPC3 を欠損する骨髄キメラマウスは pSNL 処置により対照群と同程度に機械痛覚過敏を発症したが、骨髄系細胞以外で TRPC3 を欠損する骨髄キメラマウスでは pSNL 処置後の機械痛覚過敏が抑制されていた。
- TRPC3 は脊髄後角においてニューロンで発現しており、アストロサイトでの発現は認められなかった。
- 脊髄後角ニューロン特異的に TRPC3 を KD したマウスでは pSNL 処置後の機械痛覚過敏が抑制されたが、一次感覚神経で TRPC3 を KD したマウスでは機械痛覚過敏は抑制されなかった。
- 脊髄 TRPC3 の刺激により急性の機械痛覚過敏が形成され、一次感覚神経 TRPC3 の刺激は疼痛様行動を惹起しなかった。
- 脊髄 NK₁ 受容体および PLC の活性化により誘発される機械痛覚過敏は TRPC3 の欠損により抑制された。

以上、著者はマウスモデルを用いて、感覚機能の制御における末梢・中枢神経細胞 TRP チャネルの役割の一端を明らかにした。本研究の成果は、慢性疼痛をはじめとする様々な感覚障害の病態解明および新薬の創出に資する重要な基礎的知見を提供するものである。

謝辞

本研究に際しまして、終始懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 白川久志 准教授に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益な御助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科 金子周司 名誉教授ならびに大阪大学大学院薬学研究科 永安一樹 准教授に心から感謝の意を表します。

本研究の遂行に当たり、多大なるご協力をいただきました National Institute of Environmental Health Sciences, Prof. Lutz Birnbaumer、九州大学大学院薬学研究院 西田基宏 教授、和歌山県立医科大学薬学部 中川貴之 教授、京都大学大学院工学研究科 森泰生 教授、京都大学大学院薬学研究科 井上飛鳥 教授、富山大学大学院 歌大介 准教授、京都大学大学院医学研究科 浅岡希美 助教に深く感謝いたします。また、Prof. Lutz Birnbaumer および西田基宏 教授には TRPC3-KO マウスおよび TRPC6-KO マウスを、森泰生 教授には Gfap^{cre} マウスをご提供いただき深く感謝いたします。

研究生生活を始めるにあたり御指導、御助言をいただきました和歌山県立医科大学薬学部 抱将史 助教、矢野佑一 学士、日本大学医学部 長島卓也 助教、大阪公立大学医学研究科 河合洋幸 助教、大橋佳奈 博士をはじめ諸先輩方に心から感謝いたします。また、本研究にご協力いただきました玉田晃生 学士、植村凪 学士、澤田杏子 さんに心から感謝いたします。そして、日々の研究生生活において互いに切磋琢磨し合えた中島弘貴 修士をはじめ京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

本研究の遂行に関しましてご援助をいただきました日本学術振興会特別研究員制度、藤多仁生奨学金、岩垂奨学会に深く感謝いたします。

最後に、著者の良き理解者であり研究活動に専念出来るように終始支えて下さった妻 真帆をはじめ家族一同に心から感謝いたします。

発表論文目録

1. MrgprB4 in trigeminal neurons expressing TRPA1 modulates unpleasant sensations.
(TRPA1 陽性三叉神経に発現する MrgprB4 は不快感を修飾する)
Shota Tabori, Haruka Hiyama, Takahito Miyake, Yuichi Yano, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, Yasuo Mori, Shuji Kaneko
2021 年 8 月発行 *Journal of Pharmacological Sciences* 第 146 巻 200 頁–205 頁に掲載
2. Spinal TRPC3 promotes neuropathic pain and coordinates phospholipase C-induced mechanical hypersensitivity
(脊髄 TRPC3 は神経障害性疼痛を促進しホスホリパーゼ C 誘発機械痛覚過敏を調整する)
Shota Tabori, Kosei Tamada, Nagi Uemura, Kyoko Sawada, Masashi Kakae, Kazuki Nagayasu, Takayuki Nakagawa, Yasuo Mori, Shuji Kaneko, Hisashi Shirakawa
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 印刷中

参考文献

1. J. Vriens, B. Nilius, T. Voets, Peripheral thermosensation in mammals. *Nat Rev Neurosci* **15**, 573-589 (2014).
2. R. H. LaMotte, X. Dong, M. Ringkamp, Sensory neurons and circuits mediating itch. *Nat Rev Neurosci* **15**, 19-31 (2014).
3. S. Katta, M. Krieg, M. B. Goodman, Feeling force: physical and physiological principles enabling sensory mechanotransduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* **31**, 347-371 (2015).
4. J. A. Lamas, L. Rueda-Ruzafa, S. Herrera-Pérez, Ion Channels and Thermosensitivity: TRP, TREK, or Both? *Int J Mol Sci* **20** (2019).
5. K. Talavera *et al.*, Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: From Structure to Disease. *Physiol Rev* **100**, 725-803 (2020).
6. G. M. Story *et al.*, ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819-829 (2003).
7. D. P. Corey *et al.*, TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* **432**, 723-730 (2004).
8. K. Y. Kwan *et al.*, TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* **50**, 277-289 (2006).
9. D. M. Bautista *et al.*, TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* **124**, 1269-1282 (2006).
10. Y. Karashima *et al.*, TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1273-1278 (2009).
11. K. J. Zappia, C. L. O'Hara, F. Moehring, K. Y. Kwan, C. L. Stucky, Sensory Neuron-Specific Deletion of TRPA1 Results in Mechanical Cutaneous Sensory Deficits. *eNeuro* **4** (2017).
12. X. Dong, S. Han, M. J. Zylka, M. I. Simon, D. J. Anderson, A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* **106**, 619-632 (2001).
13. M. Bader, N. Alenina, M. A. Andrade-Navarro, R. A. Santos, MAS and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs. *Pharmacol Rev* **66**, 1080-1105 (2014).
14. Q. Liu *et al.*, Sensory neuron-specific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. *Cell* **139**, 1353-1365 (2009).
15. S. R. Wilson *et al.*, TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch. *Nat Neurosci* **14**, 595-602 (2011).
16. L. Han *et al.*, A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch. *Nat Neurosci* **16**, 174-182 (2013).
17. Q. Liu *et al.*, Molecular genetic visualization of a rare subset of unmyelinated sensory neurons that may detect gentle touch. *Nat Neurosci* **10**, 946-948 (2007).

18. S. Vrontou, A. M. Wong, K. K. Rau, H. R. Koerber, D. J. Anderson, Genetic identification of C fibres that detect massage-like stroking of hairy skin in vivo. *Nature* **493**, 669-673 (2013).
19. J. Wessberg, H. Olausson, K. W. Fernström, A. B. Vallbo, Receptive field properties of unmyelinated tactile afferents in the human skin. *J Neurophysiol* **89**, 1567-1575 (2003).
20. I. Morrison, L. S. Löken, H. Olausson, The skin as a social organ. *Exp Brain Res* **204**, 305-314 (2010).
21. H. Olausson, J. Wessberg, I. Morrison, F. McGlone, A. Vallbo, The neurophysiology of unmyelinated tactile afferents. *Neurosci Biobehav Rev* **34**, 185-191 (2010).
22. F. McGlone, A. B. Vallbo, H. Olausson, L. Loken, J. Wessberg, Discriminative touch and emotional touch. *Can J Exp Psychol* **61**, 173-183 (2007).
23. L. S. Löken, J. Wessberg, I. Morrison, F. McGlone, H. Olausson, Coding of pleasant touch by unmyelinated afferents in humans. *Nat Neurosci* **12**, 547-548 (2009).
24. R. Ackerley *et al.*, Human C-tactile afferents are tuned to the temperature of a skin-stroking caress. *J Neurosci* **34**, 2879-2883 (2014).
25. D. Andrew, Quantitative characterization of low-threshold mechanoreceptor inputs to lamina I spinoparabrachial neurons in the rat. *J Physiol* **588**, 117-124 (2010).
26. I. Morrison, M. Björnsdotter, H. Olausson, Vicarious responses to social touch in posterior insular cortex are tuned to pleasant caressing speeds. *J Neurosci* **31**, 9554-9562 (2011).
27. H. Olausson *et al.*, Unmyelinated tactile afferents signal touch and project to insular cortex. *Nat Neurosci* **5**, 900-904 (2002).
28. N. Gogolla, The insular cortex. *Curr Biol* **27**, R580-R586 (2017).
29. S. Yamaguchi, K. Otsuguro, A mechanically activated ion channel is functionally expressed in the MrgprB4 positive sensory neurons, which detect stroking of hairy skin in mice. *Neurosci Lett* **653**, 139-145 (2017).
30. T. Ogihara *et al.*, Improvement of peripheral vascular impairment by a phosphodiesterase type 5 inhibitor tadalafil prevents oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in mice. *J Pharmacol Sci* **141**, 131-138 (2019).
31. Y. S. Kim *et al.*, Central terminal sensitization of TRPV1 by descending serotonergic facilitation modulates chronic pain. *Neuron* **81**, 873-887 (2014).
32. M. J. Zylka, X. Dong, A. L. Southwell, D. J. Anderson, Atypical expansion in mice of the sensory neuron-specific Mrg G protein-coupled receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10043-10048 (2003).
33. Y. H. Huang, C. Y. Chang, C. C. Chen, C. D. Yang, W. H. Sun, Distinct expression of Mas1-related G-protein-coupled receptor B4 in dorsal root and trigeminal ganglia--implications for altered behaviors in acid-sensing ion channel 3-deficient mice. *J Mol Neurosci* **51**, 820-834 (2013).
34. D. Usoskin *et al.*, Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci* **18**, 145-153 (2015).
35. F. Touska *et al.*, Comprehensive thermal preference phenotyping in mice using a novel automated circular gradient assay. *Temperature (Austin)* **3**, 77-91 (2016).

36. Z. Winter, P. Gruschwitz, S. Eger, F. Touska, K. Zimmermann, Cold Temperature Encoding by Cutaneous TRPA1 and TRPM8-Carrying Fibers in the Mouse. *Front Mol Neurosci* **10**, 209 (2017).
37. E. Navratilova, F. Porreca, Reward and motivation in pain and pain relief. *Nat Neurosci* **17**, 1304-1312 (2014).
38. L. U. Sneddon, Comparative Physiology of Nociception and Pain. *Physiology (Bethesda)* **33**, 63-73 (2018).
39. L. Colloca *et al.*, Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17002 (2017).
40. P. Baral, S. Udit, I. M. Chiu, Pain and immunity: implications for host defence. *Nat Rev Immunol* **19**, 433-447 (2019).
41. R. R. Ji, C. R. Donnelly, M. Nedergaard, Astrocytes in chronic pain and itch. *Nat Rev Neurosci* **20**, 667-685 (2019).
42. K. Inoue, M. Tsuda, Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Neurosci* **19**, 138-152 (2018).
43. M. Calvo, J. M. Dawes, D. L. Bennett, The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. *Lancet Neurol* **11**, 629-642 (2012).
44. K. Meacham, A. Shepherd, D. P. Mohapatra, S. Haroutounian, Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Curr Pain Headache Rep* **21**, 28 (2017).
45. D. E. Clapham, TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517-524 (2003).
46. L. Birnbaumer, The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca^{2+} concentrations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**, 395-426 (2009).
47. K. Quick *et al.*, TRPC3 and TRPC6 are essential for normal mechanotransduction in subsets of sensory neurons and cochlear hair cells. *Open Biol* **2**, 120068 (2012).
48. L. Qu *et al.*, Transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) is required for IgG immune complex-induced excitation of the rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* **32**, 9554-9562 (2012).
49. S. Kumarasamy *et al.*, Deep Transcriptomic Profiling of M1 Macrophages Lacking Trpc3. *Sci Rep* **7**, 39867 (2017).
50. J. Casas, C. Meana, J. R. López-López, J. Balsinde, M. A. Balboa, Lipin-1-derived diacylglycerol activates intracellular TRPC3 which is critical for inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci* **78**, 8243-8260 (2021).
51. A. S. Wenning *et al.*, TRP expression pattern and the functional importance of TRPC3 in primary human T-cells. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 412-423 (2011).
52. M. Z. Li *et al.*, Molecular mapping of developing dorsal horn-enriched genes by microarray and dorsal/ventral subtractive screening. *Dev Biol* **292**, 555-564 (2006).
53. J. Xia *et al.*, Orai1 is a crucial downstream partner of group I metabotropic glutamate receptor signaling in dorsal horn neurons. *Pain* **163**, 652-664 (2022).
54. K. Miyano *et al.*, Activation of the neurokinin-1 receptor in rat spinal astrocytes induces Ca^{2+} release from IP3-sensitive Ca^{2+} stores and extracellular Ca^{2+} influx through TRPC3. *Neurochem Int* **57**, 923-934 (2010).

55. H. Shirakawa *et al.*, Transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) mediates thrombin-induced astrocyte activation and upregulates its own expression in cortical astrocytes. *J Neurosci* **30**, 13116-13129 (2010).
56. M. Munakata *et al.*, Transient receptor potential canonical 3 inhibitor Pyr3 improves outcomes and attenuates astrogliosis after intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke* **44**, 1981-1987 (2013).
57. Y. Aoki *et al.*, Rs11726196 Single-Nucleotide Polymorphism of the Transient Receptor Potential Canonical 3 (TRPC3) Gene Is Associated with Chronic Pain. *Int J Mol Sci* **24** (2023).
58. A. Tappe-Theodor *et al.*, $G_{q/11}$ signaling tonically modulates nociceptor function and contributes to activity-dependent sensitization. *Pain* **153**, 184-196 (2012).
59. L. N. Wirotanseng, R. Kuner, A. Tappe-Theodor, G_q rather than G_{11} preferentially mediates nociceptor sensitization. *Mol Pain* **9**, 54 (2013).
60. S. Marwari, C. Kowalski, K. A. Martemyanov, Exploring pharmacological inhibition of $G_{q/11}$ as an analgesic strategy. *Br J Pharmacol* **179**, 5196-5208 (2022).
61. H. Alkhani *et al.*, Contribution of TRPC3 to store-operated calcium entry and inflammatory transductions in primary nociceptors. *Mol Pain* **10**, 43 (2014).
62. K. Szteyn, R. Gomez, K. A. Berg, N. A. Jeske, Divergence in endothelin-1- and bradykinin-activated store-operated calcium entry in afferent sensory neurons. *ASN Neuro* **7** (2015).
63. K. Haraguchi *et al.*, TRPM2 contributes to inflammatory and neuropathic pain through the aggravation of pronociceptive inflammatory responses in mice. *J Neurosci* **32**, 3931-3941 (2012).
64. M. Kakae *et al.*, The astrocytic TRPA1 channel mediates an intrinsic protective response to vascular cognitive impairment via LIF production. *Sci Adv* **9**, eadh0102 (2023).
65. S. Caxaria *et al.*, Neutrophils infiltrate sensory ganglia and mediate chronic widespread pain in fibromyalgia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **120**, e2211631120 (2023).
66. S. R. Chaplan, F. W. Bach, J. W. Pogrel, J. M. Chung, T. L. Yaksh, Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* **53**, 55-63 (1994).
67. W. J. Dixon, Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **20**, 441-462 (1980).
68. K. Hargreaves, R. Dubner, F. Brown, C. Flores, J. Joris, A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* **32**, 77-88 (1988).
69. K. So *et al.*, Involvement of TRPM2 in a wide range of inflammatory and neuropathic pain mouse models. *J Pharmacol Sci* **127**, 237-243 (2015).
70. K. So *et al.*, Hypoxia-induced sensitisation of TRPA1 in painful dysesthesia evoked by transient hindlimb ischemia/reperfusion in mice. *Sci Rep* **6**, 23261 (2016).
71. S. Tobori *et al.*, MrgprB4 in trigeminal neurons expressing TRPA1 modulates unpleasant sensations. *J Pharmacol Sci* **146**, 200-205 (2021).
72. Z. Seltzer, R. Dubner, Y. Shir, A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* **43**, 205-218 (1990).
73. S. Ho Kim, J. Mo Chung, An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental

spinal nerve ligation in the rat. *Pain* **50**, 355-363 (1992).

74. M. Tsutsui *et al.*, TRPM2 Exacerbates Central Nervous System Inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Increasing Production of CXCL2 Chemokines. *J Neurosci* **38**, 8484-8495 (2018).
75. K. Isami *et al.*, Involvement of TRPM2 in peripheral nerve injury-induced infiltration of peripheral immune cells into the spinal cord in mouse neuropathic pain model. *PLoS One* **8**, e66410 (2013).
76. A. Silveira Prudente *et al.*, Microglial STING activation alleviates nerve injury-induced neuropathic pain in male but not female mice. *Brain Behav Immun* **117**, 51-65 (2024).
77. K. Tanaka *et al.*, Secreted PLA₂-III is a possible therapeutic target to treat neuropathic pain. *Biochem Biophys Res Commun* **568**, 167-173 (2021).
78. D. Atasoy, Y. Aponte, H. H. Su, S. M. Sternson, A FLEX switch targets Channelrhodopsin-2 to multiple cell types for imaging and long-range circuit mapping. *J Neurosci* **28**, 7025-7030 (2008).
79. H. Hatakama, N. Asaoka, K. Nagayasu, H. Shirakawa, S. Kaneko, Amelioration of obsessive-compulsive disorder by intracellular acidification of cortical neurons with a proton pump inhibitor. *Transl Psychiatry* **14**, 27 (2024).
80. Y. Kohro *et al.*, A new minimally-invasive method for microinjection into the mouse spinal dorsal horn. *Sci Rep* **5**, 14306 (2015).
81. L. Beaulieu-Laroche *et al.*, TACAN Is an Ion Channel Involved in Sensing Mechanical Pain. *Cell* **180**, 956-967.e917 (2020).
82. A. Hegron *et al.*, Therapeutic antagonism of the neurokinin 1 receptor in endosomes provides sustained pain relief. *Proc Natl Acad Sci U S A* **120**, e2220979120 (2023).
83. R. E. Sorge *et al.*, Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat Neurosci* **18**, 1081-1083 (2015).
84. T. Del Rivero, R. Fischer, F. Yang, K. A. Swanson, J. R. Bethea, Tumor necrosis factor receptor 1 inhibition is therapeutic for neuropathic pain in males but not in females. *Pain* **160**, 922-931 (2019).
85. S. M. Jeon, D. Chang, A. Geske, D. D. Ginty, M. J. Caterina, Sex-Dependent Reduction in Mechanical Allodynia in the Sural-Sparing Nerve Injury Model in Mice Lacking Merkel Cells. *J Neurosci* **41**, 5595-5619 (2021).
86. X. Chen, G. Sooch, I. S. Demaree, F. A. White, A. G. Obukhov, Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now. *Cells* **9** (2020).
87. J. Wang *et al.*, The analgesic action of larixyl acetate, a potent TRPC6 inhibitor, in rat neuropathic pain model induced by spared nerve injury. *J Neuroinflammation* **17**, 118 (2020).
88. S. Xu *et al.*, Dexmedetomidine Alleviates Neuropathic Pain via the TRPC6-p38 MAPK Pathway in the Dorsal Root Ganglia of Rats. *J Pain Res* **15**, 2437-2448 (2022).
89. B. Miao *et al.*, The implication of transient receptor potential canonical 6 in BDNF-induced mechanical allodynia in rat model of diabetic neuropathic pain. *Life Sci* **273**, 119308 (2021).
90. J. M. Bráz, A. I. Basbaum, Differential ATF3 expression in dorsal root ganglion neurons reveals the profile of primary afferents engaged by diverse noxious chemical stimuli. *Pain* **150**, 290-301 (2010).

91. Y. Liu *et al.*, Sensory neuron-expressed TRPC3 mediates acute and chronic itch. *Pain* **164**, 98-110 (2023).
92. A. J. Todd, Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* **11**, 823-836 (2010).
93. T. Belkacemi *et al.*, TRPC1- and TRPC3-dependent Ca^{2+} signaling in mouse cortical astrocytes affects injury-evoked astrogliosis in vivo. *Glia* **65**, 1535-1549 (2017).
94. Y. Mizoguchi *et al.*, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces sustained intracellular Ca^{2+} elevation through the up-regulation of surface transient receptor potential 3 (TRPC3) channels in rodent microglia. *J Biol Chem* **289**, 18549-18555 (2014).
95. Y. Nakajima, K. Tsuchida, M. Negishi, S. Ito, S. Nakanishi, Direct linkage of three tachykinin receptors to stimulation of both phosphatidylinositol hydrolysis and cyclic AMP cascades in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **267**, 2437-2442 (1992).
96. Y. S. Bae *et al.*, Identification of a compound that directly stimulates phospholipase C activity. *Mol Pharmacol* **63**, 1043-1050 (2003).
97. C. J. Woolf, Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* **152**, S2-S15 (2011).
98. A. C. Zarpelon *et al.*, Spinal cord oligodendrocyte-derived alarmin IL-33 mediates neuropathic pain. *FASEB J* **30**, 54-65 (2016).
99. S. P. Gadani, J. T. Walsh, I. Smirnov, J. Zheng, J. Kipnis, The glia-derived alarmin IL-33 orchestrates the immune response and promotes recovery following CNS injury. *Neuron* **85**, 703-709 (2015).
100. S. Yamamoto, T. Hashidate-Yoshida, Y. Yoshinari, T. Shimizu, H. Shindou, Macrophage/microglia-producing transient increase of platelet-activating factor is involved in neuropathic pain. *iScience* **27**, 109466 (2024).
101. F. R. Fusco *et al.*, Cellular localization of TRPC3 channel in rat brain: preferential distribution to oligodendrocytes. *Neurosci Lett* **365**, 137-142 (2004).
102. J. Y. Than, L. Li, R. Hasan, X. Zhang, Excitation and modulation of TRPA1, TRPV1, and TRPM8 channel-expressing sensory neurons by the pruritogen chloroquine. *J Biol Chem* **288**, 12818-12827 (2013).
103. T. J. Shi *et al.*, Phospholipase C β 3 in mouse and human dorsal root ganglia and spinal cord is a possible target for treatment of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20004-20008 (2008).
104. P. Vachon, R. Massé, B. F. Gibbs, Substance P and neurotensin are up-regulated in the lumbar spinal cord of animals with neuropathic pain. *Can J Vet Res* **68**, 86-92 (2004).
105. A. Nitzan-Luques, M. Devor, M. Tal, Genotype-selective phenotypic switch in primary afferent neurons contributes to neuropathic pain. *Pain* **152**, 2413-2426 (2011).
106. D. Siniscalco *et al.*, Involvement of subtype 1 metabotropic glutamate receptors in apoptosis and caspase-7 over-expression in spinal cord of neuropathic rats. *Pharmacol Res* **57**, 223-233 (2008).
107. K. Vincent *et al.*, Intracellular mGluR5 plays a critical role in neuropathic pain. *Nat Commun* **7**, 10604 (2016).

108. A. B. Malmberg, A. I. Basbaum, Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* **76**, 215-222 (1998).
109. M. Petcu *et al.*, Role of kinin B1 and B2 receptors in a rat model of neuropathic pain. *Int Immunopharmacol* **8**, 188-196 (2008).