

〔原著〕 松本歯学 33 : 269~275, 2007

key words : 三叉神経節—炎症—遺伝子動態—イオンチャンネル—セカンドメッセンジャー

顎顔面領域における炎症モデルラット三叉神経節細胞の遺伝子発現動態 —カルモジュリンキナーゼと K⁺チャンネルの解析—

姫野 勝仁^{1,2}, 奥村 雅代², 田中 丈也², 時崎 匡史², 澁谷 徹^{1,2}, 金銅 英二²

¹松本歯科大学 歯科麻酔学講座

²松本歯科大学 大学院歯独立研究科 顎口腔機能制御学講座

Gene expression patterns in the rat trigeminal ganglion neurons
under orofacial inflammation.

—Calcium/calmodulin—dependent protein kinase II and potassium ion channel—

KATSUHIITO HIMENO², MASAYO OKUMURA¹, TAKEYA TANAKA¹, TADASHI TOKIZAKI¹,
TOHRU SHIBUTANI² and EIJI KONDO¹

¹Department of Dental Anesthesiology, School of Dentistry, Matsumoto Dental University

²Department of Oral and Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University

Summary

This study investigated functions of the K⁺ channel family K member3 (KCNK3) and Calmodulin kinase II β (CaMK II β) in rat trigeminal ganglion neurons under orofacial inflammation.

We investigated gene expression following orofacial inflammation in the rat trigeminal ganglion using complementary DNA microarray. Up-regulation of two molecule genes, KCNK3 and CaMK II β mRNAs were demonstrated. Therefore, we investigated the two molecules showing changes in gene expression, pattern and quantity over a 1-week time course after injection of Complete Freund's Adjuvant (CFA) to the rat upper lip. Trigeminal ganglion neurons, 3 days after CFA injection, expressed the two molecule mRNAs and strong staining was identified ipsilateral to the injection site by *in situ* hybridization histochemistry. Quantity of KCNK3 mRNA participated in the changes during orofacial inflammation. These data suggest that profound mechanisms are involved in the symptom.

緒 言

「痛み」は医療現場における重要な課題であり

「痛み」のメカニズム解明, 特に慢性疼痛の病態を解明することは急務とされている。それは, 慢性疼痛に対する適切な治療薬や治療法が確立され

ておらず, 多くの慢性痛に苦しむ患者が存在する為である。これらの患者は, 当該部位の機能障害のみならず痛みの原因が不明であることや長期的な症状を呈することなどから不安が増強し, 精神的な破綻をきたす場合もある。多数の医療機関を転々としたり, 痛みが激烈になると行動抑制が起きたり, さらに増悪すると鬱状態や自殺まで惹起してしまう場合もある^{1,2)}。

これまでに, 顎顔面領域における慢性疼痛メカニズムの解明を目指して起炎症物質 Complete Freund's Adjuvant (CFA) により発症した慢性炎症モデル動物を用いた研究が行なわれている³⁾。本実験モデル動物に関して, 熱刺激装置にて疼痛逃避行動を調べた結果, CFA 注入後, 1日から5日まで熱刺激による刺激開始から逃避するまでの時間(潜時)の短縮を認め, 本モデル動物が, 痛覚過敏やアロディニアを発症していることをこれまでに明らかにし, 他の研究グループと同様の知見を得ている³⁾。この結果を基に, CFA 注入3日後の動物から摘出した三叉神経節を用いて三叉神経系における遺伝子動態変化をマイクロアレイにて網羅的に解析してきた⁴⁾。このマイクロアレイチップの解析によると, 約420以上の遺伝子について遺伝子発現動態変化を認めた。特に, カルモジュリンキナーゼ II β (以下 CaMKII β) と K⁺チャンネルのひとつ (以下 KCNK3) の発現量は, CFA の注入によって著明に増加していた。

リン酸化酵素である CaMKII は, セロトニン生合成の律速酵素のトリプトファンヒドロキシラーゼがリン酸化の際に Ca²⁺/カルモジュリン複合体で活性化されたことより発見された⁵⁾。また, この CaMKII はマルチファンクション・プロテイン・キナーゼの一種とされ, 異なる発現型の α , β , γ , δ , で存在する約12のサブユニットからなる複合体である^{6,7)}。 α , β は神経細胞のみに発現しており特に脳・脊髄で観察される。CaMKII α および β は, 脳の海馬などの部位で記憶や学習, 特に Long-term potentiation (LTP: 長期増強) に関与すること, シナプス後膜に存在しイオンチャンネル, 神経伝達物質などをリン酸化することにより蛋白機能の調整を行うことでシナプス伝達に関与する事等, 多くの報告がある⁷⁻¹¹⁾。また, CaMKII α は炎症との関連性も報告されて

おり, カプサイシンを足底に投与した炎症ラットの脊髄後角でその蛋白量が増加することや中枢神経レベル(脊髄レベル)での過敏化に関与していることが明らかにされている¹¹⁾。その一方で, CaMKII β は, 炎症と関連する機能について未だ不明な点が多いが, CaMKII α と同様に脳や脊髄で観察されること⁷⁾より, 神経細胞の活動に関与している可能性は考えられる。

KCNK3 についての報告は少なく, 以前は TASK1 とも呼ばれていたが, 現在は KCNK3 で統一されている。Two-pore-domain K⁺チャンネルスーパーファミリーの1つとされ¹²⁻¹⁴⁾細胞外の pH, 酸素分圧, 揮発性の麻酔薬などの影響を受ける¹⁵⁾。このことは KCNK3 が炎症による患部の pH の低下に対して大きく感受性が変化する可能性があることを意味している¹⁶⁻¹⁹⁾。

本研究では CFA による慢性炎症モデル動物のマイクロアレイによる網羅的解析結果を基に CaMKII β および KCNK3 に着目し, この二つの分子と炎症時の疼痛メカニズムの関連性を解析することを目的に個々の細胞レベルにおける発現パターンを形態学的手法で追跡調査し, また経時的変化についても定量性に優れたリアルタイム PCR を行い解析した。

実験動物及び方法

1. *in situ* ハイブリダイゼーション

1) 実験動物

6週齢の Sprague Dawley 系 (SD) 雄性ラット (200~250g) を用いた。動物に三叉神経第2枝領域である左側上口唇に CFA (Sigma, Missouri, USA) と生理食塩水を 1:1 で混合したものを 50 μ l 注入し, 炎症モデル動物を作製した^{3,20-22)}。また, コントロール動物として生理食塩水を左側上口唇に 50 μ l 注入したモデルも作製した。これらの動物は CFA を注入したものを CFA 群, 生理食塩水を注入したものを生食群とした。尚, 本実験は松本歯科大学実験動物委員会の承諾 (048-06) を得て行った。

2) 組織の摘出

CFA 注入3日後, ジエチルエーテル (ナカライテスク, 京都, 日本) にて深麻酔後, 剪刀にて断頭し, 大後頭孔より頭蓋骨上部を切除し大脳, 小脳部を除去した。脳底部の脳硬膜を丁寧に剥離

し三叉神経節を剖出し、各枝を切断し摘出し *in situ* ハイブリダイゼーションに供した。

摘出した組織、CFA 注入後3日目のラット6匹の三叉神経節は粉末状ドライアイスにて凍結し、クライオスタットにて新鮮凍結切片(8 μ m)を作製し、シランコーティングしたスライドガラス(MATSUNAMI社製MSコート、大阪、日本)に順次貼付した。また、生理食塩水注入モデル6匹も同様の処置を行った。

3) ハイブリダイゼーション反応と可視化反応

切片は、4%ホルムアルデヒド燐酸緩衝液(4% Formaldehyde in 0.1M Phosphate buffer, 4% FA in 0.1M PB)にて固定を行い、燐酸緩衝液(0.1M PB)にて洗浄後、プロテアーゼK処理(5mg/ml proteinase K, 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM EDTA), アセチル化処理(0.1M Triethanolamine, 24mM Acetic anhydride), エタノール系列による脱水、乾燥と前処理をした。次に hybridization buffer (20mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.3M NaCl, 5mM EDTA, 10% Dextran sulfate, 1 x Denhart solution, 0.2% sarcosyl, 0.25mg/ml yeast tRNA, 0.4mg/ml salmon testis DNA, 20mM DTT) によるプレハイブリダイゼーションをおこなった(55°C, 1時間)。さらにジゴキシゲニン(Digoxigenin; DIG)標識したRNAプローブを作製し、このRNAプローブを含む(0.25-1ng/ μ l) hybridization buffer により、ハイブリダイゼーション反応をおこなった(55°C, 16-20時間)。RNAプローブは、cDNAをpGEM-T-Easy Vector (Promega, West Indiana, USA)に組み込んだものをRNAポリメラーゼSP6 (Promega)またはRNAポリメラーゼT7 (Promega)にてDIG RNA labeling Mix (Roche, Basel, Switzerland)存在下で転写して作製した。RNAプローブには、BLAST検索(National Center for Biotechnology Information; NCBI, Washington, USA)により他の分子との相同性の低い領域を選び出し、以下の領域を用いた。CaMKII β (NM_021739; GenBank, USA), 936-1303 bp; KCNK3 (NM_033376; GenBank), 926-1352 bp。

次に5 x SSC (0.75M NaCl, 75mM Sodium citrate; 65°C, 30分), High stringency buffer (50% Formamide, 75mM NaCl, 7.5mM So-

dium citrate; 65°C, 30分), Wash buffer (10mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA, 0.5M NaCl; 37°C, 10分, 3回)と洗浄し、RNase処理(20 μ g/ml RNase in Wash buffer; 37°C, 30分)の後、再度洗浄した(High stringency buffer; 65°C, 30分)。

さらに、アルカリフォスファターゼ標識された抗DIG抗体(Roche)にて免疫組織反応をおこなない(4°C, 12時間)、洗浄(100mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 0.2% Tween 20; 室温, 15分, 4回)した後に、発色反応をおこなった(0.45mg/ml nitro-blue tetrazolium chloride, 0.175mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphatase, 100mM Tris-HCl (pH 9.5), 0.1M NaCl, 50mM MgCl₂)。適度に発色したところでカバーガラスをかけて封入し、光学顕微鏡(OLYMPUS BX-51, 東京、日本)で観察した。

2. リアルタイム PCR

1) 実験動物

1. の実験と同様にモデル動物を作製した。

2) 組織の摘出

三叉神経節を1, 3, 5, および7日の各タイムコースの条件下で摘出し、すぐに左右別に1, 2枝領域を単離した。なお、各タイムポイントでは4~6匹を使用した。

3) リアルタイム PCR

これら組織のtotal RNAは、TRIZOL (Invitrogen社, California, USA)を用いて指定の方法により抽出・精製した。次にM-MLV逆転写酵素(Invitrogen社)を用いて指定の方法によりcDNAを合成した。プライマーとプローブはBLAST検索(NCBI)により他の分子との相同性の低い領域を選び出し、そこからprimer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Massachusetts, USA)にて設計したものを合成依頼した(日本バイオサービス, 埼玉, 日本)。検出領域はそれぞれ、CaMKII β (NM_021739; GenBank), 増幅1009-1161 bp, プローブ1115-1141 bp; KCNK3 (NM_033376; GenBank), 増幅1043-1168 bp, プローブ1094-1115 bpを用いた。

リアルタイム PCRは、Ex Taq R-PCR Kit Version 2.1 (TaKaRa, 滋賀, 日本)を用いて、

熱変性 (95°C, 2分), 増幅 (95°Cで15秒, その後60°Cで30秒, 80サイクル) の反応条件で行い, リアルタイム PCR 解析システム (DNA Engine Opticon™ System Bio-Rad, California, USA) にて測定及び解析をおこなった. 尚, インターナルコントロールとして cDNA マイクロアレイにて発現変動の見られなかった β アクチンを用いた.

3. 統計処理

統計データの解析は, Dr. SPSSII for Windows (エス・ピー・エス・エス, 東京, 日本) を用い

た. クラスカル・ウォリスの検定にて多重比較を行い, $p < 0.05$ を有意とした.

結 果

1. *in situ* ハイブリダイゼーション (Fig. 1, 2)

CFA 注入3日後と生理食塩水注入3日後の三叉神経節を用いて, *in situ* ハイブリダイゼーションを行った. その結果, 三叉神経節において神経細胞のほぼ全てに CaMKII β 及び KCNK3 の発色反応がみられた. しかし, CaMKII β 及び KCNK3 共に生食群 (ipsi) と CFA 群 (ipsi) を比較すると CFA 群 (ipsi) が濃く染色する傾向

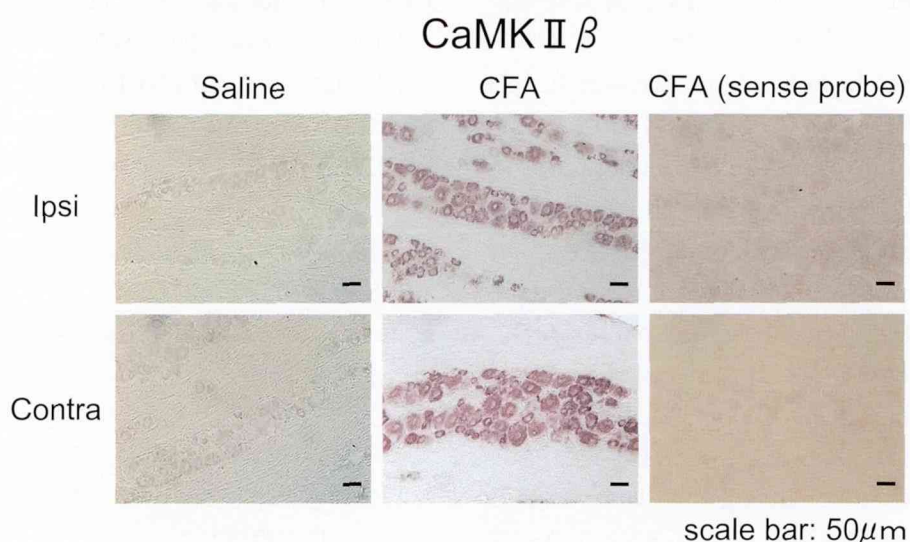


Fig.1: 注入後3日目の三叉神経節における CaMKII β mRNA 局在.

上段が注入側 (Ipsi), 下段が非注入側 (Contra) を示す. 左側が生食注入, 中央が CFA 注入 (右側が sense probe) の組織像を示す.

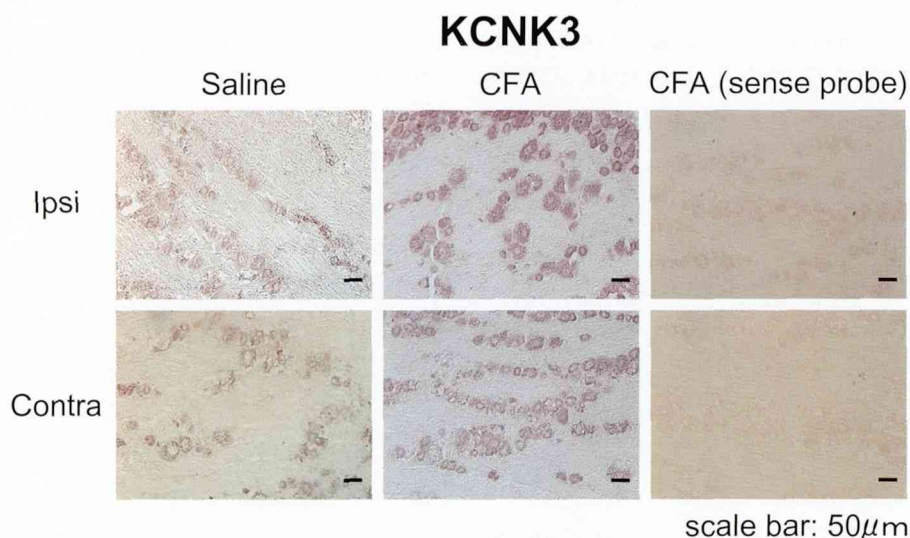


Fig.2: 注入後3日目の三叉神経節における KCNK3 mRNA 局在.

上段が注入側 (Ipsi), 下段が非注入側 (Contra) を示す. 左側が生食注入, 中央が CFA 注入 (右側が sense probe) の組織像を示す.

が明らかになった。また、その傾向は対側（非注入側：contra）も同様であり、左右差は認められなかった。なお、センスプローブを用い反応すると、CaMKII β 及びKCNK3共に全く染色されなかった。

2. リアルタイム PCR (Fig. 3, 4)

CFA 群の注入側 (ipsi) における三叉神経節の1, 2枝支配領域から抽出したRNAについて、そこに含まれる mRNA の量をリアルタイム PCR によって測定した。その結果 CaMKII β については、1日, 3日, 5日, 7日を通じて有意な変動は見られず、非注入側 (contra) との差も認められなかった。KCNK3 についても有意差

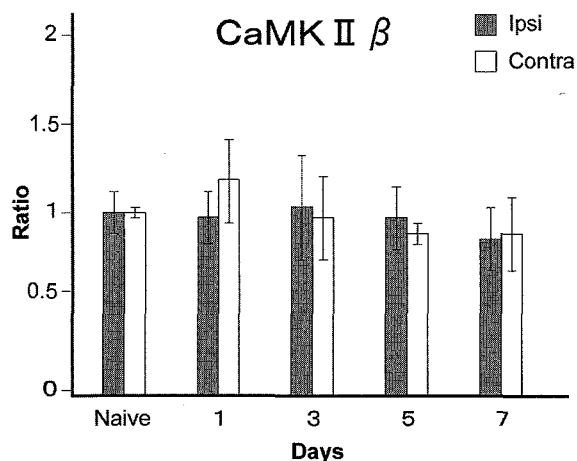


Fig.3: Real-time PCR における CaMKII β の mRNA 量の測定結果。灰色の棒グラフが、注入側 (Ipsi), 白色の棒グラフが非注入側 (Contra) を示す。値は、無処置 (naive) に対する相対比として示した。

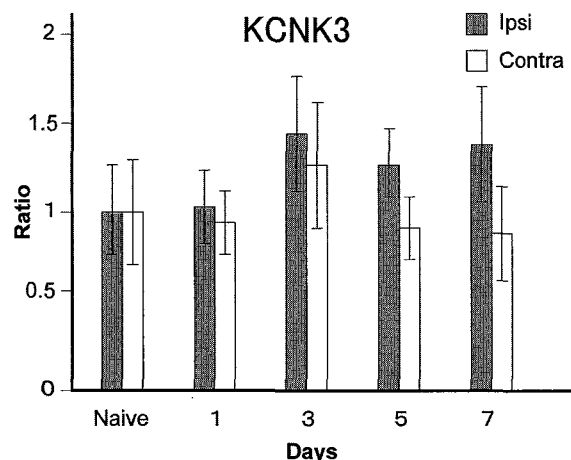


Fig.4: Real-time PCR における KCN K3 の mRNA 量の測定結果。灰色の棒グラフが、注入側 (Ipsi), 白色の棒グラフが非注入側 (Contra) を示す。値は、無処置 (naive) に対する相対比として示した。

は検出されないものの、注入側においては、3日, 5日, 7日で上昇傾向が見られた。 β -アクチンについても測定を行い、これについても明らかな発現量の変動は見られないことを確認した (データは提示せず)。

考 察

今回の *in situ* ハイブリダイゼーションの結果について3日後での反応は、生食群に比べ、CFA 群の全細胞で濃い発色反応を示した。これは、マイクロアレイで得た結果である3日後の注入側で CaMKII β 3.34倍、KCNK3 4.15倍を示したデータと同じ傾向であった。三叉神経節はサイズ、性質等の異なる神経細胞の集合体であるが、CaMKII β , KCN K3 の発現は、全神経細胞に認められ、特定の性質の神経細胞のみに発現している分子ではないことが考察される。また、CFA 群の強い発色反応は非注入側においてもほぼ同程度に観察され、局所の CFA による炎症が全身性の反応を惹起し、神経細胞に影響を与えている可能性が示唆される。また、注入側、非注入側に差を認めなかった別の理由として、CFA 投与による刺激が中枢神経系に伝達された結果、上位中枢から下行性の反応が両側の三叉神経中枢枝を刺激あるいは抑制し、それが原因となり注入側、非注入側に差が認められなくなった可能性も考えられる。

他の報告において中枢神経系での中枢性過敏のメカニズムにおける CaMKII の役割が確認されている¹¹⁾ことや、KCNK3 は、pH 依存性¹⁶⁻¹⁹⁾という特殊なチャネル構造から炎症における pH 低下などが影響していると思われる、痛みや炎症との関連性は高いと考えられる。

今回、CaMKII β 及び KCN K3 は両者共に炎症による疼痛伝達との関連は *in situ* ハイブリダイゼーションの結果から疑われたものの、リアルタイム PCR 法による解析では有意差はみられなかった。

この原因として、各実験 (*in situ* ハイブリダイゼーション, リアルタイム PCR, cDNA マイクロアレイ) それぞれに使ったプローブ等の検出領域の差が挙げられる。検出領域の差は、領域が異なっている、もしくは領域が重複していても完全に一致するものではないため、選択的スプライ

シングの存在などの影響により結果そのものや、検出効率が増加する可能性がある。また、炎症に対する応答としてのこれら分子の発現変動が、そもそも不安定であるという可能性も考えられる。現段階では、リアルタイム PCR において経時的変化が検出できなかった理由は不明であり、これらの可能性については、さらに詳細な解析が必要である。

結 論

CaMKII β , KCNK3 とも cDNA マイクロアレイや *in situ* ハイブリダイゼーションの結果では、炎症による疼痛逃避行動試験において潜時減少のピークを示した 3 日目のデータと一致した経過時間に発現量の上昇が確認された。このことより、炎症時の何らかの役割を担っていることが示唆された。しかし、リアルタイム PCR の結果において経時的発現動態変化を明らかに出来なかった。この結果より選択的スプライシング等の可能性について、さらに詳細な解析と確認が必要であろう。また、これらの分子の発現の変動が直接、疼痛に関連するものであるかどうかについても別途解析、確認を進める必要があるといえる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に際し適切な助言とご指導を賜りました松本歯科大学総合歯科医学研究所 硬組織疾患制御学部門 平岡行博教授に深く謝意を表します。

文 献

- 1) 金銅英二, 井川雅子, 正司喜信 (2006) 口腔歯科領域の痛みの鑑別と治療-非定型顔面痛と非定型歯痛を中心に- 痛みと臨床 **6**: 23-9.
- 2) Ikawa M, Yamada K and Ikeuchi S (2006) Efficacy of amitriptyline for treatment of somatoform pain disorder in the orofacial region: A case series. *J Orofac Pain* **20**: 234-40.
- 3) Imbe H, Iwata K, Zhou QQ, Zou S, Dubner R and Ren K (2001) Orofacial deep and cutaneous tissue inflammation and trigeminal neuronal activation. Implications for persistent temporomandibular pain. *Cells Tissue Organs* **169**: 238-47.
- 4) 金銅英二 (2006) 痛み研究のアプローチ. 第 1 版: 79-87, 真興交易医書出版部, 東京
- 5) Yamauchi T and Fujisawa H (1979) Activation of tryptophan 5-monooxygenase by calcium-dependent regulator protein. *Biochem Biophys Res Commun* **90**: 28-35.
- 6) Hudmon A and Schulman H (2002) Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* **15**: 593-611.
- 7) Colbran RJ and Brown AM (2004) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **3**: 318-27.
- 8) Means AR, Vanberkum MF, Bagchi I, Lu KP and Ramussen CD (1991) Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacol Ther* **50**: 255-70.
- 9) Butler LS, Silva A J, Abeliovich A, Watanabe Y, Tonegawa S, and McNamara JO (1995) Limbic epilepsy in transgenic mice carrying a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II alpha-subunit mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* **18**: 6852-5.
- 10) Barria A, Muller D, Derkach V, Griffin LC and Soderling TR (1997) Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* **27**: 2042-5.
- 11) Fang L, Wu J, Lin Q and Willis WD (2002) Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II contributes to spinal cord central sensitization. *Neurosci* **15**: 4196-204.
- 12) Talley EM, Sirois JE, Lei Q and Bayliss DA (2003) Two-pore-Domain (KCNK) potassium channels. dynamic roles in neuronal function. *Neuroscientist* **9**: 45-56.
- 13) Karschin C, Wischmeyer E, Preisig-Muller R, Rajan S, Derst C, Grzeschik KH, Daut J and Karschin A (2001) Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K⁺ channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system. *Mol Cell Neurosci* **18**: 632-48.
- 14) O'Connell AD, Morton MJ and Hunter M (2002) Two-pore domain K⁺ channels-molecular sensors. *Biochim Biophys Acta* **1566**: 152-6.
- 15) Lesage F (2003) Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology* **44**: 1-7.
- 16) Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C and Lazdunski M (1997) TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J*

- 16 : 5464-71.
- 17) Leonoudakis D, Gray AT, Winegar BD, Kindler CH, Harada M, Taylor DM, Chavez RA, Forsayeth JR and Yost CS (1998) An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. *J Neurosci* **18** : 868-77.
 - 18) Lopes CM, Gallagher PG, Buck ME, Butler MH and Goldstein SA (2000) Proton block and voltage gating are potassium dependent in the cardiac leak channel *Kcnk3*. *J Biol Chem* **275** : 16969-78.
 - 19) Morton MJ, O'Connell AD, Sivaprasadarao A and Hunter M (2003) Determinants of pH sensing in the two-pore domain K^+ channels TASK1 and-2. *Pflugers Arch* **445** : 577-83.
 - 20) Ogawa A, Ren K, Tsuboi Y, Morimoto T, Sato T and Iwata K (2003) A new model of experimental parotitis in rats and its implication for trigeminal nociception. *Exp Brain Res* **152** : 307-16.
 - 21) Iwata K, Tashiro A, Tsuboi Y, Imai T, Sumino R, Morimoto T, Dubner R and Ren K (1999) Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. *J Neurophysiol* **82** : 1244-53.
 - 22) Imbe H and Ren K (1999) Orofacial deep and cutaneous tissue inflammation differentially upregulates preprodynorphin mRNA in the trigeminal and paratrigeminal nuclei of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* **6** : 87-97.