Noradrenaline stimulates ATP leakage out from DRG cells by inducing cell death

Takeshi Kanno, Hirokazu Fujikawa, and Tomoyuki Nishizaki

Department of Physiology, Hyogo College of Medicine

[Received 22 December 2006, Accepted 21 February 2007]

Abstract

The present study explored the origin of ATP, to activate P2X receptors relevant to pain, in the dorsal root ganglion (DRG). Noradrenaline, released in association with sympathetic nerve sprouting into the DRG after peripheral nerve injury, is thought to be a factor for neuropathic pain. In the MTT assay, noradrenaline reduced viability of cultured DRG cells in a concentration (10 – 300 μ M) and treatment time (24 – 72 hr)–dependent manner. Interestingly, glial cells and fibroblasts were TUNEL–positive, while neurons were TUNEL–negative, indicating that noradrenaline induces necrosis in neurons and apoptosis in glial cells and fibroblasts in the DRG. Noradrenaline (48–hr treatment) increased ATP release from cultured DRG cells in a concentration (10 – 300 μ M)–dependent manner, the range being consistent with that for noradrenaline–induced cell death. Taken together, the results of the present study suggest that noradrenaline, released from sprouting sympathetic nerve terminals after peripheral nerve injury, stimulates ATP leakage out from DRG cells by inducing cell death. This provides fresh insight into the relation between noradrenergic transmission and P2X receptors in pain pathway.

Key words: ATP leakage; Noradrenaline; Dorsal root ganglion; Cell death

PAIN RESEARCH 22 (2007) 127–131

ノルアドレナリンは DRG 細胞死を誘導することにより ATP を漏出する

菅野 武史／藤川 浩一／西崎 知之

兵庫医科大学 生理学第二講座

はじめに

神経因性疼痛は神経損傷などが原因で発症し、非ステロイド系抗炎症薬およびモルヒネに抵抗性の難治性慢性疼痛である。神経因性疼痛メカニズムの全容は解明されていないが、その 1 つの要因

として末梢神経傷害後に認められる交感神経の後根神経節 (DRG) への発芽 (sprouting) が指摘されている^{7,11)}。交感神経発芽にともなって放出されるノルアドレナリンは痛覚伝達路の中継点となる DRG 神経細胞の興奮性を高め、アロディニアを含む神経因性疼痛の発症に関与すると考えられてい

る¹⁾。また、交感神経ブロックにより痛みが緩和されるという事実は疼痛におけるノルアドレナリンの関与を示唆している^{2,3)}。

最近、細胞内のエネルギー源である ATP が神経因性疼痛発症に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた⁵⁾。ATP 受容体はイオンチャネル型受容体 (P2X) と G タンパク質共役型受容体 (P2Y) の 2 つに分類され、P2X 受容体は DRG や脊髄後角に豊富に発現しており、痛覚伝達の一端を担っている可能性がある⁴⁾。興味あることに、P2X 受容体サブタイプである P2X₄ 受容体の発現がアロディニアモデル動物の脊髄ミクログリアで増加すると報告されている⁹⁾。また、坐骨神経傷害後に DRG に発現するアドレナリン受容体 mRNA が増加し、ノルアドレナリン処理により DRG 神経細胞の P2X 受容体反応が増強されることが示されている⁶⁾。この事実は、DRG への交感神経発芽と P2X 受容体活性化が神経因性疼痛発症に深く関与していることを示唆している。しかし、DRG において P2X 受容体アゴニストである ATP の起原は不明である。本研究は、ノルアドレナリンが DRG 細胞死を誘導し、その結果、細胞が破壊されることにより ATP が放出されるかを検討したので報告する。

方 法

1. 使用細胞

Wistar ラットの L4～6 の DRG から単離した培養細胞、神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞および正常ヒトアストロサイト NHA 細胞を用いた。

2. 細胞生存率定量

3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-

tetrazolium bromide (MTT) 法により細胞生存率を定量した。

3. 免疫細胞化学染色

DRG 培養細胞に対し、抗 MAP2 抗体、抗 GFAP 抗体、抗 fibronectin 抗体を用いた免疫細胞化学染色を行い、DRG 神経細胞、グリア細胞、線維芽細胞を同定した。

4. アポトーシス判定

DRG 細胞死がアポトーシスであるかを判定するため、TUNEL 染色を行い共焦点顕微鏡で判定した。

5. ATP 定量

細胞死によって細胞が破壊された結果、細胞内 ATP が細胞外に漏出するかどうかを検討するため、DRG 培養上清に含まれる ATP の量を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いて定量した。

結 果

1. ノルアドレナリン誘導細胞死

ノルアドレナリンは DRG 細胞生存率を濃度依存性 (10～300 μ M)、処理時間依存性 (24～72 hr) に低下させた (**Fig.1A**)。12 時間のノルアドレナリン (300 μ M) 処理後に TUNEL 染色を行ったところ、神経細胞は TUNEL 染色に対して陰性であり、グリア細胞および線維芽細胞は TUNEL 染色に対して陽性であった (**Fig.1B**)。

ノルアドレナリンは DRG 細胞だけでなく、SK-N-SH 細胞および NHA 細胞の生存率を濃度依存性、処理時間依存性に低下させる働きがあった (**Fig.2**)。

Fig.1 Noradrenaline induces DRG cell death.

(A) Cultured DRG cells were treated with noradrenaline at concentrations ranging from 0 to 300 μM for 24, 48, and 72 hr, followed by an MTT assay. In the graph, each point represents the mean ($\pm$ S.E.M.) percentage of control (viability for untreated cells) ($n=4$). (B) Cells treated with noradrenaline at 300 μM for 12 hr were labeled with TUNEL. Glial cells and fibroblasts were TUNEL-positive (arrows), while neurons were TUNEL-negative. Bar, 50

2. 細胞死に伴う ATP 漏出

次に、細胞外 ATP 量に対するノルアドレナリンの効果を検討した。48 時間のノルアドレナリン処理により、細胞外 ATP 量はノルアドレナリン濃度依存性 (10 ~ 300 μM) に増加した (Fig.3)。同様に、SK-N-SH 細胞および NHA 細胞においてもノルアドレナリン処理により濃度依存性に細胞外 ATP 量が増加した (Fig.4)。

Fig.2 Noradrenaline reduces viability of SK-N-SH (A) and NHA cells (B).

Cells were treated with noradrenaline at concentrations as indicated for 48, 72, and 96 hr, and then an MTT assay was carried out. In the graph, each point represents the mean ($\pm$ S.E.M.) percentage of control (viability for untreated cells) ($n=4$).

考 察

神経因性疼痛の発症機序の 1 つとして、末梢神経損傷後に認められる交感神経の DRG への発芽が示唆されている。また、最近の研究で、疼痛経路における P2X 受容体の役割が解明されつつある。坐骨神経傷害後に P2X 受容体の発現レベルが上昇することや、P2X 受容体アンタゴニストや siRNA を用いた P2X 遺伝子ノックダウンにより疼痛が抑制されることが知られている^{8,10)}。しかし、DRG において P2X 受容体の生体内活性化物

Fig. 3 Noradrenaline induces ATP leakage from DRG cells.

Cultured DRG cells were treated with noradrenaline (10 – 300 μM) for 48 hr in the presence of cytidine 5'-triphosphate (CTP) (500 μM), a broad inhibitor of ATPases, and ATP leaked in extracellular solution was measured with the HPLC system. Each point represents the mean ($\pm$ S.E.M.) ATP amount per 1 h (pmol/h) ($n=4$).

質、ATP がどの細胞からどのような機構で細胞外へ放出されるのかは全く不明であった。

本研究結果により、ノルアドレナリンは DRG 神経細胞に対してはネクローシスを、グリア細胞および線維芽細胞に対してはアポトーシスを誘導することにより、DRG 細胞死を誘導した。また、ノルアドレナリンは DRG 培養細胞における細胞外 ATP 濃度を増加させた。このノルアドレナリンの作用は、SK-N-SH 細胞および NHA 細胞でもみられたことから、ノルアドレナリンは種々の細胞でこれらの作用を発揮することが判明した。注目すべきことに、ノルアドレナリン処理による細胞外 ATP 濃度上昇の有効濃度は細胞死が起こる濃度範囲と一致していた。以上の結果は、ノルアドレナリンが細胞死を誘導し、ATP を漏出することを示唆している。

DRG における ATP 起源に関して、本研究結果は次の結論に到達する；末梢神経損傷後に交感神経が DRG へ発芽し、そこで放出されるノルアドレナリンが DRG 細胞死を誘導し、細胞死にとも

Fig. 4 Noradrenaline induces ATP leakage out from SK-N-SH (A) and NHA cells (B).

Cells were treated with noradrenaline at concentrations as indicated for 48 hr in the presence of CTP (500 μM), and ATP leaked in extracellular solution was measured with the HPLC system. Each point represents the mean ($\pm$ S.E.M.) ATP amount per 1 h (pmol/h) ($n=4$).

なう細胞破壊により ATP が漏出する (Fig.5)。細胞外へ漏出した ATP は P2X 受容体を活性化し、疼痛経路に参加すると考えられる。さらに、ノルアドレナリンは末梢神経損傷後に DRG において発現が増加する Gq タンパク質共役型 α_{1b} アドレナリン受容体シグナルを介して P2X 受容体反応を増大させ⁵⁾、疼痛を増幅させているかもしれない。このように、ノルアドレナリンは疼痛経路において ATP 漏出ならびに P2X 受容体活性化・修飾に重要な役割を果たしている。

Fig.5 Schematic diagram for ATP leakage out from DRG cells induced by noradrenaline. NA, noradrenaline; P2XR, P2X receptor.

文 献

- 1) Chung, J.M., Chung, K., Importance of hyper-excitability of DRG neurons in neuropathic pain, *Pain Pract.*, 2 (2002) 87-97.
- 2) Dunn, D., Chronic regional pain syndrome, type 1: part I, *AORN J.*, 72 (2000) 422-432.
- 3) Dunn, D.G., Chronic regional pain syndrome, type 1: part II, *AORN J.*, 72 (2000) 643-651.
- 4) Kennedy, C., P2X receptors: targets for novel analgesics? *Neuroscientist*, 11 (2005) 345-356.
- 5) Khakh, B.S., North, R.A., P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease, *Nature*, 442 (2006) 527-532.
- 6) Maruo, K., Yamamoto, H., Yamamoto, S., Nagata, T., Fujikawa, H., Kanno, T., Yaguchi, T., Maruo, S., Yoshiya, S., Nishizaki, T., Modulation of P2X receptors via adrenergic pathways in rat dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury, *Pain*, 120 (2006) 106-112.
- 7) McLachlan, E.M., Janig, W., Devor, M., Michaelis, M., Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia, *Nature*, 363 (1993) 543-546.
- 8) North, R.A., P2X₃ receptors and peripheral pain mechanisms, *J. Physiol.*, 554 (2004) 301-308.
- 9) Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., Inoue, K., P2X₄ receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury, *Nature*, 424 (2003) 778-783.
- 10) Ueno, S., Yamada, H., Moriyama, T., Honda, K., Takano, Y., Kamiya, H.O., Katsuragi, T., Measurement of dorsal root ganglion P2X mRNA by SYBR Green fluorescence, *Brain Res. Protoc.*, 10 (2002) 95-101.
- 11) Zhou, X.F., Deng, Y.S., Chie, E., Xue, Q., Zhong, J.H., McLachlan, E.M., Rush, R.A., Xian, C.J., Satellite-cell-derived nerve growth factor and neurotrophin-3 are involved in noradrenergic sprouting in the dorsal root ganglia following peripheral nerve injury in the rat, *Eur. J. Neurosci.*, 11 (1999) 1711-1722.

Address for correspondence: Tomoyuki Nishizaki
 Department of Physiology, Hyogo College of Medicine
 1-1 Mukogawa-cho, Nishinomiya 663-8501, Japan
 Tel: +81-798-45-6399 / Fax: +81-798-45-6649
 E-mail: tomoyuki@hyo-med.ac.jp