

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18882

研究課題名(和文)過敏性腸症候群におけるT型カルシウムチャネルの機能変化と制御因子の影響

研究課題名(英文)The functional changes of Cav3.2 T-type Ca<sup>2+</sup> channel and its regulatory factors in a mouse model for irritable bowel syndrome

研究代表者

坪田 真帆(Tsubota, Maho)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：90510123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、マウスのbutyrate誘起IBSモデルでは、Cav3.2 T-channelの機能亢進が起こっており、これによってTRPV1の直接刺激あるいはPAR2刺激を介する間接的活性化、さらにTRPA1刺激に対する結腸痛覚過敏が生じている可能性が示唆された。本知見は、IBSの発症にかかわる分子メカニズムを解明するための重要な示唆を与えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study suggest that functional upregulation of Cav3.2 T-channel has occurred in the mice with butyrate-induced IBS, and thereby direct stimulation of TRPV1, indirect activation via PAR2 stimulation, and TRPA1 stimulation might contribute to colonic hyperalgesia. These findings demonstrate that an important suggestion for elucidating the molecular mechanism of the onset of IBS.

研究分野：薬理学

キーワード：Cav3.2 過敏性腸症候群

### 1. 研究開始当初の背景

T型  $Ca^{2+}$ チャネルは中枢および末梢神経系において神経興奮を制御し、てんかんや痛みの病態に関与するほか、心血管障害やがんにも関与することが示唆されている。T型  $Ca^{2+}$ チャネルの3つのサブタイプ ( $Ca_v3.1\sim3.3$ )のうち、 $Ca_v3.2$ は侵害受容ニューロンに豊富に発現しており、痛みの情報伝達において重要な役割を担うことが私達のグループを含む複数の研究者により証明されている。 $Ca_v3.2$ はドメインに存在する191番目のヒスチジン残基に結合する亜鉛により恒常的に抑制されており、L-システインや $H_2S$ はこの亜鉛による抑制を解除することでチャネル機能を亢進すると考えられている。

過敏性腸症候群は、明確な基質的病変を伴わず、便秘または下痢と、腹痛や腹部不快感が慢性的に繰り返される疾患で、有効な治療薬の開発が望まれている。過敏性腸症候群(IBS)に伴う結腸痛の発現には侵害受容ニューロン上に発現する transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)、transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) および proteinase-activated receptor 2 (PAR2) などの膜タンパクが関与することが知られている。私達は、結腸内腔の硫化水素 ( $H_2S$ ) が  $Ca_v3.2$  を介して内臓痛を誘起することを世界に先駆けて明らかにし、その後、ラットの butyrate 誘起 IBS モデルにおける結腸痛覚過敏の発現に、 $Ca_v3.2$  が重要な役割を果たすことが仏国のグループにより報告された。

### 2. 研究の目的

本研究では、ブチル酸ナトリウム誘起過敏性腸症候群のマウスモデルを新たに作成し、 $Ca_v3.2$  の機能変化と TRPV1、TRPA1 および PAR2 との相互関係を検討した。

### 3. 研究の方法

1) 過敏性腸症候群モデルマウスの作製  
ddY系、C57BL/6J系および  $Ca_v3.2$  knockout (KO) マウスに butyrate 20あるいは60  $\mu\text{mol}/\text{mouse}$  を50  $\mu\text{L}$  の用量で朝夕1日2回3日間計6回反復結腸内投与を行った。

#### 2) 結腸痛様行動の評価

各試薬結腸内投与および高容量の水の結腸内投与による結腸伸展刺激後に見られる、下腹部への舐め行動の回数を30分間カウントすることで内臓痛様行動を評価した。

#### 3) von Frey filaments による関連痛覚過敏の評価

Butyrate 結腸内投与開始日から、von Frey filament を用いてマウスの下腹部にお

ける機械的刺激に対する反応を観察した。

### 4. 研究成果

#### 1) Butyrate 結腸内投与により誘起される腹部関連痛覚過敏の経時的变化

マウスに butyrate 20 または 60  $\mu\text{mol}/\text{mouse}$  を50  $\mu\text{L}$  の用量で朝夕1日2回3日間計6回反復結腸内投与し、von Frey test により腹部関連痛覚過敏を評価した。Butyrate 20  $\mu\text{mol}/\text{mouse}$  では有意な痛覚過敏は見られなかったが、60  $\mu\text{mol}/\text{mouse}$  の用量では投与開始翌日から関連痛覚過敏が認められ、これは6日後に最大となったのち、14日後には消失していた(図1)。

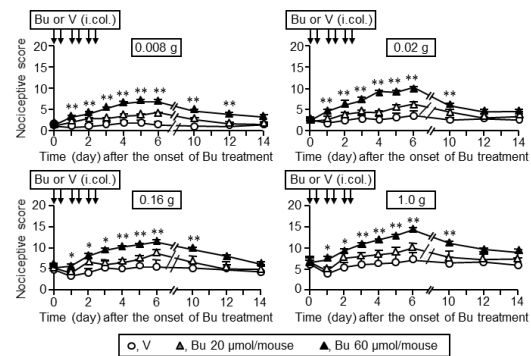


図1 Butyrate 結腸内投与により誘起される腹部関連痛覚過敏の経時的变化

#### 2) マウスの結腸粘膜に対する butyrate 反復結腸内投与の影響

Butyrate 投与3日後および6日後に摘出した結腸の長さおよび湿重量はコントロール群と比べて変化は見られなかった。一方、Hematoxylin-Eosin 染色画像において、butyrate 投与3日後に、若干の炎症性細胞の浸潤が認められたが、6日後にはほとんど消失していた。よって、butyrate 投与6日後以降のマウスは、粘膜病変を伴わない結腸痛を示すIBSモデルとして有用であることが裏付けられた。

#### 3) Butyrate 誘起 IBS モデルマウスにおける腹部関連痛覚過敏に対する T-channel 阻害薬および $Ca_v3.2$ ノックダウンの効果

Butyrate 誘起 IBS モデルマウスにおける下腹部関連痛覚過敏は、各種 T-channel 阻害薬および  $Ca_v3.2$  ノックダウンにより焼失した(図2)。

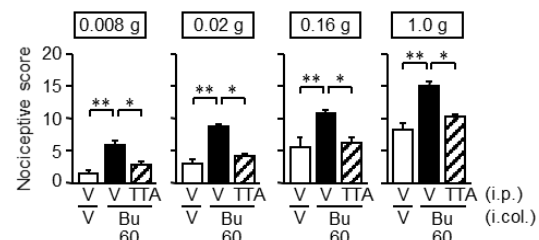


図2 Butyrate 誘起 IBS モデルマウスにお

る腹部関連痛覚過敏に対する T-channel 阻害薬の効果

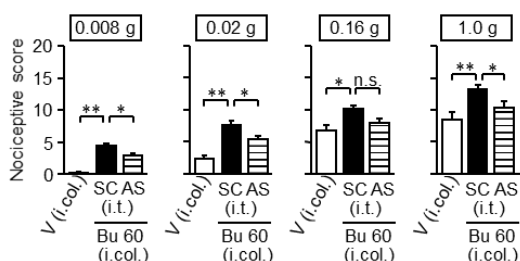


図3 Butyrate 誘起 IBS モデルマウスにおける腹部関連痛覚過敏に対する  $Ca_v3.2$  ノックダウンの効果 (AS;  $Ca_v3.2$  アンチセンス、SC; スクランブル)

4)  $Ca_v3.2$  ノックアウトマウスにおける butyrate 結腸内投与の効果

C57BL6J マウスに、butyrate を反復結腸内投与したところ、投与開始 2 日～6 日後にかけて下腹部における関連痛覚過敏が認められたが、 $Ca_v3.2$  ノックアウトマウスに butyrate を投与しても関連痛覚過敏は全く認められなかった。また、butyrate 処置マウスに、結腸伸展刺激を与えたところ、野生型マウスでは、明らかな結腸痛様行動が検出されたが、 $Ca_v3.2$  ノックアウトマウスで痛み行動は全く認められなかった。これらのことから、butyrate 誘起 IBS マウスの関連痛覚過敏および結腸伸展過敏に  $Ca_v3.2$  が関与することが明らかとなった。

5) Butyrate 処置マウスに対する  $H_2S$  供与体  $Na_2S$ 、TRPV1 刺激薬 capsaicin、TRPA1 刺激薬 allyl isothiocyanate あるいは PAR2 活性化ペプチド SLIGRL-NH<sub>2</sub> の結腸内投与の効果

Butyrate 処置マウスでは、 $H_2S$  供与体  $Na_2S$ 、TRPV1 刺激薬 capsaicin、TRPA1 刺激薬 allyl isothiocyanate あるいは PAR2 活性化ペプチド SLIGRL-NH<sub>2</sub> の結腸内投与により誘起される結腸痛様行動が明らかに増加し、これらはすべて T-channel 阻害薬あるいは  $Ca_v3.2$  ノックダウンにより抑制された。以上より、butyrate 誘起 IBS マウスでは、 $Ca_v3.2$  の機能亢進によって、結腸の伸展刺激や化学的刺激に対する知覚神経の感受性が亢進していることが示唆された。

本研究により、マウスの butyrate 誘起 IBS モデルでは、 $Ca_v3.2$  T-channel の機能亢進が起こっており、これによって TRPV1 の直接刺激あるいは PAR2 刺激を介する間接的活性化、さらに TRPA1 刺激に対する結腸痛覚過敏が生じている可能性が示唆された。本知見は、IBS の発症にかかわる分子メカニズムを解明するための重要な示唆を与えるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1) 坪田真帆、川畑篤史 . Butyrate 誘起過敏性腸症候群モデルマウスの知覚神経過敏における  $Ca_v3.2$  T 型  $Ca^{2+}$  チャンネルの役割 . 第 45 回日本潰瘍学会 2017, 11, 20-21, 京都 .

2) 松井和樹、中野真希、友近拳、坪田真帆、川畑篤史 . Butyrate 誘起過敏性腸症候群モデルマウスにおける結腸の知覚神経過敏における  $Ca_v3.2$  T 型  $Ca^{2+}$  チャンネルの役割 . 生体機能と創薬シンポジウム 2017. 2017, 8, 24-25, 京都 .

3) 松井和樹、中野真希、石井優子、寺田侑加、坪田真帆、川畑篤史 . 結腸痛発症メカニズムの解析：侵害受容ニューロン発現分子 TRPV1、PAR2 および  $Ca_v3.2$  の役割 . 第 90 回日本薬理学会年会 . 2017, 3, 15-17, 長崎 .

4) 中野真希、松井和樹、石井優子、坪田真帆、川畑篤史 . Butyrate 誘起過敏性腸症候群モデルマウスにおける結腸痛覚過敏への  $Ca_v3.2$  T 型  $Ca^{2+}$  チャンネルの関与 . 第 66 回 日本薬学会近畿支部総会・大会 . 2016, 10, 15, 高槻 .

5) 松井和樹、中野真希、石井優子、寺田侑加、坪田真帆、川畑篤史 . 結腸痛の発症における侵害受容ニューロン発現分子 TRPV1、PAR2 および  $Ca_v3.2$  の役割について . 第 129 回日本薬理学会近畿部会、2016, 6, 24, 広島 .

6) 坪田真帆、石井優子、中野真希、梶谷梨絵、西堀正洋、川畑篤史 . Butyrate 誘起過敏性腸症候群モデルマウスにおける結腸痛覚過敏への T 型  $Ca^{2+}$  チャンネルおよび HMGB1 の関与 . 第 127 回日本薬理学会近畿部会、2015, 6, 26, 岐阜 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.kindai.ac.jp/byoutai/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坪田 真帆 (TSUBOTA, Maho)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：90510123