

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：82648

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19197

研究課題名(和文) TRPチャンネルとアノクタミン1の相互作用を介した疼痛メカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms of pain sensation through interactions between TRP channels and anoctamin 1

研究代表者

高山 靖規 (TAKAYAMA, Yasunori)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特任助教

研究者番号：60711033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：カプサイシン受容体であるTRPV1は、皮膚において痛み刺激を受容する重要なイオンチャンネルである。長年、TRPV1のみが灼熱痛の主体を成すと考えられてきたが、本研究ではアノクタミン1という別のイオンチャンネルがTRPV1による痛み信号を増強していることを解明した。また、カプサイシンによる痛みがアノクタミン1阻害薬により減弱することが判明した。このことから、アノクタミン1を標的とした鎮痛薬はより良い治療戦略になるものと期待される。

また、アノクタミン1阻害効果を持つ新規化合物を発見し、これは鎮痛薬開発における新たなシーズとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：TRPV1, a capsaicin receptor, is an important ion channel in sensory nerves to detect painful situation in skin. For long time, TRPV1 has been believed as main ion channel inducing burning pain, however we identified the interaction with anoctamin 1, a kind of chloride channel. This TRPV1-anoctamin 1 interaction is a molecular mechanism to enhance TRPV1-mediated pain sensation. In addition, capsaicin-induced pain was reduced by anoctamin 1 inhibitor. Thus, the painkiller targeting anoctamin 1 could be better therapy in clinical situations. Furthermore, we found a new chemical compound which has inhibitory effect on anoctamin 1 activity. Therefore, this chemical could be novel seeds in the development of painkiller.

研究分野：神経生理学

キーワード：TRPV1 アノクタミン1 疼痛

1. 研究開始当初の背景

TRPV4 とアノクタミン1が脈絡叢上皮細胞において共発現しており、それらは機能的・直接的に相互作用し得ること、またこの相互作用により脳脊髄液分泌の恒常性が保たれるであろうことを明らかとしていた (Takayama et al, 2014)。このことから、TRPチャンネルとアノクタミン1の相互作用による生理的意義が他にも存在すると考えられた。

2. 研究の目的

一次感覚神経における TRP チャンネル-アノクタミン1相互作用の生理的意義の解明

3. 研究の方法

(1) HEK293T 細胞およびマウス後根神経節 (DRG) より単離した一次感覚ニューロンにおいて TRPV1 とアノクタミン1の機能的相互作用を電気生理学的手法により検討した。また、免疫学的手法により直接的相互作用について検討した。

(2) TRPA1 とアノクタミン1の相互作用についても電気生理学・生化学的手法により検討した。

(3) マウス後肢の甲に TRP チャンネルのアゴニストを皮下投与した場合の疼痛関連行動 (足舐め行動) を観察した。この際、アノクタミン1 阻害剤がもたらす鎮痛効果について薬剤の同時投与により検討した。

4. 研究成果

(1) 一次感覚神経における TRPV1-アノクタミン1相互作用の生理的役割を解明した (Takayama et al, 2015)。マウス DRG において免疫染色により TRPV1 とアノクタミン1の共発現を観察したところ、およそ 80% の TRPV1 陽性ニューロンでアノクタミン1の発現が示唆された。また、免疫沈降法により TRPV1 とアノクタミン1のタンパク-タンパク間結合が HEK293T 細胞と DRG ニューロンの両方において示された。これは、TRPV1 とアノクタミン1が細胞膜上で近接していることを示唆している。実際に、EGTA と BAPTA を用いたホールセルパッチクランプ記録の結果から、TRPV1 とアノクタミン1は理論上 20 nm 以内において機能的に相互作用していることが示唆された。つまり、TRPV1 の活性化に伴う神経興奮がアノクタミン1の相乗作用によって増幅されることが明らかとなった。そこで、マウスを用いて行動薬理学的検討を行ったところ、後肢皮下へのカプサイシン投与によって惹起された疼痛関連行動がアノクタミン1の選択的阻害剤である T16Ainh-A01 の同時投与によって有意に減弱した。このことは、TRPV1 が関わる疼痛を抑える効果的な方法はアノクタミン1の阻害であるということを示唆している。以上のことから、TRPV1-アノクタミン1相互作用は急性疼痛を惹起する新規分子メカニズムで

あることが判明した。

(2) TRPV1 と同じく TRPA1 も一次感覚神経に発現し、疼痛に関わることはよく知られている。HEK293T 細胞における電気生理学的検討において、TRPA1 とアノクタミン1の相互作用が示されたため、生体内における TRPA1-アノクタミン1相互作用の生理的意義についても検討した。マウス DRG における二重蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法により TRPA1 陽性ニューロンがアノクタミン1を共発現していることが示唆された。しかしながら、TRPA1 のアゴニストであるアリルイソチオシアネートによる疼痛関連行動はアノクタミン1阻害剤の影響を受けなかった。このことから、TRPA1 とアノクタミン1は確かに相互作用し得るが、一次感覚神経においてはさほど効果的ではないということが判明した。

(3) アノクタミン1阻害効果を持つ新規化合物を発見した。TRP チャンネルとアノクタミン1の相互作用を検討する過程で、TRPM8 のアゴニストであるメントールがアノクタミン1を強力に阻害することを発見した (Takayama et al, 2017)。メントール類似体を用いた検討から、メントール、1,4-シネオールおよび 1,8-シネオールもアノクタミン1を阻害することが判明したが、1,8-シネオールの抑制効果は微弱であった。そこで、メントールを構成している化学構造の中にアノクタミン1阻害に重要な部位があると考え、イソプロパノール、シクロヘキサノール、イソプロピルシクロヘキサン、メチルシクロヘキサンおよびイソプロピルシクロヘキサンのアノクタミン1電流に対する効果を電気生理学的に検討したところ、イソプロピルシクロヘキサンだけがアノクタミン1を強力に阻害した。すなわち、イソプロピルシクロヘキサンがアノクタミン1阻害に必要な最小限の化学構造であることが判明した。これまで、この化合物の持つイオンチャンネル阻害効果は報告がないため、本研究は鎮痛薬開発における新規シーズの同定につながったと言える。

(4) メントールはアノクタミン1だけでなく TRPV1 も抑制することが知られている (Takaishi et al, 2016)。TRPV1 に対する効果はアノクタミン1に対するほど強力ではないが、メントールは他にも電位依存性ナトリウムチャンネルを阻害する効果も知られているため、これらがメントールの持つ鎮痛作用を説明するものと考えられている (Gaudio et al, 2011)。しかし、行動薬理学的検討においてメントール受容体である TRPM8 を欠損させられたマウスではカプサイシンによる疼痛関連行動がメントールの投与により抑制されることが報告されている (Liu et al, 2013)。すなわち、メントールによる TRPV1/

アノクタミン1陽性ニューロンの直接的な興奮抑制ではなく、TRPM8陽性ニューロンを介したネガティブフィードフォワード経路が疼痛を抑えるのに重要であるとの見方がある。この混迷を検討するため、一次感覚神経の投射先である脊髄第二層において *in vivo* 細胞外活動電位記録を行った。TRPM8欠損マウスの後肢にカプサイシンを投与した際に見られる活動電位の頻度亢進に対するメントール同時投与の効果を検討したところ、メントール投与群では有意にその頻度が減弱した。すなわち、一次感覚神経レベルでメントールは痛覚神経の興奮を抑えていることが示された。つまり、TRPM8欠損マウスにおいてメントールの鎮痛効果が見られないという報告は、TRPM8陽性ニューロンによるフィードフォワード経路の存在を反映するのではなく、TRPM8欠損によって神経機能が変化しているものと推察された。事実、カプサイシン単独投与により引き起こされる脊髄ニューロンの活動電位は野生型よりもTRPM8欠損マウスにおいて高頻度であったことから、TRPM8欠損により一次感覚神経のTRPV1発現量が変化するなどの二次的影響が考えられた。TRPM8欠損と神経機能変化の関連は未だ報告がないため、今後の研究において興味深いテーマの一つになると期待される。

<引用文献>

1. Takayama Y, Shibasaki K, Suzuki Y, Yamanaka A, Tominaga M., Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anocetamin 1., *FASEB J*, vol 28, 2014, 22238-48.
 2. Takayama Y, Uta D, Furue H, Tominaga M., Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anocetamin 1 in sensory neurons., *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol 112, 2015, 5213-8.
 3. Takayama Y, Furue H, Tominaga M. 4-isopropylcyclohexanol has potential analgesic effects through the inhibition of anocetamin 1, TRPV1 and TRPA1 channel activities., vol 7, 2017, 43132.
 4. Takaishi M, Uchida K, Suzuki Y, Matsui H, Shimada T, Fujita F, Tominaga M., Reciprocal effects of capsaicin and menthol on thermosensation through regulated activities of TRPV1 and TRPM8., *J Physiol Sci*, vol 66, 2016, 143-55.
 5. Gaudioso C, Hao J, Martin-Eauclaire MF, Gabriac M, Delmas P., Menthol pain relief through cumulative inactivation of voltage-gated sodium channels., *Pain*, vol 153, 2012, 473-84.
 6. Liu B, Fan L, Balakrishna S, Sui A, Morris JB, Jordt SE., TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain., *Pain*, vol 154, 2013, 2169-77.
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 6 件)
- (1) Takayama Y, Furue H, Tominaga M., 4-isopropylcyclohexanol has potential analgesic effects through the inhibition of anocetamin 1, TRPV1 and TRPA1 channel activities., *Sci Rep*, 査読有, vol 7, 2017, 43132. doi: 10.1038/srep43132.
 - (2) Yoshida A, Furube E, Mannari T, Takayama Y, Kittaka H, Tominaga M, Miyata S., TRPV1 is crucial for proinflammatory STAT3 signaling and thermoregulation-associated pathways in the brain during inflammation., *Sci Rep*, 査読有, vol 6, 2016, 26088, doi: 10.1038/srep26088.
 - (3) Okuda H, Noguchi A, Kobayashi H, Kondo D, Harada KH, Youssefian S, Shioi H, Kabata R, Domon Y, Kubota K, Kitano Y, Takayama Y, Hitomi T, Ohno K, Saito Y, Asano T, Tominaga M, Takahashi T, Koizumi A., Infantile Pain Episodes Associated with Novel Nav1.9 Mutations in Familial Episodic Pain Syndrome in Japanese Families., *Plos ONE*, 査読有, vol 11, 2016, 0154827, doi: 10.1371/journal.pone.0154827.
 - (4) Sun W, Uchida K, Suzuki Y, Zhou Y, Kim M, Takayama Y, Takahashi N, Goto T, Wakabayashi S, Kawada T, Iwata Y, Tominaga M., Lack of TRPV2 impairs thermogenesis in mouse brown adipose tissue., *EMBO rep*, 査読有, vol 17, 2016, 383-99, doi: 10.15252/embr.201540819.
 - (5) Takayama Y, Uta D, Furue H, Tominaga M. Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anocetamin 1 in sensory neurons., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有, vol 112, 2015, 5213-8, doi: 10.1073/pnas.1421507112.

(6) Yoshiyama M, Mochizuki T, Nakagomi H, Miyamoto T, Kira S, Mizumachi R, Sokabe T, Takayama Y, Tominaga M, Takeda M., Functional roles of TRPV1 and TRPV4 in control of lower urinary tract activity: dual analysis of behavior and reflex during the micturition cycle., Am J Physiol Renal Physiol., 査読有, vol 308, 2015, F1128-34, doi: 10.1152/ajprenal.00016.2015.

[学会発表] (計 7 件)

(1) Takayama Y, Tominaga M., Interaction of TRPV1 and ANO1 in DRG neurons., International Association for the Study of Pain., パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2016 年 9 月 29 日.

(2) Takayama Y, Tominaga M., Interaction of transient receptor potential vanillin 1 and anoctamin 1 in primary sensory neurons., Physiology 2016, ダブリン, アイルランド, 2016 年 7 月 29 日.

(3) 高山 靖規、秋元 望、古江 秀昌、富永 真琴., DRG ニューロンにおける TRPV1-ANO1 相互作用とメントールによる ANO1 阻害効果の検討., 第 38 回 日本疼痛学会, 北海道立道民活動センター かでの 2・7 (北海道札幌市), 2016 年 6 月 25 日.

(4) Takayama Y, Tominaga M., Does TRPV1-ANO1 interaction enhance HOT taste ?, International Symposium on Olfaction and Taste, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2016 年 6 月 6 日.

(5) Takayama Y, Akimoto N, Furue H, Tominaga M., Investigation of ANO1 blocker and the effect on TRPV1-related pain., 第 93 回 日本生理学会大会, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), 2016 年 3 月 24 日.

(6) Takayama Y, Tominaga M., TRPV1-ANO1 interaction in sensory neurons., TRP 2015, ルーベン, ベルギー, 2015 年 9 月 17 日.

(7) Takayama Y, Tominaga M., Inhibition of anoctamin 1-mediated currents by menthol., 第 38 回 日本神経科学大会, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 2015 年 7 月 29 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 活性抑制剤および皮膚感覚過敏抑制剤
発明者: 高山 靖規、富永 真琴

権利者: 大学共同利用機関法人自然科学研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2017-021635

出願年月日: 2017 年 2 月 8 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

(1) カプサイシンが引き起こす痛みの増強メカニズム

http://www.nips.ac.jp/release/2015/04/_trpv1.htm
1

(2) 新たな鎮痛薬創薬シーズの発見

http://www.nips.ac.jp/release/2017/02/_4-.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 靖規 (TAKAYAMA, Yasunori)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特任助教

研究者番号: 60711033

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()