

令和 3 年 5 月 23 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15793

研究課題名(和文)新規ANO1阻害剤の発見とその鎮痛作用機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of novel ANO1 inhibitor and its analgesic effects

研究代表者

高山 靖規 (Takayama, Yasunori)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：60711033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：痛み神経に発現するイオンチャネルの一種であるアノクタミン1(ANO1)はその活性化により疼痛を惹起させる。本研究では、ミントなどに含まれる清涼成分であるメントールがANO1を発見したことに端を発し、新たなANO1阻害メカニズム解明と鎮痛作用の解析を行なった。その結果、メントールに類似する4-イソプロピルシクロヘキサノールや甘草由来成分であるリクイリチゲニンによってANO1が阻害されることを発見した。また、これらは灼熱痛を抑えることも判明した。このことから、ANO1を標的とした天然化合物による新たな鎮痛メカニズムの一端が解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

4-イソプロピルシクロヘキサノールは単純な構造をした化合物であるため、これをコアとして薬剤開発することによりイオンチャネルへの選択性や力価を調整できるため新たな創薬シーズとして期待される。また、甘草は多くの漢方薬や醤油に使用されており、東洋医学や食品の新たな機能性について今後言及することが可能となる。加えて、リクイリチゲニンと作用が似ているエストロゲンの効果も検討した結果、胎児発達に伴い産生されるエストジオールによってANO1は阻害された。その力価は乏しかったが、胎児と母親の新たな生理学的関係の解明に繋がるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：Anoctamin1 (ANO1) is a kind of chloride channel expressed in peripheral pain nerves, and the activation evokes pain sensation. I found that menthol inhibits ANO1 in my previous study. Therefore, I focused on novel findings of the mechanisms of ANO1 inhibition and pain reduction. In the results, I identified that 4-isopropylcyclohexanol, an analog of menthol, and liquiritigenin, a licorice-derived flavonoid, strongly inhibited ANO1. Furthermore, these chemicals reduced pain-related behavior in mice injected capsaicin into hind paw. These results indicate the novel strategy of pain control by natural compounds.

研究分野：イオンチャネル

キーワード：イオンチャネル 疼痛 天然化合物 阻害剤

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) カプサイシン受容体である **Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1)** とカルシウム活性化黒ライドチャネルである **アノクタミン1 (ANO1)** は一次感覚神経において侵害受容を担うイオンチャネルであり、**TRPV1** 活性化を介した疼痛は **ANO1** によって増強されることを発見していた。
- (2) メントールが **ANO1** 電流を抑制することを発見していた。そこで、**ANO1** 抑制に関わる特異的な構造がメントールに含まれていると考え検討した結果、シクロヘキサンにイソプロピル基が付加されたイソプロピルシクロヘキサンによって **ANO1** がほぼ完全に抑制されることが判明した。

### 2. 研究の目的

イソプロピルシクロヘキサンの化学構造に着目した新規 **ANO1** 阻害剤の同定とそれによる鎮痛効果の検証

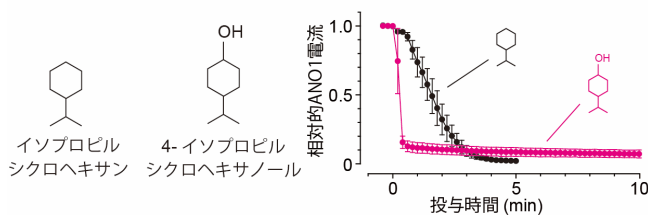
### 3. 研究の方法

- (1) **ANO1** を強制発現させた **HEK293T** 細胞におけるホールセルパッチクランプ記録により各種イソプロピルシクロヘキサン類似物による **ANO1** 電流抑制効果を検討した。
- (2) マウス後肢にカプサイシンを投与し、誘発される急性疼痛に対する新規 **ANO1** 阻害物質の効果を検討した。
- (3) **TRPV1** と **ANO1** を強制発現させた **HEK293T** 細胞において炎症状態を模した実験条件における **ANO1** 電流の測定を行なった。
- (4) マウス後肢にカプサイシンを投与し、誘発される炎症性アロディニアに対する新規 **ANO1** 阻害物質の効果を検討した。

### 4. 研究成果

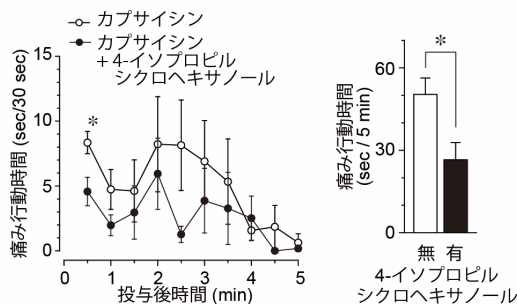
- (1) イソプロピルシクロヘキサンに水酸基が1つ結合した **4-イソプロピルシクロヘキサノール** によって **ANO1** が強力かつ迅速に阻害されることを同定した(図1)。

図1 ANO1 電流阻害の時間変化



- (2) **4-イソプロピルシクロヘキサノール (100 μM)** の同時投与によってカプサイシン (**300 μM**) 惹起による急性疼痛行動が有意に抑制された (図2)。

図2 4-イソプロピルシクロヘキサノールによる鎮痛



- (3) リクイリチゲニンが ANO1 を阻害することを発見した (図 3)。また、作用が類似するエストロゲンによっても ANO1 が阻害されることを発見した (図 4)。

図 3 リクイリチゲニンによる ANO1 阻害

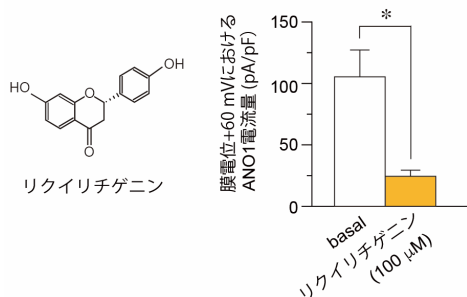
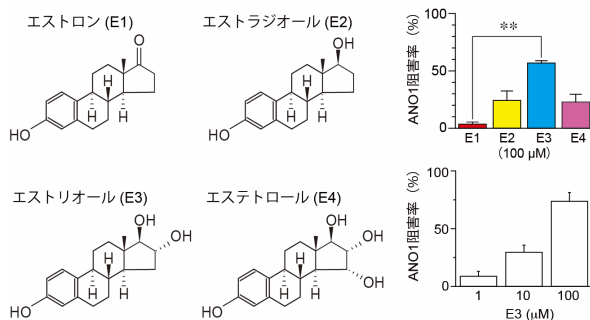


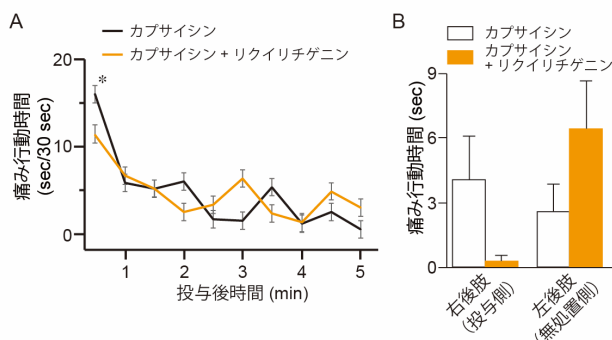
図 4 エストロゲンによる ANO1 阻害



- (4) PMA によって TRPV1 をリン酸化させた炎症様状態において、通常では相互作用が起らないカプサイシン濃度 (10 nM) であっても ANO1 は TRPV1 下流で強く活性化された。このことは、炎症性疼痛における ANO1 阻害の有効性を示唆する。

- (5) リクイリチゲニン (1 mM) の同時投与によりカプサイシン (300 μM) による疼痛関連行動は減弱した (図 5 A)。これに加えて、Hot プレートテストも行った (図 5 B)。Hot プレートにおける逃避行動までの潜時は変化しなかったが、熱刺激を加えた後の足舐める時間を左右後肢に分けて解析したところ、リクイリチゲニンを同時投与した群ではカプサイシンを投与しなかった側の後肢 (左) をよく舐める傾向にあった。現在解析を進めている中途ではあるが、これはリクイリチゲニンが炎症を抑えているとともに熱による痛みを有意に抑える可能性を示唆している。このような薬理学的行動解析はこれまでに報告が無いため、今後の重要な検討課題として研究を進める。

図 5 リクイリチゲニンによる疼痛抑制



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kato Mami, Takayama Yasunori, Sunagawa Masataka	4. 巻 12
2. 論文標題 The Calcium-Activated Chloride Channel TMEM16A is Inhibited by Liquiritigenin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 628968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.628968	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akanuma Yuko, Kato Mami, Takayama Yasunori, Ikemoto Hideshi, Adachi Naoki, Ohashi Yusuke, Yogi Wakako, Okumo Takayuki, Tsukada Mana, Sunagawa Masataka	4. 巻 7
2. 論文標題 Analgesic Efficacy of a Combination of Fentanyl and a Japanese Herbal Medicine "Yokukansan" in Rats with Acute Inflammatory Pain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicines	6. 最初と最後の頁 75 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicines7120075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Feng Xiaona, Takayama Yasunori, Ohno Nobuhiko, Kanda Hirosato, Dai Yi, Sokabe Takaaki, Tominaga Makoto	4. 巻 3
2. 論文標題 Increased TRPV4 expression in non-myelinating Schwann cells is associated with demyelination after sciatic nerve injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01444-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sugisawa Erika, Takayama Yasunori, Takemura Naoki, Kondo Takeshi, Hatakeyama Shigetsugu, Kumagai Yutaro, Sunagawa Masataka, Tominaga Makoto, Maruyama Kenta	4. 巻 182
2. 論文標題 RNA Sensing by Gut Piezo1 Is Essential for Systemic Serotonin Synthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 609 ~ 624.e21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2020.06.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maruyama Kenta, Kidoya Hiroyasu, Takemura Naoki, Sugisawa Erika, Takeuchi Osamu, Kondo Takeshi, Eid Mohammed Mansour Abbas, Tanaka Hiroki, Martino Mika?l M., Takakura Nobuyuki, Takayama Yasunori, Akira Shizuo, Vandenbon Alexis, Kumagai Yutaro	4. 巻 32
2. 論文標題 Zinc Finger Protein St18 Protects against Septic Death by Inhibiting VEGF-A from Macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107906 ~ 107906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107906	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Araki K, Araki A, Honda D, Izumoto T, Hashizume A, Hijikata Y, Yamada S, Iguchi Y, Hara A, Ikumi K, Kawai K, Ishigaki S, Nakamichi Y, Tsunekawa S, Seino Y, Yamamoto A, Takayama Y, Hidaka S, Tominaga M, Ohara-Imaizumi M, Suzuki A, Ishiguro H, Enomoto A, Yoshida M, Arima H, Muramatsu S, Sobue G, Katsuno M	4. 巻 129
2. 論文標題 TDP-43 regulates early-phase insulin secretion via CaV1.2-mediated exocytosis in islets	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 3578 ~ 3593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI124481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takayama Y, Derouiche S, Maruyama K, Tominaga M	4. 巻 20(14)
2. 論文標題 Emerging Perspectives on Pain Management by Modulation of TRP Channels and ANO1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 E3411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20143411	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 高山 靖規	4. 巻 270(10)
2. 論文標題 カルシウム活性化クロライドチャンネルとカルシウム透過性チャンネルの相互作用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1017-1022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maruyama K, Takayama Y, Sugisawa E, Yamanoi Y, Yokawa T, Kondo T, Ishibashi KI, Sahoo BR, Takemura N, Mori Y, Kanemaru H, Kumagai Y, Martino MM, Yoshioka Y, Nishijo H, Tanaka H, Sasaki A, Ohno N, Iwakura Y, Moriyama Y, Nomura M, Akira S, Tominaga M	4. 巻 6
2. 論文標題 The ATP Transporter VNUT Mediates Induction of Dectin-1-Triggered Candida Nociception	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 306-318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2018.08.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Akashi HD, Chen PJ, Akiyama T, Terai Y, Wakakuwa M, Takayama Y, Tominaga M, Arikawa K	4. 巻 221
2. 論文標題 Physiological responses of ionotropic histamine receptors, PxHCLA and PxHCLB, to neurotransmitter candidates in a butterfly, Papilio xuthus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Exp Biol	6. 最初と最後の頁 Pt21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jeb.183129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchiya M, Hara Y, Okuda M, Itoh K, Nishioka R, Shiomi A, Nagao K, Mori M, Mori Y, Ikenouchi J, Suzuki R, Tanaka M, Ohwada T, Aoki J, Kanagawa M, Toda T, Nagata Y, Matsuda R, Takayama Y, Tominaga M, Umeda M	4. 巻 9
2. 論文標題 Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 2049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-04436-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takayama Y, Shibasaki K, Furue H, Uta D, Tominaga M	4. 巻 33
2. 論文標題 Physiological significances of TRP-ANO1 interaction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PAIN RESEARCH	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計23件(うち招待講演 3件/うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Takayama Y
2. 発表標題 Functional analyses of ion channels affected by environmental factors
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会・第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kato M, Takayama Y, Sunagawa M
2. 発表標題 TMEM16A inhibition by a licorice-derived flavonoid and estrogen
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会・第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fujiwara A, Tsukada M, Iduno T, Ikemoto H, Takayama Y, Guo S, Liu Y, Hisamitsu T, Sunagawa M
2. 発表標題 The effect of an acupuncture "press tack needle" treatment on orexin secretion under acute stress
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsukada M, Ikemoto H, Adachi N, Takayama Y, Okumo T, Yogi W, Kato M, Hisamitsu T, Sunagawa M
2. 発表標題 Contribution of oxytocin to the anti-stress effect of the Kampo medicine Kamikihito -Part II-
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takayama Y, Kato M, Tsukada M, Adachi N, Ikemoto H, Sunagawa M
2. 発表標題 ANO1 inhibition by the extracts from Glechoma Hederacea
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kato M, Takayama Y, Tsukada M, Sunagawa M
2. 発表標題 Effects of kampo medicine containing ginger on TRPV1-ANO1 interaction
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ebihara N, Ikemoto H, Adachi N, Ebihara T, Ebihara K, Oike J, Kunieda Y, Takayama Y, Hisamitsu T, Sunagawa M
2. 発表標題 Preemptive analgesia provided by complementary approaches in acute inflammatory pain model rats
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Adachi N, Ando M, Sakhri F, Ikemoto H, Ohasi Y, Tsukada M, Takayama Y, Hirai Y, Sunagawa M
2. 発表標題 Possible Mechanisms of Astrocyte Senescence in a Hepatic Encephalopathy Model
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 高山靖規, 富永真琴
2. 発表標題 TRPV1-ANO1相互作用の炎症性疼痛への関与
3. 学会等名 第41回日本疼痛学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Xiaona Feng, Yasunori Takayama, Makoto Tominaga
2. 発表標題 TRPV4 is functionally expressed in cultured mouse Schwann cells
3. 学会等名 FAOPS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mingyi Dong, Hong Dung Thi Nguyen, Yasunori Takayama, Makoto Tominaga
2. 発表標題 Functional interaction between TRPM8 and ANO1
3. 学会等名 FAOPS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yu Yamanoi, Yasunori Takayama, Makoto Tominaga
2. 発表標題 Role of TRPV3-ANO1 interaction in keratinocyte wound healing
3. 学会等名 FAOPS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hong Dung Thi Nguyen, Yasunori Takayama, Makoto Tominaga
2. 発表標題 Identification of amino acids involved in the 4-isopropylcyclohexanol actioin on TRP channels
3. 学会等名 FAOPS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasunori Takayama, Makoto Tominaga
2. 発表標題 TRPV1 and ANO1/TMEM16A interaction in inflammatory pain conditions
3. 学会等名 FAOPS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高山靖規, 富永真琴
2. 発表標題 炎症におけるTRPV1-ANO1相互作用の役割
3. 学会等名 第40回日本疼痛学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasunori Takayama
2. 発表標題 Pain enhancing mechanism through TRPV1-ANO1 interaction and its pharmacological control
3. 学会等名 Sophion - International Symposium on channelopathy and drug discovery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasunori Takayama, Makoto Tominaga
2. 発表標題 Interaction between TRPV1 and ANO1/TMEM16A in acute and inflammatory pain conditions
3. 学会等名 IASP 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayama Y,
2. 発表標題 Comprehensive regulation of ion dynamics through TRP-ANO1 interaction in primary sensory neurons
3. 学会等名 The 7th Asian Pain Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takayama Y, Furue H, Tominaga M
2. 発表標題 Inhibitory effects of 4-isopropylcyclohexanol on ion channels
3. 学会等名 第39回日本疼痛学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takayama Y, Furue H, Tominaga M
2. 発表標題 Analgesia via comprehensive inhibition of ion channels by 4-isopropylcyclohexanol
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takayama Y, Furue H, Tominaga M
2. 発表標題 Pharmacological effects of 4-isopropylcyclohexanol on TRP channel and ANO1/TMEM16A
3. 学会等名 Neuroscience 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takayama Y, Furue H, Tominaga M
2. 発表標題 Pain and itch reductions by 4-isopropylcyclohexanol targeting TRP channels and ANO1
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayama Y, Tomianga M
2. 発表標題 Pathophysiological significance of TRPV1-ANO1 interaction in inflammation
3. 学会等名 第40回日本疼痛学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 高山靖規	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 158
3. 書名 医学のあゆみ TRPチャンネルのすべて	

1. 著者名 Yasunori Takayama	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 265
3. 書名 Advances in Pain Research: Mechanisms and Modulation of Chronic Pain	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 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
産業財産権の種類、番号 特許、特願 2017-158822	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

昭和大 学 医学部 生体制御学部門 <a href="https://www.showa-u.ac.jp/education/med/major/physio-1.html">https://www.showa-u.ac.jp/education/med/major/physio-1.html</a> 妊娠期に分泌されるエストロゲンに類似するフラボノイドによる新たなイオンチャネル阻害を発見 <a href="https://www.showa-u.ac.jp/news/nid00002946.html">https://www.showa-u.ac.jp/news/nid00002946.html</a> 腸内細菌物質が腸のはたらきと骨形成を制御する仕組みを発見 -- 細菌RNAが機械刺激受容体を活性化し、セロトニンホルモンを産生する -- <a href="https://www.showa-u.ac.jp/news/nid00001471.html">https://www.showa-u.ac.jp/news/nid00001471.html</a> カンジダ感染症における不快情動を惹起する分子メカニズムの解明 <a href="https://www.nips.ac.jp/release/2018/09/post_376.html">https://www.nips.ac.jp/release/2018/09/post_376.html</a> 新たな鎮痛薬創薬シーズの発見 <a href="http://www.nips.ac.jp/nips_research/2018/02/_4-.html">http://www.nips.ac.jp/nips_research/2018/02/_4-.html</a>
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------