

平成 22 年 6 月 2 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2009 年度
 課題番号：18380171
 研究課題名 (和文) バニロイド受容体を介した痛覚過敏発現メカニズムの解明とインビトロ痛覚定量系の確立
 研究課題名 (英文) Regulatory mechanisms of vanilloid receptor on pain signaling

研究代表者
 太田 利男 (OHTA TOSHIO)
 鳥取大学・農学部・教授
 研究者番号：20176895

研究成果の概要 (和文)：

侵害受容体であるバニロイド受容体 (TRPV1) 遺伝子をブタ及びヒトからクローニングし、HEK293 細胞へ異所性発現させ、本受容体の機能解析のためインビトロ定量系を確立した。この定量系を用いた結果、バニロイド受容体はカプサイシン、熱及び酸で活性化するのみならず、細胞外ナトリウムによっても制御を受けていることを明らかにした。また、炎症性メディエーターであるセロトニンやヒスタミンによる痛覚過敏の発現にはバニロイド受容体の過活性化が関与していることを示した。マスタードオイルやメチルサリチル酸はバニロイド受容体に対する新規アゴニストとして作用すること、また後者はこの受容体を脱感作させることにより鎮痛作用を示すことを見出した。これらの結果から、バニロイド受容体が痛覚過敏発現に重要なターゲット分子であることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：

We cloned cDNA encoding vanilloid receptor (TRPV1) from porcine and human spinal cord cDNA library. We established *in vitro* assay system for monitoring vanilloid receptor activities. Heterologous expressed TRPV1 receptors are activated by not only capsaicin, heat and protons, but also regulated by extracellular sodium ions. Hyperalgesia induced by inflammatory mediators, such as serotonin and histamine is due to a hyper-activation of TRPV1 using heterologous expression system and cultured sensory neurons. We found that mustard oil and methylsalicylate act as TRPV1 agonist and the latter produces marked desensitization of TRPV1 resulting in anti-nociception for capsaicin-induced pain. These data suggest that TRPV1 is important target molecule especially for inflammation-induced hyperalgesia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2007 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：神経薬理学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：TRPV1、capsaicin、ion channel、intracellular Ca、pain

1. 研究開始当初の背景

痛みは知覚としての感覚要素のひとつであり、有害刺激による生体組織の障害を最小限に食い止めるための重要な生体の警告信号である。しかし、組織損傷の治癒後や明らかな組織損傷がないにも拘わらず生じる有害な痛みもあり、これらは痛覚過敏を主徴とする病態痛として知られている。しかし、その発現メカニズムは十分に解明されていない。近年、感覚神経終末や知覚神経細胞で特異的に発現する陽イオンチャンネルとして、唐辛子の辛味成分カプサイシンにより活性化するバニロイド受容体 (TRPV1 受容体) が単離され、侵害刺激受容の責任分子として注目されつつある。それ故、バニロイド受容体機能を効率的に解析できる定量系の構築とそれを用いた機能解析を行うことにより、神経原性疼痛や炎症性疼痛で生じる痛覚過敏のメカニズムを解明することが可能となる。

2. 研究の目的

神経原性疼痛や炎症性疼痛で生じる痛覚過敏の発現機構を明らかにするため、近年痛覚受容体分子としてその重要性が示唆されているバニロイド受容体に着目し、この受容体遺伝子のクローニングと、異所性発現させた細胞における活性制御分子機構を明らかにする。また、この受容体タンパク質の活性の測定を利用した効率的なインビトロ定量システムを構築し、新規鎮痛薬の候補分子を見出す。

3. 研究の方法

(1) ブタ及びヒトバニロイド受容体の遺伝子クローニング: ブタ及びヒト脊髄由来 cDNA を鋳型として PCR クローニングを行う。得られた PCR 産物を GATEWAY 法を用いて哺乳動物発現ベクターに組み換える。

(2) リポフェクション法を用いた異所性遺伝子発現: リポフェクション試薬を用いて HEK293 細胞にバニロイド受容体を一過性に発現させ、TRPV1-HEK293 細胞を作製する。

(3) バニロイド受容体機能解析

①細胞内イオンイメージング:

TRPV1-HEK293 細胞のバニロイド受容体活性を調べるため、蛍光 Ca 指示薬 Fura2 及び蛍光 Na 指示薬 CoroNa-green を細胞に負荷する。リアルタイム細胞内イオン画像解析装置を用いて、バニロイド受容体活性化により生じる細胞内 Ca 濃度及び細胞内 Na 濃度増加反応を同時測定する。

②イオンチャンネル活性解析: ホールセルボルテージクランプ法を用いて、バニロイド受容

体活性化により生じるイオンチャンネル電流を単一細胞レベルで検出する。

(4) 遺伝子変異体の作出: PCR を用いたアミノ酸点変異体を作成し、HEK293 細胞に発現させ、アミノ酸変異がチャンネル活性に与える影響を調べる。

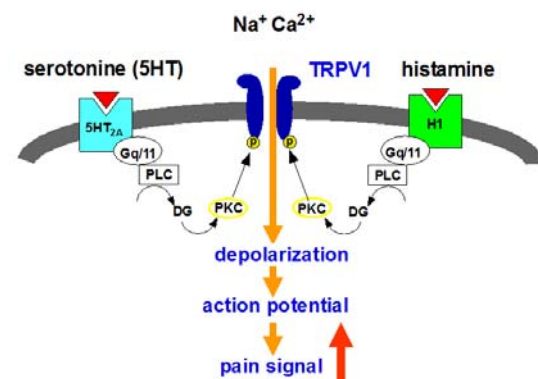
(5) 新規鎮痛物質の検索: バニロイド受容体に作用する薬剤の効果を (2) の方法を用いてスクリーニングする。

(6) 知覚神経細胞の初代培養: ラット及びマウス知覚神経を酵素処理により単離後、培養し、インビトロでの細胞機能解析を行う。

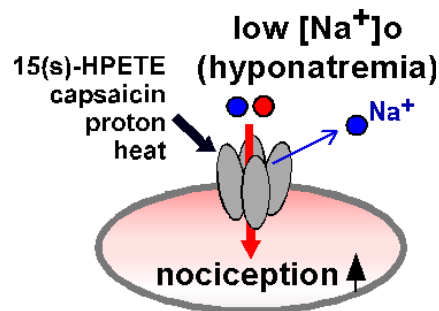
(7) 痛覚行動解析: 実験動物 (ラット) にカプサイシン又は被験物質を投与し、カプサイシンによる疼痛行動に与える影響を痛覚測定機器を用いて調べる。

4. 研究成果

(1) 培養知覚神経細胞を用いた研究より、内因性発痛物質 (炎症性メディエーター) であるセロトニン及びヒスタミンによる痛覚過敏には、各々の代謝型受容体を介して、バニロイド受容体のリン酸化による活性増加が関連していることを示した。



(2) 細胞内 Ca と Na イオンの同時イメージング解析法を確立した。TRPV1 遺伝子発現系を用いた蛍光イメージング法とパッチクランプ法により、細胞外ナトリウムによる TRPV1 活性の新規制御メカニズムと低ナトリ



ウム血症による病態痛の発現機構を明らかにした。

(3) 遺伝子発現系と知覚神経細胞を用いて、ワサビ辛味成分である mustard oil 及びシラタマノキ由来芳香成分である methyl salicylate (MS) がバニロイド受容体を刺激する新規リガンドであることを示した。また MS はバニロイド受容体を脱感作させ、カプサイシン誘発性疼痛反応を抑制したことから、本化合物は新規鎮痛薬のシーズとなる可能性を示した。

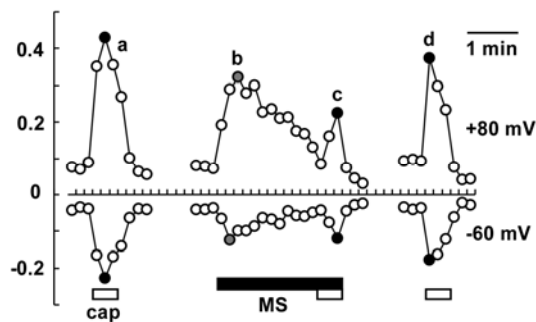
5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Kajihara Y, Murakami M, Imagawa T, Otsuguro K, Ito S, Ohta T. Histamine potentiates acid-induced responses mediating transient receptor potential V1 (TRPV1) in mouse primary sensory neurons. *Neuroscience*, 166(1):292-304 (2010) 査読あり
2. Ohta T, Ohba T, Suzuki T, Watanabe H, Sasano H, Murakami M. Decreased calcium channel currents and facilitated epinephrine release in the Ca²⁺ channel beta3 subunit-null mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 394(3):464-469. (2010) 査読あり
3. Murakami M, Ohta T, Ito S. Lipopolysaccharides enhance the action of bradykinin in enteric neurons via secretion of interleukin-1 β from enteric glial cells. *J. Neurosci. Res.* (2009) 査読あり
4. Ohta T, Imagawa T, Ito S. Involvement of transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1) in analgesic action of methylsalicylate. *Mol. Pharmacol.* 75, 307-317 (2009). 査読あり
5. Ohta T, Imagawa T, Ito S. Novel gating and sensitizing mechanism of capsaicin receptor (TRPV1): Tonic inhibitory regulation of extracellular sodium through the external protonation sites on TRPV1. *J. Biol. Chem.* 283, 9377-9387. (2008). 査読あり
6. Ishida T, Takei R, Gautam SH, Otsuguro K, Ohta T, Ito S, Habara Y, Saito, T. Voltage-gated channel properties of epithelial cells in porcine vomeronasal organ. *Neurosci. Lett.* 441, 277-281 (2008). 査読あり

7. Murakami M, Ohta T, Ito S. Interleukin 1beta enhances the action of bradykinin in rat myenteric neurons through upregulation of glial B1 receptor expression. *Neuroscience*. 151, 222-231 (2008). 査読あり

8. Ohta T, Imagawa T, Ito S. Novel agonistic action of mustard oil on



recombinant and endogenous porcine Transient Receptor Potential V1 (pTRPV1) channels. *Biochem. Pharmacol.* 73, 646-656 (2007). 査読あり

9. Murakami M, Ohta T, Otsuguro K, Ito S. Involvement of prostaglandin E₂ derived from enteric glial cells in the action of bradykinin in cultured rat myenteric neurons. *Neuroscience*. 145, 642-653 (2007). 査読あり
10. Ohta T, Ikemi Y, Murakami M, Imagawa T, Otsuguro K, Ito S. Potentiation of transient receptor potential V1 functions by the activation of metabotropic 5-hydroxytryptamine receptors in rat primary sensory neurons. *J. Physiol.* 576, 809-822 (2006). 査読あり
11. Takahashi E, Inanami O, Ohta T, Matsuda A, Kuwabara M. Lipid raft disruption prevents apoptosis induced by 2-chloro-2'-deoxyadenosine (Cladribine) in leukemia cell lines. *Leuk. Res.* 30, 1555-1561 (2006). 査読あり
12. Otsuguro K, Yamaji Y, Ban M, Ohta T, Ito S. Involvement of adenosine in depression of synaptic transmission during hypercapnic acidosis in isolated spinal cord of neonatal rats. *J. Physiol.* 574, 835-847 (2006). 査読あり
13. Otsuguro K, Ohta T, Ito S. Zinc modulates primary afferent fiber-evoked responses of ventral roots in neonatal rat spinal cord in vitro. *Neuroscience*. 138,

[学会発表] (計 27 件)

1. 太田利男、今川敏明、伊藤茂男 (2010) MethylsalicylateによるTransient Receptor Potential Vanilloid1 (TRPV1) 活性化と鎮痛作用について 第 149 回日本獣医学会 3/26 (東京)
2. 乙黒兼一、和田昌子、太田利男、伊藤茂男 (2010) 低酸素による新生ラット脊髄反射抑制における日齢の影響とアデノシンの関与。第 149 回日本獣医学会 3/26 (東京)
3. 太田利男、今川敏明、伊藤茂男 (2010) メチルサリチル酸によるTRPV1 活性化作用について 第 83 回日本薬理学会年会 3/16 (大阪)
4. 川本研介、岩崎健幸、乙黒兼一、太田利男、伊藤茂男 (2010) 新生ラット脊髄反射電位に対する内因性モノアミンの作用 第 83 回日本薬理学会年会 3/16 (大阪)
5. 川本研介、岩崎健幸、乙黒兼一、太田利男、伊藤茂男 (2009) 新生ラット脊髄反射電位に対するメタンフェタミンの作用 第 148 回日本獣医学会 (鳥取) 9/27
6. 太田利男 (2009) 痛みシグナルを受容するTRPチャンネル 第 147 回日本獣医学会シンポジウム (宇都宮) 4/3
7. 加治原佑介、太田利男、乙黒兼一、伊藤茂男 (2008) マウス一次知覚神経細胞におけるヒスタミンによるTRPV1 反応の増強 第 146 回日本獣医学会 (宮崎) 9/24
8. 岩崎健幸、乙黒兼一、太田利男、伊藤茂男 (2008) 新生ラット脊髄における内因性セロトニンの神経調節機能について 第 146 回日本獣医学会 (宮崎) 9/24
9. 村上真津香、太田利男、伊藤茂男 (2008) LPSによる腸管グリアからのinterleukin-1b放出を介した神経機能の変化 (第 22 回北海道薬物作用談話会 7/26、札幌)
10. 太田利男、今川敏明、伊藤茂男 (2008) TRPV1 チャンネルの細胞外ナトリウムイオンによる活性調節 (第 4 回TRPチャンネル研究会) (岡崎) (6/6)
11. 村上真津香、太田利男、伊藤茂男 (2008) 炎症性腸疾患における腸管神経系の機能変化に対する腸管グリアの関与-in vitro 炎症モデルを用いた検討- (第 145 回日本獣医学会、(東京) 3/28
12. 丸井崇則、太田利男、伊藤茂男 (2008) シクロフォスファミド誘発性マウス膀胱炎の膀胱機能変化におけるTRPV1 の関与について。第 81 回日本薬理学会年会、(横浜) 3/18
13. 村上真津香、太田利男、伊藤茂男 (2007) Interleukin-1 β による腸管グリアを介した壁内神経細胞におけるbradykinin反応の増強作用について (第 58 回日本薬理学会北部会 9/29、札幌)
14. 太田利男、鳥居優人、今川敏明、伊藤茂男 (2007) AllylisothiocyanateによるTRPV1 チャンネルに対する活性化作用。第 144 回日本獣医学会、(江別) 9/3
15. 丸井崇則、太田利男、伊藤茂男 (2007) 膀胱炎の病態におけるTRPV1 機能の関与 - T RPV1 ノックアウトマウスを用いた検討-。第 144 回日本獣医学会 (江別) 9/3
16. 村上真津香、太田利男、伊藤茂男 (2007) IL1- β による腸管神経細胞におけるブラジキニン反応の増強—グリアB1 受容体発現の関与— (第 21 回北海道薬物作用談話会 7/28、札幌)
17. 村上真津香、太田利男、伊藤茂男 (2007) Interleukin 1- β による壁内神経細胞におけるbradykinin反応の増強—腸管グリア B1 受容体の関与— (第 143 回日本獣医学会、(つくば) 4/4)
18. 太田利男、今川敏明、伊藤茂男 (2007) AllylisothiocyanateによるTransient Receptor Potential V1 (TRPV1)チャンネルに対する刺激作用 (第 80 回日本薬理学会年会、名古屋) 3/20
19. 村上真津香、太田利男、伊藤茂男 (2007) ラット壁内神経における Interleukin 1- β によるbradykinin反応の増強—腸管グリアによるB1 受容体発現の関与— (第 80 回日本薬理学会年会、名古屋) 3/20

20. 乙黒兼一、山地良彦、伴昌明、太田利男、伊藤茂男 (2006) 高炭酸アシドーシスによる新生ラット摘出脊髄からのアデノシン放出と脊髄反射電位抑制作用 第142回日本獣医学会 (山口) 9/20
21. 太田利男、小松竜一、乙黒兼一、伊藤茂男 (2006) 神経因性疼痛発現における Transient Receptor Potential V1 (TRPV1) の関与について —TRPV1 ノックアウトマウスを用いた解析— 第142回日本獣医学会 (山口) 9/20
22. Ohta Toshio, Ikemi Yuki, Murakami Matsukam, Otsuguro Kenichi, Ito Shigeo (2006) Metabotropic 5-hydroxytryptamine receptors are involved in potentiation of transient receptor potential V1 function in rat primary sensory neurons. Neuroscience 2006 (Atlanta, USA, October 17)
23. Murakami Matsuka, Otsuguro Kenichi, Ohta Toshio, Ito Shigeo (2006) The action of bradykinin in rat cultured myenteric neurons is modulated by prostaglandin E2 released from enteric glial cells. Acta Pharmacologica Sinica July 2-7, Beijing, China.
24. Toshio Ohta, Ikemi Yuki, Murakami Matsuka, Otsuguro Kenichi, Ito Shigeo (2006) 5-Hydroxytryptamine potentiates transient receptor potential V1 functions in rat primary sensory neurons. Serotonin Club, 6th IUPHAR Satellite Meeting on Serotonin, June 27-30, Sapporo).
25. 太田利男、小松竜一、今川敏明、乙黒兼一、伊藤茂男 (2006)。ブタTRPV1 遺伝子クローニングと発現機能解析-内因性TRPV1 受容体反応との比較- (第79回日本薬理学会年会、名古屋) 3/20
26. 乙黒兼一、山地良彦、伴昌明、太田利男、伊藤茂男 (2006) 新生ラット摘出脊髄における高炭酸アシドーシス惹起反射電位抑制に対するアデノシンの関与。(第79回日本薬理学会年会、名古屋) 3/20
27. 村上真津香、太田利男、乙黒兼一、伊藤茂男 (2006) グリア細胞-COX-PGE2 系を介したラット壁内神経細胞におけるブラ

ジキニン作用(第79回日本薬理学会年会、横浜) 3/20

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 利男 (OHTA TOSHIO)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号：20176895

(2) 研究分担者

今川 敏明 (IMAGAWA TOSHIKI)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・准教授
研究者番号：20142177
(H20→H21 連携研究者)

稲波 修 (INANAMI OSAMU)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：10193559
(H20→H21 連携研究者)