

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02345

研究課題名(和文) 侵害受容体を介した病態痛発現メカニズムの解明と疼痛緩和への応用

研究課題名(英文) Elucidation of pathological pain via nociceptors and its application to pain relief

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：知覚神経細胞に発現しているTRPA1の活性化が低閾値型電位依存性Caチャンネルにより制御されていること、炎症時に産生される酸化ストレス物質によるTRPA1活性が、内因性イオウ化合物により調節されていることを明らかにした。工業用硫黄含有化合物による有害作用の発現にTRPA1とTRPV1が関与することを見出した。TRPチャンネル機能の動物種差に関する研究により、鳥類忌避剤の作用点としてTRPA1チャンネルが重要であること、TRPV1アンタゴニストにおける哺乳類と鳥類の違いを明らかにした。TRPV1機能を抑制する化合物の検索により、パニロイド化合物の幾つかがTRPV1を抑制的に制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、各種チャンネル遺伝子発現細胞、実験動物より単離した知覚神経細胞及び動物個体を用いて行い、作用の分子メカニズムについて遺伝子レベル、細胞レベル及び個体レベルで検討した。その結果、本研究においてTRPチャンネルの新しい機能の解明、化学物質の毒性発現機構、忌避作用におけるTRPチャンネルの病態生理学的意義を明らかにすることが出来た。本研究の成果は、新規鎮痛薬や新しい疼痛緩和法の開発並びに痛み関連の病態解明に向けた基礎的知見を提供すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study clarified that the activation of TRPA1 expressed in sensory neurons is regulated by low-threshold voltage-gated Ca channels and that TRPA1 activity by oxidative stress substances produced during inflammation is modulated by endogenous sulfur compounds. Studies on species differences in TRP channel function revealed the importance of TRPA1 channels as a site of action in bird repellents and differences between mammals and birds in TRPV1 antagonists. A search for compounds that inhibit TRPV1 function revealed that some vanilloids showed inhibitory action on TRPV1.

研究分野：細胞薬理学

キーワード：疼痛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛などの慢性痛は、組織傷害から生体を保護するための警告信号である急性痛とは異なり、痛みそのものが病態となる。そのためヒトや獣医療において問題となっているが、その原因や治療法は十分に解明されていない。痛み信号の発射起点は、知覚神経に発現している侵害受容体の活性化である。侵害受容体の分子実体として Transient Receptor Potential (TRP) チャンネルが機能している。

TRP チャンネルの多くは、高い Ca^{2+} 透過性を持つ非選択的陽イオンチャンネルであり、刺激性物質や温度に感受性を有する。加えて TRP チャンネルは、生体内で産生される活性酸素などの分子センサーとしても働いている。これら TRP チャンネルの機能抑制は、疼痛制御に深く関わると考えられているため、チャンネル抑制分子の同定や検索が広く行われている。しかし、現在まで特異的な抑制作用を有する有効な化合物の臨床応用には至っていない。また、疼痛に関わる内因性分子によるチャンネル活性制御機構についても不明な点が残されている。更に、侵害受容チャンネルに作用する物質は、ヒトや動物に対して痛みなどの不快感や組織障害を引き起こすため、刺激性化学物質による毒性発現や動物に対する忌避作用に関わる可能性があるが、それらの作用点としての TRP チャンネルの機能についても十分に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、病態痛治療におけるターゲット分子として TRP チャンネルに着目し、この分子に作用する種々の化合物による活性化機構やその制御メカニズムを明らかにすることにより、新規鎮痛薬の開発や疼痛緩和法に関わる基礎的知見を得ることである。

これらの研究では、各種 TRP チャンネル遺伝子発現細胞、実験動物より単離した知覚神経細胞、及び動物個体を用い、作用の分子メカニズムについて遺伝子レベル、細胞レベル及び個体レベルで検討した。その結果、痛み受容や化学物質の毒性、忌避作用における TRP チャンネルの病態生理学的意義を明らかにすることが出来た。

3. 研究の方法

(1) 使用動物

野生型マウス、TRP チャンネル遺伝子欠損マウス、ニワトリ (胚、初生ヒナ)

(2) 使用細胞

ヒト胎児腎由来 (Human Embryonic Kidney: HEK) 293 細胞。TRP チャンネル遺伝子発現細胞として HEK293 細胞を用いた。

ラット膵臓癌由来 RIN-14B 細胞。内因性に TRPA1 チャンネル及び電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを発現している細胞株として RIN-14B 細胞を用いた。

マウス知覚神経細胞：炭酸ガスにより動物を安楽殺処置した後、背根神経節を摘出し、コラゲナーゼ処理により知覚神経細胞を単離した。単離した細胞は、FBS を添加した DMEM 中に分散し、5% CO_2 、95% O_2 下で 1 日培養した。

ニワトリ知覚神経細胞：17~21 日胚より背根神経節を摘出し、マウスと同様な処置により知覚神経細胞を単離、培養した。

(3) 遺伝子発現

各種動物 (ヒト、マウス、ニワトリ) 由来 TRP チャンネル遺伝子を組込んだ哺乳動物細胞発現ベクターを用いた。

ミュータント遺伝子：PrimeSTAR Max DNA Polymerase により変異遺伝子を作成した。

(4) 異所性遺伝子発現：HEK293 細胞への遺伝子導入は、リポフェクション法により行った。遺伝子導入細胞を同定するために EGFP を組み込んだ発現ベクターを共発現させ、蛍光顕微鏡に装着したフィルターを介して GFP 蛍光を検出した。

(5) 細胞膜電流測定：感覚神経細胞や種々の TRP チャンネル遺伝子導入細胞のチャンネル活性をホールセルパッチクランプ法により解析した。

(6) 細胞内蛍光イメージング：TRP チャンネルは高い Ca^{2+} 透過性を有するため、活性測定のため細胞内 Ca 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を計測した。蛍光 Ca^{2+} 指示薬である Fura2 を細胞に負荷して、リアルタイム細胞内イオン画像解析システムを用いて Ca イメージングを行った。

細胞内ポリスルファイド濃度の測定には、Fura2 に加えて、SSip-1 DA を細胞内に付加し、蛍光変化を経時的に測定した。

(7) RT-PCR：各種細胞より RNA を精製、cDNA を作成後、各種 TRP チャンネル及び House Keeping Gene に対する特異的プライマーを用いてリアルタイム RT-PCR を行った。

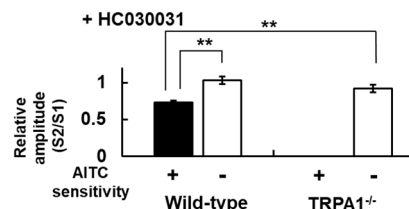
(8) 疼痛行動解析：マウス及びニワトリへ種々の薬物を投与し、生じた疼痛関連行動及び痛覚過敏反応を計測した。

4. 研究成果

(1) 侵害受容性 TRPA1 チャンネルと電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの機能的連関：T 型 Ca^{2+} チャンネルと TRPA1 は感覚神経に発現しており、両チャンネルは痛みの伝達に関連している。しかし、その機能的な相互作用については十分に解明されていない。この研究では、マウスの感覚神経細胞を用いて T 型 Ca^{2+} チャンネルと TRPA1 の機能的関係を薬理的に証明した。

RT-PCR 解析により、マウス知覚神経細胞には、全ての T 型 Ca^{2+} チャンネルサブタイプが発現していることが分かった。15mM カリウム (15K) による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、選択的 T 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬により抑制された。TRPA1 アゴニスト感受性ニューロン (TRPA1 発現細胞) における 15K 反応は、TRPA1 非発現細胞及び TRPA1 遺伝子欠損マウス由来知覚ニューロンより有意に大きかった。また、TRPA1 阻害剤 (HC030031) は TRPA1 発現細胞における 15K 反応を減少させ、更に TRPA1 アゴニストと 15K の併用により $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は有意に増強した。

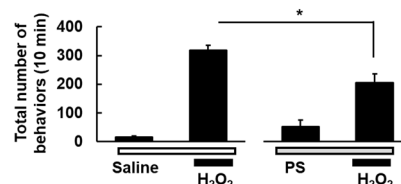
これらの結果から、知覚神経において T 型 Ca^{2+} チャンネルは TRPA1 と機能的相互作用を有していることが示された。それ故、T 型 Ca^{2+} チャンネルは TRPA1 関連痛覚制御のためのターゲット分子となりうる可能性が示された。



(2) 内因性イオウ化合物による酸化ストレス誘発性疼痛に対する抑制機構：硫化水素の酸化により生成される内因性硫黄化合物の (polysulfide) は、侵害受容性 TRPA1 チャンネルを刺激することを申請者は既に明らかにしている。一方 TRPA1 は、炎症時に生成される過酸化水素 (H_2O_2) などの活性酸素種によっても活性化される。そこでこの研究では、polysulfide による活性酸素種 (H_2O_2) 作用に与える影響について検討した。

マウス知覚神経細胞において、 H_2O_2 による TRPA1 活性化作用は polysulfide の前処理により減弱した。TRPA1 遺伝子発現細胞における H_2O_2 反応も polysulfide により減弱し、その作用には TRPA1 チャンネルのシステイン修飾と Ca/calmodulin 系を介したチャンネル脱感作が関与していた。マウスへの polysulfide の適用により H_2O_2 による侵害行動は減弱した。

これらの結果から、内因性イオウ化合物である polysulfide が炎症状態における TRPA1 の機能変化を介して、侵害受容調節に関与している可能性があることを明らかにした。

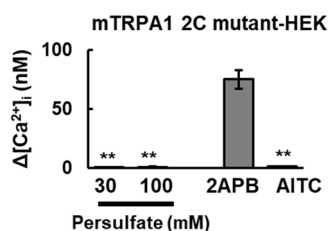


(3) 工業用硫黄含有化合物による刺激作用に関連する生体内分子の同定：過硫酸塩類は工業薬品として広く使用されており、暴露により職業性喘息、職業性鼻炎、接触性皮膚炎などを引き起こす。しかし、これらの毒性発現メカニズムは十分に解明されていない。ある種の TRP チャンネルは、呼吸器疾患や皮膚疾患に関与しているため、本研究では過硫酸ナトリウムによる TRP チャンネル機能に与える影響について検討した。

野生型マウスの感覚神経細胞において、過硫酸塩は $[Ca^{2+}]_i$ 増加を引き起こし、この反応は TRPA1 遮断薬で抑制された。一方、過硫酸塩は TRPA1 遺伝子欠損マウス由来神経細胞では反応を起こさなかった。異所性遺伝子発現細胞において、過硫酸塩は TRPA1 チャンネルに加えて、TRPV1 チャンネルに対しても活性化作用を示した。

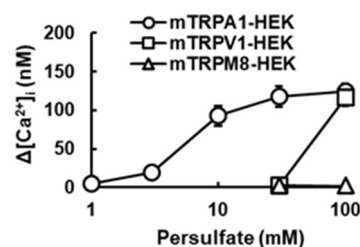
変異チャンネルを用いた解析により、過硫酸塩は TRPA1 の親電子アゴニスト感受性システイン残基に作用すること、TRPV1 への作用については酸による間接作用が関与していることが明らかになった。

これらの結果より、工業用硫黄含有化合物の曝露による呼吸器系および皮膚障害には、侵害受容性 TRPA1 及び TRPV1 チャンネルが関与している可能性が示された。それ故、過硫酸塩による毒性作用の改善には、これら TRP チャンネル遮断が有効であることを示した。



(4) 動物忌避作用における侵害受容体の関与：化学的な忌避剤には不快な感覚を引き起こすものがあり、この作用が動物に対し忌避行動を惹起させる。現在、種々の動物忌避剤が用いられているが、その詳細な作用メカニズムは不明なものが多い。この研究では、鳥類に対する忌避剤の一つである pulegone による忌避作用に対する侵害受容性 TRP チャンネルの関与について、ニワトリ感覚神経細胞及び異種発現系を用いて検討した。

ニワトリ感覚神経細胞において pulegone は 2 種類の異なる感受性を示した。即ち、低濃度から反応する細胞

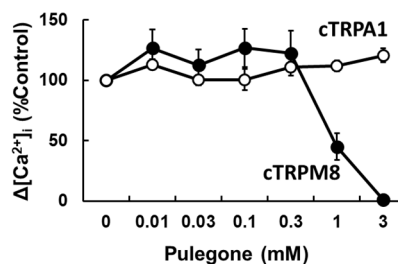


と高濃度から反応する細胞に分類された。薬理的解析の結果、前者は TRPM8 のみを、後者は TRPA1 と TRPM8 の両方を介することが明らかとなった。

ニワトリ TRP チャンネルを用いた異種発現系を用いて、pulegone による両チャンネルの活性化について検討した結果、高濃度では TRPM8 は抑制されたが、TRPA1 は抑制されなかった。

一方、マウス TRPM8、TRPA1 とともに pulegone により抑制されたことから、その効果には動物種差があることが分かった。ニワトリヒナへの pulegone 投与により痛み関連行動が誘発され、この行動は TRPA1 アンタゴニストにより抑制された。

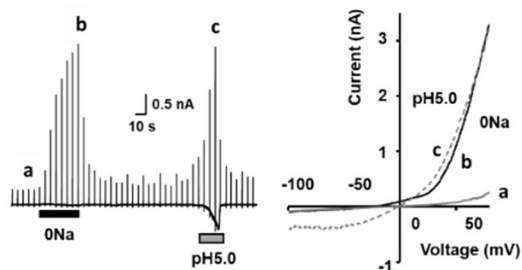
これらの結果から、pulegone は鳥類の感覚神経細胞において TRPM8 と TRPA1 の両チャンネルを刺激し、高濃度では前者を抑制するが後者を抑制しないことから、鳥類における忌避作用の分子標的として、主に侵害受容性 TRPA1 が重要であることが示唆された。この研究は、TRP チャンネル機能における動物種差のメカニズムの解明に加えて、新たな忌避剤の探索に有用な情報を提供すると考えられる。



(5) 細胞外陽イオンと TRPV1 作動薬による疼痛行動の誘発：TRPV1 感受性は動物種によって異なり、特に鳥類では capsaicin 感受性が低いことが示されている。また、哺乳類では細胞外ナトリウムイオン ($[Na^+]_o$) が TRPV1 活性を調節することを申請者らは既に報告している。しかし、鳥類 TRPV1 においてこれらの調節作用は明らかにされていない。そこで本研究では、capsaicin 及び $[Na^+]_o$ による鳥類 TRPV1 活性に与える影響について検討した。

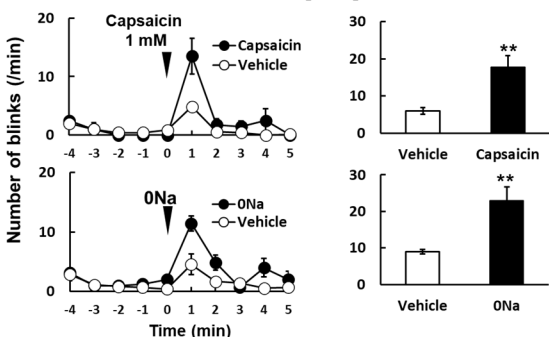
ニワトリ感覚神経細胞において、capsaicin による感受性は約 30 倍力価が低かった。 $[Na^+]_o$ を低下させると哺乳類とほぼ同程度の力価で TRPV1 チャンネル活性が見られた。

TRPV1 アンタゴニストの作用について調べたところ、哺乳類に対して抑制作用を示すアンタゴニストは、低 $[Na^+]_o$ による鳥類 TRPV1 の活性化をほとんど抑制しなかった。変異原性解析により、低 $[Na^+]_o$ はプロトン結



合部位との相互作用により TRPV1 活性を示すことが明らかになった。Capsaicin 又は低 $[Na^+]_o$ のニワトリヒナへの投与により、痛み関連行動が誘発された。

これらの結果は、細胞外低 $[Na^+]_o$ が *in vitro* で鳥類 TRPV1 を活性化し、*in vivo* では痛みを惹起することが明らかになった。本データより、鳥類 TRPV1 の機能解析は阻害薬の作用点や TRPV1 チャンネル活性機構を調べる上で有用な手段になることが示された。

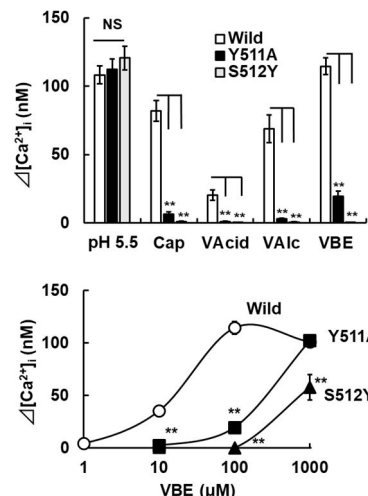


(6) バニロイド化合物による TRPV1 チャンネル活性制御機構の解明：TRPV1 は、唐辛子の辛味成分である capsaicin に反応する熱感受性侵害受容チャンネルである。このチャンネル機能を抑制する化合物は、鎮痛薬の候補分子と成り得るが、現在までに有効なものは見つかっていない。この研究では、capsaicin の構造的特徴に着目し、capsaicin と同様のバニリル骨格を有する複数の化合物による TRPV1 チャンネル活性に与える影響を調べた。

その結果、vanillic acid (VAcid), vanillyl alcohol (VALc) 及び vanillyl butyl ether (VBE) は、TRPV1 に対して活性化作用を有していることが明らかになった。これら作用は TRPV1 における capsaicin 感知部位の変異により減弱した。

更に、Vacid と vanillylmandelic acid (VMA) は capsaicin 及び酸による TRPV1 活性を抑制した。VMA による TRPV1 抑制作用は感覚神経細胞においても見られた。

この実験の結果から、バニロイド構造を持つ化合物が TRPV1 を標的とする新しい鎮痛剤開発のための戦略を提供すると考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 R Uzura , K Takahashi, S Saito, M Tominaga, T Ohta	4. 巻 1747
2. 論文標題 Reduction of extracellular sodium evokes nociceptive behaviors in the chicken via activation of TRPV1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 147052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2020.147052.	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 Shimada T, Takahashi K, Tominaga M, Ohta T.	4. 巻 72
2. 論文標題 Identification of molecular targets for toxic action by persulfate, an industrial sulfur compound.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurotoxicol	6. 最初と最後の頁 29-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuro.2019.02.003.	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 Majikina A, Takahashi K, Saito S, Tominaga M, Ohta T.	4. 巻 151
2. 論文標題 Involvement of nociceptive transient receptor potential channels in repellent action of pulegone.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Pharmacol	6. 最初と最後の頁 89-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2018.02.032.	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 Nishizawa Y, Takahashi K, Oguma N, Tominaga M, Ohta T.	4. 巻 96
2. 論文標題 Possible involvement of transient receptor potential ankyrin 1 in Ca ²⁺ signaling via T-type Ca ²⁺ channel in mouse sensory neurons.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurosci Res	6. 最初と最後の頁 901-910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jnr.24208.	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 Oka Y, Takahashi K, Ohta T.	4. 巻 30
2. 論文標題 The effects of vanilloid analogues structurally related to capsaicin on the transient receptor potential vanilloid 1 channel.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Reports	6. 最初と最後の頁 101243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101243.	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 Oguma N, Takahashi K, Okabe S, Ohta T.	4. 巻 757
2. 論文標題 Inhibitory effect of polysulfide, an endogenous sulfur compound, on oxidative stress-induced TRPA1 activation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurosci Lett	6. 最初と最後の頁 135982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2021.135982.	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 -

[学会発表] 計18件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 岡 祐樹、高橋賢次、太田利男
2. 発表標題 パニロイド化合物によるTransient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) 活性に与える影響について
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋賢次、石原亨、太田利男
2. 発表標題 Cytotoxic effects of mushroom extracts banked in FMRC
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山顕太郎、高橋賢次、太田利男
2. 発表標題 H ₂ S代謝産物とその類似体によるTransient Receptor Potential Ankyrin 1(TRPA1)に対する抑制作用
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋賢次、太田利男
2. 発表標題 メントールによるヒト肺がん由来細胞A549のアポトーシス誘導経路について
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川南海、高橋賢次、太田利男
2. 発表標題 T型CaチャンネルはTransient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) との相互作用により炎症性疼痛に関与する
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋賢次、太田利男
2. 発表標題 ヒト肺がん由来A549細胞におけるメントールによる活性酸素非介在性細胞死誘発メカニズム
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋賢次、太田利男
2. 発表標題 きのご類抽出物ライブラリーを用いた新規抗腫瘍活性成分の探索
3. 学会等名 第1回日本比較薬理学毒性学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A Majikina, K Takahashi, S Saito, M Tominaga, T Ohta
2. 発表標題 Nociceptive TRP channels are molecular targets of a bird repellent pulegone.
3. 学会等名 WCP2018 Kyoto (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K Takahashi, T Ohta
2. 発表標題 Cytotoxic effects of menthol in lung cancer cell line, A549.
3. 学会等名 WCP2018 Kyoto (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 眞境名 梓、高橋賢次、斎藤 茂、富永真琴、太田利男
2. 発表標題 鳥類忌避剤Pulegoneによる侵害受容性TRPチャネル活性化
3. 学会等名 第14回 TRP チャネル研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小熊尚子、高橋賢次、太田利男
2. 発表標題 エンドサルファーによる酸化ストレス誘発性TRPA1反応に対する抑制作用
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋賢次、太田利男
2. 発表標題 メントールによるヒト肺がん由来細胞A549の細胞毒性作用機序について
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田利男
2. 発表標題 内因性硫黄化合物の侵害受容メッセンジャーとしての役割：活性硫黄種の新展開
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋賢次、太田利男
2. 発表標題 シワタケ菌糸体培養ろ液抽出物の抗腫瘍活性成分の探索
3. 学会等名 第2回日本比較薬理学毒性学会 春季研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋賢次、太田利男
2. 発表標題 ヒト肺がん由来A549細胞のメントール誘発細胞毒性におけるオートファジーとアポトーシスの関係
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小熊尚子、高橋賢次、太田利男
2. 発表標題 エンドサルファーによる酸化ストレス誘発性TRPA1反応に対する抑制作用
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡祐樹、高橋賢次、太田利男
2. 発表標題 カプサイシン構造に類似したバニロイド化合物によるTRPV1チャネル活性に与える影響
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本美穂、高橋賢次、太田利男
2. 発表標題 精油成分Linaloolによる鎮痛効果メカニズムについて
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	高橋 賢次 (TAKAHASHI Kenji) (00400143)	鳥取大学・農学部・准教授 (15101)	
研究分担者	稲波 修 (INANAMI Osamu) (10193559)	北海道大学・獣医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	今川 敏明 (IMAGAWA Toshiaki) (20142177)	北海道大学・理学研究院・特任准教授 (10101)	

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
---------	---------