

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590156

研究課題名 (和文) 過敏性腸症候群モデル動物における温度感受性受容体を介する知覚過敏性反応

研究課題名 (英文) Hyperesthesia via the alteration of thermo-sensitive TRP channels in animal model of irritable bowel syndrome

研究代表者

堀江 俊治 (SYUNJI HORIE)

城西国際大学・薬学部・教授

研究者番号：50209285

研究成果の概要：精神的ストレスが積み重なると、消化管に大きな影響を与え、便通異常と痛みを伴う過敏性腸症候群というやっかいな病気に進展する。この原因を解明するために、過敏性腸症候群モデル動物を用いた研究を行った。結果として、ストレスにより消化管に知覚過敏が引き起こされており、これにはカプサイシン受容体 TRPV1 (43℃の熱で活性化するセンサー) の反応性が大きくなっていることが判明した。したがって、このカプサイシン受容体は新しい医薬品のターゲットになると考えている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：薬効解析学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：TRPV1, カプサイシン, TRPA1, アリルイソチオシアネート, 下部消化管, 内臓知覚神経, 免疫組織化学, ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 温度感受性受容体とは：特定の温度以上あるいは以下で活性化するイオンチャネル内蔵型受容体 transient receptor potential (TRP) ファミリーで、主に求心性一次知覚神経に発現しており、末梢の温度情報を中枢に伝達する役割を担って

いる。熱刺激受容体 TRPV1 はトウガラシ辛味成分カプサイシンの作用点として発見された受容体で、43℃以上の（熱いを感じる）温度に活性化される。一方、冷刺激受容体 TRPA1 はワサビ辛味成分アリルイソチオシアネートの作用点として発見された受容体で、17℃以下の（冷たい

を感じる) 温度により活性化される。

- (2) ストレス性胃腸疾患の原因究明は国家的急務の課題: ちまたの下痢止め口内崩壊薬剤の売り上げが急激に上昇したことなどからも、便通異常、胃腸疼痛を訴える患者の多さと深刻さがうかがえる。不安などの精神的ストレスが積み重なると、消化管に大きな影響を受け、ストレス性胃腸疾患(機能性胃腸症、過敏性腸症候群)という厄介な病気に進展する。このストレス性胃腸疾患の原因究明と対策は今や国家レベルでの課題に浮上し、その原因の科学的解明は急務となってきている。その病態には消化管の知覚過敏が大きく絡んでいる。筆者らは内臓知覚神経系に発現する温度感受性受容体TRPV1およびTRPA1に着目し、これらの受容体による温度感受性の知覚受容システムが増強され、それが内臓知覚過敏性を引き起こすのだろうと考えた。
- (3) 研究開始当初の研究成果: 筆者らは「Ca²⁺拮抗薬では抑制できないCa²⁺流入の経路を介する生体機能の解明」に関する研究を行っていた。その研究経過の中で、熱刺激受容体TRPV1が正常動物の消化管一次知覚神経に多く発現しており、消化管機能に重要な働きを有していることを見いだした。筆者らはこれまでにTRPV1が胃の防御機構に重要な役割を果たしていることを報告している。さらに、TRPV1神経線維が胃の粘膜と筋間神経叢に豊富に存在しており、これが胃酸分泌と胃運動を調節していることも報告している。当該研究ではこれらの新知見を発展させ、過敏性腸症候群モデル動物の消化管における温度感受性受容体の変化について検討した。

2. 研究の目的

- (1) 当該研究では「ストレスによる消化管機能の内臓知覚神経過敏性反応において、温度感受性受容体の分布あるいは機能の増大が関与しているのではないか」と言う仮説を立て、個体動物、臓器、細胞レベルの実験標本系を用いて、過敏性腸症候群モデル動物における温度感受性受容体の分布と機能の変化について検

討を行った。

- (2) 消化管(胃、大腸、結腸)において、免疫組織化学的手法を用いてTRPV1、TRPA1がどのように分布し、正常動物の組織と比べてどのように変化しているかを検討した。
- (3) 消化器機能(消化管平滑筋収縮、胃粘膜血流)に対する温度感受性受容体作動薬の薬理作用を検討した。

3. 研究の方法

- (1) 免疫組織化学的手法による TRPV1 の分布: ウィスター系雄性ラットより胃を摘出後固定し、凍結切片を作成した。また、ddY 系雄性マウスより大腸を摘出後、近位、横行、遠位結腸、直腸の部位別に分け、凍結切片を作成した。切片は、一次抗体のウサギ血清抗 TRPV1 抗体とインキュベートし、ABC 法とタイラマイド-フルオロセインにて蛍光染色した。その後さらに、抗 CGRP 抗体、抗サブスタンス P 抗体とともにインキュベートし、ローダミンの二次抗体を用いて蛍光二重染色した。染色した標本は蛍光顕微鏡、あるいは共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。
- (2) 摘出消化管平滑筋標本における平滑筋張力測定: ハートレイ系雄性モルモットより回腸標本を作成した。また、ddY 系雄性マウスより下部消化管を摘出し、近位・横行・遠位結腸および直腸の部位に分けて平滑筋標本とした。標本をマグナス装置に懸架し、縦走筋方向の筋張力を等張性に記録した。摘出標本は 0.7 g の負荷をかけ、37°C 保温下の保温槽内で、95%O₂ - 5%CO₂ の混合ガスを通気し、栄養液を満たした臓器槽内に支持柱を用いて懸架した。標本の収縮力はマグナス法により等張性に測定した。
- (3) 麻酔下ラットにおける胃粘膜血流の測定: 動物は雄性 SD 系ラットを用い、ウレタン麻酔下に胃を *ex-vivo* チェンバーに装置し、粘膜血流はレーザードップラー血流計で測定した。カプサイシン (3.3 mM) は 10 分間胃内適用した。
- (4) 母子分離ストレスモデル: マウス出生後、

2日目から14日目まで、1日3時間ずつ母親から離すため、隣のケージに移す処置を行った。

4. 研究成果

(1) ラット胃およびマウス下部消化管凍結切片における熱刺激受容体受容体 TRPV1 の分布

①免疫組織化学的手法を用いて、ラット胃の各領域、各層における TRPV1 の分布を詳細に検討した。TRPV1 神経は通常の染色方法では検出されなかったが、アビジン・ビオチンコンプレックス法とタイラマイドシグナル増幅法を組み合わせることで初めて共焦点顕微鏡下で検出された。胃体部切片において、TRPV1 免疫活性は神経線維状に観察された。Protein gene product 9.5 との二重染色の結果から、TRPV1 免疫活性は神経上に存在することを確認した。また、TRPV1 神経線維は胃粘膜層、平滑筋層、神経叢などすべての層で認められ、中でも胃粘膜層では胃腺に沿う形で、さらに粘膜下層の血管周囲と筋間神経叢には豊富に存在していることが明らかとなった。これらの結果より、TRPV1 神経が胃粘膜血流と平滑筋運動を調節しているというこれまでの生理学的知見を支持され、TRPV1 発現知覚神経が胃腺を構成する細胞それぞれに何らの影響を及ぼしている

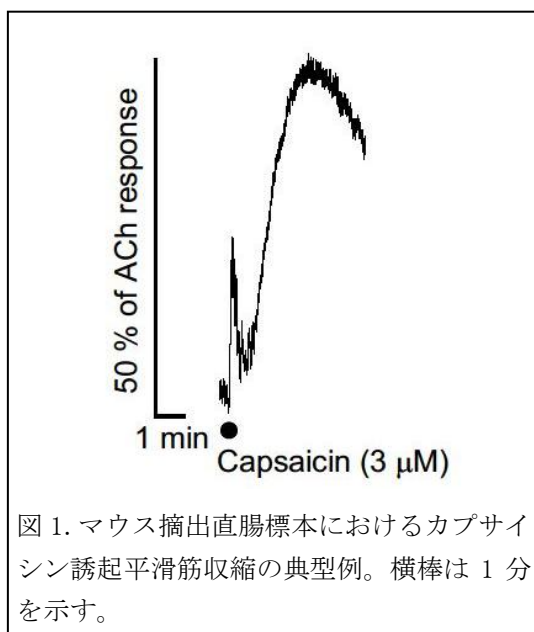


図 1. マウス摘出直腸標本におけるカプサイシン誘起平滑筋収縮の典型例。横棒は 1 分を示す。

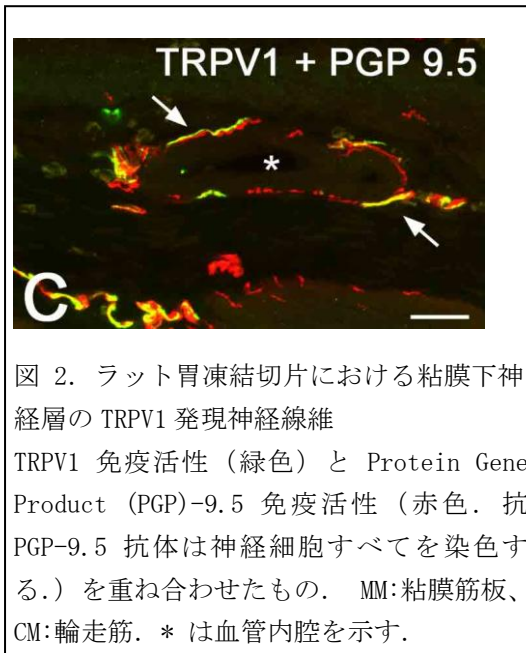


図 2. ラット胃凍結切片における粘膜下神経層の TRPV1 発現神経線維 TRPV1 免疫活性 (緑色) と Protein Gene Product (PGP)-9.5 免疫活性 (赤色. 抗 PGP-9.5 抗体は神経細胞すべてを染色する.) を重ね合わせたもの. MM: 粘膜筋板, CM: 輪走筋. * は血管内腔を示す.

ることが推察された。

②下部消化管の全域において、TRPV1 免疫活性は線維状に認められ、特に直腸、遠位結腸の粘膜下神経叢、筋間神経叢に多く局在していた。粘膜層においても腸腺を横切って存在していることが明らかとなった。また、粘膜下の細動脈、細静脈、リンパ管の周囲に TRPV1 発現神経が確認された。Protein gene product 9.5 との二重染色の検討から、TRPV1 は神経軸索上に発現しており、細胞体には認められなかった。CGRP との二重染色の検討から TRPV1 神経線維に CGRP が発現していることが明らかとなった。これらのことより TRPV1 は外来性の一次知覚神経上に発現していることが示唆された。

(2) 麻酔下ラットにおける TRPV1 刺激による胃粘膜血流増大反応

カプサイシン誘起胃粘膜血流増大に関与する NO が神経型 NO 合成酵素もしくは内皮型 NO 合成酵素に由来するのか検討を行った。カプサイシン単独適用では、用量依存性的かつ有意な血流増大を誘起した。しかし、カプサイシンの 2 回目投与では血流増大は観察されなかった。カプサイシン神経毒性用量投与による知覚神経麻痺処置および TRPV1 拮抗薬 BCTC 前処置により、カプサイシン誘起

血流増大は完全に抑制した。

(3) TRPV1 発現とカプサイシン誘起下部消化管平滑筋収縮反応の部位差

①TRPV1 発現神経面積の部位差を免疫組織学的検討により行った。同一濃度の抗 TRPV1 抗体により染色された TRPV1 発現神経を二値化ソフトにより定量した結果、直腸において TRPV1 発現神経は最も多く存在しており、遠位結腸では直腸の約 50%、横行、近位結腸では約 10%程度の発現であった。

②マグヌス法によりカプサイシンの平滑筋張力に対する作用について検討を行った。その結果、直腸および遠位結腸では、横行結腸や近位結腸と比較して、高い反応性を有することが明らかとなった。その収縮パターンは部位によって大きく異なっており、直腸、遠位結腸ではカプサイシン投与直後に一過性収縮反応が観察され、それに続いて持続的収縮反応が見られた。横行、近位結腸では一過性収縮反応のみが観察された。以上の結果から特に下部消化管の肛門側ほど TRPV1 発現神経線維が多く、カプサイシンによる反応性も高いことが明らかとなった。

(5) ストレス負荷マウス下部消化管におけるホット受容体 TRPV1 反応性の亢進

①正常時に消化管運動を調節している TRPV1 を介する内臓知覚神経系受容体の知覚受容システムが、病態時には増感することで内臓知覚過敏を引き起こすのではないかと考え検討を行った。IBS モデルとしては、幼少期に母子分離ストレスを負荷したマウスを作製し、その摘出下部消化管標本で正常マウスと比べ、カプサイシンに対する反応性に違いが見られるかについて検討を行った。

②同腹子のコントロール群と比較して、近位および横行結腸では母子分離ストレス負荷による影響は見られなかったが、遠位結腸と直腸では母子分離ストレス負荷によって一過性の弛緩・収縮反応の増強が観察された。肛門側の下部消化管運動において TRPV1 の感受性が増大している可能性が示唆された。したがっ

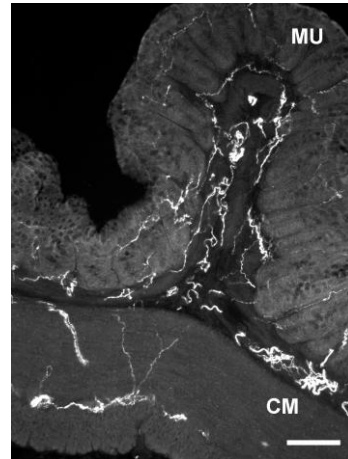


図 3. マウス直腸における TRPV1 発現神経。
MU：粘膜，CM：輪状筋。Scale bar：：100 μ m

て、下部消化管肛門側ではストレスによって、TRPV1 の感受性が増大している傾向が観察された。現段階の結果からははっきりしたことが言えないが、この TRPV1 感受性増大がストレスによる便秘異常に関わっているのだろうと推定している。

(6) まとめ

①香辛料は、食欲増進、消化促進、唾液・胃液促進などの薬理作用を持つとされているが、これまで科学的根拠は乏しかった。本研究により、トウガラシ成分カプサイシンは、知覚神経上の熱刺激受容体 TRPV1 刺激を介して胃腸機能（胃粘膜保護作用、胃酸分泌、消化管運動）を高めることを見いだした。

②消化管機能を調節している熱刺激受容体 TRPV1 を介する内臓知覚受容システムが、ストレス負荷により増感することで内臓知覚過敏を引き起こすのであろうという仮説についてさらに検討していきたい。

5. 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ①Matsumoto, K., Kurosawa, E., Terui, H., Hosoya, T., Tashima, K., Murayama, T., Priestley, J.V., Horie, S.:
Localization of TRPV1 and contractile

- effect of capsaicin in mouse large intestine: high abundance and sensitivity in rectum and distal colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, in press (2009)、査読有
- ②Murakami I., Hamada Y., Yamane S., Fujino H., Horie S., Murayama T.: Nicotine-induced neurogenic relaxation in the mouse colon; changes with dextran sodium sulfate-induced colitis. *J. Pharmacol. Sci.*, 109(1), 128 - 138 (2009)、査読有
- ③Matsumoto, K., Kimura, H., Tashima, K., Uchida, M., Horie, S.: Validation of ¹³C-acetic acid breath test by measuring effects of loperamide, morphine, mosapride, and itopride on gastric emptying in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 31(10), 1917-1922 (2008)、査読有
- ④Zhang, G., Shimokawa, S., Mochizuki, M., Kumamoto, T., Nakanishi, W., Watanabe, T., Ishikawa, T., Matsumoto, K., Tashima, K., Horie, S., Higuchi, Y., Dominguez, O.P. The Chemical Constituents of *Aristolochia constricta*: Antispasmodic effects of its constituents in guinea-pig ileum and isolation of a diterpeno-lignan hybrid. *J. Natural Products*, 71, 1167-1172 (2008)、査読有
- ⑤Watanabe, N., Horie, S., Spina, D., Michael, G.J., Page, C.P., Priestley, J.V.: Immunohistochemical localization of transient receptor potential vanilloid subtype 1 in the trachea of ovalbumin-sensitized guinea pigs. *International Archives of Allergy and Immunology*, 146(1), 28-32 (2008)、査読有
- ⑥Matsumoto, K., Takayama, H., Narita, M., Nakamura, A., Suzuki, M., Suzuki, T., Murayama, T., Wongseripipatana, S., Misawa, K., Kitajima, M., Tashima, K., Horie, S.: MGM-9 [(E)-methyl 2-(3-ethyl-7a, 12a-(epoxyethanoxy)-9-fluoro-1, 2, 3, 4, 6, 7, 12, 12b-octahydro-8-methoxyindolo[2, 3-a]quinolizin-2-yl)-3-methoxyacrylate], a derivative of the indole alkaloid mitragynine: a novel dual-acting μ - and κ -opioid agonist with potent antinociceptive and weak rewarding effects in mice. *Neuropharmacology*, 55(2), 154-165 (2008)、査読有
- ⑦堀江俊治: トウガラシの辛味は胃でも味わう: カプサイシンのバニロイド受容体を介した胃機能への薬理作用. *Food and Food Ingredients Journal of Japan*, 213(7), 660-665 (2008年7月)、査読有
- ⑧堀江俊治、田嶋公人、松本健次郎: 温度と辛味を感じる受容体: 消化管にとってよい受容体か? 悪い受容体か? *G. I. Research*, 16(5), 403-410 (2008年10月)、査読有
- ⑨Penuelas, A, Tashima, K., Tsuchiya, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Horie, S., Yano, S.: Contractile effect of TRPA1 receptor agonists in the isolated mouse intestine. *Eur. J. Pharmacol.*, 576(1-3), 143-50 (2007)、査読有
- ⑩Horie, S., Matsumoto, K., Tashima, K.: Effect of capsaicin via TRPV1 in isolated mouse lower gastrointestinal tract and the influence of neonatal stress. *Autonomic Neuroscience*, 135(1-2), 96-97 (2007)、査読有
- ⑪Sasaki, M., Nakamura, H., Tsuchiya, S., Horie, S., Kashiwayanagi, M., Saito, T., Murayama, T.: Quercetin-induced PC12 cell death accompanied by caspase-mediated DNA fragmentation. *Biol. Pharm. Bull.*, 30(4), 682-686 (2007)、査読有
- [学会発表] (計 11 件)
- ① 堀江俊治、松本健次郎、田嶋公人: ラット胃におけるバニロイド受容体 TRPV1 神経の分布: 脳腸ペプチド カルシトニン遺伝子関連ペプチドおよびサブスタンス P との共存。ワークショップ。第 5 回消化管学会総会 (東京、2009. 2. 12-13)
- ② 田嶋公人、佐藤翔吾、吉田実世、松本健次郎、村山俊彦、堀江俊治: ラット培養

胃粘膜細胞におけるタイトジャンクションバリアに対する温度感受性チャネル TRPV1、TRPA1 作動薬の作用。シンポジウム。第 26 回 Cytoprotection 研究会 (京都、2008. 3. 14)

- ③ 松本健次郎、田嶋公人、堀江俊治：マウス直腸、遠位、横行、近位結腸におけるバニロイド受容体 TRPV1 の局在とカプサイシン誘起平滑筋収縮の相関。シンポジウム。第 26 回 Cytoprotection 研究会 (京都、2008. 3. 14)
- ④ Kenjiro Matsumoto, Kimihito Tashima, Syunji Horie: Differences in localization of TRPV1 channels and contractile effect of capsaicin in mouse isolated lower gastrointestinal tract: higher abundance and sensitivity of TRPV1 channels in rectum and distal colon than in transverse and proximal colon. Digestive Disease Week and the 109th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute (May 17-22, 2008, Washington, D. C, USA)
- ⑤ 松本健次郎、田嶋公人、堀江俊治：マウス摘出下部消化管におけるバニロイド受容体 TRPV1 の局在とカプサイシン誘起平滑筋収縮作用機序の解明。生体機能と創薬シンポジウム 2008 (東京、2008. 9. 5-6)
- ⑥ 堀江俊治：トウガラシの辛みの薬効に科学的エビデンス：胃におけるバニロイド受容体 TRPV1 発現神経の分布と機能。招聘講演。第 7 回神経消化器病学会 (東京、2008. 9. 30)
- ⑦ Kimihito Tashima, Penueles Angelica, Shizuko Tsuchiya, Kenjiro Matsumoto, Tomonori Nakamura, Shingo Yano, Syunji Horie: Cold receptor TRPA1 mediate the smooth muscle contraction in isolated mouse lower intestinal tract. Digestive Disease Week (Washington, DC, 2007. 5. 19-24)
- ⑧ 堀江俊治、Angelica Penueles、土屋静子、中村智徳、矢野眞吾、松本健次郎、

田嶋公人：マウス摘出下部消化管標本におけるワサビ成分アリルイソチオシアネートの平滑筋収縮作用：低温感受性チャネル TRPA1 の関与。第 24 回和漢医薬学会大会 (富山、2007. 9. 8-9)

- ⑨ 佐藤翔吾、田嶋公人、松本健次郎、土屋静子、矢野眞吾、村山俊彦、堀江俊治：ラット胃粘膜初代培養細胞のタイトジャンクションバリアに対する温度感受性 TRPV1, TRPM8, および TRPA1 チャネル作動薬の作用。第 35 回日本潰瘍学会 (鳥取、2007. 9. 21-22)
- ⑩ Syunji Horie, Kenjiro Matsumoto, Kimihito Tashima: Effect of capsaicin via TRPV1 in isolated mouse lower gastrointestinal tract and the influence of neonatal stress. International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN) 2007 (Kyoto, 2007. 10. 5-8)
- ⑪ 堀江俊治：消化器疾患とバニロイドレセプター 辛味は消化器でも味わう：バニロイドレセプター TRPV1 による消化管機能調節。ランチオンセミナー。Japan Digestive Disease Week 2007 (神戸、2007. 10. 20)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 俊治 (SYUNJI HORIE)
城西国際大学・薬学部・教授
研究者番号：50209285

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し