

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07109

研究課題名(和文) 腸、脳に発現するTRPM8チャネルを標的とした過敏性腸症候群の治療

研究課題名(英文) Role of TRPM8 in the irritable bowel syndrome like symptoms induced by early-childhood social defeat stress in mice

研究代表者

松本 健次郎(Matsumoto, Kenjiro)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10406770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：過敏性腸症候群(IBS)は、腹痛、下痢、便秘を慢性的に繰り返す機能性消化管障害である。TRPM8は、メントールの受容体として同定された冷感受性カチオンチャネルである。本研究では、幼少期の社会的敗北ストレスによって引き起こされるIBS様症状におけるTRPM8の役割を、WTおよびTRPM8KOマウスを用いて検討した。

幼少期社会的敗北ストレス負荷により、成熟後にIBS様の症状が確認された。TRPM8は大腸の感覚神経と脳のGABA作動性神経に発現していた。TRPM8は、IBS様症状に対して保護的な役割を担っていることが示唆された。TRPM8アゴニストは、IBS治療の魅力的な標的であると推定される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的に高い有病率を示している過敏性腸症候群は、有用な実験動物モデルが不足している。本研究の成果は、幼少期マウス社会的敗北ストレスによる新規病態モデルを提案することができた。本病態モデルにおいてTRPM8遺伝子欠損マウスを用いた検討から、TRPM8の活性化により症状が緩和されることが示唆された。これは基礎研究からのエビデンスの乏しかった、過敏性腸症候群とTRPM8の関わりについて重要な情報となる。

研究成果の概要(英文)：Irritable bowel syndrome (IBS) is the most common functional gastrointestinal disorder that chronically repeats abdominal pain, diarrhea and constipation. Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) is a cold-sensitive, calcium-permeable cation channel identified as a receptor for menthol which provides relief from stress and mental exhaustion. The present study investigated the role of TRPM8 in IBS like symptoms induced by early-childhood social defeat stress using WT and TRPM8 deficient (KO) mice. Juvenile social defeat stress exposure results in later onset of IBS-like symptoms in WT mice. TRPM8 expressed in sensory neuron in colon and GABAergic neuron in brain. TRPM8 deficiency attenuated the IBS like symptoms. TRPM8 has a protective role against early childhood social defeat stress induces IBS-like symptoms. TRPM8 agonist may be an attractive target for the treatment of IBS.

研究分野：薬理学

キーワード：過敏性腸症候群 温度感受性受容体 TRPM8 社会的敗北ストレス 内臓痛覚過敏 知覚神経

1. 研究開始当初の背景

過敏性腸症候群 (Irritable Bowel Syndrome, IBS) は主にストレスに起因して、腹痛、下痢、便秘を慢性的にくりかえす疾患である。世界における IBS の有病率は 10%以上であり、本邦においても 1,000 万人を超える患者がいると推定されている。IBS は、現代社会において急増しており、頻発する便意の問題で学校や会社に行けなくなる場合があり、生活の質 (QOL) を著しく低下させることが社会的に大きな問題となっている。

IBS の病態は不明な点が多く残されているが、病因としては、腸における微弱な炎症や腸内細菌、脳におけるストレス、神経可塑性などが推察されている (Nat Rev Dis Primers. 2016;2:16014-)。その中でも幼少期のストレスは IBS のリスクを高めることが明らかとなっている。治療薬としては消化管運動調節薬、高分子重合体などがあるが、病態の複雑さにより、既存薬の治療効果は十分でなく、医療ニーズに応える治療薬が不足している。

温度感受性 Transient Receptor Potential (TRP) チャネルは、温度だけでなく、唐辛子などの植物成分、機械・圧刺激、そして様々な生体内メディエーターの刺激に応答する多刺激反応性受容器である。TRP は外界とつながる臓器である消化管において、細胞外の環境を感知するセンサーとして重要な役割を担っている。TRP の異常は、IBS や炎症性腸疾患などの慢性の腸疾患につながることを示唆されている。

代表者は、センサーとしての TRP に着目し炎症や内臓痛覚過敏における研究を行ってきた。本研究で標的とする TRPM8 は、ストレス改善効果の報告されているメントールの受容体として同定された。代表者は、TRPM8 が腸だけでなく、脳神経に発現することを明らかにした。さらにストレスに起因する IBS モデル動物を用いた予備検討から、TRPM8 が、IBS の腹痛や下痢、ストレス応答に関わっていることを発見した。

冷感受性 TRPM8 は、主に知覚神経に発現し、片頭痛、神経障害性疼痛や炎症に関与していることが報告されている。また TRPM8 が制御する伝達物質としてカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) が炎症やうつ症状を制御していることも示唆されている。しかし、TRPM8 と IBS の関係については未解明であり、基礎的な検討は行われていない。そこで本研究では「TRPM8 は、IBS の腹痛、便秘異常を制御する鍵分子であるか？」という「問い」に対して、若齢期ストレス、出生直後のストレス、微弱な腸炎症に起因する IBS モデルにおいて、腸、脳の TRPM8 の役割を検討することで、その答えを明らかにする。本研究の遂行により、急増する IBS の病態解明において有益なデータを社会に提供することができる。

2. 研究の目的

IBS は主にストレスに起因して、腹痛、下痢、便秘を慢性的にくりかえす機能性消化管障害である。IBS の病態は不明な点が多く残されているが、病態モデルが不足していることが治療薬の開発を遅らせている。

本研究は、IBS 患者において幼少期のストレスが高い事に着目し、社会的敗北ストレスを用いて新規病態モデルの作製を行った。さらに新規治療標的としてストレス改善効果の報告されているメントールの受容体として同定された TRPM8 を着目し、TRPM8 遺伝子欠損動物を用いて TRPM8 の役割を解析した。

3. 研究の方法

・ IBS モデル動物の作製

若齢期社会的敗北ストレスモデルは、28 週齢 ICR マウスのエリアに 4 週齢の WT (C57BL/6) もしくは TRPK0 を入れ、1 日 5~10 分間攻撃を受けさせる。攻撃時以外は ICR マウスと隣接飼育する。これを 10 日間繰り返した後、5 週間通常飼育する。その後、拘束ストレスケージにマウスを入れ成熟後のストレスとして負荷した。

・ 病態評価

- ・ 内臓痛覚閾値の測定：腹直筋に電極を装着し、1 週間後バロスタット装置によるバルーン圧負荷に対する腹直筋の収縮を筋電図記録装置で測定する。
- ・ 排便数・便性状の評価：1 時間の排便数、便性状スコア、便の水分含量を測定する。

・ 行動解析

ソーシャルインタラクション、オープンフィールド、高架式十字迷路、強制水泳、テイルサスペンション試験による行動を EthoVision で解析し、社会性、不安、うつ様行動を評価する。また血漿中のコルチコステロン量を EIA キットで定量する。

・ 腸内細菌叢の解析

16S rRNA 領域を増幅した PCR 産物等を対象に、次世代シーケンサーを用いて解析した。

・ 免疫組織染色

TRPM8-EGFP マウスから脊髄後根神経節 (DRG)、大脳および大腸を摘出し、抗 GFP 抗体で染色後と各種特異的抗体との二重染色により行った。

4. 研究成果

a. 若齢期社会的敗北ストレス負荷、5週間後の解析

若齢期社会的敗北ストレスが成熟期においても維持されているか、ソーシャルインタラクションテストを行った (Figure 1)。ストレスを受けたマウスでは攻撃マウス存在下での escape zone での滞在時間が正常マウスと比べ有意に増加したことから、攻撃マウスに対するトラウマが維持されていることが示唆された。

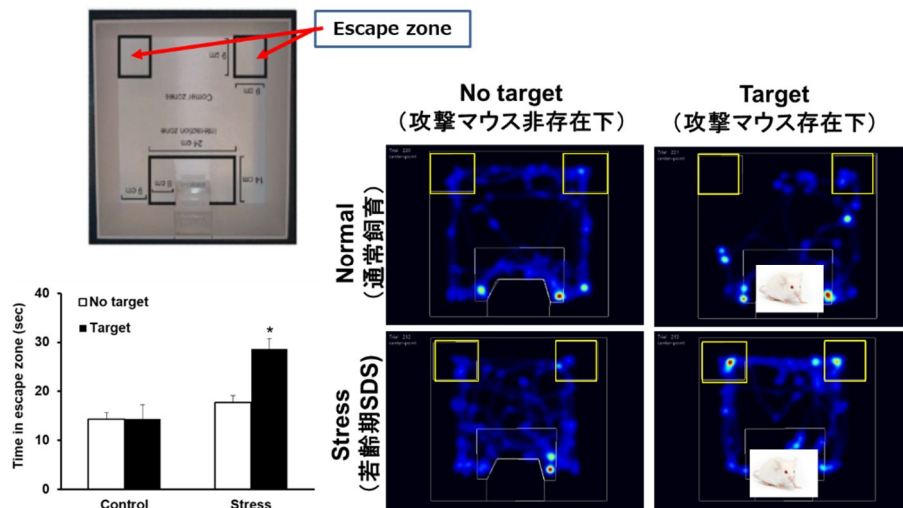


Figure 1. Social avoidance behavior was identified at 5 weeks after the exposure of juvenile social defeat stress (stress). Duration of time spent in the escape zone (yellow square) with (target) or without (no target) aggressor mouse. Representative results of heat maps in social interaction test with or without aggressor mouse. Data are presented as the mean \pm SEM (n = 8 mice per group). *p < 0.05 for comparison with the corresponding no target.

続いて行動薬理的試験によって、不安、うつ様の行動を解析した。若齢期社会的敗北ストレス負荷マウスでは、正常マウスと比べ、テイルサスペンション試験、強制水泳試験における無働時間ならびに高架式十字迷路試験におけるオープンアームズの滞在時間が有意に増加した (Figure 2)。

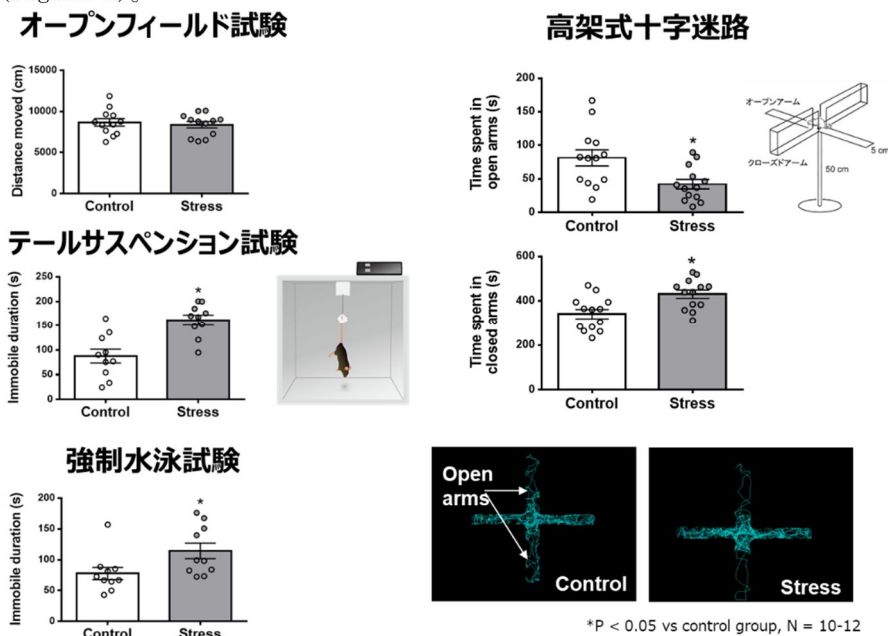


Figure 2. Juvenile SDS induced depression- and anxiety-like behaviors. The behaviors of control and juvenile SDS mice (stress) in open field, tail suspension, forced swimming and elevated plus maze tests. Data are presented as the mean \pm SEM (n = 8-13 mice per group). *p < 0.05 compared with the control group.

若齢期ストレス負荷群では、大腸における 5-HT、CGRP 発現の増加、内臓痛覚過敏、ならびに腸内細菌叢の変化も検出された。

b. 若齢期社会的敗北ストレス 5 週間後の拘束ストレスに対する反応

成熟後の拘束ストレス負荷は、若齢期ストレス群では対照群と比較して、排便数の増加、ビーズ排出時間の短縮、血中コルチコステロン、大腸のセロトニンが有意に増加することが示唆されたが、便の水分含量と腸管透過性には影響を及ぼさなかった (Figure 3)。社会的敗北ストレスは扁桃体において拘束ストレス時にノルアドレナリンの代謝回転を亢進させることが示唆された。

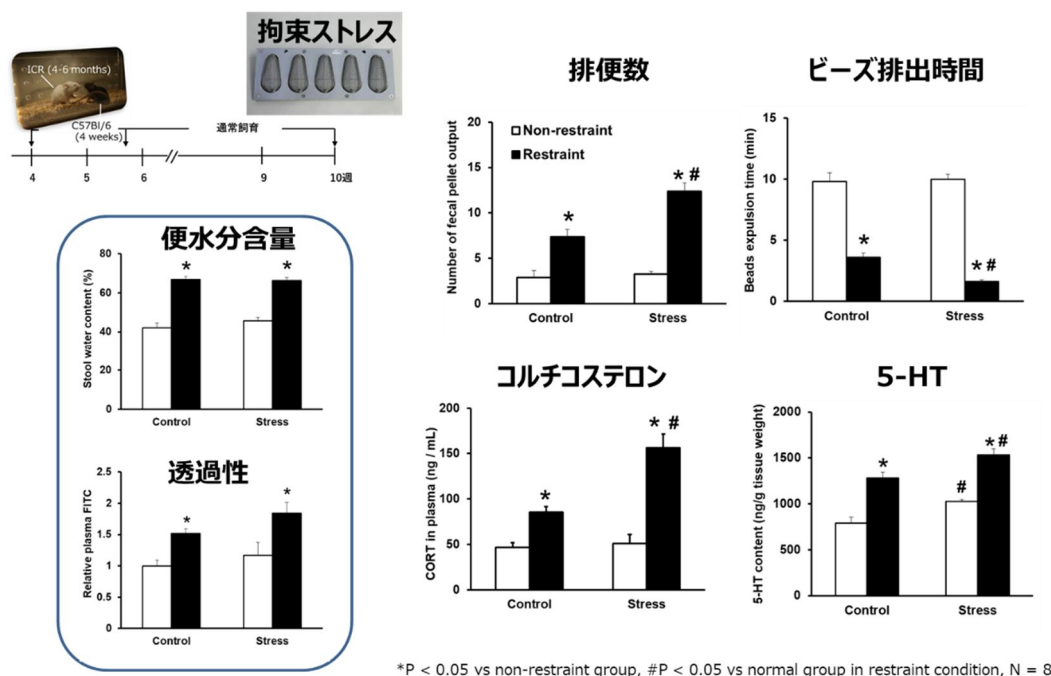
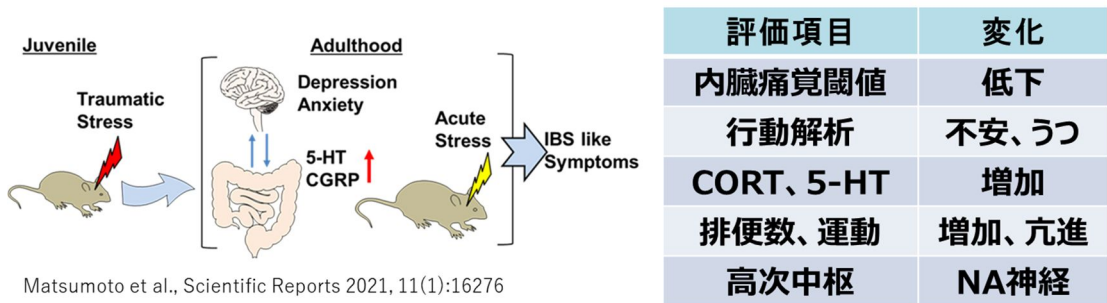


Figure 3. Juvenile SDS exacerbated stress responses in the restraint condition. Fecal pellet output number, bead expulsion time, stool water content, relative plasma FITC content, plasma corticosterone levels, and 5-HT content of control and juvenile SDS (stress) mice in the non-restraint and restraint stress conditions. Data are presented as the mean \pm SEM (n = 8 mice per group). *p < 0.05 for comparison with the non-restraint group. #p < 0.05 for comparison with the control group in the restraint condition.

若齢期社会的敗北ストレスは成熟期でも維持され、内臓痛覚過敏および再ストレスに対する感受性増大が観察された。よって本モデルは若齢期のストレスによる IBS モデルとして有用である可能性が推察された。



c. 若齢期敗北ストレス誘起 IBS 症状における TRPM8 の役割

TRPM8-EGFP マウスを用いて、マウス大腸、脊髄後根神経節（DRG）ならびに大脳における TRPM8 の発現解析を行った（Figure 4）TRPM8 は CGRP やサブスタンス P を含有する大腸の内在性・外来性知覚神経に発現していることが観察された。大脳では GABA 作動性神経に発現していた。

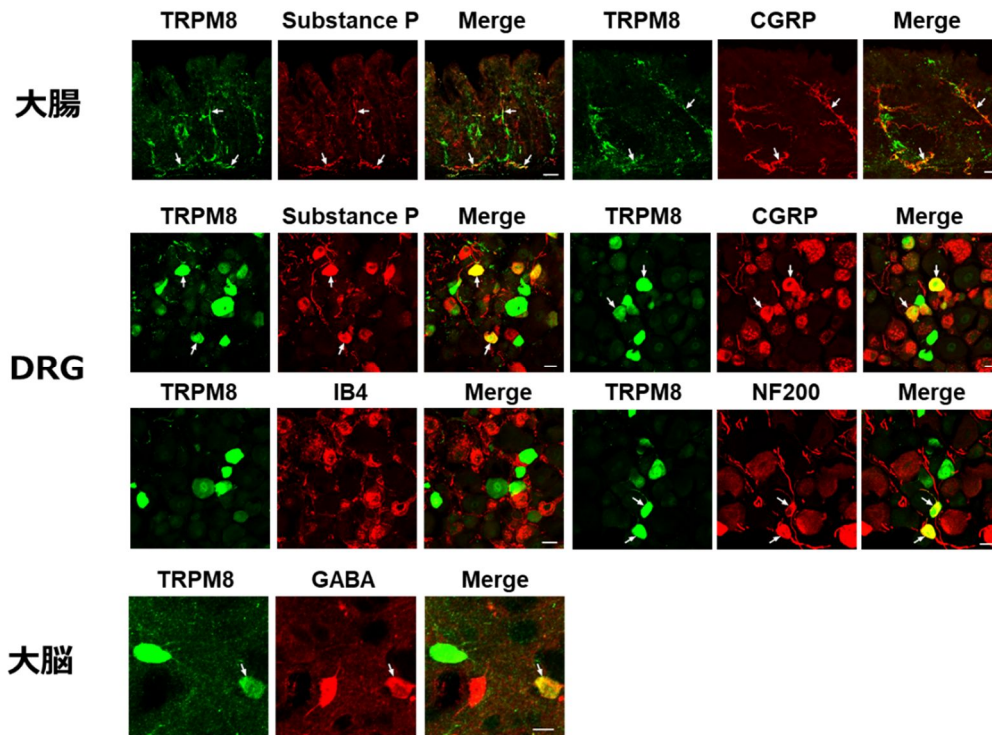


Figure 4. TRPM8 expressed in sensory neuron and GABAergic neuron in normal mice distal colon and brain, respectively. Double labelling of TRPM8 and CGRP, substance P, IB4, and NF200 in normal mice distal colon and DRG. Double labelling of TRPM8 and GABA in normal mice amygdala. Scale bars are 20 μ m.

TRPM8 欠損マウスでは、若齢期社会的敗北ストレス誘起 IBS モデルにおける内臓痛覚閾値の低下、腸内細菌叢の変化、拘束ストレス負荷時の排便数の亢進がより顕著に認められた。ゆえに、TRPM8 は IBS 症状の緩和に関与していることが示唆された。

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 4件）

1. 著者名 Kenjiro Matsumoto, Kana Takata, Daisuke Yamada, Haruki Usuda, Koichiro Wada, Maaya Tada, Yoshiyuki Mishima, Shunji Ishihara, Syunji Horie, Akiyoshi Saitoh, Shinichi Kato	4. 巻 11
2. 論文標題 Juvenile social defeat stress exposure favors in later onset of irritable bowel syndrome-like symptoms in male mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-95916-5	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 Kenjiro Matsumoto, Minako Suenaga, Yumi Mizutani, Kohei Matsui, Ayano Yoshida, Tomohiro Nakamoto, and Shinichi Kato	4. 巻 146
2. 論文標題 Role of transient receptor potential vanilloid subtype 2 in lower oesophageal sphincter in rat acid reflux oesophagitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 125-135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2021.03.010	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 Aliaa Fouad, Kenjiro Matsumoto, Kikuko Amagase, Hiroyuki Yasuda, Makoto Tominaga, and Shinichi Kato	4. 巻 44
2. 論文標題 Protective effect of TRPM8 against indomethacin-induced small intestinal injury via the release of calcitonin gene-related peptide in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 947-957
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00045	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 Yui Matsumoto, Yukiko Matsuya, Kano Nagai, Kikuko Amagase, Kazuko Saeki, Kenjiro Matsumoto, Takehiko Yokomizo, Shinichi Kato	4. 巻 373
2. 論文標題 Leukotriene B4 Receptor Type 2 Accelerates the Healing of Intestinal Lesions by Promoting Epithelial Cell Proliferation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pharmacol Exp Ther	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） 10.1124/jpet.119.263145	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 Kenjiro Matsumoto, Ayuka Deguchi, Aoi Motoyoshi, Akane Morita, Urara Maebashi 2, Tomohiro Nakamoto 2, Shohei Kawanishi 4, Mari Sueyoshi 5, Kaneyasu Nishimura, Kazuyuki Takata, Makoto Tominaga, Tsutomu Nakahara, Shinichi Kato	4. 巻 867
2. 論文標題 Role of transient receptor potential vanilloid subtype 4 in the regulation of azoymethane/dextran sulphate sodium-induced colitis-associated cancer in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 172853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2019.172853	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 Shinichi Kato, Daichi Utsumi, Kenjiro Matsumoto	4. 巻 140
2. 論文標題 G protein-coupled receptor 40 activation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice via the upregulation of glucagon-likepeptide-2.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 144-152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.05.003	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 松本健次郎
2. 発表標題 マウス若齢期社会的敗北ストレスによる、過敏性腸症候群様の病態と腸内細菌叢の変化
3. 学会等名 第23回日本神経消化器病学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 松本健次郎、加藤伸一
2. 発表標題 腸管神経系におけるTRPV2、TRPV1発現とTNBS誘起内臓痛覚過敏における役割の解明
3. 学会等名 第23回日本神経消化器病学会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 Kenjiro Matsumoto, Shinichi Kato
2. 発表標題 ROLE OF TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID SUBTYPE 2 IN LOWER ESOPHAGEAL SPHINCTER IN RAT REFLUX ESOPHAGITIS
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 松本 健次郎, 末永 美奈子, 林 大成, 城戸 瑞穂, 加藤 伸一
2. 発表標題 難治性消化管疾患モデル動物におけるTRPV2の発現と機能解析
3. 学会等名 2020TRP研究会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 松本 健次郎, 末永 美奈子, 林 大成, 中本 智大, 安田 浩之, 加藤 伸一
2. 発表標題 ラット食道炎モデルの病態におけるTransient Receptor Potential Vanilloid 2 (TRPV2) の関与
3. 学会等名 第22回神経消化器病学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 松本 健次郎, 堀江 俊治 ² , 加藤 伸一
2. 発表標題 マウス若齢期社会的敗北ストレスを用いた 新規過敏性腸症候群様モデルの確立
3. 学会等名 第48回日本潰瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenjiro Matsumoto, Makoto Tominaga, Syunji Horie, Shinichi Kato
2. 発表標題 Role of TRPM8 in the irritable bowel syndrome like symptoms induced by early-childhood social defeat stress in mice
3. 学会等名 the 10th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 富永 真琴、西田 基宏	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 158
3. 書名 TRPチャンネルのすべて	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都薬科大学 薬物治療学分野 ホームページ http://labo.kyoto-phu.ac.jp/chiryu/chiryu-j.html</p>

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