

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 14 日現在

機関番号：32519
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590100
 研究課題名（和文） ストレスによる温度感受性受容体発現知覚神経の反応性増大とオピオイド天然物の作用
 研究課題名（英文） Hyperreactivity of thermo-sensitive TRP channel-expressing sensory neurons under stress conditions, and effects of herbal medicines on hyperesthesia
 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（和文）：精神的ストレスが積み重なると、消化管の痛みを伴う過敏性腸症候群という病気に進展する。この原因を解明するために、過敏性腸症候群病態モデル動物を用いた研究を行った。その結果、ストレスにより、温度感受性受容体 TRPV1（43℃の熱で活性化するセンサー）の神経が増え、消化管の知覚過敏が引き起こされていることが判明した。したがって、この TRPV1 神経の異常を抑えれば、過敏性腸症候群の治療につながると考えている。その候補として漢方薬を提案した。

研究成果の概要（英文）：Psychological stress induces impairment of gastrointestinal tracts, leading to irritable bowel syndrome (IBS) accompanied by abdominal pain. The present study was designed with IBS model animals in order to elucidate the causes of IBS. As an important result, the stress induces the increased number of thermosensitive TRPV1-expressing nerve fibers, resulting in the hypersensitivity of visceral pain. Therefore, the inhibition of the abnormality of TRPV1 nerves in gut will make a contribution to the treatment of irritable bowel syndrome. I propose that Japanese Kampo medicine such as Daikenchuto will be a candidate that has the inhibitory effect of the abnormality on TRPV1 nerves in gut.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬効解析学、下部消化管

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、末梢の熱い・冷たいという温度情報を脳へ伝える役割を持っている。温度感受性受容体の一つである熱刺激受容体 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°C以上の（熱いを感じる）温度で活性化される。また、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°C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好調なことなどからも、ストレス社会の現状で、便秘異常、胃腸疼痛を訴える患者は多く、その状況が深刻なことがうかがえる。不安などの精神的ストレスが積み重なると、消化管は大きな影響を受け、ストレス性胃腸疾患（機能的胃腸症、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。この病態には消化管の知覚過敏が大きく絡んでおり、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 による温度受容システムの異常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：

①筆者はこれまでに「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きた。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。当該研究ではこれらの新知見を進展させ、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申請者は 20 年前からタイ王国伝承薬用植物クラトムのオピオイド活性成分の探索を行ってきた。その結果、モルヒネの鎮痛作用を凌駕するミトラガイナルカロイドを発見した。当該研究ではこれら化合物がストレス性胃腸機能障害に対する治療薬のシーズになりうるか？についても検討を行った。

2. 研究の目的

これまでの科学研究費に助成された一連の研究成果として、ストレス負荷により、熱刺激受容体 TRPV1 を介する消化管平滑筋収縮反応（特に直腸で）が増大することが見出されてきている。この新知見を受けて、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（TRPV1 および TRPA1）発現神経の数の増大が関与しているのではないか？」という仮説について検討しようと企画した。また、天然

薬物の中から消化管知覚過敏性を改善するシードがあるか検索を行った。

(1) 正常動物の消化管において、免疫組織化学的手法を用いて温度感受性受容体 TRPV1 および TRPA1 の発現を検討した。また、消化器機能（消化管運動、粘膜血流）における温度感受性受容体の役割について検討を行った。

(2) 機能的胃腸症および炎症性腸疾患の動物モデルを確立し、その消化管において温度感受性受容体の発現分布量が正常動物の組織と比べて増大しているかについて検討した。

(3) 機能的胃腸症動物モデルを用いて、タイ国伝承民間薬成分ミトラガイナルカロイドおよび漢方薬の消化管知覚過敏反応に対する改善作用を検討した。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学的手法による TRPV1 の分布： 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-フルオレッ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： 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： 雄性 SD 系ラットをウレタン麻酔下に胃を *ex-vivo* チェンバーに装置して実験標本とした。粘膜血流はレーザードップラー血流計で測定した。

(4) 機能胃腸症病態動物モデルの作製と内臓知覚過敏性の評価： 内臓痛覚過敏を起こした病態モデルラットを作製した。母子分離ストレスモデルは幼少期のストレスを想定し

たモデルであり、生後 2 日目から 14 日目までのラットを 1 日 3 時間母親から分離してストレス負荷をかけて作製した。水回避ストレスモデルは成長後のストレスを想定し、週齢 50 日のラットを 10 日間、1 日 1 時間、周囲を水で囲まれた環境に拘束することでストレス負荷をかけて作製した。微小炎症によるモデルは幼少期の器質的な腸の微小炎症を想定し、生後 10 日目のラットの直腸に 0.5%の酢酸 0.2 ml を肛門から投与し作製した。それぞれの病態モデルラットは全て週齢 60 日の時に評価を行った。内臓知覚反応はバロスタット法を用いて、内臓痛覚過敏の有無や度合いを測定し、評価した。

4. 研究成果

(1) 正常動物における温度感受性受容体の分布と局在

①免疫組織化学的手法にて、正常マウスの消化管凍結切片における TRPV1 神経の分布・局在と、含有神経伝達物質の検討を行った。その結果、TRPV1 神経線維は下部消化管、特に直腸に分布していることが明らかとなった。阻止苦学的には粘膜下層の血管周囲、筋間神経叢に豊富に局在しており、粘膜層においても存在が確認された。筋間神経叢に観察された TRPV1 神経線維のほとんどには、知覚神経系神経ペプチドであるカルシトニン遺伝子関連ペプチド、サブスタンス P、ニューロキニン A が含有されていること、一部には一酸化窒素合成酵素が含有されていることが明らかになった。これらの TRPV1 発現神経含有神経伝達物質が消化管運動性、知覚受容に関与しているものと推察された。TRPV1 神経に含有されている知覚神経系神経ペプチドと一酸化窒素が、消化管血流増大、胃酸分泌抑制、消化管平滑筋収縮反応に関与していることを見出した。

②正常マウス群の結腸を、抗 TRPA1 抗体、抗リン酸化 TRPV1 抗体で免疫染色したが、ほとんど染色されなかった。染色条件設定の問題もあるので、この点は今後の検討課題となった。

(2) ストレス負荷による機能性胃腸障害病態モデル動物の確立

①機能性胃腸障害では、ストレス負荷によって消化管知覚神経過敏反応が引き起こされる。ストレスによって微小な炎症が惹起されると、熱刺激受容体 TRPV1 の発現量を介するチャネル活性が増大するのではないかという作業仮説を立て、これを検証するために検討を進めた。

②酢酸注腸惹起の微小炎症、母子分離ストレス、水回避ストレスをマウスに負荷すること

により、3 種類の機能性胃腸症病態モデル動物を確立した。どの病態モデル動物においても下部消化管における痛覚過敏性が観察された。これにより 3 種類の機能性胃腸症モデル動物を確立した。

(3) 炎症性腸疾患病態モデル動物の確立と病態モデル動物における消化管知覚過敏性

①機能性胃腸障害では、ストレスに由来する微小な炎症により、熱刺激受容体 TRPV1 と冷刺激受容体 TRPA1 が増大するため発現するのではないかという作業仮説を立てたが、これを検証するために、まず炎症性腸疾患における消化管の変化を検討することが必須であると考えた。そこで、炎症性腸疾患病態モデル動物を確立し、その消化管における温度感受性受容体の変化を検討した。

②マウスにデキストラン硫酸ナトリウムの投与により、炎症性腸疾患モデルを作製した。この病態モデル動物の結腸において TRPV1 の免疫染色を行うと、全層において TRPV1 神経線維の数の明らかな増加が観察された。さらに、病態モデル動物群では下部消化管の知覚過敏が観察されており、TRPV1 神経線維の数の増加が炎症時における知覚過敏に関与しているものと考えられた。

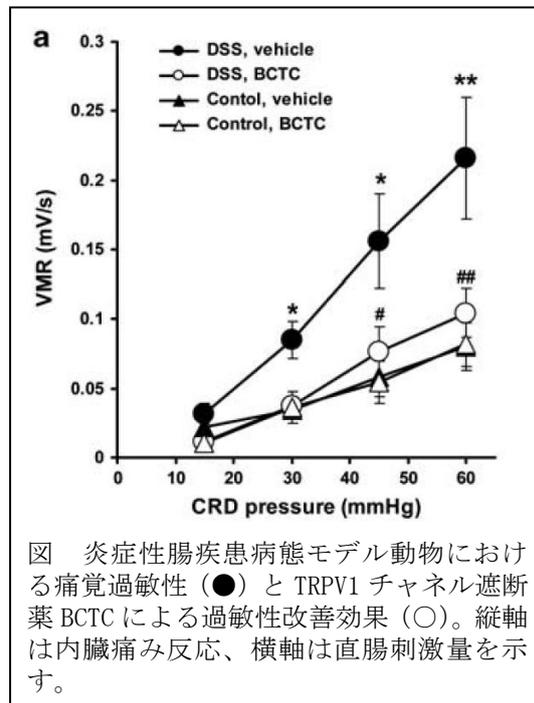


図 炎症性腸疾患病態モデル動物における痛覚過敏性 (●) と TRPV1 チャネル遮断薬 BCTC による過敏性改善効果 (○)。縦軸は内臓痛み反応、横軸は直腸刺激量を示す。

③炎症性腸疾患病態モデル動物の結腸の粘膜層においてのみ、非神経性の TRPV1 免疫陽性細胞 (おそらくマクロファージ) の出現を観察した。この TRPV1 発現細胞の増加も炎症時における知覚過敏性に関連しているものと考えている。

④炎症性腸疾患モデルマウスの結腸の粘膜層において、セロトニン 5-HT₃ 受容体発現神経の顕著な増加もみられた。これら受容体の変化が知覚過敏性に関連しているものと考えている。

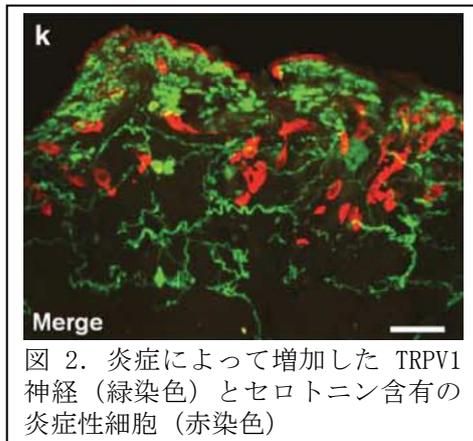


図 2. 炎症によって増加した TRPV1 神経（緑染色）とセロトニン含有の炎症性細胞（赤染色）

(4)天然薬物の作用

①タイ王国伝承薬用植物クラトム由来ミトラガイナルカロイドおよび漢方薬大建中湯の消化管知覚過敏性に対する作用を検討した。

②動物個体レベルの実験において、ミトラガイナルカロイドの消化管運動に対する作用を検討したところ、ミトラガイナルカロイドはオピオイド μ 受容体を介する下部消化管運動抑制作用を示すことを見出した。この作用は、ストレス誘起の下痢反応抑制につながると考えられる。

③臨床の現場で、過敏性腸症候群の治療に漢方薬の大建中湯が用いられている。そこで、過敏性腸症候群病態モデル動物における痛覚過敏性に対する大建中湯の作用を検討したところ、大建中湯エキスが下部消化管痛覚過敏性を改善することを見出した。

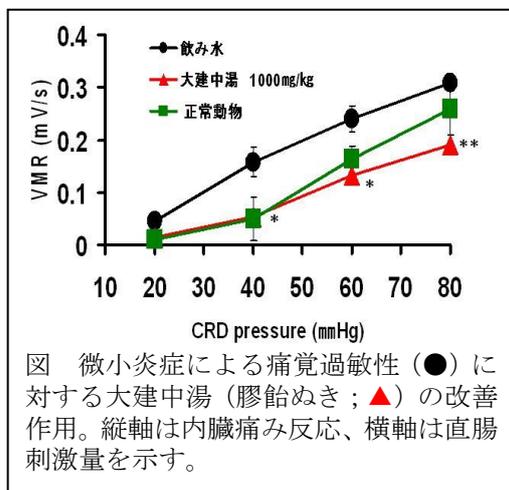


図 微小炎症による痛覚過敏性 (●) に対する大建中湯 (膠飴ぬき; ▲) の改善作用。縦軸は内臓痛み反応、横軸は直腸刺激量を示す。

(5) 当該研究によって得られた成果の位置付け：

①ストレス性胃腸疾患の原因究明は国家的急務の問題

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、便通異常を訴える患者の多さと深刻さがうかがえる。このストレス性胃腸疾患（機能的胃腸症、過敏性腸症候群）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と考えられる。

②当該研究の成果により「内臓知覚神経の過敏性は、温度感受性受容体の発現増大を介して引き起こされ、これが機能的消化管障害につながっている」という新仮説を提供した。この知見は、ストレスによる消化管知覚過敏性の発症メカニズムの解明につながるため、新しい治療法におけるターゲットモレキュールの提案することになる。また、患者における知覚過敏性の症状を緩和させるために、温度感受性受容体のコントロールが重要であるということも提案でき、社会的な波及効果が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Matsumoto, K., Lo, Wah, M., Hosoya, T., Tashima, K., Takayama, H., Murayama, T., Horie, S.: Experimental colitis alters expression of 5-HT receptors and transient receptor potential vanilloid 1 leading to visceral hypersensitivity in mice. *Laboratory Investigation*, 92(5):769-782 (2012) 査読有
2. Furuta S, Matsumoto K, Horie S, Suzuki T, Narita M.: Subdiaphragmatic vagotomy induces a functional change in visceral A δ primary afferent fibers in rats. *Synapse*, 66(4), 369-371 (2012) 査読有
3. Kato E, Yamane, S, Nomura R, Matsumoto K, Tashima K, Horie S, Saito T, Fujino H, Murayama T.: Dysfunction of neurogenic VIP-mediated relaxation in mouse distal colon with dextran sulfate sodium-induced colitis. *Pharmacological Research*,

- 65(2):204-212 (2012) 査読有
4. Hamada Y, Kato E, Nakamura H, Fujino H, Matsumoto K, Tashima K, Horie S, Murayama T.: Decrease of guanylyl cyclase β 1 subunit and nitric oxide (NO)-induced relaxation in mouse rectum with colitis and its reproduction on long-term NO treatment. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.*, 385(1):81-94 (2012) 査読有
 5. Matsumoto, K., Hosoya, T., Tashima, K., Namiki, T., Murayama, T., Horie, S.: Distribution of transient receptor potential vanilloid 1 channel-expressing nerve fibers in mouse rectal and colonic enteric nervous system: relationship to peptidergic and nitrergic neurons. *Neuroscience*, 172, 518-534 (2011) 査読有
 6. 古田貞由、松本健次郎、堀江俊治、鈴木勉、成田年：迷走神経機能不全下での知覚神経感作とセロトニン4受容体作動薬 mosaprideによる鎮痛効果。日本緩和医療薬学雑誌, 4 (3), 93-98 (2011) (2011) 査読有
 7. 田嶋公人、松本健次郎、堀江俊治：ワサビ受容体TRPA1の胃機能における役割ーバニロイド受容体TRPV1との比較ー *G. I. Research*, 19 (3), 210-216 (2011) 依頼総説
 8. Lo, Wah, M. W., Matsumoto, K., Iwai, M., Tashima, K., Kitajima, M., Horie, S., Takayama, H: Inhibitory effect of Iboga-type indole alkaloids on capsaicin-induced contraction in isolated mouse rectum. *J. Nat. Med.*, 65(1), 157-165 (2011) 査読有
 9. Hamada, Y., Murakami, I., Katoh, E., Yamane, S., Fujino, H., Matsumoto, K., Tashima, K., Horie, S., Murayama, T.: Neurogenic contraction of mouse rectum via the cyclooxygenase pathway: Change of PGE₂-induced contraction with dextran sulfate sodium-induced colitis. *Pharmacological Research*, 61(1):48-57 (2010) 査読有
 10. 堀江俊治、田嶋公人、松本健次郎：消化管におけるセロトニンシグナリングシステムと内臓知覚。 *G. I. Research*, 18 (5), 387-393 依頼総説 査読無
 11. Furuta, S., Shimizu, T., Narita, M., Matsumoto, K., Kuzumaki, N., Horie, S., Suzuki, T., Narita, M.: Subdiaphragmatic vagotomy promotes nociceptive sensitivity of deep tissue in rats. *Neuroscience* 164(3):1252-1262 (2009) 査読有
 12. Matsumoto, 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.*, 297(2), G348-360 (2009) 査読有
 13. Murakami I.,他4名, 4番目: 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
- [学会発表] (計 15 件)
1. 細谷拓司、松本健次郎、田嶋公人、村山俊彦、堀江俊治：マウス大腸における TRPM8 チャネルの局在と TRPM8 作動薬の平滑筋作用。第 84 回日本薬理学会 (横浜、2011. 3. 22-24)
 2. 堀江俊治、田嶋公人、松本健次郎：トウガラシの辛味は胃腸でも味わう：胃におけるバニロイド受容体 TRPV1 の分布と機能 [シンポジウム] 日本薬学会第 131 年会 (静岡、2011. 3. 29-3. 31)
 3. Kenjiro Matsumoto, Kimihito Tashima, Syunji Horie: Immunohistochemical analysis of altered serotonin signaling and transient receptor potential vanilloid 1 channels in experimental colitis mice Digestive Disease Week 2011 (May 7-11, 2011, Chicago, USA)
 4. Kenjiro Matsumoto, Takuji Hosoya, Kenta Kijiyama, Rikako Suzuki, Kimihito Tashima, Toshihiko Murayama, Syunji Horie: Role of neuronal and non-neuronal transient receptor potential vanilloid type 1 and sensory neuropeptides in DSS-induced peripheral inflammatory changes Digestive Disease Week 2011 (May 7-11, 2011, Chicago, USA)
 5. Kenjiro Matsumoto, Rikako Suzuki, Eriko Ishikawa, Kenta Kijiyama, Syunji Horie: Distribution of transient receptor potential vanilloid 1 channels-expressing nerve fibers in mouse lower esophageal sphincter Digestive Disease Week 2011 (May 7-11, 2011,

- Chicago, USA)
6. Hirokuni Okumi, Tetsuya Takeuchi, Kimihito Tashima, Kenjiro Matsumoto, Takao Namiki, Syunji Horie: A Dietary Agonist of TRPV1 Inhibits Gastric Acid Secretion and Increases Gastric Mucosal Blood Flow in Mice. Digestive Disease Week 2011 (May 7-11, 2011, Chicago, USA)
 7. Kimihito Tashima, Masatoshi Yoshikubo, Masaki Raimura, Kenya Ozone, Hirokuni Okumi, Kenjiro Matsumoto, Atsushi Chino, Takao Namiki, Syunji Horie: Allyl Isothiocyanate, a Dietary Activator of TRPA1, Increases Gastric Mucosal Blood Flow Through TRPV1-Expressing and Non-Expressing Sensory Nerves in Rats. Digestive Disease Week 2011 (May 7-11, 2011, Chicago, USA)
 8. 野村涼也, 中村浩之, 藤野裕道, 堀江俊治, 村山俊彦: 分泌型ホスホリパーゼ A2 の腸管自発性運動機能への影響と潰瘍性大腸炎モデル動物での変動解析. 第 124 回日本薬理学会関東部会 (東京, 2011. 6. 4)
 9. 松本健次郎, 堀江俊治: 成因の異なる 3 種類の内臓痛覚過敏モデルラットにおける大建中湯および小建中湯の改善作用. 第 28 回和漢医薬学会学術大会 [シンポジウム] (富山, 2011. 8. 27, 28)
 10. 堀江俊治, 田嶋公人, 松本健次郎, 來村昌紀, 奥見裕邦: 研究室に漢方医がやってきた: 薬理学研究室の強みと弱み. [シンポジウム] 第 21 回漢方治療研究会 (千葉, 2011. 9. 25)
 11. 堀江俊治, 佐藤翔吾, 來村昌紀, 松本健次郎, 村山俊彦, 並木隆雄, 寺澤捷年, 田嶋公人: 麻酔下ラットにおけるワサビ辛味成分アリルイソチオシアネートによる胃粘膜傷害性と粘膜血流増大反応. 第 13 回応用薬理シンポジウム (船橋, 2011. 9. 3-4)
 12. 渡邊直人, 松本健次郎, 田嶋公人, 堀江俊治: 肺におけるバニロイド受容体とニューロキニン A との関係. 第 13 回咳嗽研究会 (東京, 2011. 11. 5)
 13. 堀江俊治, 田嶋公人, 松本健次郎: トウガラシ辛味成分カプサイシンの麻酔下ラット胃粘膜血流増大作用: TRPV1 神経線維に存在する NO 合成酵素の関与. 第 13 回日本神経消化器病学会 (宇都宮, 2011. 11. 5)
 14. 寺田祐子, 堀江俊治, 高山廣光, 佐藤努, 渡辺達夫: アフリカ伝承民間薬成分 voacangine は天然由来の TRPV1 アンタゴニストである. 第 26 回日本香辛料研

究会 (福井, 2011. 11. 18-19)

15. Kimihito Tashima, Kenjiro Matsumoto, Syunji Horie: Effect of allyl isothiocyanate, a dietary activator of TRPA1, on gastric mucosal defense mechanisms in rats: comparison with capsaicin. International Symposium on Gastrointestinal Research (Chiba, Japan, 2011. 11. 17)

〔図書〕 (計 1 件)

1. 堀江俊治, 田嶋公人, 松本健次郎: 第 10 章ナス科植物 (トウガラシ属) と機能カプサイシンの胃粘膜保護作用. スパイス・ハーブの機能と最新応用技術. (中谷延二監修), 171-177, シーエムシー出版 依頼執筆、査読無

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: オピオイド鎮痛剤

発明者: 高山廣光、北島満里子、堀江俊治、松本健次郎

権利者: 高山廣光、北島満里子、堀江俊治、松本健次郎

種類: 日本特許 (補正)

番号: 特願 2009-543879

出願年月日: 2010 年

国内外の別: 国内

名称: Indole alkaloid derivatives having opioid receptor agonistic effect, and therapeutic compositions and methods relating to same

発明者: 高山廣光、北島満里子、堀江俊治、松本健次郎

権利者: 高山廣光、北島満里子、堀江俊治、松本健次郎

種類: アメリカ合衆国特許

番号: US60/986370

出願年月日: 2007 年

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

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

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし