

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590730

研究課題名(和文)ペインセンサーTRPA1のチャネル活性抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文)Inhibitory modulation of the pain sensor protein, TRPA1

研究代表者

戴 毅(DAI, YI)

兵庫医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：20330441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は一次知覚神経におけるTRPチャネルの活性抑制制御の分子機構の解明を目指した。主な研究成果は以下である。

1. アーテミンおよびレスベラトロールによるTRPA1の活性抑制効果が確認され、TRPA1タンパクの細胞膜から細胞内の移行は抑制機構の1つとして示唆された。2. ピノシルピン誘導体によるTRPV1の活性抑制効果が確認され、TRPA1の抑制現象と異なる調節機構が示された。3. エトドラクによるTRPA1の活性抑制効果を確認し、TRPA1細胞内ドメインのシステイン残基が関与する可能性が示唆された。以上の結果により、TRPチャネルの活性抑制は複雑な機構で制御されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The transient receptor potential (TRP) channel subtype V1 (TRPV1) and A1 (TRPA1) are known to be expressed on sensory neurons and respond to changes in temperature, pH and local application of certain noxious chemicals. In this study, we investigated mechanisms of inhibitory modulation of these TRP channels. Following is the major findings of this study.

1. We found that artemin or resveratrol can inhibit TRPA1. The mechanism is likely due to a decreasing of the channel density of TRPA1 on cell membranes. 2. Pinosylvin methyl ether can inhibit TRPV1 by changing the EC50, but not the maximum response of capsaicin-induced currents. 3. Etodolac can directly activate and subsequently desensitize TRPA1 through a covalent modification of cysteine residues. These data indicate that the inhibitory mechanism of modulation of TRP channels are various and complicated.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学，疼痛学

キーワード：TRPA1 TRPV1 artemin resveratrol etodolac

1. 研究開始当初の背景

感覚神経終末に発現する transient receptor potential (TRP)ファミリーのメンバー、とくに TRPV1 と TRPA1 チャンネルは、温度、化学物質、機械刺激など種々な痛み刺激を受容するセンサーであり、痛みの発生メカニズムにおいて重要な役割を果たす。研究代表者らはとくに慢性・難治性疼痛における TRP チャンネルの関与に着目し、炎症時における TRPV1, TRPA1 の発現変化、およびそのチャンネル活性増強機構を解明してきた (Dai et al., J Neurosci. 2004, Dai et al., J Clin Invest. 2007, Wang et al, Brain 2008)。

TRP チャンネルは生理状態下において反復刺激に対する desensitization が知られているが、このほかの活性抑制現象は知られていない。われわれの研究開始当初の実験データでは、ラット後根神経節 (DRG) ニューロン培養細胞において、TRPA1 のチャンネル活性が神経栄養因子 artemin によって抑制される結果が得られた。また、実験動物の足裏に一定濃度の artemin を事前注射すると、TRPA1 受容体に介した疼痛行動が著明に抑制された。これにより、TRPA1 は artemin の抑制的な調節を受け、疼痛行動の抑制に関与する可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究は一次求心性ニューロンにおける、TRPA1 チャンネル活性の抑制機構を解明し、生体内に存在する痛みに対する新たな自己抑制機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

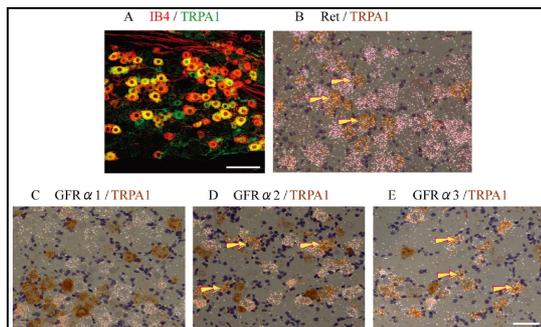
本研究は形態学的、分子生物学的、行動薬理的、電気生理学的手法を用い、TRP チャンネルの機能抑制制御の細胞内分子メカニズムを解明した。

- (1) *In vivo* で Ret/GFR 3 と TRPV1/TRPA1 との共存を確認した (蛍光二重染色、免疫沈降、*In Situ* ハイブリダイゼーション法)。
- (2) TRP タンパクを強制発現した HEK 細胞や一次培養のラット後根神経節細胞を用いて artemin や resveratrol、Etodolac などによる TRPV1 および TRPA1 チャンネルの機能抑制現象を電気生理学的解析 (Patch Clamp 法) した。
- (3) *In vivo* 行動薬理学実験で上記薬剤による TRP チャンネル活性抑制およびそれに関わる細胞内シグナリングを確認した。
- (4) 痛覚過敏実験動物モデルを用いて、痛みの発生と抑制における TRP 機能調節の役割を確認した。

4. 研究成果

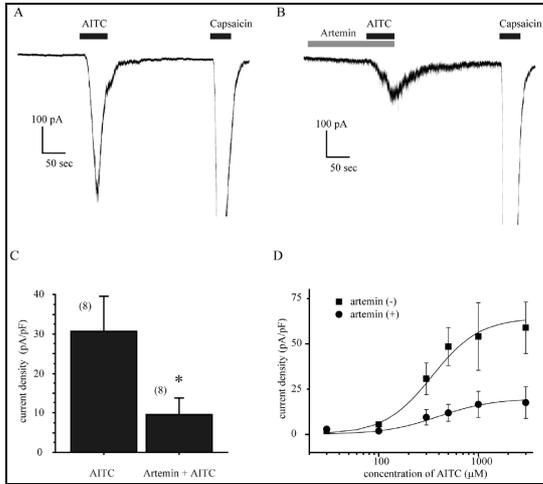
本研究は一次求心性ニューロンにおける TRPA1 チャンネル活性抑制機構の解明を目指した。主な研究成果を以下にまとめる。

- (1) Ret/GFR 3 と TRPV1/TRPA1 との共存を確認した。

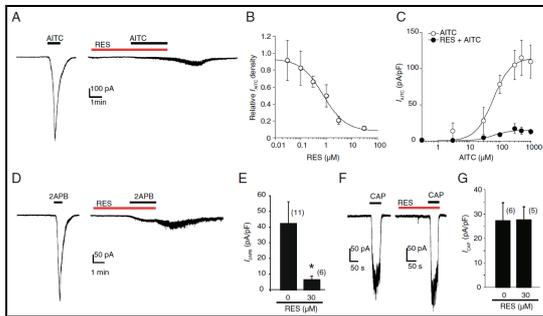


- (2) Artemin および resveratrol による TRPA1 のチャンネル活性抑制効果を確認し、TRPA1 タンパクの細胞膜から細胞内の移行は抑制機構の1つとして示唆した。

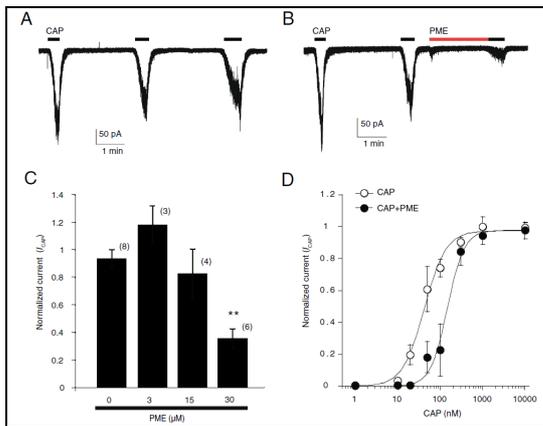
Artemin による TRPA1 の抑制調節 :



Resveratrol による TRPA1 の抑制調節 :

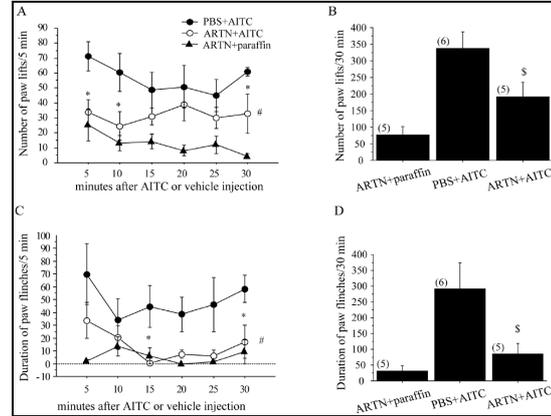


(3) Pinosylvin methyl ether (PME) による TRPV1 のチャネル活性抑制効果が確認された。TRPA1 の抑制現象と異なる調節機構が示唆された。

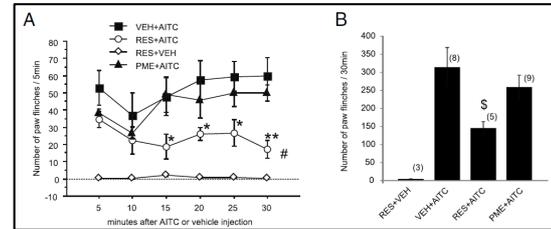


(4) Artemin, resveratrol の疼痛行動抑制効果が確認された。

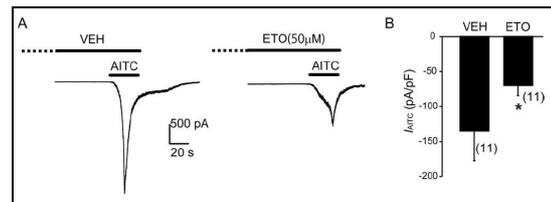
Artemin による疼痛抑制 :



Resveratrol による TRPA1 の抑制調節 :



(5) Etodolac による TRPA1 の活性抑制効果を確認し、TRPA1 細胞内ドメインのシステイン残基における covalent modification が関与する可能性が示唆された。



以上の結果により、Etodolac, Artemin, resveratrol, PME などの TRP チャネルに対する抑制作用が確認され、それぞれ異なるメカニズムを有することが示唆された。

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 8 件)

Wang S, Dai Y, Kogure Y, Yamamoto S, Zhang W, Noguchi K. Etodolac activates and desensitizes transient

receptor potential ankyrin 1. **J Neurosci Res.** 2013;91(12):1591-8. doi: 10.1002/jnr.23274. 査読有

Yu L, Wang S, Kogure Y, Yamamoto S, Noguchi K, Dai Y. Modulation of TRP channels by resveratrol and other stilbenoids. **Mol Pain.** 2013 15;9:3. doi:10.1186/1744-8069-9-3. 査読有

Wang S, Dai Y, Kobayashi K, Zhu W, Kogure Y, Yamanaka H, Wan Y, Zhang W, Noguchi K. Potentiation of the P2X3 ATP receptor by PAR-2 in rat DRG neurons, through protein kinase-dependent mechanisms, contributes to inflammatory pain. **Eur J Neurosci.** 2012 Aug;36(3):2293-301. Doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08142.x. 査読有

Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, Kanda H, Dai Y, Noguchi K. Up-regulation of platelet-activating factor synthases and its receptor in spinal cord contribute to development of neuropathic pain following peripheral nerve injury. **Mol Pain** 8, p.8, 2012. doi:10.1186/1744-8069-8-8. 査読有

Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M, Miyoshi K, Dai Y, Noguchi K. Re-evaluation of the phenotypic changes in L4 dorsal root ganglion neurons after L5 spinal nerve ligation. **Pain**, 153(1):68-79 2012. 査読有

戴毅, 痛みとペインセンサーTRPA1の役割、Clinical Neuroscience (臨床神経科学) Vol.29 (10) 1201-1203, 2011. 査読無

戴毅, 東洋医学からみた痛みの制御、**脳** 21, 14(1), 61-67. 2011. 査読無

Yoshida N, Kobayashi K, Yu L, Wang S, Na R, Yamamoto S, Noguchi K, Dai Y, Inhibition of TRPA1 channel activity in sensory neurons by the glial cell line-derived neurotrophic factor family member, artemin. **Mol Pain.** 7: p.41. 2011. doi:10.1186/1744-8069-7-41. 査読有

〔学会発表〕(計13件)

王勝蘭、戴毅、野口光一、Etodolac activates and desensitizes TRPA1, 第6回日本運動器疼痛学会、神戸国際会議場(神戸市)、2013.12.7

OKUBO M, YAMANAKA H, KOBAYASHI K, KANDA H, DAI Y, NOGUCHI K; Expression of colony-stimulating factors and their receptors in dorsal root ganglion and spinal cord after peripheral nerve injury; 43rd annual meeting of neuroscience 2013, San Diego Convention Center: Sails Pavilion (San Diego, USA); 2013.11.9

戴毅, 于麗娜, 王勝蘭, 野口光一、レスベラトロールと他のスチルベン化合物によるTRPチャネル修飾、第35回日本疼痛学会、大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)、2013.7.13

戴毅、虎杖の主成分 resveratrol による疼痛関連受容体TRPA1チャネルの活性抑制、第64回日本東洋医学会学術総会、城山観光ホテル(鹿児島市)、2013.6.2

Wang Shenglan, Noguchi Koichi, Dai Yi, Etodolac activates and desensitizes transient receptor potential ankyrin 1 through cysteine modification. 第86回日本薬理学会年会、2013.3.22; 福岡国際会議場(福岡市)

MIYAGAWA Y, KOBAYASHI K, YAMANAKA H, YU L, DAI Y, YAGI H, NOGUCHI K;

Regulation of TRPV1 and TRPA1 channels expression in sensory neurons by artemin after inflammation. 42th annual meeting of neuroscience 2012, Moial Convention Center (New Orleans, USA), 2012.10.17

Yu L, Dai Y, Noguchi K, Inhibitory effect of stilbenoids on TRP channels, 42th annual meeting of neuroscience 2012, Moial Convention Center (New Orleans, USA) 2012.10.15

Fukuoka T, Dai Y, Noguchi K, Delayed intrathecal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor exerts anti-allodynic effect by mitigation of injury-induced neuropeptide expression in touch-sense pathway following l5 spinal nerve ligation. 14th world congress on pain, Milano Convention Centre (Milano, Italy), 2012.8.30

宮川慈子、小林希実子、山中博樹、戴 毅、八木秀司、野口光一、Artemin による疼痛関連 TRP 受容体発現調節、第 34 回日本疼痛学会、熊本市国際交流会館（熊本市）、2012.7.20

岩岡恵実子、松吉延之、小暮洋子、青木俊二、山本悟史、野口光一、戴 毅、Evodiamine activates TRPV1 in primary sensory neuron. 第 85 回日本薬理学会年会、国立京都国際会館（京都市）、2012.3.15

Yu L, Noguchi K. Dai Y. Pinosylvin methyl ether desensitizes the TRPV1 channel. 41th annual meeting of neuroscience 2011, Walter E. Washington Convention Center (Washington D.C., USA), 2011.11.13

岩岡恵実子、松吉延之、小暮洋子、青木俊二、野口光一、戴 毅、ゴシユクの主

成分エボジアミンによる一次知覚ニューロンの活性化。第 28 回和漢医薬学会学術大会、富山県民会館（富山市）2011.8.27～28

Yoshida N, Kobayashi K, Na R, Yu Lina, Noguchi K, Dai Y. Short-term treatment of artemin functionally inhibits TRPA1 channel activity in rat primary sensory neurons. The 4th Asian Pain Symposium, 320 YUE YANG ROAD (SHANGHAI, China), 2011.5.16

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戴 毅 (DAI YI)

兵庫医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：20330441