

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791894

研究課題名（和文） 前庭神経系におけるTRPV1受容体の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of TRPV1 channels in vestibular system

研究代表者

鎌倉 武史 (KAMAKURA TAKEFUMI)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30600564

研究成果の概要（和文）：痛みの受容体である TRPV1 受容体は主に体性感覚系の後根神経節や三叉神経節に発現しているが、これが内耳の前庭神経節にも発現していること、TRPA1 受容体と共発現していること、前庭神経節の TRPV1 は何らかの刺激を受ければイオンチャネルとして機能することを確認した。これにより TRPV1 が前庭機能ないし機能異常への関与が示唆され、TRPV1 をターゲットにした新たなめまい治療法の可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：TRPV1 is expressed in sensory neurons such as dorsal root ganglia (DRG) and trigeminal ganglia (TG), and are involved in nociception, being activated by nociceptive stimuli. We investigated the expression of TRPV1 in rat VG neurons by RT-PCR, *in situ* hybridization, immunohistochemistry, and Ca²⁺ imaging experiments, and we revealed that TRPV1 is functional as an ion channel and that co-expressed with TRPA1. In summary, our histological and physiological studies reveal that TRPV1 and TRPA1 are expressed in VG neurons. It is suggested that TRPV1 and TRPA1 in VG neurons might participate in vestibular function and/or dysfunction such as vertigo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：前庭神経節、TRPV1 受容体、TRPA1 受容体、カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

弱塩基性の炭酸水素ナトリウム(メイロン®)は眩暈症の急性期治療に広く使われる。メイロン®の作用機序としては前庭系の局所的アシドーシスの改善が予想されているが、そこで我々は前庭神経系で酸により活性化し、めまいを引き起こし得るイオンチャネルを検索した結果、TRPV1 が見出された。さらに TRPV1 は熱でも活性化するので温度眼振検査での温刺激によるめまいを引き起こしている可能性があり、眩暈症発症などの平衡機

能異常に TRPV1 が関与している可能性は高い。もしこの仮説の通りであれば、TRPV1 ブロッカーなどを用いた新しいめまい急性期治療法の開発につながる可能性が開けてくる。

そこで TRPV1 の前庭神経節における発現を詳細に調べることにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は眩暈症の発症機序への TRPV1 の関与を解明し、TRPV1 をターゲットにした新たな治療法を開発することである。

3. 研究の方法

前庭神経節における TRPV1 受容体の発現を以下の①~④の方法で確認した。ただ、研究の過程で TRPA1 受容体についても発現を確認することとした。これについては4. 研究成果で詳しく報告する。

① RT-PCR 法

ラット前庭神経節より totalRNA を抽出し、これを逆転写して 1 本鎖 cDNA を得た。予め TRPV1 と TRPA1 にそれぞれ特異的な配列のプライマーを用意し、PCR を行い、電気泳動をした。

② *in situ* hybridization 法

ラット三叉神経節から totalRNA を抽出し、1 本鎖 cDNA を得て、1 kbp の長さの PCR 産物を抽出した。そこから DIG をラベリングした non-RI-cRNA プローブを作成した。一方ラット前庭神経節から 8 μ m の厚さで切片を作成し、cRNA プローブをハイブリダイズし、アンチ DIG アルカリフォスファターゼを用い、発色には NBT と BCIP を用いた。

③ 免疫組織化学法

TRPV1 については一次抗体には VR11A (Alpha Diagnostic International) を用い、二次抗体には biotinylated secondary antibody (goat anti-rabbit, Vector Laboratories)、発色には Vectastain ABC (Vector Laboratories) とジアミノベンジンを用いた。

なお TRPA1 受容体についてはいくつかの抗体を用いて実験を行ったが、非特異的反応であったため、割愛した。

④ カルシウムイメージング法

ラット前庭神経節細胞を慎重に取り出し、トリプシンとコラゲナーゼ処理を施す。その後、Cell Tak (BD Biosciences) を塗布したカバーガラスに神経節細胞を載せて、培養した。

カルシウムインジケータである fura2 を培養した細胞にロードさせ、AQUACOSMOS system (Hamamatsu Photonics; Hamamatsu, Japan、顕微鏡は Nikon ECLIPSE TE2000-U microscope) を用いて、340nm と 380nm の 2 波長励起により蛍光強度比をとった。

TRPV1 選択的アゴニストであるカプサイシンや TRPV1 選択的アンタゴニストであるカプサゼピン、TRPA1 アゴニストであるシナムアルデヒド、TRPA1 選択的アンタゴニストである HCO30031 で刺激ないしブロックさせて蛍光強度比の変化をみた。

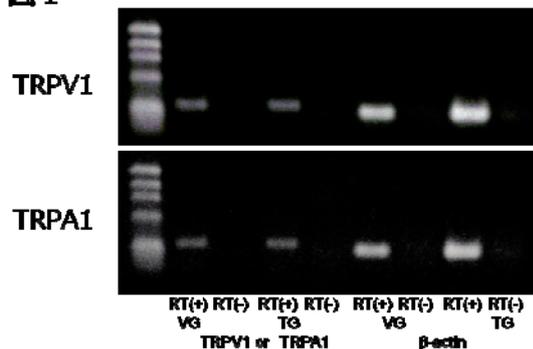
4. 研究成果

脊髄後根神経節や三叉神経節などの体感覚系の神経節細胞において TRPV1 受容体は TRPA1 受容体と共発現していることが過去の報告でわかっている。TRPA1 受容体は低温 (17 $^{\circ}$ C 未満)、アルカリなどにより活性化し、高温 (43 $^{\circ}$ C 以上)、酸などにより活性化する TRPV1 受容体とは対照的である。TRPA1 受容体の前庭神経節における発現は現在のところ報告されていないが、この 2 受容体は三叉神経節で相互作用があることも報告されており、前庭神経節でも TRPV1 受容体だけでなく、TRPA1 受容体発現している可能性が高いと考えられた。また発現しているだけでなく、平衡機能にも TRPV1 受容体とともに関与している可能性が考えられたため、今回 TRPV1 受容体と TRPA1 受容体を同時に解析することとした。

① RT-PCR 法

前庭神経節 (VG) における TRPV1 ならびに TRPA1 受容体の発現を見るべく、RT-PCR を行った。図 1 のように、三叉神経節 (TG) と同様に前庭神経節でも両受容体 mRNA の発現を認めた。

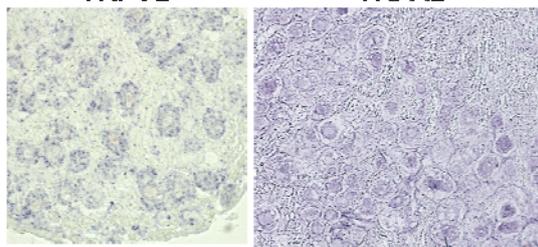
図 1



② *in situ* hybridization 法

次に TRPV1, TRPA1 受容体 mRNA の局在を見るべく *in situ* hybridization 法を行った。図 2 は両受容体の non-RI アンチセンスプローブを用いた *in situ* hybridization であるが、両受容体ともに神経細胞の細胞質に局在していることがわかった。いずれもセンスプローブ (negative control) ではシグナルは得られなかった。

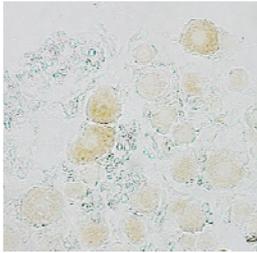
図 2 TRPV1 TRPA1



③免疫組織化学法

TRPV1 受容体タンパクの発現を確認するた

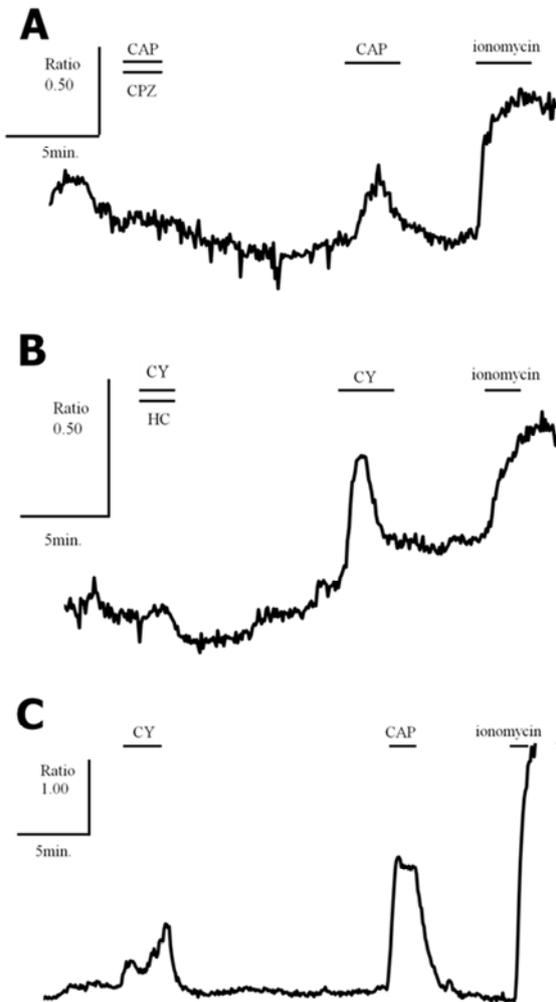
図3



めに免疫組織化学法を行った。これは TRPV1 受容体のみ示す。TRPV1 受容体の免疫反応シグナルは図3のように主に細胞質に認められた。

④カルシウムイメージング法

最後に TRPV1, TRPA1 受容体の機能的発現を見るためにカルシウムイメージングを行った。図4Aではカプサイシン(TRPV1 選択的アゴニスト, CAP)に反応しているが、その反応はカプサゼピン(TRPV1 選択的アンタゴニスト, CPZ)によりその反応はブロックされている。同様に図4Bではシナムアルデヒド(TRPA1 アゴニスト, CY)の反応が HC030031 (TRPA1 選択的アンタゴニスト, HC)によりブロックされている。さらに、図4Cでは同一細胞が CY, CAP の両方に反応していた。



以上のことから、TRPV1 受容体は TRPA1 受容体と同様に前庭神経節においてイオンチャンネルとして機能している状態で発現していること、両受容体が共発現していることが確認された。TRPA1 受容体の前庭神経節での発現と、TRPV1、TRPA1 受容体の同一細胞での共発現を初めて確認した。また、前庭神経節において、TRPV1、TRPA1 受容体ともに、イオンチャンネルとして何らかの刺激があれば応答できる状態にあることを初めて示した。実際の内耳において何が活性化因子になるのかなど解明しなければならぬ問題は多くあるが、この2受容体が平衡機能ないし機能異常に関与している可能性は高いと考えられる。

また、TRPV1、TRPA1 受容体の実際の病態での研究のため、眼振モデルを模索しており、現在ラットに対する塩化カリウムの鼓室内投与により眼振を誘発するモデルについて詳細に調べている。この眼振誘発モデルはメニエール病のめまい発作時に発生する眼振の経過に酷似しており、このモデルと TRPV1 受容体、TRPA1 受容体との関連を見出すことができれば、TRPV1、TRPA1 受容体をターゲットにした治療法の開発に近づくことができるのではないかと考えており、研究を継続している。

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)

[学会発表] (計4件)

① Kamakura T, Ishida Y, Nakamura Y, Yamada T, Kitahara T, Takimoto Y, Horii A, Uno A, Imai T, Okazaki S, Inohara H and Shimada S

Functional expression of TRPA1 and TRPV1 in rat vestibular ganglia
27th Barany Society Meeting、平成24年6月12日、スウェーデン、ウプサラ。

② 鎌倉武史、石田雄介、中村雪子、山田貴博、北原紘、滝本泰光、宇野敦彦、今井貴夫、堀井新、岡崎鈴代、猪原秀典、島田昌一。
前庭神経節における TRPV1、TRPA1 受容体の発現について
第1回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会、平成24年8月25日、大阪。

③ 鎌倉武史、北原紘、滝本泰光、宇野敦彦、今井貴夫、堀井新、岡崎鈴代、猪原秀典。
ラットに対する塩化カリウム溶液鼓室内注入による眼振誘発とその経時的変化について
第71回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会、平成24年11月28~30日、東京。

- ④ Kamakura T, Ishida Y, Nakamura Y, Yamada T, Kitahara T, Takimoto Y, Horii A, Uno A, Imai T, Okazaki S, Inohara H and Shimada S

Functional Analysis of TRPV1 and TRPA1 in rat vestibular ganglia 36th ARO Midwinter Meeting、平成 25 年 2 月 16～17 日、アメリカ合衆国、ボルティモア。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌倉 武史 (KAMAKURA TAKEFUMI)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30600564