

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670785

研究課題名(和文) イオンチャネルを用いた時空間的制御可能なドラッグデリバリーシステムの開発

研究課題名(英文) Drug-delivery-system through ion channels

研究代表者

若森 実 (Wakamori, Minoru)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50222401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：TRPV1チャネル(カプサイシン受容体)はカプサイシンの刺激により開口し、Na⁺、K⁺、Ca²⁺等を通過させる。TRPV1チャネルをHEK293細胞に一過的に発現させ、電気生理学的に濃度-反応関係を記録した。カプサイシンの閾値は0.03 μMであり、EC50は0.22 μMであった。蛍光色素FM1-43(分子量が452 Da)の透過性も検討した。FM1-43存在下で1 μMのカプサイシンで刺激したところTRPV1発現細胞にFM1-43が流入した。細胞外のCa²⁺を除去するとFM1-43の流入は抑制された。以上の結果より、細胞外のCa²⁺がイオン通過路内径に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：TRPV1 channel is activated by capsaicin and is permeable to Na⁺, K⁺ and Ca²⁺. Concentration-response relationship for capsaicin was obtained from the HEK293 cells expressing recombinant TRPV1 channel. The threshold concentration and EC50 of capsaicin were 0.03 and 0.22 μM, respectively. FM1-43, a positively charged organic ion, was a permeant when the TRPV1 channel was activated by 1 μM capsaicin, indicating that TRPV1 channel pore size is wide enough to pass the 452 Da FM1-43. When the extracellular Ca²⁺ was removed, the FM1-43 could not enter the cells through the TRPV1 channel. These results suggest that the TRPV1 channel pore is dilated by capsaicin but extracellular Ca²⁺ regulates the dilation.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

薬理作用の効率化と副作用の軽減のため、薬物を目的の組織・細胞にだけ集中的に投与する Drug Delivery System (DDS) の開発が必要である。例えば、歯科で用いる局所麻酔薬は痛覚を遮断するために用いられるが、運動神経も遮断し、口唇の運動機能が低下する。カプサイシン受容体(別名、TRPV1 チャンネル)は運動神経には発現せず、痛みを伝える感覚神経にのみ発現しているため、TRPV1 チャンネルを介してイオン化した局所麻酔薬を感覚神経にのみ投与できる (Binshtok et al, Nature 449, 607-610, 2007)。

TRP チャンネルは細胞外の環境センサーとして味覚、温度、触覚等の口腔内感覚の受容に関わっている。TRP チャンネルは Na^+ 、 K^+ や Ca^{2+} 等の無機陽イオンを通過させるチャンネルであるが、高濃度作動薬の刺激により TRP チャンネルはイオン通過路の内径が大きくなり、有機陽イオンを通過させる (Binshtok et al, Nature 449, 607-610, 2007)。また、ATP を受容する P2X 受容体もイオン通過路の内径が大きくなる (Virginio et al, Nature Neurosci 2, 315-321, 1999)。

2. 研究の目的

薬理作用の効率化と副作用の軽減のため、薬物を目的の組織・細胞にだけ集中的に投与する Drug Delivery System (DDS) の開発が必要である。ナノ粒子やリポソームを用いた DDS が開発されているが、特異性は不十分である。本申請は生体内にあるイオンチャンネルを薬物投与経路として用いて時空間的制御可能な新たな Drug Delivery System (DDS) の開発を目指す。カプサイシン受容体(別名、TRPV1 チャンネル)と ATP を受容する P2X 受容体は高濃度の作動薬を投与すると無機イオンの他に、有機イオンも通過させるようになる。この物質輸送系としてのイオンチャンネルを利用し、TRP チャンネルや P2X 受容体が発現する細胞に選択的に薬物を投与し(空間的制御)、チャンネルを開口させた時にのみ薬物を投与する(時間的制御)新たな DDS の開発のための基礎的研究を行う。

3. 研究の方法

(1) TRPV1 チャンネルをコードする遺伝子の HEK293 細胞への導入

HEK293 細胞は 10% bovine serum、penicillin 30 U/ml、streptomycin 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加した DMEM 培地 (Sigma-Aldrich) を用い 37、5% CO_2 下で培養した。TRPV1 チャンネルと蛍光タンパク質を HEK293 細胞に発現させるため、TRPV1 ベクターと EGFP ベクターを 5:1 の割合で Effecten (Qiagen) を用い HEK293 細胞に導入した。遺伝子導入をした HEK293 細胞は 24 時間後、poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) でコートしたカバーガラスに播き、更に 24 時間後にガラスに貼り付いた HEK293 細胞を測定用ディッシュへ移動した。HEK293 細胞にマ

ウス TRPV1 チャンネルと蛍光タンパク質である EGFP を共発現させ蛍光観察することで、TRPV1 チャンネルを発現している可能性の高い細胞を倒立蛍光顕微鏡 (IX71、Olympus) により選択した。

(2) 膜電流の測定

パッチクランプ法ホールセル法を用い、膜電位固定下にチャンネルの活性化によるイオン電流を測定した。ピペット電極は Flaming/Brown Micropipetter Puller Model P-97 (Sutter Instruments) を用いてガラスキャピラリー(外径 1.5 mm、内径 1.0 mm) を加熱伸展して製作し、電極内液で満たされた時に抵抗値が 2~3 M となるものを用いた。ピペット電極を倒立顕微鏡で観察しながら水圧式三次元マニピレーター(ナリシゲ) を使用して細胞膜に接着させ、弱い吸引によりギガオームシールを形成した。更にピペット内を陰圧にすることでパッチ膜を破り、ホールセルモードを形成した。EPC-10 patch-clamp amplifier (Heka) を用いて膜電位を -60 mV に設定し、カプサイシンで惹起される膜電流をデータ取得ソフト Patch-Master (Heka) を用いて 2.9 kHz の low-pass フィルターを通しサンプリングレート 5 kHz で記録した。実験データは、Pulse software package (Heka) と Igor Pro (WaveMetrics) を用いて解析した。

(3) 溶液

パッチクランプ法による膜電流記録時には、記録細胞の近くに外液還流装置("Y-tube") を置き細胞周囲の溶液を 1 秒以内に交換できるようにし、外液及び外液に溶解させた薬物を投与した。ディッシュ内の溶液は常にポンプにてディッシュ外へ吸引することでディッシュ内の液量は一定にした。

細胞外液としては、 0Ca^{2+} -1EGTA-タイロード液 (NaCl 143 mM、KCl 5 mM、 MgCl_2 1 mM、HEPES 10 mM、EGTA 1 mM、pH = 7.4 with NaOH) を用いた。細胞内液は K^+ -gluconate 内液 (K^+ -gluconate 70 mM、KCl 50 mM、NaCl 26 mM、 CaCl_2 0.5 mM、 MgCl_2 3 mM、HEPES 10 mM、EGTA 10 mM、 ATPNa_2 、pH = 7.2 with KOH) を用いた。カプサイシンは Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶かした後、使用直前に外液で希釈することで試薬の濃度を調整した。DMSO の最終濃度は 0.1% 以下に調整したため、DMSO のチャンネルに対する効果は認められなかった (data not shown)。

(4) 統計学的分析

実験数値は平均値 \pm 標準誤差で示した。作動薬の濃度 反応曲線は $A \times C^n / (C^n + EC_{50}^n)$ の式で KaleidaGraph (Synergy Software) を用いて描画した。上式で A は最大応答値、C は作動薬濃度、 EC_{50} は最大応答の 50% の応答

が得られる作動薬の濃度、 n はヒル係数である。

4. 研究成果

(1) HEK293 細胞に発現させたマウス TRPV1 チャンネルのカプサイシン濃度-反応曲線

マウス TRPV1 チャンネルを HEK293 細胞に発現させ、三叉神経節細胞と同様にパッチクランプ法ホールセル法を適用した。'0Ca-1EGTA-タイロド液' 中で膜電位を -60 mV に保持し、0.03 ~ 10 μ M のカプサイシンを投与して濃度 反応関係を調べた。0.03 μ M のカプサイシンを投与すると小さい内向き電流が惹起された(下図 A)。同一細胞に 4 分後に 0.1 μ M のカプサイシンを投与するとより大きな内向き電流が惹起されるとともに、電流のノイズ幅が拡大しチャンネルの開閉が活発に起こっていることが示唆された。カプサイシンを洗い流すと投与前のベースラインレベルまで膜電流はゆっくりと戻り、電流のノイズ幅も時間と共に小さくなっていった。更に、同一細胞にて約 4 分毎に 0.3 μ M、1 μ M とカプサイシンの濃度を高くしていくと濃度依存的に内向き電流のピーク電流値は大きくなった。同一細胞でカプサイシンの 0.03 μ M から 3 μ M までの濃度で惹起された内向き電流のピーク電流値をカプサイシンの 1 μ M で惹起された内向き電流のピーク電流値で標準化し、その値をカプサイシンの各濃度に対してプロットしたのが下図 B のカプサイシンの濃度 反応曲線である。EC₅₀ 値とヒル係数はそれぞれ 0.22 μ M と 1.4 であった。

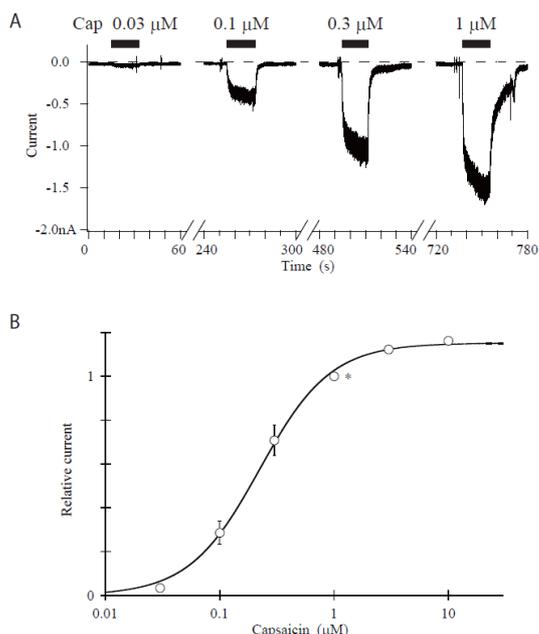


図 1 HEK293細胞に発現させたマウス TRPV1チャンネルのカプサイシン応答

A: 1 mM EGTAを含む '0Ca-1EGTA-タイロド液' 中で保持膜電位 -60 mVにおける各種濃度のカプサイシン応答を記録した。各濃度のカプサイシンは4分毎にトレースの上のバーで表した時間だけ同一の細胞

に投与した。

B: カプサイシンの濃度 反応曲線。同一細胞でカプサイシンの0.03 μ Mから10 μ Mまでの濃度で惹起された内向き電流のピーク電流値をカプサイシンの1 μ Mで惹起された内向き電流のピーク電流値で標準化し、その値をカプサイシンの各濃度に対してプロットした。フィッティングから得られた最大応答値は1.15、EC₅₀値は0.22 μ M、ヒル係数は1.4であった。シンボルはmean \pm s.e. (n = 8) で表している。

(2) 蛍光色素を用いた有機イオン透過性の検討

TRPV1 チャンネルがカプサイシンの刺激によりどの程度の大きさの分子を透過させて細胞内に入れることが出来るかを調べるために、シナプスにおけるベシクルリサイクリング観察に用いられている蛍光色素 FM1-43 を用いた。FM1-43 は分子量が 452 Da である。Mouse TRPV1 を HEK293 細胞に一過的に発現させて、FM1-43 (10 μ M)存在下で 1 μ M のカプサイシン刺激を行なった。FM1-43 の細胞への取り込みは B 励起を用いて FM1-43 を励起し、510-550 nm のバンドパスフィルターで得られた蛍光強度で評価した。カプサイシン刺激を 5 分行ったところ mTRPV1 発現細胞の蛍光強度がコントロール細胞に比べて有意に上昇した。カプサイシンの処置時間を 20 分に延長すると更なる蛍光強度の増加が見られた。興味深いことに細胞外の calcium イオンを除去すると FM1-43 の取り込みは抑制された。以上の結果より、細胞外の Ca²⁺がイオン通過路内径に影響を与えることが示唆された。TRPV1 チャンネルは Ca²⁺を通過させるため、細胞内から Ca²⁺が TRPV1 チャンネルを修飾する可能性もあり、今後、詳細な電気生理学的な解析が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Nakao A, Miki T, Shimono K, Oka H, Numata T, Kiyonaka S, Matsushita K, Ogura H, Niidome T, Noebels JL, Wakamori M, Imoto K, Mori Y. Compromised maturation of GABAergic inhibition underlies abnormal network activity in the hippocampus of epileptic Ca²⁺ channel mutant mice, tottering. *Pfluegers Arch.* 2015; 467:737-752. 査読有、doi: 10.1007/s00424-014-1555-6.

Shimizu S, Yonezawa R, Hagiwara T, Yoshida T, Takahashi N, Hamano S, Negoro T, Toda T, Wakamori M, Mori Y, Ishii M. Inhibitory effects of AG490 on H2O2-induced TRPM2-mediated Ca²⁺ entry. *Eur J Pharmacol.* 2014; 742: 22-30. 査読有、doi: 10.1016/j.ejphar.2014.08.023.

〔学会発表〕(計 13 件)

若森実/TRPチャンネルと脂質 第16回応用薬理シンポジウム 2014年12月5日 松島

高橋かおり、吉田卓史、若森実 酸刺激で活性化した TRPV1 チャンネルに対する Eugenol の鎮静作用メカニズムの解明 2014年9月26日 福岡

宮本英欧、荒木健太郎、若森実 pHで活性化される TRPV1 チャンネルの電気生理学的解析 2014年9月26日 福岡

吉田卓史、高橋かおり、若森実 オイゲノールによる鎮痛作用メカニズムの解明 第56回歯科基礎医学学術大会サテライトシンポジウム 2014年9月25日 福岡

窪田寿彦、吉田卓史、若森実 海馬 CA3領域でのシナプス伝達に対する抗けいれん薬フェニトインの作用 第56回歯科基礎医学学術大会総会サテライトシンポジウム 2014年9月25日 福岡

宮本英欧、高柳義哉、荒木健太郎、柳澤輝行、若森実 Voltage-dependency of TRPV1 channel 第87回日本薬理学会年会 2014年3月19日 仙台

高橋かおり、吉田卓史、若森実 ユージノールによる TRPV1 チャンネル抑制機構解明 第87回日本薬理学会年会 2014年3月19日 仙台

吉田卓史、高橋かおり、若森実 ユージノールによる TRPV1 チャンネル抑制機構解明 第87回日本薬理学会年会 2014年3月19日 仙台

宮本英欧、高柳義哉、荒木健太郎、柳澤輝行、若森実 Voltage-dependency of TRPV1 channel インターフェイス口腔健康科学国際シンポジウム 2014年1月20日 仙台

窪田寿彦、若森実、フェニトインは海馬 CA3 錐体細胞へ投射する興奮性神経終末部に作用してグルタミン酸放出を抑制する 日本生理学会東北生理談話会 2013年10月5日 仙台

吉田卓史、高橋かおり、若森実 ユージノールの TRPV1 チャンネルに対する抑制機構解明 第55回歯科基礎医学学術大会 2013年9月22日 岡山

Hisahiko Kubota, Minoru Wakamori Antiepileptic Drug Phenytoin reduce mEPSC Frequency at Rat Hippocampus CA3 synapse. The 11th Japan-Korea Joint Symposium on Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. 2013年9月4日 浜松市

Hisahiko Kubota, Minoru Wakamori Antiepileptic Drug Phenytoin reduce mEPSC Frequency at Rat Hippocampus CA3 synapse. NIH-Tohoku University-JSPS Symposium 2013年5月9日 仙台

〔図書〕(計 1 件)

若森実、三木崇史、中尾章人、高田宜則、森泰生 脳神経イラストレイテッド 改訂第3版 (羊土社) 「電位依存性チャンネル」 2013年 185頁-192頁.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若森 実 (WAKAMORI Minoru)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号: 50222401

(2) 連携研究者

吉田卓史 (YOSHIDA Takashi)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号: 30455795