

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670121

研究課題名(和文)環境ガス早期警告系としてのTRPA1チャネルの役割

研究課題名(英文)Role of TRPA1 as the front-line sensor to the environmental gas threats

研究代表者

桑木 共之(Kuwaki, Tomoyuki)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：80205260

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)：Transient Receptor Potential (TRP)イオンチャネルの1つであるTRPA1チャネルが環境ガス中に含まれる低酸素および有害物質のセンサーとして働き、これらを体内に取り込んでしまう前に忌避行動、覚醒や呼吸変化を引き起こす早期警告系として役立っているのではないかという仮説を検証した。仮説は実証され、しかも鼻腔内の三叉神経に存在するTRPA1が重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：I hypothesized that Transient Receptor Potential Ankinin-1, one of the TRP ion channel family proteins, play a role as the front-line sensor to the environmental gas threats including hypoxic and irritating gases to prevent further incorporation of them by inducing arousal, avoidance behavior, and respiratory slowing. An affirmative results were obtained. Furthermore, TRPA1 located in the trigeminal nerve in the nasal cavity was most responsible for the responses.

研究分野：環境生理学、神経生理学

キーワード：環境有害物質 忌避行動 睡眠・覚醒 TRPA1 低酸素 感覚神経 三叉神経 呼吸

1. 研究開始当初の背景

Transient Receptor Potential (TRP)イオンチャネルチャネルは1989年にショウジョウバエの遺伝子が同定されて以来、世界中で精力的に研究され、温度・機械刺激・浸透圧・カプサイシンを初めとする種々の化学物質・pH等を検出するセンサーとしての役割が明らかになってきた。TRPチャネル活性化の分子メカニズムを明らかにする目的で種々のTRPチャネルの酸化感受性を定量化したところ、TRPA1チャネルが最も感受性が高いことが判明した(Nature Chemical Biology 7:701-711, 2011)。生体が高酸素検出系を持っていることを示した世界初の成果であるが、その生物学的意義の検証は十分ではなかった。

2. 研究の目的

TRPチャネルの1つであるTRPA1チャネルが環境ガス中に含まれる高酸素・低酸素および有害物質のセンサーとして働き、これらを体内に取り込んでしまう前に忌避行動や呼吸変化を引き起こす早期警告系として役立っているのではないかと仮説を検証する事であった。

3. 研究の方法

TRPA1遺伝子ノックアウトマウスおよびその対照野生型マウスを繁殖・維持して以下の4つの実験を行い、TRPA1が高濃度酸素を含む有害物質吸入阻止を担う早期警告系の役割を果たすという仮説を検証した。

- (1) 忌避/近接行動を利用して、酸素濃度や刺激物質の検出に寄与している可能性を調べる。
- (2) 気道周囲でTRPA1が存在する3つの神経、すなわち鼻粘膜の三叉神経、嗅神経、ならびに気管の迷走神経求心路の役割分担を調べる。
- (3) 低酸素刺激が実際に鼻腔内三叉神経を活性化させるか否かを検証する。
- (4) 鼻腔内三叉神経におけるTRPA1の分布を免疫組織学的に調べる。

4. 研究成果

(1) ホルマリンやわさびの刺激成分などの有害物質のセンサーとしてTRPA1が役立っていることを、TRPA1欠損マウスと対照野生型マウスとの行動比較によって立証するため、ガス刺激に適した行動観察装置を作成した(図1)。

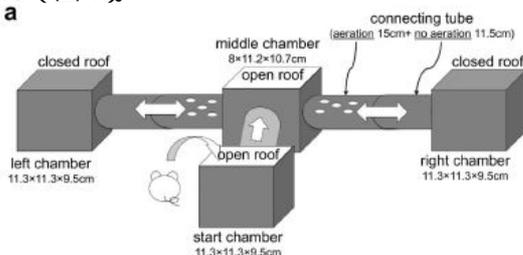


図1. ガス刺激忌避/近接行動試験装置

この装置を用いて実験した結果、TRPA1欠損マウスはホルマリン、ワサビ成分のアリルイソチオシアネート、タバコ煙成分のアクロレインといった有害物質に対して忌避行動を取らなかった。この異常は野生型マウスの鼻腔内にTRPA1プロテクトを投与することによって再現できたので、感覚神経の中でも特に鼻腔内三叉神経に分布するTRPA1が重要であると推測された(図2)。

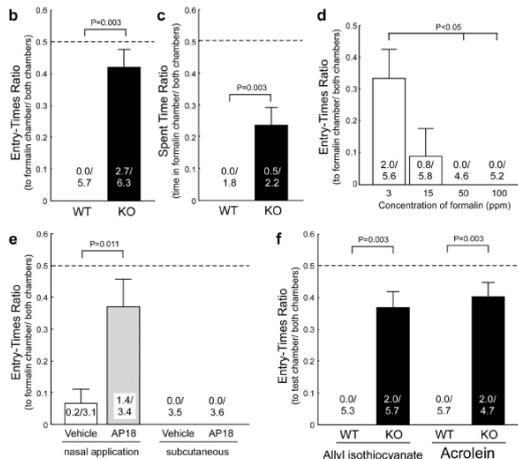


図2. 有害ガス忌避行動にはTRPA1が必要である事を示した実験結果

次に、脳波と筋電図測定用の電極を埋め込んだマウスを用いて、ホルマリン蒸気刺激による睡眠からの覚醒時間短縮効果を調べたところ、TRPA1欠損マウスではホルマリンによる短縮効果が見られないことが明らかになった(図3)。

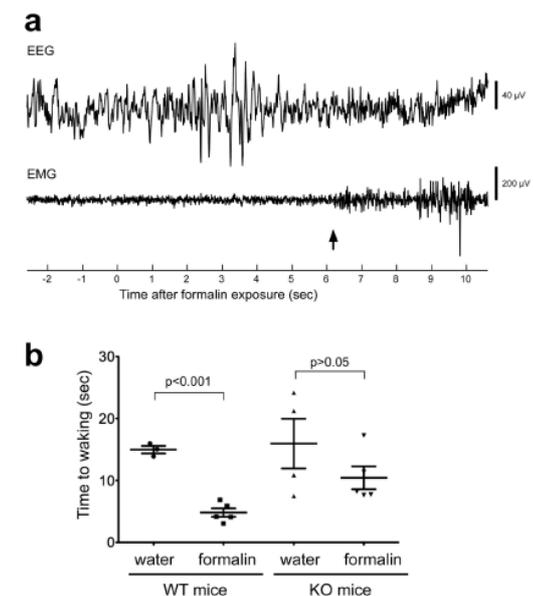


図3. 危険物を感知して早期に覚醒するにはTRPA1が必要である事を示した実験結果

また、逆行性トレーサーを鼻腔内に投与した後三叉神経節を取りだして調べた結果、鼻腔内に分布する三叉神経の細胞体の一部にTRPA1が存在していることが明らかになった(図4)。

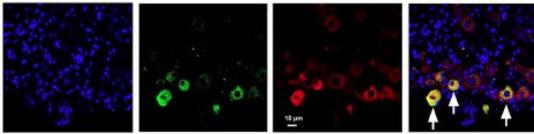


図4. 鼻腔内に分布する三叉神経節細胞にTRPA1が存在する証明

最後に、ホルマリン刺激による三叉神経の活性化がTRPA1欠損マウスではほとんど消失していることも確認した(図5)。

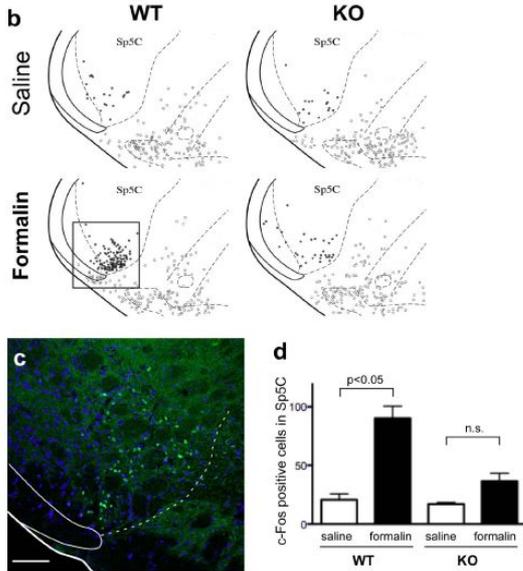


図5. ホルマリン蒸気刺激による三叉神経脊髄路核神経の活性化

以上、①~⑤の結果を総合すると、先行する試験管内実験結果から推測されていたTRPA1の低酸素および有害物質のセンサーとしての役割を、生体内でも実証することができ、仮説は正しかった事が証明された。更に、鼻腔内の三叉神経が重要であるという新たな発見もすることができた。

(2) 気道周囲でTRPA1が存在する3つの神経、すなわち鼻粘膜の三叉神経、嗅神経、ならびに気管の迷走神経求心路の役割分担を調べるために、上気道(鼻腔)と下気道(気管)とを別々に刺激できる装置を作成した(図6)。

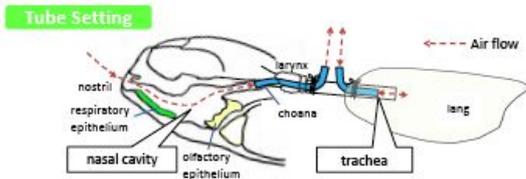


図6. 上・下気道を個別に刺激するための挿管手術

この装置を用いて野生型マウス、TRPA1欠損マウス、嗅球破壊野生型マウスの鼻腔内または気管内にTRPA1選択的の刺激剤であるアリルイソチオシアネート(AITC)蒸気を投与したときの呼吸に対する効果を比較した。

その結果、下気道にAITCを投与した時には3種の動物全てで呼吸に変化が見られなかった。いっぽう、上気道に投与した際には野生型マウスと嗅球破壊マウスで同程度の呼吸数抑制が観察されたが、TRPA1欠損マウスでは全く反応が起らなかった。

これらの結果から、呼吸抑制に関与するTRPA1は主として鼻腔内の三叉神経に分布すると結論された。研究(1)では忌避行動や覚醒反応を調べたが、呼吸抑制という自律神経系反応でも同様に三叉神経のTRPA1が危険センサー機構として重要であることが判った。

(3) 低酸素刺激が三叉神経を活性化させて覚醒反応や呼吸数抑制反応を引き起こしていることを更に確認するために、三叉神経の活性化を免疫組織化学的に検討した。具体的には、5時間の装置馴化の後3分間の低酸素暴露を与え、直ちに深麻酔、固定液の経心臓灌流を行い、脳を摘出した(図7)。

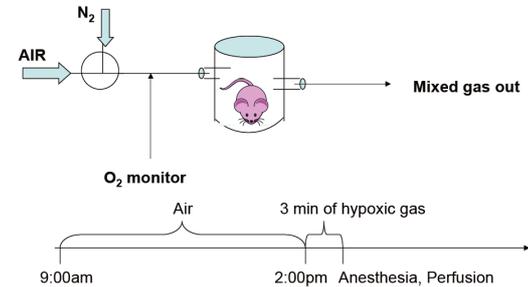


図7. 低酸素負荷実験手順

三叉神経節内の神経細胞の活性化を判定するため、神経細胞のマーカーであるNeuNと細胞活性化の指標である細胞外シグナル調節キナーゼのリン酸化体との2重染色を行った(図8)。

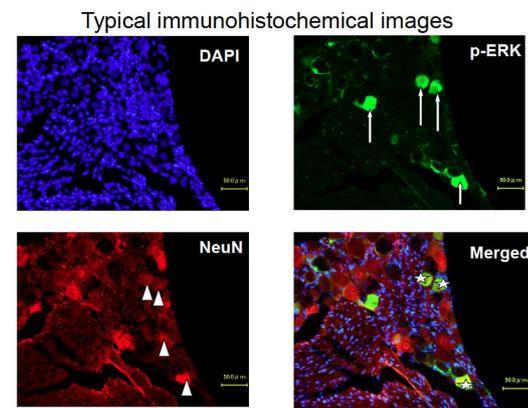


図8. 三叉神経節細胞の免疫染色代表例

野生型マウスでは21%酸素と比較して低酸素で活性化される神経細胞数が有意に増加したが、TRPA1欠損マウスでは10%の強度低酸素で増加したものの、13%の軽度低酸素では増加しなかった。すなわち、鼻腔における軽度低酸素の検出にはTRPA1が必須である事が明らかになった。

(4) 鼻腔内における TRPA1 の分布の免疫組織化学的検討

予想どおり、三叉神経のマーカーである PGP9.5 と共存し、上皮細胞層と粘膜固有層との境界線付近を走行する線維状構造が陽性染色された。

以上、(1)～(4)の結果を総合すると、TRPA1 が実際に生体内において低酸素および有害物質のセンサーとして働き、忌避行動・覚醒・呼吸変化等を介して生体防御に働く早期警報系を形成していることが証明できた。

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 4 件)

桑木共之、呼吸・循環測定実験、呼吸 34(6) (掲載予定) 査読無

桑木共之、酸素および刺激ガスセンサーとしての TRPA1 チャンネルの役割、九州高気圧環境医学会誌 15: 1-6, 2015. 査読無

米満亨、桑木共之、三叉神経のワサビ受容体による危機回避: Science Topics、日本生理学雑誌 76(1):11, 2014. 査読無

Yonemitsu T, Kuroki C, Takahashi N, Mori Y, Kanmura Y, Kashiwadani H, Ootsuka Y, Kuwaki T. TRPA1 detects environmental chemicals and induces avoidance behavior and arousal from sleep. Scientific Reports, 査読有、vol.3, 3100; pp.1-5, DOI:10.1038/srep03100 (2013).

[学会発表](計 20 件)

戌亥啓一、桑木共之: 刺激物質誘発性の呼吸数低下には鼻腔内の TRPA1 が寄与する、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会第 92 回日本生理学大会合同大会、2015/3/21-23、神戸国際会議場(兵庫県)

戌亥啓一、桑木共之: 鼻腔内 TRPA1 を介した刺激物質誘発性呼吸数低下、第 10 回環境生理シンポジウム、2015/3/20、北野プラザ六甲荘(兵庫県)

Tomoyuki Kuwaki: TRPA1 in airway sensory neurons acts as an oxygen sensor to modulate breathing and behavior、International symposium on Ion channels, transporters, and small molecules as key regulators of homeostatic system (招待講演) 2015/03/17-20、名古屋国際会議場(愛知県)

戌亥啓一、桑木共之: 刺激物質誘発性呼吸数低下における鼻腔 TRPA1 の重要性 第 8 回桜ヶ丘地区(基礎系)研究発表会、2015/1/28、鹿児島大学桜ヶ丘キャンパス

Toru Yonemitsu, Yuichi Kanmura, Tomoyuki Kuwaki: Intranasal TRPA1 activates trigeminal nerve and alarms environmental irritants in mice、15th World Congress on pain (IASP2014)、10/6-11/2014、Buenos Aires アルゼンチン Chang-Ping Chen, Chiharu Kuroki, Tomoyuki Kuwaki: Mild hypoxia activates trigeminal neurons and wakes up sleeping mice through TRPA1、第 24 回日本病態生理学会、2014/8/8-10、北九州国際会議場(福岡県北九州市)

桑木共之: 気道感覚神経の TRPA1 (ワサビ受容体) による行動と呼吸の調節、第 46 回 Sleep Apnea カンファレンス(招待講演) 2014/8/2、帝人ファーマ本社(東京都)

ChangPing Chen, Chiharu Kuroki, Toru Yonemitsu, ShaoWu Ou, Tomoyuki Kuwaki: Mild hypoxia activates trigeminal neurons and wakes up sleeping mice through TRPA1、第 4 回鹿児島神経科学研究会、2014/7/12、鹿児島大学桜ヶ丘キャンパス

桑木共之: 睡眠・覚醒に伴う呼吸調節の変化、日本睡眠学会第 39 回定期学術集会基調シンポジウム(招待講演) 7/3-4/2014、徳島県郷土文化会館

米満亨、上村裕一、桑木共之: 巴豆の成分であるクロトンオイルはイオンチャンネル TRPA1 を刺激する、第 65 回日本東洋医学会学術総会、2014/6/27-29、東京国際フォーラム(東京都)

桑木共之: 酸素および刺激ガスセンサーとしての TRPA1 チャンネルの役割、第 15 回九州高気圧環境医学会(招待教育講演)、2014/6/7、鹿児島大学鶴陵会館(鹿児島市)

桑木共之、米満亨、黒木千晴、高橋重成、森泰生: 環境ガス早期警報装置としての TRPA1、TRP 研究会 2014、2014/6/5-6、生理学研究所(愛知県岡崎市)

長谷川麻衣子、桑木共之、上村裕一: 術後痛と創傷治癒: 酸素センサーとしての TRPA1 をターゲットとした鎮痛と、マクロファージ制御による術後遷延痛の予防、第 61 回日本麻酔科学会シンポジウム、2014/5/15-17、パシフィコ横浜(神奈川県)

桑木共之: 第 91 回日本生理学大会合シンポジウム: 呼吸調節における TRP チャンネルの関与(招待講演) TRPA1 contributes to arousal and respiratory activation to mild hypoxia、第 91 回日本生理学大会、2014/3/16-18、鹿児島

米満亨、高橋重成、森泰生、田代章悟、上村裕一、桑木共之、TRPA1 は三叉神経を介して環境侵害刺激を警報する、日本ペインクリニック学会第 47 回大会、2013/7/13-15、大宮

桑木共之、米満亨、黒木千晴、環境早期警報装置としての TRPA1 チャンネル、第 19 回日本行動神経内分泌学研究会全国集会、2013/7/5-7、桜島

Kuroki C., Yonemitsu T., Kanmura Y.,
Kuwaki T.: Contribution of TRPA1 to
arousal and respiratory response to
hypoxia. 優秀演題、EuroAnesthesia 2013,
2013/6/1-4, Barcelona, Spain

Yonemitsu T., Takahashi N., Mori Y.,
Kanmura Y., Kuwaki T.: Transient receptor
potential ankyrin 1 alarms diverse
inhalation stimuli in mice.
EuroAnesthesia 2013, 2013/6/1-4,
Barcelona, Spain

黒木千晴、米満亨、上村裕一、桑木共之、
低酸素に対する覚醒および呼吸調節におけ
る TRPA1 の関与、優秀演題、日本麻酔科学会
第 60 回学術集会 2013/5/23-25 札幌

Toru Yonemitsu, Nobuaki Takahashi,
Yasuo Mori, Yuichi Kanmura, Tomoyuki
Kuwaki. Avoidance of environmental gas
irritants mediated by TRPA1. EB2013,
2013/4/20-24, Boston

〔図書〕(計 0 件)

〔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

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 統合
分子生理学分野ホームページ

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~physiol1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑木 共之 (KUWAKI, Tomoyuki)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教
授

研究者番号：80205260

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

高橋 重成 (TAKAHASHI, Nobuaki)

森 泰生 (MORI, Yasuo)

大塚 曜一郎 (OOTSUKA, Youichirou)

柏谷 英樹 (KASHIWADANI, Hideki)

戌亥 啓一 (INUI, Keiichi)

陳 昌平 (CHEN, ChangPing)

黒木 千晴 (KUROKI, Chiharu)

米満 亨 (YONEMITSU, Toru)

上村 裕一 (KANMURA, Yuichi)