

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 11 月 27 日現在

機関番号：34533

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893280

研究課題名(和文)炎症性腸疾患に伴う内臓痛の発症メカニズムにおける免疫調節因子とTRP受容体の相関

研究課題名(英文)The involvement of immunomodulatory factors and TRP receptors in inflammatory bowel disease induced visceral pain

研究代表者

王 勝蘭(Wang, Shenglan)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号：50714359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：2種類炎症性腸疾患モデルラットにおいてDRGおよび腸管における炎症性関連サイトカイン、疼痛関連受容体、過酸化物質等の発現と内臓痛発症との関連を調べた。いくつかのサイトカインやTRPA1、H2O2の発現上昇が認められた。また、増加したH2O2はTRPA1を介して内臓痛覚過敏を誘発することが示唆された。TRPA1のアゴニストであるAITCを正常ラットの腸管に投与したところ、ラットの結腸運動と内臓疼痛行動の増加が確認された。腸管運動を司るアセチルコリンM3受容体のアンタゴニストはAITC誘発運動と疼痛行動を抑制した。以上の結果から炎症性腸疾患の発症に種々の因子が複雑に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We made two kinds of IBD rat models and detected the expression of inflammatory cytokines, pain-related receptors and oxidants in DRG neurons or colonic tissues. We found several cytokines, TRPA1 and H2O2 contents increased in DRG neurons or colonic tissues of IBD rats. Using a recording of visceromotor response to colorectal distention, we observed that the increased H2O2 sensitized TRPA1 channel to evoke visceral hyperalgesia in TNBS rats. We also evaluated interaction of colonic motility and visceral pain. We found that intrarectal administration with AITC (a TRPA1 agonist) increased both colonic motilities and visceral pain behaviors. 4-DAMP, an antagonist of acetylcholine receptors subtype M3, inhibited the AITC-induced colonic motility and visceral pain. These results indicate that the mechanism of visceral pain in IBDs involve the inflammatory cytokines, pain-related receptors, oxidants and visceral motilities, which factors are interact each other and form a complex machinery.

研究分野：神経科学

キーワード：内臓痛 DSSモデル TNBSモデル TRPチャンネル 免疫調節因子

## 1. 研究開始当初の背景

内臓疾患に起因する痛みは、体性痛とは様々な点でそのメカニズムが異なっている。内臓からの知覚神経は脊髄の広範囲に投射しているため、内臓痛には局在性が乏しく関連痛を伴うことが多い。また、内臓は異なる機能をもつ知覚神経が二重に分布しているため、体性痛に比べ複雑なメカニズムにより情報が伝えられている。このような背景より、内臓痛の研究が体性痛よりも大きく遅れている。

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) では、慢性的に腹痛を伴うために、患者の QOL は著しく低下する。IBD に伴う腹痛は、炎症による局所刺激以外に、腸の蠕動運動に伴う機械刺激、腸内環境の化学刺激などが関わって発生している。免疫学分野では、IBD は免疫異常により発症し、炎症性サイトカインなど多くの免疫調節因子が関与していることが示唆されている。一方、疼痛学分野では、IBD に関する研究は少なく、腹痛と免疫調節因子の直接的な関連性は報告されていない。

一方、Transient receptor potential 遺伝子がコードする TRP 蛋白質は、侵害受容器などの細胞膜において非選択的なカチオンチャンネルとして機能し、様々な刺激に応答して活性化される。温度、化学的、物理的な刺激を受容する TRP チャンネルは、カプサイシン受容体 TRPV1 を始め、TRPA1、TRPV2、TRPM8 など侵害刺激受容に関与するものも多く、侵害刺激受容の中心的役割を担っている。

## 2. 研究の目的

本研究は、Dextran Sodium Sulphate (DSS) と TriNitroBenzene Sulfonic acid (TNBS) 誘発性大腸炎モデルを用いて、炎症性腸疾患に伴う内臓痛における免疫調節

因子と TRP 受容体との相関について検討し、内臓痛発生の新規メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

本研究は行動薬理学的、電気生理学的、形態学的、分子生物学的手法を用い、内臓痛疾患の分子メカニズムを検討した。

- (1) DSS および TNBS 誘発性大腸炎モデルの作製。DSS モデル: 7 週齢 SD ラット (200-300 g) を用いて、4 %DSS の自由飲水による経口投与で作製する。腸組織の MPO 活性を測定し、免疫染色で腸粘膜の損傷状態を確認した。TNBS モデル: 7 週齢 SD ラットの直腸に TNBS を 50%エタノールで溶解した液を 0.4ml 投与して作製した。
- (2) IBD モデルにおける TRP 受容体および免疫調節因子 (サイトカイン) 発現変化の検討。RT-PCR、免疫染色法を用いて DRG や腸管における TRP 受容体遺伝子及びタンパクの発現を検討した。また、サイトカイン蛍光標識測定キットを用いて腸管および血清中のサイトカイン変化を検討した。H2O2 アッセイを用いて腸管過酸化物質を検討した。
- (3) 内臓痛の測定。各モデルの外腹斜筋の筋電図 (electromyography; EMG) の変化を測定し、疼痛関連動作の経時的変化を調べた。また、腸管運動と痛み発生の関係やセロトニンやアセチルコリン、各種 TRP 受容体の関わりを検討した。

## 4. 研究成果

- (1) DSS および TNBS 誘発性大腸炎モデルを作製した。HE 染色と筋電図測定方法を用いて、DSS および TNBS モデルの主な

症状を測定した。図1に示しているのは、コントロール群より、DSS 誘発した大腸炎モデルによる結腸粘膜糜爛および炎症細胞の著しい浸潤を明らかにした。図2に示しているのは、TNBS 誘発した大腸炎モデルによるラットの腹内疼痛感覚が増加することを明らかにした。(図1～図2)

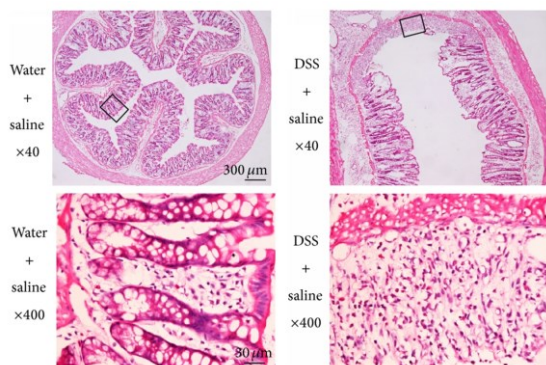


図1：ラット DSS モデルによる結腸粘膜の組織的变化 (HE 染色)。

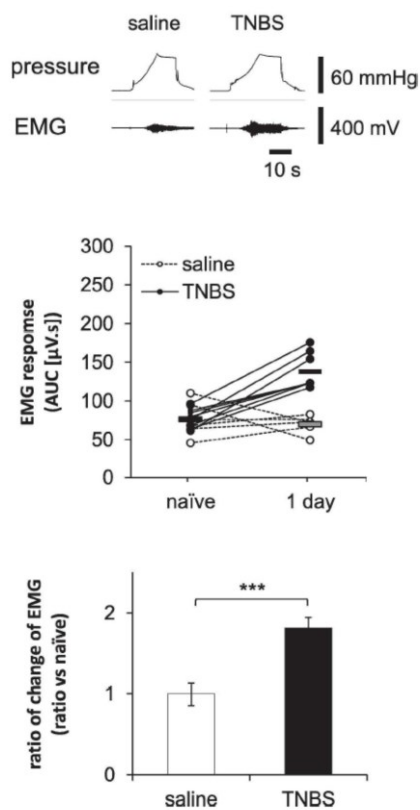


図2：ラット TNBS モデルによる腸内バールン刺激誘発腹筋筋電図の変化 (内臓痛測定)。

(2) ラット DSS モデルによる、全身および局所の腸管における MPO や炎症性関連サイトカインの発現変化を検討した。DSS 群の結腸ではインターロイキン IL-1 $\beta$  やケモカイン GRO/KC と MCP-1 など有意に増加していたが、粘膜修復に関連するサイトカイン MIP-3 $\alpha$  を減少したことが示唆された。(図3～図6)

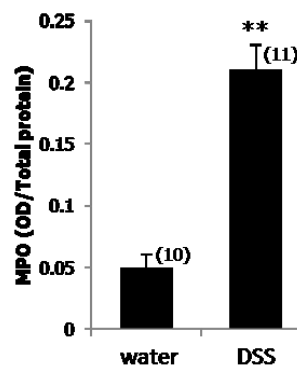


図3：結腸 MPO 活性。

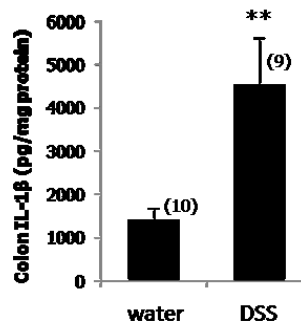


図4：結腸 IL-1 $\beta$  の発現変化。

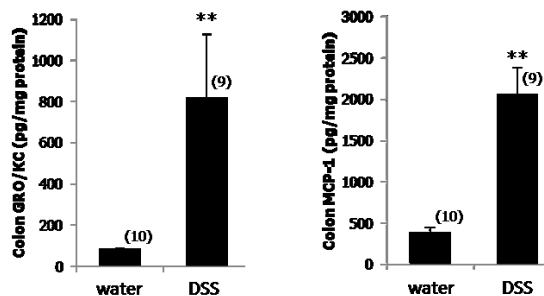


図5：結腸ケモカイン GRO/KC (左) と MCP-1 (右) の発現変化。

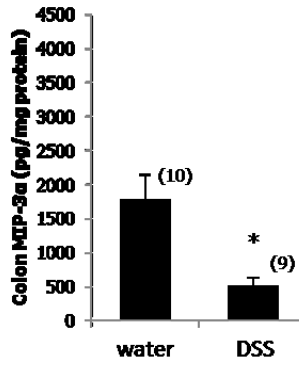


図 6: 結腸 MIP-3 $\alpha$  (粘膜修復に関連するサイトカイン) の発現変化。

- (3) DRG および腸管における疼痛関連受容体の発現変化を検討した。TRPA1 は結腸の腸管に大量に存在することを確認した。(図 7)

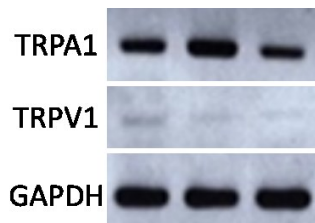


図 7: 結腸遠端の組織による、TRPA1 及び TRPV1 遺伝子の発現 (n=3)。

- (4) 過酸化物質の発現変化と内臓痛発症との関連を調べた。コントロール群より、TNBS モデル結腸 H2O<sub>2</sub> の発現が上昇した。(図 8)

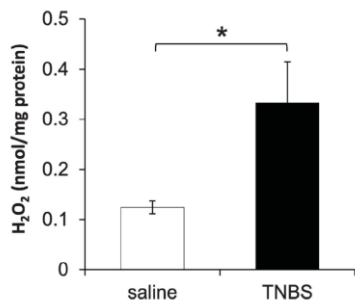


図 8: ラット TNBS モデルによる結腸 H2O<sub>2</sub> の発現変化。

- (5) 腸内バルーン刺激誘発腹筋筋電図の変化を指標とした内臓痛測定では、H2O<sub>2</sub>

は TRPA1 チャンネルを介して内臓痛覚過敏を誘発することが示唆された (図 9 ~ 図 10)。

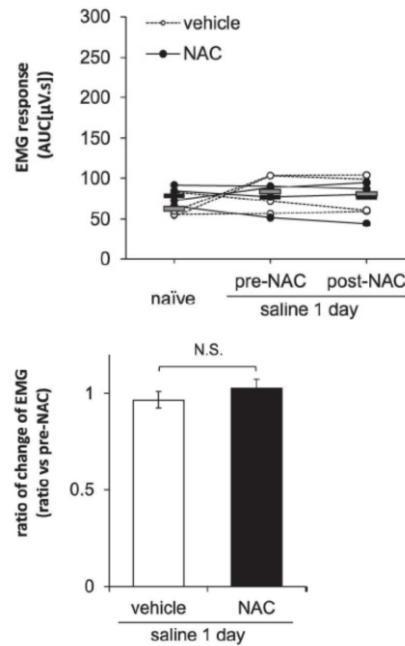


図 9: H2O<sub>2</sub> スカベンジャーである N-acetyl-L-cysteine (NAC) を静脈投与し、saline 群ラットの筋電図の変化が認められなかった。

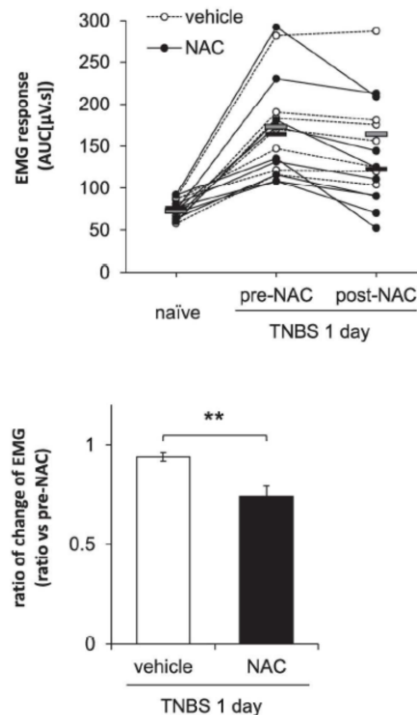


図 10: NAC を静脈投与し、TNBS モデル群ラットの筋電図の変化が抑制した。

(6) TRPA1 や TRPV1 のアゴニストであるカプサイシンやマスタードの成分を正常ラットの腸管に投与し、ラットの結腸運動と内臓疼痛行動の関連を調べた。AITC はラットの結腸運動と内臓疼痛行動を起こした。

(7) 腸管運動を司るアセチルコリン受容体 (mAChR M3) のアンタゴニストである 4-DAMP を投与したところ、AITC 誘発運動と疼痛行動が抑制された。

以上の結果により、炎症性腸疾患の発症に種々の因子が複雑に関与していることが示唆された。また、TRP チャネルは IBD モデルに伴う内臓痛発症に中心的な役割を担っていることが明らかとなった。

## 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 1 件)

(1) Hao Y, Nagase K, Hori K, Wang S, Kogure Y, Fukunaga K, Kashiwamura S, Yamamoto S, Nakamura S, Li J, Miwa H, Noguchi K, Dai Y. Xilei san ameliorates experimental colitis in rats by selectively degrading proinflammatory mediators and promoting mucosal repair. Evid Based Complement Alternat Med. 2014; 2014 : 569587, Epub 2014 Jul 10. doi: 10.1155/2014/569587. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

(1) KOGURE Y, WANG S, TANAKA K-I, YAMAMOTO S, NISHIYAMA N, NOGUCHI K, DAI Y; Role of hydrogen peroxide and TRPA1 in visceral hyperalgesia in trinitrobenzene sulphate-induced

colitis; The 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2014, Walter E. Washington Convention Center (Washington. DC, USA); 2014. 11. 18

(2) HAO Y, WANG S, KOGURE Y, YAMAMOTO S, MIWA H, NOGUCHI K, DAI Y; TRPA1, but not TRPV1 contributes to the colonic motility-dependent visceral pain in rats; The 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2014, Walter E. Washington Convention Center (Washington. DC, USA); 2014. 11. 18

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

王 勝蘭 (Wang Shenglan)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号 : 50714359