

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06641

研究課題名(和文) 侵害受容チャネルTRPA1活性化の種差に関する分子毒性学的研究

研究課題名(英文) Molecular toxicological study on the species differences in activation of nociceptive TRPA1 channel

研究代表者

神野 透人 (Jinno, Hideto)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：10179096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、3つの活性システインをセリンに置換した変異体ならびにN-末端領域、膜貫通領域1-4、膜貫通領域5-6およびC-末端領域をヒトとマウスの間で相互に入れ替えたキメラTRPA1を発現する細胞株を樹立し、ケイ皮酸エステル類によるTRPA1活性化について、ヒトとマウスの間での種差および活性化機構について検討した。

その結果、ケイ皮酸エステル類のうち、EC50値に～4倍の種差が認められる化合物については、活性システイン残基を介した共有結合による活性化とリガンドとしての活性化の混合型の活性化機構を有すること、リガンドとしての相互作用は主に膜貫通領域1-4によるものであることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TRPA1は寒冷刺激の他に、さまざまな化学物質によって活性化される侵害受容体である。一般に、化学物質の安全性は主にげっ歯類を用いる動物実験によって評価され、安全係数の導入によってヒトに外挿されることを考慮すると、両者の間の種差は、リスク評価の妥当性に影響を及ぼす重要な因子であるといえる。本研究で得られた知見は、TRPA1が関与する生体影響に関して、げっ歯類モデルを用いるリスク評価に限界があることを示している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established a mutant TRPA1 in which three reactive cysteines (C621, C641 and C665) are substituted for serine residues, and chimeric TRPA1s in which four segments (N-terminal, membrane-penetrating regions 1-4 and 5-6, and the C-terminal) are replaced with each other between human and mouse. By using these mutant TRPA1s, we examined the TRPA1 activation by a group of cinnamate derivatives, and found that some cinnamate derivatives with the species differences of ~4 times elicited a mixed-type of activation mechanisms, or activation by covalent-binding with reactive cysteine residues and ligand binding with transmembrane regions 1-4.

研究分野：環境系薬学

キーワード：侵害刺激 TRPA1 種差 ケイ皮酸エステル類

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、ヒトおよびマウス TRPA1 の安定発現細胞株を樹立し、気道過敏性を亢進する化学物質のスクリーニングを実施してきた。その過程で、比較的大きな種差を示す環境汚染物質が存在することを見出した。TRPA1 活性化の種差を生じる要因を明らかにすることは、化学物質の安全性評価の観点から極めて重要であると考えられることから、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

TRPA1 は寒冷刺激の他に、ホルムアルデヒドやアクロレインなど、さまざまな化学物質によって活性化される侵害受容体である。一般に、化学物質の安全性は主にげっ歯類を用いる動物実験によって評価され、安全係数の導入によってヒトに外挿されることを考慮すると、両者の間の種差は、リスク評価の妥当性に影響を及ぼす重要な因子であるといえる。

本研究では、TRPA1 を介する侵害刺激の受容に関して、ヒトとマウスの種間で決定的な差異を生じるタンパク質構造的な要因について検討を行う。TRPA1 は 2 通りの機序で活性化するユニークなイオンチャネル型受容体である。1 つは、親電子性化合物と反応性の高いシステイン残基の共有結合によるものであり、もう 1 つは化学的な反応性に乏しく、リガンドとして会合するものである。これらのメカニズムのいずれが TRPA1 活性化にかかる種差を生じる要因となっているか、これを明らかにすることが本研究の主たる目的である。

3. 研究の方法

3 つのシステイン残基をセリンに置換した変異型 TRPA1 発現ベクターは QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて作成した。TRPA1 の N-末端および C-末端領域、ならびに 6 つの膜貫通領域 (TM) の TM 1-4 および TM 5-6 をマウスとヒトで相互に置換したキメラ TRPA1 発現ベクターは、GeneArt Seamless Cloning and Assembly Technology を用いて作成した。これらの TRPA1 を安定的に発現する Flp-In293 細胞株を樹立し、被験物質の添加による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を、FLIPR Calcium 6 Assay Kit を用いて FlexStation 3 で測定した。

4. 研究成果

(1) 野生型のヒトおよびマウス TRPA1 安定発現細胞株を用いて、ケイ皮酸類縁化合物 (Coniferyl aldehyde、Vanillylidene acetone、Coniferyl alcohol、trans-Ferulic acid、Methyl ferulate、Ethyl ferulate) による TRPA1 活性化を検討した。その結果、親電子的な反応性が高いと考えられるアルデヒド化合物およびケトン化合物、すなわち Coniferyl aldehyde や Vanillylidene acetone では種差は観察されなかったのに対し、ケイ皮酸エステル類では顕著な種差が認められた。また、ケイ皮酸エステル類は、アルデヒド化合物およびケトン化合物とは異なり、活性システインをセリンに置換した変異型 TRPA1 に対しても活性化能を保持していることが明らかになった。これらの結果は、TRPA1 の活性化機序に依存して種差の有無が生じる可能性を示唆するものであると考えられる。

(2) 一方、リガンドとして TRPA1 を活性化する Menthol のリガンド結合に関与することが報告されている TM5 領域のアミノ酸残基の変異体 (ヒトでは V875G、マウスでは G878V) は、ケイ皮酸エステル類の反応性には影響を及ぼさなかったことから、これらの化合物は Menthol とは異なるアミノ酸を介して TRPA1 と相互作用することが示唆された。

(3) Methyl ferulate はマウス TRPA1 の TM5-6 領域を置換したヒト TRPA1 は野生型ヒト TRPA1 とほぼ同等の濃度依存性を示したのに対し、マウス TM1-4 領域の置換によって、ヒト TRPA1 に対する Methyl ferulate の親和性は顕著に低下し、その EC_{50} 値はマウス TRPA1 に匹敵する値であった。これらの結果から、Methyl ferulate は、典型的な TRPA1 アゴニストである Menthol とは異なる部位/領域 (TM1-4) での TRPA1 との相互作用によって種差を生じることが明らかとなった。

(4) Methyl coumalate および Methyl caffeate の場合も、ヒト、マウス TRPA1 の活性化能に 2.5 ~ 4 倍程度の種差がみられ、かつ活性システインをセリンに置換した変異型 TRPA1 においても活性化が認められた。これらの結果は、Methyl coumalate、Methyl caffeate も Methyl Ferulate と同様にリガンド結合領域での相互作用を介して TRPA1 を活性化することを示していると考えられる。

(5) これらの結果から、ケイ皮酸エステル類のうち、 EC_{50} 値に ~ 4 倍の種差が認められる化合物

については、活性システイン残基を介した共有結合による活性化とリガンドとしての活性化の混合型の活性化機構を有すること、リガンドとしての相互作用は主に膜貫通領域 1-4 によるものであることが明らかとなった。換言すれば、リガンドとして TRPA1 に作用するアゴニストは比較的大きな種差を示す可能性があることから、げっ歯類の結果をヒトに外挿する際には注意深い考察が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawakami Tsuyoshi, Isama Kazuo, Jinno Hideto	4. 巻 55
2. 論文標題 Skin transferability of phthalic acid ester plasticizers and other plasticizers using model polyvinyl chloride sheets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Environmental Science and Health, Part A	6. 最初と最後の頁 1163 ~ 1172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10934529.2020.1795503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawakami Tsuyoshi, Isama Kazuo, Ikarashi Yoshiaki, Jinno Hideto	4. 巻 45
2. 論文標題 Evaluation of the sensitization potential of volatile and semi-volatile organic compounds using the direct peptide reactivity assay	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 725 ~ 735
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.45.725	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森 葉子、永井萌子、大河原 晋、磯部隆史、青木 明、岡本誉士典、埴岡伸光、香川（田中）聡子、神野透人
2. 発表標題 フェルラ酸類によるTRPA1活性化の種差に関する研究
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤綾乃、秋山 希、長奈都美、三浦伸彦、河村伊久雄、森 葉子、永井萌子、磯部隆史、大河原 晋、埴岡伸光、神野透人、香川（田中）聡子
2. 発表標題 気道過敏性関連遺伝子のヒト気管及び肺における発現個体差
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoko Mor , Akira Aoki , Yoshinori Okamoto , Takashi Isobe , Susumu Ohkawara , Toshiko Tanaka-kagawa , Nobumitsu Hanioka , Hideto Jinno
2. 発表標題 Isoform-specific real-time PCR method for the determination of human bitter taste receptor (TAS2R) transcripts
3. 学会等名 International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 葉子、青木 明、岡本誉士典、磯部隆史、大河原 晋、埴岡伸光、香川(田中)聡子、神野透人
2. 発表標題 Ethyl Ferulate によって惹起される消化管内分泌細胞のCa ²⁺ およびリン酸化シグナル伝達に関する研究
3. 学会等名 フォーラム2020：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 葉子、永井萌子、大河原 晋、磯部隆史、青木 明、岡本誉士典、埴岡伸光、香川(田中)聡子、神野透人
2. 発表標題 フェルラ酸メチルによるTRPA1活性化の種差に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 葉子、永井萌子、河合美樹、大河原晋、磯部隆史、青木 明、植田康次、岡本誉士典、埴岡伸光、香川(田中)聡子、神野透人
2. 発表標題 バニリンおよびその類縁化合物によるTRPA1活性化の種差に関する研究
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金澤 希、大橋和幸、尾前悠斤、大河原晋、森 葉子、磯部隆史、越智定幸、埴岡伸光、神野透人、香川(田中)聡子
2. 発表標題 ヒト気道および肺組織におけるTRPイオンチャネルの発現個体差
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井萌子、森 葉子、大河原晋、磯部隆史、青木 明、植田康次、岡本誉士典、埴岡伸光、香川(田中)聡子、神野透人
2. 発表標題 フェルラ酸およびその類縁化合物によるTransient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) の活性化機序に関する研究
3. 学会等名 フォーラム2019: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河合美樹、香川(田中)聡子、大河原 晋、埴岡伸光、青木 明、岡本誉士典、植田康次、神野透人
2. 発表標題 香料および関連化合物によるTRPA1活性化の種差に関する研究
3. 学会等名 第64回日本薬学会東海支部 総会・大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	香川 聡子	横浜薬科大学・薬学部・教授	
	(Tanaka-Kagawa Toshiko)		
	(40188313)	(32723)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------