

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：34533

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16935

研究課題名（和文）炎症性腸疾患に伴う内臓痛におけるROS感受性TRP受容体の役割

研究課題名（英文）Role of ROS sensitive TRP channels in visceral pain associated with IBD

研究代表者

小暮 洋子 (Kogure, Yoko)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号：60548684

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：炎症性腸疾患は腹痛が慢性的に持続するが、腹痛をコントロールする薬は開発されていない。大建中湯は、腹が冷えて痛み腹部膨満感のあるもの、に適応される漢方薬で、本研究から、好酸球に作用し、炎症性腸疾患に伴う腹痛に対しても有効であることを明らかにした。一方で、既存治療薬であるメサラジンは、好酸球に作用するが腹痛に対する鎮痛効果はないことが明らかとなった。TRPC5及びTRPV3受容体は、物理的・化学的刺激に対するセンサーであり、炎症で増加する酸化ストレス物質によって活性化されることが知られている。本研究から、TRPC5及びTRPV3受容体が炎症性腸疾患に伴う腹痛の発症に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、メサラジンと大建中湯の炎症性腸疾患に対する作用は部分的に異なっていることが明らかとなった。大建中湯とメサラジンを併用することで、炎症性腸疾患に伴う腹痛症状の緩和や症状悪化の予防に効果を発揮できると期待される。また、TRPC5やTRPV3受容体が炎症性腸疾患に関わることを示唆したのは本研究が初めてである。今後の腹痛治療薬の開発においてこれらが新しいターゲットとなり、腹痛治療の進展に貢献できるであろう。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory bowel disease (IBD) chronically persistent abdominal pain and medicines which control the pain are not developed. Daikenchuto is herbal medicine used for abdominal pain, bloating sensation or constipation. We revealed that Daikenchuto effects on eosinophils and also beneficial for the pain associated with IBD. On the other hand, existing medicines 5-aminosalicylic acid (5-ASA) effects on eosinophils but not suppressed abdominal pain. TRPC5 and TRPV3 receptors are sensor for physical and chemical stimulus and it is reported that these receptors are activated by reactive oxygen species increased in IBD. We suggested that TRPC5 and TRPV3 receptors are involved in the onset of abdominal pain accompanied with IBD.

研究分野：神経科学

キーワード：内臓痛 TRP受容体 大腸炎 活性酸素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) は腹痛が慢性的に持続する難治性疾患である。「痛み」は死に直結する病態ではないが、長期間持続する痛みは治療が困難であり、QOL (quality of life; 生活の質) の低下が問題となっている。我々は、痛み受容体として注目されている Transient receptor potential Ankyrin 1 (TRPA1) 受容体が、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) の一つである  $H_2O_2$  によって活性化され、内臓痛を引き起こすことを報告した。近年、TRP 受容体と炎症時に増加する活性酸素の関係について明らかとなり、ROS によって活性化される TRP 受容体として、TRPA1、TRPV1、TRPV3/4、TRPC1/4/5、TRPM2/7 の 9 種類が報告された。

### 2. 研究の目的

IBD における内臓痛の発症に関わる神経や炎症と内臓感覚がどのように関わっているかについては明らかになっていない。本研究では、IBD モデルとして潰瘍性大腸炎モデルおよびクローン病モデルラットを用い、ROS 感受性 TRP 受容体の役割、特に病態による役割の違いを明らかにすることで、IBD に伴う内臓痛発症機序の一端を解明し、新しい治療薬開発のターゲットとなることを目指す。さらに、ROS や TRP 受容体をターゲットとする IBD に伴う内臓痛の新規治療薬の探索を行う。

### 3. 研究の方法

#### 1) IBD モデルラットの作製

7 週齢の雄性 SD ラットを用い、2 種類の IBD モデル動物を作製した。クローン病モデルは、直腸に trinitrobenzen sulfonic acid (TNBS) を投与して作製した。潰瘍性大腸炎モデルは、4% dextran sodium sulfate (DSS) を自由飲水させて作製した。

#### 2) リアルタイム PCR

naive ラットからは脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) および食道、十二指腸、結腸、直腸を摘出した。2 種類の IBD モデルラットからは、モデル作製後 7 日目に、DRG および直腸、結腸を摘出した。9 種類の ROS 感受性 TRP 受容体 (TRPA1、TRPV1、TRPV3/4、TRPC1/4/5、TRPM2/7) についてリアルタイム PCR を行った。

#### 3) Disease Activity Index (DAI) スコア

便の硬さおよび出血量をそれぞれ 0-4 点で評価し、合計点を DAI スコアとした (表 1)。

スコア	便の硬さ	出血量
0	普通	なし
1	間	血便
2	軟便	少量
3	間	中量
4	下痢	大量

#### 4) 大腸伸展刺激による内臓痛の測定

プロポフォル麻酔下で、直腸にバルーンを挿入し、60mmHg の内圧を加え、内臓痛として外腹斜筋の筋電図の変化を観察した。

#### 5) 組織損傷程度の観察

内臓痛測定後、ラットから大腸を取り出し、大腸の長さ及び重さを測定した。HE 染色を行い、炎症細胞の浸潤の程度や炎症細胞数などを観察した。

#### 6) 免疫組織化学染色

naive および 2 種類の IBD モデルラット作製後 7 日目に大腸を摘出し、誘導型 NO 合成酵素 (inducible nitric oxide synthase: iNOS) の免疫染色を DAB 染色により行った。

#### 7) TRPV3 阻害剤の投与

TRPV3 阻害剤として osthole を用いた。TNBS モデル作製 2 日前から連続 3 日間、osthole を 1 日 1 回腹腔内投与し、モデル作製翌日に内臓痛を測定した。

#### 8) TRPC5 阻害剤の投与

TRPC5 阻害剤として AC1903 を用いた。DSS 作製後 7 日目に AC1903 を投与し、1 時間後に内臓痛を測定した。

#### 9) 大建中湯 (DKT) および 5-ASA の投与

TNBS モデルおよび DSS モデル作製後 3 日目から連続 5 日間、1 日 1 回大建中湯または 5-ASA を経口投与した。投与最終日の、投与 1 時間後に、内臓痛を測定した。

#### 10) 活動量の計測

飼育ケージに赤外線センサーを設置し、モデル作製前からモデル作製後 14 日目までの活動量を計測した。

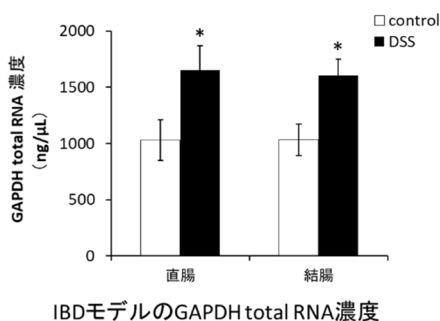
### 4. 研究成果

#### 1) naive および IBD モデルラットにおける ROS 感受性 TRP 受容体の特定

ROS によって活性化することが報告されている TRP 受容体 (TRPA1、TRPV1、TRPV3/4、TRPC1/4/5、TRPM2/7) のうち、大腸に発現しているものを特定した。Naive ラットの大腸では、TRPM2 以外の TRP 受容体が発現していることを確認できた。IBD モデルラットの大腸では、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH の total RNA 濃度が有意に増加する結果となった (図 1)。これは、大腸炎により炎症細胞が大量に増えているためと考えられ、PCR による定量・比較は不可能であることが明らかとなった。そこで、内臓痛の伝導経路である DRG の TRP 受容体発現量を観察した naive

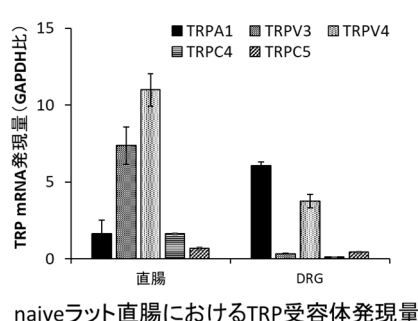
および各モデルラットの DRG において、TRP 受容体が発現していたが、9 種全ての TRP 受容体について、両モデルラットにおける有意な発現変化は認められなかった。

さらに、naive ラットの消化管各部位（食道、十二指腸、結腸、直腸）の発現量を比較した。TRPV3、TRPV4、TRPC4/5 は、結腸や直腸に多く発現していることが明らかとなった（図 2）。



IBDモデルのGAPDH total RNA濃度

図 1

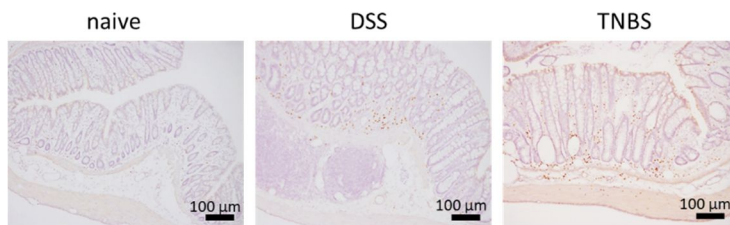


naiveラット直腸におけるTRP受容体発現量

図 2

## 2) IBD モデルラットの大腸における ROS の発現と局在

ROS の一つである iNOS を指標とし、ROS の大腸における発現分布を確認した。naive ラットでは、iNOS の発現はわずかであったが、潰瘍性大腸炎モデルでは、粘膜層に多く発現していた。一方、クローン病モデルでは、粘膜層から筋層に至るまで発現が認められた。炎症部位と iNOS の発現はほぼ一致していることが明らかとなった（図 3）。



IBDモデル大腸におけるiNOS発現量

図 3

## 3) IBD モデル動物における ROS 感受性 TRP 受容体と内臓痛との関連性の検討

TRPV3 および TRPC5 が IBD に伴う内臓痛の発症に関与しているかを確認するため、IBD モデル動物に TRPV3 および TRPC5 の阻害剤を投与し、内臓痛に対する影響を観察した。クローン病モデルラットに TRPV3 阻害剤を 3 日間事前投与したところ、内臓痛が有意に抑制された。また、炎症の指標である体重および DAI スコア、大腸の重さは、TRPV3 阻害剤投与により減少傾向が認められた。これより、TRPV3 は、クローン病の発症に関与することが示唆された。

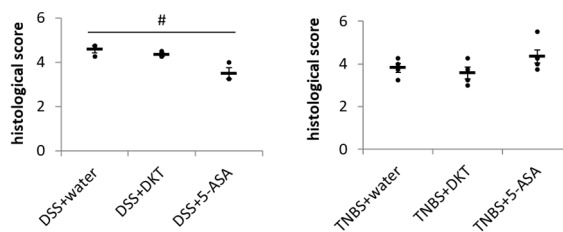
潰瘍性大腸炎モデルラットには、モデル作製後 7 日目に TRPC5 阻害剤を投与した。投与 1 時間後に内臓痛を測定したところ、内臓痛の抑制傾向が認められた。体重および DAI スコア、大腸の重さに対しては影響が認められなかった。これより、TRPC5 は、潰瘍性大腸炎に伴う内臓痛に関与することが示唆された。

## 4) IBD モデル動物の行動変化

IBD モデルの内臓痛の評価方法について、臨床により近い評価方法を検討するため、内臓痛が行動に及ぼす影響を調べた。2 種類の IBD モデルラットを用いて、14 日間の昼夜別の活動量および内臓痛、炎症症状を測定したところ、内臓痛および炎症症状が強い時期には、夜間の活動量が有意に低下した。また、内臓痛と活動量の程度には相関関係も認められた。IBD に伴う内臓痛の評価方法の 1 つとして、夜間の活動量も指標になることが示唆された。

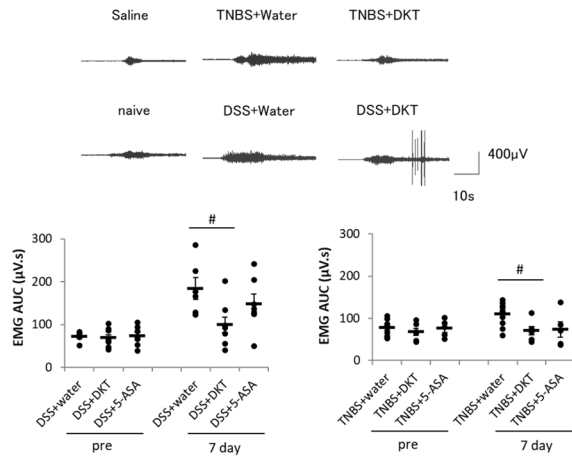
## 5) IBD に伴う内臓痛の新規治療薬の探索

IBD の既存治療薬である 5-ASA および腹痛の治療薬として用いられている漢方薬「大建中湯（DKT）」について、IBD の病態やそれに伴う内臓痛に対する効果を検討するため、2 種類の IBD モデルラットに 5 日間投与し、炎症と内臓痛の程度を評価した。5-ASA は潰瘍性大腸炎モデルの組織損傷を修復したが、クローン病モデルに対しては効果が認められなかった（図 4）。内臓痛は、大建中湯投与により両モデルにおいて有意に抑制されたが、5-ASA では抑制されなかった（図 5）。



IBDモデルの組織損傷に対する大建中湯の効果

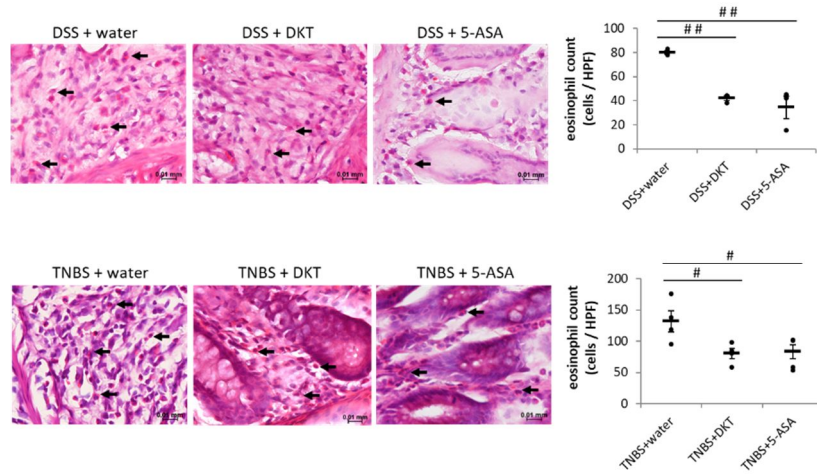
図 4



IBDモデルの内臓痛に対する大建中湯の効果

図 5

また、IBDモデルでは大腸の好酸球数の増加が認められた。両モデルとも、大建中湯および5-ASA投与により好酸球数の増加が有意に抑制された(図6)。大建中湯と5-ASAのIBDに対する作用機序は一部異なっており、併用することで相乗効果が得られると期待される。



IBDモデルの好酸球に対する大建中湯の効果

図 6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoko Kogure, Hirosato Kanda, Shenglan Wang, Yongbiao Hao, Junxiang Li, Satoshi Yamamoto, Koichi Noguchi, Yi Dai	4. 巻 4
2. 論文標題 Daikenchuto attenuates visceral pain and suppresses eosinophil infiltration in inflammatory bowel disease in murine models.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 1146-1154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jgh3.12410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoko Kogure, Hirosato Kanda, Shenglan Wang, Satoshi Yamamoto, Koichi Noguchi, Yi Dai
2. 発表標題 Daikenchuto attenuates visceral pain and suppresses eosinophil infiltration in inflammatory bowel disease in murine models
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------