

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590133

研究課題名（和文） 室内環境中のカルボニル化合物による TRP イオンチャネルの活性化に関する研究

研究課題名（英文） Study on TRP ion channels activation by carbonyl compounds in indoor environments

研究代表者

神野 透人 (JINNO HIDETO)

国立医薬品食品衛生研究所・生活衛生化学部・第一室長

研究者番号：10179096

研究成果の概要（和文）：室内環境化学物質による健康障害の発症メカニズムの解明を目指し、侵害受容器である TRP (transient receptor potential) イオンチャネル発現細胞株を樹立して、ハイスループットアッセイ系を構築した。室内環境中に存在する揮発性有機化合物である limonene 等の主要な酸化生成物である 1-methyl-4-acetylcyclohexene がヒト TRPA1 に対して濃度依存的な活性化を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the mechanism of health problems caused by indoor environments, we established transformants stably expressing the 6 transient receptor potential (TRP) channels, and developed a high throughput assay for the screening the indoor chemicals which activates the TRP ion channels. In this study, we demonstrated that indoor carbonyl compounds such as a limonene oxidation product, 1-methyl-4-acetylcyclohexene activated human TRPA1, which is known to be a sensory neuronal TRP ion channel in airway chemosensation and inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	0	1,500,000
2009 年度	1,100,000	0	1,100,000
2010 年度	1,100,000	0	1,100,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	0	3,700,000

研究分野：衛生化学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：環境衛生学・シックハウス症候群・イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

(1) 室内環境中、特に室内空気中の化学物質に起因すると考えられるシックハウス症候群あるいは Multiple chemical sensitivities (MCS) / 化学物質過敏症などの健康障害の

増加が重要な社会問題となっている。しかし、MCS / 化学物質過敏症として報告されている症候は、粘膜刺激症状、皮膚炎、気管支炎、喘息、循環器症状、消化器症状、自律神経障害、精神症状、中枢神経障害、頭痛、発熱、

疲労感など多彩であり、人が環境中の種々の低濃度化学物質に応答するための(非アレルギー性)機序が十分に解明されていないことと相まって、治療方法はもとより臨床上の診断基準でさえ確定しているとは言い難い。このような状況において、室内空気質健康影響研究会(厚生労働省健康局、平成16年2月)の報告書にも述べられているように、MCS/化学物質過敏症の病態解明や治療法及び予防法確立に必要な「微量化学物質による非アレルギー性の過敏状態」についての研究進展が切望されている。

(2) 近年、ポリモーダル受容器である Transient receptor potential (TRP)イオンチャネルの活性化が MCS/化学物質過敏症の発症に関与する、という興味深い仮説が Washington 州立大学の Martin L.Pall 教授らによって提示された (Pall and Anderson, 2004)。その仮説によれば、中枢及び末梢神経に広範に分布し、MCS/化学物質過敏症患者で応答性が亢進しているという報告もある TRPV1 が Nitric oxide レベルの増加や N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor の活性化を引き起こし、その結果として MCS/化学物質過敏症の発症に至る、というものである。Pall 教授らの説は現時点では単なる仮説の域を出るものではないが、微量の環境化学物質の神経系へのインターフェースとして TRP イオンチャネルを想定した点は画期的であり、実際に Formalin や Paraben で誘発される痛みには TRPA1 イオンチャネルが関与していることや、モノテルペン類によって TRPV3 が活性化されることが相次いで報告されつつある (McNamara et al., 2007; Fujita et al., 2007; Vogt-Eisele et al., 2007)。

2. 研究の目的

- (1) これまでに化学物質刺激に対する応答が報告されている主要な TRP イオンチャネルである TRPV1、TRPV2、TRPV3、TRPV4、TRPA1 及び TRPM8 を対象として、これらの遺伝子のヒト cDNA をクローニングし、哺乳動物細胞で安定的発現系を構築する。
- (2) 樹立した TRP イオンチャネル発現細胞株を用いて、細胞内カルシウムイオン濃度のハイスループットアッセイを実施し、我が国の室内環境中で高頻度もしくは高濃度で検出されるカルボニル化合物を対象として TRP イオンチャネルに対する影響を明らかにする。
- (3) このような一連の研究を通して、室内環境化学物質の神経系へのインターフェースとしての各 TRP イオンチャネルの役割を明らかにするとともに、末梢神経への侵害刺激を引き起こす室内環境中のカルボニル化合物を同定する。

3. 研究の方法

- (1) 6種類のヒト TRP イオンチャネル(TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1, TRPM8) cDNAs を GATEWAY Directional TOPO クローニング法によりクローニングし、哺乳動物細胞(HEK 293)で一過性に発現させてイオンチャネルとして機能することを確認したのちに、Flp-In System による安定的発現細胞株を樹立した。
- (2) 樹立した TRP イオンチャネル発現細胞株を用いて、FlexStation による細胞内カルシウムのハイスループットアッセイを実施した。蛍光プローブとしては FLIPR Calcium 4 Assay Kit 並びに FLIPR Calcium 5 Assay Kit を使用した。
- (3) 被験物質としたテルペン類とオゾンの反応によって生じるカルボニル化合物 (Pinonaldehyde、4-Acetyl-1-methylcyclohexene) は試薬として市販されていないため、合成したものを使用した。

4. 研究成果

(1) TRP イオンチャネル安定発現細胞株の樹立

TRPV1、TRPV2、TRPV3、TRPV4、TRPA1 及び TRPM8 を対象として、Human Dorsal Root Ganglion Total RNA 及び Human Skin Total RNA から RT-PCR によって各 TRP イオンチャネル遺伝子の cDNA をクローニングし、組換え反応により染色体上の同一部位に目的遺伝子を導入できる Flp-In System を用いて、TRP イオンチャネルを安定的に発現する哺乳動物細胞株を樹立した。

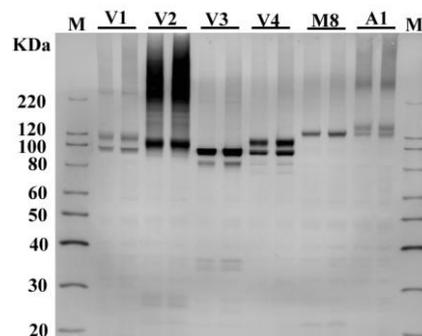


図 1 Protein expression of human transient receptor potential (TRP) ion channels in Flp-In 293 cells.

なお、本研究で樹立した細胞株について、Western blot でタンパク質レベルでの発現を確認し(図 1)、各イオンチャネル TRPV1、TRPV2、TRPV3、TRPV4、TRPA1 及び TRPM8 のそれぞれについてその代表的な Agonist である Capsaicin、Cannabidiol、Camphor、

4 α -Phorbol-12,13-Didecanoate、Cinnamaldehyde、及び Menthol によるカルシウムイオンの細胞内流入を指標に、イオンチャネルとして機能することを確認した。

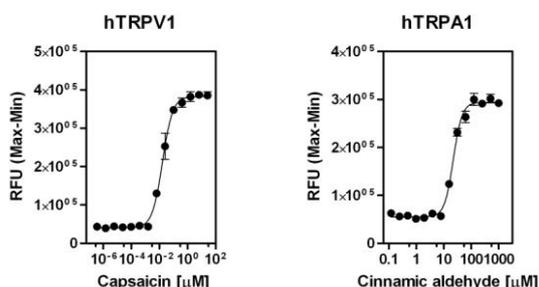


図2 Activation of human TRPV1 and TRPA1 by representative agonists capsaicin and cinnamic aldehyde, respectively.

樹立した TRPV1 及び TRPA1 安定発現細胞株について、それぞれの典型的な活性化物質 Capsaicin (TRPV1) 及び Cinnamic aldehyde (TRPA1) による活性化を蛍光プローブとして FLIPR Calcium 4 を用いて評価した結果を図 2 に示す。Capsaicin 及び Cinnamic aldehyde による活性化の濃度依存性を調べた結果、それぞれの EC₅₀ 値はこれまでに報告された値に匹敵する値であった。以上の結果から、樹立したヒト TRPV1 及び TRPA1 細胞株を用いる評価法は、これらイオンチャネル活性化物質をスクリーニングする方法として有用であることが確認された。

(2) 微生物由来揮発性有機化合物による TRP イオンチャネルの活性化

喘息や気道過敏症の発症及び増悪に深く関与することが示されている TRPV1 及び TRPA1 に関して、構築したアッセイ系を用いて実際に室内環境中に存在し、シックハウス症候群発症の重要な一要因であることが指摘されている微生物由来揮発性有機化合物 (microbial volatile organic compounds ;MVOC)、及び水の塩素消毒に伴って生じる消毒副生成物についてそれら化合物による活性化能を評価した。

図 3 は、MVOC として知られる 3-Octanone 及び 1-Octen-3-one による TRPV1 並びに TRPA1 の活性化の程度を、それぞれの陽性対象化合物 (TRPV1; Capsaicin, TRPA1; Cinnamic aldehyde) による活性化に対する割合で示したものである。1-Octen-3-one 及び程度は弱いながら 3-Octanone が TRPV1 及び TRPA1 を濃度依存的に活性化することが明らかになった (図 3)。1-Octen-3-one による TRPA1 活性化の EC₅₀ 値は 9.7 μ M と極めて小さい値であり、これは典型的な TRPA1 活性

化物質である Allyl isothiocyanate や Acrolein で報告されている EC₅₀ 値にほぼ匹敵する値であった。

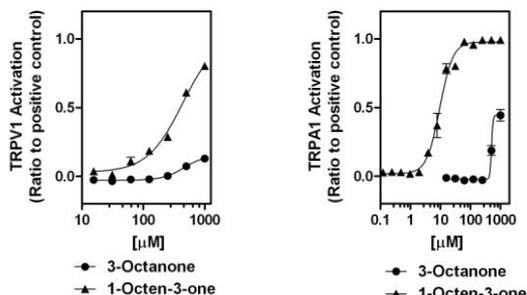


図3 Activation of human TRPV1 and TRPA1 by microbial volatile organic compounds, 3-octanone and 1-octen-3-one.

Mizuno ら (2005) は一般室内での存在が確認されている 5 種類の真菌から放散される化学物質について定性及び定量的解析を実施し、検討したすべての菌種から放散される主要な化合物として、3-Octanone 及び 1-Octen-3-ol を検出している。1-Octen-3-one は 1-Octen-3-ol の酸化生成物であり、また、ある種の真菌から 1-Octen-3-one 自身が放散されることが報告されている (Jurjevic et al., 2008)。真菌等の微生物による室内環境汚染を考える上で、室内空气中に孢子状態で存在する真菌が、それ自身アレルゲンとして鼻炎等のアレルギー疾患を引き起こすのみならず、本研究結果から、微生物の代謝の過程で放散する 3-Octanone 及び 1-Octen-3-one 等の揮発性の有機化合物が TRP イオンチャネルの活性化を介して、直接皮膚や気道等の粘膜を刺激する可能性も考えられる。

(3) 塩素消毒に伴って生じるカルボニル化合物による TRP イオンチャネルの活性化

水の塩素消毒に伴って生じる消毒副生成物の中でカルボニル化合物である 1,3-Dichloro-2-propanone、1-Chloro-2-propanone、1,1,3-Trichloro-2-propanone、1,1-Dichloro-2-propanone について、ヒト TRPV1 及び TRPA1 に対する活性化能を評価した。図 4 は、これら化合物による TRPA1 の活性化の程度を、陽性対象化合物・Cinnamic aldehyde による活性化に対する割合で示したものである。図 4 に示すように、評価した 4 化合物すべてが濃度依存的にヒト TRPA1 を活性化することが判明した。作用の強さを EC₅₀ 値で比較した場合、1,3-Dichloro-2-propanone が最も低く 10 μ M であり、1-Chloro-2-propanone (20 μ M)、1,1,3-Trichloro-2-propanone (110 μ M)、

1,1-Dichloro-2-propanone (490 μM) の順であった。尚、ヒト TRPV1 に対してはこれら化合物による活性化は認められなかった。

これまでに、塩素消毒された室内プールの定期利用が学童において喘息等の気道疾患のリスクを高めるとの報告 (Nickmilder and Bernard, 2007) や、次亜塩素酸によって TRPA1 が活性化されること、さらに TRPA1 欠損マウスでは次亜塩素酸や過酸化水素のようなオキシダントによる呼吸抑制が起こりにくいことから、TRPA1 は気道感覚神経における主要なオキシダントセンサーである可能性が示されている (Bessac et al., 2008)。著者らは、既に屋内遊泳プールや公衆浴場の施設内空気中にハロアセトニトリル類などの消毒副生成物が存在することを明らかにしており、これら化合物が TRPA1 の活性化を介して気道過敏性を亢進させる可能性も考えられる。

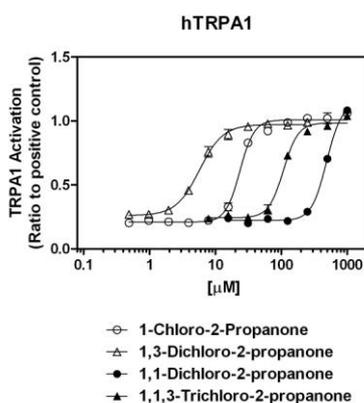


図 4 Activation of human TRPA1 by disinfection by-products.

(4) テルペン類酸化生成物による TRP イオンチャネルの活性化

室内環境中の主要な揮発性有機化合物である α -Pinene や Limonene 等の酸化生成物について、TRP イオンチャネルの活性化能を評価した。尚、アッセイに用いる蛍光指示薬としては、高感度蛍光プローブとして本研究の最終年度に入手可能になった FLIPR Calcium 5 (Molecular Devices 社) を使用して、TRP イオンチャネルに対する Assay Medium 中の Quencher の影響などについて検討を行う等アッセイ系の最適化を図るとともに、既に実施したアッセイ結果との整合性を確認し、より一層精度の高いハイスループットアッセイ系を構築した。

図 5 は Pinene の主要な酸化生成物である Pinon aldehyde 並びに Limonene の主要な酸化生成物である 1-Methyl-4-acetylcyclohexene によるヒト TRPV1 及びヒト TRPA1 活性化の程

度を、それぞれの陽性対象化合物 (TRPV1; Capsaicin, TRPA1; Cinnamic aldehyde) による活性化に対する割合で示したものである。

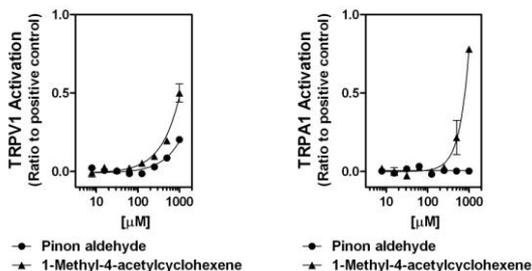


図 5 Activation of human TRPV1 and TRPA1 by terpene oxidation products, pinon aldehyde and 1-methyl-4-acetylcyclohexene.

TRPV1 については活性化の程度は弱いものの 1-Methyl-4-acetylcyclohexene による濃度依存的な活性化が認められた。また、Pinon aldehyde に関しては今回評価した最高濃度である 1000 μM で処理した場合に、陽性対象化合物である Capsaicin 処理の約 20% の活性化が認められた。ヒト TRPA1 に対しては 1-Methyl-4-acetylcyclohexene が濃度依存的な活性化を引き起こすことが明らかになった。このようなテルペン類は建材や家具などの木材、あるいは消臭・芳香剤から放散されて室内環境を汚染するが、その酸化生成物にはより刺激性の強い性質を有するものが存在し、シックハウス症候群の発症、あるいは増悪に関与している可能性も示唆されている。本研究結果は、Limonene の酸化生成物が TRPA1 の活性化を介して気道過敏性を亢進させる可能性があることを示すものであり、これらの結果は室内環境化学物質による健康障害のメカニズムを説明する上で重要な知見である。

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 2 件)

- ① Ohkawara, S., Tanaka-Kagawa, T., Furukawa, Y., Nishimura, T., Jinno, H. : Activation of the Human Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 by Essential Oils, Biol Pharm. Bull., 査読有, Vol. 33, 2010, 1434-1437.
- ② Ohkawara, S., Tanaka-Kagawa, T., Furukawa, Y., Nishimura, T., Jinno, H.: Development of a SYBR Green Real-time Polymerase Chain Reaction Assay for Quantitative Detection of Human

N-methyl-D-aspartate Receptors Subtype 1
Splice Variants, J. Health Sci., 査読有, Vol.
56, 2010, 527-533.

〔学会発表〕(計7件)

- ① 香川(田中)聡子、他6名、和精油によるヒト冷刺激/侵害刺激受容体 TRPA1の活性化、日本薬学会第129年会、2009.3.26、京都
- ② 大河原 晋、他5名、糖化反応中間体によるヒト TRPA1 イオンチャネルの活性化、日本薬学会第129年会、2009.3.28、京都
- ③ 神野透人、他5名、微生物由来揮発性有機化合物による侵害刺激受容体 TRPA1 及び TRPV1 の活性化、日本薬学会第130年会、2010.3.28、岡山
- ④ 香川(田中)聡子、他5名、消毒副生成物によるヒト侵害刺激受容体 TRPA1 及び TRPV1 の活性化、日本薬学会第130年会、2010.3.28、岡山
- ⑤ 神野透人、他4名、ハロアセトニトリル類によるヒト侵害刺激受容体 TRPA1 及び TRPV1 の活性化、第37回日本トキシコロジー学会学術年会、2010.6.18、沖縄
- ⑥ 香川(田中)聡子、他4名、Microbial Volatile Organic Compounds によるヒト侵害刺激受容体 TRPA1 及び TRPV1 の活性化、第37回日本トキシコロジー学会学術年会、2010.6.18、沖縄
- ⑦ 香川(田中)聡子、他4名、室内環境化学物質による TRP イオンチャネルの活性化、第19回日本臨床環境医学会学術集会、2010.7.2、東京都

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

神野 透人 (JINNO HIDETO)

国立医薬品食品衛生研究所・生活衛生化学
部・第一室長

研究者番号：10179096

(2)研究分担者

香川 聡子 (KAGAWA TOSHIKO)

国立医薬品食品衛生研究所・生活衛生化学
部・主任研究官

研究者番号：40188313

(3)研究協力者

大河原 晋 (OHKAWARA SUSUMU)

武蔵野大学・薬学部・講師

研究者番号：20409387