

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：82675

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02667

研究課題名(和文) TRPチャンネル/ANO1複合体の生理的意義・構造の解明とヒトへの応用

研究課題名(英文) Physiological significance and structure of TRP channel/ANO1 complex, and its clinical application

研究代表者

富永 真琴 (Tominaga, Makoto)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(機構直轄研究施設)・生命創成探究センター・教授

研究者番号：90260041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：(1) マウス脳のミクログリアがTRPV4で脳内の温かい温度を感知して運動を亢進させている。(2) 蚊やマウスの唾液がTRPV1, TRPA1機能を阻害して鎮痛効果をもたらす。(3) マウスの温度依存性行動をThermal Gradient Ringで解析した。(4) 温帯と熱帯の蚊のTRPA1のアミノ酸比較から温度感知に関わるアミノ酸を同定した。(5) TRPV3が表皮ケラチノサイトで温かい温度感知に関わっている。(6) TRPV4とanocetamin1の機能連関が発汗に関わっている。(7) TRPV1とanocetamin1の機能連関が炎症性疼痛の発生に関わる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの動物種の温度感受性TRPチャンネルが生物のさまざまな温度依存性活動に関わっていることを明らかにした。そして、温度感受性TRPチャンネルの温度感知機能の構造基盤の一部を明らかにした。それは、以下のことにつながる。(1) 新たな鎮痛薬の開発、(2) 身体中の細胞、組織が温度を感知しているという新しい概念の創出、(3) Thermal preferenceとthermal avoidanceが異なることの説明、(4) 新たな制汗剤の開発。温度生物学に多くの新知見が加わった。

研究成果の概要(英文)：We have found several new things regarding the structure and function of thermosensitive TRP channels.

1. We found the temperature-dependent movement of mouse brain microglia with TRPV4. 2. We found that saliva from mouse and mosquito inhibits TRPV1 and TRPA1, causing antinociception in mice. 3. We analyzed temperature-dependent behaviors of mice including ones lacking thermosensitive TRP channels with Thermal Gradient Ring. 4. We identified several amino acids in mosquito TRPA1 involved in the determination of activation temperature thresholds. 5. We concluded the involvement of TRPV3 in skin keratinocytes in ambient temperature detection in mice. 6. We found that the TRPV4/anocetamin1 interaction is involved in perspiration in mice. 7. We found that the TRPV1/anocetamin1 interaction is involved in inflammatory pain.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：TRPチャンネル ANO1複合体 カルシウム

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

温度感受性 TRP チャンネルは非選択性陽イオンチャンネルとして機能し、神経細胞では陽イオンの流入が脱分極から電位作動性 Na^+ チャンネルの活性化を引き起こして神経細胞の興奮を惹起する。一方、高い Ca^{2+} 透過性による多くの Ca^{2+} 流入は、 Ca^{2+} 結合蛋白質を介した機構も含む幅広い Ca^{2+} 依存的な細胞内応答につながる。特に、非興奮性細胞での TRP チャンネルの活性化は Ca^{2+} 流入の意義が大きい。私たちは、2014 年にマウス脳の脈絡叢上皮細胞において、TRPV4 が ANO1 と複合体を形成して機能連関することを報告し、脈絡叢上皮細胞からの脳脊髄液分泌に関わること (*FASEB J.* 2014)、唾液・涙分泌に関わること (*FASEB J.* 2018) を報告した。中枢神経細胞での Cl^- チャンネル GABA_A 受容体の活性化による Cl^- イオンの流入による過分極とは対照的である。この Ca^{2+} 透過性の高い TRP チャンネルと ANO1 の機能連関は両分子が共発現する細胞で広く認められ、 Cl^- の移動方向は単純にそれぞれの細胞での Cl^- の平衡電位と膜電位の関係で規定されるモデルを提唱した (*Channels* 2014)。さらに、この TRP チャンネルと ANO1 の複合体形成による機能連関が感覚神経でも起こっていることを報告した (*P.N.A.S.* 2015)。感覚神経では侵害刺激感知に関わるカプサイシン受容体 TRPV1、ワサビ受容体 TRPA1 と ANO1 が複合体を形成して、TRPV1, TRPA1 を通って流入した Ca^{2+} が ANO1 を活性化することで Cl^- が流出して更なる脱分極を引き起こされることを明らかにしたのである。これは、痛み増強の全く新しいメカニズムであり、この機能連関あるいは ANO1 を阻害する化合物が新たな鎮痛・鎮痒薬の開発につながることを意味する。事実、化合物をスクリーニングすることによって、TRPV1, TRPA1, TRPM8, ANO1 のいずれの機能も阻害する化合物 4 イソプロピルサイクロヘキサノールを発見して (*Sci. Rep.* 2017)、特許出願を行った (出願番号: 2017-158822)。こうした成果から、私たちはこの複合体機能制御が疾患治療に寄与すると考え、その全容を明らかにし、複合体形成の構造基盤を明らかにしようと考えた。そのために、ANO1 と複合体を形成する TRP チャンネルの種類を増やし、それらの生理学的意義を明らかにすることを計画した。多くの動物種から TRP チャンネル遺伝子をクローニングしていることから、この複合体形成の進化における重要性の解明にも迫ることができ、種による作用の差異からも複合体形成の構造基盤を同定できると考えた。そして、化合物スクリーニング、in silico analysis で複合体阻害剤、ANO1 阻害剤の同定を目指して、ヒトへの臨床応用までも視野に入れることにした。

2. 研究の目的

こうした複数の TRP チャンネルが ANO1 の複合体を形成して生理機能を担う事実をもとに、この「TRP チャンネルと ANO1 の複合体形成で TRP チャンネルが関わる多くの生理学的現象を説明できるか？」を明らかにすることを第 1 の目的とする。また、「TRP チャンネルと ANO1 の機能連関の生理学的意義は細胞種と発現する TRP チャンネルの種類で規定されるか？」も明らかにする。これまでに口腔内粘膜に発現する TRPV3 の活性化による Ca^{2+} 流入が細胞増殖因子活性化から創傷治癒促進を引き起こすことを報告した (*FASEB J.* 2015) が、TRPV3 と ANO1 がヒト表皮ケラチノサイト (Normal Human Epidermal Keratinocyte) で機能連関して wound healing を促進することを明らかにしている。この事実は、TRPV3 を介して流入した Ca^{2+} が細胞増殖因子活性化とは異なるメカニズムで細胞の増殖あるいは移動を制御することを意味する。一方、TRPM8 は感覚神経に加えて前立腺癌で強く発現することが知られており、TRPM8 はアンドロゲンによっても活性化する。また、ANO1 は癌細胞で発現が増強して癌細胞の増殖能の増大や転移に関わることが分かっている。そこで、TRPM8/ANO1 複合体が前立腺癌の病態にいかに関わるかを明らかにしたい。こうした実験によって、個々の細胞に発現する TRP チャンネルの種類と ANO1 によってその細胞での TRP/ANO1 の機能連関の意義が規定されると考えることができる。

TRPV1, TRPA1, TRPV4 と ANO1 の機能連関を報告してきたが、この複合体形成 (共免疫沈降法および Duolink Assay で確認している) の構造基盤を明らかにするためには、TRP チャンネルと ANO1 の複合体形成に関わるアミノ酸残基あるいはモチーフの同定が欠かせない。「TRP チャンネルと ANO1 の複合体形成の構造基盤は何か？」である。そのために、どの TRP チャンネルが ANO1

と機能連関するのを見極める必要がある。上述のように、TRPM2, TRPM8, TRPV3 も ANO1 と機能連関することを示す予備的データを得ている。また、TRPV2 との機能連関は今のところ確認できてない。そこで、ANO1 と複合体を形成する TRPV1, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM8, TRPA1 と形成しない TRPV2 のアミノ酸比較・キメラ体解析・点変異体解析から、TRP チャネルと ANO1 の複合体形成に関わるアミノ酸残基あるいはモチーフの同定を目指す。上述のように、上皮細胞では ANO1 を介した Cl⁻流出が水チャネルを介した水の移動を駆動する。Cl⁻の移動には電気的中性の法則から、K⁺と一緒に移動しなければならないが、K⁺チャネルの分子実態は明らかでない。そこで、ANO1 と機能連関する分子の同定を目指す。その候補として TRP チャネルを介して流入した Ca²⁺によって活性化される Ca²⁺活性化 K⁺チャネルである KCa3.1, KCa2.1, KCa1.1 を候補として考えており、その関与を解析する。TRP チャネルを介して流入した Ca²⁺が 2 つの「Ca²⁺結合蛋白質」(Ca²⁺活性化 Cl⁻チャネルと Ca²⁺活性化 K⁺チャネル)と Ca²⁺依存的な機能ドメインを形質膜に形成するモデルを想定している。

「TRP チャネルと ANO1 の複合体形成阻害あるいは機能阻害はヒトでの臨床応用につながるか？」も明らかにする。TRPV4, TRPV1, TRPA1 の ANO1 との機能連関の生理学的意義を既に報告しているが、新たに解明する TRPM2, TRPV3, TRPM8 と ANO1 の機能連関の生理学的意義に加えて、その臨床応用を目指す。その対象としてまず、発汗と鎮痛を選択する。ヒトでは体温調整性発汗、味覚性発汗に加えて手掌や腋窩でよく観察される緊張による精神性発汗がある。発汗過多を訴える患者に対して今のところアルミニウム製剤（汗管を塞ぐと考えられている）、腋窩交感神経節焼却以外によい治療法はなく、新規の制汗剤開発が望まれている。私たちは既に TRPM8 活性化物質 menthol が TRPV4, ANO1 の機能をもとに阻害することを見いだしており、menthol で「汗が引く」現象が TRPM8 活性化による冷涼感ではなく、実際に発汗を抑制して起こっていると考えている。事実、無汗症患者の汗腺で TRPV4 の発現が著しく減弱しているのを観察している。そこで、ヒトでの TRPV4/ANO1 複合体の発汗への関与を検証するとともに、マウス汗腺での TRPV4/ANO1 複合体の発現及び機能を解析する。マウスも足底に温度依存性発汗を起こすことを観察している。手掌の発汗は摩擦力の増大からグリップ力を生み出すもととなっている。

私たちは、感覚神経において TRPV1/ANO1 または TRPA1/ANO1 複合体が機能し、TRPV1 または TRPA1 を介して流入した Ca²⁺が ANO1 を活性化して Cl⁻流出からさらなる脱分極をもたらすことを明らかにした (*P.N.A.S.* 2015)。TRPV1 の遺伝子クローニングから 23 年になるが、未だ TRPV1 を標的とした鎮痛薬はない。TRPV1/ANO1 または TRPA1/ANO1 の機能連関は侵害刺激による痛み感覚増強の全く新しいメカニズムであり、既存の ANO1 阻害剤が鎮痛薬として機能することを示して大きな注目を浴びた。さらに、ANO1 阻害剤スクリーニングによって同定した比較的単純な構造の化合物 4 イソプロピルサイクロヘキサノールが意外なことに TRPV1, TRPA1, TRPM8, TRPV4 の機能をも阻害することを見いだした (*Sci. Rep.* 2017)。タクロリムス (FK506) はアトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー疾患患者に対して免疫抑制剤として、経皮吸収薬あるいは点眼薬として使用されているが、灼熱感・痛みを主とした副作用が患者を悩ませる。代表者はこの灼熱感・痛みが TRPA1 を活性化して起こることを明らかにした (*J. Physiol. Sci.* 2019)。この TRPA1 を介した疼痛は上述のように ANO1 の活性化によって増強することから、ANO1 阻害は TRPA1 が関わる疼痛の緩和に有効であり、皮膚や角膜といった局所投与であれば ANO1 阻害による副作用は起こりにくいと予想され、新たな化学物質ライブラリーによる TRPA1 or TRPV1/ANO1 複合体形成阻害剤、ANO1 阻害剤のスクリーニングを行う。経皮薬、点眼薬への成分追加は比較的容易であると推察される。

3. 研究の方法

TRPM2, TRPV3, TRPM8 がそれぞれ ANO1 と複合体を形成してどのような生理機能に関与するかを明らかにする。このために、それぞれ脳内ミクログリア、表皮ケラチノサイトと前立腺癌細胞を用いる。(1) 脳内ミクログリアでは、細胞膜における Cl⁻移動がいかに細胞運動に関わるかが興味深い課題である。(2) 表皮ケラチノサイトでは、TRPV3 と ANO1 が複合体を形成して細胞内 Cl⁻濃度依存的に p38, JNK のリン酸化を制御して cell cycle の調節から wound healing のスピード

を規定することを示す予備的な結果を得ている。(3)Ca²⁺活性化 K⁺チャネルが ANO1 と複合体を形成して Cl⁻移動に伴って起こる K⁺移動を担っていると考えており、候補として KCa3.1, KCa2.1, KCa1.1 を挙げている、すでに、遺伝子を得ており、HEK293 細胞を用いた強制発現系と上皮細胞でパッチクランプ法を用いた電気生理学的解析と共免疫沈降法および Duolink Assay 含めた生化学的解析を行って証明する。(4)TRPM8/ANO1 複合体解析にはヒト前立腺癌細胞株 LNCaP を用いた解析を始めた。

TRPV1, TRPA1, TRPV4, TRPV3, TRPM2, TRPM8 と ANO1 との複合体形成に関わるアミノ酸・モチーフ構造をアミノ酸比較・キメラ解析・点変異体解析から明らかにする。この6つのチャネル蛋白質構造は低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析から明らかになっており、共同研究による *in silico* アプローチも行う。

広く使われて安全性が確認されている menthol が発汗に関与する TRPV4, ANO1 の両方を阻害することを発見しており、ヒトの指定難病である特発性後天性全身性無汗症で TRPV4 の発現が著しく減弱していることを確認している。そこで、ヒトを対象として人工気候室(愛知医科大学)で全身での発汗量を、ヨードデンブロン反応を用いたミノール法で検討し、menthol の効果を検討する。所属機関での倫理に関する審査申請書「メントールによる発汗制御の検討」は既に承認を受けている。京都大学化学研究所が所有する小分子化合物ライブラリーを用いて TRPV4, ANO1 の阻害効果を検討して(両蛋白質を発現させた HEK293 細胞で)、その個体レベルでの効果をマウス、さらにヒトで検証する。TRPV1, TRPA1/ANO1 複合体の機能阻害を目的としては、すでに4イソプロピルサイクロヘキサノールの有効性を報告しており、鎮痛作用、鎮痒作用に関して特許「活性抑制剤および皮膚感覚過敏抑制剤」(特願 2017-158822)出願済みである。上記小分子化合物ライブラリーを用いた複合体形成阻害薬のスクリーニングで得られた化合物に関して、その個体レベルでの効果をマウス、さらにヒトで検証したい。さらに、上記実験で明らかになった複合体形成に関わる部位に作用する化合物探索を共同研究による *in silico* アプローチで行う。

4. 研究成果

(1) マウス脳から調整したミクログリアの移動を 33 度(低温)、37 度(正常体温)、40 度(発熱時の体温)で観察すると、温度が高くなるほどミクログリアの移動距離が長くなることが分かった。マウスの脳内ミクログリアに温度感受性 TRPV4, TRPM2 の遺伝子発現および機能的発現が観察された。TRPV4 欠損マウスの脳ミクログリアでは温度上昇に伴うミクログリア移動距離の増大が消失していた。マウス脳で *in vivo* で観察し(37 度と 32 度)、ミクログリアの突起の運動に温度依存性が観察され、その変化は TRPV4 欠損マウスでは消失していた。よって、マウスの脳内のミクログリアは温度感受性 TRPV4 チャネルを使って脳内の温度を感知して運動し、神経の機能を監視・調節していると考えられた(P.N.A.S. 2021)。

(2) 蚊の無痛性穿刺に関する唾液の関与を検討した。蚊の唾液は濃度依存的にヒト TRPV1, TRPA1 の機能を抑制した。また、マウスの唾液もマウス TRPV1, TRPA1 の機能を抑制したことから、唾液の TRPV1, TRPA1 に対する効果は普遍的であろうと考えられた。シアロルフィンが濃度依存的にヒト TRPV1, TRPA1 の機能を抑制した。マウスにカプサイシンやワサビ成分アリルイソチオシアネートを投与しての痛み関連行動が蚊唾液やシアロルフィンで抑制された。よって、蚊やマウスの唾液が痛みセンサーの TRPV1, TRPA1 の機能を阻害して鎮痛をもたらしていると結論された。ヒトを含む多くの動物がけがをしたときに傷口を舐めるが、その理由の一つは唾液による鎮痛かもしれない(Pain 2021)。

(3) マウスの温度依存性行動はこれまで、後肢の下からレーザー熱刺激を与えるプランターテストや高温のプレート上での逃避行動を観察するホットプレートテストで行われてきた。また、温度グレイディエントがある装置でも、直線型のものが使われ、マウスが端を好む性質の影響を除外できなかった。プランターテストやホットプレートテストは痛み熱刺激への逃避行動を観察するがマウスの温度嗜好性は解析できなかった。そこで、ドーナツ型のプレートで自在に温度勾配をもたせる Thermal Gradient Ring を使い、滞在時間、移動スピード等の複数のパラメータを解析することで温度マウスの温度忌避行動と温度嗜好性を詳細に解析した。野生型マウスと TRP

チャンネルの欠損マウス (TRPV1, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM8, TRPA1) を用いた。 (*J. Physiol. Sci.* 2022)

(4) 熱帯の蚊 TRPA1 は 32-34 度の、温帯の蚊 TRPA1 は約 22 度の活性化温度閾値を有する。熱帯に生息するネッタイシマカと温帯に生息するアカイエカの TRPA1 のアミノ酸配列の比較から活性化温度閾値の決定に関わるアミノ末端アンキリンリピートドメインの 2 つの電荷アミノ酸を同定した。熱帯の蚊 TRPA1 ではこのグルタミン酸とアルギニンの間で塩橋が形成され、構造の熱耐性もたらされていると考えられた (*J. Biol. Chem.* 2022)。

(5) 皮膚表皮細胞には温かい温度を感知する TRPV3 と TRPV4 が発現しているが、それらが感知した情報が脳まで伝わっているかは明らかではなかった。TRPV3 ともう一つの膜蛋白質 TMEM79 を HEK293T 細胞に共発現させると 2APB による TRPV3 電流が小さくなることが分かった。生化学的な解析で、TRPV3 が TMEM79 と形質膜で結合して、TRPV3 を細胞内へ移動させていることが分かった。細胞質内へ移動した TRPV3 はリソゾームで分解された。それと一致して TMEM79 を欠損するマウスの皮膚表皮細胞では TRPV3 の電流が大きかった。Thermal Gradient Ring を用いたマウスの温度依存性行動解析で、TMEM79 欠損マウスはよりすばやくより温かい温度帯に移動することが分かった。これは、マウスの皮膚表皮細胞に発現する TRPV3 が温かい温度を感知して行動を起こしていることを意味する (*Nat. Commun.* 2023)。

(6) TRPV4 とカルシウム活性化クロライドチャンネル anoctamin 1 (ANO1) はさまざまな細胞での水分布に関わっていることを報告してきた。マウス足底の汗腺腺房細胞でも TRPV3, ANO1, 水チャンネルの共発現を観察し、機能も確認した。マウス足底でミノールデンブロン反応による発汗を解析したところ、野生型マウスでは外気温依存的な発汗増大を観察したが、TRPV4 欠損マウスではそれがなかった。マウス足底での発汗の生理的意義は摩擦力の増大にあると考えて、マウスがツルツルの坂を登れるかどうか観察したところ、TRPV4KO マウスでは坂を登る成功率が有意に低かった。よって、マウス足底でも温度依存的な発汗があり、それに TRPV4, ANO1, 水チャンネル複合体が関わっていることが明らかになった (*eLife* 2024)。

(7) TRPV1 とカルシウム活性化クロライドチャンネル anoctamin 1 (ANO1) の機能連関は侵害刺激の増強に関わっている。PKC で刺激すると TRPV1 を介して流入したカルシウムによって活性化した ANO1 の電流が著しく増大した。PKC で炎症状態をミミックすると、ANO1 電流は低濃度のカプサイシン刺激や体温程度の温度刺激で大きな ANO1 電流を生じさせた。これは、TRPV1/ANO1 機能連関が炎症性疼痛にも関わっていることを示している (*Pain Res.* 2024)。

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 Yamanoi Y, Lei J, Takayama Y, Hosogi S, Marunaka Y, Tominaga M.	4. 巻 6:88
2. 論文標題 TRPV3-ANO1 interaction positively regulates wound healing in keratinocytes.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Comms. Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-023-04482-1	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3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富永 真琴
2. 発表標題 TRPチャンネルを介した温度受容のメカニズムと生体反応
3. 学会等名 第56回現代医療鍼灸臨床研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 富永 真琴
2. 発表標題 温度感受性TRPチャンネルを介した温度感知のメカニズムと生理機能
3. 学会等名 自動車技術シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 富永 真琴
2. 発表標題 上皮におけるTRP Familyの役割
3. 学会等名 Scientific Exchange Meeting（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

自然科学研究機構 生命創成探究センター 温度生物学研究グループ（生理学研究所 細胞生理研究部門）
<http://www.nips.ac.jp/cs/>

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