

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380160

研究課題名(和文) 侵害受容体を介した病態痛発生の分子機構の解明と痛覚評価モデル系の確立

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of pathophysiological pain via nociceptive channels and establishment of pain-evaluating system

研究代表者

太田 利男(OHTA, Toshio)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：20176895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：痛みを受容する侵害受容チャネル遺伝子を種々の動物種からクローニングし、異所性発現させることにより、これら受容体の調節機構を明らかにするための痛覚評価系を確立した。これらの実験系を用いて、TRPV1チャネルのカプサイシン感受性部位を同定した。変温動物である両性類のTRPA1チャネルは哺乳類とは異なり、熱感受性を担うことを見出した。更に、マウスやヒトTRPA1チャネルの解析により、環境化学物質であるカドミウムや生体内ガスメッセンジャーである硫化水素によるTRPA1活性化の分子機構を明らかにした。加えて、哺乳類TRPA1遮断薬の作用点をアミノ酸レベルで明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We cloned cDNA encoding nociceptive channels from amphibian and chicken and constructed expression vectors. We established nociception-evaluating system for elucidation of the pathophysiological significance of these receptors. Using this system, we found that the recognition sites for capsaicin, a pungent compound for TRPV1. Functional expression and characterizing of *X. tropicalis* TRPA1 revealed that amphibian TRPA1 showed heat sensitivity in contrast to homeothermic homologues. By analyzing human and mouse TRPA1s, Cadmium, an environmental irritant and hydrogen sulfide, an endogenous inflammatory gas messenger, could activate TRPA1 channel resulting in elicitation of acute pain. We identified amino acid residues regarding these chemical sensitivities by mutagenetic studies. These data suggest that nociceptive TRP channels are important molecule especially for inflammation-induced pathophysiological pain.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：薬理

### 1. 研究開始当初の背景

痛みの信号は極めて複雑な神経系を介して伝達される。急性痛は生体の警告系としての役割を果たすが、慢性痛などの病態痛はそれ自体が生体に悪影響を及ぼす。痛みは化学的、温度、機械的な侵害性刺激により末梢に発現している侵害受容器を介して伝えられる。様々な病態痛が知られているが、その分子基盤や発現機構は十分に解明されていない。近年、知覚神経細胞や感覚神経に発現する非選択的陽イオンチャネルである TRP チャネル群のうち唐辛子辛み成分のカプサイシンで活性化する TRPV1 及びワサビの辛味成分や刺激性化学物質及び冷刺激で活性化する TRPA1 の機能的な重要性が示された。それ故、本研究ではこれら分子の活性化調節機構を解析する痛覚評価系を確立し、その制御機構を明らかにすることにより、病態痛の発生メカニズムを解明することを企図した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、侵害性 TRP チャネルと病態痛との関連性について明らかにすることである。そのため、難治性病態痛の発現の分子基盤として侵害性 TRPV1 及び TRPA1 に着目し、これらの遺伝子クローニング、異所性発現させた細胞におけるチャネル活性を定量するための痛覚評価系を確立し、チャネルの調節機構やその機能に与える分子の作用様式を細胞レベルで検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 両生類 TRPV1 及び TRPA1 の遺伝子クローニング：末梢神経から単離した cDNA を鋳型にして PCR クローニングを行った。得られた PCR 産物を哺乳動物発現ベクターに組み替えた。一部の遺伝子は発現の有無を可視化するため GFP 融合ベクターへ組み換えた。

(2) ミュータント遺伝子の作出：高いフィデリティを有する PCR 酵素である PrimeSTAR Max DNA Polymerase を用いて、変異遺伝子を作成した。クローニングした遺伝子及び変異遺伝子は BigDye Terminator 法により遺伝子配列を決定した。

(3) リポフェクション法を用いた異所性遺伝子発現：哺乳細胞への遺伝子導入には、種々の遺伝子導入試薬を用いたリポフェクション法により行った。発現細胞として HEK293 細胞及び HeLa 細胞を用いた。

(4) 知覚神経細胞の単離培養：マウスを始めとする各種動物の知覚神経細胞をコラゲナーゼ処理により分離培養後、インビトロで TRP チャネル活性を測定し、細胞機能の評価した。

(5) 疼痛関連行動の解析：マウス及びニワトリへの薬物投与による自発的疼痛関連行動及び痛覚過敏に与える影響を各種痛覚測定機器により測定した。アフリカツメガエルでは個体を水槽に入れ、薬物投与及び温度変化による逃避行動を測定することにより、薬

物誘発性の疼痛行動を定量化した。

### (6) TRP チャネルの機能解析

細胞内イオンイメージング：TRP チャネルは高い Ca 透過性を有することから、チャネル活性を細胞内 Ca 濃度変化として計測することが出来る。蛍光 Ca 指示薬である Fura2 あるいは FuraRed を細胞に負荷して、リアルタイム細胞内イオン画像解析システムを用いて細胞内 Ca イメージングを行った。温度制御は細胞近傍に設置した温度プローブを介して行った。

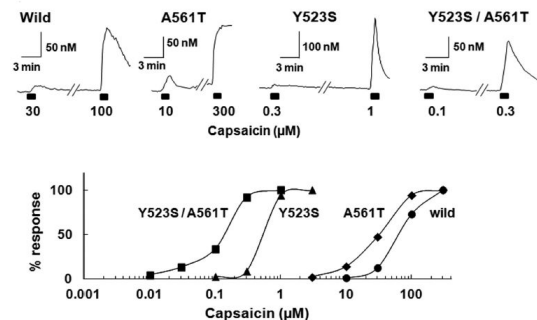
細胞内 Cd イオンイメージング：Cd 蛍光指示薬である Leadmium-AM を細胞内に負荷して、細胞内 Cd 濃度変化を単一細胞レベルで経時的に測定した。

イオンチャネル電流解析：非選択的陽イオンチャネルである TRP チャネル活性により生じた電流応答をホールセルパッチクランプ法及び inside-out による単一チャネル電流測定法を用いて計測した。

### 4. 研究成果

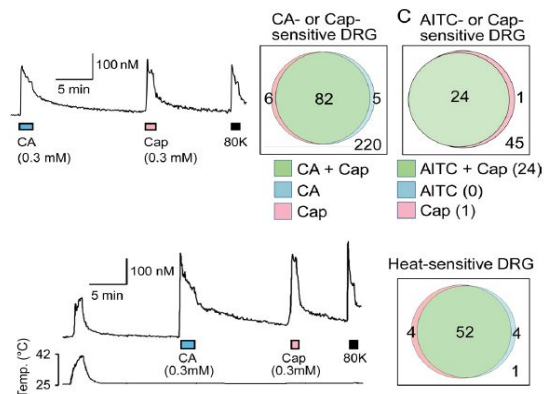
(1) 両生類 TRPV1 のカプサイシン感受性部位の同定：両生類 (アフリカツメガエル、*Xenopus Tropicalis*) から TRPV1 遺伝子 (XtTRPV1) をクローニングした。XtTRPV1 遺伝子は哺乳類 TRPV1 とアミノ酸レベルで約 60% の相同性があった。遺伝子発現細胞の機能解析により、XtTRPV1 は哺乳類と同様、capsaicin、熱及び酸により活性化するポリモダル受容体として機能していた。しかし、capsaicin 感受性は哺乳類に比べて、約 1000 倍低下していた。同様な反応性はアフリカツメガエルより分離した知覚神経細胞及び動物個体を用いた疼痛試験からも得られた。

両生類 TRPV1 をヒト型に変異させたミュータントチャネルを作成し、チャネル解析を行った結果、TRPV1 チャネルの第 3 及び第 4 膜貫通領域の 2 つのアミノ酸が capsaicin 認識部位として重要であることを明らかにした。それ故、これらの部位に作用する薬物の検索は新たな鎮痛薬ターゲットとして重要であると考えられた。



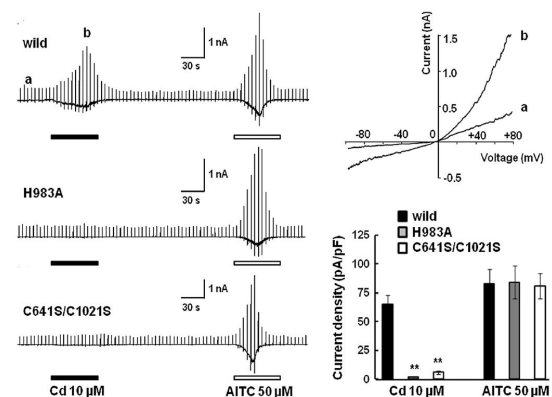
(2) 両生類及び鳥類の TRPA1 活性化機構と温度感受性機構の解析：両生類 (アフリカツメガエル) 及び鳥類 (ニワトリ) より単離した cDNA を用いて、TRPA1 遺伝子をクローニングし、発現機能解析を行った。両 TRPA1 ホモログは哺乳類と同様、シンナムアルデヒド、

カルバクロール、アクロレインを始めとする刺激性化学物質に反応性を有していた。しかし、両生類及び鳥類 TRPA1 チャンネルは冷刺激に感受性のある哺乳類 TRPA1 とは異なり、熱刺激により活性化される熱感受性受容体として機能することが分かった。アフリカツメガエル及びニトリから分離した初代培養知覚神経細胞及び動物個体を用いた疼痛試験からも同様な成績が得られた。



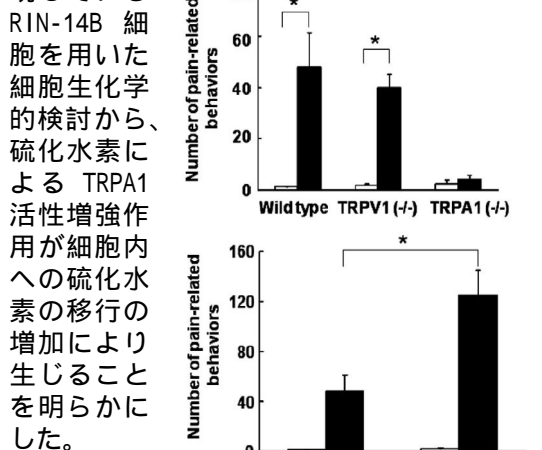
両生類及び鳥類では熱感受性 TRPV1 と TRPA1 が知覚神経細胞において共発現していた。系統発生的解析により、熱感受性の二つのチャンネルにおいて、知覚神経では TRPA1 が最初に発現し、その後進化的に新しい TRPV1 が共発現したと考察された。それ故、両者が熱感受性を補完するチャンネルとして機能していることが示唆された。炎症性の病態痛では発熱を伴うことから、熱感受性機構や熱性痛覚過敏発現メカニズムを調べるために、これらチャンネルの更なる解析が重要であると考えられる。

(3) カドミウムによる TRPA1 チャンネル活性化機構の解明：環境毒性物質であるカドミウムイオン ( $Cd^{2+}$ ) は慢性疼痛を引き起こすが、急性疼痛発現機構は明らかにされていない。本研究から、 $Cd^{2+}$  は知覚神経細胞のうち TRPA1 発現細胞を刺激することを明らかにした。亜鉛感受性を欠損したミュータント遺伝子を発現させた HEK293 細胞では  $Cd^{2+}$  による TRPA1 チャンネル活性化作用は消失していた。マウス個体への  $Cd^{2+}$  の局所適用により疼痛関連行動が惹起され、この反応は TRPA1 欠損マウスで有意に減弱していた。

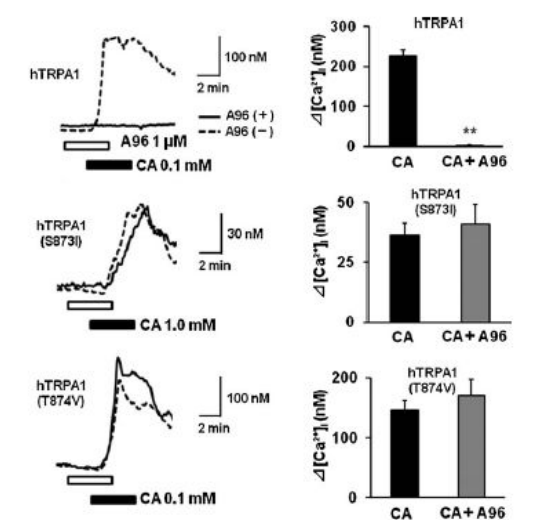


(4) 内因性ガスメッセンジャーによる炎症性病態痛の発現機構：生体内で産生されるガスメッセンジャーである硫化水素が TRPA1 を選択的に活性化させることを、知覚神経細胞及び異所性遺伝子発現細胞から明らかにし、その作用部位を分子レベルで同定した。

炎症時に硫化水素が産生されること、更に炎症時には組織の酸性化が生じることから、硫化水素による TRPA1 活性化に対する細胞外 pH の影響を調べた。その結果、細胞外が弱酸性の条件下では硫化水素による TRPA1 活性化作用は著明に増加し、硫化水素が誘発する発痛作用も増大した。TRPA1 を恒常的に発現している



(5) 遺伝子変異体を用いた TRPA1 遮断薬の作用点の解明：哺乳類 TRPA1 に対して強力な阻害薬として働く A967079 は両生類 TRPA1 活性を抑制しなかった。この原因を探るため、多種 TRPA1 との amino acid 配列の比較を行い、候補 amino acid の変異体を作成し、機能解析を行った。その結果、A967079 の作用点としてイオンチャンネルポア領域に存在する 2 つの amino acid の重要性を明らかにした。



以上の成績から、病態痛における侵害受容チャンネルの役割及び鎮痛薬の作用点を明らかにするための新たな知見を得ることが出来た。

## 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9件)

Takahashi K, Yokota M, Ohta T. Molecular mechanism of 2-APB-induced Ca<sup>2+</sup> influx in external acidification in PC12. *Exp Cell Res* 323(2):337-345. (2014) 査読有り

Saito S, Banzawa N, Fukuta N, Takahashi K, Imagawa T, Ohta T, Tominaga M. Heat and noxious chemical sensor, chicken TRPA1, as a target of bird repellents and identification of its structural determinants by multispecies functional comparison. *Mol Biol Evol* 31(3):708-722. (2014) 査読有り

Nakatsuka K, Gupta R, Saito S, Banzawa N, Takahashi K, Tominaga M, Ohta T. Identification of molecular determinants for a potent mammalian TRPA1 antagonist by utilizing species differences. *J Mol Neurosci* 51(3):754-762. (2013) 査読有り

Takahashi K, Ohta T. Inflammatory acidic pH enhances hydrogen sulfide-induced TRPA1 activation in RIN-14B cells. *J Neurosci Res* 91(10):1322-1327. (2013) 査読有り

Miura S, Takahashi K, Imagawa T, Uchida K, Saito S, Tominaga M, Ohta T. Involvement of TRPA1 activation in acute pain induced by cadmium in mice. *Molecular Pain* 9:7. (2013) 査読有り

Takahashi K, Ohta T. Low pH enhances 2-aminoethoxydiphenyl borate-induced cell death of PC12 cells. *Toxicol Lett* 215(7) 161-166. (2012) 査読有り

Saito S, Nakatsuka K, Takahashi K, Fukuta N, Imagawa T, Ohta T, Tominaga M. Analysis of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) in Frogs and Lizards Illuminates Both Nociceptive Heat and Chemical Sensitivities and Coexpression with TRP vanilloid 1 (TRPV1) in Ancestral Vertebrates. *J Biol Chem* 287(36):30743-30754. (2012)

Ogawa H, Takahashi K, Miura S, Imagawa T, Saito S, Tominaga M, Ohta T. H2S functions as a nociceptive messenger through transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) activation. *Neuroscience* 218:335-343. (2012) 査読有り

Ohkita M, Saito S, Imagawa T, Takahashi K, Tominaga M, Ohta T. Molecular Cloning and Functional Characterization of *Xenopus tropicalis* Frog Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Reveal Its Functional Evolution for Heat, Acid, and

Capsaicin Sensitivities in Terrestrial Vertebrates. *J Biol Chem* 287(4) 2388-2397. (2012) 査読有り

[学会発表](計19件)

高橋賢次、横田緑苗、太田利男 酸性条件下における PC12 細胞の 2-aminoethoxydiphenyl borate 誘発性 Ca 流入メカニズム 第 87 回日本薬理学会年会、(2014,3,20) 仙台

貝本竜規、高橋賢次、齋藤茂、富永真琴、太田利男 リモネンによる TRPA1 チャンネルを介した疼痛抑制作用について 第 87 回日本薬理学会年会、(2014,3,19) 仙台

鳩澤永子、齋藤茂、高橋賢次、富永真琴、太田利男 熱感受性チャンネルとしての鳥類 Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) 受容体の機能 第 156 回日本獣医学会学術集会 (2013,9,20) 岐阜

貝本竜規、高橋賢次、富永真琴、太田利男 Limonene による鎮痛作用における Transient receptor potential ankyrin1 (TRPA1) の関与 第 156 回日本獣医学会学術集会 (2013,9,20) 岐阜

高橋賢次、横田緑苗、太田利男 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2APB) は酸依存性にストア作動性 Ca チャンネル Orai3 を活性化する 第 156 回日本獣医学会学術集会 (2013,9,20) 岐阜

Ohta T, Miura S, Takahashi K, Imagawa T, Uchida K, Saito S, Tominaga M. Cadmium induces acute pain through the activation of nociceptive TRPA1 channel in mice. *Neuro2013*, (2013,6,20) Kyoto

高橋賢次、横田緑苗、太田利男 2 - Aminoethoxydiphenyl borate による PC12 細胞の酸依存性細胞死誘発作用 第 155 回日本獣医学会学術集会 (2013,3,30) 東京

太田利男、三浦冴子、高橋賢次、齋藤茂、内田邦敏、富永真琴 カドミウムによる発痛作用には侵害受容性 TRPA1 チャンネルが関与する。第 86 回日本薬理学会年会(2013,3,21) 福岡

高橋賢次、小川ひとみ、齋藤茂、富永真琴、太田利男 硫化水素による TRPA1 を介した発痛作用はアシドーシス条件下で増強される 第 86 回日本薬理学会年会(2013,3,21) 福岡

中塚一将、齋藤茂、高橋賢次、富永真琴、太田利男 ニシツメガエル Transien Receptor Potential Ankyrin1(TRPA1)の遺伝子クローニングと発現・機能解析 第 154 回日本獣医学会学術集会(2012,9,15)盛岡

三浦冴子、高橋賢次、富永真琴、太田利男 カドミウムによる Transient Receptor Potential Ankyrin1 (TRPA1) を介したマウス知覚神経の興奮作用 第 154 回日本獣医学会学術集会 (2012,9,15)盛岡

小川ひとみ、高橋賢次、三浦冴子、齋藤茂、富永真琴、太田利男 硫化水素の TRPA1

チャンネル活性化を介した侵害受容メッセンジャーとしての役割「TRP チャンネル群の動作原理と生理・病理機能の統合的理解」第8回 TRP チャンネル研究会(2012,6,14)岡崎

小川ひとみ、高橋賢次、三浦冴子、太田利男 細胞外酸性下における硫化水素の発痛増強作用とその機構について 第153回日本獣医学会学術集会(2012,3,28)大宮

大北真嗣、齋藤茂、高橋賢次、富永真琴、太田利男、両生類 TRPV1 遺伝子クローニングと機能解析によるポリモーダル感受性の進化、第85回日本薬理学会年会(2012,3,15)京都

小川ひとみ、高橋賢次、三浦冴子、齋藤茂、富永真琴、太田利男 硫化水素は TRPA1 の活性化を介してマウスに疼痛反応を引き起こす 第39回薬物活性シンポジウム(2011,11,22)福岡

高橋賢次、太田利男 酸性条件下における 2-aminoethoxydiphenyl borate による PC12 細胞の細胞死誘発作用 第64回日本薬理学会西南部会(2011,11,20)福岡

小川ひとみ、高橋賢次、三浦冴子、齋藤茂、富永真琴、太田利男 硫化水素による TRPA1 受容体を介したマウス知覚神経の活性化 第152回日本獣医学会学術集会(2011,9,20)大阪

大北真嗣、齋藤茂、富永真琴、高橋賢次、今川敏明、太田利男、ニシツメガエル Transient receptor potential vanilloid1 は侵害刺激を受容する 第7回 TRP チャンネル研究会(2011,6,20)岡崎

小川ひとみ、高橋賢次、齋藤茂、富永真琴、太田利男 マウス知覚神経における硫化水素による細胞内 Ca 増加反応について、第84回日本薬理学会年会(2011,3,22)横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

太田利男(OHTA, Toshio)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号:20176895

### (2)研究分担者

高橋賢次(TAKAHASHI, Kenji)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号:00400143

### (3)連携研究者

今川敏明(IMAGAWA, Toshiaki)

北海道大学・理学研究科・准教授

研究者番号:20142177