

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：82648

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659323

研究課題名（和文） 侵害刺激感受性感覚神経の新分類と TRPV1, TRPA1 の機能連関

研究課題名（英文） New classification of nociceptive sensory neurons and functional interaction between TRPV1 and TRPA1

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 (岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：90260041

研究成果の概要（和文）：

辛くないトウガラシに含まれるカプシエイトがワサビ受容体 TRPA1 を活性化することを明らかにした。第一級アルコールが炭素鎖長依存的に TRPA1 を活性化して痛みを惹起することを発見した。ワサビに含まれる 2 つの isothiocyanate 成分 6-MSITC と 6-MTITC が TRPA1 を活性化することを明らかにした。自然に存在する鎮痛薬を探索する目的で、TRPM8 を活性化して TRPA1 を阻害する物質をスクリーニングして 1,8-cineole を発見した。

研究成果の概要（英文）：

We found that capsiate, an ingredient contained in non-pungent capsicum, activates TRPA1. We found that Primary alcohols activate human TRPA1 channel in a carbon chain length-dependent manner. We found that two isothiocyanates from *Wasabia japonica* (6-MSITC, 6-MTITC) activate TRPA1. We found that 1,8-cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1 upon intensive screening.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：侵害受容器

## 1. 研究開始当初の背景

侵害刺激を受容する陽イオンチャネルのいくつかは、TRP (Transient Receptor Potential) スーパーファミリーに属する。そのうち TRPV サブファミリーに属するカプサイシン受容体 TRPV1 は侵害刺激受容神経 (nociceptor) での発現が強く、カプサイシン、熱、プロトンといった生体に痛みを惹起する複数の刺激で活性化されることから、侵害刺激受容の中心的分子と考えられている。2003 年に侵害性冷刺激で活性化される温度感受性 TRP チャネルとして TRPA1 が報告された。TRPA1 の冷刺激感受性については結論が出ていないが、TRPA1 はわさびの辛み成分アリルイソチ

オシアネートをはじめとする種々の侵害刺激物質によって活性化することが明らかになっている。TRPV1, TRPA1 の侵害刺激受容能はそれぞれの欠損マウスの解析から確かめられている。無髄の C 線維の細胞体である感覚神経細胞の組織化学的解析から、無髄の C 線維の多くは TRPV1 を発現し、その一部が TRPA1 を発現することが明らかになっている。カプサイシンは TRPV1 のみを活性化し、ワサビの主成分アリルイソチアシアネートは TRPA1 のみを活性化するが、ニンニクの主成分アリシンなど両受容体に作用する物質も存在する。さらに、同じ Gq 共役型受容体の下流で、PKC を介した TRPV1 の制御

機構と  $PIP_2$  を介した制御機構が存在する。TRPA1 に関して、 $PIP_2$  を介した制御機構を報告している。こうした結果は、TRPV1 のみを発現する細胞と TRPV1, TRPA1 両方を発現する細胞で細胞内情報伝達系が異なることを示唆する。これまで、TRPV1 の活性化および制御メカニズムはほぼ一様と考えられてきており、TRPV1 発現神経が2種類存在することは鎮痛薬開発の上からも全く新しい知見である。また、TRPV1, TRPA1 共発現神経で TRPV1, TRPA1 がどのように機能連関して侵害刺激受容の関わっているのかもほとんど明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

侵害刺激受容体TRPA1 を発現する細胞は、ほぼ全てカプサイシン受容体TRPV1 を発現し、TRPV1 発現細胞の50%程度がTRPA1 を発現する。従って、TRPA1, TRPV1 両方を発現する神経細胞とTRPV1 のみを発現する神経細胞が存在するが、その機能の相違等はまったく明らかになっていない。遺伝子ノックインマウス、生化学的手法、電気生理学手法、行動薬理学的的手法を駆使して、これまでひとくりにされてきたカプサイシン感受性侵害刺激受容神経を分類し、末梢神経終末での侵害刺激受容の分子メカニズムの全容を解明することとTRPV1, TRPA1 の機能連関の可能性を明らかにすることを目的とする。また、新規のTRPA1刺激化合物を見いだすことも目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) TRPV1, TRPA1 の発現解析 (mRNA および蛋白質レベル)、(2) TRPV1 単独発現神経・TRPV1, TRPA1 共発現神経の生化学的キャラクタライゼーション (各種マーカー蛋白質の発現解析)、(3) 感覚神経細胞と HEK293 細胞強制発現系を用いて TRPV1 単独発現神経・TRPV1, TRPA1 共発現神経の機能解析を行う。TRPV1, TRPA1 共発現神経では、(4) TRPV1, TRPA1 の物理的結合の解析、(5) 機能連関の解析を行う。その物理的あるいは機能的連関の生理的意義を(6) 野生型マウス、TRPV1 欠損マウス、TRPA1 欠損マウスの行動薬理学的解析から解明する。(7) TRPV1, TRPA1 の新規有効刺激の発見も解析の助けとなると思われる。

## 4. 研究成果

カプサイシンの足底投与による licking, biting 等の痛み関連行動、アリルイソチアシアネートの足底投与による痛み関連行動を比較検討し、片方の受容体欠損によって別受容体を介した行動に変化がでていないかを解析した。TRPA1 欠損マウスのみならず TRPV1 欠損マウスにおいても、TRPA1 の刺激物質アリ

ルイソチアシアネート(AITC)の投与による痛み関連行動が著しく減弱し、TRPV1 欠損が TRPA1 機能に大きな影響を及ぼしていることが分かった。同様に、TRPV1 欠損マウスのみならず TRPA1 欠損マウスにおいても、TRPV1 の刺激物質カプサイシンの投与による痛み関連行動が著しく減弱し、TRPA1 欠損が TRPV1 機能に大きな影響を及ぼしていることが判明した。これらの事実は、TRPV1 と TRPA1 の機能連関を強く示唆する。しかし、生化学的実験によって TRPV1 と TRPA1 の物理的結合は確認できなかった。

TRPV1 を活性化することが明らかになっている辛いトウガラシの成分カプシエイトの TRPA1 に対する効果を検討した。ヒト TRPA1 を強制発現させた HEK293 細胞において、カプシエイト (10  $\mu$ M) は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を増加させた。カプシエイトによる細胞内  $Ca^{2+}$  濃度増加作用は、TRPV1, TRPA1 発現細胞では観察されたが、感覚神経に発現することが知られている TRPM8, TRPV2 を強制発現させた細胞では観察されなかったことから、TRPV1 と TRPA1 が作用標的と考えられた。パッチクランプ法を用いた膜電流解析で、カプシエイトによる外向き整流性をもった全細胞電流の活性化が観察され、その作用はカプシエイトの濃度依存的であった。カプシエイトによる活性化電流は TRPA1 の特異的阻害剤 HC-030031 で完全に抑制されたことも、カプシエイトの作用標的が TRPA1 であることを支持する。マウス後根神経節細胞において、カプシエイトは細胞内  $Ca^{2+}$  濃度増加をもたらし、その細胞内  $Ca^{2+}$  濃度増加は TRPA1, TRPV1 ダブル欠損マウスから得た後根神経節細胞では完全に消失した。カプシエイトの足底注射によって惹起される痛み関連行動は野生型マウスと比較して TRPA1 欠損マウスで有意に減弱したが、TRPV1 活性化によると思われるコンポーネントは残存した。TRPA1 の活性化メカニズムの1つとされる共有結合修飾に関わるシステインとヒスチジンの変異体においてもカプシエイトによる活性化電流が観察されたことから、カプシエイトによる TRPA1 活性化には共有結合修飾は関与しないものと考えられた。以上のことからカプシエイトは TRPV1 のみならず TRPA1 も活性化することが明らかとなり、カプシエイトが弱い TRPV1 活性化能にもかかわらず強い代謝への効果が観察されるのは、一部は TRPA1 活性化能によるのかもしれないと考えられる。

第一級アルコールの TRPA1 への効果を、 $Ca^{2+}$  イメージング法、パッチクランプ法、マウス (野生型マウスと TRPA1 欠損マウス) の行動解析法で明らかにした。HEK293 細胞にヒト TRPA1 を強制発現させて  $Ca^{2+}$  イメージング法で解析したところ、炭素鎖長依存的

な活性化が観察され、1-C8OH で最大の活性化がみられた。この作用は TRPA1 に特異的で、TRPV1, TRPV2, TRPM8 発現細胞では観察されなかった。この第一級アルコールによる TRPA1 の活性化作用は全細胞型パッチクランプ法でも観察され、濃度依存的な外向き整流性をもつ電流の活性化がみられ、その電流は HC-030031 で抑制された。炭素鎖長依存的な濃度依存曲線のシフトも観察された。また、炭素鎖長依存的な TRPA1 の活性化はパッチ膜だけの inside-out 法による単一チャネル電流記録でも観察され、TRPA1 チャネルへの直接の作用と考えられた。さらに、アミノ酸の点変異体解析によって、665 番目のシステインと 983 番目のヒスチジンが第一級アルコールによる TRPA1 の活性化に関与することが明らかとなった。加えて、亜鉛が TRPA1 活性化に関わることも見いだした。興味深いことに、この第一級アルコールによる活性化はヒト TRPA1 で強く観察され、マウス TRPA1 では弱かった。1-C8OH の足底注射による痛み関連行動がマイルドで TRPA1 欠損マウスとの差がないこともそれを支持する。以上のように、第一級アルコールは炭素鎖長依存的にヒト TRPA1 を活性化することが明らかになり、それが、第一級アルコールによる疼痛発生の分子メカニズムと考えられた。

ワサビに含まれる2つの isothiocyanate 成分 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (6-MSITC) と 6-(methylthio)hexyl isothiocyanate (6-MTITC)が TRPA1 を活性化することを Ca<sup>2+</sup>イメージング法およびパッチクランプ法を用いた解析で明らかにした。6-MTITC の作用は TRPV1, TRPV2, TRPM8 では見られなかったが、6-MSITC は TRPV1 活性化能も有していることが分かった。6-MSITC, 6-MTITC とも濃度依存的にヒト TRPA1 による電流活性化を引き起こし、その活性化電流は Hc-030031 で完全に抑制された。6-MSITC, 6-MTITC は野生型マウスから得られた後根神経節細胞で細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の増加をもたらし、その効果は TRPA1 欠損マウスから後根神経節細胞で著しく減弱した。加えて、その疼痛惹起作用を野生型マウスと TRPA1 欠損マウスの行動解析から個体レベルで比較し、6-MSITC は足底注射によって用量依存的に有意な痛み関連行動を惹起し、それは TRPA1 欠損マウスで有意に減弱した。このように、ワサビに含まれる 6-MSITC と 6-MTITC は AITC と同様に TRPA1 を活性化することが明らかとなった。

自然に存在する鎮痛薬を探索する目的で、TRPM8 を活性化して TRPA1 に作用しない物質をフレグランスオイルで Ca<sup>2+</sup>イメージング法を用いてスクリーニングし、eucalyptus oil を見いだした。eucalyptus oil に含まれる 1,8-cineole がそうした性質をもつ物質である

ことが明らかになった。1,8-cineole は、TRPV1, TRPV2, TRPA1 を活性化しないことが分かったが、TRPV3 活性化能は有していることが判明した。eucalyptus oil には 1,4-cineole も含まれるが、1,4-cineole は TRPA1 を活性化することが Ca<sup>2+</sup>イメージング法、パッチクランプ法を用いた解析で分かった。興味深いことに、1,8-cineole は AITC, menthol, FFA, octanol で活性化した TRPA1 電流を濃度依存的に抑制したが、TRPV1, TRPV2, TRPV3 活性は阻害しなかった。1,8-cineole の TRPA1 活性抑制作用はマウス後根神経節細胞でも観察された。ヒトにおいて 1,8-cineole の TRPA1 活性抑制作用を頸部皮膚の sensory irritation score を用いて検討した。1,8-cineole 自体は痛みを惹起せず、octanol (0.2%) もしくは menthol (0.5%) で惹起された痛み感覚を 1,8-cineole (0.1%) は有意に抑制した。このように、1,8-cineole はヒト TRPA1 を阻害することが分かり、鎮痛薬として理想的であることが判明した。

#### 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4件)

- ① Shintaku K, Uchida K, Suzuki Y, Zhou Y, Fushiki T, Watanabe T, Yazawa S, Tominaga M. Activation of TRPA1 by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate. Br. J. Pharmacol. Br. J. Pharmacol. 165: 1476-1486, 2012, 査読有, DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01634.x.
- ② Komatsu T, Uchida K, Fujita F, Zhou Y, Tominaga M. Primary alcohols activate human TRPA1 channel in a carbon chain length-dependent manner. Pflugers Archiv. Eur. J. Physiol. 463 (4): 549-59, 2012, 査読有, DOI:10.1007/s00424-011-1069-4
- ③ Uchida K, Miura Y, Nagai M & Tominaga M. Isothiocyanates from *Wasabia japonica* activate transient receptor potential ankyrin 1 channel. Chemical Senses 37: 809-818, 2012, 査読有, DOI:10.1093/chemse/bjs065
- ④ Takaishi M, Fujita F, Uchida K, Yamamoto S, Sawada M, Hatai C, Shimizu M & Tominaga M. 1,8-cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1. Molecular Pain 8: 86, 2012, 査読有, DOI:11.1186/1744-8069-8-86

[学会発表] (計2件)

- ① 内田邦敏、三浦陽介、永井雅、富永真琴、

- ② ワサビから抽出される種々のイソチオシアネートによる TRPA1 の活性化、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 20 日 (愛知)
- ③ 新宅健司、富永真琴、辛くないトウガラシ成分カプシエイトによる TRPA1 の活性化、第 33 回日本疼痛学会、2011 年 7 月 23 日 (愛媛)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/es>

## 6. 研究組織

### (1) 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  
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイ  
エンスセンター・教授

研究者番号：90260041

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし