

## 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 29 日現在

機関番号：24601  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790726  
 研究課題名（和文）アルコールに起因する心血管イベントに対する新たな指標としての TRP チャンネルの役割  
 研究課題名（英文）The role of TRP channels as a new indicator of cardiovascular events induced by alcohol  
 研究代表者  
 工藤 利彩（KUDO RISA）  
 奈良県立医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：20347545

研究成果の概要（和文）：近年、transient receptor potential（TRP）チャンネルが様々な生物種で同定され、血管においても重要な生理機能を担っていることが明らかになりつつある。TRP スーパーファミリーのうち、TRPV1 と TRPV4 は血管に分布し弛緩反応に関与することが知られている。我々は、エタノールが心血管病の危険因子であることに注目し、TRP チャンネルを介する血管弛緩反応に対するエタノールの影響を検討したところ、エタノールが TRPV1 と TRPV4 を介する弛緩反応を有意に抑制することを明らかにした。この抑制は、血流障害および、それに伴う様々な心血管病態を引き起こす可能性を示唆しており、TRP チャンネルがアルコールに起因する心血管イベントの新たな指標となり得るものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Transient receptor potential (TRP) channels were recently found to be expressed in the vasculature of several species, and it is becoming clear that TRP channels are features that are important for physiological functions. TRPV1 and TRPV4, which belong to a subtype of the TRP channel superfamily, are localized within vessels and are known to be involved in the relaxation response. We have noted that ethanol is a risk factor for cardiovascular disease, and therefore we investigated the effect of ethanol on the vascular relaxation response via the TRP channels. We showed that the relaxation response via TRPV1 and TRPV4 was significantly suppressed by ethanol. This inhibition has been suggested to cause changes in blood flow, blood disorders, and various cardiovascular pathologies. We accordingly suggest that TRP channels can serve as a new indicator of cardiovascular events induced by alcohol.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|          | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|----------|-----------|-----------|-----------|
| 平成 23 年度 | 2,800,000 | 840,000   | 3,640,000 |
| 平成 24 年度 | 600,000   | 180,000   | 780,000   |
| 交付決定額    | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：アルコール医学

## 1. 研究開始当初の背景

血管機能の恒常性維持には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が不可欠であるが、その流入経路となる受容体活性型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルは不明のままであった。近年、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの候補として transient

receptor potential (TRP) チャンネルが発見され、これまでに多くの TRP ホモログが同定され、TRP スーパーファミリーを形成し、重要な生理機能を担っていることが明らかになりつつある。

## 2. 研究の目的

TRP スーパーファミリーのうち、TRPV サブファミリーに属する TRPV1 は、カプサイシン受容体としても知られ、感覚神経一次求心性 C 線維に分布し、CGRP (calcitonin-gene related peptide) の遊離を促し神経細胞依存性弛緩反応を引き起こすことが知られている。一方、TRPV4 は、血管内皮、血管平滑筋、心筋をはじめ諸臓器に分布し、血管においては、Ca<sup>2+</sup>応答と NO を介した弛緩反応を引き起こすことが示唆されており、心血管病態への関与が注目されているものの、これらのチャネルに対するエタノールの関与についての報告例はない。また、エタノールが心血管病の危険因子であることは知られているものの、その作用機序については未だ明らかになっていない。そこで、我々はその作用機序を解明するため、TRP チャネルを介する血管弛緩反応に対するエタノールの影響について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫組織化学的検討

Wistar 系雄性ラットから摘出した各動脈を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、脱水、透徹後、パラフィン包埋し、切片を作製した。一次抗体は抗 TRPV4 ウサギポリクローナル抗体を用い、二次抗体反応はヒストファインシンプルステインラット MAX-PO (ニチレイ)を用いた。3,3'-diaminobenzidine (DAB) で発色し、マイヤーのヘマトキシリン液で核染色した。

### (2) ラット血管輪状標本の作製

Wistar 系雄性ラットの各動脈を摘出し、輪状標本作製し、恒温バス内に懸垂し等尺性張力の変化を測定した。なお、内皮細胞剥離の有無については、フェニレフリン収縮下において、内皮細胞由来の弛緩物質であるアセチルコリンによる弛緩反応の有無によって確認した。

なお、動物実験は公立大学法人奈良県立医科大学動物実験委員会の承認を得て行った。

### (3) TRP チャネルアゴニストによる血管弛緩反応の検討

フェニレフリンによる収縮下、累積的に TRPV1 アゴニストのカプサイシン、アナンダミド、および TRPV4 アゴニストの GSK1016709A を添加し、これらの弛緩反応に対する各種阻害剤およびエタノールの影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) TRP チャネルの発現検討

免疫染色法により、抗 TRPV1 抗体および抗 TRPV4 抗体を用いて、各動脈における TRPV1 および TRPV4 チャネルの発現部位を検討したところ、大動脈、上腸間膜動脈、

肝動脈において、いずれも発現がみられ、TRPV1 は血管平滑筋細胞全体に発現しており、TRPV4 は血管平滑筋細胞にも発現しているが、主に血管内皮細胞に発現していることが明らかになった (図 1)。

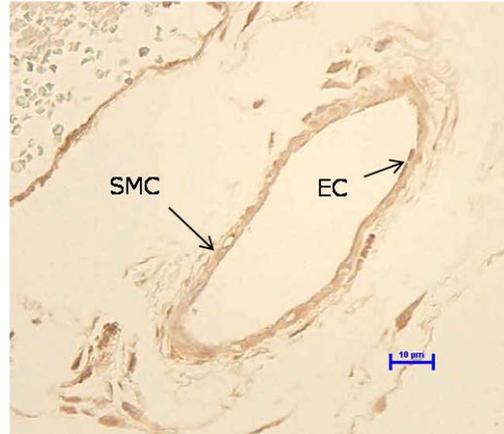


図 1. 上腸間膜動脈における TRPV4 の局在

### (2) TRPV1 アゴニストによる血管弛緩反応

TRPV1 アゴニストであるカプサイシン刺激による弛緩反応について検討したところ、内皮細胞剥離標本は、カプサイシン濃度依存性弛緩反応を示した。この弛緩反応は、TRPV1 阻害剤であるカプサゼピンとルテニウムレッド、CGRP receptor 阻害剤の CGRP[8-37]で抑制されたが、nitro-L-arginine (NO 合成酵素阻害剤) は抑制作用を示さなかった。したがって、カプサイシンによる弛緩反応は、カプサイシンが sensory nerve 表面にある TRPV1 に結合し、NO ではなく主に CGRP を介して行われるものと考えられた。また、エタノールは、このカプサイシン刺激による弛緩反応に抑制的に作用した (図 2)。

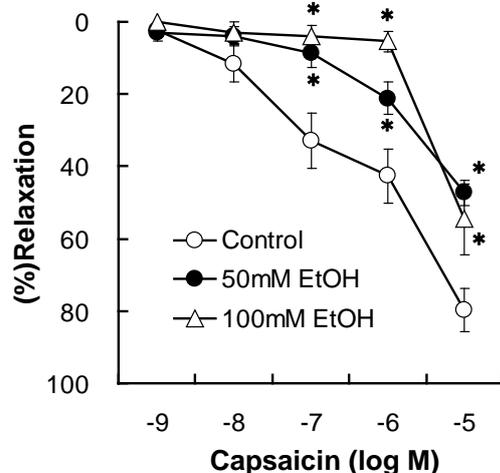


図 2. 肝動脈におけるカプサイシン刺激による弛緩反応

同じく TRPV1 アゴニストであるアナンドアミド刺激による弛緩反応について検討した。アナンドアミド (N-アラキドノイルエタノールアミン) は、長鎖脂肪酸のエタノールアミドの1つであり、脳のカンナビノイド受容体の内在性リガンドとして発見された。その後、脳内のみならず、他の臓器や神経および血管内皮などの末梢組織からも検出され、種々のカンナビノイド様生理活性を示すことが報告されている。内皮細胞剥離標本は、アナンドアミド濃度依存性弛緩反応を示し、この反応はカプサイゼン、ルテニウムレッド、および CGRP[8-37]により有意に抑制され、nitro-L-arginine による影響はみられなかった。これらのことからカプサイシン同様、アナンドアミドによって活性化された sensory nerve 表面の TRPV1 が CGRP の遊離を促すことによって弛緩反応が引き起こされることが明らかになり、この反応に対する NO nerve の関与は否定された。また、エタノールは、このアナンドアミド刺激による CGRP を介した弛緩反応に抑制的に作用した (図 3)。

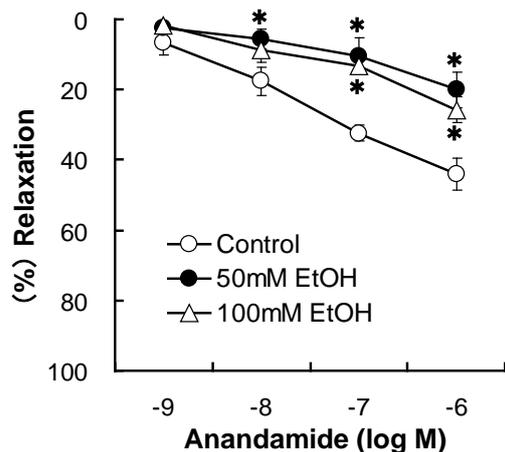


図 3. 肝動脈におけるアナンドアミド刺激による弛緩反応

これらの TRPV1 を介する弛緩反応に対するエタノールの抑制部位について考えられることとしては、我々は既に、エタノールが NO donor ニトロプルシッドナトリウム (SNP) による平滑筋レベルでの弛緩反応に対しては全く影響を及ぼさないことを明らかにしていることから、おそらく平滑筋レベルではなく神経末端レベルで抑制しているものと思われる。

### (3) TRPV4 アゴニストによる血管弛緩反応

TRPV4 は、主に血管内皮細胞に分布し NO を介する弛緩反応を引き起こすことが知られているが、近年、TRPV4 は血管平滑筋細胞にも分布し、平滑筋レベルでの弛緩反応を引き起こすことも報告されていることから、

今回、両経路の関与を視野に入れて検討した。TRPV4 アゴニストである GSK1016709A 刺激による弛緩反応について検討したところ、血管輪状標本は、GSK1016709A による濃度依存的弛緩反応を示し、この弛緩反応は TRPV4 阻害剤であるルテニウムレッドによりほぼ完全に阻害された。また、内皮細胞の剥離によっても弛緩反応は有意に抑制されたことから、この弛緩反応に対する平滑筋の関与はごく僅かであり、主に内皮細胞レベルで機能していることが明らかになった。さらに、nitro-L-arginine (NO 合成酵素阻害剤) および iberiotoxin (BKca チャネル阻害剤) の単独投与によっても弛緩反応はほぼ完全に阻害された。これらのことから、内皮細胞の NO を介する経路と BKca チャネルを介する経路は、それぞれが独立した経路ではなく、1 つの経路として機能していることが示唆された。実際、内皮細胞表面に分布する BKca チャネルの活性化によって生じる過分極が eNOS を活性化し、内皮細胞由来の NO が増加するという報告があることから、内皮細胞表面の TRPV4 チャネルの活性化により細胞外から  $Ca^{2+}$  が流入し細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇することによって、1 つにはダイレクトに eNOS が活性化され、もう一方では BKCa チャネルが活性化し、過分極になることによって eNOS が活性化され、これら 2 つの経路が合流し内皮細胞由来の NO 産生が増大することによって、NO を介する弛緩反応が引き起こされるものと考えられる。また、エタノールは、この GSK1016709A 刺激による TRPV4 を介する弛緩反応に抑制的に作用した (図 4)。

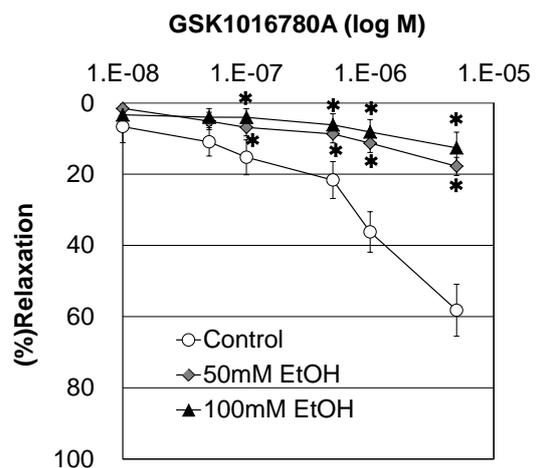


図 4. 上腸間膜動脈における GSK1016709A 刺激による弛緩反応

このエタノールの抑制部位について考えられることとしては、上述のように、我々は既に、エタノールが NO donor ニトロプルシ

研究者番号：20347545

(2)研究分担者  
該当なし

(3)連携研究者  
該当なし

ッドナトリウム (SNP) による平滑筋レベルでの弛緩反応に対しては全く影響を及ぼさないことを明らかにしていることから、おそらく平滑筋レベルではなく内皮細胞レベルで抑制しているものと思われる。

(4) アルコールに起因する心血管イベントに対する TRP チャネルの役割

TRP チャネルである TRPV1 や TRPV4 が  $Ca^{2+}$ チャネルとして機能することや、細胞膜の透過性を高めることが知られていることから、エタノールが細胞外からの  $Ca^{2+}$ の流入や細胞膜の透過性に影響を及ぼしている可能性が考えられる。今回示した TRPV1 および TRPV4 を介する弛緩反応に対するエタノールの抑制作用から、エタノールは神経細胞依存性および内皮細胞依存性の両方向から TRP チャネルを介する弛緩反応を抑制し、血流障害および、それに伴う様々な心血管病態を引き起こすことを示唆している。したがって、TRP チャネルがアルコールに起因する心血管イベントの新たな指標となり得るものと考えられる。

#### 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. 工藤利彩, 勇井克也, 羽竹勝彦, ラット上腸間膜動脈における TRPV4 チャネルを介する血管弛緩反応に及ぼすエタノールの影響, アルコールと医学生物学, 査読有, 31, 2013, 掲載予定.
2. 工藤利彩, 羽竹勝彦, 神経系を介した血管反応に及ぼすエタノールの影響, 日本アルコール・薬物医学会雑誌, 査読有, 46 (2), 2011, 241-249.

[学会発表] (計 2 件)

1. 工藤利彩, 勇井克也, 羽竹勝彦, ラット上腸間膜動脈における TRPV4 チャネルを介する血管弛緩反応に及ぼすエタノールの影響, アルコール医学生物学研究会学術集会, 2013. 1. 25-26, 東京.
2. R. Kudo, K. Hatake, Effect of ethanol on TRPV4-mediated relaxation in the rat artery, 2012 ISBRA World Congress (16<sup>th</sup> Congress of International Society for Biomedical Research on Alcoholism), 9. 9-12, 2012, Sapporo.

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

工藤 利彩 (KUDO RISA)

奈良県立医科大学・医学部・助教