

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590173

研究課題名(和文) 侵害刺激受容体 TRPA1 の感受性個体差に関する分子毒性学的研究

研究課題名(英文) Studies on molecular mechanisms of the inter-individual variation in nociceptive TRPA1 sensitivity

研究代表者

神野 透人 (Hideto, Jinno)

国立医薬品食品衛生研究所・生活衛生化学部・室長

研究者番号：10179096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：生活環境化学物質が原因あるいは増悪因子と考えられる疾患において重要な役割を果たしていると考えられる侵害刺激受容体TRPA1 チャンネルについて、その感受性個体差に影響を及ぼす遺伝的要因並びに環境要因を明らかにすることを目的として、既知のSNPs を導入した異型TRPA1 5種並びに野生型TRPA1をHEK293細胞で強制発現させて機能変化を明らかにした。また、ヒト気道及び肺組織について、TRPA1 mRNA発現量の差をReal Time RT-PCR法により定量的に解析し、ヒト気道組織においてはTRPA1 mRNAレベルで100倍以上の個体差が認められる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 associated with the indoor environments, and to reveal the multiple genetic factors involved in the individual susceptibility to environmental pollutants, we established transformants stably expressing the wild-type and 5 variants transient receptor potential (TRP) A1 channels, and the differences in the activation by indoor chemicals were determined. Furthermore, we examined the variation in mRNA levels of TRPA1 and TRPV1 in human airway tissues. Our study revealed that TRPA1 expression levels in trachea shows over 100-fold inter-individual variation. Single nucleotide polymorphisms have been reported in both TRPA1 and TRPV1 genes, however, the TRPA1 genetic variant may contribute more than TRPV1 to the chemical sensitiveness in airway tissues.

研究分野：衛生化学

キーワード：感受性個体差 シックハウス症候群 侵害刺激受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 生活環境化学物質が発症の原因あるいは増悪因子となる疾病として、シックハウス症候群や化学物質過敏症/本態性多種化学物質過敏状態、アレルギー性鼻炎や気管支喘息などが知られている。これらの疾病に共通する特徴はアレルギー性もしくはアレルギー様の応答である。しかし、生活環境中の微量の化学物質が必ずしもおしなべて古典的な免疫応答を惹起するわけではなく、この点が原因物質の特定や疾病の診断における障害となっている。例えば、化学物質過敏症に関する室内空気質健康影響研究会の報告(平成16年2月、厚生労働省健康局生活衛生課)では以下のように記されている。

“本研究会としては、微量化学物質暴露による非アレルギー性の過敏状態としての MCS (Multiple Chemical Sensitivity: 多種化学物質過敏状態) に相当する病態の存在自体を否定するものではないが、「化学物質過敏症」という名称のこれまでの使用実態に鑑みると、非アレルギー性の過敏状態としての MCS に相当する病態を示す医学用語として、「化学物質過敏症」が必ずしも適当であるとは考えられず、今後、既存の疾病概念で説明可能な病態を除外できるような感度や特異性に優れた臨床検査法及び診断基準が開発され、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が進展することを期待したい。”我々は生活環境化学物質と生体とのインターフェースとして主に末梢神経に発現する Transient Receptor Potential (TRP) チャンネル、特に寒冷刺激やカルボニル化合物によって活性化される TRPA1 にいち早く着目し、精油中のテルペン類、リン酸トリエステル類、グリコールエーテル類、2-エチル-1-ヘキサノール、TXIB や Texanol、フタル酸モノエステル類など、多種多様な生活環境化学物質が TRPA1 を作用点とすることを明らかにして来た。生活環境中のこれらの身近な化学物質は単独あるいは複合的に末梢神経の TRPA1 を活性化し、その結果 Substance P や CGRP などの神経ペプチドの遊離により神経(原)性炎症を引き起こす可能性があると考えられる。一方、上述した生活環境化学物質が関与する一群の疾病のもう一つの特徴として、比較的大きな個体差(個人差)の存在をあげることができる。また、化学物質過敏症/本態性多種化学物質過敏状態が「急性大量、または慢性微量の化学物質負荷により過敏性を獲得すると、その後極めて微量な化学物質により不愉快な症状が出現する状態」(平成13年度本態性多種化学物質過敏状態の調査研究 研究報告書、環境省)と定義されていることから、非アレルギー性の何らかの“感作(Sensitization)”過程が存在することが推察され、この Sensitization によって個体差がさらに増幅されるものと予想される。実際 TRPA1 にも Sensitization が知られており、Bradykinin

や Proteinase-activated Receptor (PAR) 2 は Protein Kinase A (PKA)/Phospholipase C (PLC) Signaling を介して TRPA1 の Sensitization を引き起こすことが明らかにされている (Dai et al., Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. J Clin Invest. 2007 117: 1979-1987)。また、その機序の一つとして、PKA/PLC Signaling によって TRPA1 の細胞膜への移行が促進される、という興味深い結果も報告されている (Schmidt et al., Nociceptive Signals Induce Trafficking of TRPA1 to the Plasma Membrane. Neuron 2009 64: 498-509)。

(2) ポリモーダル受容器である Transient receptor potential (TRP) イオンチャンネルの活性化が 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 イオンチャン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 イオンチャン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

生活環境化学物質が原因あるいは増悪因子と考えられる疾患において重要な役割を果たしていると考えられる侵害刺激受容体 TRP (Transient Receptor Potential) A1 チャンネルについて、の感受性の個体差に影響を及ぼす遺伝的な要因並びに環境要因を明らかにすることを目的とする。まず、既知の Non-synonymous SNPs を導入した異型 TRPA1 を HEK293 細胞で強制発現させて機能変化を明らかにするとともに、TRPA1 を発現するヒト由来細胞株を用いて生活環境化学物質による感受性亢進の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 変異型 TRPA1 安定発現細胞株の樹立
5種類のアミノ酸置換 (R3C、R58T、E179K、K186N 及び H1018R) を引き起こす SNPs を選定し、哺乳動物細胞においてそれぞれの異型タンパク質をほぼ同じレベルで高発現する

細胞株樹立用のプラスミドベクターを構築した。構築したベクターを用いて異型 TRPA1 安定発現細胞株を樹立した。

(2) 変異型 TRPA1 の機能解析

野生型ならびに 5 種変異型 TRPA1 それぞれ 4 クローン計 24 クローンについて典型的な TRPA1 アゴニストである Cinnamic aldehyde 及び生活環境化学物質で既に著者らによって TRPA1 を活性化することが判明したフタル酸モノエステル類に対する応答性を細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を指標として検討した。

(3) ヒト由来培養細胞株の TRPA1 発現レベル環境要因の探索に適した *in vitro* 系を構築する目的で、複数のヒト由来培養細胞 (ヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞、ヒト肺癌由来 A549 細胞、ヒト肺線維芽細胞由来 CCD19-Lu 細胞、ヒト気道上皮由来 BEAS-2B) について TRPA1 発現量を mRNA レベルで比較した。

(4) ヒト気道及び肺組織の TRPA1 発現レベルの個体差

ヒト気道及び肺組織を対象として、BioChain 社よりそれぞれ 5 ドナーの total RNA を購入し、TRPA1 及び TRPV1 mRNA 発現量の差を Real Time RT-PCR 法により定量的に解析した。

4. 研究成果

(1) 変異型 TRPA1 安定発現細胞株の樹立

日本人で比較的高い Allele Frequency で検出される SNPs として、5 種類のアミノ酸置換 (R3C、R58T、E179K、K186N 及び H1018R) を引き起こす SNPs を選定し、哺乳動物細胞においてそれぞれの異型タンパク質をほぼ同じレベルで高発現する細胞株樹立用のプラスミドベクターを構築した。構築したベクターを用いて異型 TRPA1 安定発現細胞株を樹立し、野生型ならびに 5 種変異型 TRPA1 それぞれ 4 クローン計 24 クローンについてタンパク質の発現レベルを定量的に解析した結果、何れもタンパク質発現レベルでは顕著な差が認められないことを確認した。

(2) 変異型 TRPA1 の機能解析

野生型ならびに 5 種変異型 TRPA1 それぞれ 4 クローン計 24 クローンについて典型的な TRPA1 アゴニストである Cinnamic aldehyde 及び生活環境化学物質で既に著者らによって TRPA1 を活性化することが判明しているフタル酸モノエステル類に対する応答性を細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を指標として検討した。その結果、5 種変異型 TRPA1 の何れもが本研究で対象とした Cinnamic aldehyde 及びフタル酸モノエステル曝露によって、野生型 TRPA1 と同程度の活性化を示すことが明らかになった。ただし、本研究で樹立した変異型 (E179K、K186N) TRPA1 については、Cinnamic aldehyde 及びフタル酸モノエス

ルに対する応答性が、培養のステージによって変化することが判明した。この結果から、これら細胞の培養過程における環境要因によって、化学物質に対する応答性が変化する可能性も示唆された。

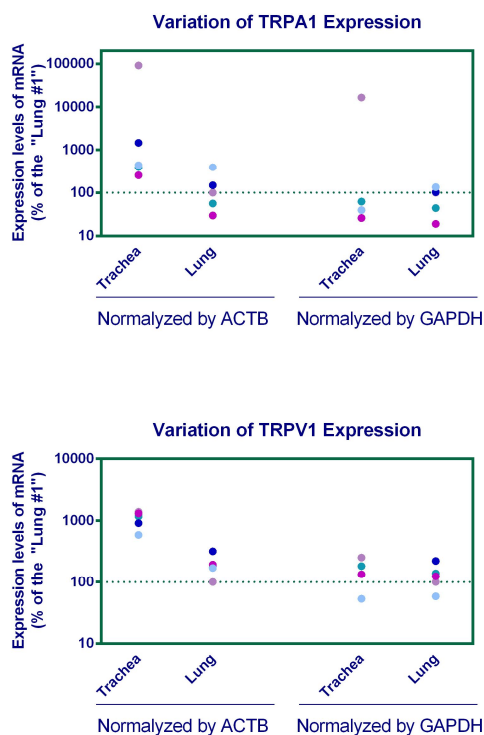


図 1 Individual variation of TRPA1 and TRPV1 Gene Expression in Trachea and Lung.

(3) ヒト由来培養細胞株の TRPA1 発現レベル環境要因の探索に適した *in vitro* 系を構築する目的で、複数のヒト由来培養細胞 (ヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞、ヒト肺癌由来 A549 細胞、ヒト肺線維芽細胞由来 CCD19-Lu 細胞、ヒト気道上皮由来 BEAS-2B) について TRPA1 発現量を mRNA レベルで比較した結果、 $IMR-32 \ll BEAS-2B < A549 < CCD-19Lu$ であることを明らかにした。それぞれの培養細胞株における TRPA1 mRNA 発現レベルは、既に研究代表者らが樹立したヒト TRPA1 高発現細胞株に比較して低く、発現レベルの誘導を検討する目的に適していると考えられる。

(4) ヒト気道及び肺組織の TRPA1 発現レベルの個体差

ヒト気道及び肺組織について、TRPA1 mRNA 発現量の差を Real Time RT-PCR 法により定量的に解析した結果、ヒト気道において TRPA1 mRNA レベルについて 100 倍以上の個体差が認められることを明らかにした (図 1)。同じ 5 ドナー由来の total RNA について TRPV1 mRNA の定量的な解析を実施した結果、その個体差は 2~3 倍程度であった (図 1)。

これらの結果から、TRPA1 及び TRPV1 いずれにおいても、これまでに遺伝子多型が報告されているが、気道組織においては TRPV1 よりも TRPA1 に関する遺伝子多型が感受性個体差に重要な役割を果たしている可能性も考えられる。

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1件)

Ohkawara S, Tanaka-Kagawa T, Furukawa Y, Jinno H, Methylglyoxal activates the human transient receptor potential ankyrin 1 channel. *J Toxicol Sci*. 査読有, 37(4): 831-835, 2012.

[学会発表](計13件)

香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 神野 透人, フタル酸エステル類及びその加水分解生成物による TRPV1 及び TRPA1 の活性化. 第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012 年 7 月).

Jinno H, Ohkawara H, Tanaka-Kagawa T, Activation of nociceptive transient receptor potential channels by phthalates. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (2012 年 7 月).

香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 岡元 陽子, 五十嵐 良明, 神野 透人, フタル酸エステル類の気道刺激性に関する研究. 平成 24 年度室内環境学会学術大会 (2012 年 12 月).

香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 岡元 陽子, 五十嵐 良明, 神野 透人, イソチアゾリン系抗菌剤によるヒト侵害受容器 TRP イオンチャネルの活性化. 日本薬学会第 133 年会 (2013 年 3 月).

香川(田中) 聡子, 中森 俊輔, 大河原 晋, 岡元 陽子, 真弓 加織, 小林 義典, 五十嵐 良明, 神野 透人, 抗菌剤 Isothiazoline 誘導体による TRP イオンチャネルの活性化. 第 40 回日本毒性学会学術年会 (2013 年 6 月).

Jinno H, Ohkawara S, Okamoto Y, Mayumi, Tahara M, Ikarashi Y, Tanaka-Kagawa T, Isothiazolinone preservatives activate the sensory ion channels human TRPA1 and TRPV1. The XIII International Congress of Toxicology (2013 年 7 月).

香川(田中) 聡子, 真弓 加織, 岡元 陽子, 田原 麻衣子, 神野 透人, 五十嵐 良明, 消費生活用製品に使用されるイソチアゾリン系抗菌剤による気道刺激性に関する研究. 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会 (2013 年 11 月).

神野 透人, 大河原 晋, 岡元 陽子, 田原 麻衣子, 川原 陽子, 真弓 加織, 五十嵐 良明, 香川(田中) 聡子, 柔軟剤中の香料

による気道刺激に関する研究. 平成 25 年度室内環境学会学術大会 (2013 年 12 月).

香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 田原 麻衣子, 岡元 陽子, 川原 陽子, 真弓 加織, 五十嵐 良明, 神野 透人, 家庭用品中の抗菌剤による気道刺激に関する研究. 平成 25 年度室内環境学会学術大会 (2013 年 12 月).

香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 岡元 陽子, 真弓 加織, 田原 麻衣子, 川原 陽子, 五十嵐 良明, 神野 透人, 衣料用柔軟仕上げ剤中の香料成分によるヒト侵害受容器 TRPA1 の活性化. 日本薬学会第 134 年会 (2014 年 3 月).

香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 田原 麻衣子, 川原 陽子, 真弓 加織, 五十嵐 良明, 神野 透人, 家庭用品中の香料成分によるヒト侵害受容器 TRPA1 の活性化. 第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014 年 7 月).

Tanaka-Kagawa T, Ohkawara S, Tahara M, Kawahara Y, Mayumi K, Ikarashi Y, Jinno H, Activation of nociceptive transient receptor potential channels by antimicrobial agents/ Isothiazolines in consumer products. Indoor Air 2014 The 13th International Conference on Indoor Air Quality and Climate (2014 年 7 月).

香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 神野 透人, 生活環境化学物質による侵害刺激. フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2014 年 9 月).

[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