

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 12 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860395

研究課題名(和文)炎症性腸疾患患者とモデル動物におけるTRPM2受容体の病態への関与

研究課題名(英文)Role of transient receptor potential melastatin 2 channels in visceral nociception and hypersensitivity in rats

研究代表者

松本 健次郎(Matsumoto, Kenjiro)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10406770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマクロファージに発現し炎症制御に関わっている温度感受性TRPM2チャネルのラット消化管神経、脊髄後根神経節におけるTRPM2の発現と大腸炎モデルにおける内臓痛覚過敏への関与について検討を行った。TRPM2の局在を免疫組織化学的に検討したところ、大腸に投射しているTRPM2は内在性、外来性の知覚神経であることが示唆された。TNBS誘起大腸炎モデルにおいてTRPM2発現量は顕著に増加した。パロスタット法によりTRPM2と内臓痛覚過敏との関連性を検討したところ、TRPM2は生理的条件下の有害刺激の感知および大腸炎症の内臓痛覚過敏の発現に関与していることを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：TRPM2, which is a thermosensitive and Ca²⁺-permeable cation channel, contributes to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. The present study investigated the expression of TRPM2 and their involvement in visceral sensitivity in rats. TRPM2 was expressed in enteric neuron, and was co-localized with the marker of intrinsic primary afferent neuron. The majority of TRPM2 cells were double positive with a retrograde marker fluorogold in DRG. TRPM2-positive DRG neurons were labeled with A-fiber, C-fiber marker, substance P, and CGRP. The TRPM2 inhibitor econazole reduced visceromotor response to noxious colorectal distention in the normal rats. The expression of TRPM2 in the mucosa was increased in TNBS-induced colitis models. Econazole attenuated the visceral hypersensitivity to the control level. In conclusion, TRPM2 expressed in intrinsic and spinal primary afferent neurons contributes to the visceral pain under normal and visceral hypersensitivity under inflammatory conditions.

研究分野：薬物治療学

キーワード：炎症性腸疾患 内臓痛 温度感受性受容体 TRPM2

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は消化管における慢性の炎症、潰瘍を引き起こす原因不明の疾患である。厚生労働省の特定疾患に指定されており、ここ 20 年間で患者数は 10 倍増加し、なお増加傾向にある。日常的な腹痛や下痢といった消化器症状が患者の QOL を著しく低下させており、重症化すると大腸の全摘出が必要となる。そのため炎症性腸疾患の病因解明と新しい治療法が強く望まれている。

申請者は正常動物、炎症性腸疾患モデル動物における温度感受性受容体の関与について研究を行ってきた。43 以上の熱や酸、カプサイシンなどにより活性化される TRPV1 が消化管、特に大腸において多く局在していることを明らかにした (Neuroscience, 2011; Am. J. Physiol., 2009)。さらに炎症性腸疾患モデル動物において TRPV1 が神経だけでなく炎症性細胞にも多く発現し、内臓痛覚過敏に深く関与していることを報告した (Lab. Invest., 2012)。しかしながら炎症性腸疾患患者の大腸組織において TRPV1 免疫活性の変化は見出されなかった (未発表)。

TRPM2 はカルシウムイオン透過型のカチオンチャンネルである。体温付近で活性化され、活性酸素種などによって活性が増強される。マクロファージなどの免疫細胞上に発現する TRPM2 が慢性痛に関与することが実験動物で報告されている (Haraguchi et al., J. Neurosci., 2012; Yamamoto et al., Nat. Med., 2008)。申請者は温度感受性受容体の中でも、体温付近で活性化する TRPM2 が炎症性腸疾患の慢性的な腹痛や下痢に関与しているのではないかと推定し本研究を企画した。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患は原因不明の難治性疾患であり、患者数が年々増加し続けている。日常的な腹痛や下痢といった消化器症状が患者の QOL を著しく低下させており、病因解明と新しい治療法が強く望まれている。申請者は「消化管炎症時における内臓知覚過敏には、温度感受性受容体の変化が関与している。」と考え研究を行ってきた。本研究では温度感受性受容体の中でも体内温度付近(36 以上)で活性化する Transient receptor potential melastatin 2(TRPM2)チャンネルに着目し疾患モデル動物における TRPM2 の機能と変化について検討する。

3. 研究の方法

炎症性腸疾患モデル動物の作成

マウスもしくはラットにトリニトロベンゼンスルホン酸を注腸すると、10 日目に炎症性腸疾患様の病態を呈する。これを炎症性腸疾患モデル動物として使用する。

多重染色による TRPM2 免疫活性の同定

大腸、脊髄後根神経節を摘出し、上述の方法により固定、凍結切片を作成する。粘膜、筋層、脊髄後根神経節において各種マーカー

を使用して TRPM2 との多重染色を行う。

- ・粘膜 - セロトニン関連因子、炎症性細胞マーカー、TNF- など
- ・腸管神経系 - サブスタンス P、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、一酸化窒素合成酵素、小胞アセチルコリントランスポーターなど
- ・脊髄後根神経節 - NF200、IB4、サブスタンス P、カルシトニン遺伝子関連ペプチドなど

逆行性トレーサーによる脊髄由来神経の同定

神経逆行性トレーサーであるフルオロゴールドを大腸に注入し、数日後に脊髄後根神経節を摘出する。その後 TRPM2、C 線維、A 線維のマーカーなどと多重染色を行うことで、脊髄後根神経節から大腸に投射している神経の特性を明らかにすることができる。

炎症性腸疾患モデルラットを用いた TRPM2 発現の変化

大腸炎症時の TRPM2 の変化について正常動物とモデル動物との比較によって行う。

- ・免疫組織染色
- ・ウエスタンブロッティング

内臓痛覚閾値測定

内臓痛覚閾値の評価はバロスタット装置 (G&J Electronics 社 Distender R)、筋電図記録装置 (本研究にて申請するスターメディカル社 バイオアンプ BA-011、収容ケース PAS-211)、データ解析システムにより行う。内臓痛覚閾値測定前にラットの腹直筋に電極をあらかじめ装着しておく。バルーンを挿入し、バルーン内圧に対する腹直筋の収縮反応を測定する。

術後イレウスモデルの作成と評価

野生型 (WT) と TRPM2 遺伝子欠損 (KO) マウスの回腸に外科的手術 (IM) を施行し術後イレウスモデルマウスを作成した。IM24 時間後に回腸凍結組織とホールマウント標本を作成し、CD68、Ly6B.2、ミエロパーオキシダーゼ (MPO) の染色を行った。さらに炎症誘発性サイトカイン、ケモカインの mRNA 発現を測定した。

4. 研究成果

1) ラット大腸、脊髄後根神経節における TRPM2 の発現

ラット大腸において TRPM2 発現神経の局在を免疫組織化学的に検討したところ、粘膜、粘膜下層、筋層の神経上に局在していることが観察された。さらに脊髄後根神経節においても TRPM2 が発現していることが明らかとなった。各種マーカー、逆行性トレーサーを用いた検討から、ラット大腸に投射している TRPM2 発現神経は内在性、外来性の知覚神経であることが示唆された。続いて TNBS 誘起大腸炎モデルを用いて病態時の TRPM2 の変化を検討した。病態時において TRPM2 発現神経数、発現量はコントロール群と比べ有意に増加した (図 1)。

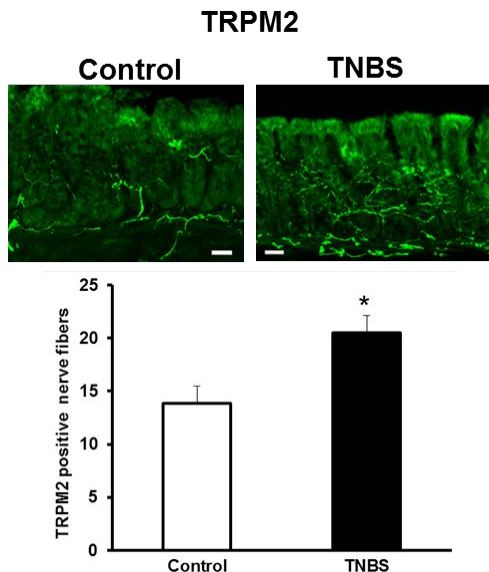


図1 正常動物とTNBS誘起大腸炎モデルにおけるTRPM2の変化

2) ラット大腸炎モデルにおける内臓痛覚過敏への関与

内臓痛覚過敏との関連性を検討するため、バロスタット法により20, 40, 60, 80 mmHgのバルーン圧に対する腹直筋の収縮反応を評価した。TRPM2遮断作用が報告されているエコナゾールを経口投与したところ、正常動物では80 mmHgの圧刺激に対し、TNBSによる内臓痛覚過敏動物では40, 60, 80 mmHgの圧に対し、腹直筋の収縮反応の有意な抑制が認められた。本研究の結果より大腸に注射しているTRPM2は生理的条件下の有害刺激の感知および大腸炎の内臓痛覚過敏の発現に関与していることが示唆された(図2)。

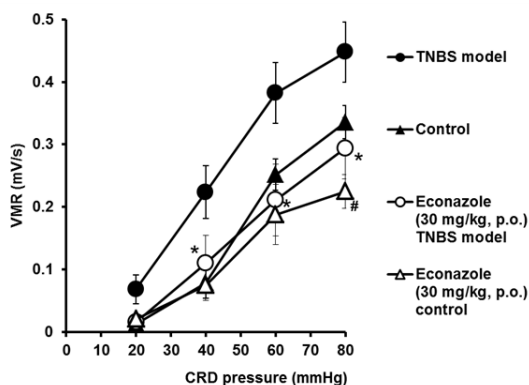


図2 正常動物とTNBS誘起大腸炎モデルにおけるTRPM2抑制薬エコナゾールの効果

マウスTNBSモデルにおいて、野生型(WT)とTRPM2遺伝子欠損(KO)マウスの内臓痛覚閾値の評価を行ったところ、ラットにおけるエコナゾールと同様の結果が得られた。

3) 術後イレウスにおけるTRPM2の役割

術後イレウスモデルにおける腸管運動能の遅延は、WTと比較してTRPM2KOマウスでは有意に改善した。また、術後イレウスモデルにおけるマクロファージ(CD68)および好中球(Ly6B.2)の浸潤、MPO活性はKOマウスで抑制された。さらにサイトカイン/ケモカインのmRNA発現の増加もKOマウスで抑制された。TRPM2はPOIの病態悪化に関与していることが示唆された。

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11件)

1, Matsumoto K, Takagi K, Kato A, Ishibashi T, Mori Y, Tashima K, Mitsumoto A, Kato S, Horie S., Role of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channels in visceral nociception and hypersensitivity., *Exp Neurol.* 2016 Nov;285(Pt A):41-50. DOI: 10.1016/j.expneurol.2016.09.001.

2, Utsumi D, Matsumoto K, Amagase K, Horie S, Kato S., 5-HT3 receptors promote colonic inflammation via activation of substance P/neurokinin-1 receptors in dextran sulphate sodium-induced murine colitis., *Br J Pharmacol.* 2016;173(11):1835-49. DOI: 10.1111/bph.13482.

3, Matsumoto K, Umemoto H, Mori T, Akatsu R, Saito S, Tashima K, Shibasaki M, Kato S, Suzuki T, Horie S., Differences in the morphine-induced inhibition of small and large intestinal transit: Involvement of central and peripheral μ -opioid receptors in mice., *Eur J Pharmacol.* 2016;15:771:220-8. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.12.033.

4, Matsumoto K, Kato S, Horie S., Transient receptor potential cation channels in visceral pain., *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2015;146(4):233-5. DOI: 10.1254/fpj.146.233.

5, Yamane S, Nomura R, Yanagihara M, Nakamura H, Fujino H, Matsumoto K, Horie S, Murayama T., L-Cysteine/D,L-homocysteine-regulated ileum motility via system L and B^o (+) transporter: Modification by inhibitors of hydrogen sulfide synthesis and dietary treatments., *Eur J Pharmacol.* 2015; 5:764:471-9. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.07.042.

6, Maehara T, Matsumoto K, Horiguchi K, Kondo M, Iino S, Horie S, Murata T, Tsubone H, Shimada S, Ozaki H, Horie M., Therapeutic action of 5-HT₃ receptor antagonists targeting peritoneal macrophages in post-operative ileus., *Br J Pharmacol*. 2015;172(4):1136-47. DOI: 10.1111/bph.13006.

7, Matsumoto K., Immunohistochemical analysis of altered serotonin signaling and transient receptor potential vanilloid 1 channels in experimental colitis mice., *Yakugaku Zasshi*. 2014;134(11):1165-70.

8, Matsumoto K, Hosoya T, Ishikawa E, Tashima K, Amagase K, Kato S, Murayama T, Horie S., Distribution of transient receptor potential cation channel subfamily V member 1-expressing nerve fibers in mouse esophagus., *Histochem Cell Biol*. 2014;142(6):635-44. DOI: 10.1007/s00418-014-1246-6.

9, Hosoya T, Matsumoto K, Tashima K, Nakamura H, Fujino H, Murayama T, Horie S., TRPM8 has a key role in experimental colitis-induced visceral hyperalgesia in mice., *Neurogastroenterol Motil*. 2014;26(8):1112-21. DOI: 10.1111/nmo.12368.

10, Raimura M, Tashima K, Matsumoto K, Tobe S, Chino A, Namiki T, Terasawa K, Horie S., Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide is involved in gastric mucosal hyperemic response to capsaicin in rats., *Pharmacology*. 2013;92(1-2):60-70. DOI: 10.1159/000351853.

11, Matsumoto K, Nakajima T, Sakai H, Kato S, Sagara A, Arakawa K, Tashima K, Narita M, Horie S., Increased expression of 5-HT₃ and NK 1 receptors in 5-fluorouracil-induced mucositis in mouse jejunum., *Dig Dis Sci*. 2013;58(12):3440-51. DOI: 10.1007/s10620-013-2709-7.

〔学会発表〕(計10件)

1, Kenjiro Matsumoto, Daichi Utsumi, Kikuko Amagase, Makoto Tominaga, Shinichi Kato: Transient receptor potential vanilloid 4(TRPV4) regulates vascular endothelial permeability during colonic inflammation in dextran sulfate sodium(DDS)- induced murine colitis. American Gastroenterological Association

(San Diego, USA), 2016.5.

2, 大谷 彩、松本健次郎、田嶋公人、天ヶ瀬紀久子、堀江俊治、加藤伸一: ラット消化管における TRPM2 チャネルの発現と TNBS 誘起内臓痛覚過敏との関与. 第 89 回日本薬理学会年会 (横浜), 2016.3.

3, 宮本明日香、松本健次郎、天ヶ瀬紀久子、堀江俊治、加藤伸一: TRPM2 チャネルの発現と TNBS 誘起ラット内臓痛覚過敏との関与. 第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (大阪), 2015.10.

4, Kenjiro Matsumoto, Riho Yamaba, Daichi Utsumi, Kikuko Amagase, Makoto Tominaga, Shinichi Kato: Vascular endothelial transient receptor potential vanilloid 4 links colonic inflammation in dextran sulfate sodium-induced colitis model mice. American Gastroenterological Association (Washington, USA), 2015.5.

5, 那須円香、宇佐見龍逸、松本健次郎、天ヶ瀬紀久子、田嶋公人、堀江俊治、加藤伸一: Transient Receptor Potential Melastatin 2 チャネルの発現とラット大腸炎モデルにおける内臓痛覚過敏への関与. 日本薬学会第 135 年会 (神戸), 2015.3.

6, 松本健次郎、田嶋公人、天ヶ瀬紀久子、加藤伸一、堀江俊治: 大腸炎モデルラットの内臓痛覚過敏状態における Transient Receptor Potential Melastatin 2 チャネルの関与. 第 42 回日本潰瘍学会 (東京), 2014.10.

7, 松本健次郎、細谷拓司、田嶋公人、天ヶ瀬紀久子、加藤伸一、堀江俊治: 炎症性腸疾患モデル動物の内臓痛覚過敏状態における TRPM8 チャネルの機能. 第 10 回 TRPM チャネル研究会 (岡崎), 2014.6.

8, Kenjiro Matsumoto, Kimihito Tashima, Shinichi Kato and Syunji Horie: Role of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channels in visceral pain and hypersensitivity in rats. American Gastroenterological Association (Chicago, USA), 2014.5.

9, 松本健次郎、渡辺智章、五十幡陽、高木加奈子、田嶋公人、堀江俊治: ラット腸管神経系、脊髄後根神経節における TRPM2 チャネルの局在に関する免疫組織学的検討. 第 9 回 TRPM チャネル研究会 (岡崎), 2013.6.

10, Kenjiro Matsumoto, Tomoaki Watanabe, Minami Isohata, Kimihito Tashima, Syunji Horie: Distribution of transient receptor

potential melastatin 2
channels-expressing nerve fibers in rat
alimentary tract and dorsal root ganglion.
Digestive Disease Week 2013(Orland),
2013.5.

〔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〕

ホームページ等

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/chiryou/chiryou-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 健次郎 (Matsumoto Kenjiro)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10406770

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし