

温度・痛みを感じる体のしくみ

ーカルシウム・ナトリウム透過性チャネルの多彩な働きー

富永 真琴

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター細胞生理研究部門 教授

細胞は、それを取り巻く環境の変化の中で、その環境情報を他のシグナルに変換し、細胞質・核や周囲の細胞に伝達することによって環境変化にダイナミックに対応している。さらに、細胞で得られた感覚情報は生物個体の生存適応に必要な個体の感覚情報へと統合される。特に、視覚、聴覚、味覚、嗅覚等では細胞で得られる感覚情報はそのまま個体の感覚情報となる。細胞外環境情報は大きく化学物質情報と物理情報に分けられており、化学物質にはイオン、アミノ酸、蛋白質、脂質等に加えて、匂い、フェロモン、味物質などの低分子有機化合物からガス(一酸化窒素や二酸化炭素)にいたるまで多岐にわたる物質が含まれ、物理情報には電位変化、容積変化、光、浸透圧、機械刺激、温度刺激等が含まれる。細胞外環境に直接接する膜蛋白質は細胞膜センサーとして細胞感覚に重要な役割を果たしているが、特に TRP チャネルは化学物質刺激・物理刺激のセンサーとして注目を浴びている。

trp 遺伝子は 1989 年にショウジョウバエの光受容応答変異株の原因遺伝子として発見され、*trp* 変異株において光刺激に対する受容器電位 (receptor potential) 変化が一過性 (transient) であることから命名された。*trp* がコードする蛋白質 (TRP) の多くはカルシウム透過性の高い非選択性陽イオンチャネルを形成している。遺伝子解析の結果、図1に示すように多くの TRP ホモログが同定され、TRP イオンチャネルスーパーファミリーは 7 つのサブファミリー: TRPC (canonical), TRPM (melastatin), TRPV (vanilloid), TRPML (mucolipin), TRPP (polycystin), TRPA (ankyrin), TRPN (nompC) に分けられるが、哺乳類には TRPN サブファミリーはなく 28 のチ

ャネルが、そしてヒトでは TRPC2 が偽遺伝子となり 27 のチャネルが 6 つのサブファミリーを構成している (図 1) (Gees et al., 2012)。

それまで「カルシウム・ナトリウム透過性チャネル」と電気生理学的に括られていた一群のチャネルの分子実体が明らかになったことで、その生理的意義が細胞、種を越えて議論できるようになってきた。カルシウム透過性が高いためにチャネル開口によるカルシウム流入が細胞内の様々なカルシウム依存性経路を活性化し、神経細胞においては脱分極から細胞興奮をもたらす。特に、感覚神経では侵害刺激を受容する(侵害刺激を電気信号に変換する)最も簡単で有効的なメカニズムは陽イオンの流入がもたらす脱分極によって電位作動性ナトリウムチャネルを活性化させて活動電位を発生させることであり、その陽イオンの流入を司る陽イオン透過性のイオンチャネルの中心的分子群の1つが TRP イオンチャネルである (Julius, 2013)。そして、10 の TRP チャネル (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM8, TRPA1) に温度感受性があることが報告されている。

TRPV1

1997 年に遺伝子クローニングされたトウガラシの主成分であるカプサイシンの受容体 TRPV1 は、主に無髄の C 線維に発現しており、カプサイシンと同様に痛みを惹起する熱や酸(プロトン)によっても活性化する (Julius, 2013)。この TRPV1 の性質はカプサイシン感受性の侵害受容神経が複数の刺激に応答する (polymodal nociceptors) ことと合致する。TRPV1 の熱による活性化

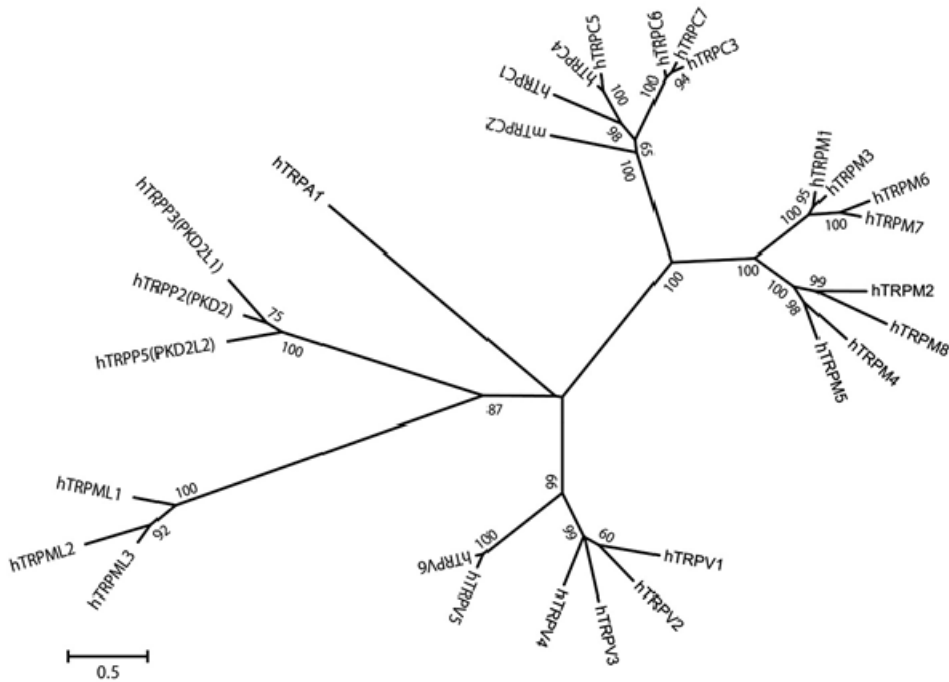


図 1. ヒト TRP チャンネルの分子系統樹

アミノ酸置換数を JTT 法により推定し、最小進化法により分子系統樹を作成した。各枝の数値は統計的な信頼性(ブートストラップ値)を表している。ヒトでは TRPC2 が偽遺伝子となっているので、マウス TRPC2 を用いた。scale: 遺伝的距離(アミノ酸置換率)。

の温度閾値は約 43 度で生体に痛みを引き起こす温度閾値とほぼ一致している。カプサイシン、プロトン、熱という3つの TRPV1 の有効刺激に加えて、複数の TRPV1 の内在性リガンドの候補が報告されている。TRPV1 を発現した細胞を用いた電気生理学的解析に加え、TRPV1 欠損マウスの行動解析によって個体レベルでも TRPV1 が複数の侵害刺激の受容体として機能していることが確認されているが、TRPV1 欠損マウスの最も顕著な表現型は熱性痛覚過敏の減弱であり、TRPV1 が炎症性疼痛の発生に強く関わっていることと合致する。2013 年に低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析から TRPV1 のほぼ全体の構造が 3.4 Å の解像度で明らかにされた(Liao et al., 2013)。さらに、2016 年には脂質 nanodisc 内での構造が明らかにされ、温度によるチャンネル開口に膜脂質が関与するモデルが提唱されている(Gao et al., 2016)。

TRPV4

TRPV4 は、2000 年に低浸透圧(機械伸展刺激)を感知して活性化するイオンチャンネルとして報告され、その後約 30 度以上の温かい温度で活性化することが明らか

かにされた(Gees et al., 2012)。TRPV4 の大きな特徴として、感覚神経よりも上皮細胞に発現が多く見られる。表皮ケラチノサイトが TRPV3(同じく温かい温度で活性化する TRP チャンネル)、TRPV4 によって温度を感知して ATP を介して温度情報を感覚神経に伝えていることを示す実験結果が報告された(Mandadi et al., 2009)。感覚神経と皮膚、2つの組織で環境温を感知しているようである。細胞内でエネルギー源として使われる ATP が神経伝達物質として働くことは広く知られており、グリア細胞から神経細胞、味細胞から味神経など、ひろく情報伝達に関わっていることが明らかになっている。TRPV4 欠損マウスは野生型マウスより高い温度帯に滞在し、また、45~46 度の侵害熱刺激への応答がそれぞれ減弱していた。これらの結果は、TRPV4 が適切な環境温の選別や侵害熱の感知に関わる可能性を示している。TRPV4 はまた、皮膚ケラチノサイトで活性化して皮膚のバリア機能に関わることが明らかになっている(Sokabe et al., 2010)。TRPV3 や TRPV4 が表皮ケラチノサイトで環境温の受容に関わっていることから、「感覚組織としての上皮」という概念が提唱されている。事実、尿がたまって尿

意を感じさせる最初の細胞は膀胱の上皮ではないかという報告がされて注目を集めた。尿がたまって膀胱壁が伸展された機械刺激を膀胱上皮細胞に発現する TRPV4 が体温下で感知して Ca^{2+} を流入させ ATP を放出して感覚神経にその情報を伝達している、というのである (Mochizuki et al., 2009)。事実、情報を受け取る側の感覚神経の ATP 受容体欠損マウスでは膀胱機能異常が起こるといふ。

TRPV1/TRPV4 と anoctamin 1

私たちは、体温下においてマウス脳脈絡叢上皮細胞のアピカル膜で恐らく機械刺激を感知して活性化した TRPV4 を介して流入したカルシウムが TRPV4 に結合したカルシウム活性化クロライドチャンネルの anoctamin1 (ANO1) を活性化させることを報告した (Takayama et al., 2014)。脳脈絡叢上皮細胞は細胞内クロライド濃度が高いので、ANO1 の活性化はクロライドを流出させ、それが駆動力となって水が流出すると考えられる。これは、脳脊髄液産生の分子メカニズムの一つと推定される。同様のカルシウム透過性の高い TRP チャンネルと ANO1 の機能連関は多くの細胞で起こっていると推定され、クロライドの移動方向は純粋にクロライドイオンの平衡電位で決定されると考えられる (Tominaga and Takayama, 2014) (図 2)。

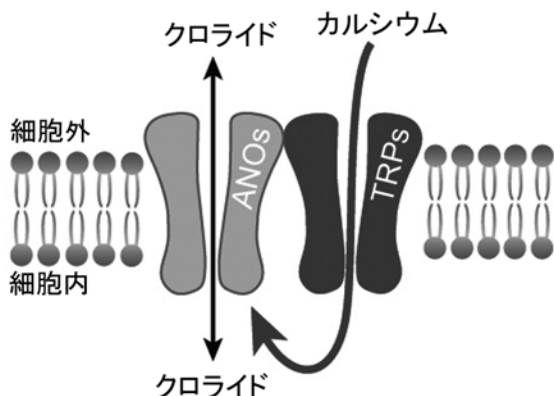


図 2. Anoctamin (ANO) と TRP チャンネルの機能連関によるクロライド移動のモデル図

TRP チャンネルを介して流入したカルシウムがカルシウム活性化クロライドチャンネル ANO を活性化させる。クロライドの移動方向はその細胞が持つクロライドイオンの平衡電位で決定される。

そこで、同じような TRP チャンネルと ANO1 の機能連関をマウス感覚神経で検討した。中枢神経細胞では細胞内クロライドイオン濃度が低いのでクロライドチャンネルの開口はクロライドイオンの流入 (過分極) をもたすが、感覚神経では細胞内クロライドイオン濃度が高いのでクロライドチャンネルの開口はクロライドの流出 (脱分極) をもたすが、これは、侵害刺激による神経応答の増強を意味する。特異的抗体を用いた免疫染色法による解析で、80-90% の TRPV1 発現細胞に ANO1 が発現していることが確認された。また、TRPV1 と ANO1 を共発現させた HEK293T 細胞でカプサイシンによる細胞外カルシウム依存性のクロライド電流の活性化が観察された。マウス感覚神経においてもカプサイシンによる内向き電流が ANO1 阻害剤 T16Ainh-A01 (A01) で有意に抑制され、A01 はカプサイシンによる活動電位発生も抑制した。さらに、イオンチャンネル型 ATP 受容体を活性化する $\alpha\beta$ methylenesATP による疼痛関連行動は A01 によって抑制されなかったが、カプサイシンによる疼痛関連行動は A01 で有意に抑制された (図 3)。私たちは、カプサイシンによる痛みは TRPV1 活性化による陽イオン流入が脱分極から活動電位が発生して起こるものと理解しているが、TRPV1 を介して流入したカルシウムイオンによって活性化した ANO1 によるクロライド流出が実は脱分極のかなりの部分を担っていることが明らかになった (図 3) (Takayama et al., 2015)。

TRPM2

TRPM2 は種々の温度依存的な生理応答に重要であり (Gees et al., 2012)、さらに、最近、感覚神経や視床下部神経に発現する TRPM2 が温かい温度感知やそれに基づく生理機能に関わることが報告されて注目を浴びている (Song et al., 2016; Tan and McNaughton, 2016; Zhong et al., 2016)。TRPM2 はカルボキシル末端に刺激物質 β -NAD や ADP リボースの結合部位があり、温度とリガンドの同時刺激で活性が増強する。膵臓の β 細胞では深部体温下で常に活性化し、インスリン分泌に寄与することが示されており、TRPM2 欠損マウスは耐糖能異常を示す (Uchida and Tominaga, 2014)。TRPM2 欠損マウスでは、小腸から分泌されるインスリン放出を促すインクレチンホルモンによる膵臓からのインスリン分泌が

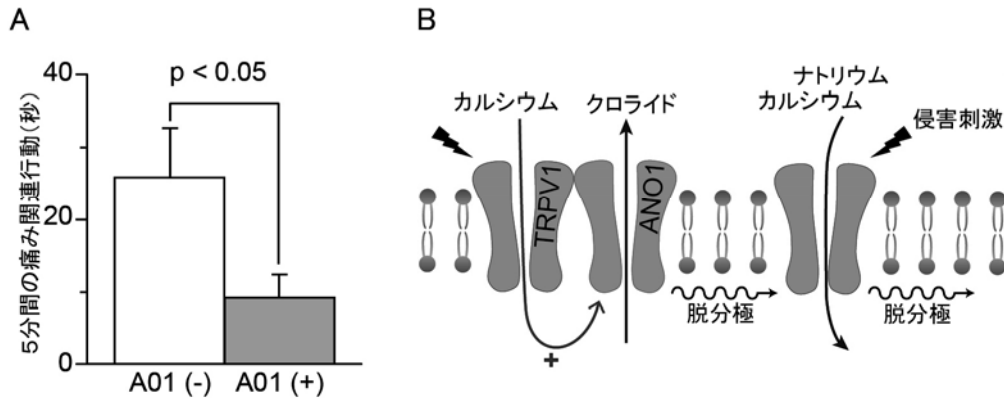


図 3. カプサイシンによる痛み関連行動への ANO1 阻害剤の効果と感覚神経細胞でのモデル図

(A) マウス後肢足底へのカプサイシン投与による痛み関連行動の ANO1 阻害剤 T16Ainh-A01 (A01)による抑制。(B) 感覚神経では、侵害刺激による TRPV1 の活性化によって陽イオンが細胞内に流入して脱分極するが、同時に TRPV1 を通って流入したカルシウムは ANO1 を活性化してクロライドが流出し、さらなる脱分極が引き起こされる。

阻害されており、膵臓の機能に大きく関わる事が明らかになっている。

TRPM2 は、レドックス感受性を持つ TRP チャンネルのひとつであるが、リンパ球からミクログリアまで免疫細胞に広く発現することから、炎症との関連が数多く報告されている (Yamamoto et al., 2008; Di et al., 2012)。私たちはこれまでに、過酸化水素がアミノ末端のメチオニン残基 (Met214) を酸化して TRPM2 の活性化温度閾値を低下させて熱刺激に対する応答性を増強させることを明らかにした (Kashio et al., 2012)。つまり、活性酸素が産生される炎症環境においては、TRPM2 チャンネルが体温レベルの温度で活性化できるようになることで細胞内のカルシウム濃度を上昇させて免疫応答を増強すると考えられる。実際に、TLR2 リガンドであるザイモサン刺激で惹起されるサイトカイン遊離は TRPM2 欠損マクロファージで減弱しており、ザイモサン貪食能も TRPM2 の発現と温度に依存して増強した。炎症は血管拡張による局所温度の上昇を伴うが、炎症部位の冷却が症状の軽減に有効であることはこの現象からも理解しやすい。また、マクロファージに発現する TRPM2 は、ケモカイン遊離およびそれに伴う炎症部位への好中球の遊走を亢進すること、脊髄ミクログリアに発現する TRPM2 の活性が炎症性疼痛モデルおよび神経障害性疼痛モデルにおいて機械刺激痛覚過敏を増悪させることが示されている。一方で、TRPM2 は活性酸素の産生を抑制するネガティブフ

ィードバック機構にも関わる事が報告されていることから、レドックスシグナルと TRPM2 機能が協調的に免疫機能を調節しており、そのバランスの破綻が炎症の慢性化に関わると考えられる。この TRPM2 のレドックスセンサーとしての機能は、膵臓でのグルコース依存性のインスリン放出にも関わっている (Kahsio et al., 2015)。

文献

- Di, A., Gao, X.P., Qian, F., Kawamura, T., Han, J., Hecque, C., Ye, R.D., Vogel, S.M., Malik, A.B. (2012) The redox-sensitive cation channel TRPM2 modulates phagocyte ROS production and inflammation. *Nat Immunol* 13: 29-34, 2012.
- Gao, Y., Cao, E., Julius, D., Cheng, Y. (2016) TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. *Nature* 534: 347-351.
- Gees, M., Owsianik, G., Nilius, B. and Voets, T. (2012) TRP channels. *Comp Physiol* 2: 563-608
- Julius, D. (2013) TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29: 355-384.
- Kashio, M., Sokabe, T., Shintaku, K., Uematsu, T., Fukuta, N., Kobayashi, N., Mori, Y., Tominaga, M. (2012) Redox signal-mediated sensitization of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. *Proc Natl*

- Acad Sci USA 109: 6745-6750.
- Kshio, M. and Tominaga, M. (2015) Redox Signal-mediated Enhancement of the Temperature Sensitivity of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Elevates Glucose-induced Insulin Secretion from Pancreatic Islets. *J Biol Chem* 290: 12435-12442.
- Liao, M., Cao, E., Julius, D. and Cheng, Y. (2013) Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504: 107-112.
- Mandadi, S., Sokabe, T., Shibasaki, K., Katanosaka, K., Mizuno, A., Moqrich, A., Patapoutian, A., Fukumi-Tominaga, T., Mizumura, K. and Tominaga, M. (2009) TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. *Pflüger Archiv Eur J Physiol* 458: 1093-1102.
- Mochizuki, T., Sokabe, T., Araki, I., Fujishita, K., Shibasaki, K., Uchida, K., Naruse, K., Koizumi, S., Takeda, M. and Tominaga, M. (2009) The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca^{2+} influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. *J. Biol. Chem.* 284: 21257-21264.
- Sokabe, T., Fukumi-Tominaga, T., Yonemura, S., Mizuno, A. and Tominaga, M. (2010) The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 285: 18749-18758.
- Son, K., Wang, H., Kamm, G.B., Pohle, J., Reis, F. de C., Heppensrall, P., Wende, H., Siemens, J. (2016) The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia. *Science* (in press)
- Takayama, Y., Shibasaki, K., Suzuki, Y., Yamanaka, A. and Tominaga, M. (2014) Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anoctamin 1. *FASEB J* 28: 2238-2248.
- Takayama, Y., Uta, D., Furue, H. and Tominaga, M. (2015) Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 5213-5218.
- Tan, C.-H., McNaughton, P.A. (2016) The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature* 536: 460-463.
- Tominaga, M. and Takayama, Y. (2014) Interaction between TRP and Ca^{2+} -activated chloride channels. *Channels* 8: 3.
- Uchida, K. and Tominaga, M. (2014) The role of TRPM2 in pancreatic beta-cells and the development of diabetes. *Cell Calcium* 56: 332-339.
- Yamamoto, S., Shimizu, S., Kiyonaka, S., Takahashi, N., Wajima, T., Hara, Y., Negoro, T., Hiroi, T., Kiuchi, Y., Okada, T., Kaneko, S., Lange, I., Fleig, A., Penner, R., Nishi, M., Takeshima, H., Mori, Y. (2008) TRPM2-mediated Ca^{2+} influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med* 14: 738-747.
- Zhong, J., Amina, S., Liang, M., Akther, S., Yuhi, T., Nishimura, T., Tsuji, C., Tsuji, T., Liu, H.X., Hashii, M., Furuhashi, K., Yokoyama, S., Yamamoto, Y., Okamoto, H., Zhao, Y.J., Lee, H.C., Tominaga, M., Lopatina, O., Higashida, H. (2016) Cyclic ADP-Ribose and Heat Regulate Oxytocin Release via CD38 and TRPM2 in the Hypothalamus during Social or Psychological Stress in Mice. *Front Neurosci* 10: 304.

講演者略歴

富永 真琴(とみなが まこと)

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター(生理学研究所)教授。1984年愛媛大学医学部卒業。同年より京都大学附属病院内科研修医、浜松労災病院循環器内科医として勤務の後、1988年に京都大学大学院医学研究科博士課程入学。1992年同大学院修了後、1993年自然科学研究機構生理学研究所助手。1996年からカリフォルニア大学サンフランシスコ校博士研究員。1999年筑波大学基礎医学系講師、2000年三重大学医学部教授(生理学第一講座)を経て2004年から現職。1958年生まれ。