
助成研究報告書

医学プロジェクト研究

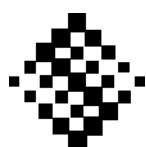
(2012－2014年度)

センサーとしてのCa²⁺透過性チャネルの制御機構とその生理学的意義

Calcium-Permeable Channels as Sensors:
Their Regulation Mechanisms and Physiological Significance

The Salt Science Research Foundation
Project Research Report

平成28年3月



公益財団法人
ソルト・サイエンス研究財団

プロジェクト研究報告書 目次

医学分野

12C - 14C センサーとしての Ca^{2+} 透過チャネルの制御機構とその生理学的意義

1	まえがき	
	富永 真琴 (自然科学研究機構)	1
2	温度感受性 TRPM2 チャネルを介した免疫機構の研究 (12C1 - 14C1)	
	富永 真琴 (自然科学研究機構)	5
3	発生期の神経回路形成を制御する膜伸展刺激受容体 TRPV2 (12C2 - 14C2)	
	柴崎 貢志 (群馬大学)	2 3
4	TRP チャネルを介したマウス嗅覚による CO_2 感知機構の解析 (12C3 - 14C3)	
	高橋 弘雄 (奈良県立医科大学)	4 1
5	がん化学療法により誘発される知覚異常・しびれにおける TRPA1 の役割に関する研究 (12C4 - 14C4)	
	中川 貴之 (京都大学)	5 5
6	将来展望	
	富永 真琴 (自然科学研究機構)	7 5

CONTENTS

PROJECT RESEARCHES OF MEDICAL SCIENSE

12C - 14C Calcium-Permeable Channels as Sensors: Their Regulation Mechanisms and Physiological Significance

1	Foreword	
	Makoto Tominaga (National Institute of Natural Sciences)	3
2	Molecular Mechanisms of Immune System Involving Thermosensitive TRPM2 Channel (12C1 - 14C1)	
	Makoto Tominaga (National Institute of Natural Sciences)	2 0
3	Mechanosensor TRPV2 Regulates Axonal Outgrowth during Development (12C2 - 14C2)	
	Koji Shibasaki (Gunma University)	4 0
4	Molecular Basis of CO ₂ Sensing in the Mouse Olfactory System (12C3 - 14C3)	
	Hiroo Takahashi (Nara Medical University)	5 4
5	Research on the Roles of TRPA1 in the Cancer Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (12C4 - 14C4)	
	Takayuki Nakagawa (Kyoto University)	7 4
6	Perspective	
	Makoto Tominaga (National Institute of Natural Sciences)	7 6

まえがき

プロジェクト研究課題名: センサーとしての Ca^{2+} 透過性チャネルの制御機構とその生理学的意義

富永 真琴

プロジェクトリーダー

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター教授

Ca^{2+} はその細胞外濃度と細胞内濃度に1万倍以上の差があり、それゆえ細胞内へ流入した Ca^{2+} はセカンドメッセンジャーとして機能する。 Ca^{2+} チャネルではこれまで、主に神経細胞・筋肉細胞に発現する電位作動性 Ca^{2+} チャネルに関して精力的な研究がなされてきたが、1989年にショウジョウバエの眼の光受容器変異体の原因遺伝子のコードする蛋白として初めてTRP (transient receptor potential: 一過性受容器電位)チャネルが報告されて以来、数々のTRPチャネルが発見され、哺乳類ではTRPC、TRPV、TRPM、TRPML、TRPP、TRPAの6つのサブファミリーに分けられる27のチャネルの存在が明らかになっている。TRPチャネルは非選択性陽イオンチャネルとして機能するが、その多くは高い Ca^{2+} 透過性をもつ。身体の中のほとんどの細胞が複数種のTRPチャネルを発現しており、これらのTRPチャネルはそれらの細胞で重要な Ca^{2+} の流入経路として機能することが明らかになりつつある。

それまで「非選択性陽イオンチャネル non-selective cation channels」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り、チャネル研究が大きく進展した。TRPチャネル研究のbreak throughは、そのいくつかがセンサーとして様々な細胞外刺激の感知を行うことが明らかになったことである。その最初がカプサイシン受容体として知られる1997年の

TRPV1の遺伝子クローニングである。感覚に關与する受容体として研究がもっとも遅れていたのが物理刺激センサーであり、TRPV1は直接熱を感知して活性化することから大きな注目を浴びた。その論文は2016年1月30日の時点でcitationが4,613回を数える。PubMedで「transient receptor potential」とtype inすると10,000を越える論文がhitする。TRPV1の遺伝子クローニング論文が4,613回引用されていることを考えると、この数字は実際の論文数よりかなり少ないと思われるが、それでも、ここ数年での指数関数的な論文数の増加が見て取れる(図1)。

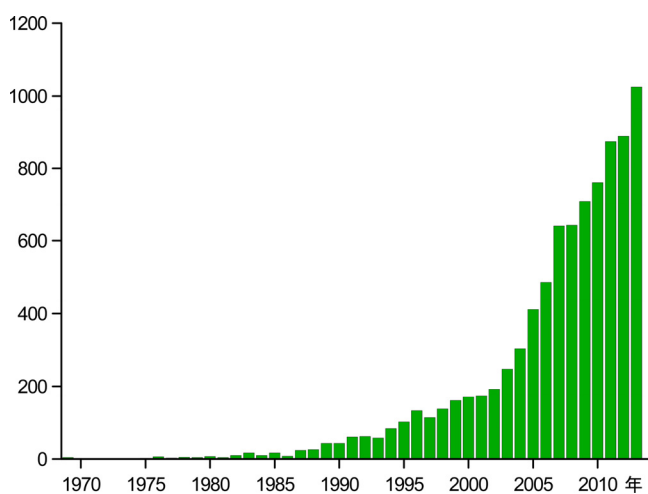


図1. PubMedで「transient receptor potential」で検索した論文数の推移

様々な刺激によって開口することが明らかになっている TRP チャンネルであるが、化学物質のみならず温度や機械刺激といった物理刺激をも感知して活性化することが注目を浴び、その活性化機構や生理的意義の解明は、生命現象における Ca^{2+} の重要性を理解する上で、焦眉の課題となっている。そこで、TRP チャンネルによるセンシング機構の解明に焦点を絞って、以下の4つのサブテーマ(温度センシング機構・機械刺激センシング機構・ガスセンシング機構・化学物質センシング機構)でプロジェクト研究を行った。

富永真琴(温度センシング機構)

「温度感受性 TRPM2 チャンネルを介した免疫機構の研究」

柴崎貢志(機械刺激センシング機構)

「発生期の神経回路形成を制御する膜伸展刺激受容体 TRPV2」

高橋弘雄(ガスセンシング機構)

「TRP チャンネルを介したマウス嗅覚による CO_2 感知機構の解析」

中川貴之(化学物質センシング機構)

「がん化学療法により誘発される知覚異常・しびれにおける TRPA1 の役割に関する研究」

複数の TRP チャンネルによる温度、機械刺激、ガスおよび化学物質のセンシング機構と流入による生理学的意義の解明にいたる素晴らしい研究成果が得られた。また、本プロジェクト研究の成果は、評価の高い国際誌に掲載された。

1. Takayama Y, Shibasaki K, Suzuki Y, Yamanaka A, Tominaga M. Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anoctamin 1. *FASEB J.* 28: 2238-2248, 2014.
2. Takayama Y, Uta D, Furue H, Tominaga M. Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112(6): 5213-5218, 2015.
3. Kashio M, Tominaga M. Redox signal-mediated enhancement of the temperature sensitivity of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) elevated glucose-induced insulin secretion from pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 290 (19): 12435-12442, 2015.
4. Naruse, M., Shibasaki, K., Yokoyama, S., Kurachi, M. and Ishizaki, Y. Dynamic Changes of CD44 Expression from Progenitors to Subpopulations of Astrocytes and Neurons in Developing Cerebellum. *PLoS ONE*, 8: e53109, 2013.
5. Shibasaki, K., Ishizaki, Y. and Mandadi, S. Astrocytes Express Functional TRPV2 Ion Channels. *Biochem Biophys Res Commun*, 441: 327-332, 2013.
6. Shibasaki, K., Ikenaka, K., Tamalu, F., Tominaga, M. and Ishizaki, Y. A Novel Subtype of Astrocytes Expressing TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid 4) Regulates Neuronal Excitability via Release of Gliotransmitters. *J Biol Chem*, 289: 14470-14480, 2014.
7. Yoshihara, S., Takahashi, H., Nishimura, N., Kinoshita, M., Asahina, R., Kitsuki, M., Tatsumi, K., Furukawa-Hibi, Y., Hirai, H., Nagai, T., Yamada, K. and Tsuboi, A. Npas4 Regulates Mdm2 and thus Dcx in Experience-Dependent Dendritic Spine Development of Newborn Olfactory Bulb Interneurons. *Cell Reports*, 8: 843-857, 2014.
8. Zhao, M., Isami, K., Nakamura, S., Shirakawa, H., Nakagawa, T. and Kaneko, S. Acute Cold Hypersensitivity Characteristically Induced by Oxaliplatin Is Caused by the Enhanced Responsiveness of TRPA1 in Mice. *Mol Pain*, 8: 55, 2012.

Foreword

A project research: 'Regulation mechanisms of Ca²⁺-permeable channels as sensors and their physiological significance'

Makoto Tominaga

Project Leader

Professor, Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institute of Natural Sciences

There is more than 10,000-time difference in the Ca²⁺ concentrations between intracellular and extracellular solutions. Accordingly, Ca²⁺ ions entering the cells work as the second messengers. The research about Ca²⁺ channels has been mainly performed by focusing on the voltage-gated Ca²⁺ channels expressed in neurons and muscle cells. However, a lot of transient receptor potential (TRP) channels have been isolated since a cloning of the prototypical member in *Drosophila* as a protein encoded by the gene involved in the mutant having abnormal light responsiveness. There are now 27 TRP channels in mammals composed of 6 subfamilies; TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPP and TRPA. Many of the TRP channels work as non-selective cation channels having relatively high Ca²⁺ permeability. Most cells in our body express multiple TRP channels and they function as important pathways for Ca²⁺ influx. Although TRP channels are activated by various stimuli, it is noted that some of them can be activated by not only chemical substances but also by physical stimuli such as temperature and mechanical ones, and the clarification of their activation mechanisms and physiological significance has a lot of attention in order to understand the importance of Ca²⁺ for the life phenomena. Based on this background, we performed a project research titled 'Regulation mechanisms of Ca²⁺-permeable channels as sensors and their physiological significance' focusing on the TRP channels involved in sensing of temperature, mechanical stimuli, gas and chemical substances.

温度感受性 TRPM2 チャンネルを介した免疫機構の研究

富永 真琴¹, 加塩 麻紀子², 高山 靖規¹

¹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

²京都府立医科大学大学院医学研究科

概要 TRPM2 は、大きな TRP イオンチャンネルスーパーファミリーに属する Ca^{2+} 透過性の高い非選択性陽イオンチャンネルで、脳、膵臓、脾臓、腎臓や種々の免疫系の細胞における発現が報告されており、adenosine diphosphate ribose (ADPR) により活性化されること、細胞内 Ca^{2+} により活性化が促進されること、低濃度の ADPR 存在下で体温程度の温かい温度で活性化されることがよく知られている。温度によって活性化する温度感受性 TRP チャンネルの 1 つと考えられている。この温度感受性 TRPM2 の免疫機能への関与を明らかにする目的で機能制御機構の解析を行った。

炎症等で産生される過酸化水素が TRPM2 の 1 つのメチオニン残基を直接酸化して活性化温度閾値を 47 度から体温域に低下させて機能増強させることが明らかになった。TRPM2 欠損腹腔マクロファージではこの機能増強は観察されず、内在性 TRPM2 がマクロファージのサイトカイン産生能、貪食能に関わることが判明した。TRPM2 は免疫機能制御薬開発のターゲットになると推察される。TRPM2 の過酸化水素による感作メカニズムがより普遍的なメカニズムであることを証明するためにマウス膵臓で検討を行った。膵臓は還元酵素の機能が低く過酸化水素の影響をより受けやすいこと、グルコースが膵臓での過酸化水素産生をもたらすことが報告されている。単離膵臓β細胞で過酸化水素処置によって腹腔マクロファージと同じように熱応答の増大が観察され、それは TRPM2 欠損膵臓β細胞では見られなかった。また、マウス膵島からのグルコース依存的なインスリンの分泌を 33 度、37 度、40 度で観察したところ、野生型マウスでは温度上昇依存的にインスリン分泌の増大が観察されたが、TRPM2 欠損膵島では観察されなかった。さらに、その野生型マウスでの温度依存的なグルコースによる膵島からのインスリン分泌の増大は還元剤依存的であった。これらのことから、TRPM2 の過酸化水素による機能増強は広く見られる現象であり、マクロファージの免疫機能のみならず膵臓でのグルコース依存的なインスリン分泌にも強く関わるようになった。

この TRPM2 に加えて、温度感受性 TRPV チャンネルに関する解析も行い、脈絡叢上皮細胞 apical 膜で TRPV4 が活性化して Ca^{2+} が流入し、その Ca^{2+} が Ca^{2+} 活性化クロライドチャンネル anoctamin1 を活性化してクロライドイオン流出をもたらして水の流出を駆動することを明らかにした。これは、脳脊髄液産生のメカニズムの 1 つと考えられる。また、感覚神経細胞でもカプサイシンで TRPV1 が活性化して Ca^{2+} が流入し、その Ca^{2+} が anoctamin1 を活性化してクロライドイオン流出をもたらして更なる脱分極を引き起こすことを明らかにした。これは、新規の痛み増強メカニズムと考えられる。

このように、 Ca^{2+} 透過性の高い 3 つの TRP チャンネル TRPM2、TRPV4、TRPV1 の制御機構とその生理的意義を明らかにした。

1. 研究の背景と目的

TRPM2 は、大きな TRP イオンチャンネルスーパーファミリーに属する Ca^{2+} 透過性の高い非選択性陽イオンチャンネルで、脳、膵臓、脾臓、腎臓や種々の免疫系の細胞における発現が報告されており、adenosine diphosphate ribose (ADPR) により活性化されること、細胞内 Ca^{2+} により活性化が促進されること、低濃度の cyclicADPR 存在下で体温程度の温

かい温度で活性化されることがよく知られている。温度によって活性化する温度感受性 TRP チャンネル(図 1)の1つと考えられている。

私たちはこれまで、TRPM2 が膵臓 β 細胞に強く発現し、グルコース依存的なインスリン放出に関与することを報告してきた^(1,2)。TRPM2 欠損マウスから単離した膵臓 β 細胞では温度刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が起こらず、TRPM2 欠損膵島ではグルコース依存的あるいはインクレチン依存的なインスリン放出が野生型膵島と比較して有意に小さかった。また、個体レベルでも、経口または腹腔内投与によるグルコース負荷試験で、TRPM2 欠損マウスは野生型マウスより血糖上昇が大きく回復にもより時間がかかった。これらの結果から、TRPM2 の膵臓 β 細胞におけるインスリン分泌への関与は個体レベルで確認されたと考えた。

TRPM2 は過酸化水素によって活性化されることが報告されており、酸化ストレスによる細胞内 Ca^{2+} 上昇による細胞死との関連が議論されてきたが、その詳細は明らかではない。過酸化水素によって核やミトコンドリアでADPR産生が高まることが一因とされているが、それを否定する論文もある。過酸化水素は細胞死をもたらすだけでなく、ガ

スメッセンジャーとして細胞内や細胞間の情報伝達に関与することが近年明らかになりつつある。細菌感染等による全身的な炎症においては発熱が起こるが、体温上昇は TRPM2 活性を増強させると推測される。軽度の体温上昇(発熱)は免疫機能を強めると考えられているがその分子メカニズムは明らかでないことから、TRPM2 の温度感受性に焦点をあてた機能制御機構の解析が必要だと考えられた。

2. 研究方法と研究結果

HEK293T 細胞にマウス TRPM2 を強制発現させて細胞内 Ca^{2+} 変化を蛍光色素 fura-2 を用いて測定した。2回の40度までの熱刺激を行い、2回の熱刺激の間に過酸化水素処置をした。過酸化水素処置をすると、2回目の熱刺激に対する応答が著しく増強した(図 2A)。この増強は TRPM2 発現細胞(DsRed 陽性細胞)だけで観察されたことから、TRPM2 開口による Ca^{2+} 流入によって起こっているものと考えられた。さらに、この過酸化水素処置による熱応答の増強は過酸化水素の濃度と投与時間の両方に依存したことから(図 2B, C)、化学修飾等によるものと考えられた⁽³⁾。

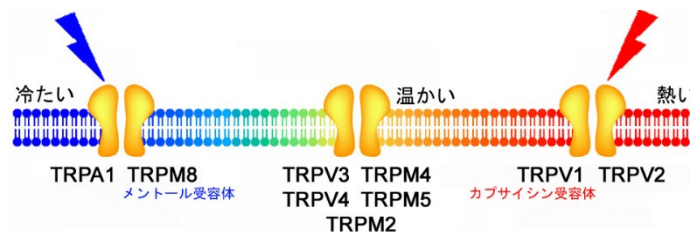


図 1. 9つの温度感受性 TRP チャンネルとその活性化温度領域

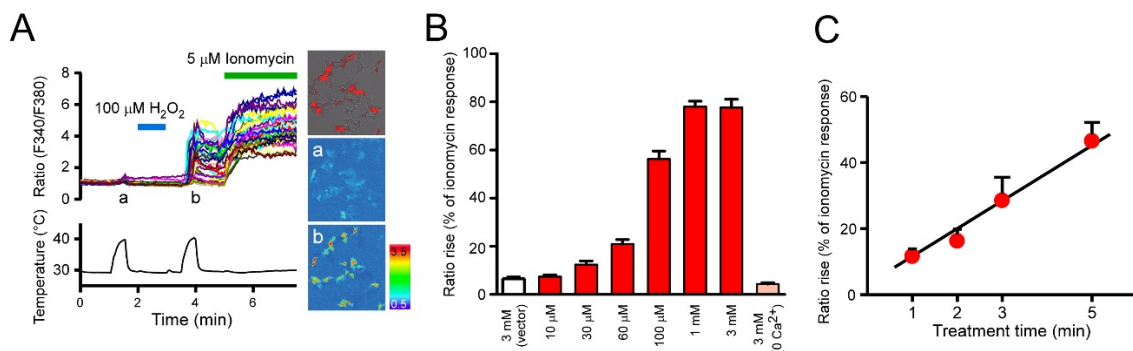


図 2. マウス TRPM2 を発現する HEK293 細胞に2回の熱刺激を行い細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定した。5 μM ionomycin を陽性コントロールとした。DsRed 陽性細胞においてのみ過酸化水素処置後に熱刺激によって Ca^{2+} 濃度上昇がみられる。過酸化水素の濃度依存性(B)と30 μM 過酸化水素処置の曝露時間依存性(C)。(文献 3)から改変引用)

過酸化水素処置によって熱刺激応答性が増強したのは、熱に対する感受性が増大したため(活性化温度閾値が低下したため)と考えられたので、細胞内 Ca^{2+} 濃度測定法で活性化温度閾値を調べたところ、無処置で 47.2 度、100 μM 過酸化水素 1 分処置で 41.7 度、3 mM 過酸化水素 1 分処置で 36.3 度と過酸化水素の濃度依存的に有意に低下し、3 mM 過酸化水素 1 分処置では体温以下になった(図 3A, B) TRPM2 活性化温度閾値は、60 μM の過酸化水素処置で曝露時間依存的にも有意に低下した(図 3B)。全細胞型パッチクランプ法による TRPM2 膜電流測定からの Arrhenius plot による活性化温度閾値解析でも、100 μM 過酸化水素をピペット内に入れたときには 40.2 度、3 mM 過酸化水素を入れたときには 36.3 度と細胞内 Ca^{2+} 濃度測定法と同様に、過酸化水素の濃度依存的に活性化温度閾値の有意な低下が観察された。これらの実験か

ら、TRPM2 活性化温度閾値の低下が TRPM2 の温度応答のメカニズムであろうと考えられ、過酸化水素の作用部位は TRPM2 の細胞内ドメインではないかと推測された。また、この現象は、TRPM2 活性の生理的体温への「感作」と捉えることができると考えた⁽³⁾。

この過酸化水素による TRPM2 の活性化温度の低下に細胞内因子が関わっているかどうかを調べるために、TRPM2 を強制発現させた HEK293 細胞からパッチ膜をひきちぎり、インサイドアウトモードで電流記録を行った。細胞内 Ca^{2+} 濃度測定法の実験と同じように、1回目の温度刺激ではほとんどチャンネル開口は観察されなかったが、300 μM の過酸化水素処置後の2回目の熱刺激に対しては著しいチャンネル開口の増大が観察された(図 4)。このことは、細胞内因子の関与無しに過酸化水素が直接 TRPM2 に作用することを示唆する⁽³⁾。

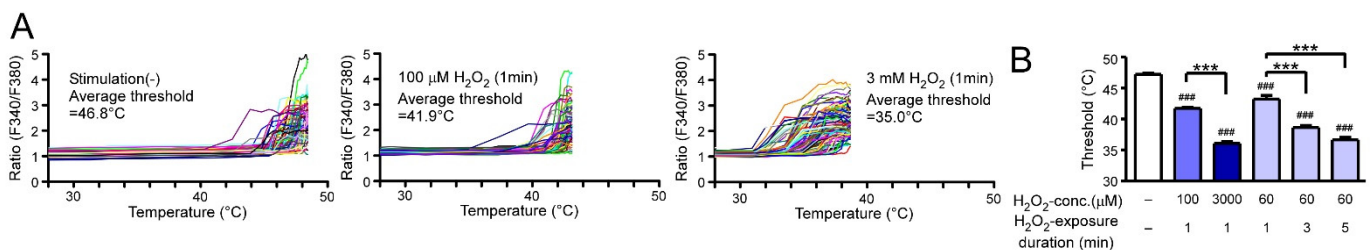


図 3. 細胞内 Ca^{2+} 測定法による TRPM2 の活性化温度閾値の変化 (A) 無処置(左)、100 μM 過酸化水素処置(中)、3 mM 過酸化水素処置(右)で活性化温度閾値が低温側にシフトしている。(B) 定量解析。TRPM2 の活性化温度閾値が過酸化水素の濃度依存的、処置時間依存的に低下した。*** $p < 0.001$, ### $p < 0.001$ vs. 無処置群(左端)。(文献 3)から改変引用)

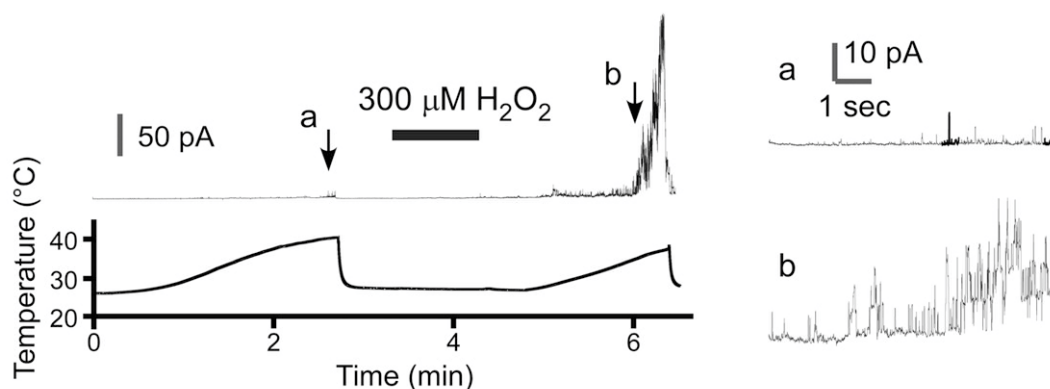


図 4. インサイドアウトパッチにおける TRPM2 単一チャンネル電流の熱応答の過酸化水素処置による増強(左)とその拡大トレース(右)。(文献 3)から改変引用)

過酸化水素による直接の TRPM2 への作用メカニズムとして TRPM2 の酸化を考えた。そこで、よりメチオニンの酸化をもたらすクロラミン T (Ch-T) を用いたところ、過酸化水素処置と同様にインサイドアウト法による単一チャネル電流記録で熱応答の著しい増大が観察された (図 5A)。一方、システインの酸化をもたらす DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) では熱応答の増強は観察されなかった (図 5B) ことから、過酸化水素によって TRPM2 のメチオニンが酸化されて機能増強が起こっているものと推測された⁽³⁾。

過酸化水素による TRPM2 応答増強作用はヒト TRPM2 でも観察されたことから、マウスとヒト TRPM2 に共通するメ

チオニン残基 21 個 (図 6A) をアラニンに置換した点変異体を作成し、細胞内 Ca^{2+} 濃度測定法を用いて過酸化水素による熱応答増強作用を検討した。その結果、214 番目のメチオニンの点変異体のみで増強作用がなくなっており (図 6B)、このメチオニンが過酸化水素の作用標的であると結論した⁽³⁾。

この現象の生理学的意義を明らかにするためにまず、native な細胞において同様な現象が観察されるかどうかを検討した。細胞にはマウス腹腔マクロファージを選んだ。野生型腹腔マクロファージは TRPM2 を発現させた HEK293 細胞と同様に過酸化水素処置で著しい熱応答の増強が観察されたが、TRPM2 欠損マウスから調整した腹

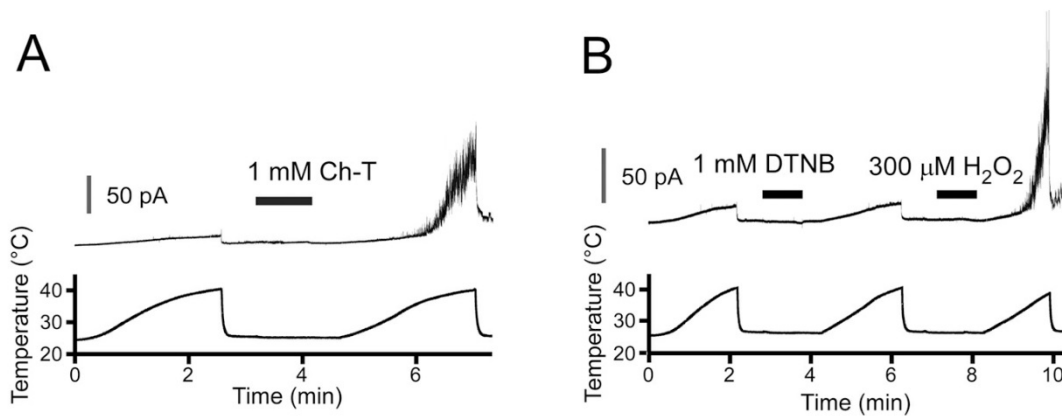


図 5. TRPM2 発現 HEK293 細胞におけるクロラミン T (Ch-T) (A) と DTNB (B) による TRPM2 の熱応答増強作用の検討。(文献 3) から改変引用)

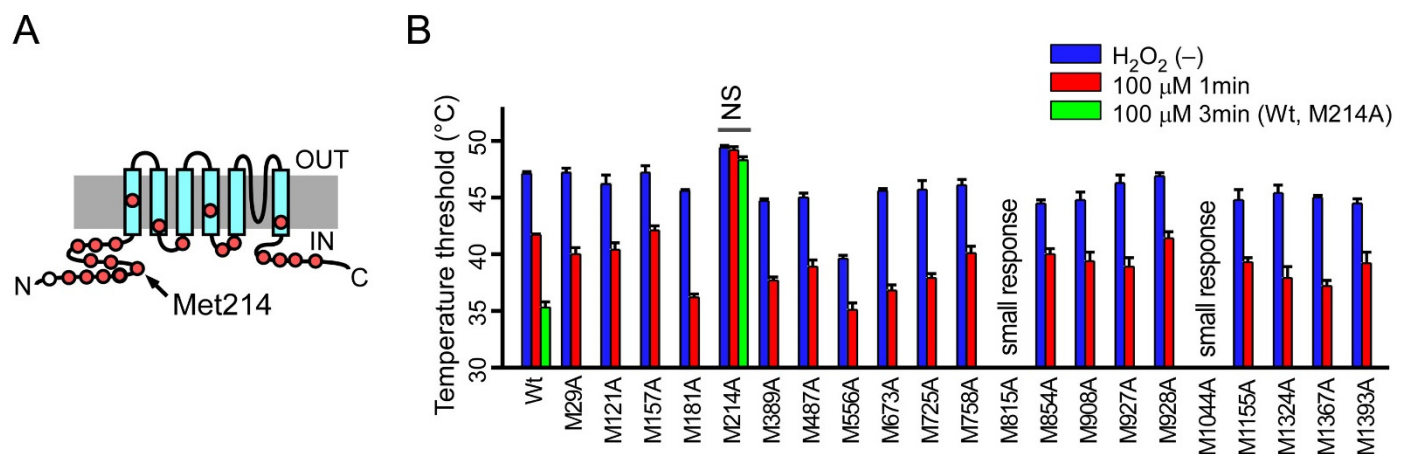


図 6. TRPM2 のメチオニン (Met) 残基 (A)。過酸化水素処置による細胞内 Ca^{2+} 濃度測定法での活性化温度閾値 (B)。M214A でのみ活性化温度閾値が変化しない (NS)。(文献 2) から改変引用)

腔マクロファージでは増強作用が認められなかった(図7)ことから、過酸化水素による TRPM2 の感作機構は native の細胞でも働いていることが分かった⁽³⁾。

そこで、腹腔マクロファージ機能を野生型マウスと TRPM2 欠損マウスで比較検討した。zymosan 刺激による複数のサイトカイン(G-CSF, CXCL2, IL-1 α)産生が TRPM2 欠損腹腔マクロファージで有意に低下していた(図8)⁽³⁾。

過酸化水素による TRPM2 の機能増強(感作)によって TRPM2 の活性化温度閾値は体温域に低下する。過酸化水素が産生されるような炎症においては上昇した体温によって TRPM2 のさらなる機能増強が起こることが推測される。そこで、野生型マウス腹腔マクロファージの細胞内 Ca²⁺濃度変化を観察したところ、36.9 度環境下で 30 μ M 過酸化水素によって胞内 Ca²⁺濃度は少し増加し、そこから 38.2 度への僅か 1.3 度の温度上昇によって細胞内 Ca²⁺濃度はさらに増加した(図9A)。さらに、37 度から 38.5 度への温度上昇によって野生型腹腔マクロファージの食

能は有意に増大したが、そのような温度依存的な食能の増大は TRPM2 欠損腹腔マクロファージでは観察されなかった(図9B)ことから、体温上昇時のマクロファージ機能増強にも TRPM2 が関わっていることが示唆された⁽³⁾。

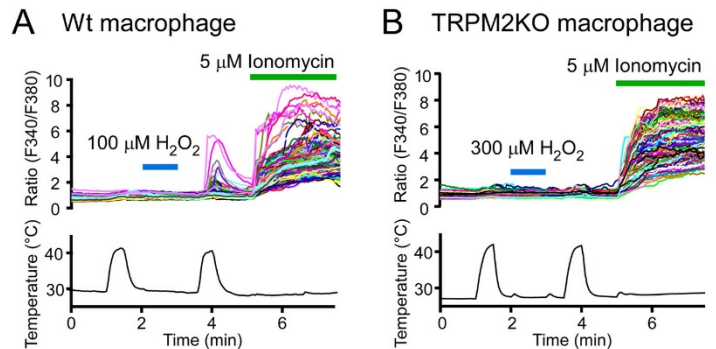


図7. 野生型マウスから得た腹腔マクロファージ(A)と TRPM2 欠損マウスから得た腹腔マクロファージ(B)における過酸化水素処置による熱応答の増強。(文献3)から改変引用)

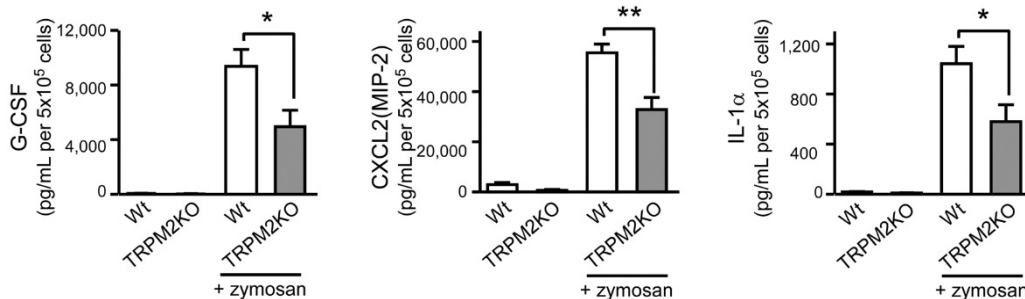


図8. zymosan 刺激に対する G-CSF(左)、CXCL2(中)、IL-1 α (右)産生能の野生型腹腔マクロファージと TRPM2 欠損腹腔マクロファージの比較。* p < 0.05, ** p < 0.01。(文献3)から改変引用)

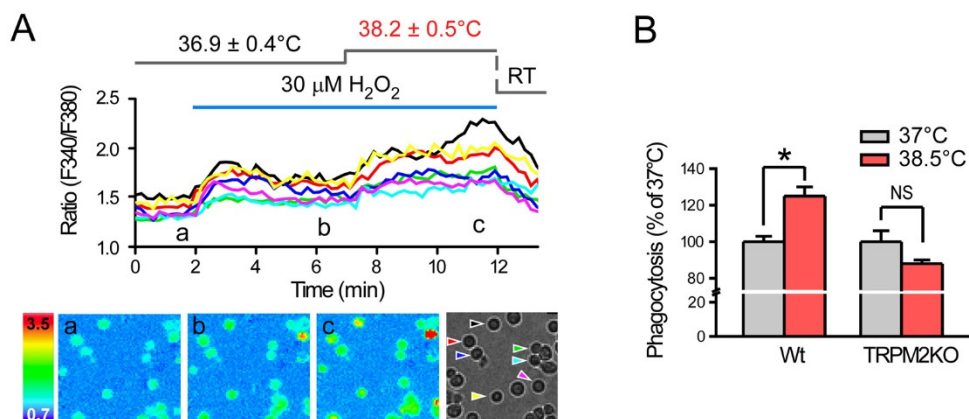


図9. 腹腔マクロファージの温度変化および過酸化水素処置による細胞内 Ca²⁺濃度変化(A)と温度依存性食能の野生型マクロファージと TRPM2 欠損マクロファージの比較(B)。* p < 0.05。(文献3)から改変引用)

TRPM2 の過酸化水素による感作メカニズムがより普遍的なメカニズムかどうかを検討するためにマウス膵臓で解析を行った。膵臓は抗酸化酵素の機能が低く過酸化水素の影響をより受けやすいことが知られている。また、グルコースは膵臓での過酸化水素産生をもたらすことが報告されている。そこで、単離膵臓β細胞を用いて、過酸化水素処置によって腹腔マクロファージと同じように熱応答の増大が観察されるかどうかを細胞内 Ca^{2+} 濃度測定法で検討したところ、野生型膵臓β細胞では過酸化水素処置後の2

回目の熱刺激で応答の増大が観察されたが、TRPM2 欠損膵臓β細胞では観察されなかった(図 10)。

その過酸化水素処置による膵臓β細胞の熱応答の増大は過酸化水素の濃度依存的であった(図 11)。また、40 mM KCl による脱分極を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度増加は野生型膵臓β細胞と TRPM2 欠損膵臓β細胞で差がなかったことから、電位作動性 Ca^{2+} チャネルを介した経路は関係しないことが分かった(図 11)。

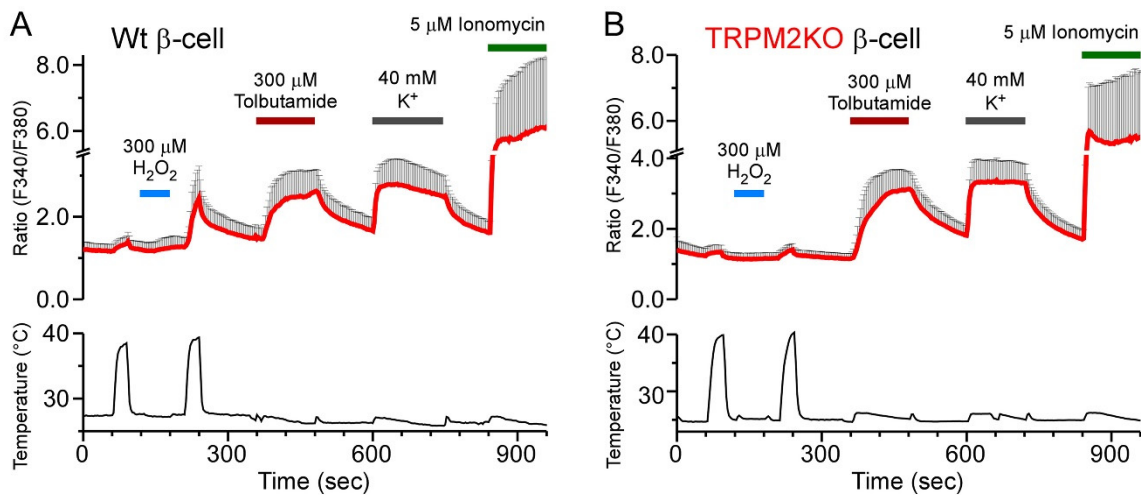


図 10. 単離したマウス野生型膵臓β細胞(A)と TRPM2 欠損膵臓β細胞(B)での温度変化および過酸化水素処置による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化。(文献 4)から改変引用)

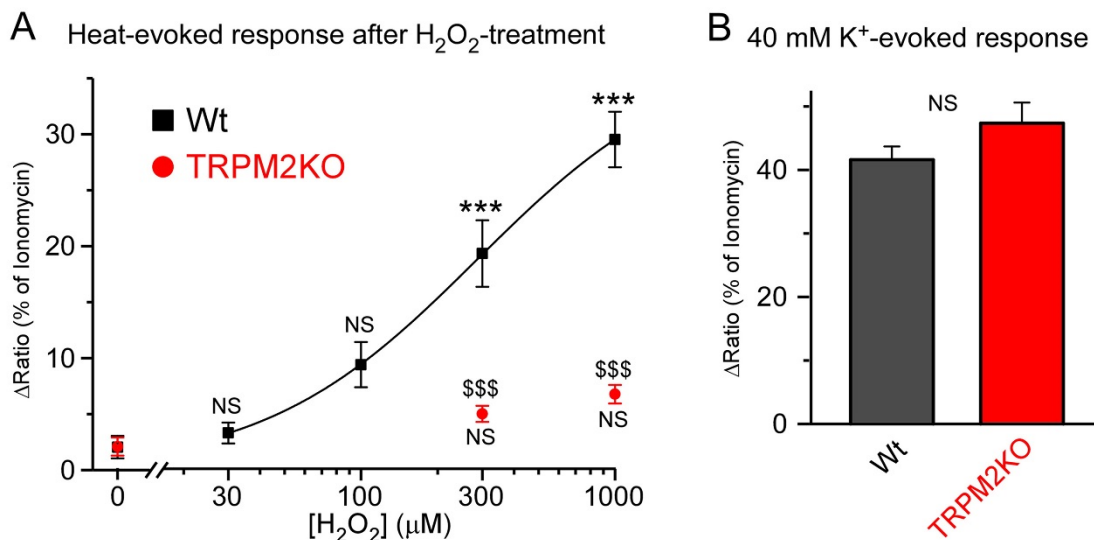


図 11. 野生型マウス膵臓β細胞と TRPM2 欠損膵臓β細胞での熱刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の過酸化水素濃度依存性(A)。脱分極刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の野生型マウス膵臓β細胞と TRPM2 欠損膵臓β細胞での比較(B)。(文献 4)から改変引用)

このマウス膵臓β細胞での応答のインスリン分泌への関与を検討した。マウス膵島からのグルコース依存的なインスリンの分泌を33度と37度で観察したところ、野生型マウスでは温度上昇依存的にインスリン分泌の増大が観察されたが、TRPM2欠損膵島では観察されなかった(図12)。

また、その野生型マウスでの温度依存的なグルコースによる膵島からのインスリン分泌の増大は抗酸化酵素依存的であった(図12)。NAC依存的なグルコースによるインスリン分泌量をプロットするとより明らかになる(図13)。

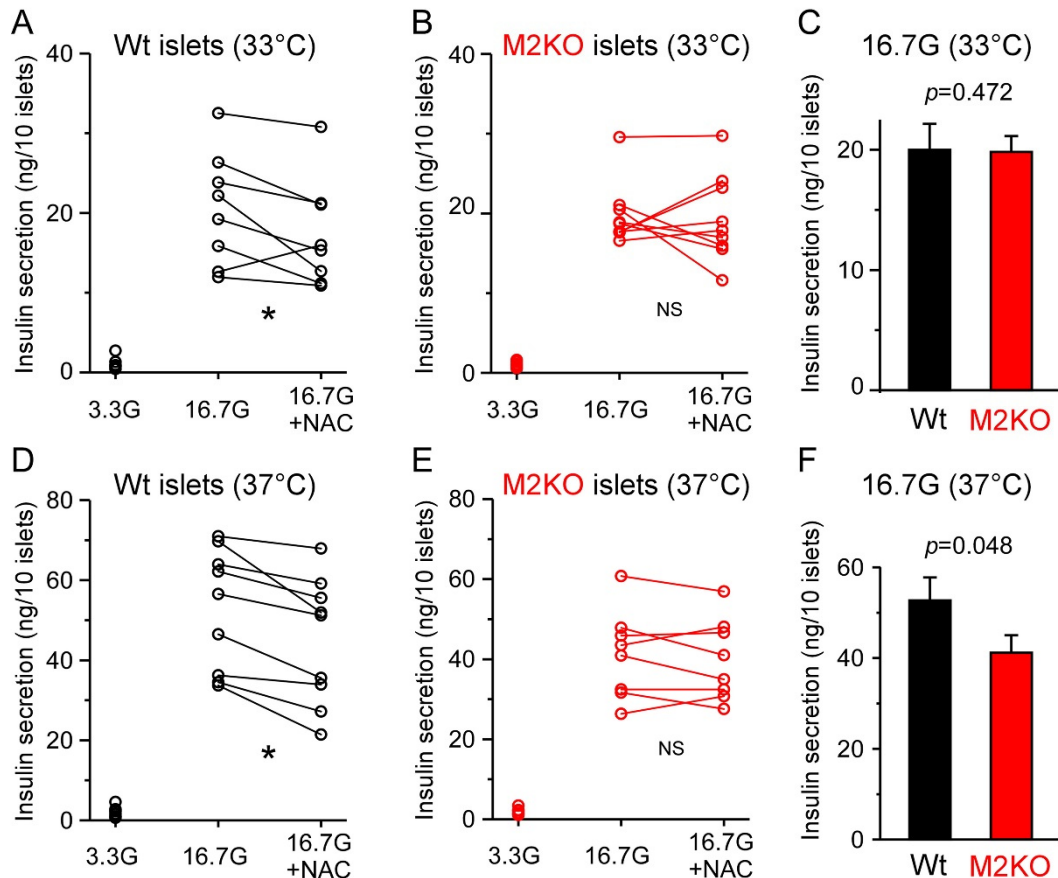


図12. 33度(A-C)と37度(D-F)における3.3m, 16.7mMグルコース(G)依存的な膵島(野生型とTRPM2欠損)からのインスリン放出量と抗酸化酵素 N-acetylcysteine (NAC)の効果。(文献4)から改変引用)

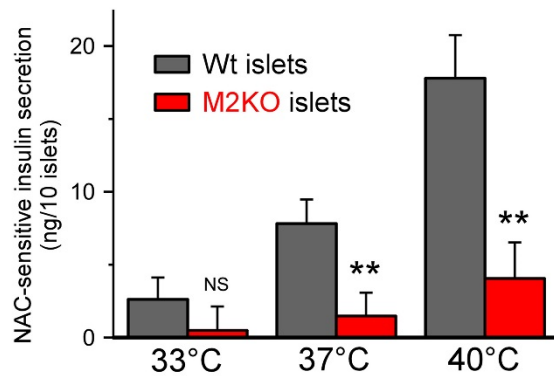


図13. 33度, 37度, 40度における16.7mMグルコース依存的な膵島(野生型とTRPM2欠損)からのインスリン放出量のN-acetylcysteine (NAC)依存的な成分。(文献4)から改変引用)

私たちはこれまで、表皮ケラチノサイトにおける TRPV4 の生理的意義を数多く報告してきたが、脳内にも TRPV4 は発現している。以前に海馬錐体細胞に発現する TRPV4 が体温下で活性化して Na⁺流入によって脱分極し、神経細胞の興奮性を制御していることを報告してきた⁽⁵⁾。TRPV4 は脳内脈絡叢に強く発現している。そこで、TRPV4/EGFP BAC Transgenic mouse を作成したところ、やはり、脈絡叢に強い GFP シグナルをみとめたことから、脈絡叢 TRPV4 は重要な生理機能を担っているものと推測された。

脈絡叢は側脳室、第3脳室、第4脳室にわたって存在し、一層の上皮細胞、軟膜、血管から成る。特異的抗体を用いて TRPV4 の発現を解析したところ、脈絡叢上皮細胞に発現し、また、apical 膜のマーカーである NaK/ATPase $\alpha 1$ と発現が完全に重なったことから、TRPV4 は脈絡叢上皮細胞の apical 膜に発現すると結論した⁽⁶⁾。単離脈絡叢上皮細胞で TRPV4 の機能的発現をパッチクランプ法による電流記録で確認した。野生型マウスから調整した単離脈絡叢上皮細胞では、GSK1016790A (GSK, 0.1 μM) の投与によって外向き整流性を有する電流の活性化が観察されたが、TRPV4 欠損マウスから調整した単離脈絡叢上皮細胞では、1 μM の GSK の投与でも電流の活性化は確認できなかった(図 14)⁽⁶⁾。

脈絡叢の重要な生理機能の1つは脳脊髄液の産生・放出である。そこで、脈絡叢上皮細胞 apical 膜で TRPV4 が活性化して Ca²⁺が流入し、その Ca²⁺が Ca²⁺活性化クロライドチャンネルを活性化してクロライドイオン流出をもたらし、

それが駆動力となって水の移動が起こるのではないかと考えた。というのは、脈絡叢上皮細胞は細胞内のクロライドイオン濃度が高いためにクロライドイオンの平衡電位がおおよそ -20 mV で、静止膜電位はおおよそ -50 mV なので、クロライドチャンネルの活性化はクロライドイオンの流出をもたらすからである。これまで、脈絡叢上皮細胞に Ca²⁺活性化クロライドチャンネルの報告はない。そこでまず、電気生理学的に Ca²⁺活性化クロライドチャンネルの存在を検討した。細胞内外 NMDG (N-methyl-D-glucamine) -Cl 液でクロライド電流しか観察できない条件でパッチクランプ全細胞記録法を用いて解析したところ、細胞内 Ca²⁺濃度 500 nM の状態で外向き整流性を有するクロライド電流が観察され、NPPB (5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid) というグローバルなクロライドチャンネル阻害剤(100 μM)で抑制された(図 15)。Inomycin によって細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させても、同様に NPPB で抑制されるクロライドチャンネル電流の活性化が観察された(図 15)⁽⁶⁾。

Ca²⁺活性化クロライドチャンネルの分子実体として anoctamin (ANO) が数年前に報告されている。そこで、脈絡叢上皮細胞における ANO 遺伝子発現を検討したところ、複数の ANO 遺伝子 (*Ano1*, *Ano4*, *Ano6*, *Ano10*) の発現が観察された。その中でも ANO1 が最も Ca²⁺感受性が高いことから、特異的抗体を用いて ANO1 の発現を検討し、脈絡叢上皮細胞に ANO1 蛋白質の発現を確認した⁽⁶⁾。こうして遺伝子・蛋白質レベル、機能レベルで脈絡叢上皮に Ca²⁺活性化クロライドチャンネル anoctamin の発現が確認された。

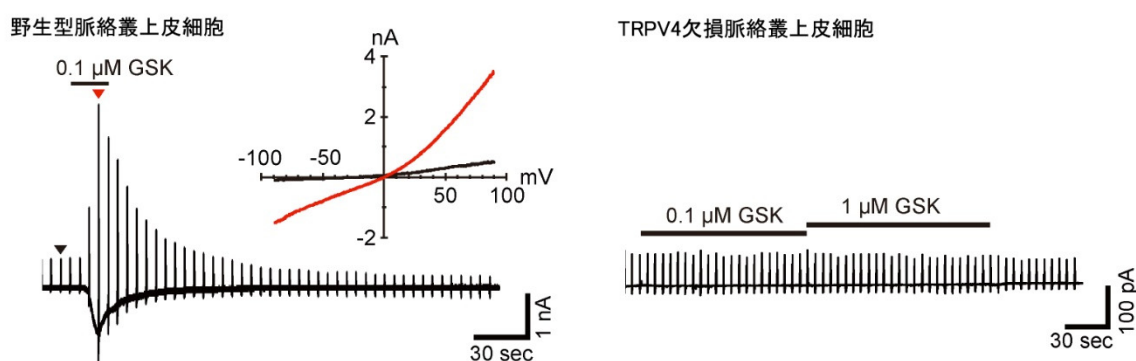


図 14. 単離脈絡叢情報細胞の TRPV4 刺激薬(GSK)に対する応答。左図の挿入図は電流トレースの黒および赤 ∇ の電流電圧関係。(文献 6)から改変引用)

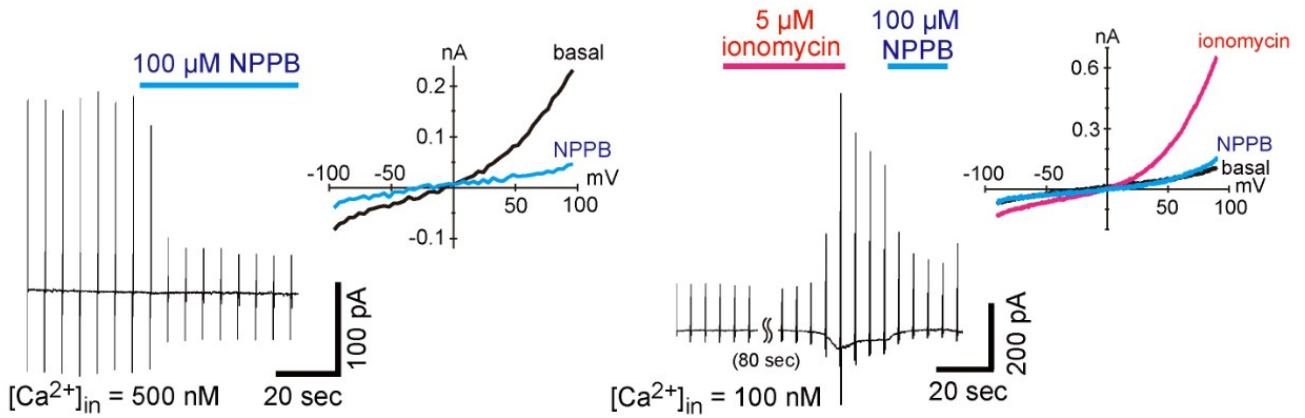


図 15. 単離脈絡叢上皮細胞の Ca^{2+} 活性化クロライドチャンネル電流。細胞内 Ca^{2+} 濃度 500 nM か ionomycin で細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させたときの外向き整流性 (挿入図は電流電圧関係) を示すクロライド電流の活性化が観察される。(文献 6) から改変引用)

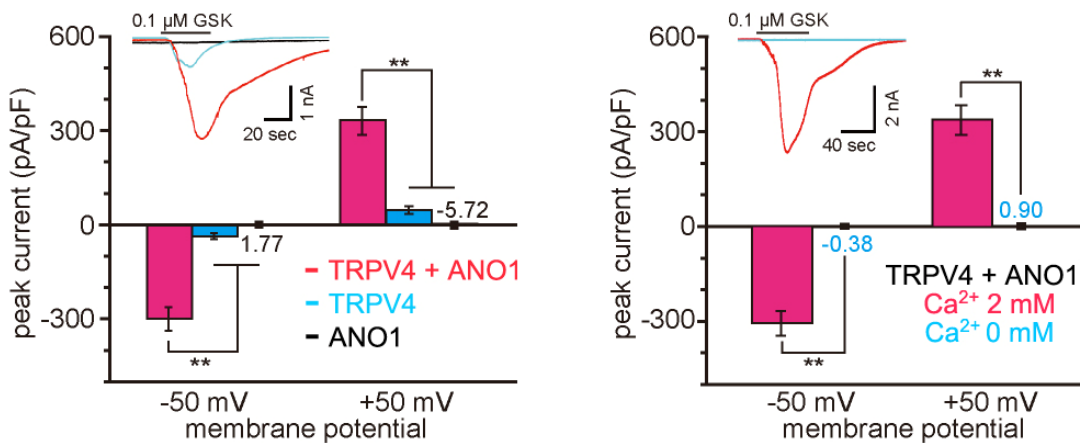


図 16. TRPV4+ANO1, TRPV4 単独 あるいは ANO 単独発現 HEK293T 細胞における GSK 投与に対するクロライド電流 (左) の活性化とその細胞外 Ca^{2+} 濃度依存性 (右)。** $p < 0.01$ 。(文献 6) から改変引用)

次に、TRPV4 と ANO1 を共発現させた細胞で、TRPV4 刺激薬である GSK を投与してクロライド電流を観察したところ、細胞外に Ca^{2+} が存在するときのみ大きなクロライド電流が観察された (図 16) (6)。ANO1 単独発現細胞、TRPV4 単独発現細胞、TRPV4+ANO4 発現細胞、TRPV4+ANO6 発現細胞、TRPV4+ANO10 発現細胞では同様のクロライド電流は観察されなかったことから、この機能関連は TRPV4+ANO1 に特異的であり、事実、HEK293 細胞で TRPV4 と ANO1 の物理的結合が共免疫沈降法によって確認された (図 17) (6)。

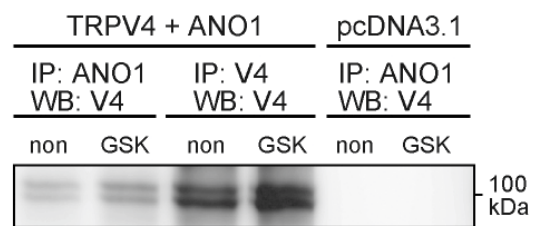


図 17. TRPV4 と ANO1 を共発現させた HEK293T 細胞で、抗 ANO1 抗体で免疫沈降 (IP) させた標本に抗 TRPV4 抗体で認識される (WB) 蛋白質が存在する。(文献 6) から改変引用)

単離脈絡叢上皮細胞でも、GSK 刺激によって外向き整流性を示すクロライド電流が観察され、その電流は ANO1 阻害剤 T16Ainh-A01 (A01) で完全に抑制された(図 18)⁽⁶⁾。また、脈絡叢上皮細胞において TRPV4 と ANO1 の物理的結合が共免疫沈降法によって確認された(図 19)⁽⁶⁾。以上のことから、脈絡叢上皮細胞において、TRPV4 の活性化によって流入した Ca^{2+} によって、TRPV4 と物理的に結合する Ca^{2+} 活性化クロライドチャンネル ANO1 が活性化することが明らかとなった。

GSK は合成 TRPV4 刺激薬であることから、内因性刺激の1つである低浸透圧で TRPV4 を活性化して検討した。野生型マウスから調整した単離脈絡叢上皮細胞において 37 度条件下で、300 mOsm から 200 mOsm への低浸透圧刺激によって大きなクロライド電流の活性化が観察された

が、TRPV4 欠損マウスから調整した単離脈絡叢上皮細胞では観察されなかった(図 20)⁽⁶⁾。このことから、内因性 TRPV4 刺激によっても脈絡叢上皮細胞で TRPV4 と ANO1 の機能連関が確認できた。

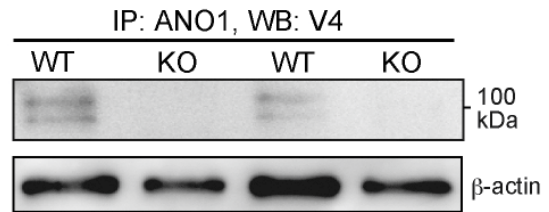


図 19. 脈絡叢上皮細胞で、抗 ANO1 抗体で免疫沈降 (IP)させた標本に抗 TRPV4 抗体で認識される (WB)蛋白質 が存在する。(文献 6)から改変引用)

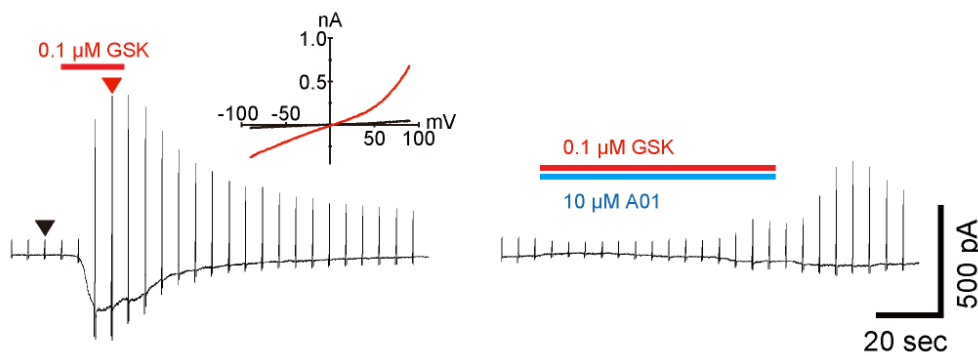


図 18. 単離脈絡叢上皮細胞における GSK 投与に対するクロライド電流の活性化(左)とその電流の ANO1 阻害薬 A01 による抑制(右)。左図の挿入図は電流トレースの黒および赤▽の電流電圧関係。(文献 6)から改変引用)

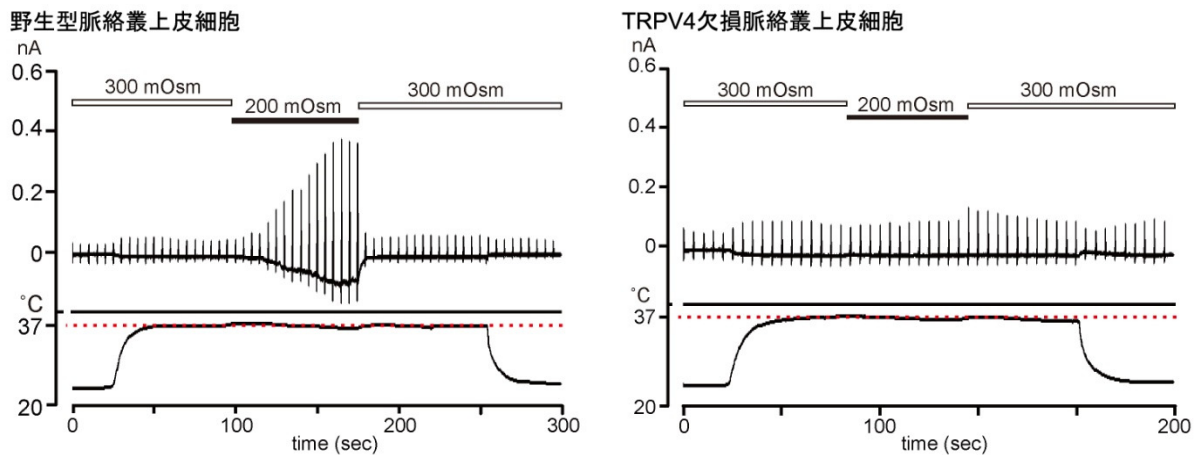


図 20. 単離脈絡叢情報細胞の 37 度における低浸透圧刺激に対するクロライド電流の活性化 (文献 6)から改変引用)

ANO1は熱刺激によって活性化することが知られているので、単離脈絡叢上皮細胞を用いて45度までの2回の熱刺激の間にGSK投与を行ってクロライド電流を観察したところ、野生型マウスの単離脈絡叢上皮細胞ではGSK投与後の2回目の熱刺激でクロライド電流の著しい増大が観察されたが、TRPV4欠損マウスの単離脈絡叢上皮細胞では熱刺激応答に変化がなかった(図21)⁽⁶⁾。野生型マウスの単離脈絡叢上皮細胞では、GSKによってTRPV4が活性化してCa²⁺が流入し、熱刺激とあいまってANO1活性の著しい増強が起こったものと考えられた。

TRPV4とANO1の機能連関による脈絡叢上皮細胞膜か

らのクロライドイオン流出は水移動を駆動するはずである。TRPV4は水チャネルアキアポリン4(aquaporin 4; AQP4)と結合していることが既に明らかになっている。そこで、HEK293細胞にANO1を強制発現させてパッチクランプ全細胞記録法(細胞内Ca²⁺濃度500 nM)で膜電位を-50 mVに保持すると著しい細胞容積減少が観察され、保持電位を+50 mVに変化させると細胞容積は元に戻った。この現象はANO1を発現しない細胞や電位を変化させない状態では観察されなかったことから、保持電位変化によるANO1を介したクロライドイオンの流出と流入が水移動を引き起こしたものと考えられた(図22)⁽⁶⁾。TRPV4とANO1

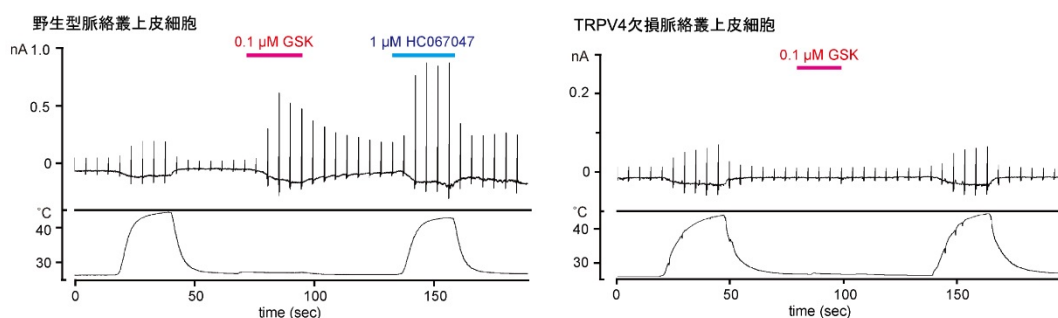


図 21. 単離脈絡叢上皮細胞における熱活性化クロライド電流に対する GSK 投与による TRPV4 活性化の効果 HC067047: TRPV4 阻害薬。(文献 6)から改変引用)

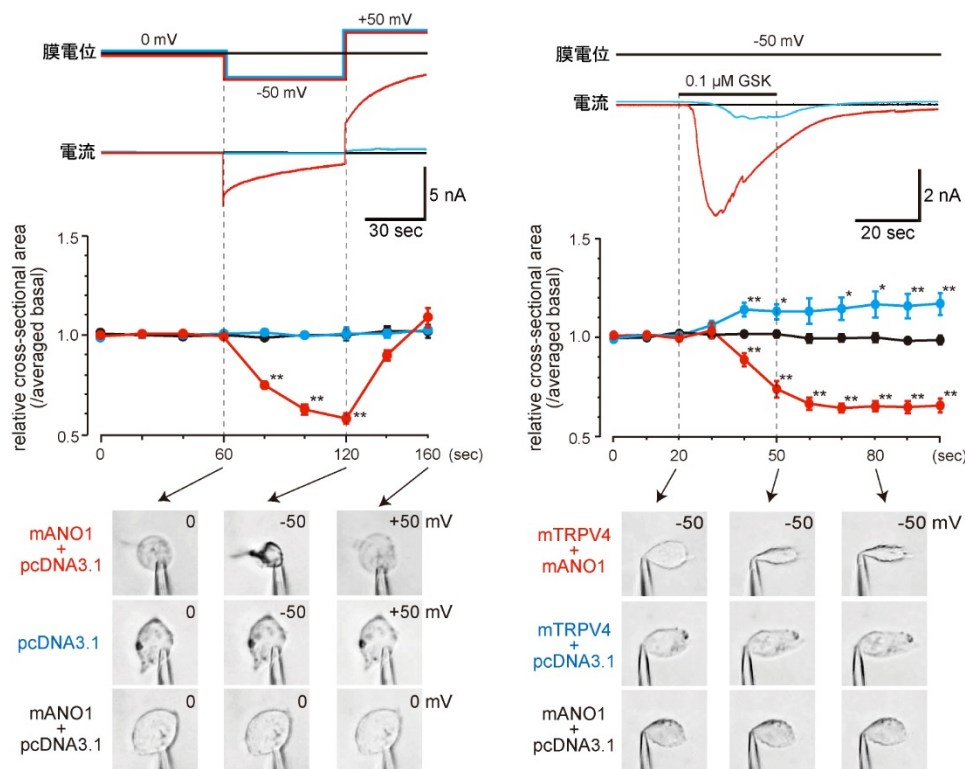


図 22. HEK293 細胞における ANO1 依存的な細胞容積変化。左. ANO1 を発現させた細胞では陰性電位でクロライド電流を活性化させると細胞容積減少が起こる。 ** p < 0.01。右. TRPV4, ANO1 を共発現させると陰性電位でクロライド電流を活性化させると細胞容積減少が起こる。 * p < 0.05, ** p < 0.01。(文献 6)から改変引用)

を共発現させた HEK293 細胞 (細胞内 Ca^{2+} 濃度 100 nM) では、GSK の投与によって保持電位 -50 mV で大きな内向き電流 (クロライドイオンの細胞からの流出) に引き続いて細胞容積の減少が観察された。ANO1 だけを発現させた細胞では容積変化は観察されず、TRPV4 だけを発現させた細胞では小さな内向き電流の後にむしろ細胞容積の増大が観察された (図 22) (6)。GSK による TRPV4 活性化によって流入した Ca^{2+} 電流とその Ca^{2+} 流入に駆動された水流入が引き起こされたものと推察された。

観察された TRP チャンネルと ANO1 の機能連関はより普遍的なものであろうと考え (7)、感覚神経細胞で検証しようと考えた。感覚神経は細胞内クロライドイオン濃度が高いことが知られており、ANO1 チャンネルの開口はクロライドイオン流出からさらなる脱分極をもたらすと推定される。そこでまず、マウス感覚神経節での TRPV1 と ANO1 の共発現を検討したところ、多くの小径の細胞 (おそらく無髄の C 線維の細胞体) での共発現が確認された (図 23) (8)。

次に、HEK293T 細胞に mTRPV1 と mANO1 を共発現させて細胞内外 NMDG-Cl 溶液の条件でクロライド電流を観察したところ、mTRPV1 と mANO1 を共発現させた細胞

では 0.3 μM のカプサイシン投与で大きなクロライド電流が観察されたが、mTRPV1 あるいは mANO1 だけを発現させた細胞では観察されなかった。また、そのクロライド電流活性化は細胞外に Ca^{2+} が存在するときにだけ観察された (図 24) (8)。この結果は、カプサイシンによって活性化した TRPV1 を通って流入した Ca^{2+} が ANO1 を活性化させたことを意味する。

共免疫沈降法による解析から、HEK293T 細胞で mTRPV1 と mANO1 が結合していることが明らかになった (図 25) (8)。

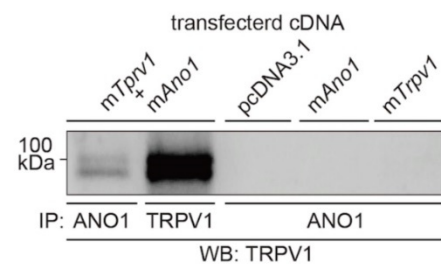


図 25. mTRPV1, mANO1 を共発現させた HEK293T 細胞での抗 ANO1 抗体免疫沈降標本での TRPV1 蛋白質の検出 (文献 8) から改変引用)

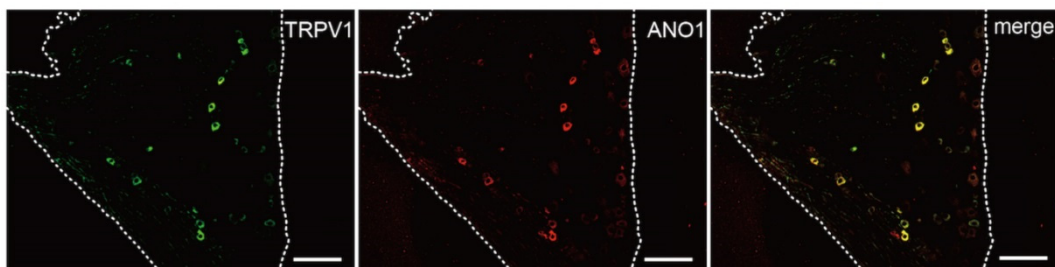


図 23. マウス後根神経節における TRPV1 (緑) と ANO1 (赤) の共発現。Scale bar 50 μm 。(文献 8) から改変引用)

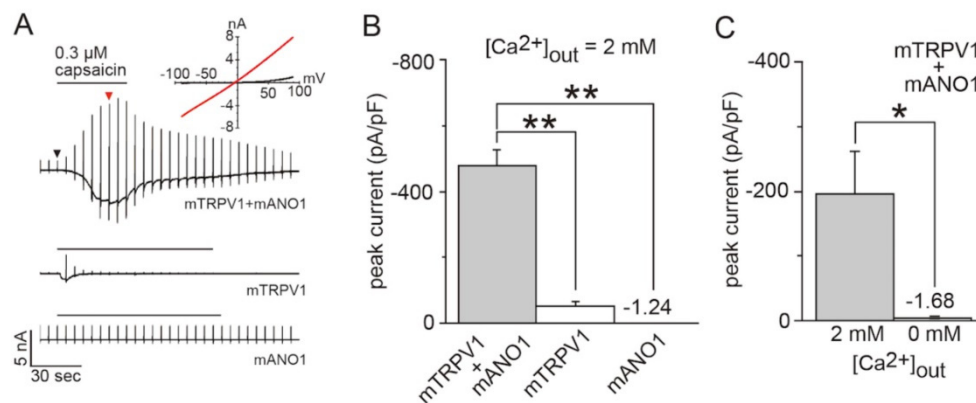


図 24. HEK293T 細胞での mTRPV1, mANO1 共発現依存的クロライド電流の活性化 (A, B) とその細胞外 Ca^{2+} 依存性 (C)。(文献 8) から改変引用)

次に、単離したマウス後根神経節細胞で細胞内 KCl, 細胞外 NaCl のイオン条件でカプサイシンによる内向き電流を観察した。ANO1 阻害剤である A01 存在下では、カプサイシンによる内向き電流が有意に小さく、この A01 依存性は高濃度 EGTA でも変わらなかったが高濃度 BAPTA では消失した(図 26)⁽⁸⁾。よって、カプサイシン投与によって観察される内向き電流は Na⁺, Ca²⁺だけではなく、Ca²⁺による ANO1 活性化を介した外向きクロライド電流がかなりの割合を占めていると考えられた。また、ANO1 依存性が高濃度 BAPTA で消失したことから、この機能関連は 20 nm 以内の局所で起こっているものと推定され、それは mTRPV1, mANO1 の直接結合の結果と合致する。マウス感覚神経においても TRPV1 と ANO1 の結合が確認された(図 27)⁽⁸⁾。

この TRPV1 と ANO1 の機能関連の意義を個体レベルで検討するために、マウスの後肢にカプサイシンを投与して痛み関連行動を観察した。すると、カプサイシンを投与による肢舐め行動は ANO1 阻害剤の同時投与で有意に抑制されたが、イオンチャネル型 ATP 受容体刺激薬 $\alpha\beta$ methylene ATP による肢舐め行動は差がなかった(図 28)⁽⁸⁾。

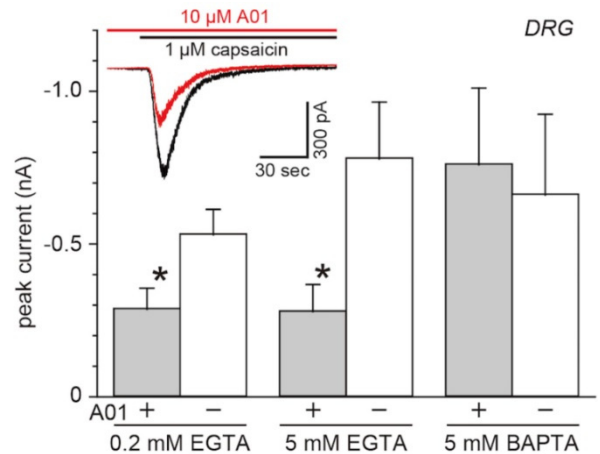


図 26. マウス後根神経節細胞でのカプサイシンによる内向き電流への ANO1 阻害剤と Ca²⁺キレーターの影響。* p < 0.05 (文献 8)から改変引用)

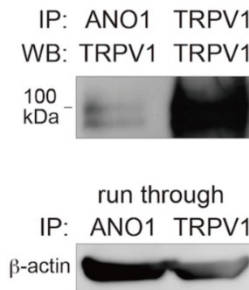


図 27. マウス感覚神経細胞での TRPV1, ANO1 蛋白質の共免疫沈降。(文献 8)から改変引用)

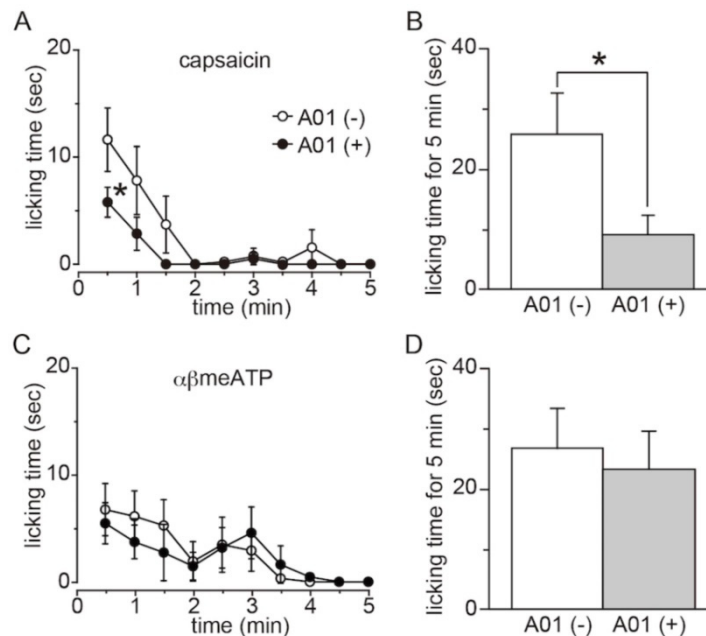


図 28. マウス後肢へのカプサイシン投与による 30 秒ごと(A)および 5 分間(B)の痛み関連行動への ANO1 阻害剤の効果と $\alpha\beta$ methylene ATP ($\alpha\beta$ meATP)投与による 30 秒ごと(C)および 5 分間(D)の痛み関連行動への ANO1 阻害剤の効果。* p < 0.05 (文献 8)から改変引用)

3. 考察および今後の課題

今回の実験によって、過酸化水素によるメチオニンの酸化によって TRPM2 の活性化温度閾値が低下することが明らかとなった。これまで、温度感受性 TRP チャンルの活性化温度閾値の変化にはさまざまなメカニズムがあることが明らかになっている。カプサイシン受容体 TRPV1 の活性化温度閾値は PKA, PKC によるリン酸化によって本来の 43 度以上から体温域に低下することが明らかになっており、体温が活性化刺激となって痛みが起こる可能性が示されている。これは、急性炎症性疼痛発生の1つの分子機構と考えられている。また、TRPV1 とメントール受容体 TRPM8 は化学物質(TRPV1 はカプサイシン, TRPM8 はメントール)の存在下で活性化温度閾値が変化(TRPV1 は低下, TRPM8 は上昇)することも判明している。加えて、私たちは最近、PIP₂量もしくは PIP₂の TRPM8 への結合が、細胞が曝露する温度依存的に変化して TRPM8 の活性化温度閾値の変化をもたらすことを報告した⁹⁾。細胞外温度が高いとの制御が高まり、TRPM8 の活性化温度閾値が上昇することが分かった。このメカニズムはウェーバーの3ボトル実験(冷たい水に手を浸した後で室温の水に手を浸すと温かく感じ、熱い温度の湯に手を浸した後で室温の水に手を浸すと冷たく感じる現象)を説明できると考えている。今回のメチオニンの酸化による TRPM2 の活性化温度閾値の変化は新たな活性化温度閾値変化のメカニズムである。

メチオニン酸化による TRPM2 の機能増強(感作)はマクロファージ機能に大きな意味を持つことが明らかになった。全身的な細菌感染等では NADPH oxidase によってマクロファージ等で過酸化水素が産生され、マクロファージ

機能が增強される。サイトカインや貪食能の増強は細菌等を処理するのに有利に働く。同時に、1.5 度という微小な温度上昇がマクロファージ機能を增強させることが明らかとなった。体温上昇時にはむやみに熱を下げないことが肝要だと臨床では言われているが、体温(あるいは体温上昇)がもつ免疫機能増強作用の一部は TRPM2 の機能増強で説明できるかもしれない。TRPM2 は、マクロファージ以外にもリンパ球や好中球等さまざまな免疫担当細胞に発現することが明らかになっており、そうした細胞の温度依存的な活動制御が報告されている。そうした温度依存性も TRPM2 の機能制御で説明できるかもしれず、TRPM2 が広く免疫機能を制御するための温度センサーとして機能する可能性が示唆される。事実、私たちは、免疫に関わる樹状細胞やミクログリアが TRPM2 を強く発現することを見いだしており、今回明らかになった TRPM2 の活性制御による免疫機能調節を研究していきたい。

さらに、TRPM2 の過酸化水素による機能増強が膵臓 β 細胞でも観察されたことから、この TRPM2 の過酸化水素による感作は広く見られる現象であり、膵臓でのグルコース依存的なインスリン分泌に強く関わっていることが明らかになった。

脈絡叢上皮細胞では、基底側膜からの水流入によって細胞容積が増大すると考えられる。その細胞容積増大が膜伸展を招来して膜脂質から epoxyeicosatrienoic acid (EET) が産生されて TRPV4 を活性化する。TRPV4 を介して流入した Ca²⁺が Ca²⁺活性化クロライドチャンネル ANO1 を活性化してクロライドイオンが流出して水が流出するものと推定される(図 29)。

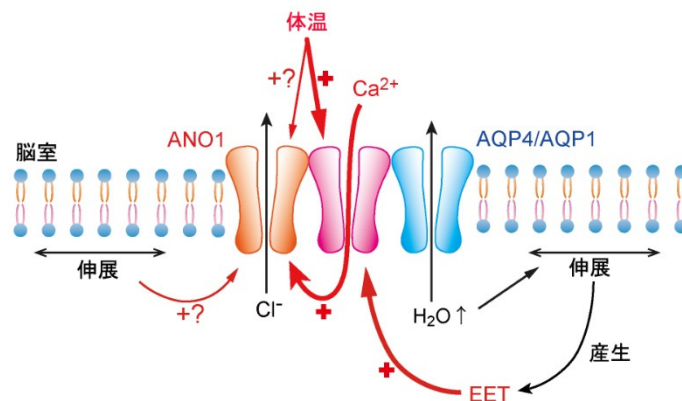


図 29. TRPV4、ANO の連関による水移動の模式図

これは、脳脊髄液産生のメカニズムの1つと考えられる。このメカニズムが破綻すると脳脊髄液産生に異常がでるものと推定され、その検討が必要である。また、炎症時には TRPV4 活性が増強することが知られており、脳内炎症時の TRPV4 活性化が脳脊髄液産生増加をもたらすかどうかは今後検討していく必要がある。

Ca²⁺透過性が高い TRP チャネルと ANO1 の機能連関は脈絡膜だけでなくマウス感覚神経でも観察された。これは、全く新しい痛み増強メカニズムであり、ANO1 阻害や TRPV1/ANO1 複合体形成阻害が新たな鎮痛薬開発につながることを期待される。また、同様の TRP チャネルと ANO1 の機能連関が他の臓器でも起こっており、広く様々な生理機能にかかわっているものと推察される。そうした例の発見につとめていきたい。

4. 引用文献

- 1) Uchida K, Dezaki K, Damdindorj B, Inada H, Shiuchi T, Mori Y, Yada T, Minokoshi Y, Tominaga M. Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice. *Diabetes* 60: 119-126, 2011.
- 2) Uchida K, Tominaga M. The role of TRPM2 in pancreatic β -cells and the development of diabetes. *Cell Calcium* 56: 332-339, 2014.
- 3) Kashio M, Sokabe T, Shintaku K, Uematsu T, Fukuta N, Kobayashi N, Mori Y, Tominaga M. Redox signal-mediated sensitization of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109 (17): 6745-6750, 2012.
- 4) Kashio M, Tominaga M. Redox signal-mediated enhancement of the temperature sensitivity of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) elevated glucose-induced insulin secretion from pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 290 (19): 12435-12442, 2015.
- 5) Shibasaki K, Suzuki M, Mizuno A, Tominaga M. Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by TRPV4. *J. Neurosci.* 27: 1566-1575, 2007.

- 6) Takayama Y, Shibasaki K, Suzuki Y, Yamanaka A, Tominaga M. Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anoctamin 1. *FASEB J.* 28: 2238-2248, 2014.
- 7) Tominaga M, Takayama Y: Interaction between TRP and Ca²⁺-activated chloride channels. *Channels* 8: 3, 2014.
- 8) Takayama Y, Uta D, Furue H, Tominaga M. Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112(6): 5213-5218, 2015.
- 9) Fujita F, Uchida K, Takaishi M, Sokabe T, Tominaga M. Ambient temperature affects the temperature threshold for TRPM8 activation through interaction of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurosci.* 33 (14): 6154-6159, 2013.

5. 論文業績

- Kashio M, Sokabe T, Shintaku K, Uematsu T, Fukuta N, Kobayashi N, Mori Y, Tominaga M. Redox signal-mediated sensitization of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109 (17): 6745-6750, 2012.
- Kashio M, Tominaga M. Redox signal-mediated enhancement of the temperature sensitivity of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) elevated glucose-induced insulin secretion from pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 290 (19): 12435-12442, 2015.
- Takayama Y, Shibasaki K, Suzuki Y, Yamanaka A, Tominaga M. Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anoctamin 1. *FASEB J.* 28: 2238-2248, 2014.
- Takayama Y, Uta D, Furue H, Tominaga M. Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112 (6): 5213-5218, 2015.

Molecular Mechanisms of Immune System Involving Thermosensitive TRPM2 Channel

Makoto TOMINAGA¹, Makiko KASHIO², Yasunori TAKAYAMA¹

¹Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institute of Natural Sciences

²Kyoto Prefectural University of Medicine

Summary

Thermoregulation is the ability of organisms to keep their body temperatures within a certain range (~37°C). Nine thermosensitive transient receptor potential (TRP) channels (thermoTRPs) are known to detect ambient temperature and are believed to be involved in thermoregulation. We investigated the regulatory mechanism and physiological role of TRP melastatin 2 (TRPM2) at the body temperature, which is sensitive to warm temperatures (>35°C).

TRPM2 is a nonselective, Ca²⁺-permeable cation channel, and is expressed in various organs such as the brain, pancreas, spleen, kidney and a wide range of immunocytes, such as lymphocytes, neutrophils, and monocytes/macrophages. TRPM2 plays important roles in Ca²⁺ signaling in these tissues and cells, and contributes to cellular functions that include insulin release, cytokine production, cell motility, and cell death. The primary activator of TRPM2 is adenosine diphosphate ribose (ADPR). We found the novel activation mechanism of TRPM2 induced by H₂O₂. The alteration in the temperature sensitivity of TRPM2 by H₂O₂ was mediated by a reduction in the temperature threshold for TRPM2 activation, enabling channel activation and cytosolic Ca²⁺ elevation at the physiological body temperature. Sensitization of TRPM2 by H₂O₂ was found to be via oxidation of methionine residues. Therefore, endogenous TRPM2 channels in vivo could be modulated by redox signals in parallel with adenine-containing second messengers at physiological body temperature.

Sensitization of the heat-evoked response was also observed in wild-type (Wt) but not in TRPM2-deficient macrophages, indicating possible involvement of TRPM2 sensitization in macrophage functions. ROS-mediated elevation of cytosolic Ca²⁺ and Ca²⁺-dependent ROS production may interact and amplify each other, playing central roles in innate immune responses. Indeed, zymosan-induced cytokine release was affected in TRPM2-deficient macrophages. In addition, elevated temperatures (fever) were found to enhance phagocytic activity of Wt macrophages, but not TRPM2-deficient macrophages, implying that the ROS-TRPM2 activation pathway plays a critical role in macrophage functions. This novel activation mechanism of TRPM2, sensitization to temperature, might provide new approaches to immune research.

We then investigated whether the TRPM2 sensitization by H₂O₂ is a global phenomenon by focusing on the TRPM2 functions in pancreatic β cells. Heat-evoked [Ca²⁺]_i increases were observed after H₂O₂ treatment in Wt β cells, but not TRPM2-deficient β cells similar to macrophages. In addition, TRPM2 activation downstream from the redox signal plus glucose stimulation enhanced glucose-induced insulin secretion in a temperature-dependent manner. The N-acetyl cysteine (NAC)-sensitive fraction of insulin secretion by Wt islets was increased by temperature elevation and this temperature-dependent enhancement was significantly diminished in TRPM2KO islets. These data suggest that

endogenous redox signals in pancreatic β -cells elevate insulin secretion via TRPM2 sensitization and activity at body temperature. The results could provide new therapeutic approaches for the regulation of diabetic conditions by focusing on the physiological function of TRPM2 and redox signals.

We also investigated the physiological role of TRP vanilloid 4 (TRPV4) at the body temperature, which is sensitive to warm temperatures ($>30^{\circ}\text{C}$). TRPV4, a calcium-permeable channel, is highly expressed in the apical membrane of choroid plexus epithelial cells (CPECs) in the brain. The function of TRPV4 is unknown. We show physical and functional interaction between TRPV4 and anoctamin (ANO) 1, one of the Ca^{2+} -activated chloride channels, in HEK293T cells and CPECs. Chloride currents induced by a TRPV4 activator (GSK1016790A) were markedly increased in an extracellular calcium-dependent manner in HEK293T cells expressing TRPV4 with ANO1, but not with ANO4, ANO6 or ANO10, the mRNAs of which were expressed in the choroid plexus. GSK-induced chloride currents were observed in wild-type CPECs but not in TRPV4-deficient CPECs. We also found physical interaction between TRPV4 and ANO1 in both HEK293T cells and choroid plexus. We observed that ANO1 was activated at a warm temperature (37°C) in HEK293T cells and that the heat-evoked chloride currents were markedly enhanced after GSK1016790A application in CPECs. Simultaneous stimulation by warmth and hyposmosis induced chloride current activation in wild-type, but not in TRPV4-deficient CPECs. Cell volume changes were induced by ANO1-mediated chloride currents in parallel with membrane potential changes, and the cell volume was significantly decreased at negative membrane potentials by TRPV4-induced ANO1 activation. Thus, physical and functional interactions between TRPV4 and ANO1 can modulate water transport in the choroid plexus, and it could be one of the mechanisms for cerebrospinal fluid production in choroid plexus.

To find another example the functional interaction between Ca^{2+} -permeable TRP channels and ANO1, we focused on mouse sensory neurons. Because it is known that cytosolic chloride concentrations are high in the sensory neurons, opening of ANO1 is supposed to lead to chloride efflux, resulting in the membrane depolarization. Capsaicin receptor TRPV1 is activated by various noxious stimuli, and the stimuli are converted into electrical signals in primary sensory neurons. It is believed that cation influx through TRPV1 causes depolarization, leading to the activation of voltage-gated sodium channels, followed by action potential generation. We found that the capsaicin-evoked action potential could be induced by two components: a cation influx-mediated depolarization due to TRPV1 activation and a subsequent anion efflux-mediated depolarization via activation of anoctamin 1 (ANO1), a calcium-activated chloride channel, due to the entry of Ca^{2+} through TRPV1. The interaction between TRPV1 and ANO1 is based on their physical binding. Capsaicin activated the chloride currents in an extracellular calcium-dependent manner in HEK293T cells expressing TRPV1 and ANO1. Similarly, in mouse DRG neurons, capsaicin-activated inward currents were significantly inhibited by a specific ANO1 antagonist, T16Ainh-A01 (A01) in the presence of a high concentration of EGTA, but not BAPTA. Furthermore, pain-related behaviors in mice treated with capsaicin, but not with $\alpha\beta$ methylene ATP, were significantly reduced by the concomitant administration of A01. These results indicate that TRPV1-ANO1 interaction is a significant pain-enhancing mechanism in the peripheral nervous system.

発生期の神経回路形成を制御する膜伸展刺激受容体 TRPV2

柴崎 貢志¹, 小野 勝彦²

¹群馬大学大学院医学系研究科分子細胞生物学分野, ²京都府立医科大学神経発生生物学

概要 TRPV2は1999年に52℃以上の侵害熱刺激を感知する熱センサーとしてクローニングされた。ところが、脊髄及びDRGにおけるこのチャネルの発現時期を調べると、未成熟な神経細胞の出現にあわせて胎生期において既に発現を開始していた。子宮内の胎仔が52℃以上の侵害熱刺激に遭遇する機会はないため、熱刺激以外のTRPV2リガンドが存在し、発達期には熱センサーとは全く異なる役割を持つと考えた。そして、解析を進めていくと、胎仔期のTRPV2は脊髄運動神経・DRG感覚神経が、末梢(皮膚・筋肉など)に向けて非常に長い軸索を伸長している時に細胞膜にかかる膜伸展刺激で活性化し、軸索伸長を促進させていることを突き止めた。さらに、TRPV2がどの程度微弱な機械刺激を受容可能であるのかを検証したところ、TRPV2は現在実験室でアプライし得る最も小さな機械刺激でも活性化することが判明した。また、腸管神経節の抑制性運動神経にもTRPV2が発現し、TRPV2をメカノセンサーとして用いることで蠕動運動を制御していた。これらの結果より、TRPV2は軸索伸長に関わる有力なメカノセンサーであると考えられた。そして、微弱な膜伸展刺激においてもTRPV2の活性化が認められることを突き止めた。予想通りTRPV2はメカノセンサーとして、微弱な機械刺激を感知する特性を備えていると考察された。我々の体には成長に応じてあらゆる細胞に対して伸展張力が働き、これを軸索が感じ取り、体のサイズに合わせて神経回路の長さをチューニングしている。これらの結果より、TRPV2は受動的軸索伸長に関わる有力なメカノセンサーであると考えられる。

TRPV2遺伝子の開始コドンを含むエキソンをloxPで挟んだアレルを導入したTRPV2 flox/floxマウスにEIIa-Cre Tgマウス(全身でCre Recombinaseを発現)を交配し、全身でTRPV2が欠損したTRPV2KOを作製した。このTRPV2KO成体マウスDRGから感覚神経細胞を単離し、同様の実験を行ったところ、陽圧アプライに伴う細胞内Ca²⁺上昇と軸索伸長促進が野生型と比較し、減弱していることが観察された。さらに、脊髄運動神経とDRG感覚神経特異的なTRPV2CKOを実現することを目的にIslet1-CreマウスとTRPV2 flox/floxマウスを交配した脊髄運動神経とDRG感覚神経特異的なTRPV2CKOを作製し、解析した。TRPV2CKO由来の培養DRG神経細胞では、軸索伸長が抑制された。一方、軸索分岐には何ら影響はなかった。

以上の解析結果より、TRPV2は非常に微弱な機械刺激で活性化し、それに伴い軸索伸長が促進することが判明した。本プロジェクト研究の目的であった「センサーとしてのCa²⁺透過性チャネルの制御機構とその生理学的意義」を考慮すると、TRPV2を活性化させ、透過するCa²⁺量を増加させる薬剤を開発することで損傷軸索再生を促すことが可能になる日が来るかもしれない。

1. 研究の背景と目的

温度感受性 Transient Receptor Potential (TRP) チャネルは、成体の後根神経節 (DRG) の神経細胞に高発現し、温度受容に関わる温度センサーチャネルである^(1,2)。このチャネルは世界で初めて明らかとなった痛みの分子実体

であり、その発見により痛み研究が飛躍的に発展し、有効な鎮痛薬の開発につながった。

しかしながら、発達期のどの段階でこのセンサーチャネルの発現が開始するのかに関しては全く研究されていなかった。そこで、研究実施者は、発達期マウス脊髄領域の

温度感受性 TRP チャンネル発現様式を解析した。その結果、神経発生のごく初期過程(マウスの胎生 10.5 日齢)において、感覚神経・運動神経の双方に侵害熱センサー・TRPV2 (52°C以上の熱で活性化)が発現開始することを見いだした。子宮内の胎仔が 52°C以上の熱刺激に暴露されることは生理条件下では考えられないことから、他に内在性のリガンドが存在し、この分子を活性化することで発達期の神経分化の調節に役立っていることが示唆された。

TRPV2 が低浸透圧刺激により活性化するという報告⁽³⁾が存在したため、低浸透圧刺激 → 細胞内への大量の水流入 → 形質膜にかかる膜伸展刺激というカスケードが存在し、TRPV2 は膜伸展刺激を感知するメカノセンサーとして機能するのではないかと仮説を立て検討を行った。その結果、TRPV2 は発達期神経の軸索・成長円錐に高発現しており、軸索伸長時に生じる膜伸展刺激により活性化し、細胞外から Ca^{2+} を流入させ軸索伸長を促進していることを見いだした。

これまでに様々な研究において、神経回路形成時に細胞膜にかかる膜伸展刺激を感知するメカノセンサー活性化を介して、神経回路形成はポジティブな制御を受けていることが報告されていた^(4,5)。しかしながら、このメカノセンサー分子の実体が長い間全く不明であった。上記の研究実施者の新たな知見⁽⁶⁾により、TRPV2 が長い間分子実体が不明であった神経回路形成を制御するメカノセンサー分子である可能性が出てきた。

TRPV2 は非常に Ca^{2+} 透過性の高い分子であり、成体では侵害熱刺激センサー (52°C以上で活性化)として機能している。ソルトサイエンス研究財団の医学プロジェクト研究「センサーとしての Ca^{2+} 透過性チャネルの制御機構とその生理学的意義」の中では、 Ca^{2+} 透過性チャネル・メカノセンサーと生理応答に着目したプロジェクトを進めた。成体では侵害熱刺激センサーである分子が、発達期には膜伸展刺激感知センサーとして軸索伸長を促進する分子として機能している時間的モダリティに着目し、一つのチャネル分子が胎仔期と成体という異なる条件でどのようにして多様な生理機能を発揮するのかという分子メカニズムを明らかにした。

2. 研究方法

本研究課題は、メカノセンサーTRPV2 の機能解析に加えて、脊髄運動神経・DRG 感覚神経特異的な TRPV2 欠損マウスの表現型解析 → この遺伝子改変マウスを用いた DNA マイクロアレイによる TRPV2 下流遺伝子の同定 → Ca^{2+} イメージングを利用した TRPV2 依存的な細胞内 Ca^{2+} シグナル経路の同定と TRPV2 下流遺伝子の発現変化 → 損傷軸索の再生時における TRPV2 分子の挙動と軸索再生への試み。という流れで研究を進めている。

In vitro (細胞培養系)と *In vivo* (遺伝子改変マウスとニワトリ胚)の両方を組み合わせて、受動的軸索伸長への TRPV2 関与を調べた。また、生体内における軸索伸長因子としての TRPV2 の役割を解析した。

Ca^{2+} 透過性チャネル・TRPV2 分子が関わる神経回路網形成の分子基盤を明らかにするために、以下の 2 つのパートを遂行した。

- 1) 機械刺激による TRPV2 活性化機構の解明
- 2) 体の成長にあわせた神経回路伸長である「受動的軸索伸長」の分子基盤の解明

どちらのパートも *In vitro* (細胞培養系)と *In vivo* (遺伝子改変マウスとニワトリ胚)の両方を組み合わせにより進めた。

3. 研究結果

3. 1 TRPV2 はメカノセンサーとして軸索伸長を促進する

研究実施者は、神経発生のごく初期過程(マウスの胎生 10 日齢)において、感覚神経・運動神経の双方に限局して温度センサー・TRPV2 チャンネルが発現開始することを見いだした。感覚神経での発現に注目すると、興味深いことに、TRPV2 は成体では A δ 線維を有する有髄神経のみにその発現が限局しており⁽¹⁾、その他の温度センサーである TRPV1 (43°C以上で活性化)や TRPM8 (27°C以下で活性化)を発現する C 線維を有する無髄神経とはその発現が重ならない(図 1)。しかしながら、胎生期においては、ほとんど全ての感覚神経に TRPV2 が発現し、その TRPV2 陽性細胞に TRPV1 や TRPM8 が発現するようになった。その後、TRPV2 発現が消失することで、上述した成体に特有の発現パターンを取るようになった(図 1)。この観察結果から、胎生期の未熟な神経において全ての感覚神経でなんらかの理由で TRPV2 を必要としていること

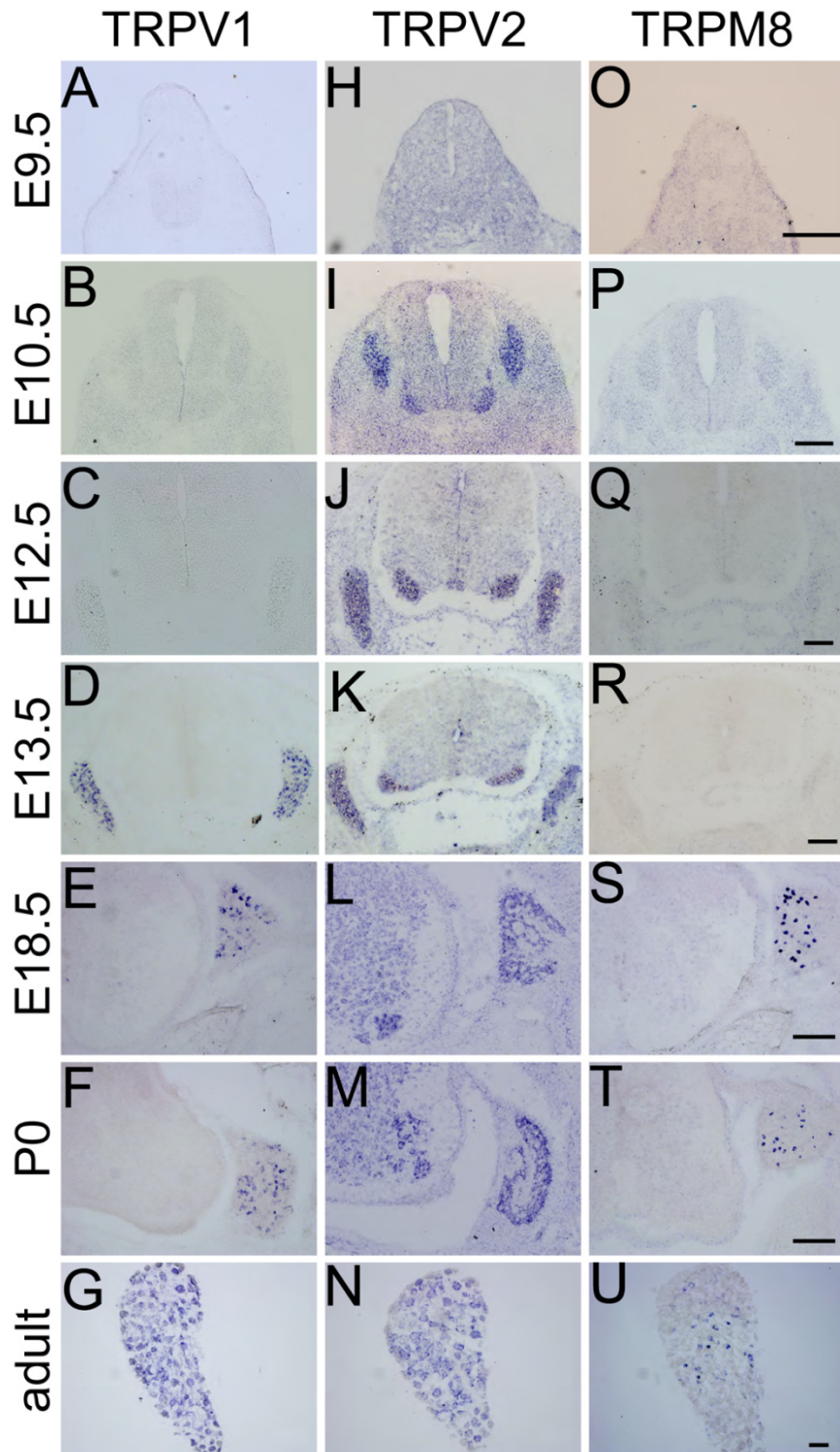


Figure 1. Time course of thermo-TRP channel mRNA expression in the developing DRG and spinal cord. In situ hybridization analysis was performed in the spinal cord region of E9.5 to adult mice. Expression of TRPV1 (A-G) and TRPV2 (H-N) started at different time points (TRPV2, E10.5; TRPV1, E13.5). TRPM8 expression was observed after E13.5 (O-U). Expression of TRPV2 mRNA was observed both in the DRGs and spinal cord ventral horns (I-M). Scale bars; 100 μ m.

が浮かび上がってきた。

TRPV2 は成体における侵害熱センサーである(52°C以上の熱で活性化)と報告されてきた⁽¹⁾が、子宮内の胎子が52°C以上の熱刺激に暴露されることは生理条件下では考えられないことから、他に内在性のリガンドが存在し、このチャネル分子を活性化していることが予想された。さらには、その TRPV2 活性化が発生期の神経分化の調節に役立っているに違いないと考えた。心筋では TRPV2 が低浸透圧刺激により活性化することが報告されていたため⁽²⁾、著者は TRPV2 が低浸透圧刺激により生じた細胞容積の変化(=膜伸展刺激)により活性化するメカノセンサーな

のではないかと予想した。

ここで重要なポイントだったのは、どのようにして膜伸展刺激が TRPV2 活性化を促すのか(=TRPV2 がメカノセンサーであるのか)を証明することであった。幸い、先行研究によって数種類のメカノセンサー分子が同定されており、近年では、その分子特性を調べるための装置がベンチャー企業により販売されている(図2)⁽⁷⁾。このため、この市販システムを用いた機械刺激の人工的アプライ実験を試みることにした。まず、胎生 12 日目のマウス後根神経節(DRG)から感覚神経細胞を単離し、エレクトロポレーション法で遺伝子導入した [コントロールとして EGFP のみ。

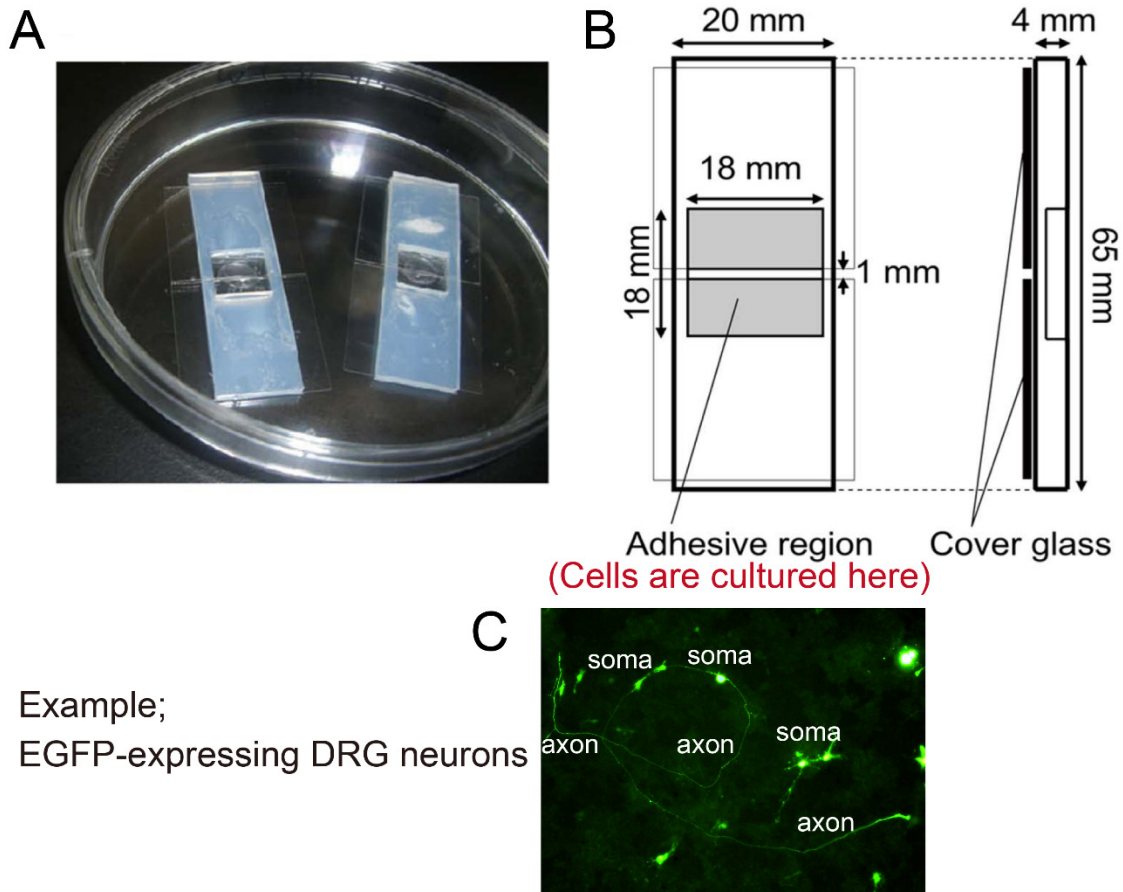


Figure 2. In vitro cell-stretch system.

A, B. Elastic silicone chambers and their dimensions. Two pieces of cover glass (rectangle) are attached to the bottom of the silicone chamber with an adhesive agent and a 1 mm width slit (from glass edge to edge) is made in the center of the chamber so that only the slit area can be elongated upon extension. C. DRG neurons were cultured on the silicone chamber (the gray 18 mm X 18mm square place in Figure B) after EGFP cDNA was electroporated. Many soma and axons were visualized by EGFP expression.

野生型 TRPV2 (WT-V2)-IRES-EGFP、あるいは、ドミナントネガティブ変異体 TRPV2 (DN-V2)-IRES-EGFP]。この細胞を図 2 に示すシリコンチャンバー上に培養した。培養 2 日目 (図 2C) にモータードライブ方式の伸展刺激付加装置 (図 3A) にシリコンチャンバーを装着し、細胞を引っ張りながら Ca^{2+} イメージング実験を行った (図 3)。図 3B では、HEK293 細胞に WT-V2 を強制発現した例である。強制発現細胞は同時に Ds-Red を発現するシステムのため、明るく見える細胞のみが TRPV2 を発現している。この細胞に +2.8% の伸展刺激を付加すると、TRPV2 発現細胞のみで細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を認めた。図 3C に、その定量結果を示した。アスタリスク (*) のついた図 3B の細胞では、3 回の +2.8% の伸展刺激で、3 回の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を

認めるが、周りの TRPV2 非発現細胞では、その応答が観察されなかった。つまり、 52°C 以上の侵害熱センサーとして長い間研究が進められてきた TRPV2 は、細胞膜にかかる伸展刺激を感知出来るメカノセンサーでもあることが実験的に証明された。さらに、この TRPV2 のメカノセンサー特性が発生期の運動神経・感覚神経に備わっていることが、上記の実験システムと DN-V2 の強制発現により実証された。残念ながら、この実験のみでは、発生期の運動神経・感覚神経に発現する TRPV2 がメカノセンサーであることは証明出来たが、この TRPV2 のメカノセンサー特性が軸索伸長の制御に関わっているのかは不明のままであった。

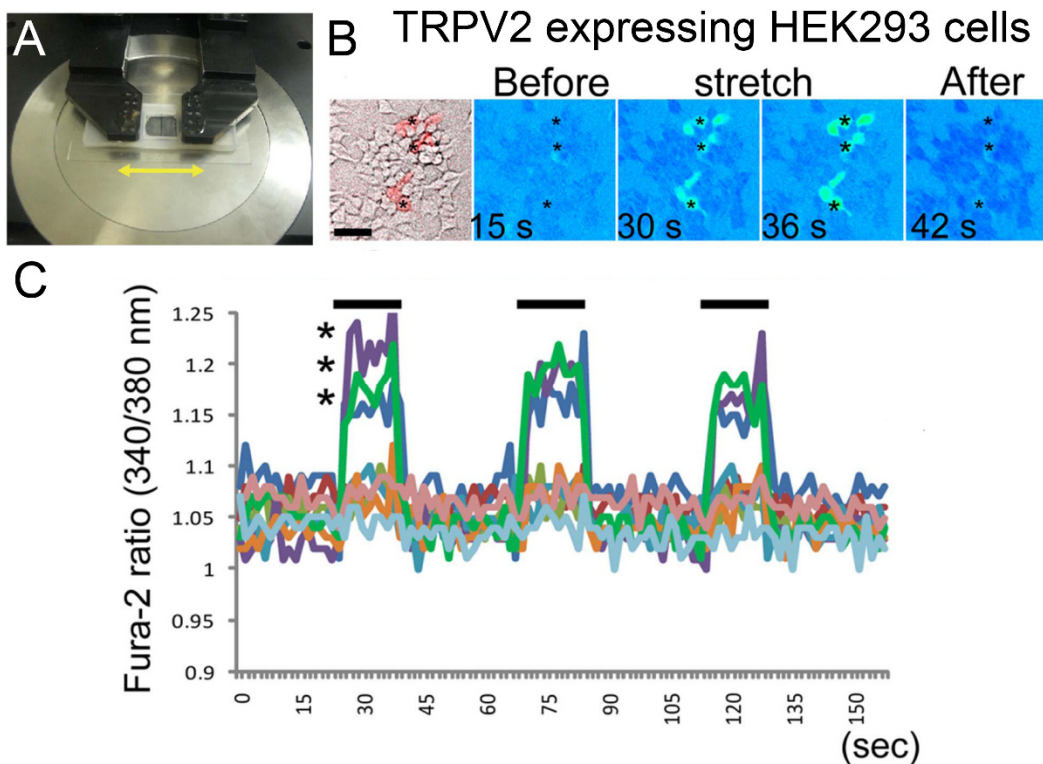


Figure 3. *In vitro* cell-stretch system.

A. After 48 hr of cell culture, the silicone chamber is set in two arms of the extension device on the Ca^{2+} -imaging microscope. An arrow in A indicates the direction of extension.

B. HEK293 cells expressing TRPV2 were exposed to membrane stretch (102.8% extension) for 15 seconds by the STREX machine during Ca^{2+} -imaging. The red signals in the most left picture represent the TRPV2 transfected cells revealed by Ds-Red co-expression. Fura-2 ratio traces by symbols are from the cells indicated by the same symbols in the pseudocolor image. Ca^{2+} influx was observed only in the transfected cells (red cells) by 102.8% stretch. C. The representative traces were shown in the graph (both transfected and non-transfected cells).

そこで、それを示すために次のような実験系を組んだ。単離した発生期の運動神経・感覚神経に3種類のプラスミドを強制発現した(コントロールとしてEGFPのみ。WT-V2-IRES-EGFP、あるいは、DN-V2-IRES-EGFP)。その後、CO₂インキュベーターで通常通り培養する群と共に、CO₂インキュベーターの中でシェーカーに乗せて“ゆらゆら”と揺らしながら培養する群を設けた。揺らしながら培養することでディッシュ中の培地がかき回されることで細胞膜にかかる物理的な力(=機械刺激)が増すであろうと考えた訳である。そして、これらの群を2日間培養した後に、その軸索の伸長度合いを定量化して比較した。その結果、

TRPV2は細胞膜にかかる機械刺激により活性化し、細胞外から細胞内へとCa²⁺流入を促すことで軸索伸長を促進していることを突き止めた(図4)。世界で初めてメカノセンサー分子の活性化による軸索伸長の促進を観察したのだ。しかしながら、この実験系は単離した運動神経・感覚神経を用いた実験系であることが弱点であった。つまり、*in vitro*系特有の人工的イベントではないのか?と問われた際には、*in vivo*でも起こっているという回答をすることが出来ない。この点より、*in vivo*における実験証明が必要であった。

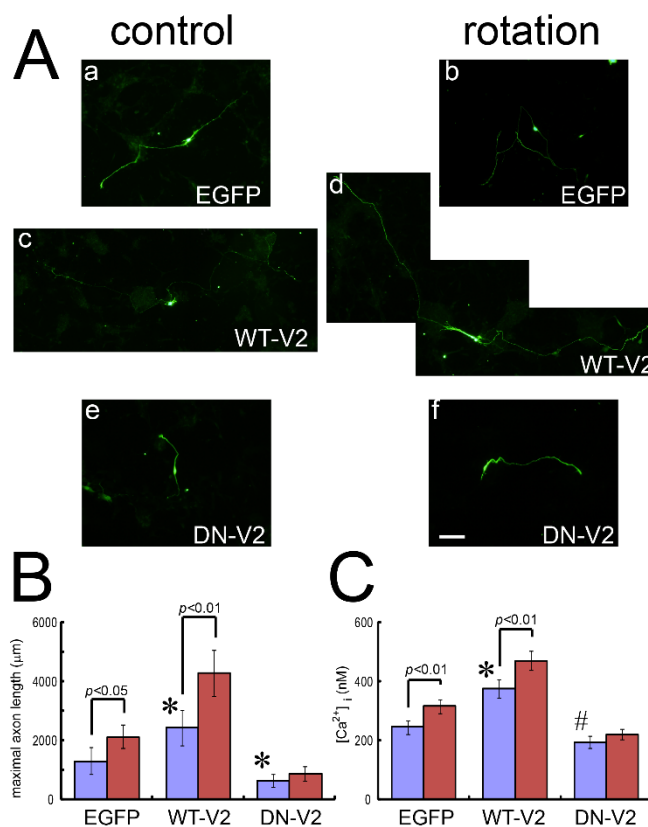


Figure 4. TRPV2 activation through membrane stretch promotes axon outgrowth in developing sensory neurons.

A: Representative images of cultured DRG neurons from E12.5 embryos (at 2 DIV); a cell expressing EGFP (a), a cell expressing WT-V2 (c) and a cell expressing DN-V2 (e). All plasmid DNAs were incorporated by electroporation. Five independent cultures were examined (n = 121 - 155). WT-V2 expression significantly enhanced axon outgrowth (c) compared with EGFP (a). Conversely, DN-V2 expression significantly inhibited axon outgrowth (e). In order to apply mechanical force on the cell membrane, we cultured dissociated DRG neurons electroporated with cDNA of EGFP alone (b), WT-V2 (d) or DN-V2 (f), on a shaker (rotation). The rotation enhanced axon outgrowth in EGFP- or WT-V2-expressing neurons, but not in DN-V2-expressing neurons. Scale bar, 200 μm. **B:** Average maximal axon length was quantified both in control (blue) and rotation (red) conditions. **C:** Comparison of intracellular calcium level both in control (blue) and rotation (red) conditions. All values represent mean ± SEM. Significant differences are represented as * (p<0.01) vs. EGFP values or # (p<0.05) vs. EGFP values.

発生期の胎仔を用いて神経管へと WT-V2 や DN-V2 を強制発現出来れば、*in vivo* 実験証明につながると考えた。強制発現実験の問題点は、マウスを用いた場合には子宮膜越しに神経管へとプラスミド DNA を注入することがとても難しいことであった。最近、マウス胎仔の脳への遺伝子導入は一般的な手法となっているが、これは大きな脳室が存在するから可能なのであり、ターゲットを神経管に移すと全く勝手が違う。このため、強制発現実験にはマウスを用いることをあきらめ、その代わりにニワトリ胚を用いることを思い立った。卵ならば、卵殻さえ取り除けば、容易に神経管の位置を特定でき、簡単に遺伝子導入することが出来る。そういった先行研究も多数有り、それらとの比較も行うことが出来るためである。まだ運動神経が誕生する前段階で、ニワトリ胚の神経管片側だけに EGFP のみ、WT-V2-IRES-EGFP、あるいは、DN-V2-IRES-EGFP を強制発現させ(図 5A)、1 日間だけ孵卵器で発生を進ませた。そうするとこの 1 日間の孵卵培養中に運動神経が誕生して、末梢へとその軸索を伸長させた。遺伝子導入した側の神経管で、EGFP 陽性運動神経の軸索伸長度合い(図 5B)を定量比較した。このニワトリ胚実験系の優れたところは、遺伝子導入していない側の神経管を比較対象として使用することで、遺伝子導入による異常を伴っていないことを示すことが出来る点である。内在性の軸索伸長を調べるために脊髄組織切片を抗ニューロフィラメント抗体で染色し、その軸索伸長度合いを EGFP 陽性運動神経と比較した(図 5B)。その結果、WT-V2 を強制発現すると運動神経の軸索伸長は促進し、DN-V2 を強制発現した場合には軸索伸長が抑制された(図 5B)。これらの *in vivo* での結果は、上述した *in vitro* 実験の結果とピタリと一致したことより、TRPV2 の活性化に伴い、生体内においても軸索伸長が促進することが示された。

3. 2 TRPV2 は内臓においてもメカノセンサーとして機能している

以上の結果より、TRPV2 は発生期の軸索伸長中にはメカノセンサーとして機能し、軸索伸長を促進することが明らかになった。ちょうどこの研究をまとめている最中に、消化器内科との共同研究を行うことになった。身近な現象と自分のデータを結びつけて研究を進めることにした。

皆さんにも経験がおりだろうが、動物を解剖した際、死後であっても、腸管はウニウニと蠕動運動を繰り返

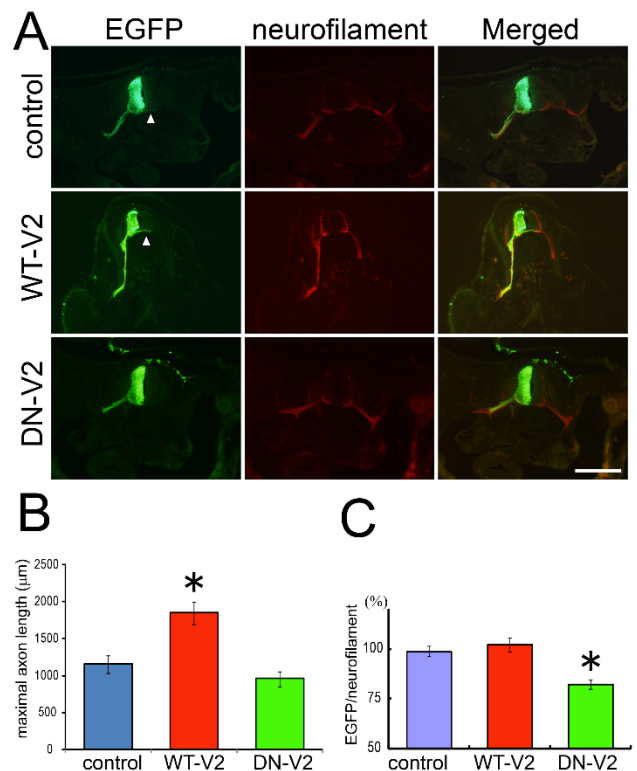


Figure 5. TRPV2 regulates axon outgrowth in chick embryos.

A: Representative images of motor neurons, which were identified by neurofilament expression (red) in chick embryos; a control spinal cord tissue expressing EGFP, a tissue expressing WT-V2 and a tissue expressing DN-V2. Arrowheads indicate commissur axons. All plasmid DNAs were incorporated by electroporation *in ovo* at HH 10-14 stages. After 1 day, chick embryos were fixed and tissue sections were prepared. Fourteen to sixteen independent embryos were examined. WT-V2 expression significantly enhanced axon outgrowth compared with EGFP. Scale bar, 1 mm. **B:** Maximal axon length in each embryo was measured and quantified. **C:** Ratio of GFP signal to neurofilament was quantified. All values represent mean \pm SEM. Significant differences are represented as * ($p < 0.01$) vs. control values.

す。腸管神経節にある運動神経と感覚神経が、この蠕動運動を支配しているためである。しかしながら、どのような分子機構で蠕動運動が制御されるのかは明らかではなかった。そこで、メカノセンサーTRPV2 が腸管神経節に発現していれば、腸管が自分の動きを感知して指令を与えられるのではないかと予想を膨らませた。このため、まず、腸管神経節における TRPV2 発現を調べてみた。すると NO

を放出する抑制性運動神経に TRPV2 が発現していた。これはひょっとすると、抑制性運動神経であるにも関わらず、メカノセンサーを介して自分自身を感覚神経としても機能させているのではないか (efferent=afferent の神経が存在するのでは)？一つの仮説が生まれた。検証実験を進めていくと、その仮説は大当たりであった。腸管神経節の抑制性運動神経は TRPV2 をメカノセンサーとして用いることで腸管の動き具合を感知し、NO を放出することで蠕動運動を制御していたのだ⁽⁸⁾。このように 2 つの実験系 (発生期の軸索と腸管神経節) において、TRPV2 はメカノセンサーとしても機能することが証明された。

3.3 非常に微弱な機械刺激を感知する TRPV2 は受動的軸索伸長に関与する可能性がある

現在、本研究は、TRPV2 がどれくらい小さな力を感知できるメカノセンサーなのか？というポイントに力点を置いている。軸索伸長中に細胞膜にかかる超微弱な物理的な伸展刺激で TRPV2 は十分に活性化出来ると予想しており、受動的軸索伸長 (動物が体の成長に応じて、神経回路の長さを調節する) に TRPV2 を用いている可能性が高いと考えているからである。

TRPV2 が超微弱な伸展刺激を感知することを証明するためにパッチクランプの実験システムにどのくらいの膜伸展刺激を付加したのかをモニターできる計測システムを取り付けた。そして、このシステム下で、TRPV2 陽性細胞と陰性細胞の機械刺激依存性をホールセルパッチクランプ法で解析した。その結果、TRPV2 陰性細胞は膜伸展刺激により惹起される内向き電流が全く観察されないのに比較して、TRPV2 陽性細胞では膜伸展刺激の強度依存的な内向き電流が観察された (図 6)。特に注目すべき点は、微弱な膜伸展刺激においても TRPV2 の活性化が見られたことである (図 6)。予想通り TRPV2 はメカノセンサーとして、微弱な機械刺激を感知する特性を備えていると考察された。

では、TRPV2 が受動的軸索伸長時に付加されるような非常に微弱な機械刺激を受容した場合にも、軸索伸長は促進するのであるだろうか？培養細胞を用いた検証を行った。成体のマウス DRG から感覚神経細胞を単離し、2 日間培養した。その後、成長円錐の真上にガラスキャピラリーを置き、そこから 1 cm H₂O という超微弱な陽圧 (我々の皮膚

にアプライしても感知出来ないほど微弱な機械刺激) をアプライした。陽圧アプライに伴い、成長円錐において細胞内 Ca²⁺ 上昇が観察され、その付加後の 30 分間では軸索伸長の程度が有意に増加した (図 7)。

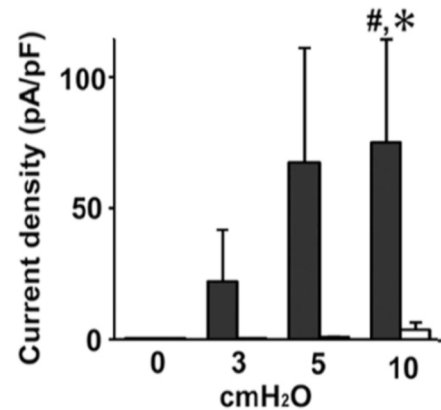


Figure 6. Weak membrane stretches evoke TRPV2 activation

Current densities for 3, 5, and 10 cm H₂O pressure-induced responses in mouse TRPV2 transfected HEK293 cells. Pressure-induced TRPV2-mediated responses (10 cm H₂O) were significantly larger than those in 0 cm H₂O pressure-induced responses in TRPV2-expressing cells (#*p*<0.05) and than those in 10 cm H₂O pressure-induced responses in cells not expressing TRPV2 (**p*<0.05).

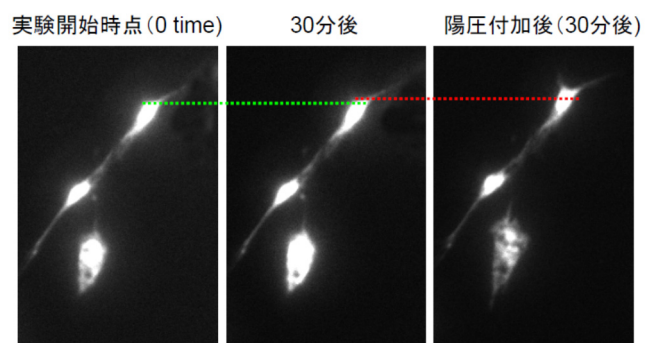


Figure 7. Weak membrane stretches promote axon extension

DRG neurons were cultured, and Fura-2AM was applied to the cells. The time lapse imaging was performed focusing on the location of growth cone. Basal axon elongation during 30 min was shown by green dashed line. Membrane stretch evoked axon elongation during 30 min was shown by red dashed line.

3. 4 TRPV2 全身 KO マウス解析と問題点

上記の軸索伸長促進効果は TRPV2 活性化に伴う変化なのであろうか？ TRPV2 の関与を調べるために、TRPV2 遺伝子の開始コドンを含むエキソンを loxP で挟んだアレルを導入した TRPV2 flox/flox マウスに EIIa-Cre Tg マウス (全身で Cre Recombinase を発現) を交配し、全身で TRPV2 が欠損した TRPV2KO を作製した。この TRPV2KO 成体マウス DRG から感覚神経細胞を単離し、同様の実験を行ったところ、陽圧アプライに伴う細胞内 Ca²⁺ 上昇と軸索伸長促進が野生型と比較し、減弱していることが観察された。以上の解析結果より、TRPV2 は非常に微弱な機械刺激で活性化し、それに伴い軸索伸長が促進することが判明した。この点より、TRPV2 は受動的軸索伸長に密接に関わる分子の有力候補であると考えられる。では、新たに作出した TRPV2KO マウスはどんな表現型異常を持つのであろうか？この全身型 TRPV2KO マウスは交配にとっても苦労があった。TRPV2 ヘテロ同士を交配して得た子供には、ほとんどホモ (TRPV2KO) マウスがいなかったためである。72 匹の産仔を得て、3 匹のみがホモマウスであった。メンデルの法則とは全く一致しない。そこで、妊娠中の母マウスを解剖してみると何匹かの胎仔が子宮内で死亡しており、それらの遺伝子型はホモであった。現在のところ、理由は全く不明であるが、TRPV2 を全身で KO すると出生前後で死亡してしまう個体がほとんどであることが判明した。しかしながら、上述したように生き残って出生し、成体にまで発育するホモマウスもわずかではいるが存在する。(BDNF 全身 KO マウスも同様に、ほとんどのホモ個体が死んでしまうのに、どういう訳かほんの一部のホモ個体は生き残り、成体にまで発育する。この例と共通している現象のようである。)この一部のホモ個体のみが生き残る現象は、私とは別に全身型 TRPV2KO マウスを作製した米国グループが昨年報告している⁽⁹⁾。

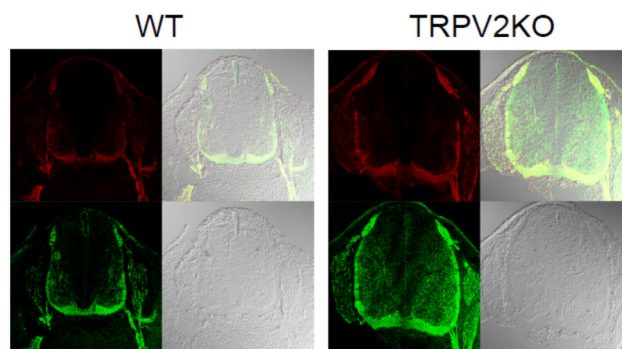
こういった複雑な背景事情を持つが、ともかく成体にまで発育した生き残り TRPV2KO マウスを組織・解剖学的に解析してみた。その結果、生き残り TRPV2KO マウスでは、組織学的な異常を持つ領域も存在するものの、運動神経・感覚神経の軸索伸長や投射には大きな異常は観察されなかった (図 8)。つまり、上述してきた私の実験結果とは一致しなかった。

その理由としては、①「ほとんどのホモマウスが死亡して

いるので、これらの死亡個体にこそ大きな表現型があった可能性」、②「TRPV2 を KO したことで、その機能を補償するような遺伝子発現変化が起こっていること」、③「生体内において TRPV2 は神経回路形成には重要な分子ではない」という可能性が考えられる。①の可能性に関しては、作製したマウスが TRPV2 flox/flox マウスなので、組織特異的な Cre マウスと交配することで、その問題を回避できる。そこで、脊髄運動神経と DRG 感覚神経特異的な TRPV2CKO を実現することを目的に Islet1-Cre マウスと TRPV2 flox/flox マウスを交配した脊髄運動神経と DRG 感覚神経特異的な TRPV2CKO を作製し、解析を続けている。

上述した可能性の② (TRPV2 機能の補償) を検証するために、野生型と生き残り TRPV2KO マウスの DRG における遺伝子発現や細胞内シグナリングの変化を解析した。この解析において、TRPV2 以外の軸索伸長促進作用を

E12.5



adult

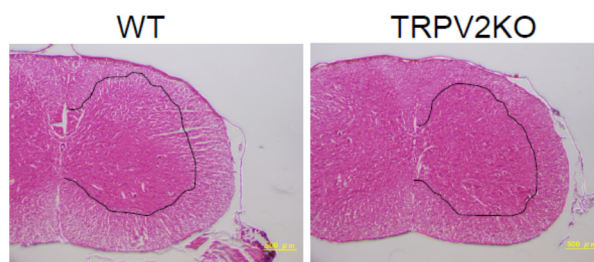


Figure 8. TRPV2KO mice did not show any abnormalities related to axonal growth

We analyzed WT or TRPV2KO spinal cords by immunostaining with anti-neurofilament 145 antibody or anti-CGRP antibody at E12.5. Furthermore, we performed the HE staining in adult WT or TRPV2KO spinal sections.

持つ TRP チャネルの発現増加が観察された(図 9)。この結果から、TRPV2KO では、なんらかの機能補償システムが働いている可能性が極めて強いと考察される。TRPV2KO マウス胎仔のほとんどが死亡することや TRPV2KO に伴う他の分子の発現増加などの実験結果から可能性③(TRPV2 は重要な分子ではない)はとも考えにくい。TRPV2 は個体の発育のためにとても重要な遺伝子であり、このため TRPV2KO 胎仔が致死に至り、生き残った TRPV2KO では他の遺伝子発現が増強しているであろう。

3. 5 TRPV2CKO(Islet1-Cre マウス×TRPV2 flox/flox マウス)における軸索伸長の変化

これまでのところ、TRPV2CKO の胎仔を用いた組織学的解析からは大きな神経回路異常は見つかっていない。より詳細な解析により、投射異常などを調べているところである。このため、*in vivo* 実験と平行して、WT と TRPV2CKO の同腹仔から調製した培養 DRG 感覚神経

細胞を用いた *in vitro* 実験も行った。その結果、TRPV2 欠損神経細胞では、WT 神経細胞と比較して、神経回路形成が有意に阻害を受けることが判明した(図 10)。また、その際に軸索の分岐数にも違いがあるのかを定量的に解析した結果、軸索分岐には有意な違いは認められなかった(図 11)。これらの点より、膜伸展刺激による TRPV2 活性化は発生期の軸索を伸ばすところに作用していることが明らかになった。

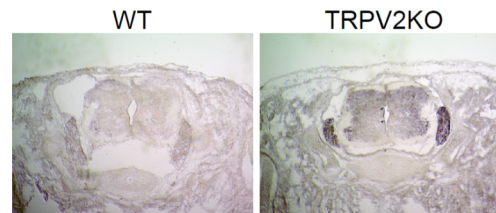


Figure 9. TRPV2KO DRG and spinal motor neurons abnormally expressed TRPC5 channel
TRPC5 mRNA was detected in spinal sections of WT or TRPV2KO at E14.5.

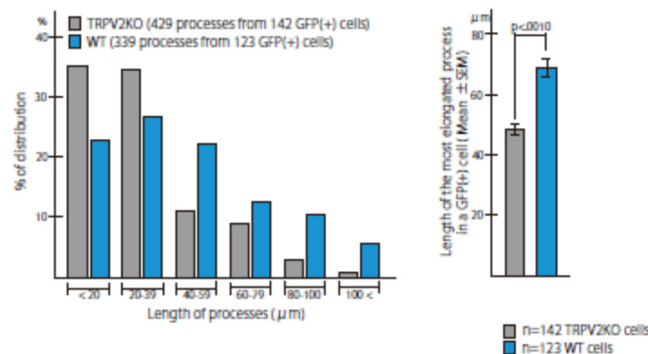


Figure 10. Cultured TRPV2CKO neurons impaired the axonal outgrowth

The cultured DRG neurons were prepared from WT or TRPV2CKO mice at E12.5. To visualize their morphology, EGFP plasmids were electroporated, and cultured for 2 days. The maximal axon length was quantified both in TRPV2CKO (gray) and WT (blue). Right graph represents the distribution of the maximal axon length, and left graph represents the average of maximal axon length. All values represent mean \pm SEM.

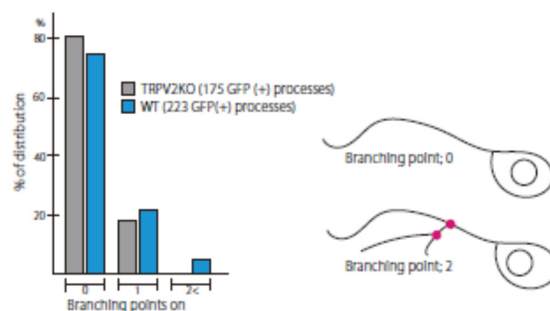


Figure 11. Cultured TRPV2CKO neurons displayed normal axonal branching

The cultured DRG neurons were prepared from WT or TRPV2CKO mice at E12.5. To visualize their morphology, EGFP plasmids were electroporated, and cultured for 2 days. The axon branching was quantified as the cartoon.

3. 6 TRPV2 はアストロサイトにも発現し、機能している

上述したように TRPV2 は神経細胞に発現し、発生期にはその神経回路形成を制御しているが、神経細胞以外の神経系細胞には発現していないのであろうか？この点を明らかにするために、脳内における TRPV2 発現を解析した。その結果、TRPV2 は神経細胞に加え、アストロサイトにも発現していることが明らかになった(図 12)。アストロサイトに発現する TRPV2 が機能的であるのかを調べるために、培養アストロサイトに人工的な侵害熱刺激(60度程度までの加温)の付加を行い、アストロサイトに興奮が惹起されるのかをカルシウムイメージング法を用いて調べた。その結果、培養アストロサイトは約 50 度以上の熱刺激により興奮すること、その興奮が TRP チャンネル阻害剤 Ruthenium Red で阻害されることが明らかになった(図 13)。これらの結果は、アストロサイトにも機能的な TRPV2 が発現している可能性を強く示唆していた。そこで、アストロサイトに TRPV2 が機能的に発現していることを直接確かめる実験を行った。培養アストロサイトを識別するために GFAP プロモーター下に EGFP を発現するコンストラクトを作製し、これを細胞に遺伝子導入した(図 14A)。そして、緑色に光った細胞のみから電流応答を取ることで、GFAP 陽性アストロサイトの性質を調べた。さらに遺伝子導入時に、pCAG(Mock)あるいは pCAG-ドミナントネガティブ TRPV2 変異体(DN-TRPV2)のどちらかを発現させた。これらの細胞に 55 度程度の熱刺激を行い、熱活性化電流の大きさを調べた。その結果、Mock 群では外向き整流性の大きな電流が観察されたが、DN-TRPV2 群ではその電流が消失していた。これらの結果から、運動神経・感覚神経以外に、アストロサイトにも機能的な TRPV2 が発現していることが示された(図 14)⁽¹⁰⁾。さらにこの解析の中で、TRPV4 もアストロサイトに RNA 発現が認められること(図 12)、34 度以上の温刺激に伴う TRPV4 活性化電流が観察されることも明らかになった(図 14)。アストロサイトに発現する TRPV4 の生理学的意義を解析したところ、脳内で神経細胞が活動し、アラキドン酸が産生すると、これを少数だけ存在する TRPV4 陽性アストロサイトがキャッチ。するとグリア性伝達物質である ATP が放出することが判明した(図 15)。この ATP を介して、周りのアストロサイトへと次々に興奮信号が伝播し、それらのアストロサイトから別

の伝達物質であるグルタミン酸が放出し、神経活動が増強することを突き止めた(図 15)⁽¹¹⁾。これらの内容は卓越しており、大きな社会貢献が期待されることから、この号の表紙に研究実施者の研究データが使用された(図 16)。

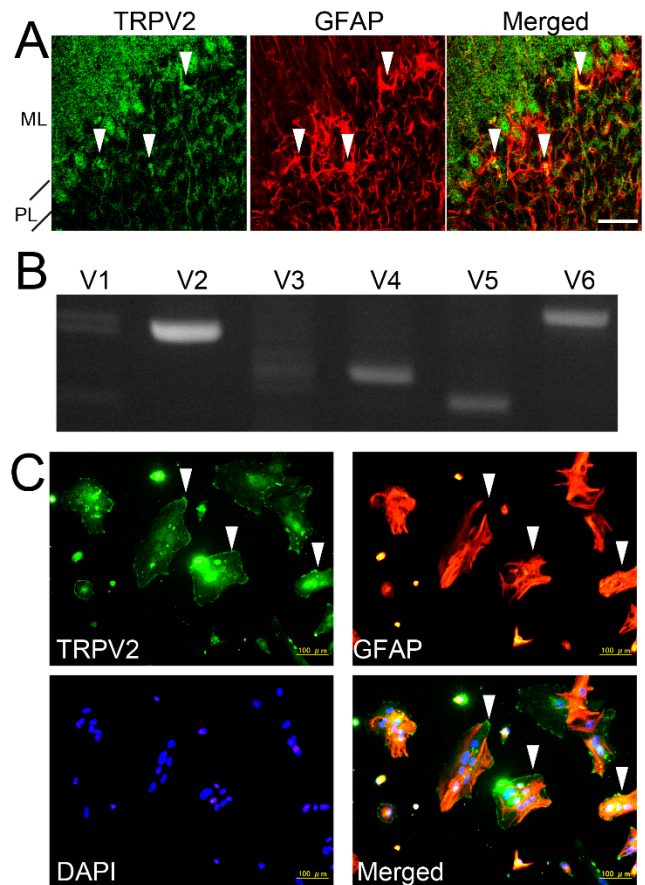


Figure 12. TRPV2 is expressed in neurons and astrocytes
A; Immunostaining of TRPV2 (green) and GFAP (red) in adult mouse cerebellum. ML; molecular layer. PL; Purkinje cell layer. TRPV2 expressions were observed in ML, PL and internal granular layers. Arrowheads represent TRPV2-expressing GFAP-positive astrocytes. Scale bar; 100 μ m. **B;** RT-PCR was performed from total RNA of cultured cerebellar astrocytes by each TRPV channel primer sets. **C;** Immunostaining of TRPV2 (green) and GFAP (red) in cultured cerebellar astrocytes. Those cells were counter stained by DAPI (blue). Arrowheads represent TRPV2-expressing GFAP-positive astrocytes. Scale bars; 100 μ m.

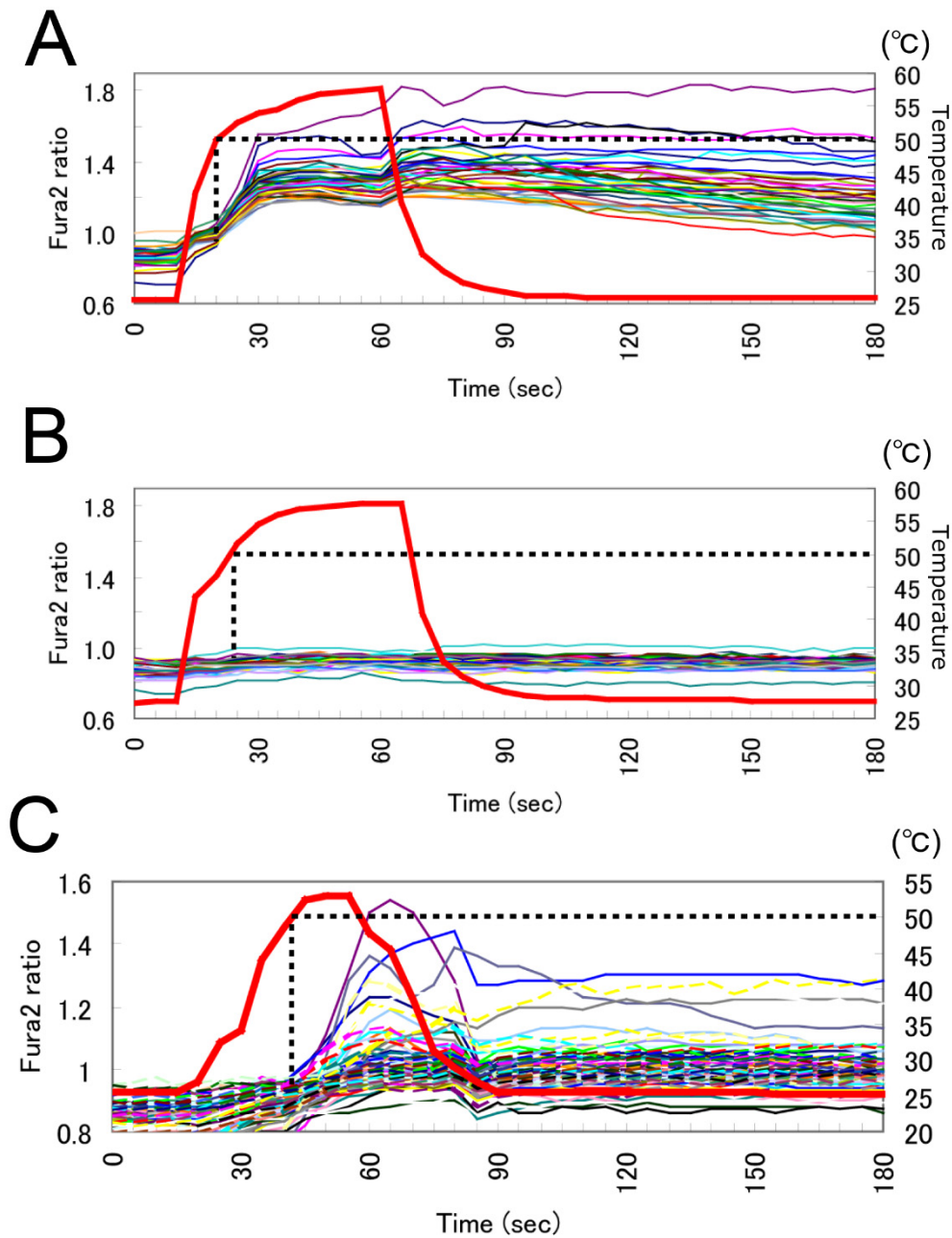


Figure 13. Astrocytic TRPV2 respond to heat stimulus

A, B; Quantification of Ca^{2+} -imaging experiments in cultured cerebellar astrocytes. We applied heat stimulus from room temperature to near 60 °C. Red thick traces represent the heat changes. Other thin traces represent changes of $[Ca^{2+}]_i$. Heat application (A) evoked steep rises of $[Ca^{2+}]_i$, however, heat application in the presence of 10 μ M ruthenium red (B) inhibited the rises of $[Ca^{2+}]_i$. Dashed lines represent the temperature threshold for rises of $[Ca^{2+}]_i$. **C;** Quantification of Ca^{2+} -imaging experiments in cultured cerebellar astrocytes. We applied short heat stimulus from room temperature to near 55 °C. Red thick trace represents the heat changes. Other thin traces represent changes of $[Ca^{2+}]_i$. Dashed line represents the temperature threshold for rises of $[Ca^{2+}]_i$.

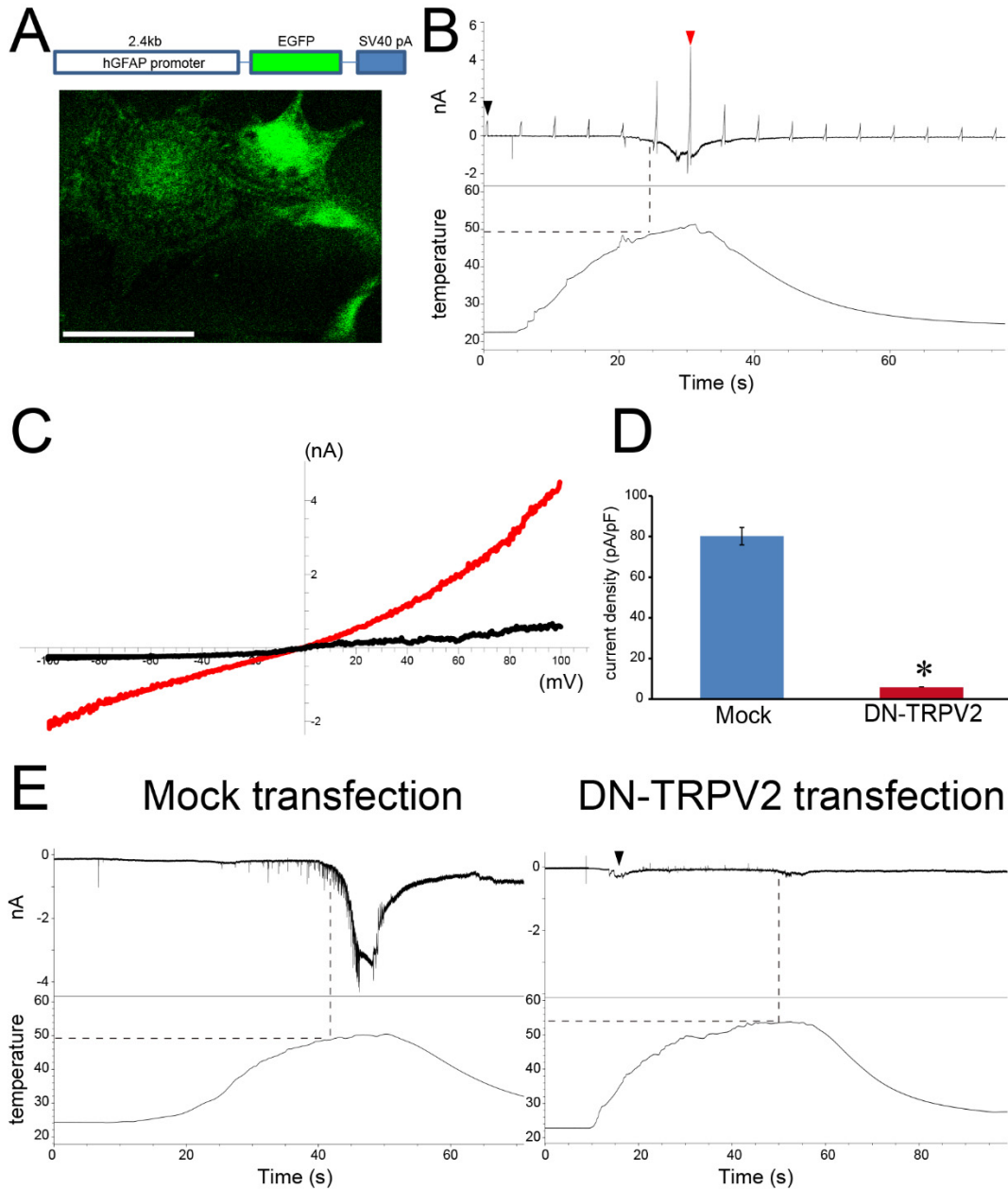


Figure 14. Astrocytes respond to heat stimulus by activation of TRPV2

A; A schematic drawing of EGFP expression vector under hGFAP promoter control. The representative picture was taken after the vector was expressed in cultured cerebellar astrocytes (2 days after). Scale bar; 50 μm . **B**; A representative trace of heat-evoked current in cultured cerebellar astrocyte. The current was recorded in an EGFP-expressing GFAP positive astrocyte. Holding potential was at -60 mV. Dashed line represents the temperature threshold of heat-evoked current. **C**; The outward rectified current-voltage relationship of heat-evoked current (red trace) corresponding to red arrowhead point in panel A. Black trace represents linear basal current-voltage relationship corresponding to black arrowhead point in panel A. **D-E**; Comparison of current densities between mock or DN-TRPV2 expressing astrocytes. Quantified current density results were shown as bar graphs (D). Asterisk represents statistical significance at $p < 0.01$. Representative traces of heat-evoked current in cultured cerebellar astrocyte expressing mock or DN-TRPV2 (E). Holding potential was at -60 mV. Occasionally, lower temperature threshold heat-evoked current was observed (arrowhead), as we found some of specific astrocytes rarely expressed TRPV4 (under submission). Dashed line represents the temperature threshold of heat-evoked current.

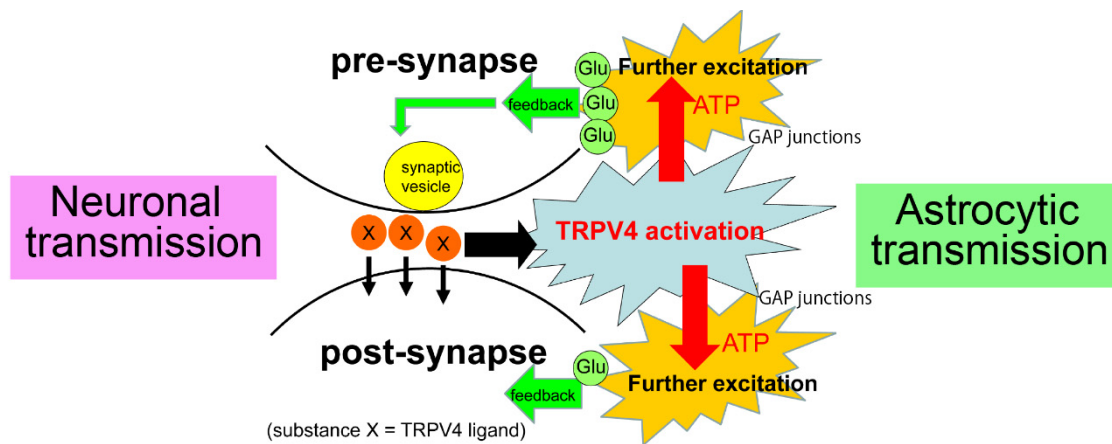


Figure 15. *TRPV4⁺-specific subtypes of astrocytes are modulate synaptic activities*

Schematic representation of our findings. A particular subtype of astrocytes shown by blue color ($TRPV4^+$) is specifically localized in the brain; activation of $TRPV4$ in these astrocytes causes excitation in neighboring astrocytes through GAP junctions and ATP release (shown as red arrows). The expanded excitation in astrocytes form excitatory astrocytes unit, and causes glutamate release from astrocytes (shown as green arrows). Glutamate release affects type I mGluRs in pre-synaptic sites and enhances neurotransmitter release.



Figure 16. The JBC cover art

Astrocytes (shown by red as GFAP-staining) have novel specific communications with neurons (shown by green as Tuj1-staining). $TRPV4^+$ astrocytes constitute a novel subtype of the population and are solely responsible for initiating excitatory gliotransmitter release to enhance synaptic transmission. $TRPV4^+$ astrocytes release ATP and glutamate to regulate neurons.

4. 考 察

今世紀に入り、分子生物学・生理学を融合し、且つ、最先端の機器を駆使することにより次々とメカノセンサー分子が同定され続けている。最近も米国のグループが新規メカノセンサーを 2 種類発見している。彼らはピエゾ素子が組み込まれた機器で微弱な機械刺激を発生させ、メカノセンサーの探索を行ったため、発見した分子をピエゾ 1、ピエゾ 2 と名付けた^(12,13)。研究実施者の場合は、既に熱センサーとして知られていた TRPV2 が、実はメカノセンサーとしても機能することを見いだした。これらの点より、長い間続けられている神経回路形成の分子機構の研究は新たな段階に突入したと言えるかもしれない。現象論としては知られていた「受動的軸索伸長」であったが、メカノセンサー分子が未同定のために手つかずのまま放置されてきた感がある。著者を筆頭に、メカノセンサー分子の特性解析を切り口にして進んでいけば、全く手つかずであった「受動的軸索伸長」の分子メカニズムは解明されていくものと期待される。この研究の重要なポイントは研究対象分子が機械刺激を受容するメカノセンサー分子だということである。研究が進めば、効率的なメカノセンサーの活性化のさせ方が明らかになり、軸索伸長を促すことも可能になるかもしれない。本プロジェクト研究の目的であった「センサーとしての Ca^{2+} 透過性チャネルの制御機構とその生理学的意義」を考慮すると、TRPV2 を活性化させ、透過する Ca^{2+} 量を増加させる薬剤を開発することで損傷軸索再生を促すことが可能になるかもしれない。

今はまだ夢物語であるが、日本発の科学技術である iPS 細胞に「受動的軸索伸長の分子メカニズム解明」で得られた知見を足し合わせることで効率的な損傷神経の再生を行うことが出来る日も来るかもしれない。

5. 今後の課題

以上の結果から、TRPV2 は非常に微弱な機械刺激をも感知可能なメカノセンサーであることが世界で初めて立証された。培養細胞を用いた実験結果から、そのような微弱な機械刺激による TRPV2 活性化が起こった場合にも軸索伸長が促進することが示された。これらのことを総合すると、TRPV2 が受動的軸索伸長の鍵分子である可能性が極めて高いと考察される。しかしながら、この点を科学的に実証するためには TRPV2CKO マウスの体内で生じている神

経回路異常を見いださねばならない。

研究実施者の実験データを元に考えると TRPV2 は軸索伸長に関わる重要なメカノセンサーであることは間違いない(図 4-5)。しかし、軸索伸長に関わるメカノセンサー分子は TRPV2 だけではないことも明らかである(図 3-5)。受動的軸索伸長を含む神経回路形成の分子機構の全容を解明していくためには、TRPV2 以外のメカノセンサー分子の同定とそれらがどのように軸索伸長を制御しているのかも調べていく必要がある。筆者はこのような観点からも研究を行っている。

メカノセンサー・TRPV2 の活性化は損傷神経の再生とも密接な関連性を持つようである。現在、まさに研究中有るため、本稿でのデータ提示をすることが出来ないが、このような神経再生との関連性の解明に大きく役立つ重要な切り口になるのではないかと期待している。

著者が研究を開始する前には「熱センサー」と捉えられ、痛みとの関連性のみがクローズアップされ、研究が進展してきた TRPV2 であるが、著者の研究から、実はメカノセンサーとして神経回路形成や腸管蠕動運動の制御に関わっていることも見えて来た。このような新たな特徴を掘り下げていくことで、新規の薬剤ターゲットとなり得るかもしれない。

6. 引用文献

1. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398: 436-441.
2. Shibasaki K, Suzuki M, Mizuno A, Tominaga M (2007) Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 1566-1575.
3. Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, et al. (2003) TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circulation research* 93: 829-838.
4. Suter DM, Miller KE (2011) The emerging role of forces in axonal elongation. *Progress in neurobiology* 94: 91-101.

5. Smith DH (2009) Stretch growth of integrated axon tracts: extremes and exploitations. *Progress in neurobiology* 89: 231-239.
 6. Shibasaki K, Murayama N, Ono K, Ishizaki Y, Tominaga M (2010) TRPV2 enhances axon outgrowth through its activation by membrane stretch in developing sensory and motor neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 4601-4612.
 7. Naruse K, Yamada T, Sokabe M (1998) Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch. *The American journal of physiology* 274: H1532-1538.
 8. Mihara H, Boudaka A, Shibasaki K, Yamanaka A, Sugiyama T, et al. (2010) Involvement of TRPV2 activation in intestinal movement through nitric oxide production in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 16536-16544.
 9. Park U, Vastani N, Guan Y, Raja SN, Koltzenburg M, et al. (2011) TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 11425-11436.
 10. Shibasaki K, Ishizaki Y, Mandadi S (2013) Astrocytes express functional TRPV2 ion channels. *Biochemical and biophysical research communications* 441: 327-332.
 11. Shibasaki K, Ikenaka K, Tamalu F, Tominaga M, Ishizaki Y (2014) A novel subtype of astrocytes expressing TRPV4 regulates neuronal excitability via release of gliotransmitters. *The Journal of biological chemistry* 289: 14470-14480.
 12. Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, et al. (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330: 55-60.
 13. Coste B, Xiao B, Santos JS, Syeda R, Grandl J, et al. (2012) Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature* 483: 176-181.
7. 論文業績および学会発表
- #印は申請者が corresponding author であることを示す。
- (論文)
- 1) Brain microvascular endothelial cell transplantation ameliorates ischemic white matter damage. Puentes S, Kurachi M, Shibasaki K, Naruse M, Yoshimoto Y, Mikuni M, Imai H, Ishizaki Y. *Brain Res.* 1469:43-53 (2012)
 - 2) Stimulation of transient receptor potential vanilloid 4 channel suppresses abnormal activation of microglia induced by lipopolysaccharide. Konno M, Shirakawa H, Iida Shota, Sakimoto S, Matsutani I, Miyake T, Kageyama K, Nakagawa T, Shibasaki K, Kaneko S. *GLIA* 60(5) : 761-70 (2012)
 - 3) Implication of the Communication from Photoreceptor to Retinal Pigment Epithelium. \$ Matsumoto H, \$ Shibasaki K, Uchigashima K, Koisumi A, Kurachi M, Watanabe M, Kishi S, Ishizaki Y. *PLoS ONE* 7: e42841 (2012) \$ **Co-1st author**
 - 4) Dynamic Changes of CD44 Expression from Progenitors to Subpopulations of Astrocytes and Neurons in Developing Cerebellum. \$ Naruse M, # \$ Shibasaki K, Yokoyama S, Kurachi M, Ishizaki Y. *PLoS ONE* 8;e53109 (2013) \$ **Co-1st author**
 - 5) Astrocytes express functional TRPV2 ion channels. # Shibasaki K, Ishizaki Y, Mandadi S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441: 327-332 (2013)
 - 6) Cerebellar neural stem cells differentiate into two distinct subtypes of astrocytes in response to CNTF and BMP2. Okano-Uchida T, Naruse M, Ikezawa T, Shibasaki K, Ishizaki Y. *Neuroscience Letters* 552 15-20 (2013)
 - 7) Motor dysfunction in cerebellar Purkinje cell-specific vesicular GABA transporter knockout mice. Kayakabe M, Kakizaki T, Kaneko R, Sasaki A, Nakazato Y, Shibasaki K, Ishizaki Y, Saito H, Suzuki N, Furuya N, Yanagawa Y. *Front Cell Neurosci.* 7:286 (2014)
 - 8) Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anoctamin 1.

- Takayama Y, Shibasaki K, Suzuki Y, Yamanaka A, Tominaga M. *FASEB J.* 28(5):2238-48 (2014)
- 9) A novel subtype of astrocytes expressing TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4) regulates neuronal excitability via release of gliotransmitters.
Shibasaki K, Ikenaka K, Tamalu F, Tominaga M, Ishizaki Y. *J. Biol. Chem.* 289 (21):14470-80 (2014)
<cover of the paper> 毎日、上毛新聞に掲載
- 10) Hippocampal neuronal maturation triggers post-synaptic clustering of brain temperature-sensor TRPV4.
Shibasaki K, Tominaga M, Ishizaki Y, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458: 168-173 (2015)
- 11) Shp2 in forebrain neurons regulates synaptic plasticity, locomotion, and memory formation in mice.
Kusakari S, Saitow F, Ago Y, Shibasaki K, Sato-Hashimoto M, Matozaki Y, Hirai H, Matsuda T, Matozaki T, Ohnishi H
Mol. Cell. Biol. 35: 1557-72 (2015)
- 12) TRPV4 activation at the physiological temperature is a critical determinant of neuronal excitability and behavior.
Shibasaki K, Sugio S, Takao K, Yamanaka A, Miyakawa T, Tominaga M, Ishizaki Y
Pflügers Archiv – Eur. J. Physiol. in press
doi: 10.1007/s00424-015-1726-0
- (国際学会)
- 1) Brain temperature enhances hippocampal neuronal excitability through TRPV4 activation in vivo.
Shibasaki K, Tominaga M, Ishizaki Y.
Forum of European Neuroscience (2012) Barcelona, Spain
- 2) TRPV2 enhances axonal outgrowth. Shibasaki K, Tominaga M, Ishizaki Y.
International Society for Neurochemistry (2013) Cancun, Mexico
- 3) TRPV4 is a critical determinant for neuronal excitability through its converter function from temperature to electrical activity. Shibasaki K, Tominaga M, Ishizaki Y.
International Congress of Physiological Sciences (2013) Birmingham, U.K.
- 4) TRPV4 is a critical determinant for excitability. Shibasaki K, Tominaga M, Ishizaki Y.
Society for Neuroscience 43th Annual Meeting (2013) San Diego, U.S.A.
- 5) Astrocytes express functional TRPV2 ion channels. Shibasaki K, Ishizaki Y.
Forum of European Neuroscience (2014) Milan, Italy
- (国内学会)
- 6) Brain temperature enhances hippocampal neuronal excitability through TRPV4 activation in vivo. 柴崎貢志 第 35 回日本神経科学大会 シンポジウム講演 (名古屋)2012
- 7) 細胞力覚センサー・TRPV2 が関与する受動的軸索伸長の分子機構 柴崎貢志 日本解剖学会 シンポジウム講演(高松)2013
- 8) てんかんの病態悪化に関わる脳内温度センサー TRPV4 柴崎貢志 日本生理学会(鹿児島)2014

Mechanosensor TRPV2 Regulates Axonal Outgrowth during Development

Koji Shibasaki ¹, Kastuhiko Ono ²

¹ Department of Molecular and Cellular Neurobiology, Gunma University Graduate School of Medicine,

² Kyoto Prefectural University of Medicine

Summary

It is specific characteristics that neurons can grow to the length of more than 1 m in humans. This mechanism of elongation has been called “passive stretching”. From embryonic stages, the passive stretching-dependent axonal outgrowth begins. As our body grows, the distances between neuronal cell bodies and growth cones gradually increase, thereby exerting tensile forces on the axons. It has never been identified for a long time which molecules are the mechanosensors for it. We previously reported that TRPV2 was a mechanosensor channel which contributed axonal outgrowth in membrane stretch dependent manner. These results indicate that TRPV2 might be an important component for passive stretching, if TRPV2 can detect very weak mechanical stimulus. In this study, we examined whether TRPV2 can detect such very weak mechanical stimulus by a Ca²⁺-imaging method and a whole-cell patch clamp recording. We also examined whether the activation of TRPV2 by weak mechanical stimulus lead to the enhancement of axon outgrowth by a time-lapse imaging method. Finally, we identified that TRPV2 had a potential to detect very weak mechanical stimulus, and the activation of TRPV2 promoted axon outgrowth. Taken together, TRPV2 is a strong candidate molecule for passive stretch-dependent axonal outgrowth as an important cell-sensor, which highly permeates the Ca²⁺ ion.

TRP チャネルを介したマウス嗅覚による CO₂ 感知機構の解析

高橋 弘雄, 吉原 誠一, 坪井 昭夫

奈良県立医科大学先端医学研究機構脳神経システム医科学分野

概要 生物にとって、外界の環境変化を素早く認識し、適切な行動を選択することは、厳しい自然界を生き抜く上で極めて重要である。ヒトには匂いを感じることができない大気中の CO₂ 濃度の微妙な変化を、多くの生物が嗅覚により識別していることが近年、明らかとなっている。マウスは 0.2%以上の CO₂ 濃度に対して忌避反応を示す。これまでに匂いを感知するマウスの嗅上皮では、CO₂ センサーとして炭酸脱水酵素を発現する特殊な嗅細胞のサブタイプ (Car2 細胞) が同定されているが、一方で Car2 細胞は誘引性の社会行動に関与することが報告されている。

著者らは、マウスの嗅上皮に、CO₂ に対する忌避行動に関与する、未知の CO₂ センサー嗅細胞が存在するのではないか?と考えて研究を行い、複数種類の新規 CO₂ センサーとして働く嗅細胞の存在を見出した。近年、一部の TRP チャネルは CO₂ などのガスセンサーとして働くことが報告されている。興味深いことに、TRP チャネルの阻害剤により、新規 CO₂ センサー細胞の CO₂ への応答は顕著に阻害された。このことから TRP チャネルが嗅上皮の新規 CO₂ センサー細胞において、CO₂ の感知に関与することが示唆された。そこで嗅上皮における TRP チャネルの発現を検討した結果、嗅細胞では、TRPC1, TRPC2, TRPM5, TRPM7, TRPML3 といった複数の TRP チャネルが発現することを見出した。さらに、匂いの一次中枢である嗅球の活性化領域を検討した結果、CO₂ を嗅いだマウスでは、Car2 細胞の神経軸索の投射先である嗅覚後側ではなく、嗅球の背側領域が強く活性化することが明らかとなった。以上の結果から、新規 CO₂ センサー細胞による嗅球の背側領域の活性化が、マウスの CO₂ に対する忌避行動に関与する可能性が示唆された。

一方、マウスには、通常の匂いの識別に関わる嗅上皮に加えて、フェロモンの感知に関わる鋤鼻上皮が存在する。著者らは鋤鼻上皮の複数の神経細胞も、CO₂ への顕著な応答を示すことを見出した。解析の結果、鋤鼻細胞の CO₂ への応答には、複数の炭酸脱水酵素と TRPC2 が必須の働きをすることが分かった。

以上の解析により、マウスの嗅覚系には、嗅上皮と鋤鼻上皮の双方に新規の CO₂ センサー細胞が存在することが明らかとなった。マウスはこれらの CO₂ センサー細胞を組み合わせることにより、周囲の CO₂ 濃度やその原因となる状況の変化を判断しているものと考えられる。

1. 研究の背景と目的

近年、マウス・線虫・ショウジョウバエなどの多種類のモデル生物を用いた嗅覚研究が進むにつれ、ヒトには匂いを感じることができない CO₂ が、多くの生物には重要な匂い分子として働くことが、明らかとなっている。地球の大気には、現在約 0.04%の CO₂ が含まれているが、上記の生物は嗅覚を用いて大気中の CO₂ 濃度の微妙な変化を感知し、誘引や忌避など様々な行動を示す。嗅覚による CO₂ センシングに関する研究は、「生物が外界の環境をい

かに感知し、それに応じた行動を呈するのか?」という脳の情報処理機構を知る上で、極めて重要である。

嗅覚における CO₂ センサーの実体としては、これまでにハエの嗅覚器官の1つである触角で、味覚受容体 (gustatory receptor; Gr) に属する *Gr21a*、*Gr63a* 遺伝子が同定されている⁽¹⁾。これら 2 つの遺伝子は、同一のニューロンで特異的に発現し、協調的に CO₂ センサーとして機能して、忌避行動を惹起する。興味深いことに、マラリア媒介蚊では、*Gr21a*、*Gr63a* のホモログである *GPRGR22*、

GPRGR24 が、昆虫のもう1つの嗅覚器官である小顎鬚の同一ニューロンで発現し、CO₂ センサーとして誘引行動を惹起すると考えられている。

一方、マウス、モルモット、ウサギなどの哺乳類も、嗅覚に CO₂ センサーを持つことが明らかにされている。近年、Luo らのグループにより、マウスの嗅覚で CO₂ センサーとして働く嗅細胞のサブタイプが同定された⁽²⁾。彼らによると、匂いを受容する嗅上皮には、通常の嗅細胞とは全く異なる固有のセンサーを持つ嗅細胞のサブタイプが存在し、CO₂ センサーとして働いている。CO₂ センサー嗅細胞は嗅覚受容体を持たず、細胞質に存在する炭酸脱水酵素 carbonic anhydrase2 (Car2) が CO₂ センサーとして働く。Car2 は、CO₂ + H₂O → HCO₃⁻ + H⁺ という化学反応を触媒して、重炭酸イオン (HCO₃⁻) を産生する。重炭酸イオンはグアニル酸シクラーゼ guanylate cyclase-D (GC-D) を活性化して、cGMP が産生され、そのシグナルが脳に伝えられる⁽³⁾ (以下、GC-D を発現する既知の CO₂ センサー嗅細胞を、Car2 細胞と呼称する)。Luo らの行動実験により、マウスが大気中の CO₂ 濃度 (0.040%) をわずかに上回る 0.066% 以上の CO₂ 濃度を識別できることや、0.2% 以上の CO₂ 濃度に対して忌避反応を示すことが明らかとされている⁽²⁾。一方、Munger らは最近、Car2 細胞が、尿に含まれる urinary peptide や呼気に含まれる二硫化炭素 CS₂ といった、仲間のマウスに由来する匂い分子に強く反応し、忌避行動というよりはむしろ誘引性の社会行動に関与していることを報告した⁽⁴⁾。Car2 細胞の活性化が、忌避と誘引という正反対のマウスの行動を制御しているのか？という点はこれまで明らかとなっていなかった。そこで著者らは、「マウスの嗅覚系において、CO₂ に対する忌避行動には、未知の CO₂ センサー嗅細胞が関与しているのではないか？」と考え、その探索を行った。その結果、これまでに、マウスの嗅覚系には複数種類の新規の CO₂ センサー嗅細胞が存在することを見出している。これら新規の CO₂ センサー嗅細胞では、Car2 細胞で CO₂ センサーとして働く Car2 は発現しておらず、いかなるセンサーにより CO₂ を感知しているのか、という点は全く明らかとなっていなかった。興味深いことに、近年、一部の TRP チャンネルは CO₂ などのガスセンサーとして働くことが報告されている⁽⁵⁻⁷⁾。そこで本研究では、嗅上皮における TRP チャンネルの発現に着目して、その詳細を検討した。また、マウスの嗅覚系には通常の匂

いの感知に関わる嗅上皮に加えて、主にフェロモンの感知に関わる鋤鼻上皮が存在する。そこで、鋤鼻上皮に関しても、鋤鼻細胞の CO₂ への応答について、TRP チャンネルと炭酸脱水酵素に着目して検討を行った。

2. 研究方法

2.1 マウス

実験には、ICR 系統の生後 2-6 週齢の雄マウスを用いた。マウスは日本 SLC より購入した。実験にあたっては、奈良県立医科大学の動物実験管理規定を遵守した。

2.2 カルシウムイメージング

Ca²⁺イメージングは、以下の論文の方法に従って行った⁽⁸⁾。マウスを断頭後、嗅上皮を摘出して、手術用のメスを用いて細かく切断した。その後、嗅上皮を、0.025%トリプシンで 10 分間、次いで 0.025%トリプシンインヒビターで 10 分間、0.1mg/ml DNaseI で 1 分間処理を行った。Cell-Tak (BD) でコーティングしたガラスプレート上で嗅上皮を転がして、嗅細胞をガラス面に接着させた後、5μM Fura2-AM (invitrogen) で 1 時間細胞を処理した。細胞を Normal Ringer solution (NR: 140mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, 5mM HEPES, 9.4 mM グルコース, 2mM Sodium Pyruvate) で洗浄後、NR に匂い物質を溶かして、細胞を刺激して、嗅細胞の匂い応答を測定した。

2.3 In situ hybridization (ISH)

ICR 系統の 3 週齢雄マウスを過剰量の pentobarbital (500 mg/kg) で処理した後、4% PFA/PBS で還流してから、2 時間固定した。固定後は 4°C で 0.5 M EDTA/PBS で 2 日間、30% sucrose/PBS で 2 日間それぞれ置換して、O.C.T compound で包埋した。CM1950 (Leica) を用いて冠状面から凍結切片 (15 μm) を作成し、スライドグラスに回収した。ISH は、以下の論文の方法に従って行った⁽⁹⁾。プローブを洗浄後、Alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (1:2,000) (Roche Diagnostics) を反応させて、nitroblue tetrazolium salt (NBT) と 5-bromo-4chloro-3-indolyl phosphate toluinium salt (BCIP) により発色させた。また、Two color ISH は、以下の論文の方法に従った⁽¹⁰⁾。

NBT/BCIP により発色させた切片画像の取り込みには、正立型顕微鏡 BX51 (Olympus) 備え付けの CCD カメラ DP30BW (Olympus) を使用した。Two color ISH を行った

切片画像の取り込みには、共焦点レーザー顕微鏡 FV1000-D (Olympus) を用いた。得られた複数の画像の合成には Photoshop CS2 (Adobe) を用いた。

2. 4 切片の抗体染色

抗体染色は、以下の論文の方法に若干の変更を加えて行った⁽¹¹⁾。抗原の賦活化処理として、切片を 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 中に入れ、電子レンジで 2 分間処理してから、20 分間室温に放置した。その後、10% Normal horse serum / (PBS + 0.2% TritonX100) により室温で 1 時間ブロッッキングを行い、一次抗体を 4°C で 24 時間反応させた。その後、二次抗体を室温で 1 時間反応させて封入した。

一次抗体には Rabbit anti-Zif268 (1:3,000, Santa cruz)、Goat anti-Nrp1 (1:1,000, R&D Systems)、Goat anti-NQO1 (1:1,000, Abcam) を用い、二次抗体には DyLight549 conjugated Donkey Anti-Goat IgG (H+L) (1:500, Jackson Immuno Research) を用いた。抗体は 1% Normal horse serum / (PBS + 0.2% TritonX100) により希釈した。二次抗体と共に、DAPI (0.1 µg/ml) により核染色を行った。切片画像の取り込みは正立型顕微鏡 BX51 (Olympus) 備え付けの CCD カメラ DP30BW (Olympus) を用いて行った。

2. 5 嗅球の展開地図 (unrolled map) の作製

嗅球における神経回路の活性化部位を平面に展開した地図 (unrolled map) の作製は、以下の論文の方法に若干の変更を加えて行った⁽¹²⁾。嗅球の展開地図の作製には、ICR 系統の 6 週齢の雄マウスを用いた。マウスを個別のクリーンケージに移して、水とエサを除いて 2 時間順応させた。その後、ケージに 5 g のドライアイスを入れ、30 分間 CO₂ を嗅がせた。その後、上記 (2. 3) (2. 4) の方法により、CO₂ の匂いを嗅がせたマウスの嗅球から、120 µm 間隔で冠状面の凍結切片を作製し、Zif268 による ISH を行った。得られた ISH の切片画像において、Zif268 のシグナルが周囲 10 個以上の傍糸球細胞で見られた糸球を、反応している糸球と定義した (Fig. 5A)。ISH の切片画像において、反応している糸球を赤丸で、反応していない糸球を黒丸でプロットした後、糸球層の中心を通るように基準線 (黄色) を引いた。嗅球背側の突出した部分を背側基準点、嗅球腹側の突出した部分を腹側基準点と設定し、腹側基準点で基準線を展開して、糸球層から 1 本の帯を作製した (Fig. 5B)。以上の操作を、120 µm 間隔の切片画像の

全てにおいて行った。帯状になった糸球層を、嗅球背側の基準点で合わせて、嗅球前方から後方の切片に向かって順に並べて展開地図とした。また、同一個体の隣接切片において、上記 (2. 4) の方法により、NQO1 (NAD (P) H:quinone oxidoreductase 1) や Nrp1 (Neuropilin 1) の抗体染色を行い、それぞれが陽性となる領域を展開地図上にプロットした。尚、以上の操作は、Illustrator CS2 (Adobe) を用いて行った。

3. 研究結果と考察

3. 1 嗅上皮の CO₂ センサー細胞

3. 1. 1 嗅上皮の CO₂ センサー細胞における TRP チャネルの発現

これまでに著者らは、マウスの嗅上皮に既知の CO₂ センサー細胞である Car2 細胞以外に、複数種類の新規 CO₂ センサーとして働く嗅細胞の存在を見出している。しかしながら、新規の CO₂ センサー細胞がいかなるセンサーにより CO₂ を感知しているのか、という点はこれまで明らかとなっていない。近年、複数のグループにより、TRP チャネルが CO₂ センサーとして働くことがいくつかの組織で報告されている^(5,6)。そこで、嗅上皮で TRP チャネルが CO₂ センサーとして働く可能性を検討した。新規の CO₂ センサー嗅細胞の CO₂ への応答に対して、TRP チャネルの阻害剤として働くことが知られる Ruthenium red の影響を調べた。

その結果、CO₂ センサー嗅細胞の CO₂ への応答は、Ruthenium red 処理により、顕著に阻害された (Fig. 1)。

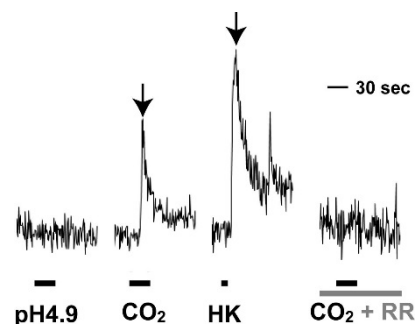


Fig. 1. Calcium imaging of novel CO₂-sensing olfactory sensory neuron (OSN) without expressing Car2. This neuron without expressing Car2 responded to CO₂. The treatment of TRP channel inhibitor, ruthenium red (RR), suppressed the response to CO₂ in the novel CO₂-sensing OSNs.

Car2 を発現しない新規の CO₂ センサー嗅細胞において、TRP チャンネルが CO₂ のセンシングに関与することが示唆された。嗅細胞では、これまでいくつかの TRP チャンネルの発現が報告されているが、その詳細や嗅細胞における機能に関しては明らかとなっていない。そこでまず、嗅細胞で発現している TRP チャンネルを明らかとするため、すべての TRP チャンネルについて *in situ* hybridization による発現解析を行った。

結果、これまでに発現の報告されている TRPM5 に加え

て⁽¹³⁾、TRPC1、TRPC2、TRPM3、TRPM7、TRPML3 といった複数の TRP チャンネルの発現が明らかとなった (**Fig. 2A-F**)。TRPC1 は嗅上皮のほぼすべての領域で発現が見られた。一方、TRPC2 は嗅上皮の一部の領域の細胞で発現が観察された。また、TRPM8 や TRPA1 は、これまでに CO₂ のセンシングに関わることや^(6,14)、嗅上皮で発現することが報告されていたが⁽¹⁵⁾、今回の著者らの検討では嗅上皮における明確な発現を見出すことはできなかった (**Fig. 2G, H**)。

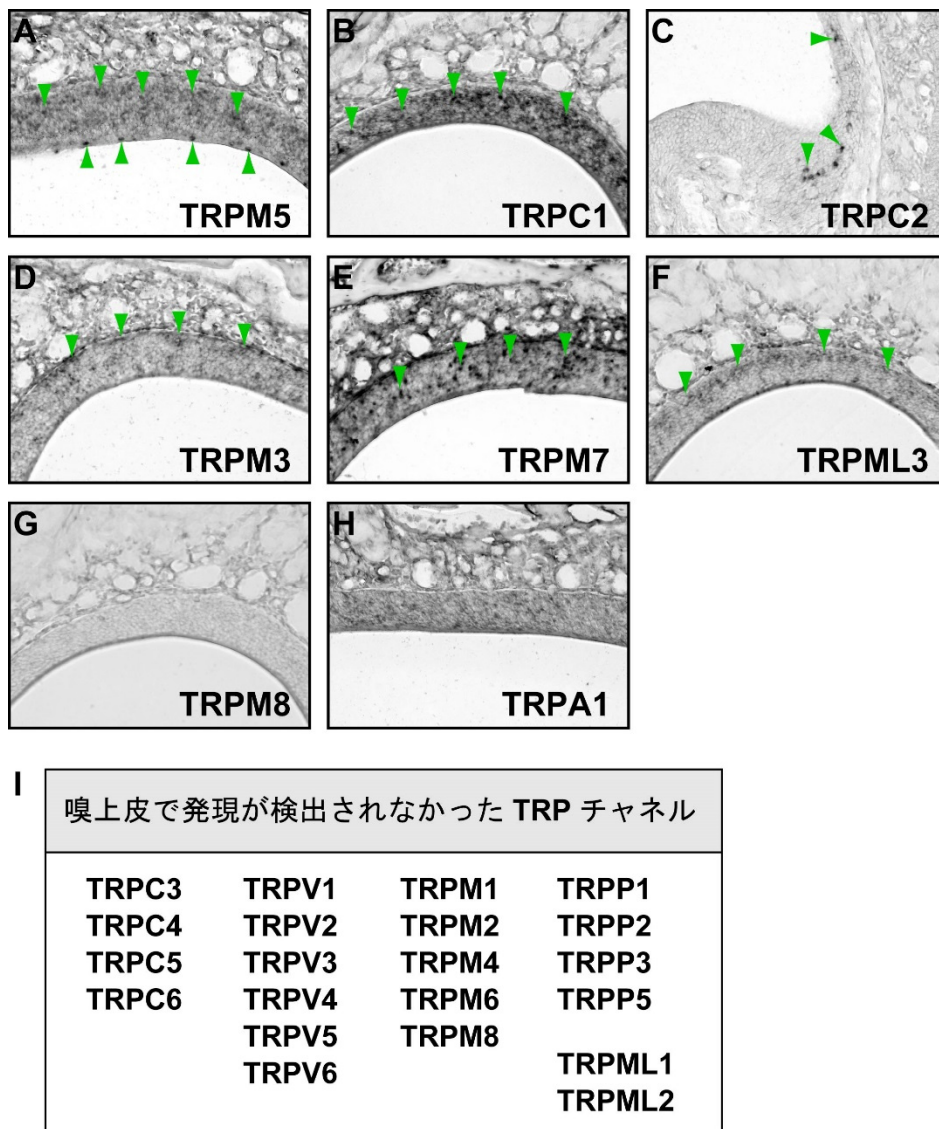


Fig. 2. Expression patterns of TRP channels in the mouse olfactory epithelium (OE).

(A-H) *In situ* hybridization of OE sections from 3-week-old mice. Green arrowheads indicate the expression of TRP channels in the OE. (I) TRP channels which were not detected in the OE

そこで次に、嗅上皮で発現の見られた TRP チャンネルが匂いのセンサー細胞である嗅細胞で発現しているのかという点について、嗅細胞のマーカである OMP もしくは、既知の CO₂ センサー細胞のマーカである Car2 との共局在を、2-color *in situ* hybridization により検討した。その結果、TRPC1 は OMP 陽性のほぼすべての嗅細胞で発現しており、Car2 細胞でも発現することが明らかとなった (Fig. 3A)。一方、TRPC2 は OMP 陽性の嗅細胞の一部サブタイ

プで発現しており、これらはその多くが Car2 細胞であることが分かった (Fig. 3A)。また、TRPM5、TRPM7、TRPML3 についても、嗅細胞と Car2 細胞で発現することが分かった (Fig. 3B)。これらの結果から、嗅細胞では複数の TRP チャンネルが発現しており、Car2 細胞や新規 CO₂ センサー細胞でも TRP チャンネルが発現することが示唆された。

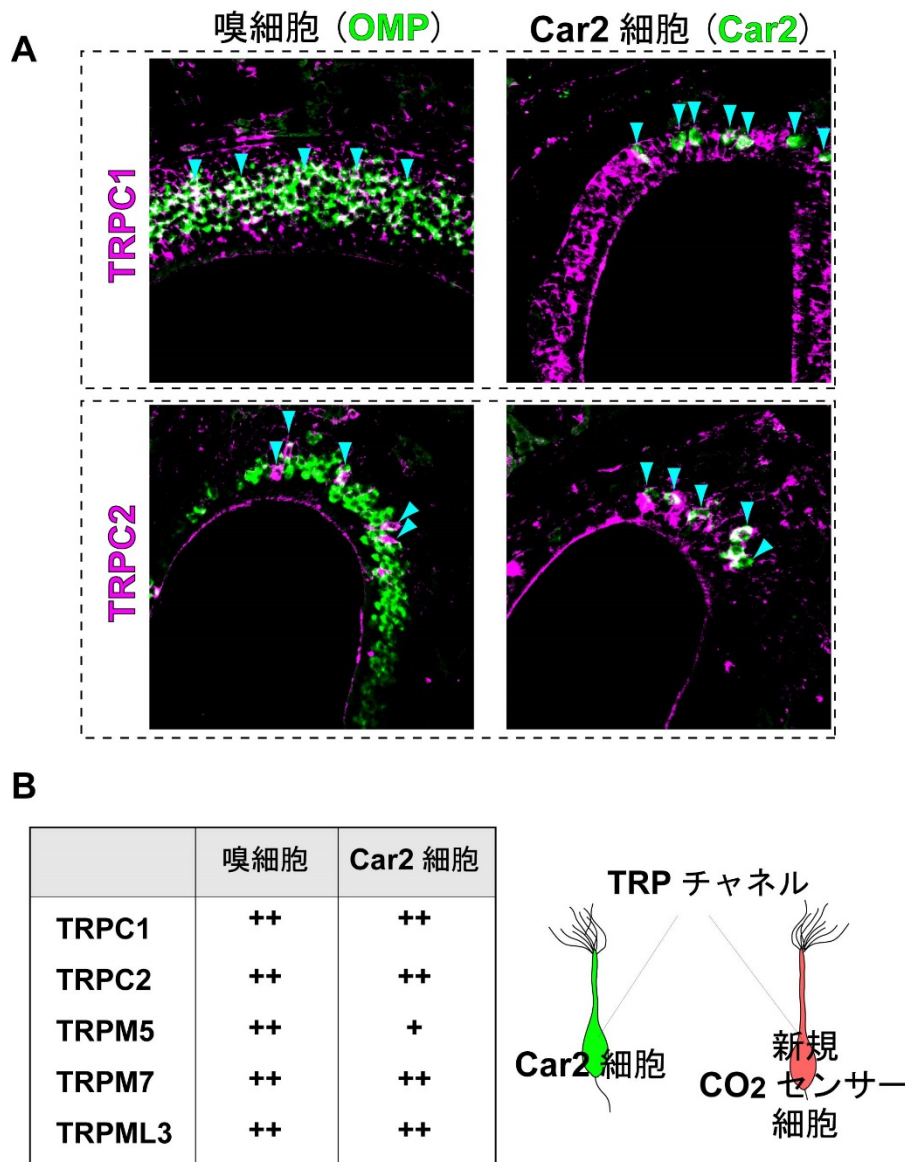


Fig. 3. Expression of TRP channel in the olfactory sensory neurons (OSNs).

(A) 2-color *in situ* hybridization of OE sections with TRPC1 or TRPC2 (purple) and OSN marker, olfactory marker protein (OMP) or Car2 OSN marker, carbonic anhydrase2 (green) probes. Cyan arrowheads indicate the OSNs, expressing both TRP channel and OSN marker. (B) Expression of TRP channels in the canonical OSNs and Car2 OSNs

3. 1. 2 CO₂の感知に関与する神経回路の解析

次に、複数種類の CO₂ センサー嗅細胞がマウスの嗅上皮に存在する意味を知るため、実際に CO₂ を嗅がせたマウスを用いて、匂いの一次中枢である嗅球の活性化部位を検討した。嗅細胞は一種類の嗅覚受容体もしくは炭酸脱水酵素のみを発現し、同じセンサーを持った嗅細胞同士は、嗅球表面の同一の糸球と呼ばれる構造に接続する。また、Car2 細胞は、ネックレス糸球と呼ばれる嗅球後方にある糸球に投射することが知られている (Fig. 4B)。Fig. 4 では、Car2 細胞の接続先であるネックレス糸球をマーカー遺伝子である Car2 の抗体染色により緑色に染めている。CO₂ をマウスに嗅がせると、ネックレス糸球の周囲で神経活動のマーカーである Zif268 の発現上昇が見られた (Fig. 4A)。この結果は、CO₂ により Car2 細胞が活性化し、その接続先の糸球の周囲で介在ニューロンの一つである傍糸球細胞の興奮が引き起こされたことを表している。興味深いことに、Car2 を発現していないネックレス糸球以外のいくつかの糸球でも、CO₂ を嗅がせたマウスでは、Zif268 の発現上昇が見られた (Fig. 4A)。これらは新規の CO₂ センサー細胞からの入力を受けた糸球であると考えられる。そこで次に、CO₂ により活性化する糸球の嗅球上における分布を明らかとするため、嗅球を平面に展開した unrolled map と呼ばれる地図を作製した。

Fig. 5A, B に unrolled map の作製方法の模式図を示す。まず CO₂ を嗅がせたマウス嗅球から coronal section を作製し、Zif268 による ISH を行った。それぞれの糸球において、周囲の傍糸球細胞で 10 個以上 Zif268 のシグナルが見られた場合、活性化した糸球と判定した。次に、糸球層を腹側で開き一本の帯を作製し (Fig. 5B)、これを嗅球の前から後ろまで並べて unrolled map を作成した (Fig. 5C)。ちょうど嗅球を腹側から開いた形になっており、背側のマーカーである NQO1 陽性の領域を黒のラインで表している。CO₂ により、特に背側の内側外側の 2ヶ所が活性化していることが分かる。Car2 細胞からの入力を受けるネックレス糸球は、嗅球後側に存在する。つまり背側の内外側は、新規の CO₂ センサー細胞からの入力を受けて活性化している領域であると考えられる。これまでに Car2 細胞からの入力は、マウスの社会行動に関与することが報告されている。一方、CO₂ を嗅いだマウスは忌避反応を示す。近年、小早川らの研究から、嗅球背側領域の活性化が先天的な

忌避反応に重要であることが報告されており、背側の嗅細胞を欠損したマウスでは、キツネの尿などの忌避物質に対する忌避反応が失われることが明らかとされている⁽¹⁶⁾。CO₂ による嗅球背側領域の活性が強く活性化しており、このことがマウスに忌避反応を引き起こすのではないかと推測される。先天的忌避反応には、視床を介したストレス経路が活性化することが知られており、CO₂ を嗅いだマウスにおいて脳内のこれらの領域が活性化しているのか？という点は、今後の興味深い課題である。

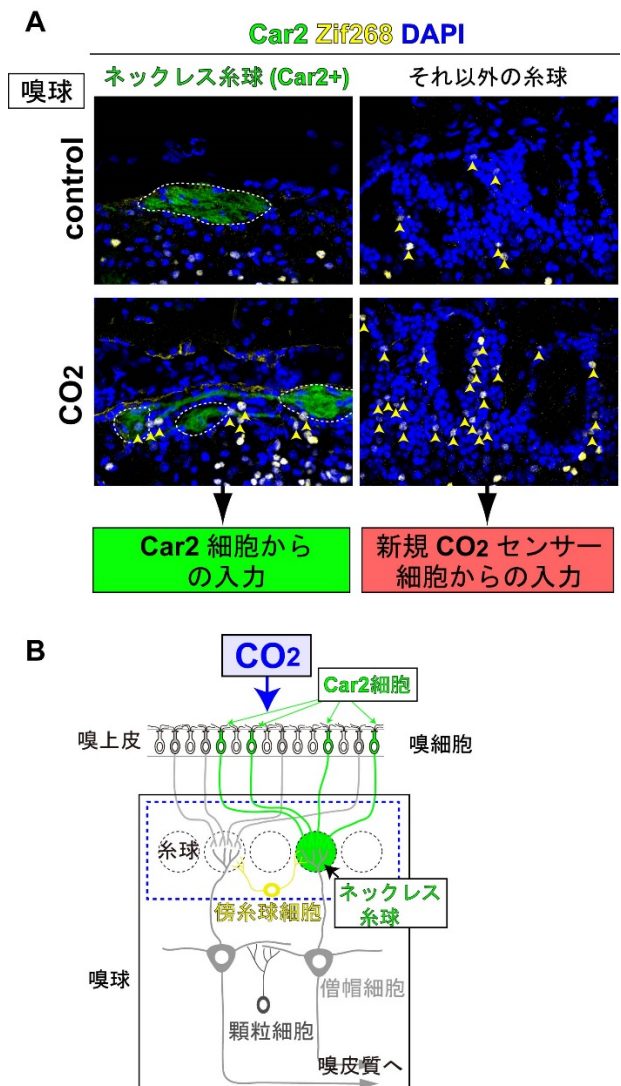


Fig. 4. CO₂ stimulation to mice induces the expression of neuronal activity marker, Zif268 around the necklace and other glomeruli. (A) Immunostaining of the olfactory bulb sections from 6-week-old mice stimulated with CO₂. OB sections were stained with neuronal activity marker, Zif268 (yellow) and Car2 OSN axon, Car2 (green). (B) Scheme of mouse olfactory system.

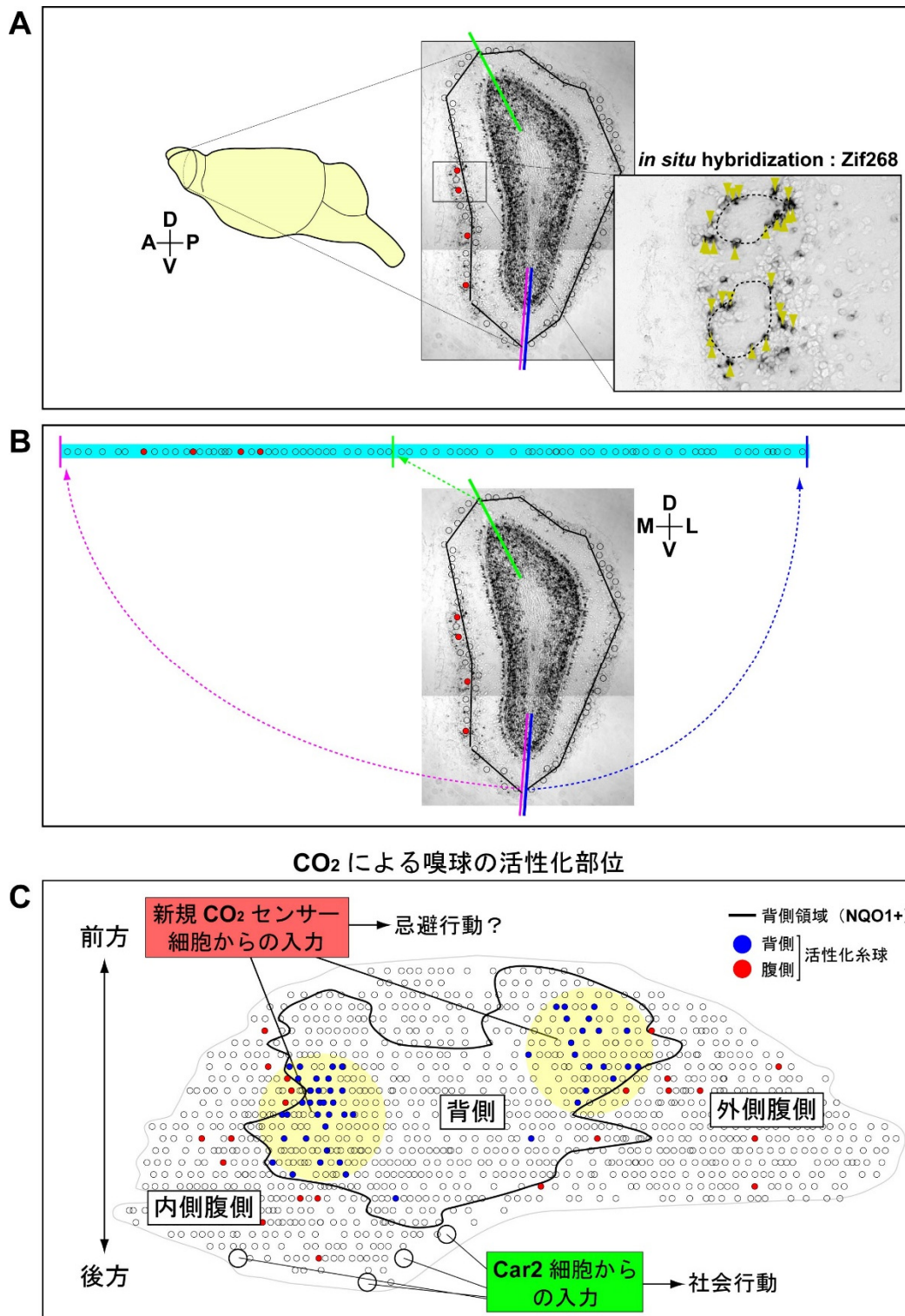


Fig. 5. Unrolled map of olfactory bulb (OB) from mice stimulated with CO₂

(A) ISH of OE sections using Zif268 probes from 6-week-old mice stimulated with CO₂. (B) Glomerular layer of the section in (A) was unrolled from the ventral side of OB. Activated glomeruli were indicated by red circles. (C) Unrolled map of OB from mice stimulated with CO₂. Activated glomeruli in the dorsal and ventral OB were indicated by blue and red circles, respectively. Black line show the dorsal marker, NQO1 positive region. Big circle represent the Necklace glomeruli, which receive the input from Car2 OSNs.

3. 2 鋤鼻上皮の CO₂ センサー細胞

3. 2. 1 嗅上皮の CO₂ センサー細胞における TRP チャネルの発現

マウスの嗅上皮には、既知の CO₂ センサー細胞である Car2 細胞以外に、複数種類の新規 CO₂ センサーとして働く嗅細胞が存在することが明らかとなった。一方、主にフェロモンの感知に関わる鋤鼻細胞が、嗅覚による CO₂ の感知に関与するのか？という点については、これまで全く検討されていない。そこで、マウスの鋤鼻器から鋤鼻細胞を採取して、カルシウムイメージング法により、CO₂ への反応を検討した。その結果、多くの鋤鼻細胞が CO₂ への顕著な応答を示すことが明らかとなった (Fig. 6)。CO₂ 溶液は

酸性 pH を示すが、CO₂ 溶液と同じ酸性 pH の溶液に対しては、鋤鼻細胞は全く応答しないことから、CO₂ 自身に応答していると考えられる。また、細胞外のカルシウムを EGTA によりキレートすると、CO₂ への応答は顕著に阻害され、CO₂ を感知した鋤鼻細胞では、細胞外からのカルシウム流入が起こっていることが分かった。

そこで、鋤鼻細胞の CO₂ への応答において、炭酸脱水酵素の関与を検討した。その結果、炭酸脱水酵素の阻害剤である Acetazolamide (AZ) 処理により、鋤鼻細胞の CO₂ への応答は完全に阻害された (Fig. 7)。この結果から、炭酸脱水酵素の酵素反応が、鋤鼻細胞の CO₂ への応答に必須の働きをすることが明らかとなった。

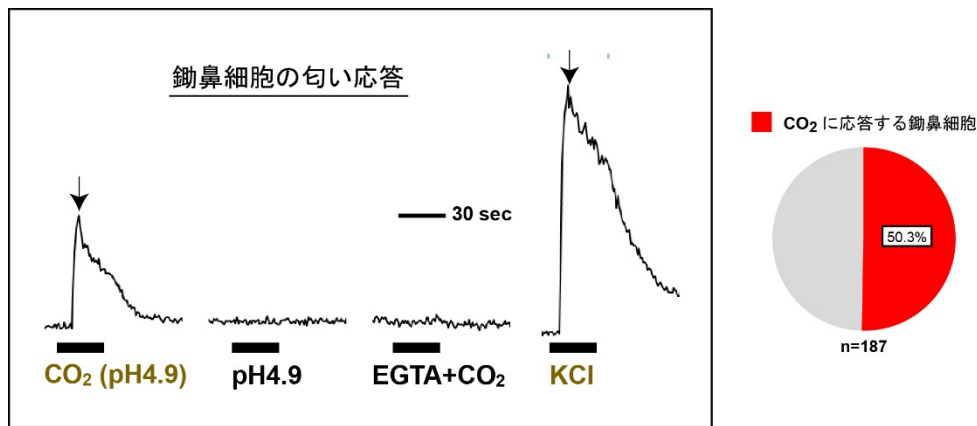


Fig. 6. Calcium imaging of vomeronasal sensory neuron (VSN). This is the typical result of VSN responded to CO₂. The treatment of the extracellular calcium chelator, EGTA, completely inhibited the response to CO₂ in the novel CO₂-sensing VSNs.

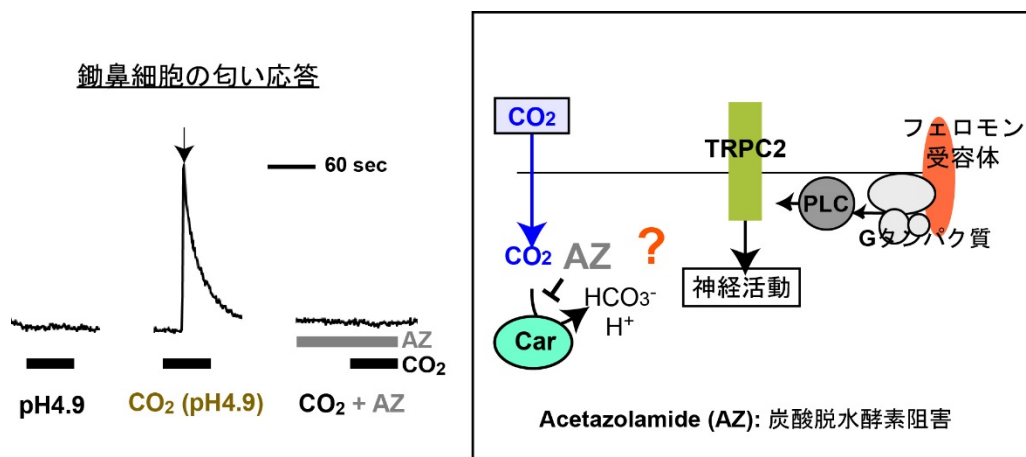


Fig. 7. The effect of carbonic anhydrase inhibitor for the CO₂ response of VSNs. Carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide (AZ) completely inhibited the CO₂ response of VSNs. This result suggests that carbonic anhydrase plays an important role in the CO₂-sensing of VSNs.

鋤鼻細胞のCO₂応答に関与する炭酸脱水酵素を明らかにするため、鋤鼻上皮における炭酸脱水酵素の発現を検討した。その結果、Car7とCar2という2種類の炭酸脱水酵素に関して、鋤鼻上皮での発現が見られた(Fig. 8)。Car7の発現は、鋤鼻細胞のマーカーであるOMP陽性の細胞のほぼすべてで見られ、Car7はほぼすべての鋤鼻細胞で発現すると考えられる(Fig. 8A, D)。一方、Car2はOMP陽性の細胞の内、apical側の約半分で発現が見られた(Fig. 8B, D)。鋤鼻上皮はapical層とbasal層とに分かれており、それぞれがV1RとV2Rという異なる種類のフェロモン受容体が発現する。apical層のマーカーであるNQO1とCar2の発現は一致することから、Car2はapical層の細胞で発現していることが分かった(Fig. 8C, D)。そこで、Car7、Car2という2つの炭酸脱水酵素を発現するapical層と、Car7のみを発現するbasal層とで、CO₂への応答を比較した。CO₂への応答が見られた細胞を、apical層のマ-

ーカーであるNQO1で抗体染色し、鋤鼻上皮のapical層とbasal層のどちらに由来する細胞であるのか判定した。

Fig. 9Aは、NQO1陽性のapical層由来の鋤鼻細胞、Fig. 9BはNQO1陰性のbasal層由来の鋤鼻細胞を示す。カルシウムイメージングの結果、どちらの層に由来する細胞でも、CO₂への応答が見られ、apical層とbasal層とでCO₂へ応答する鋤鼻細胞の割合に、大きな差は見られなかった。

そこで次に、このような鋤鼻細胞のCO₂への応答が、実際に生体内でも起こっているのか?という点について、CO₂を嗅がせたマウスを用いて検討を行った。鋤鼻細胞が活性化すると、投射先である副嗅球の糸球層において、神経活動のマーカーであるZif268発現が誘導される。CO₂を嗅いだマウスの副嗅球では、未処理のマウスと比較して、Zif268のシグナルの顕著な上昇が見られた(Fig.10A, C)。また、鋤鼻上皮のapical層のニューロンは

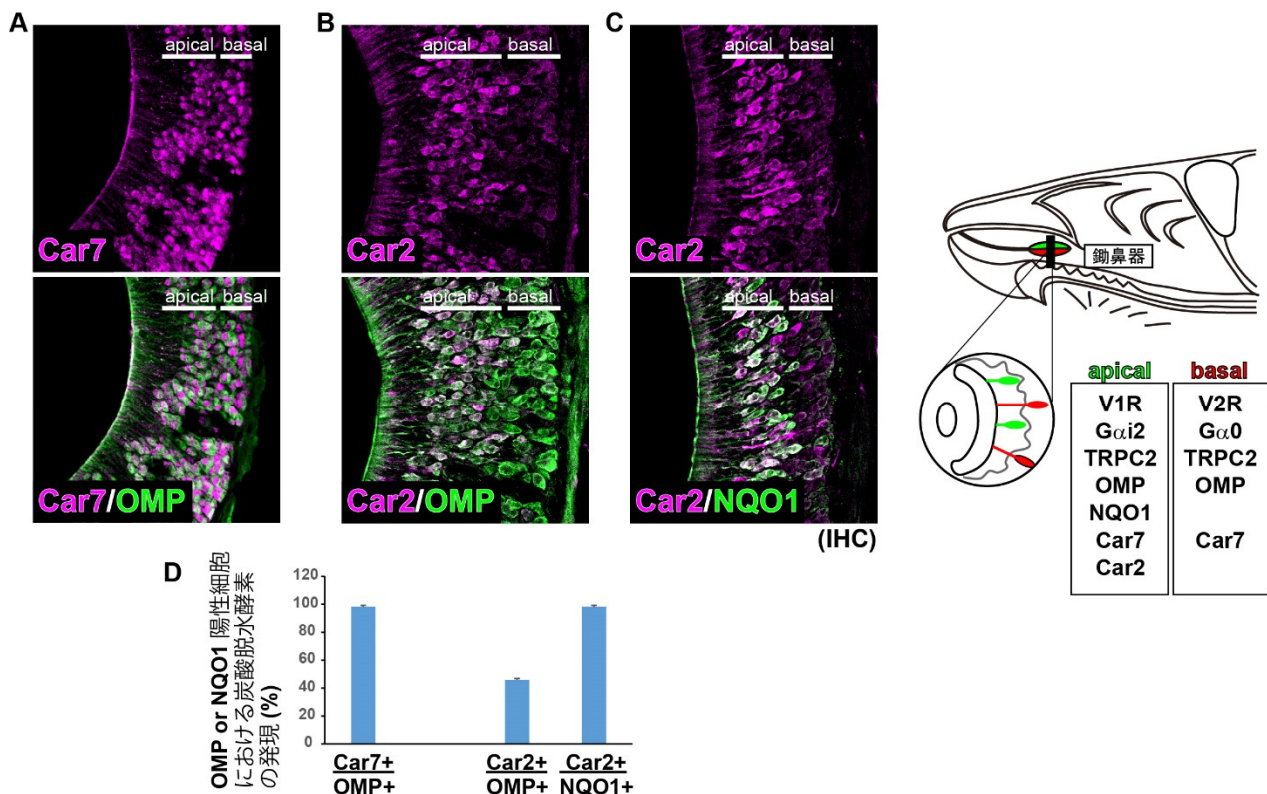


Fig. 8. Expression patterns of carbonic anhydrase in the mouse vomeronasal epithelium (VNE). (A-C) IHC of VNE sections using antibodies against both Car7 (purple) and VSN marker, OMP (green) (A), both Car2 (purple) and OMP (green) (B), or both Car2 (purple) and apical VSN marker, NQO1 (green) (C). (D) The graph showing the rate of the carbonic anhydrase expression in the OMP⁺ or NQO1⁺ VSNs.

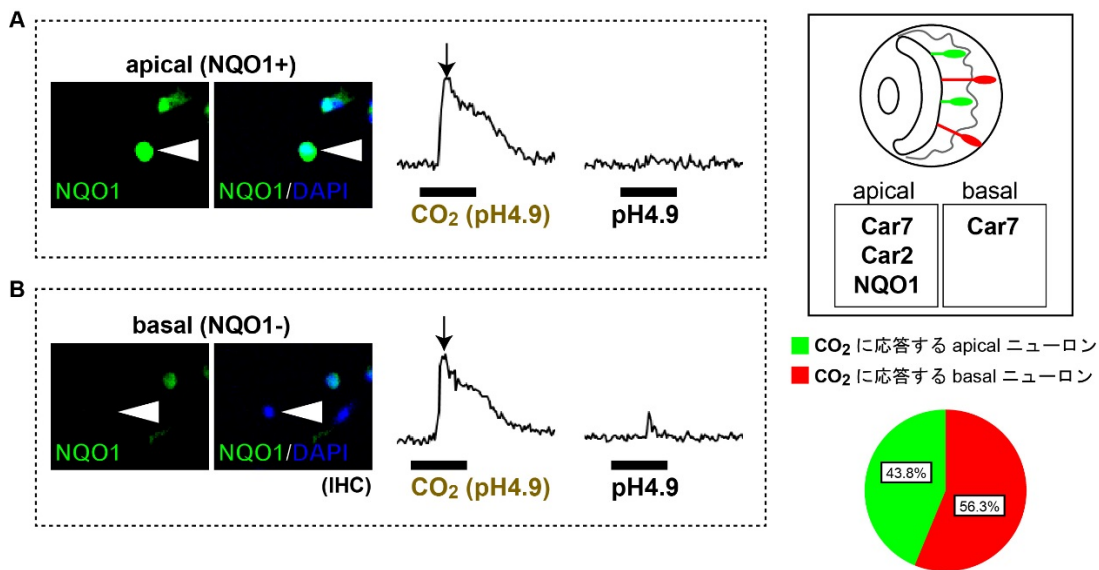


Fig. 9. CO₂ response of VSNs derived from the apical and basal layers of the VNE.

(A) Calcium imaging of NQO1⁺ VSN derived from the apical layer. (B) Calcium imaging of NQO1⁻ VSN derived from the basal layer. Note that the rate of CO₂-sensing VSNs exists both in the apical and basal layers of the VNE.

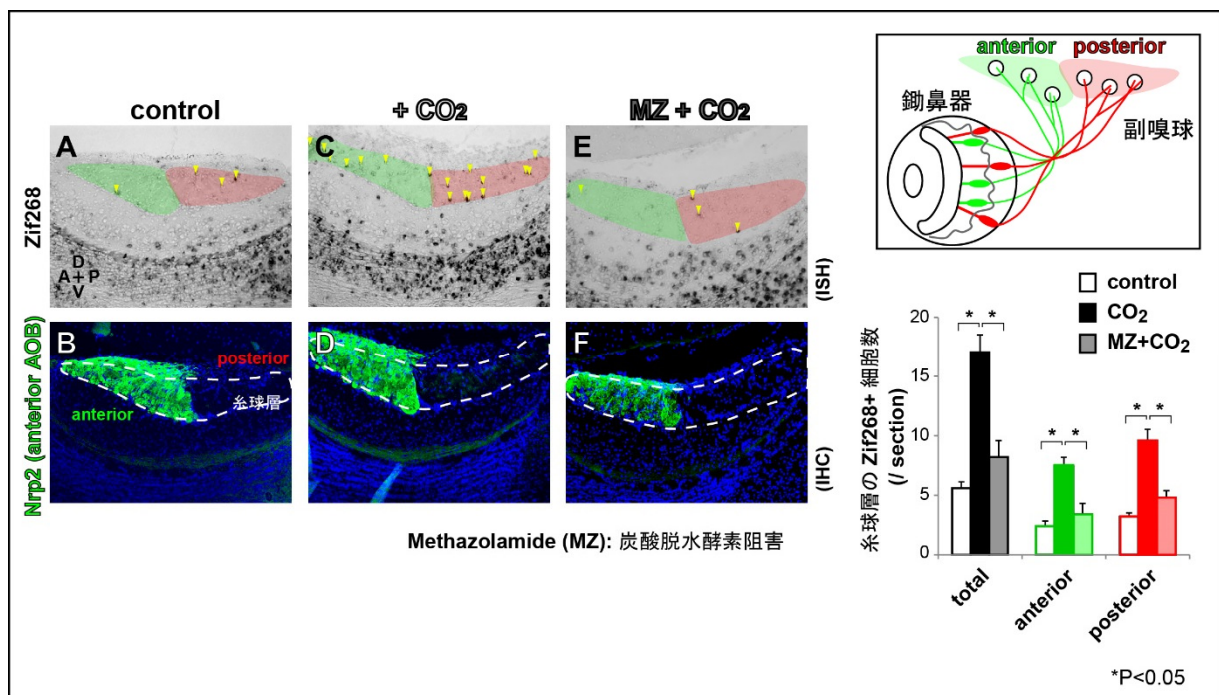


Fig. 10. CO₂ stimulation to mice induces the expression of neuronal activity marker, Zif268 in the accessory olfactory bulb (AOB). AOB sections from 6-week-old mice without the stimulation (A,B), with CO₂ stimulation (C,D), or with the injection of carbonic anhydrase inhibitor, metazolamide (MZ) into naris before CO₂ stimulation (E,F). (A,C,E) ISH using neuronal activity marker, Zif268 probes. (B,D,E) IHC of serial sections of (A,C,E) using antibody against anterior AOB marker, nulopilin-2 (Nrp2) (green). Note that VSNs in the apical and basal layers of VNE project their axon to the anterior and posterior part of AOB.

副嗅球の前方へ、basal 層のニューロンは後方へと投射することが知られている。apical 層の神経軸索のマーカである Nrp2 陽性の領域と、Nrp2 陰性の領域とを比較して、Zif268 のシグナルの数に顕著な差は見られなかった (Fig. 10C, D)。この結果は、apical 層と basal 層の両方に、CO₂ へ応答する鋤鼻細胞が同程度の割合で存在することを示唆しており、分散した鋤鼻細胞でカルシウムイメージングを行った Fig. 9 の結果とも整合性を示す。また、興味深いことに、マウスの鼻孔内に炭酸脱水酵素の阻害剤 Metazolamide (MZ) をあらかじめ注入すると、Zif268 のシグナルは、副嗅球の前後のどちらの領域でも阻害された (Fig. 10A, E)。

以上の結果から、マウスの鋤鼻上皮には、apical 層および basal 層の両方に CO₂ センサー細胞が存在し、CO₂ センサーとして炭酸脱水酵素が必須の役割を果たすことが分かった。

3. 2. 2 鋤鼻上皮の CO₂ センサー細胞における TRP チャンネルの発現

そこで最後に、CO₂ などのガスセンサーとして働くことが

報告されている TRP チャンネルについて、鋤鼻上皮での発現を検討した。その結果、これまで報告されている TRPC2 以外に、TRPC1、TRPV2、TRPML3、TRPM5、TRPM7 という複数の TRP チャンネルが鋤鼻上皮で発現することが明らかとなった (Fig. 11A-F)。TRPC1、TRPV2、TRPML3、TRPM5 は、TRPC2 と同様の発現パターンを示し、鋤鼻細胞のほぼすべてで発現していると考えられる (Fig. 11A-E)。一方、TRPM7 は鋤鼻上皮の一部の細胞で発現が見られるが、それらは OMP 陽性の鋤鼻細胞であることが分かった (Fig. 11F,G)。現在、これらの TRP チャンネルの鋤鼻細胞における機能や CO₂ センシングへの寄与について、さらに詳細な検討を行っている。興味深いことに、これまでの TRPC2 欠損マウスを用いた解析では、CO₂ を嗅がせた際に副嗅球での Zif268 の発現誘導が顕著に減少しており、炭酸脱水酵素に加えて TRPC2 チャンネルが鋤鼻細胞の CO₂ 感知に関与する可能性が示唆されている。今後、さらに詳細に解析を進めることにより、マウス嗅覚の CO₂ センシングにおける炭酸脱水酵素と TRP チャンネルとの関係が明らかになるものと考えられる。

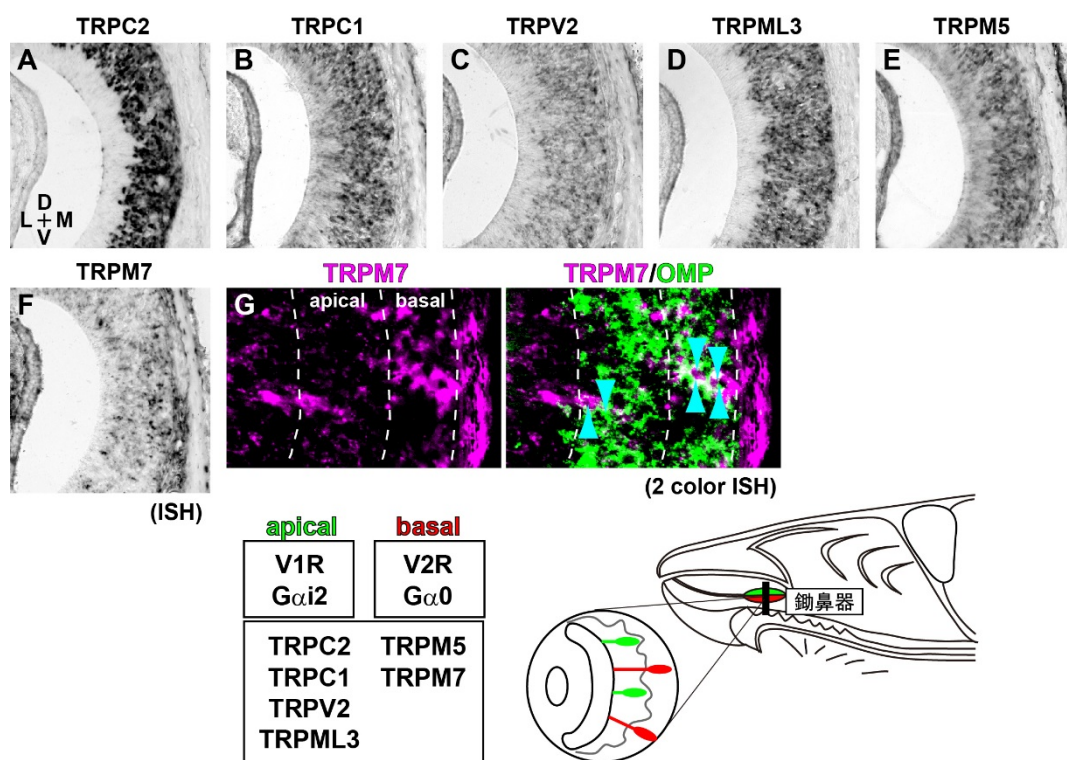


Fig. 11. Expression patterns of TRP channels in the mouse VNE. (A-F) ISH of VNE sections from 3-week-old mice. (G) Two color ISH of VNE with TRPM7 (purple) and OMP (green). White arrowheads indicate the expression of TRPM7 in the VSNs (OMP-positive). D, dorsal; V, ventral; L, lateral; M, medial.

4. 今後の課題

本研究により、マウスの嗅上皮に存在する新規の CO₂ センサー細胞において TRP チャンネルが CO₂ の感知に関与する可能性が示唆された。また、嗅細胞や Car2 細胞において、TRPC1、TRPC2、TRPM5、TRPM7、TRPML3 といった複数の TRP チャンネルが発現することが明らかとなった。CO₂ を嗅いだマウスの嗅球では、Car2 細胞の神経軸索の投射先である嗅球後側よりも、背側の一部の領域がより活性化することが分かった。以上の結果から、マウスは、複数の CO₂ センサー細胞を組み合わせることで、大気中の CO₂ 濃度の微妙な変化を識別しているものと予想される。また、鋤鼻上皮においても、多くの CO₂ センサー細胞が明らかとなり、CO₂ がフェロモンの感知に影響を及ぼす可能性が示唆された。

今後の大きな課題として、今回マウスの嗅覚系で発現を確認した複数の TRP チャンネルが、CO₂ の感知に関与するのか？という点をまずはっきりさせる必要がある。嗅細胞や鋤鼻細胞は、多様なレパートリーの中から単一の受容体を選択的に発現しており、発現する受容体の種類が細胞ごとに異なることで、嗅細胞や鋤鼻細胞の匂い応答の違いが規定されると考えられてきた。今回、著者らが見出した複数の TRP チャンネルのヘテロな発現は、TRP チャンネルもこれらの細胞の個性を生み出すことに寄与する可能性が考えられる。嗅細胞や鋤鼻細胞での TRP チャンネルの発現が、CO₂ やその他の匂い応答に果たす役割について詳細に検討していく必要がある。また、CO₂ を嗅いだマウスにおいて特に背側の嗅球領域の活性化が見られたことに関しては、今後、匂いに伴う忌避行動に関わることが知られている嗅球以降のより高次の領域(分界条床核や扁桃体など)について、さらに詳細を検討していく予定である。

人間の社会活動に伴う化石燃料の消費や、森林破壊などにより、現在の大气中の CO₂ 濃度は日々増加している。大气中の CO₂ 濃度の上昇により、鋭敏な CO₂ センサーの機能が攪乱されることで、生態系に影響を及ぼす可能性も想定される。今後、大气中の CO₂ 濃度上昇と生態系への影響の双方を注意深く監視していく必要があり、多種類のモデル生物における嗅覚の CO₂ センサーに関して、多面的かつより一層の研究の進展が求められる。

5. 引用文献

- 1) Jones WD, Cayirlioglu P, Kadow IG, Vosshall LB. Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in *Drosophila*. *Nature* 445, 86-90 (2007)
- 2) Hu J, Zhong C, Ding C, Chi Q, Walz A, Mombaerts P, Matsunami H, Luo M. Detection of near-atmospheric concentrations of CO₂ by an olfactory subsystem in the mouse. *Science* 317, 953-957 (2007)
- 3) Sun L, Wang H, Hu J, Han J, Matsunami H, Luo M. Guanylyl cyclase-D in the olfactory CO₂ neurons is activated by bicarbonate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2041-2046 (2009)
- 4) Munger SD, Leinders-Zufall T, McDougall LM, Cockerham RE, Schmid A, Wandernoth P, Wennemuth G, Biel M, Zufall F, Kelliher KR. An olfactory subsystem that detects carbon disulfide and mediates food-related social learning. *Curr. Biol.* 20, 1438-1444 (2010)
- 5) Cui N, Zhang X, Tadepalli JS, Yu L, Gai H, Petit J, Pamulapati RT, Jin X, Jiang C. Involvement of TRP channels in the CO₂ chemosensitivity of locus coeruleus neurons. *J. Neurophysiol.* 105, 2791-2801 (2011)
- 6) Wang YY, Chang RB, Liman ER. TRPA1 is a component of the nociceptive response to CO₂. *J. Neurosci.* 30, 12958-12963 (2010)
- 7) Takahashi N, Kuwaki T, Kiyonaka S, Numata T, Kozai D, Mizuno Y, Yamamoto S, Naito S, Knevels E, Carmeliet P, Oga T, Kaneko S, Suga S, Nokami T, Yoshida J, Mori Y. TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂. *Nat. Chem. Biol.* 7, 701-711 (2011)
- 8) Hamana H, Hirono J, Kizumi M, Sato T. Sensitivity-dependent hierarchical receptor codes for odors. *Chem Senses.* 28, 87-104 (2003)
- 9) Tsuboi A, Yoshihara S, Yamazaki N, Kasai H, Asai-Tsuboi H, Komatsu M, Serizawa S, Ishii T, Matsuda Y, Nagawa F, Sakano H. Olfactory neurons expressing closely linked and homologous odorant receptor genes tend to project their axons to neighboring glomeruli on the olfactory bulb. *J. Neurosci.* 19, 8409-18 (1999)

- 10) Serizawa S, Miyamichi K, Takeuchi H, Yamagishi Y, Suzuki M, Sakano H. A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. *Cell* 127, 1057-69 (2006)
- 11) Takahashi H, Yoshihara S, Nishizumi H, Tsuboi A. Neuropilin-2 is required for the proper targeting of ventral glomeruli in the mouse olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 44, 233-45 (2010)
- 12) Inaki K, Takahashi YK, Nagayama S, Mori K. Molecular-feature domains with posterodorsal-anteroventral polarity in the symmetrical sensory maps of the mouse olfactory bulb: mapping of odourant-induced Zif268 expression. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1563-74 (2002)
- 13) Lin W, Margolskee R, Donnert G, Hell SW, Restrepo D. Olfactory neurons expressing transient receptor potential channel M5 (TRPM5) are involved in sensing semiochemicals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 2471-2476 (2007)
- 14) Hirata Y, Oku Y. TRP channels are involved in mediating hypercapnic Ca²⁺ responses in rat glia-rich medullary cultures independent of extracellular pH. *Cell Calcium.* 48, 124-132 (2010)
- 15) Nakashimo Y, Takumida M, Fukui T, Anniko M, Hirakawa K. Expression of transient receptor potential channel vanilloid (TRPV) 1, melastin (TRPM) 5 and 8, and ankyrin (TRPA1) in the normal and methimazole-treated mouse olfactory epithelium. *Acta Otolaryngol.* 130, 1278-1286 (2010)
- 16) Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, Oka Y, Imai T, Ikawa M, Okabe M, Ikeda T, Itohara S, Kikusui T, Mori K, Sakano H. Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* 450, 503-8 (2007)
- A., Characterization of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb using postnatal electroporation. *Electroporation Methods in Neuroscience* 102, 93-103 (2015)
3. Yoshihara S*, Takahashi H*, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Kitsuki M, Tatsumi K, Furukawa-Hibi Y, Hirai H, Nagai T, Yamada K, Tsuboi A. (* These authors contributed equally to this work), Npas4 regulates Mdm2 and thus Dcx in experience-dependent olfactory bulb interneuron dendritic spine development. *Cell Reports* 8, 843-857 (2014)
4. 高橋弘雄、坪井昭夫 嗅覚系における CO₂ センシングの分子機構 *化学と生物*、第 51 巻、pp.438-440 (2013).

学会発表

1. Takahashi H, Yoshihara S, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Furukawa-Hibi Y, Nagai T, Yamada K and Tsuboi A. Transcription factor Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. The 12th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception、福岡 (2014).
2. Takahashi H, Yoshihara S, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Furukawa-Hibi Y, Nagai T, Yamada K and Tsuboi A. Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. Cold Spring Harbor Meeting: Axon Guidance, Synapse Formation & Regeneration, Cold Spring Harbor, USA (2014).
3. Takahashi H, Yoshihara S, Tamada Y, Hirono J, Sato T, Tsuboi A. Molecular basis of CO₂ sensing in the mouse olfactory system. 第 36 回日本神経科学大会、京都 (2013).

6. 論文業績および学会発表

論文業績

1. 高橋弘雄、坪井昭夫 嗅覚系における CO₂ センシングの分子機構 *におい・かおり環境学会誌* (in press).
2. Takahashi H, Yoshihara S, Asahina R, Tamada Y, Tsuboi

謝辞

本研究は公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団の援助により実施した成果です。謹んで感謝申し上げます。

Molecular Basis of CO₂ Sensing in the Mouse Olfactory System

Hiroo Takahashi, Sei-ichi Yoshihara, Akio Tsuboi

Laboratory for Molecular Biology of Neural Systems, Nara Medical University

Summary

Carbon dioxide (CO₂) is an important environmental cue for many organisms. In mammal, mouse, rat and guinea pig have a CO₂ sensor in the olfactory epithelium (OE). Mice can detect CO₂ at concentrations around the average atmospheric level by olfaction. In the ventro-lateral region of the mouse OE, there is a unique subset of olfactory sensory neurons (OSNs), termed GC-D OSNs, which express carbonic anhydrase 2 (Car2) and guanylate cyclase-D (GC-D), instead of odorant receptor. In GC-D neurons, Car2 and GC-D function as a sensor for CO₂, urinary peptides and carbon disulfide (CS₂) that mediates food-related social learning. Recently, we found that at least two novel subsets of OSNs, which are not expressing Car2, respond to CO₂ as well. These results suggest that mice sense CO₂ with several subsets of sensory neurons in the OE. On the other hand, mice have the other olfactory organ, vomeronasal epithelium (VNE), which is important for the pheromone sensing. It is uncertain whether the VNE also plays a role in the CO₂ sensing. Interestingly, we recently found the novel CO₂-sensing neurons in the VNE. These results suggest that mice sense CO₂ not only with GC-D OSNs, but also with novel subsets of sensory neurons in the OE and VNE.

がん化学療法により誘発される知覚異常・しびれにおける TRPA1 の役割に関する研究

中川 貴之^{1,2}, 金子 周司², 白川 久志², 森 泰生³

¹京都大学医学部附属病院, ²京都大学大学院薬学研究科, ³京都大学大学院工学研究科

概要 抗がん剤の1つである白金製剤オキサリプラチンは、ほぼ全ての患者において投与直後から数時間内に、寒冷刺激で誘発、増強される四肢・口周囲のしびれ感、知覚異常など、他の抗がん剤では認められない特徴的な急性末梢神経障害を誘発することが知られている。本研究では、主に感覚神経に発現し、様々な刺激物質のケミカルセンサーとして機能する TRPA1 に着目し、オキサリプラチン誘発急性末梢神経障害との関連を明らかにする目的で検討を行った。

その結果、オキサリプラチン(5 mg/kg)をマウスに単回腹腔内投与すると、2時間後には、他の抗がん剤(シスプラチン、パクリタキセル)では認められない特徴的な急性冷過敏応答が惹起されることを見出した。また、この急性冷過敏応答は、オキサリプラチン特有の代謝物 oxalate でも認められ、感覚神経に発現する TRPA1 を選択的に機能増強した結果、生じるものと考えられた。そのタイムコース、各種鎮痛薬に対する薬物感受性の違い、臨床でも用いられる Ca 製剤の有効性などから、この行動が疼痛とは一部異なり、オキサリプラチンの急性末梢神経障害に特徴的なしびれ、異常感覚を表現するしびれ様行動である可能性が高いと考えられる。

また、hTRPA1 発現細胞を用いた検討から、高濃度のオキサリプラチン(1 mM)は、おそらくその白金成分によるミトコンドリア障害により産生された活性酸素種(ROS)が、TRPA1 N 末端のシステイン残基を酸化修飾することにより TRPA1 を活性化することを見出した。しかし、臨床では用いられない高濃度のオキサリプラチンが必要であること、同じ白金製剤シスプラチンでも同様の機構で TRPA1 活性化が認められたことから、オキサリプラチン誘発急性末梢神経障害のメカニズムとは考えにくい。

一方、hTRPA1 発現細胞に比較的低濃度のオキサリプラチンを2時間前処置することで、ROS に対する TRPA1 の過敏応答が惹起され、この応答は、オキサリプラチンに特有の代謝物 oxalate でも認められること、一方、白金含有代謝物 Pt(DACH)Cl₂ やシスプラチンでは認められないことから、オキサリプラチン誘発急性末梢神経障害の原因である可能性が高い。さらに、この TRPA1 過敏化応答の分子機構として、oxalate が酸素感受性プロリン水酸化酵素(PHD)の酵素活性を抑制し、その結果、PHD により常時、水酸化を受けている hTRPA1 N 末端の 394 番目のプロリン残基(Pro³⁹⁴)の水酸化が解除されるという TRPA1 の低酸素による活性化と同一の機構を介することを明らかとした。

これらの結果から、TRPA1 はオキサリプラチンというヒトにおいてほぼ全例でしびれを誘発する化学物質のケミカルセンサーとして機能していること、さらに、TRPA1 はしびれ感知のセンサーとしての生理学的意義を有しているものと考えられる。

1. 研究の背景と目的

がん化学療法による末梢神経障害(chemotherapy-induced peripheral neuropathy:CIPN)は、一般的に手足のしびれや痛みなどの異常感覚で始まることが多く、進行

性に悪化する。その症状は大きく3つに分けられ、感覚神経の障害による四肢末端のしびれ、感覚異常(錯感覚)、神経痛、感覚鈍磨、運動神経の障害による筋萎縮、筋力低下、深部腱反射の低下・消失の他、自律神経障害も認

められる。CIPN の出現は抗がん剤の用量規定因子となるため、がん化学療法の治療成績にも大きな影響を与え、また、患者の QOL を低下させる原因ともなる⁽¹⁾。CIPN を生じやすい抗がん剤として、タキサン系(パクリタキセル、ドセタキセル等)、ビンカルカロイド系抗がん剤(ビンクリスチン、ビンブラスチン等)、白金製剤(シスプラチン、オキサリプラチン等)の他、また、プロテアソーム阻害薬ボルテゾミブや CD30 標的抗体-薬物複合体ブレンツキシマブベドチンなどの分子標的薬が挙げられる。タキサン系、ビンカルカロイド系抗がん剤などは、主に末梢神経の軸索に障害を与え、二次的に髄鞘が障害されると考えられており、早期に薬剤を中止すれば、軸索の発芽により遠部位に向かって再生し、回復が見込まれるとされている。一方、白金製剤は、後根神経節の神経細胞体に障害を与え、二次的に軸索と髄鞘が障害を受けると考えられており、回復が困難な場合もある⁽²⁾。現在、CIPN に対しては、ビタミン B 製剤(ビタミン B₆、ビタミン B₁₂)、漢方薬(牛車腎気丸)、また痛みがあるときには、解熱性鎮痛薬アセトアミノフェン、抗炎症性鎮痛薬(NSAID)や麻薬性鎮痛薬(オピオイド)、あるいはプレガバリンや抗うつ薬などが用いられることもあるが、いずれもそれらの有効性について統計学的な根拠に乏しい^(1, 3, 4)。最近では、二重盲検プラセボ対象無作為化クロスオーバー試験により、選択的セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬(SNRI)のデュロキセチンが CIPN による痛みや QOL を有意に改善することが報告されている⁽⁵⁾。しかし、これらが有効性を示さない場合も多く、CIPN の対応には非常に難渋しているのが現状である。また、CIPN の発症メカニズムとして、ミトコンドリア障害や活性酸素種(ROS)の発生、表皮内神経線維の脱落、免疫系/グリア細胞を介した神経炎症応答などが推察されているが未解明な部分が多く⁽⁶⁾、効果的な予防法や治療法も開発されていない。

転移性大腸がん治療薬として主に使用されているオキサリプラチンは、他の抗がん剤で認められるような蓄積性の慢性末梢神経障害の他に、ほぼ全例において投与直後から数時間以内に、寒冷刺激で誘発、増強される四肢・口周囲のしびれ感、知覚異常、まれに咽頭・喉頭の締め付け感、知覚異常による呼吸困難や嚥下困難など、他の抗がん剤では認められない特徴的な急性末梢神経障害を誘発することが知られている^(3, 4)。

一方、Ca²⁺透過性の非選択的カチオンチャンネル transient receptor potential (TRP) チャンネルのうち幾つは温度に感受性を示し、特に、TRPV1、TRPA1、TRPM8 はいずれも一次知覚神経に発現し、熱刺激や冷刺激に対する侵害受容器として大きな注目を集めているところである^(7, 8)。最近、CIPN に、TRPV1、TRPA1、TRPM8 が関与するのではないかと推察されている。実際、上記の抗がん剤の長期投与により、知覚神経における TRPV1、TRPA1 あるいは TRPM8 等の発現量が増加し、抗がん剤により惹起された触刺激や熱・冷刺激に対する痛覚過敏様行動が、これら TRP チャンネルの阻害薬あるいは遺伝子欠損により抑制されることなどが報告されている⁽⁹⁻¹²⁾。助成研究者らは、オキサリプラチンによる急性末梢神経障害が寒冷刺激(冷水や冷蔵庫等)で誘発、増強されるという臨床経験に着目し、本研究では、TRP チャンネル、特に冷侵害受容器として機能する TRPA1^(13, 14)がオキサリプラチンに対するケミカルセンサーとして機能し、オキサリプラチンによる急性末梢神経障害に寄与しているかを、そのメカニズムも含め明らかにする目的で、マウスを用いた行動薬理実験および TRPA1 強制発現細胞や培養後根神経節(DRG)神経を用いた検討を行った。

2. 研究方法

2.1 使用動物および薬物

実験は全て京都大学動物実験委員会による審査・承認を受け、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行われた。実験には、C57BL/6 系の雄性マウス(6-8 週齢、日本 SLC, 静岡)を使用した。オキサリプラチンおよび sodium oxalate(和光純薬)は、0.5%グルコース溶液に用時調製した。シスプラチン(Sigma-Aldrich)は生理食塩水に、パクリタキセル(Sigma-Aldrich)はクレモフォア/脱水アルコールに溶解後、使用時に生理食塩水で希釈した。TRPA1 阻害薬 HC-030031(Enzo Life Sciences)は、0.5%メチルセルロースにて溶解した。

2.2 行動実験

Cold plate テスト: 冷刺激に対する感受性の測定は、5°C の cold plate 上にマウスを乗せ、惹起される行動を観察することにより評価した。Lifting あるいは backwards walking は 1 点、jumping は 2 点と評価し、60 秒間の合計スコアを算出した。各種鎮痛薬の効果を測定するために、モルヒ

ネ(武田薬品)およびトラマドール(日本新薬)は皮下に、ミルナシブラン(Santa Cruz)およびメキシレチン(Sigma-Aldrich)は腹腔内に cold plate テストを行う 30 分前(オキサリプラチン投与 1.5 時間後)に投与した。ジクロフェナク(Sigma-Aldrich)、ガバペンチン(Sigma-Aldrich)およびアミトリプチリン(LKT laboratories)は、cold plate テストを行う 1 時間前(オキサリプラチン投与 1 時間後)に腹腔内投与した。これらの薬物は全て生理食塩水に溶解した。

von Frey フィラメントテスト:マウスを金属メッシュ製の床上に置き、1 時間馴化させた後、実験に用いた。オキサリプラチン投与後の触刺激に対する感受性の測定は、刺激強度の異なる 7 本の von Frey フィラメント(0.008-1.0 g)を用い、up-down 法により 50% withdrawal threshold を算出した。また、後肢虚血再灌流モデルにおいては、1.0 g の von Frey フィラメントを用い、no response = 0 点、withdrawal, lifting = 1 点、licking, flicking = 2 点と評価し、5 回施行後の合計得点(最高 10 点)をスコアとして表した。

TRP チャネル刺激薬後肢足底内投与による疼痛様行動の評価:マウス左後肢足底内に、TRPA1 刺激薬 AITC (0.1%)、TRPV1 刺激薬カプサイシン(80 $\mu\text{g/ml}$)あるいは TRPM8 刺激薬メントール(800 $\mu\text{g/ml}$)をそれぞれ 20 μl 投与した。AITC あるいはカプサイシンの場合、それぞれ投与後 20 分間あるいは 5 分間の投与足への flicking、licking 行動時間を測定した。メントールの場合、投与後 5 分間の行動を、cold plate テストの場合と同様、スコア化して評価した。

2.3 単離 DRG 神経の調製

生後 6-8 週齢の C57BL/6 系マウスより DRG を摘出し、Percoll 法を用いて DRG 神経を単離した。3 mm \times 7 mm ガラス上に細胞を播種し、10%ウシ胎仔血清を含む DMEM 中、37°C、5% CO₂ 環境下で 1 日培養後、実験に用いた。

2.4 クローン化ヒト TRPA1 cDNA の HEK293 細胞への transfection

HEK293 細胞は、10%ウシ胎仔血清を含む DMEM 中、37°C、5% CO₂ 環境下で培養した。発現ベクターに組み込んだクローン化ヒト TRPA1 (hTRPA1) cDNA および EGFP cDNA プラスミドを 4:1 の割合で混合し、Lipofectamine を用いて、HEK293 細胞に transfection した。2 日間の培養

後、実験に用いた。

2.5 細胞内 Ca²⁺イメージング

単離 DRG 神経あるいは hTRPA1 発現 HEK293 細胞をガラスに播種して調製後、蛍光 Ca²⁺指示薬 Fura-2/AM(5 mM)を含む緩衝液中で 37°C、30 分間インキュベートした。その後、Ca²⁺測定用画像解析装置(AQUACOSMOS/ORCA-ER イメージングシステム)を用いて波長 340 nm 及び 380 nm の励起光で得られる蛍光強度比を取得し、細胞内 Ca²⁺濃度変化の指標とした。

2.6 パッチクランプ法

TRPA1 発現 HEK293 細胞をガラスに播種して調製し、その後 EPC-10(HEKA Elektronik)を用いて測定を行った。ホールセルパッチクランプ法による測定では、-100 mV から 100 mV までの Ramp pulse をかけることにより電流を取得し(0.2 Hz, 保持電位; 0 mV)、得られたデータは Patchmaster(HEKA)により解析した。Cell-attach による測定では-60 mV に電圧を保持し電流を取得した。得られたデータは Patchmaster および Igor Pro(HULINKS)により解析した。

2.7 統計解析

図表中の数値は平均値 \pm 標準誤差(S.E.M)で表記した。有意差検定は、2 群以上の場合には、one-way あるいは two-way ANOVA および引き続き、Bonferroni's post hoc test、2 群間の検定には、Student's t-test により解析した。全ての実験において、 $p < 0.05$ の場合に、統計学的な有意差があると判定した。

3. 研究結果および考察

3.1 オキサリプラチンにより惹起される触刺激および冷刺激に対する過敏応答

オキサリプラチン投与後の触刺激および冷刺激に対する感受性への影響を、それぞれ、von Frey フィラメントテストおよび cold plate テストにて評価した。その結果、オキサリプラチン(5 mg/kg)を腹腔内に単回投与すると、von Frey フィラメントテストでは、投与翌日から触刺激に対する閾値の有意な低下(触刺激に対する過敏応答)が認められ、その効果は少なくとも 7 日後まで持続した(図 1A)。一方、cold plate テストでは、オキサリプラチン投与 2 時間後には、有意な冷刺激に対する過敏応答が認められ、その効果は少なくとも 7 日後まで持続した(図 1B)。また、オキ

サリプラチン(1, 5, 10 mg/kg) 投与 2 時間後の冷過敏応答は濃度依存的であった(図 1C)。すなわち、オキサリプラチンの投与 2 時間後という比較的早い段階で、冷過敏応答が惹起されるが、触刺激に対する過敏応答は認められず、これらの結果から、この投与数時間後での冷過敏応答が、オキサリプラチンに特徴的な急性期の末梢神経障害を表現した行動ではないかと推察される。また、これらの知見は、オキサリプラチンによる急性期の末梢神経障害が、寒冷被爆によって誘発、増強されるという臨床経験とも一致するものである⁽¹⁵⁾。

一方、オキサリプラチンは、生体内などの Cl⁻ 存在下では非酵素的にオキサリル基が脱離し、白金製剤の抗がん作用の活性本体であるジクロロ 1,2-ジアミノシクロヘキサン白金(Pt(DACH)Cl₂)へと代謝される。これまでの報告から、このオキサリル基がオキサリプラチンによる急性末梢神経障害の原因物質であると推察されている⁽¹⁶⁻¹⁸⁾。そこで、本研究では 5 mg/kg のオキサリプラチンから脱離する量に相当する 1.7 mg の oxalate(シュウ酸)を腹腔内投与し、cold plate テストにより冷感受性に対する影響を検討した。その

結果、oxalate 投与 2 時間後に顕著な冷過敏応答が惹起され、その効果は約 3 日後まで持続したが、7 日後には vehicle 投与群と比較して有意な差は認められなくなった(図 1D)。これらの結果から、オキサリプラチンによる急性期の冷過敏応答には、オキサリプラチンのオキサリル基あるいは脱離した oxalate が関与しているものと考えられる⁽¹⁵⁾。また、oxalate による急性冷過敏応答のタイムコースは、人で見られるオキサリプラチンによる急性末梢神経障害の発生時期や持続時間とほぼ一致している。

一方、他の白金製剤であるシスプラチン、タキサン系抗がん剤であるパクリタキセルは、その反復投与により蓄積性の末梢神経障害を誘発するものの、オキサリプラチンのような急性末梢神経障害は生じないことが知られている⁽¹⁻⁴⁾。そこで、シスプラチン(5 mg/kg)あるいはパクリタキセル(6 mg)を単回腹腔内投与し、2 時間後の触刺激および冷刺激に対する感受性を測定した。しかしながら、シスプラチンおよびパクリタキセルとも、投与 2 時間後では触刺激および冷刺激に対する感受性に影響を与えなかった(図 1E-H)。これらの結果から、オキサリプラチン投与 2 時

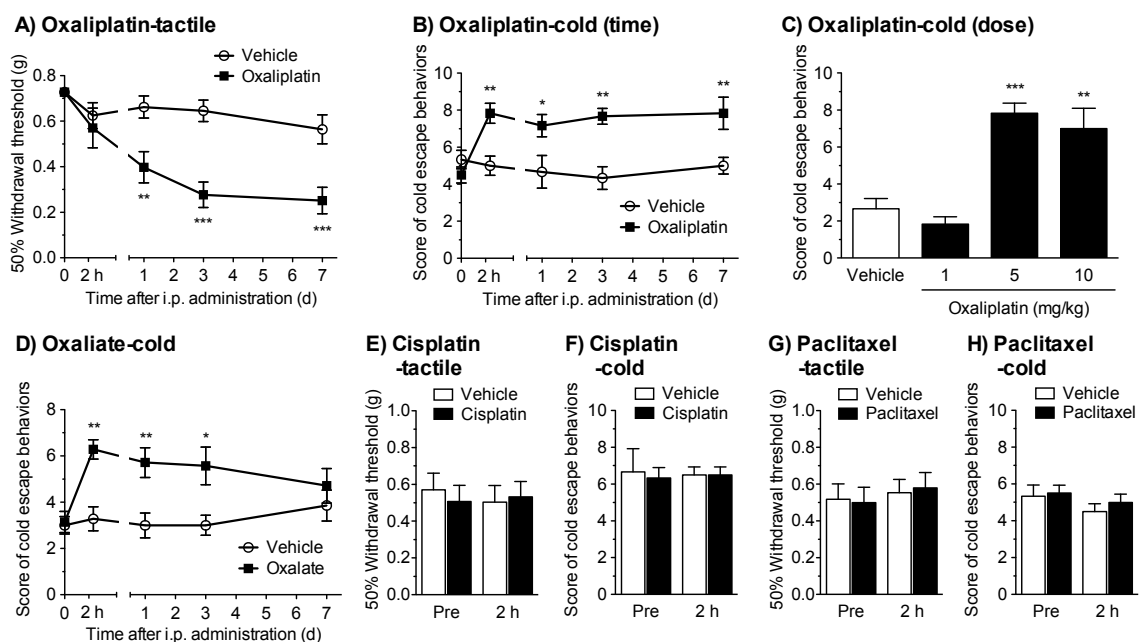


図 1. オキサリプラチン、シスプラチンおよびパクリタキセルの単回投与による触刺激あるいは冷刺激に対する感受性への効果。A, B) オキサリプラチン(5 mg/kg)、C) オキサリプラチン(1, 5, 10 mg/kg)、D) オキサリプラチンの脱離基 oxalate(1.7 mg/kg)、E, F) シスプラチン(5 mg/kg)あるいは、G, H) パクリタキセル(6 mg/kg)を単回腹腔内投与し、2 時間後、1, 3, 7 日後に触刺激および冷刺激に対する感受性をそれぞれ、von Frey フィラメントテスト(A, E, G)および cold plate テスト(B, C, D, F, H)により測定した。 $n=6-8$ 。* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs vehicle-treated group (two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc tests)

間後に生じる冷過敏応答はオキサリプラチンに特徴的なもので、他の抗がん剤では認められないことが明らかとなった⁽¹⁵⁾。

3.2 オキサリプラチン誘発急性冷過敏応答に対する各種鎮痛薬の感受性

オキサリプラチンの腹腔内投与により誘発される急性冷過敏応答に対して、NSAID ジクロフェナク、オピオイド系鎮痛薬モルヒネ、神経障害性疼痛に対する第一選択薬で

ある電位依存性 Ca^{2+} チャンネル $\alpha_2\delta$ リガンド・ガバペンチン、三環系抗うつ薬アミトリプチリン、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬ミルナシプラン、抗不整脈として用いられる Na^+ チャンネル阻害薬メキシレチン、弱オピオイドの作用とセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害作用を併せ持つトラマドールといった代表的な鎮痛薬の効果を検討した(図2)。上述の通り、オキサリプラチン(5 mg/kg)の腹腔内投与2時間後では、vehicle 投与群と比較して有意

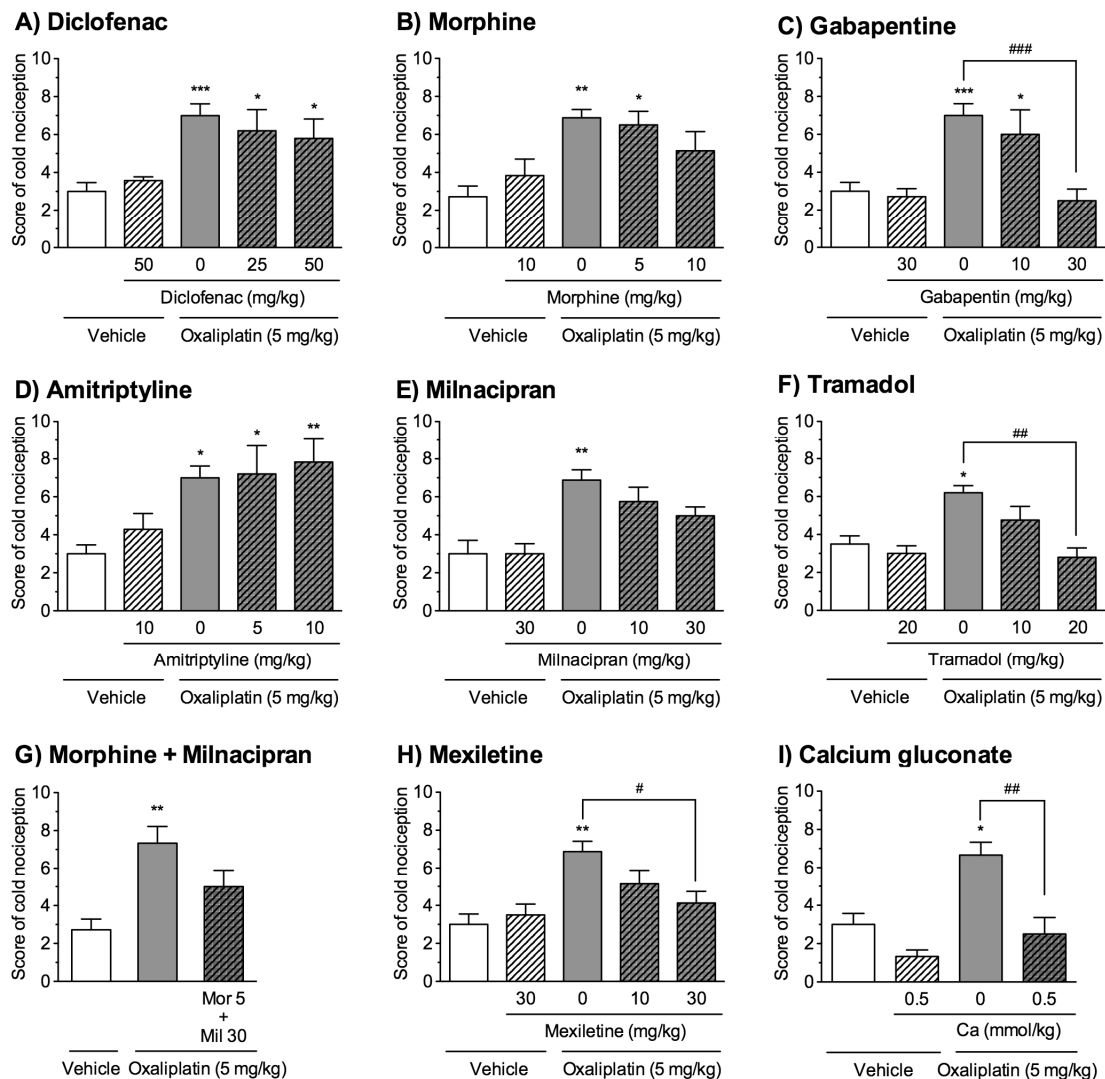


図2. オキサリプラチン誘発急性冷過敏応答に対する各種鎮痛薬および Ca^{2+} 投与の効果
 マウスにオキサリプラチン(5mg/kg)あるいは vehicle を腹腔内投与し、2時間後、cold plate テストにより、冷刺激に対する感受性を測定した。モルヒネ(5、10 mg/kg)およびトラマドール(10、20 mg/kg)は皮下に、ミルナシプラン(10、30 mg/kg)およびメキシレチン(10、30 mg/kg)は腹腔内に cold plate テストを行う30分前(オキサリプラチン投与1.5時間後)に投与した。ジクロフェナク(25、50 mg/kg)、ガバペンチン(10、30 mg/kg)およびアミトリプチリン(5、10 mg/kg)は、cold plate テストを行う1時間前(オキサリプラチン投与1時間後)に腹腔内投与した。グルコン酸カルシウム(0.5 mmol/kg)は1時間前に静脈内注射した。 $n=3-9$ 。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared to the group treated with vehicle 処置群。# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ ⁽²¹⁾

な冷過敏応答が惹起されたが、ジクロフェナク(25 および 50 mg/kg)およびアミトリプチリン(5 および 10 mg/kg)はこの冷過敏応答に対して何ら影響を与えなかった。一方、ガバペンチン(10 および 30 mg/kg)、トラマドール(10 および 20 mg/kg)、およびメキシレチン(10 および 30 mg/kg)は、オキシサリプラチン誘発急性冷過敏応答を、いずれも濃度依存的に有意に抑制した。また、モルヒネ(5 および 10 mg/kg)およびミルナシプラン(10 および 30 mg/kg)は冷過敏応答を抑制する傾向を示したが、その効果は比較的弱いものであった。弱オピオイドの作用とセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害作用を併せ持つトラマドールが、顕著な抑制作用を示したことから、モルヒネ(5 mg/kg)とミルナシプラン(30 mg/kg)を同時処置し、その併用効果を期待したが、両者の同時処置によっても、抑制傾向は認められたものの有意なものではなかった。この結果から、トラマドールによるオキシサリプラチン誘発急性冷過敏応答の抑制作用は、弱オピオイドの作用とセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害作用の相乗効果によるものではなく、おそらく他の作用(おそらくNa⁺チャンネル抑制作用)が関連するのではないかと考えられる。

一方、オキシサリプラチンによる末梢神経障害に対して臨床でカルシウム/マグネシウム製剤が用いられている。一時期、抗腫瘍効果への影響も懸念されたが、その可能性は否定され⁽¹⁹⁾、最近では、急性末梢神経障害だけでなく、蓄積性の慢性末梢神経障害に対してもその有効性が報告されている⁽²⁰⁾。

オキシサリプラチン誘発冷過敏応答に対するグルコン酸カルシウム(0.5 mmol/kg)の効果を検討したところ、冷過敏応答は有意に抑制された。これら各種鎮痛薬の薬物感受性から、下行性抑制系など主に中枢神経系に作用して鎮痛効果を示す薬物(モルヒネ、アミトリプチリン、ミルナシプラン、(ガバペンチン、トラマドール))の作用は総じて弱く、一次感覚神経終末での痛覚情報伝達物質遊離抑制作用(ガバペンチン)やNa⁺チャンネル(メキシレチン)、Ca²⁺製剤など末梢神経系に直接作用する薬物の有効性が高いのではないかと考えられる。

また、これらの結果から、オキシサリプラチン誘発急性冷過敏応答が、必ずしも疼痛関連行動を表現しているのではなく、他の感覚、おそらく、しびれや感覚異常を表現する行動ではないかと推察している⁽²¹⁾。

3.3 TRPA1、TRPM8 および TRPV1 刺激による疼痛様行動に対するオキシサリプラチン前処置の効果

オキシサリプラチンによる急性末梢神経障害における温度感受性 TRP チャンネル TRPA1、TRPM8 および TRPV1 の関与を検討する目的で、TRPA1 刺激薬 AITC、TRPM8/A1 刺激薬メントールおよび TRPV1 刺激薬カプサイシンを後肢足底内投与した際に惹起される疼痛様行動に対するオキシサリプラチンの 2 時間前処置の効果を検討した。まず、オキシサリプラチン(1, 5, 10 mg/kg)を腹腔内投与した 2 時間後、TRPA1 刺激薬 AITC(0.1%, 20 μl/paw)を足底内投与すると、AITC により惹起される疼痛様行動(licking/flicking)がオキシサリプラチンの濃度依存的に有意に増強された(図 3A)。また、その AITC 誘発疼痛様行動は、オキシサリプラチン(5 mg/kg)投与 1 日後および 3 日後でも有意に増強されていたが、投与 7 日後においては消失していた(図 3B)。この時間経過は、オキシサリプラチンの急性末梢神経障害が投与 1 週間以内には消失するという臨床経験とも合致する。

一方、TRPV1 刺激薬カプサイシン(1.6 μg/paw)による疼痛様行動(licking/flicking)に有意な変化は認められなかったが(図 3C)、TRPM8/A1 刺激薬メントール(160 μg/paw)による疼痛様行動(backwards walking/lifting)は、有意に増強された(図 3D)。しかし、メントールは、TRPM8 刺激薬としてよく用いられているが、TRPA1 も刺激することが知られている⁽²²⁾。このメントールによる疼痛様行動の有意な増強は、TRPA1 遺伝子欠損マウスにおいて消失したことから(図 3E)、少なくとも、オキシサリプラチンによって増強されるメントール誘発疼痛様行動の成分は TRPA1 を介したものであると考えている。これらの結果から、オキシサリプラチンは、TRPA1 を介した行動を増強するが、TRPV1 および TRPM8 を介した疼痛様行動には影響しないことが示される⁽¹⁵⁾。

また、オキシサリプラチンの分解産物である oxalate の 2 時間前処置によっても、AITC 足底内投与による疼痛様行動が増強された(図 3F)。すなわち、オキシサリプラチンによる TRPA1 を介した疼痛様行動の増強は、分解産物である oxalate、あるいはオキシサリプラチンのオキサリル基が関与することが示唆される。一方、シスプラチン(5 mg/kg)あるいはパクリタキセル(6 mg)の 2 時間前処置によっても、AITC 足底内投与による疼痛様行動は影響されなかった

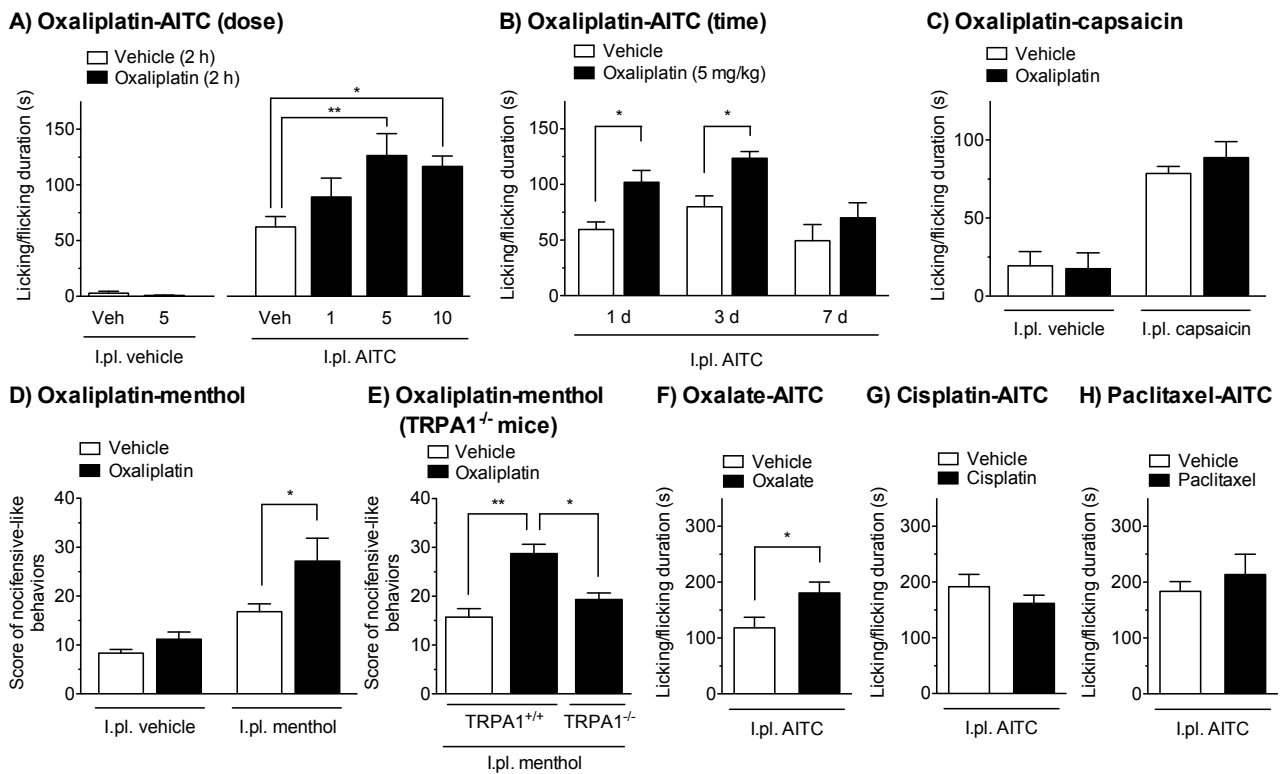


図 3. TRPA1、TRPV1、TRPM8 刺激薬の足底内投与による疼痛様行動に対するオキサリプラチン、シスプラチンおよびパクリタキセル前投与の効果

A-E) オキサリプラチン (A: 1, 5, 10 mg/kg, B: 5 mg/kg)、F) oxalate (1.7 mg/kg)、G) シスプラチン (5 mg/kg)、あるいは H) パクリタキセル (6 mg/kg) を腹腔内投与し、2 時間後 (B: 1, 3, 7 日後)、(A, B, F-H) TRPA1 刺激薬 AITC (0.1%, 20 μ l/paw)、(C) TRPV1 刺激薬カプサイシン (1.6 μ g/20 μ l/paw) (D, E) TRPM8/A1 刺激薬メントール (160 μ g/20 μ l/paw) を後肢足底内投与し、惹起される疼痛様行動の時間あるいはスコアを測定した。n=6-7。* p <0.05, ** p <0.01 (two-way or one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc tests, or Student's t -test)

(図 3G, H)。よって、シスプラチンおよびパクリタキセルは、投与 2 時間後という時間では TRPA1 を介した行動に影響を与えないことが示唆される⁽¹⁵⁾。

3. 4 単離 DRG 神経における TRPA1、TRPM8、TRPV1 機能に対するオキサリプラチン前処置の効果

オキサリプラチンの TRPA1、TRPM8 および TRPV1 機能に対する影響を、単離 DRG 神経を用いて、Ca²⁺イメージング実験により検討した。オキサリプラチンの代わりに vehicle を 1、2、4 時間前処置した単離 DRG 神経に、比較的 low 濃度の TRPA1 刺激薬 AITC (10 μ M) を処置すると、約 14.2% の細胞が AITC に感受性を示した。一方、オキサリプラチン (30 μ M) を 1、2、4 時間前処置した単離 DRG 神経では、AITC に感受性を示す細胞の割合に増加傾向が

認められたものの、有意なものではなかったが、オキサリプラチンを 100 μ M あるいは 300 μ M の濃度で 1、2、4 時間前処置した単離 DRG 神経では、AITC に感受性を示す細胞の割合が時間依存的に増加し、オキサリプラチンの 2 および 4 時間前処置により、有意な増加が認められた (図 4A-G)。一方、TRPM8/A1 刺激薬メントール (100 μ M) および TRPV1 刺激薬カプサイシン (500 nM) に感受性を示す細胞の割合は、オキサリプラチン (100 μ M) を 1、2、4 時間前処置しても変化は認められなかった (図 4H, I)。これらの結果から、オキサリプラチンの短時間前処置により、単離 DRG 神経における TRPA1 の感受性が選択的に増大し、TRPM8 および TRPV1 の感受性は変化しないことが明らかとなった⁽¹⁵⁾。

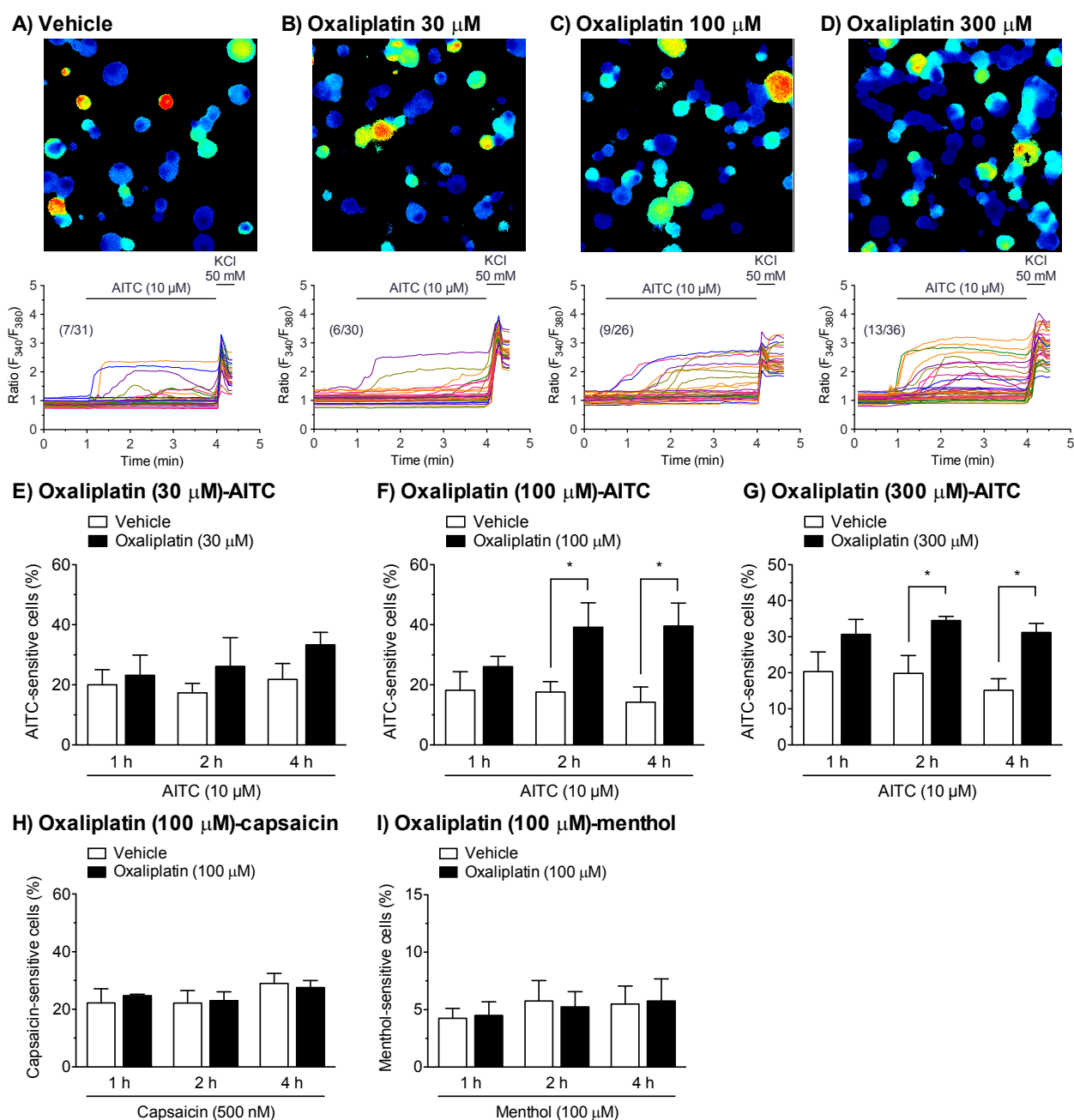


図4. 単離 DRG 神経における TRPA1 刺激薬 AITC、TRPM8/A1 刺激薬メントール、TRPV1 刺激薬カプサイシンにより誘発される細胞内 Ca^{2+} 応答に対するオキサリプラチン前処置の効果

単離 DRG 神経に、A) vehicle、あるいは、B-D) オキサリプラチン (30, 100, 300 μ M) を、2 時間前処置した後、比較的低濃度の TRPA1 刺激薬 AITC (10 μ M) を 3 分間処置し、 $[Ca^{2+}]_i$ (F_{340}/F_{380} ratio) を蛍光 Ca^{2+} イメージングにより測定した。AITC 処置後、50 mM KCl を処置し、高カリウム刺激に応答する細胞を DRG 神経であると同定した。E-I) 単離 DRG 神経に、オキサリプラチン (30, 100, 300 μ M) を、1, 2 あるいは 4 時間前処置した後、比較的低濃度の TRPA1 刺激薬 AITC (10 μ M)、TRPV1 刺激薬カプサイシン (500 nM)、TRPM8/A1 刺激薬メントール (100 μ M) を 3 分間処置し、細胞内 Ca^{2+} 応答を示す DRG 神経細胞を計数した。縦軸は、KCl に応答する細胞数のうち、それぞれの刺激薬に感受性を持つ細胞の割合を%で示してある。n=4-6。* $p < 0.05$ (two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* tests)

3.5 オキサリプラチンによる急性冷過敏応答における TRPA1 の関与

オキサリプラチン誘発冷過敏応答が TRPA1 を介した応

答であるかを確認するため、TRPA1 選択的阻害薬 HC-030031 および TRPA1 遺伝子欠損マウスを用いた検討を行った。その結果、HC-030031 (100 mg/kg) の cold

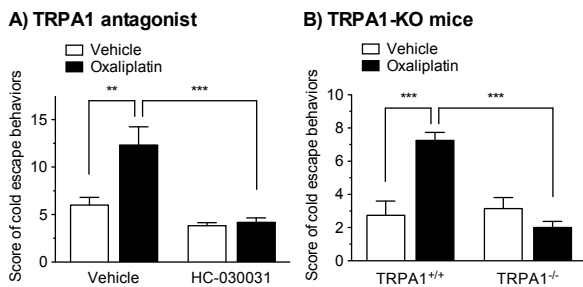


図 5. オキサリプラチン誘発急性冷過敏応答に対する TRPA1 阻害薬および TRPA1 遺伝子欠損の影響
マウスにオキサリプラチン (5 mg/kg) あるいは vehicle を腹腔内投与し、2 時間後、cold plate テストにより、冷刺激に対する感受性を測定した。(A) TRPA1 阻害薬 HC-030031 (100 mg/kg) は、cold plate テスト 30 分前に腹腔内投与した。 $n=6$ 。(B) ホモ TRPA1^{+/+}マウスおよびホモ TRPA1^{-/-}マウスを用いた。 $n=7-8$ 。*** $p<0.001$, ** $p<0.01$ (two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc tests)

plate テスト施行 30 分前の投与 (図 5A) および TRPA1 遺伝子欠損マウス (図 5B) において、オキサリプラチン誘発冷過敏応答は有意に抑制された。これらの結果ら、オキサリプラチンによる急性冷過敏応答は、実際に TRPA1 を介した行動であることが明らかとなった⁽¹⁵⁾。

3.6 オキサリプラチンによる TRPA1 活性化機構

オキサリプラチンによる TRPA1 の活性化機構を明らかにするために、クローン化 hTRPA1 を強制発現させた HEK293 細胞を用いて、Ca²⁺イメージング実験およびパッチクランプ法により検討した。空のベクターのみを transfect した mock 導入細胞では、高濃度のオキサリプラチン (1 mM) を処置しても、細胞内 Ca²⁺濃度および電流に何ら変化は認められなかったが (図 6A, B)、hTRPA1 発現細胞にオキサリプラチン (1 mM) を処置すると、緩徐で持続的な細胞内 Ca²⁺濃度の増加および外向きの TRPA1 電流が認められた (図 6C, D)。また、この細胞内 Ca²⁺濃度の増加はオキサリプラチン (0.1-1 mM) の濃度に依存的で、1 mM の濃度で有意な増加が認められた (図 6E)。これらの結果から、高濃度のオキサリプラチンは、TRPA1 を開口させる能力を有していることが示唆される。そこで、次にオキサリプラチンが TRPA1 を直接活性化するか、あるいは間接的に活性化しているのかを明らかにするために、inside-out パッチクランプ法により検討した。TRPA1 刺激薬 AITC (100 μM) は TRPA1 の単一チャンネル電流を増加したのに対し、オキサリプラチン (1 mM) は何ら影響を与えなかった (図

6F)。このことから、オキサリプラチンは、TRPA1 を直接修飾し開口させているのではなく、細胞内の何らかの因子に作用することで、間接的に TRPA1 を開口させていることが明らかとなった。

TRPA1 は酸化感受性が非常に高く、ROS などの酸化性物質により N 末端のシステイン残基が酸化修飾されることにより活性化されることが知られている^(23, 24)。また、オキサリプラチンによる末梢神経障害に活性酸素種 (ROS) の産生が関与していることが報告されていることから^(10, 25)、まず、高濃度オキサリプラチン処置による ROS の産生を、過酸化水素 (H₂O₂) 特異的蛍光指示薬 Peroxy Green 1 (PG-1) を用いて検討した。その結果、TRPA1 を発現させていない HEK293 細胞に、オキサリプラチン (1 mM) を処置すると、有意な PG-1 蛍光の増加、すなわち H₂O₂ 産生が認められた (図 6G) が、オキサリプラチンの代謝産物 oxalate の細胞膜透過性アナログ dimethyl oxalate (DMO; 3 mM) の処置では、H₂O₂ 産生は認められなかった (data not shown)。さらに、高濃度オキサリプラチンによる TRPA1 を介した Ca²⁺応答に対する抗酸化剤グルタチオン (1 mM) の共処置の効果を検討したところ、高濃度オキサリプラチン (1 mM) による TRPA1 を介した Ca²⁺応答は有意に抑制された (図 6H)。以上の結果より、高濃度オキサリプラチンによる TRPA1 活性化は、おそらくオキサリプラチンの白金部分がミトコンドリア障害を引き起こし、その結果産生された ROS が TRPA1 の N 末端のシステイン残基を酸化修飾することにより活性化させたものであると考えられる。ROS あるいは多くの TRPA1 活性化刺激による TRPA1 活性化には、N 末端の複数のシステイン残基の求電子反応が関与していることが報告されている⁽¹⁸⁻²⁰⁾。そこで、これらシステインをセリンに変異させた 8 種類の変異型 TRPA1 (C192S, C213S, C414S, C633S, C641S, C665S, C856S) を用いて検討した。その結果、TRPA1 のチャンネル機能に重要とされている C414 の変異型 TRPA1 において、オキサリプラチンによる TRPA1 を介した Ca²⁺応答が有意に抑制された他、過酸化水素や一酸化窒素 (NO) による TRPA1 活性化に重要であることが報告されている C641 の変異型 TRPA1 においても有意な抑制が認められた (図 6I, J)。

以上の結果より、高濃度オキサリプラチンによる TRPA1 活性化は、おそらくオキサリプラチンの白金部分がミトコン

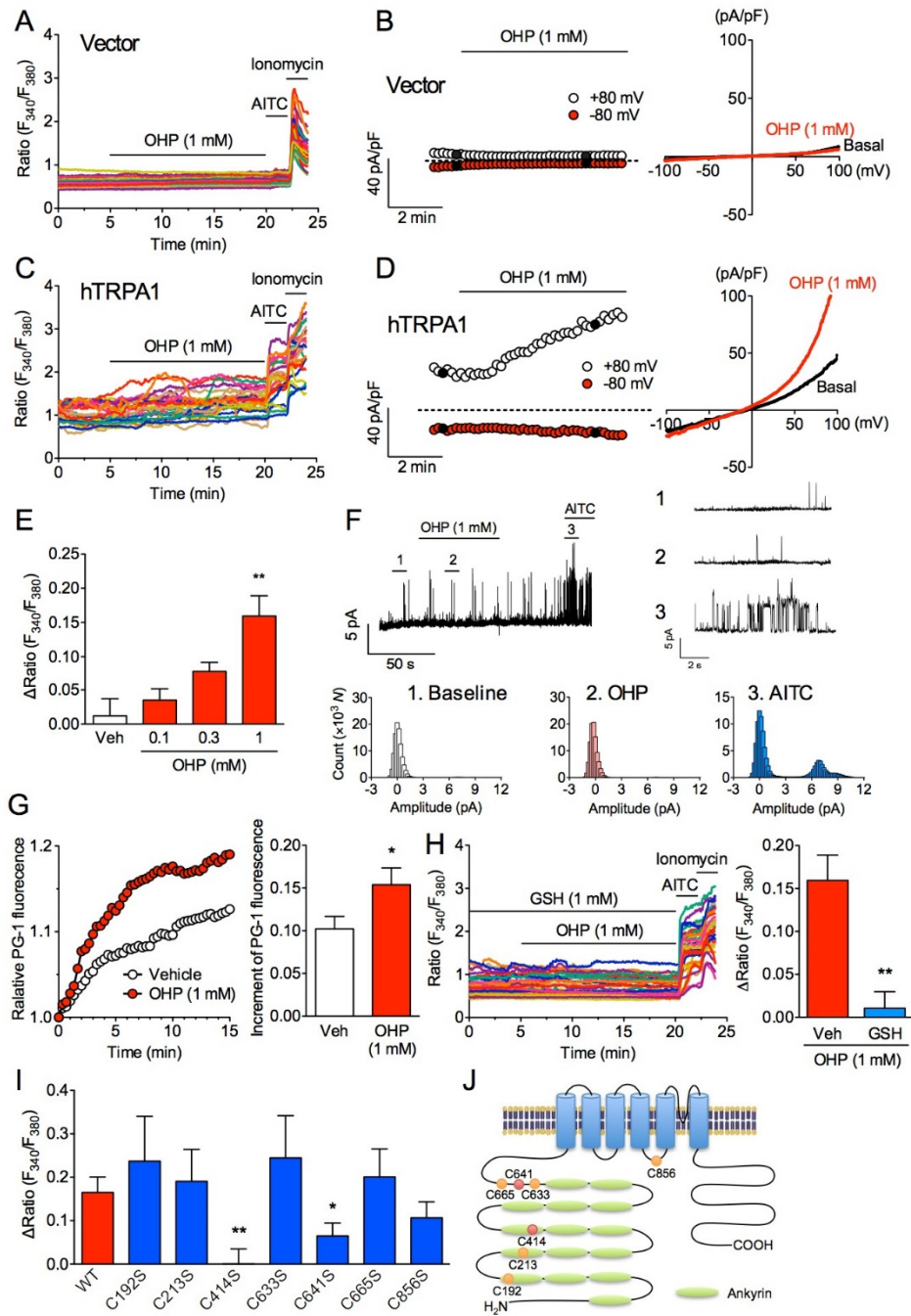


図 6. 高濃度オキサリプラチンによる ROS 産生を介した TRPA1 活性化

(A, B) mock (ベクターのみ)、あるいは、(C-E) hTRPA1 発現 HEK293 細胞に、オキサリプラチン (0.1-1 mM) を処置し、(A, C, E) Ca^{2+} イメージング法により $[Ca^{2+}]_i$ を、あるいは (B, D) whole cell patch clamp 法により電流応答を測定した (左; 電流応答の継時的変化、右; オキサリプラチン処置前後の代表的な IV カーブ)。E) はオキサリプラチン処置後の Ratio 上昇値 (Δ Ratio) によりオキサリプラチンの濃度依存性を検討している。** $P < 0.01$ vs vehicle. $n = 5-8$ 。(F) hTRPA 発現細胞における inside-out パッチクランプ法により単一チャネル電流。trace 1 (control), 2 (オキサリプラチン), 3 (AITC) は下線部分を拡大したもの、下部は単一チャネル電流のヒストグラムを表す。(G) オキサリプラチンによる H_2O_2 産生量。HEK293 細胞にオキサリプラチン (1 mM) を処置し、 H_2O_2 特異的蛍光指示薬 PG-1 で H_2O_2 産生量を定量した。* $P < 0.05$ vs vehicle. $n = 28-36$ cells。(H) オキサリプラチン誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 増加に対するグルタチオンの効果。グルタチオン (1 mM) 存在下でオキサリプラチン (1 mM) を処置した。** $P < 0.01$ vs vehicle. $n = 6-8$ 。(I, J) システイン残基変異型 TRPA1 でのオキサリプラチン誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 増加。J に示すシステイン残基の変異型 TRPA1 を HEK293 に発現させ、オキサリプラチン (1 mM) を処置した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle. $n = 4-10$

ドリア障害を引き起こし、その結果産生された ROS が TRPA1 の N 末端のシステイン残基を酸化修飾することにより活性化させたものであると考えられる。

そこで次に、同じ白金製剤であるが、急性末梢神経障害は起こさないシスプラチンについて同様に検討した。その結果、hTRPA1 発現細胞に、高濃度シスプラチン (1 mM) を処置したところ、同様に Ca^{2+} 応答および TRPA1 電流が認められ、いずれも TRPA1 阻害薬 HC030031 (100 μ M) により、抑制された。また、高濃度オキサリプラチンと同様、抗酸化剤グルタチオン (1 mM) によってもシスプラチン誘発 Ca^{2+} 応答は有意に抑制された (図 7A-E)。

これらの結果から、オキサリプラチンによる TRPA1 活性化には非常に高濃度が必要であり、臨床使用される用量とはかけ離れていること、急性末梢神経障害は起こさないシスプラチンでも同様に、ROS 産生を介した TRPA1 活性化が認められたことから、この機構はオキサリプラチン誘発急性末梢神経障害の真のメカニズムとは考えにくい。シスプラチンやオキサリプラチンなど白金製剤の蓄積性慢性末梢神経障害は、ミトコンドリア傷害による ROS 産生が

関わっていることが知られていることから⁽⁶⁾、白金製剤による慢性末梢神経障害の誘導や疼痛に TRPA1 活性化が関わっているのかもしれない。

3.7 オキサリプラチン前処置による ROS に対する TRPA1 過敏化

次に、オキサリプラチンによる TRPA1 過敏化機構を明らかにするために、hTRPA1 を直接活性化はさせない比較的低濃度のオキサリプラチン前処置した後、 H_2O_2 による hTRPA1 活性化に対する影響を検討した。Vehicle を 2 時間前処置した hTRPA1 発現 HEK293 細胞に、比較的低濃度の H_2O_2 (10 μ M) を処置すると、一部の細胞においてのみ H_2O_2 誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 増加が認められたが、オキサリプラチン (100 μ M) を 2 時間前処置した細胞においては、vehicle 処置群と比較して、 H_2O_2 誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 増加の有意な増強が認められた (図 8A, B, E)。このオキサリプラチン前処置による TRPA1 過敏化応答に、オキサリプラチン前処置時の ROS 産生が関与しているかを検討するため、抗酸化剤グルタチオン (1 mM) あるいは ROS スカベンジャー α -phenyl-*N*-tert-butyl nitron (PBN; 1 mM) をオキサリプラ

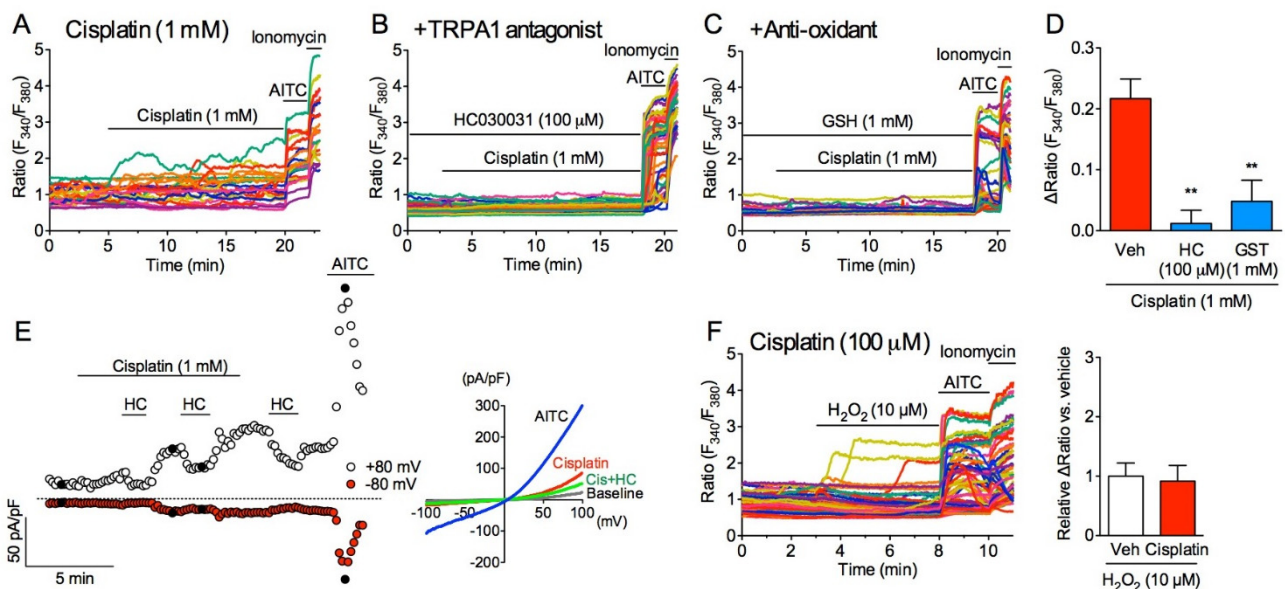


図 7. 高濃度シスプラチンによる ROS を介した TRPA1 活性化
hTRPA1 発現 HEK293 細胞に、シスプラチン (1 mM) を (A) 単独で処置、(B) TRPA1 阻害薬 HC030031 (100 μ M) 存在下、あるいは (C) 抗酸化剤グルタチオン (1 mM) 存在下で処置し、 $[Ca^{2+}]_i$ を測定した。(D) Δ Ratio 解析。** $P < 0.01$. $n = 4-7$ 。(E) Whole cell patch clamp 法によりシスプラチン (1 mM) および HC030031 (100 μ M) 処置による電流応答を測定した。(F) シスプラチン (100 μ M) 2 時間前処置後、 H_2O_2 (10 μ M) を処置し、 $[Ca^{2+}]_i$ を測定した。 $n = 3-6$

チン(1 mM)と共処置したが、同様に H₂O₂ 誘発 Ca²⁺_i 応答の有意な増強が認められた(図 8C-E)。このことから、オキサリプラチンによる TRPA1 過敏化の誘導には ROS 産生は関与しないものと考えられる。

次に、オキサリプラチン前処置による TRPA1 過敏化に、オキサリプラチン代謝物 oxalate あるいは白金含有代謝物 Pt(DACH)Cl₂ が関与するかを検討した。その結果、oxalate の細胞膜透過性アナログ dimethyl oxalate (DMO; 30 μM) を 2 時間前処置すると、オキサリプラチンと同様、

H₂O₂ 誘発 [Ca²⁺]_i 増加の有意な増強が認められたが、Pt(DACH)Cl₂ (30 μM) の前処置ではそのような効果は認められなかった(図 8F, G)。同様に、このような H₂O₂ に対する TRPA1 過敏化は、白金線剤シスプラチン(100 μM) を 2 時間処置した細胞でも認められなかった(図 7F)。これらの結果から、オキサリプラチン前処置による TRPA1 過敏化は、白金部分ではなく、オキサリプラチンに特有の代謝物 oxalate が寄与していることが示唆される。

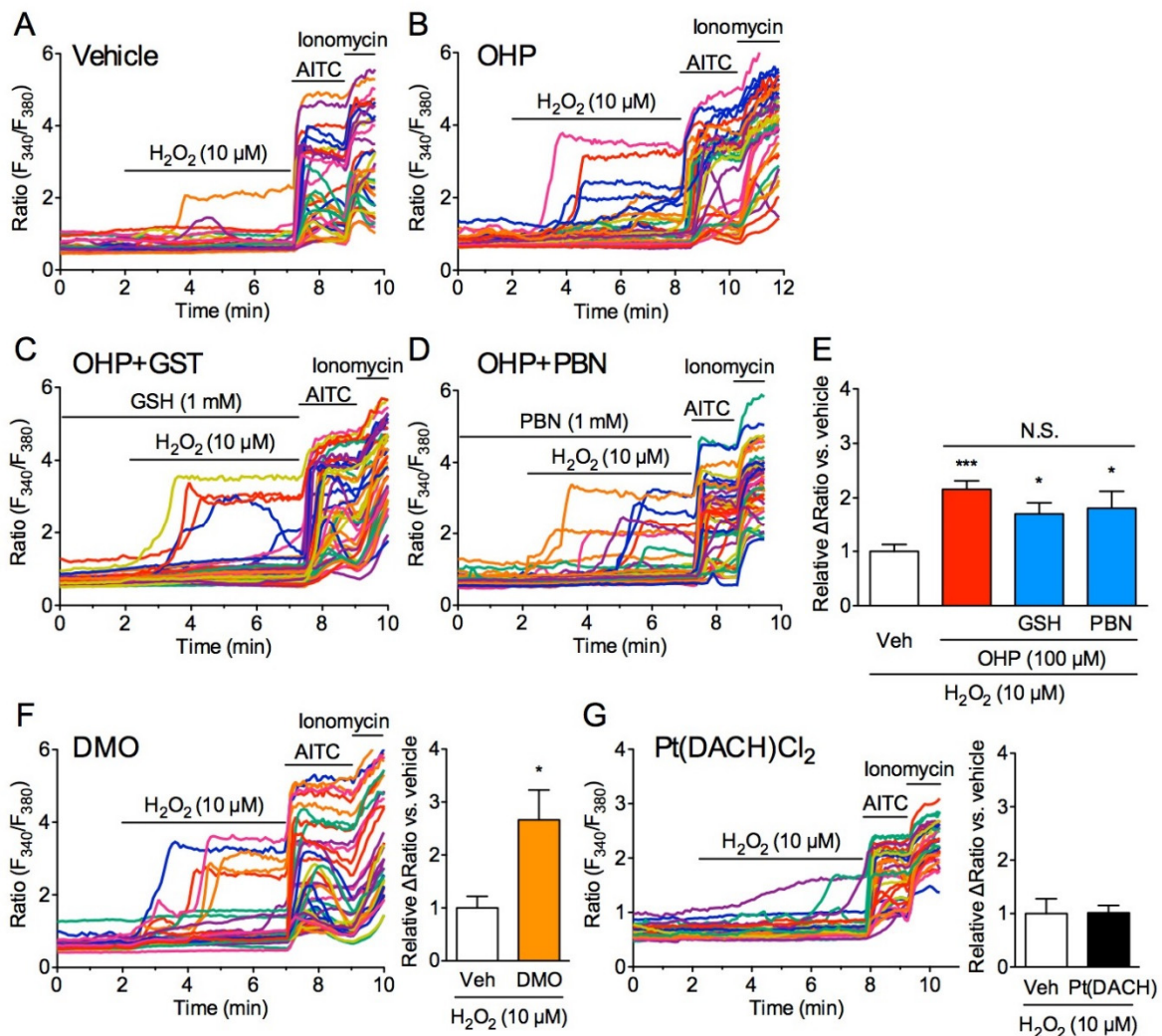


図 8. オキサリプラチン前処置による ROS に対する TRPA1 過敏化

hTRPA1 発現 HEK293 細胞に、(A) vehicle、(B) オキサリプラチン(100 μM) を 2 時間前処置した後、H₂O₂ (10 μM) を処置し、[Ca²⁺]_i を測定した。(C) グルタチオン(1 mM) あるいは (D) PBN (1 mM) をオキサリプラチン(100 μM) と同時に 2 時間前処置し、H₂O₂ (10 μM) 誘発 [Ca²⁺]_i 増加を測定した。(E) ΔRatio 解析。*P<0.05, **P<0.01 vs vehicle. n=5-12。(F) DMO (30 μM, n=4) あるいは (G) Pt(DACH)Cl₂ (30 μM, n=6) を 2 時間前処置した後、H₂O₂ (10 μM) を処置し、[Ca²⁺]_i を測定した。*P<0.05 vs vehicle

3. 8 オキサリプラチンによる TRPA1 過敏化機構

TRPA1 は、高酸素を含む酸化物質によりN末端の複数のシステイン残基の酸化修飾により活性化するが、一方、低酸素によっても活性化する。TRPA1 はN末端の394番目のプロリン残基(Pro³⁹⁴)が水酸化されることにより常時抑制されており、低酸素により酸素感受性プロリン水酸化酵素(PHD)の活性が低下すると、Pro³⁹⁴の水酸化が解除されて活性化することが共同研究者らにより報告されている⁽²⁴⁾。このPHDの阻害薬 dimethyl ox allyl glycine (DMOG) とオキサリプラチンあるいはその代謝物 oxalate は構造的に類似する部分があり、オキサリプラチンあるいはその代謝物 oxalate が PHD 活性抑制を介したプロリン水酸化を抑制した結果、TRPA1 が過敏化するのではないかと推察した。

そこで、まず、オキサリプラチンおよび代謝物 oxalate が PHD を抑制しうるかを検討した。低酸素誘導因子(HIF)-1 α は、PHD によるプロリン水酸化を受けることにより、常時、プロテアソームにより分解され、発現量が低く保たれているが、低酸素条件下でPHDの酵素活性が低下すると、プロリン水酸化が解除され、プロテアソームによる分解が抑制され、蓄積することが知られている⁽²⁶⁾。そこで、HEK293細胞にオキサリプラチン(100 μ M)あるいはDMO

(30 μ M)を24時間処置し、HIF-1 α の発現量をwestern blot法により検討し、positive controlのPHD阻害薬CoCl₂(100 μ M)と同様、どちらもHIF-1 α の発現量を増加させた(図9A)。また、hTRPA1発現細胞に、DMO(30, 100 μ M)を処置すると、DMOGと同様⁽²⁴⁾、濃度依存的に[Ca²⁺]_i増加を引き起こした。このDMOによる[Ca²⁺]_i増加はTRPA1阻害薬HC030031(100 μ M)の処置により有意に抑制されたが、抗酸化剤グルタチオン(1 mM)では有意な変化は認められなかった(図9B-D)。さらに、PHDにより水酸化されるPro³⁹⁴を変異させた変異型TRPA1(TRPA1 P394A)においては、DMOGと同様⁽²⁴⁾、DMO(300 μ M)による[Ca²⁺]_i増加が抑制された(図9E-G)。これらの結果から、DMO(oxalate)は、DMOGと同様、PHDを抑制する作用を有し、Pro³⁹⁴の水酸化の解除によりTRPA1を活性化しうることを明らかにした。次に、反対にPHD阻害薬DMOGがオキサリプラチンやoxalateと同様に、TRPA1の過敏化応答を惹起するかを検討した。hTRPA1発現細胞にDMOG(100 μ M)を2時間前処置しておくことにより、H₂O₂(10 μ M)による[Ca²⁺]_i増加は、vehicle処置群と比較して有意に増強された(図9H, I)。このことから、PHD阻害により、TRPA1の過敏化応答が惹起されることが示唆される。

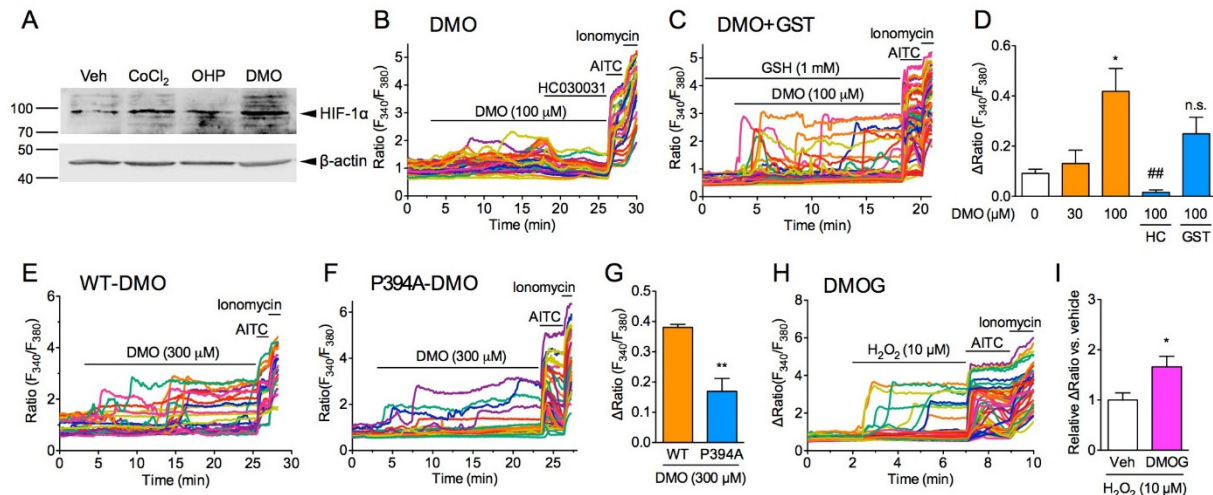


図9. OxalateのPHD抑制作用によるTRPA1活性化およびPHD阻害薬によるTRPA1過敏化応答

(A) HEK293細胞に、CoCl₂(100 μ M)、オキサリプラチン(100 μ M)あるいはDMO(30 μ M)を24時間処置し、HIF-1 α および β -actinに対するwestern blotを行った。(B-D) hTRPA1発現細胞にDMO(30-300 μ M)を処置し、HC030031(100 μ M)あるいは(C)グルタチオン(1 mM)存在下で、[Ca²⁺]_iを測定した。(D) Δ Ratio解析。* P <0.05 vs vehicle (DMO 0), ## P <0.05 vs 100 μ M DMO. n =3-6 (E-G) hTRPA1(WT)あるいはTRPA1 P394AをHEK293細胞に発現させ、DMO(300 μ M)処置時の[Ca²⁺]_iを測定した。** P <0.01 vs WT. n =3-4. (H, I) hTRPA1発現細胞にPHD阻害薬DMOG(100 μ M)を2時間前処置し、H₂O₂(10 μ M)誘発[Ca²⁺]_i増加を測定した。* P <0.05 vs vehicle前処置。 n =4-8

そこで、オキサリプラチンによる TRPA1 過敏化機構を同定するため、機能欠失型変異型 PHD1/2/3 (mutant PHD1/2/3) および Pro³⁹⁴ を変異させた変異型 TRPA1 (TRPA1 P394A) を用いて検討した。HEK293 細胞に hTRPA1 と mock を発現させた細胞においては、オキサリプラチン (100 μ M) の 2 時間前処置により、H₂O₂ 誘発 [Ca²⁺]_i 増加の増強が認められたが、hTRPA1 と mutant PHD1、mutant PHD2 あるいは mutant PHD3 を共発現させた細胞では、オキサリプラチン前処置による TRPA1 過敏化応答は消失した (図 10A-I)。なお、mutant PHD1/2/3 の共発現が、TRPA1 刺激薬 AITC による [Ca²⁺]_i 増加には影

響しないことを確認している (data not shown)。反対に、野生型 PHD2 を過剰発現させることにより、プロリン水酸化を維持しておくことによっても、オキサリプラチン前処置による TRPA1 過敏化応答は消失した (図 10J-L)。また、TRPA1 P394A 発現細胞に、オキサリプラチン (100 μ M) あるいは DMO (30 μ M) を 2 時間前処置しても、いずれも、TRPA1 過敏化応答は認められなかった (図 10M-Q)。なお、高濃度オキサリプラチン (1 mM) 誘発 [Ca²⁺]_i 増加は、変異型 PHD1/2/3 の共発現あるいは TRPA1 P394A でも影響は受けず (data not shown)、高濃度オキサリプラチンによる TRPA1 活性化に、PHD 活性抑制による TRPA1 活性

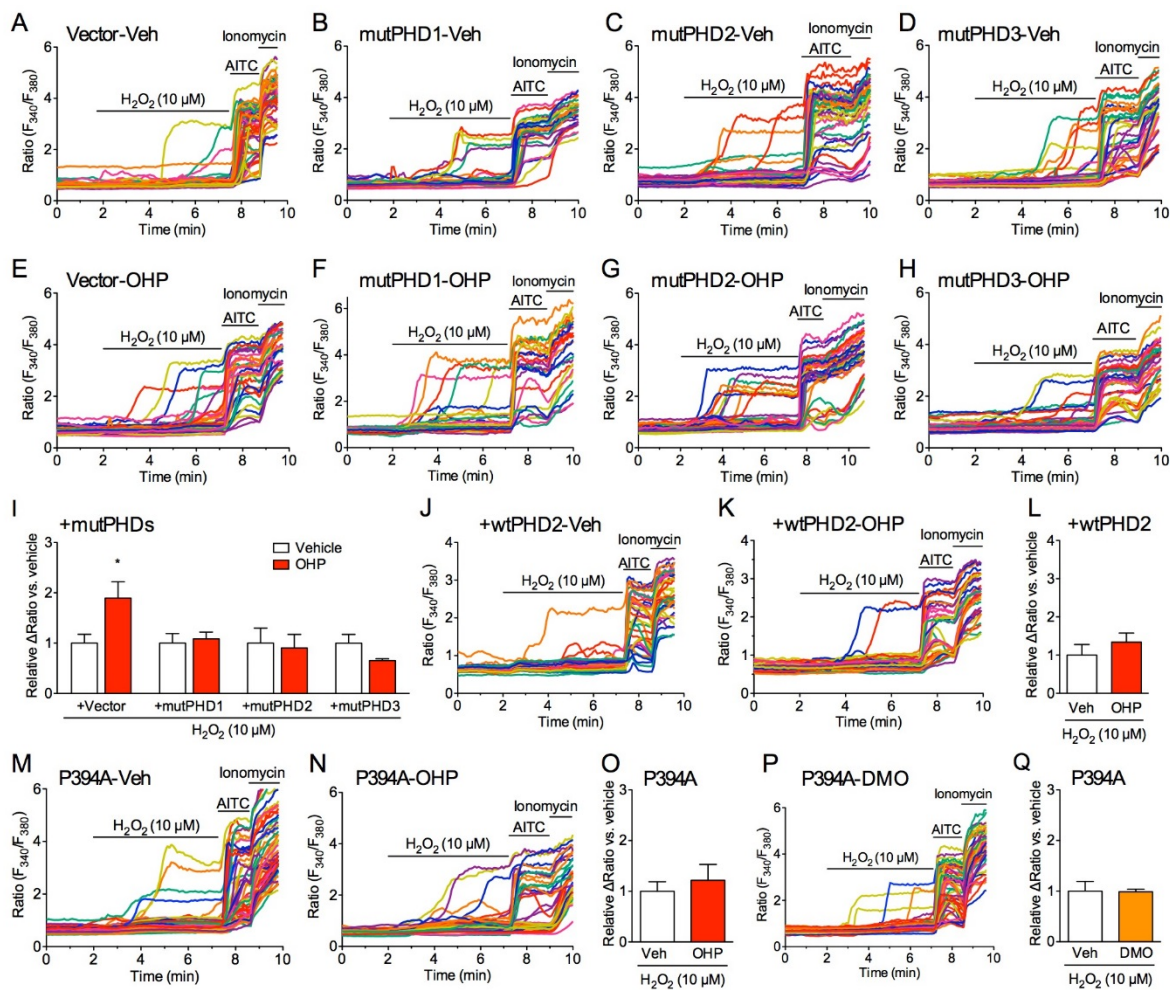


図 10. オキサリプラチンの PHD 抑制作用による TRPA1 過敏化応答

(A-I) hTRPA1 と mock (A, E)、mutant PHD1 (B, F)、mutant PHD2 (C, G) あるいは mutant PHD3 (D, H) を共発現させた細胞に、vehicle (A-D) あるいはオキサリプラチン (E-H; 100 μ M) を前処置し、H₂O₂ 誘発 [Ca²⁺]_i 増加を測定した。(I) Δ Ratio 解析。* P <0.05 vs vehicle. n =5-7 (J-L) hTRPA1 と野生型 PHD2 を共発現させた細胞に、vehicle (J) あるいはオキサリプラチン (K; 100 μ M) を前処置し、H₂O₂ 誘発 [Ca²⁺]_i 増加を測定した。(L) Δ Ratio 解析。 n =7. (M-Q) TRPA1 P394A を発現させた細胞に、vehicle (M)、オキサリプラチン (N; 100 μ M) あるいは DMO (P; 30 μ M) を 2 時間前処置し、H₂O₂ 誘発 [Ca²⁺]_i 増加を測定した。(O, Q) Δ Ratio 解析。 n =5. 4.

化は関与しないものと考えられる。

これらの結果から、オキサリプラチンはその代謝物 oxalate が PHD 活性を抑制し、PHD による TRPA1 N 末端 Pro³⁹⁴ の水酸化が解除された結果、ROS に対する過敏化応答が生じたものと考えられる。

3.9 培養 DRG 神経におけるオキサリプラチンによる TRPA1 過敏化応答

次に、初代培養 DRG 神経を用いて、オキサリプラチンあるいは DMO 前処置による TRPA1 過敏化を検討した。野生型マウスから調製した培養 DRG 神経に、オキサリプラチン(100 μM)あるいは DMO(30 μM)を2時間前処置し、H₂O₂(100 μM)による[Ca²⁺]_i増加を測定した所、vehicle 前処置群では 100 μM の H₂O₂ でも[Ca²⁺]_i増加はほとんど見られなかったのに対し、オキサリプラチンあるいは DMO の前処置により[Ca²⁺]_i増加は有意に増強された(図 11A-D)。一方、TRPA1-KO マウスから調製した培養 DRG 神経に、オキサリプラチン(100 μM)あるいは DMO(30 μM)を2時間前処置しても、H₂O₂(100 μM)による[Ca²⁺]_i増加に有意な変化は認められなかった(図 11E-H)。

3.10 オキサリプラチン前処置による H₂O₂ 誘発疼痛様行動増強に対する TRPA1 過敏応答の関与

これまでの検討により、オキサリプラチンが TRPA1 の ROS に対する過敏化応答を惹起することを見出してきた。そこで最後に、生体マウスにおいて、H₂O₂ の足底内投与によって誘発される疼痛様行動に対してオキサリプラチン前投与が TRPA1 過敏化を介して増強するかを検討した。マウスに、vehicle、オキサリプラチン(5 mg/kg)、DMO(1.7 mg/kg)あるいは Pt(DACH)Cl₂(4.8 mg/kg)を腹腔内投与し、2時間後、H₂O₂(0.5%, 20 μl)を足底内に投与した。その結果、オキサリプラチンあるいは DMO を前投与した群では、vehicle 投与群と比較して、H₂O₂ 誘発疼痛様行動を呈する時間が有意に延長した。一方、Pt(DACH)Cl₂ 前投与群では、H₂O₂ 誘発疼痛様行動を呈する時間に有意な変化は認められなかった。また、オキサリプラチンあるいは DMO による H₂O₂ 誘発疼痛様行動の増強は、TRPA1 阻害薬 HC030031(100 mg/kg)の投与により有意に抑制された(図 12A)。また同様に、PHD 阻害薬 DMOG(400 mg/kg)を腹腔内投与した2時間後、H₂O₂ 誘発疼痛様行

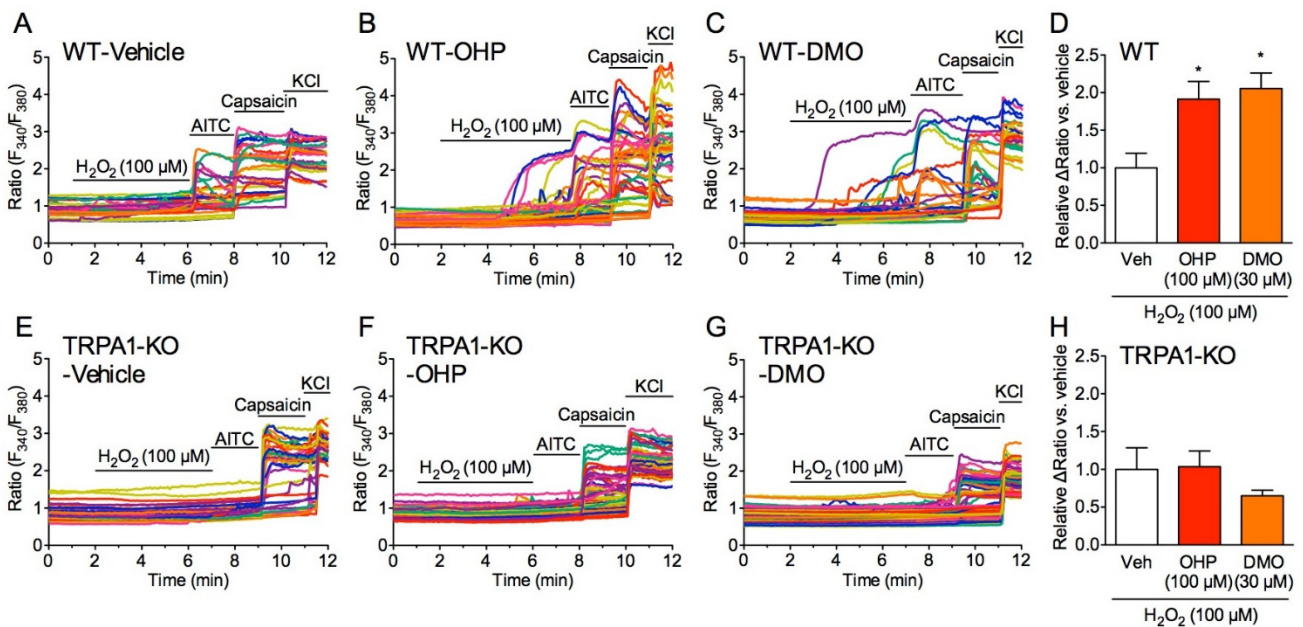


図 11. 初代培養 DRG 神経でのオキサリプラチンあるいは oxalate 前処置による TRPA1 過敏化応答

(A-D)野生型あるいは(E-H)TRPA1-KO マウスから調製した初代培養 DRG 神経に、vehicle (A, E)、オキサリプラチン(B, F; 100 μM)あるいは DMO (C, G; 30 μM)を2時間前処置し、H₂O₂(100 μM)処置による[Ca²⁺]_i増加を測定した。(D, H) ΔRatio 解析。*P<0.05 vs vehicle. n=3-6 (の[Ca²⁺]_iを測定した。n=5-6

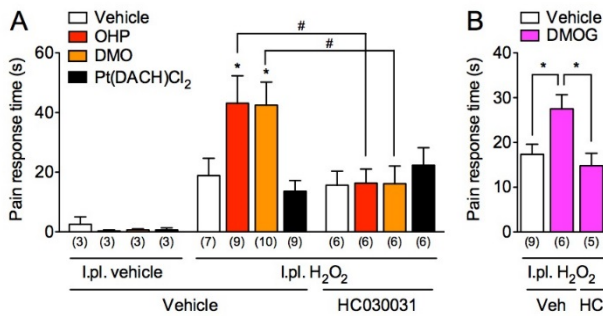


図 12. オキサリプラチン前投与による H₂O₂ 誘発疼痛行動増強効果に PHD 抑制を介した TRPA1 過敏化応答が関与する
マウスに、(A) vehicle、オキサリプラチン (5 mg/kg)、DMO (1.7 mg/kg)、Pt(DACH)Cl₂ (4.8 mg/kg)、あるいは (B) PHD 阻害薬 DMOG (400 mg/kg) を腹腔内投与し、1.5 時間後、vehicle あるいは TRPA1 阻害薬 HC030031 (100 mg/kg) を腹腔内に投与した。その 30 分後、H₂O₂ (0.5%, 20 μl) を足底内に投与し、誘発される疼痛様行動を呈する時間を 5 分間測定した。*P<0.05 vs vehicle. #P<0.05. 括弧内の数字は例数を表している。

動を呈する時間が有意に延長し、この延長は、HC030031 (100 mg/kg) の投与により有意に抑制された (図 12B)。

これらの結果から、生体内においてもオキサリプラチンは oxalate を介して PHD 酵素活性を抑制することで、ROS に対する TRPA1 過敏応答を誘導しうることが明らかとなった。

4. 結 語

本研究結果から、オキサリプラチンは、他の抗がん剤 (シスプラチン、パクリタキセル) と異なり、投与わずか数時間後に冷過敏応答を惹起することを見出した。そのタイムコース、鎮痛薬に対する薬物感受性の違い、臨床でも用いられる Ca 製剤の有効性などから、この行動が疼痛とは一部異なり、オキサリプラチンの急性末梢神経障害に特徴的なしびれ、異常感覚を表現するしびれ様行動である可能性が高い。また、オキサリプラチンによる急性冷過敏応答は、オキサリプラチン特有の代謝物 oxalate が、DRG 神経に発現する TRPA1 を選択的に機能増強した結果、生じるものと考えられた。また、hTRPA1 発現細胞を用いた検討から、高濃度のオキサリプラチンは、おそらくその白金成分によるミトコンドリア障害により産生された ROS が、TRPA1 N 末端のシステイン残基を酸化修飾することにより

TRPA1 を活性化することができるもの⁽¹⁰⁾、臨床では用いられない高濃度であること、同じ白金製剤シスプラチンでも同様の機構で TRPA1 活性化が認められたことから、オキサリプラチン誘発急性末梢神経障害のメカニズムとは考えにくい。一方、hTRPA1 発現細胞に比較的低濃度のオキサリプラチンを前処置することで、ROS に対する TRPA1 の過敏応答が惹起され、この応答は、オキサリプラチンに特有の代謝物 oxalate でも認められること、一方、白金含有代謝物 Pt(DACH)Cl₂ やシスプラチンでは認められないことから、オキサリプラチン誘発急性末梢神経障害の原因である可能性が非常に高い。さらに、この TRPA1 過敏化応答の分子機構として、oxalate による酸素感受性 PHD 活性の抑制、TRPA1 Pro³⁹⁴ の水酸化解除という TRPA1 の低酸素による活性化と同一の機構を介することを明らかとした (図 13)。これらの結果から、TRPA1 はオキサリプラチンというヒトにおいてほぼ全例でしびれを誘発する化学物質のケミカルセンサーとして機能しており、また、しびれ感知のセンサーとしての生理学的意義を有しているものと考えられる。本研究はまた、これまで評価不可能であったしびれ動物モデルを作成しようとしたものでもある。オキサリプラチンによる TRPA1 過敏化が低酸素による TRPA1 活性化と同一の機構を介したものであることは、人が正座などの際に感じる末梢血流障害による虚血時のしびれと同一である可能性を示しており、非常に興味深い。

以上、3 年間の本研究において、本研究助成の目的はほぼ達成することできたと考えている。

5. 今後の課題

本研究では、オキサリプラチンにより ROS (H₂O₂) に対する TRPA1 過敏応答が誘導されることを *in vitro* で明らかにできたが、オキサリプラチン誘発急性末梢神経障害の特徴は冷刺激で誘発されることにある。一方、hTRPA1 の冷感受性については、発見当初より疑問視されており、現在もなおその議論に決着が付いていない。我々は、hTRPA1 は通常状態では確かに冷感受性に乏しいが、予備的検討によりオキサリプラチンを含むある条件下では、TRPA1 が強く冷感受性を示すことを見出しており、今後、TRPA1 の冷感受性獲得機構についてさらに詳細に解析を行っていく予定である。また、今回の検討で、オキサリ

ラチンによる TRPA1 過敏化は、低酸素での TRPA1 活性化と同じ機構を介して誘導されることが明らかとなった。我々は、この知見をもとに、現在、正座後のしびれのモデルともいえるマウス一過性後肢虚血/再灌流モデルを作製し、一定時間の末梢血流障害後、血流を再開することで顕著な自発的なしびれ様行動を検出することに成功している。さらに、予備的検討から、この自発的しびれ様行動に TRPA1 が関与することも見出しており、今後、末梢血流障害による疼痛やしびれにおける TRPA1 の関与や分子機構についても解析していく予定である。

6. 引用文献

1. Quasthoff S, Hartung HP: Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J Neurol* 249: 9-17 (2002)
2. 厚生労働省. 重篤副作用疾患別対応マニュアル 末梢神経障害 (2009)
3. Pasetto LM, D'Andrea MR, Rossi E, Monfardini S: Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why? *Crit Rev Oncol Hematol* 59: 159-168 (2006)
4. Gamelin E, Gamelin L, Bossi L, Quasthoff S: Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures. *Semin Oncol* 29: 21-33 (2002)
5. Smith EM, Pang H, Cirrincione C, Fleishman S, Paskett ED, Ahles T, Bressler LR, Fadul CE, Knox C, Le-Lindqwister N, Gilman PB, Shapiro CL; Alliance for Clinical Trials in Oncology: Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA* 309: 1359-1367 (2013)
6. Jaggi AS, Singh N: Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. *Toxicology* 291: 1-9 (2012)
7. Moran MM, McAlexander MA, Biró T, Szallasi A: Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 10: 601-620 (2011)
8. Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ: Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov* 8: 55-68 (2009)
9. Descoeur J, Pereira V, Pizzoccaro A, Francois A, Ling B, Maffre V, Couette B, Busserolles J, Courteix C, Noel J, Lazdunski M, Eschalier A, Authier N, Bourinet E: Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Mol Med* 3: 266-278 (2011)
10. Nassini R, Gees M, Harrison S, De Siena G, Materazzi S, Moretto N, Failli P, Preti D, Marchetti N, Cavazzini A, Mancini F, Pedretti P, Nilius B, Patacchini R, Geppetti P: Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *Pain* 152: 1621-1631 (2011)
11. Ta LE, Bieber AJ, Carlton SM, Loprinzi CL, Low PA, Windebank AJ: Transient receptor potential vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. *Mol Pain* 6: 15 (2010)
12. Gauchan P, Andoh T, Kato A, Kuraishi Y: Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci Lett* 458: 93-95 (2009)
13. Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A: Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41: 849-857 (2004)
14. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A: ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112: 819-829 (2003)
15. Zhao M, Isami K, Nakamura S, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S: Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. *Mol Pain* 8: 55 (2012)
16. Sakurai M, Egashira N, Kawashiri T, Yano T, Ikesue H, Oishi R: Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat:

- involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. *Pain* 147: 165-174 (2009)
17. Jacobsen D, McMartin KE: Methanol and ethylene glycol poisonings. Mechanism of toxicity, clinical course, diagnosis and treatment. *Med Toxicol* 1: 309-334 (1986)
 18. Grolleau F, Gamelin L, Boisdrion-Celle M, Lapied B, Pelhate M, Gamelin E: A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J Neurophysiol* 85: 2293-2297 (2001)
 19. Gamelin L, Boisdrion-Celle M, Morel A, Poirier AL, Berger V, Gamelin E, Tournigand C, de Gramont A.: Oxaliplatin-related neurotoxicity: interest of calcium-magnesium infusion and no impact on its efficacy. *J Clin Oncol* 26: 1188-1189 (2008)
 20. Grothey A, Nikcevich DA, Sloan JA, Kugler JW, Silberstein PT, Dentchev T, Wender DB, Novotny PJ, Chitale U, Alberts SR, Loprinzi CL: Intravenous calcium and magnesium for oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity in adjuvant colon cancer: NCCTG N04C7. *J Clin Oncol* 29: 421-427 (2011)
 21. Zhao M, Nakamura S, Miyake T, So K, Shirakawa H, Tokuyama S, Narita M, Nakagawa T, Kaneko S: Pharmacological characterization of standard analgesics on oxaliplatin-induced acute cold hypersensitivity in mice. *J Pharmacol Sci* 124: 514-517 (2014)
 22. Karashima Y, Damann N, Prenen J, Talavera K, Segal A, Voets T, Nilius B: Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J Neurosci* 27: 9874-9884 (2007)
 23. Takahashi N, Mizuno Y, Kozai D, Yamamoto S, Kiyonaka S, Shibata T, Uchida K, Mori Y: Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels (Austin)* 2: 1-12 (2008)
 24. Takahashi N, Kuwaki T, Kiyonaka S, Numata T, Kozai D, Mizuno Y, Yamamoto S, Naito S, Knevels E, Carmeliet P, Oga T, Kaneko S, Suga S, Nokami T, Yoshida J, Mori Y.: TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂. *Nat Chem Biol* 7: 701-711 (2011)
 25. Joseph EK, Chen X, Bogen O, Levine JD.: Oxaliplatin acts on IB4-positive nociceptors to induce an oxidative stress-dependent acute painful peripheral neuropathy. *J Pain* 9: 463-472 (2008)
 26. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ: Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468-472 (2001)
7. 論文業績および学会発表
- 原著論文
- 1) Zhao M, Isami K, Nakamura S, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S: Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. *Mol Pain* 8: 55 (2012)
 - 2) Zhao M, Nakamura S, Miyake T, So K, Shirakawa H, Tokuyama S, Narita M, Nakagawa T, Kaneko S: Pharmacological characterization of standard analgesics on oxaliplatin-induced acute cold hypersensitivity in mice. *J Pharmacol Sci* 124: 514-517 (2014)
- 総説・著書
- 1) 中川貴之: "痛み"のバイオロジー 侵害受容器はどこまで分かってきたか? *実験医学* 30, 493-498 (2012)
 - 2) 中川貴之、趙 萌、白川久志、金子周司: オキサリプラチンに特徴的な急性末梢神経障害における TRPA1 の役割. *日本薬理学雑誌* 141: 76-80 (2013)
 - 3) 中川貴之: 痛みの受容機構と新規鎮痛薬創製の可能性. *生化学*, 85: 561-565 (2013)
 - 4) 中川貴之: 抗がん剤による末梢神経障害と TRP チャネル. *産婦人科漢方研究のあゆみ*, in press
- 学会発表
- 1) 中川貴之: 抗がん剤誘発末梢神経障害のメカニズム解

- 明およびその対策に向けた多施設共同研究の可能性.
第6回日本緩和医療薬学会年会、2012.10.6-7(神戸)
- 2) 趙 萌、三宅崇仁、中村彩希、浜野 智、高橋重成、白川久志、中川貴之、森 泰生、金子周司: Involvement of ROS-mediated TRPA1 activation in oxaliplatin-induced acute peripheral neuropathy. *Neuro2013*, 2013.6.20-23(京都)
 - 3) 趙 萌、三宅崇仁、中村彩希、白川久志、中川貴之、金子周司: 抗がん剤オキサリプラチンによるROSを介したTRPA1活性化. 第35回日本疼痛学会、2013.7.12-13(さいたま)
 - 4) 中川貴之: しびれの病態と侵害受容器の最新知見. 和歌山臨床整形外科部会学術講演会、2013.7.18(和歌山)
 - 5) 中川貴之: 活性酸素感受性 TRP チャンネルによる痛みの発生および慢性化機構に関する研究. 生体機能と創薬シンポジウム 2013、2013.8.29-30(福岡)
 - 6) 中川貴之: 抗がん剤による末梢神経障害の発生メカニズムおよびその対策. 第7回日本緩和医療薬学会年会、2013.9.15-16(東京)
 - 7) 中川貴之、趙 萌、宗 可奈子、中村彩希、白川久志、金子周司: しびれの動物モデル開発に向けて. 日本線維筋痛症学会第5回学術集会、2013.10.5-6(横浜)
 - 8) 中村彩希、趙萌、三宅崇仁、白川久志、中川貴之、金子周司: オキサリプラチン誘発急性末梢神経障害におけるTRPA1活性化機構の解明. 第63回日本薬学会近畿支部大会、2013.10.12(京都)
 - 9) Nakagawa T, Zhao M, So K, Miyake T, Nakamura S, Shirakawa H, Kaneko S: Roles of TRPA1 in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. 第5回 Asian Pain Symposium, 2013.12.18-20(岡崎)
 - 10) 中川貴之: Molecular mechanism of acute peripheral neuropathy induced by oxaliplatin. 生体機能と創薬シンポジウム 2014、2014.8.28-29(大阪)
 - 11) 中川貴之: 抗がん剤による末梢神経障害と TRP チャンネル. 第34回産婦人科漢方研究会学術集会、2014.9.7(青森)
 - 12) 中村彩希、趙 萌、三宅崇仁、浜野 智、高橋重成、白川久志、中川貴之、森泰生、金子周司: Involvement of TRPA1 activation through oxidative modification oxaliplatin-induced acute peripheral neuropathy. *Neuroscience* 2014, 2014.9.11-13(横浜)
 - 13) 中川貴之、趙 萌、中村彩希、三宅崇仁、宗可奈子、白川久志、金子周司、松原和夫: オキサリプラチン誘発急性末梢神経障害の発症機構の解析:レドックス感受性 TRPA1 の関与. 第24回日本医療薬学会年会、2014.9.27-28(名古屋)
 - 14) 三宅崇仁、中村彩希、趙 萌、浜野 智、井上圭亮、沼田朋大、高橋重成、白川久志、森 泰生、中川貴之、金子周司: オキサリプラチン誘発急性末梢神経障害における TRPA1 チャンネルの関与. 日本臨床腫瘍薬学会学術大会 2015、2015.3.14-15(京都)
 - 15) 中川貴之、趙 萌、中村彩希、三宅崇仁、白川久志、金子周司、松原和夫: オキサリプラチンによる急性末梢神経障害の発症機構. 日本臨床腫瘍薬学会学術大会 2015、2015.3.14-15(京都)
 - 16) Kaneko S, Nakagawa T: The involvement of TRPA1 in dysesthesia induced by an anticancer drug and transient ischemia. 薬理学会国際サテライトシンポジウム、2014.3.17(名古屋)
 - 17) 三宅崇仁、中村彩希、趙 萌、宗可奈子、浜野 智、井上圭亮、沼田朋大、高橋重成、白川久志、森 泰生、中川貴之、金子周司: TRPA1 チャンネルのオキサリプラチン誘発急性末梢神経障害における役割. 第24回神経行動薬理若手研究者の集い、2015.3.17(名古屋)
 - 18) 中村彩希、三宅崇仁、趙 萌、浜野 智、井上圭亮、高橋重成、沼田朋大、白川久志、森 泰生、中川貴之、金子周司: オキサリプラチン誘発急性末梢神経障害における異なる修飾を介した TRPA1 活性化の関与. 第88回日本薬理学会年会、2015.3.18-20(名古屋)
 - 19) 中川貴之、金子周司: Roles of redox-sensitive TRPA1 in painful peripheral neuropathy induced by chemotherapy. 第92回日本生理学会大会・第120回日本解剖学会全国学術集会、2015.3.21-23(神戸)
 - 20) 三宅崇仁、中村彩希、趙 萌、浜野智、井上圭亮、沼田朋大、高橋重成、白川久志、森 泰生、中川貴之、金子周司: オキサリプラチン誘発急性末梢神経障害における TRPA1 の関与. 日本薬学会第135年会、2015.3.25-28(神戸)

Research on the Roles of TRPA1 in the Cancer Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy

Takayuki Nakagawa ^{1,2}, Shuji Kaneko ², Hisashi Shirakawa ², Yasuo Mori ³

¹Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Kyoto University Hospital

²Department of Molecular Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

³Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

Summary

Oxaliplatin, a platinum-based chemotherapeutic agent, causes an unusual acute peripheral neuropathy triggered by cold in almost all patients during or within hours after its infusion, while its mechanisms are poorly understood. In this study, we examined the involvement of TRPA1, which is expressed mainly in primary sensory neurons and works as a chemical nociceptive sensor. A single i.p. administration of oxaliplatin (5 mg/kg) or its metabolite, oxalate (1.7 mg/kg), into mice induced cold hypersensitivity within 2 h, while other chemotherapeutic agents, cisplatin and paclitaxel, had no effect. The time course and drug sensitivity to analgesics support the possibility that oxaliplatin-induced cold hypersensitivity observed in mice may represent cold-triggered dysesthesia as clinical symptoms of oxaliplatin-induced acute peripheral neuropathy, rather than pain. The oxaliplatin-induced acute cold hypersensitivity was abolished by TRPA1 antagonist or deficiency. In addition, oxaliplatin enhanced the TRPA1-, but not TRPV1- and TRPM8-, mediated nociceptive behaviors, suggesting the involvement of the increased sensitivity of TRPA1. In hTRPA1-expressing cells, oxaliplatin evoked TRPA1 activation through reactive oxygen species (ROS) production and oxidative modification of N-terminal cysteine residues of TRPA1. However, it required a high concentration of oxaliplatin (1 mM) and cisplatin, another platinum-based agent, also evoked TRPA1 activation, suggesting other mechanisms should underlie acute peripheral neuropathy peculiar to oxaliplatin. To further explore the mechanism of oxaliplatin-induced TRPA1 sensitization, we found pretreatment with relatively-low concentration of oxaliplatin (100 μ M) or a membrane-permeable oxalate analog, dimethyl oxalate (30 μ M) increased the H₂O₂-evoked TRPA1-activation in cultured dorsal root ganglion (DRG) neurons and hTRPA1-expressing HEK293 cells, while a platinum-metabolite, Pt(DACH)Cl₂ (30 μ M) and cisplatin (100 μ M) had no effect. Furthermore, we found that oxaliplatin or oxalate induced TRPA1 sensitization by inhibition of prolyl hydroxylase (PHD)-mediated hydroxylation of a N-terminal proline residue (Pro³⁹⁴) in TRPA1, which is the same mechanism to hypoxia-induced TRPA1 activation. These results suggest that TRPA1 is a chemical sensor to oxaliplatin, which certainly produces dysesthesia as an acute peripheral neuropathy.

将来展望

富永 真琴

プロジェクトリーダー

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター教授

今回のプロジェクト研究は、細胞内への Ca^{2+} は流入経路として注目を浴びる TRP チャンネルに焦点をあてた。TRP チャンネルの多くがセンサー機能を持つことから、感覚制御の側面から TRP チャンネルは格好の創薬標的になると考えられる。また、TRP チャンネル機能異常は多くのチャンネル病を引き起こし、多くの後天的疾患や癌の発生において TRP チャンネルが重要な役割を果たしていることが明らかにされ、阻害薬あるいは刺激薬の有用性が大いに期待されている。ここ数年、低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析から、いくつかの温度感受性 TRP チャンネルの原子レベルでの構造が明らかにされており、創薬研究が促進されるものと思われる。

1989 年に *trp* 遺伝子が報告されてから 27 年、世界中の研究者がこの「非選択性陽イオンチャンネル」の

解析を進め、多くのことが明らかになってきた。しかし、 Ca^{2+} 透過性の高い「非選択性陽イオンチャンネル」は非常に多くの細胞機能に関わると想像され、まだ、ほんの少ししか明らかにされていない。1 日も早い全容解明が望まれる。そして、TRP チャンネルを制御することが、細胞機能、組織機能を、ひいては個体機能を制御することにつながるということが理解され、原子レベルでの構造解明の上に TRP チャンネルを標的とした薬剤が開発されることが期待される。TRP チャンネルと疾患との関連ももっと研究されて行くであろう。しかし、TRPV1、TRPA1 の構造が解かれた今でも、どのようにして温度刺激がチャンネル開口をもたらすかは明らかでなく、温度等の物理刺激によって TRP チャンネルが開口するダイナミックな構造解析技術の開発が大いに望まれる。

Perspective

Makoto Tominaga

Project Leader

Professor, Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institute of Natural Sciences

This project focused on the TRP channels which attract a lot of attention as a Ca^{2+} influx pathway in cells. Because many TRP channels have sensor function, they could be promising targets for drug development which could manipulate sensory functions. In addition, it is known that dysfunction of TRP channels causes various diseases (channelopathy) and that TRP channels play pivotal roles in many acquired diseases and cancer development. The facts promise the usefulness of their inhibitors and activators. Furthermore, structures of some TRP channels at an atomic level have been clarified using a single-particle analysis with CryoEM in last few years.

Researchers all over the world have analyzed these ‘non-selective cation channels’ and made great achievements for 27 years since the initial report of a *trp* gene in 1989. However, there are much more things to be clarified since it is believed that ‘non-selective cation channels’ with high Ca^{2+} permeability are involved in many cell functions. Therefore, it is well expected that regulation of TRP channel functions leads to the functional modulation of cells, organs and even whole bodies, and that medicines targeting TRP channels would be developed based on their clarified structures. Relation between TRP channels and diseases would be investigated more. However, it is still not known how temperature opens the TRP channels. Development of techniques for dynamic structure-function analyses of TRP channels activated by physical stimuli such as temperature is definitely desired very much in the near future.

プロジェクト助成研究報告書 (医学)
Project Research Report (Medical Science)

平成28年3月
March, 2016

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団
The Salt Science Research Foundation

〒106-0032 東京都港区六本木7-15-14 塩業ビル
Engyo Bldg. 7-15-14 Roppongi, Minatoku, Tokyo 106-0032, Japan

Tel. 03-3497-5711 Fax. 03-3497-5712
URL <http://www.saltscience.or.jp>

I S B N 9 7 8 - 4 - 9 0 2 1 9 2 - 4 3 - 8

助成研究報告書

医学プロジェクト研究(2012-2014)

センサーとしての Ca^{2+} 透過性チャネルの制御機構とその生理学的意義

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団