

非選択的カチオンチャネルとしてのバニロイド受容体の
生体機能と分布の解析

(課題番号 15590056)

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）
研究成果報告書

平成 17 年 3 月

研究代表者 堀 江 俊 治
(千葉大学大学院薬学研究院)

はしがき

細胞がその生理機能を発揮するためには、多くの場合、細胞内に Ca^{2+} が流入することが引き金となっている。この Ca^{2+} 流入はニフェジピンなどの電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル遮断薬（ Ca^{2+} 拮抗薬）によって抑制される。しかし、生体反応においては、 Ca^{2+} 拮抗薬では抑制できない Ca^{2+} 流入の存在が報告されている。この Ca^{2+} 流入は、 La^{3+} などの無機 Ca^{2+} チャネル遮断薬により抑制されることから、 Ca^{2+} 拮抗薬抵抗性の Ca^{2+} チャネルを介すると一応の結論が付けられているが、その経路の実体は不明確のままにされていた。さらに、その現象の生理学的意義に関してはほとんど手が付けられていない。

このような背景から、私はこれまでに Ca^{2+} 拮抗薬抵抗性 Ca^{2+} 流入経路としての非選択的カチオンチャネルを研究してきた。当該研究では Ca^{2+} 拮抗薬抵抗性 Ca^{2+} 流入経路の1つの候補として、非選択性カチオンチャネルと構造類似性が報告されたバニロイド受容体TRPV1（VR1）に着目した。バニロイド受容体TRPV1とは唐辛子成分カプサイシンの生体内作用点で、非選択的カチオンチャネルを内蔵する受容体である。この受容体の生理機能として、熱と酸による痛みの知覚伝達に重要な役割を持っていることがわかってきている。

本研究では、まず、培養細胞における Ca^{2+} 拮抗薬抵抗性 Ca^{2+} 流入を検出し、その経路としてTRPV1が関与しているかを遮断薬を用いて検討した。さらに、その Ca^{2+} 流入がどのように細胞機能に結びついているかを検討した。次に、 Ca^{2+} 拮抗薬抵抗性 Ca^{2+} 流入が生体においてどのような役割を担っているかについて解明するために、動物個体レベル、あるいは臓器レベルで、その局在と機能について検討した。これら一連の検討により得られた成果を学術誌に投稿し、掲載された論文を本冊子にまとめた。

研究組織

研究代表者： 堀江俊治 （千葉大学大学院薬学研究院 助教授）

交付決定額（配分額）（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合 計
平成15年度	2 2 0 0	0	2 2 0 0
平成16年度	1 4 0 0	0	1 4 0 0
総 計	3 6 0 0	0	3 6 0 0

研究発表

(1) 学会誌等

1. Someya, A., Horie, S., Yamamoto, H., Murayama, T.: Modification of capsaicin-sensitive neurons in isolated guinea-pig ileum by [6]-gingerol and lafutidine. *J. Pharmacol. Sci.*, 92(4), 359-366 (2003)
2. Shimma, A., Akiyama, N., Umezawa, M., Okuma, Y., Nomura, Y., Saito, T., Horie, S., Murayama, T.: Possible role of interleukin-6 in PC12 cell death induced by MPP⁺ and tetrahydroisoquinoline. *J. Pharmacol. Sci.*, 93 (4), 471-477 (2003)
3. Horie, S., Yasuda S., Tsurumaki Y., Someya A., Saito T., Okuma Y., Nomura Y., Hirabayashi T., Murayama, T.: Contraction of isolated guinea-pig ileum by urotensin II via activation of ganglionic cholinergic neurons and acetylcholine release. *Neuropharmacology*, 45 (7), 1019-1027 (2003)
4. Hasebe K, Horie S, Yano S, Watanabe K.: Stimulatory effects of nitric oxide donors on histamine release in isolated rat gastric mucosal cells. *Biol Pharm Bull.* 26 (7): 950-3 (2003).
5. Minowa, S., Ishihara, S., Tsuchiya, S., Horie, S., Watanabe, K., Murayama, T.: Involvement of glutamate and γ -amino-butyric acid receptor systems on gastric acid secretion induced by activation of κ -opioid receptors in the central nervous system in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 138 (6): 1049-1058 (2003).
6. Nemoto, T., Shimma, N., Horie, S., Saito, T., Okuma, Y., Nomura, Y., Murayama, T.: Involvement of the system L amino acid transporter on uptake of S-nitroso-L-cysteine, an endogenous S-nitrosothiol, in PC12 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 458 (1-2), 17-24 (2003)
7. Horie, S., Yamamoto, H., Michael, G.J., Uchida, M., Belai, A., Watanabe, K., Priestley, J.V., Murayama, T.: Protective role of vanilloid receptor type 1 in HCl-induced gastric mucosal lesions in rats. *Scand. J. Gastroenterol.*, 39 (4), 303-312 (2004)
8. Someya, A., Kunieda, K., Akiyama, N., Horie, S., Murayama, T.: Expression of vanilloid VR1 receptor in PC12 cells. *Neurochem. Int.*, 45 (7), 1005-1010 (2004)

9. Minowa, S., Tsuchiya, S., Someya, A., Horie, S., Murayama T.: Role of neuropeptides receptor systems on vanilloid VR1 receptor-mediated gastric acid secretion in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 486 (3), 317-324 (2004)
10. Matsumoto, K., Horie, S., Ishikawa, H., Takayama, H., Aimi, N., Ponglux, P., Watanabe, K.: Antinociceptive effect of 7-hydroxymitragynine in mice: Discovery of an orally active opioid analgesic from Thai medicinal herb *Mitragyna speciosa*. *Life Sci.*, 74 (17), 2143-2155 (2004)
11. Ogura, J., Mitamura, M., Someya, A., Shimamura, K., Takayama, H., Aimi, N., Horie, S., Murayama, T.: Mesaconitine-induced relaxation in rat aorta: role of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers in endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 483 (2-3), 139-146 (2004)
12. Nakamura, H., Takashiro, Y., Hirabayashi, T., Horie, S., Koide, Y., Nishida, A., Murayama, T.: Effects of synthetic sphingosine-1-phosphate analogs on arachidonic acid metabolism and cell death. *Biochem. Pharmacol.* 68(11), 2187-2196 (2004)
13. Kato, Y., Fukamachi, H., Takano-Maruyama, M., Aoe, T., Murahashi, Y., Horie, S., Suzuki, Y., Saito, Y., Koseki, H., Ohno, H.: Reduction of SNAP25 in acid secretion defect of *Foxl1*^{-/-} gastric parietal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320 (3), 766-772 (2004)
14. Watanabe N, Horie S, Michael GJ, Spina D, Page CP, Priestley JV.: Immunohistochemical localization of vanilloid receptor subtype 1 (TRPV1) in the guinea pig respiratory system. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 18(3), 187-197 (2005)
15. Kunieda K, Someya A, Horie S, Ajioka H, Murayama T.: Lafutidine-induced increase in intracellular Ca^{2+} concentrations in PC12 and endothelial cells. *J Pharmacol Sci.*, 97(1), 67-74 (2005)
16. Akiyama, N., Shimma, N., Takashiro, Y., Hatori, Y., Hirabayashi, T., Horie, S., Saito T., Murayama, T.: Decrease in cytosolic phospholipase A_2 mRNA levels by reactive oxygen species via MAP kinase pathways in PC12 cells: effects of dopaminergic neurotoxins. *Cell Signal.*, 17(5), 597-604 (2005)
17. Horie, S., Tsurumaki Y., Someya A., Hirabayashi T., Saito T., Okuma Y., Nomura Y., Murayama, T.: Involvement of cyclooxygenase-dependent pathway in contraction of isolated ileum by urotensin II. *Peptides*, 26 (2), 323-329 (2005)

18. Matsumoto, K., Horie, S., Takayama, H., Ishikawa, H., Aimi, N., Ponglux, D., Murayama, T., Watanabe, K.: Antinociception, tolerance and withdrawal symptoms induced by 7-hydroxymitragynine, an alkaloid from the Thai medicinal herb *Mitragyna speciosa*. Life Sci., in press
19. Horie, S., Koyama, H., Takayama, F., Ishikawa, H., Aimi, N., Ponglux, P., Matsumoto, K., Murayama, T.: Indole alkaloids of a Thai medicinal herb, *Mitragyna speciosa*, that has opioid agonistic effect in guinea-pig ileum. Planta Med., in press (2005)
20. Minowa, S., Ishihara, S., Tsuchiya, S., Horie, S., Murayama T.: Capsaicin- and anandamide-induced gastric acid secretion via vanilloid receptor type 1 (TRPV1) in rat brain. Brain Res., in press (2005)

(2) 口頭発表

1. 嶋村健, 堀江俊治, 村山俊彦: ヒト臍帯静脈内皮細胞におけるスフィンゴシン 1-リン酸による細胞接着分子の発現機構およびヒスタミンの増強作用の解析. 第 76 回日本薬理学会年会 (福岡、2003 年 3 月)
2. 大澤敬子, 平林哲也, 堀江俊治, 村山俊彦: 培養神経細胞 PC12 細胞における sPLA2 活性の存在と SH 基修飾試薬による活性調節. 日本薬学会第 123 年会 (長崎、2003 年 3 月)
3. 小山史, 堀江俊治, 土屋静子, 石川勇人, 高山廣光, 相見則郎, Dhavadee Ponglux, 村山俊彦: タイ国伝承民間薬 *Mitragyna speciosa* 含有アルカロイド誘導体 7-hydroxycorynantheidine のオピオイド活性. 日本薬学会第 123 年会 (長崎、2003 年 3 月)
4. 弦巻結美, 安田里子, 堀江俊治, 村山俊彦: モルモット摘出腸管における Urotensin II の平滑筋収縮機序. 日本薬学会第 123 年会 (長崎、2003 年 3 月)
5. 染谷晃好, 国枝佳奈, 平林哲也, 堀江俊治, 村山俊彦: Expression of vanilloid receptor (VR1) in PC12 cells. 第 46 回日本神経化学会・第 41 回日本生物物理学会合同年会 (新潟、2003 年 9 月)
6. 石川勇人, 高山廣光, 栗原美香, 北島満里子, 相見則郎, 松本健次郎, 小山史, 村山

俊彦, 堀江俊治, Davadee Ponglux : タイ, マレーシア伝承薬物 *Mitragyna speciosa* 含有鎮痛性インドールアルカロイドに関する医薬化学的研究. 第 45 回天然有機化合物討論会 (京都、2003 年 10 月)

7. 国枝佳奈, 染谷晃好, 平林哲也, 堀江俊治, 村山俊彦 : 培養神経細胞 PC12 細胞におけるラフチジンによる細胞内カルシウム濃度に対する作用. 第 109 回日本薬理学会関東部会 (東京、2003 年 10 月)
8. 渡邊直人, 堀江俊治, Domenico Spina, 牧野莊平, John V. Priestley, Clive P. Page : 気道におけるバニロイド受容体 (VR1) の分布について. 第 53 回日本アレルギー学会総会 (岐阜、2003 年 10 月)
9. 渡邊直人, 堀江俊治, Domenico Spina, 牧野莊平, 福田健, John V. Priestley, Clive P. Page : 気道におけるバニロイド受容体 (VR1 神経) と CGRP や substance P との関係. 第 53 回日本アレルギー学会総会 (岐阜、2003 年 10 月)
10. Yasutaka Kato, Hiroshi Fukamachi, Masamitsu Suzuki, Tomohiko Aoe, Syunji Horie, Yasuo Suzuki, Yasushi Saito, Kazuo Watanabe, Haruhiko Koseki, Hiroshi Ohno: Molecular basis for the impairment of acid secretion by parietal cells in Foxl1 KO mice. 第 76 回日本生化学会大会 (横浜、2003 年 10 月)
11. 秋山展輝, 平林哲也, 堀江俊治, 村山俊彦 : 培養神経細胞 PC12 における SOD 阻害薬を用いた酸化ストレスによる cytosolic PLA2 の発現上昇とその機構. ファーマバイオフォーラム 2003 (京都、2003 年 11 月)
12. Hiromitsu Takayama, Hayato Ishikawa, Mika Kurihara, Mariko Kitajima, Norio Aimi, Fumi Koyama, Toshihiko Murayama, Syunji Horie, Dhavadee Ponglux, Ikram M. Said : Chemical and Pharmaceutical Studies on the Analgesic Indole Alkaloids from the Thai and Malaysian Medical Plant, *Mitragyna speciosa*. The Sixth JSPS-NRCT Joint Seminar Recent Advances in Natural Medicine Research. (Bangkok, Thailand, December, 2003)
13. 堀江俊治, 駒坂翠, 村山俊彦 : マウス摘出胃標本におけるバニロイド受容体 VR1 を介する胃酸分泌抑制機構. 第 77 回日本薬理学会年会 (大阪、2004 年 3 月)
14. Yasutaka Kato, Hiroshi Fukamachi, Masamitsu Suzuki, Tomohiko Aoe, Syunji Horie, Tatsuro Katsuno, Yasushi Saito, Kazuo Watanabe, Haruhiko Koseki, Hiroshi Ohno: Molecular basis

for the impairment of acid secretion by parietal cells in Foxl1 KO mice. The 99th American Gastroenterological Association (New Orleans, USA, May, 2004)

15. 渡邊直人、堀江俊治、Domenico Spina、Greg Michael、牧野莊平、福田健、John V. Priestley、Clive P. Page : カプサイシン前処置による気道におけるバニロイド受容体 (VR1) の分布変化. 第 16 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (前橋、2004 年 5 月)
16. 渡邊直人、堀江俊治、Domenico Spina、Gregory Michael、牧野莊平、福田健、John V. Priestley、Clive P. Page : カプサイシン前処置による気道における CGRP および substance P 神経の分布変化. 第 16 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (前橋、2004 年 5 月)
17. 堀江俊治、村山俊彦 : 唐辛子と生姜成分のバニロイド受容体 TRPV1 を介する胃粘膜保護作用. 第 21 回和漢医薬学会大会 (富山、2004 年 8 月)
18. 堀江俊治 : 新しい薬理コンセプトによる天然薬物の薬効解明 : トウガラシと生姜成分のターゲットとしてのバニロイド受容体. 平成 16 年度東洋医学会千葉県部会 (千葉、2004 年 10 月)
19. 堀江俊治、村山俊彦 : 附子アルカロイドの血管弛緩作用 : 内皮由来 NO ラジカルと過分極因子の関与. 東洋医学会第 61 回関東甲信越支部総会 (つくば、2004 年 11 月)
20. Naoto Watanabe, Domenico Spina, Syunji Horie, Gregory J. Michael, Clive P. Page, and John V. Priestley: Immunohistochemical localization of vanilloid receptor subtype 1 (TRPV1) in the guinea pig respiratory system. European Respiratory Society Annual Congress 2004 (Glasgow, UK, September, 2004)
21. 渡邊直人、堀江俊治、Domenico Spina、牧野莊平、福田健、John V. Priestley、Clive P. Page: 気管におけるバニロイド受容体 (VR1 神経) とコリン作動性神経との関係. 第 54 回日本アレルギー学会総会 (横浜、2004 年 11 月)
22. 渡邊直人、堀江俊治、Domenico Spina、牧野莊平、福田健、John V. Priestley、Clive P. Page: 肺におけるバニロイド受容体 (VR1 神経) とコリン作動性神経との関係. 第 54 回日本アレルギー学会総会 (横浜、2004 年 11 月)
23. 堀江俊治、John V. Priestley、村山俊彦 : ラット胃におけるバニロイド受容体 TRPV1 神経の分布 : CGRP およびサブスタンス P との共存. 第 32 回実験潰瘍学会 (大津、2004

年 11 月)

24. Syunji Horie, John V. Priestley, Toshihiko Murayama: Mechanism involved in the inhibition of gastric acid secretion by stimulation of vanilloid receptor TRPV1 in isolated mouse stomach. Advances in GI Pharmacology (Otsu, Japan, November, November, 2004)
25. Syunji Horie, John V. Priestley, Toshihiko Murayama: Immunohistochemical localization of vanilloid receptor TRPV1 in rat stomach: relationship to neuropeptides. Advances in GI Pharmacology (Otsu, Japan, November, November, 2004)
26. Syunji Horie, Emi Kurosawa, Toshihiko Murayama: Contraction of guinea-pig ileum by urotensin II via acetylcholine and prostaglandin release. The 2nd Pfizer Science and Research Symposium (Nagoya, Japan, November, 2004)

研究成果による工業所有権の出願・取得状況 該当なし

研究成果

バニロイド受容体 TRPV1 および非選択的カチオンチャネルの生理的役割の解明は分子レベル、細胞レベルの研究が主流である。しかし、生体における機能解明のためにはさらにマクロな摘出臓器レベル、動物個体レベルでの研究が必要である。本研究は培養細胞実験系に加えて、動物個体を使用する実験系を用い検討を行った。機能を検討する実験では、TRPV1 を刺激するツールとして、唐辛子成分カプサイシンを用いた。バニロイド受容体作用薬の作用部位についても併せて検討した。当研究の成果の概略を下記にまとめた。

(1) 培養末梢神経モデル細胞 PC12 における TRPV1 の存在と機能

ラット副腎褐色細胞種由来 PC12 細胞を用いて、TRPV1 を介する細胞内 Ca^{2+} 動員機構とその生理機能を検討した。その結果、PC12 細胞にはバニロイド受容体 TRPV1 の mRNA およびタンパクが発現していることが明らかとなった。また、免疫細胞化学的手法により TRPV1 の局在を検討したところ、この受容体は主に細胞膜、あるいはその付近に発現していることがわかった。カプサイシンで PC12 細胞を刺激すると細胞外からの Ca^{2+} 流入が認められ、これはバニロイド受容体遮断薬の前処置により消失した。また、この刺激によりアラキドン酸やプロスタグランジンが遊離されることを観察した。カプサイシン感受性知覚神経を賦活化する作用も有する H_2 遮断薬ラフチジンの作用を検討したところ、 Ca^{2+} 拮抗薬抵抗性 Ca^{2+} 流入を引き起こした。これはラフチジンがストア作動性 Ca^{2+} チャネルを活性化するためであった。これらの結果より、PC12 細胞において、 Ca^{2+} 拮抗薬抵抗性 Ca^{2+} 流入経路のひとつとして TRPV1 が存在し、刺激によりこれを介して細胞外から Ca^{2+} が流入すると神経伝達物質遊離が惹起されることが明らかとなった。

(2) 摘出消化管標本における消化管運動亢進作用

摘出消化管標本を用いて TRPV1 の生理学的役割を検討した。モルモット摘出回腸標本において、カプサイシンはコリン作動性神経を介した一過性平滑筋収縮を引き起こした。また、バニロイド受容体関連薬であるレジニフェラトキシン、アナンダマイドも回腸を収縮させた。一方、ラフチジンおよび低濃度[6]-ジングロール (3~300 nM) は腸管収縮を引き起こさなかったが、カプサイシンの回腸収縮作用を増大させた。この反応はバニロイド受容体拮抗薬の前処置により完全に消失した。

マウス摘出下部消化管標本において、カプサイシンの平滑筋張力に対する作用について検討を行った。近位・横行・遠位結腸、直腸の各部位によって、カプサイシンによる収縮反応は異なっていた。近位、横行結腸では、投与直後に一過性の弛緩と収縮反応が観察された。一方、遠位結腸、直腸では、その一過性反応に加えて、持続性の収縮反応が認められた。TRPV1 受容体拮抗薬を用いた検討から、これらの反応は TRPV1 を介することがわかった。本検討により、生理学的条件下において TRPV1 が発現して

いる知覚神経は消化管ぜん動運動を亢進する役割を担っており、下部消化管の部位特異的にその反応が異なることが示唆された。

(3) ラット胃損傷・潰瘍モデルにおける胃粘膜保護作用

ラット胃損傷・潰瘍モデルを用いて、TRPV1 の生理学的役割を検討した。カプサイシンは、胃体部損傷、幽門洞潰瘍の形成を抑制した。また、TRPV1 を刺激するレジニフェラトキシン、ラフチジン、および[6]-ジングロールも塩酸誘起胃損傷形成を抑制した。これらの胃粘膜保護作用は TRPV1 遮断薬の前処置により抑制された。バニロイド受容体遮断薬前処置、あるいは、カプサイシン感受性神経の除神経処置は胃幽門洞部の潰瘍を悪化させた。これらのことより、胃粘膜壊死惹起時において、TRPV1 は胃保護的に働いていることが明らかとなった。

(4) 麻酔下ラット胃内灌流標本における中枢神経性胃酸分泌亢進作用

麻酔下ラット胃内灌流標本を用いて、TRPV1 の生理学的役割を検討した。カプサイシンおよび内在性生理活性物質アナンダマイドの脳室内投与による胃酸分泌に対する作用を検討したところ、カプサイシンおよびアナンダマイドは中枢の TRPV1 を介して胃酸分泌を亢進させることが明らかとなった。また、この経路に、ニューロキニン、CGRP などの神経ペプチドを含む神経ペプチド性神経系が介在し、またその下流にグルタミン酸—GABA 神経系が介在することを見いだした。

(5) 免疫染色による消化管 TRPV1 受容体の分布

ラット胃の凍結切片を作成し、TRPV1 神経を免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて検鏡した。胃切片において、TRPV1 神経線維は胃粘膜層、平滑筋層、内在神経叢などすべての層で認められ、中でも粘膜下の血管周囲と筋間神経叢に豊富に存在していた。その神経は神経ペプチド CGRP、サブスタンス P を両方含む外来性知覚神経であることが示唆された。これまでの生理学的研究により消化管における TRPV1 の役割は報告されていたが、免疫組織化学手法を用いた本検討により、直接的にその分布と含有神経伝達物質を明らかにできた。

(6) Ca^{2+} 拮抗薬抵抗性 Ca^{2+} 流入に作用する天然薬物成分の探索

Ca^{2+} 拮抗薬抵抗性 Ca^{2+} 流入を刺激して生体機能を改善する医薬品の開発を目指して、和漢薬、伝承民間薬成分の中から、 Ca^{2+} 拮抗薬抵抗性 Ca^{2+} 流入に作用する天然化合物の検索を行った。その結果、附子アルカロイド・メサコニチンは血管内皮細胞の非選択的カチオンチャネルに作用して、 Ca^{2+} 流入を引き起こすことを明らかにした。さらに、ラット摘出胸部大動脈標本において、 Ca^{2+} 流入により内皮細胞から一酸化窒素が遊離することを見いだした。

回腸標本におけるカプサイシンの収縮反応を用いて、TRPV1 受容体アゴニスト活性を簡

便に検出する方法を確立した。その系を用いて、カプサイシン感受性知覚神経を活性化させることが知られているレジニフェラトキシン、phorbol 12-phenylacetate 13-acetate 20-homovanillate (PPAHV)およびスクチゲラルの作用を検討し、それぞれに効力の差はあるが TRPV1 アゴニスト活性が認められた。また、生姜辛味成分ジンゲロールは壁内神経叢 TRPV1 受容体活性を変化させて、消化管運動を亢進させることを明らかにした。

本検討により、 Ca^{2+} 拮抗薬抵抗性 Ca^{2+} 流入にひとつとしてバニロイド受容体 TRPV1 が存在しており、これが Ca^{2+} 流入を介して様々な生体機能を発揮することを見いだした。TRPV1 の発現分布が消化管知覚神経系であることから、今後は、ストレス性胃腸障害時におけるこれら受容体の発現変化、機能変化について検討していきたいと考えている。