

侵害刺激受容に係わる transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) 及び transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) の活性化, 制御メカニズム

富永真琴

Activation and Regulation of Nociceptive Transient Receptor Potential (TRP) Channels, TRPV1 and TRPA1

Makoto TOMINAGA

Division of Cell Signaling, Okazaki Institute for Integrative Bioscience (National Institute for Physiological Sciences), National Institutes of Natural Sciences, Higashiyama 5-1, Myodaiji, Okazaki 444-8787, Japan

(Received August 31, 2009)

TRP channels are well recognized for their contributions to sensory transduction, responding to a wide variety of stimuli including temperature, nociceptive stimuli, touch, osmolarity and pheromones. In particular, the involvement of TRP channels in nociception has been extensively studied following the cloning of the capsaicin receptor, TRPV1. Painful diabetic peripheral neuropathy is described as a superficial burning pain, and it is one of the most commonly encountered neuropathic pain syndromes in clinical practice. We found that hypoxic and high glucose conditions commonly observed in diabetes potentiate TRPV1 activity without affecting TRPV1 expression both in native rat sensory neurons and HEK293 cells expressing rat TRPV1. The potentiation seems to be caused by phosphorylation of the serine residues of TRPV1 by PKC. These data indicate that PKC-dependent potentiation of TRPV1 activities under hypoxia and hyperglycemia might be involved in early diabetic neuropathy. Mechanisms for the detection of alkaline pH by sensory neurons are not well understood, although it is well accepted that acidic pH monitoring can be attributed to several ion channels, including TRPV1 and ASICs. We found that alkaline pH activates TRPA1 and that the TRPA1 activation is involved in nociception, using Ca^{2+} -imaging and patch-clamp methods. In addition, intracellular alkalinization activated TRPA1 at the whole-cell level, and single-channel openings were observed in the inside-out configuration. Furthermore, intraplantar injection of ammonium chloride into the mouse hind paw caused pain-related behaviors, which were not observed in TRPA1-deficient mice. These results suggest that alkaline pH causes pain sensation through activation of TRPA1.

Key words—nociception; transient receptor potential V1; transient receptor potential A1

1. はじめに

痛みを惹起する侵害刺激は、温度刺激（熱刺激と冷刺激）、化学刺激、機械刺激に大きく分けられ、侵害刺激を受容する陽イオンチャンネルが報告されている。侵害刺激によって陽イオンが細胞内に流入し、神経細胞を脱分極させて電位作動性 Na^+ チャンネルの活性化から活動電位の発生をもたらすのである (Fig. 1)。侵害刺激を受容する陽イオンチャンネルの多くは、TRP (Transient Receptor Potential)

スーパーファミリーに属する。¹⁾ TRP チャンネルは1つのサブユニットが6回の膜貫通領域を有する Ca^{2+} 透過性の高いチャンネルであり、TRP スーパーファミリーは哺乳類では大きく TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPP, TRPA の6つのサブファミリーに分けられている。そのうち、TRPV, TRPM, TRPA のサブファミリーに属する TRPV1, TRPV2, TRPM8, TRPA1 は感覚神経細胞での発現が強く、侵害刺激受容又は痛覚の軽減に係わっていると考えられている。

2. カプサイシン受容体 TRPV1

トウガラシの主成分であるカプサイシンは辛みとともに痛みを惹起する。発現クローニング法を用いて1997年に単離されたカプサイシン受容体は、当

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター (生理学研究所) 細胞生理研究部門 (〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町東山 5-1)

e-mail: tominaga@nips.ac.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウム S18 で発表したものを中心に記述したものである。

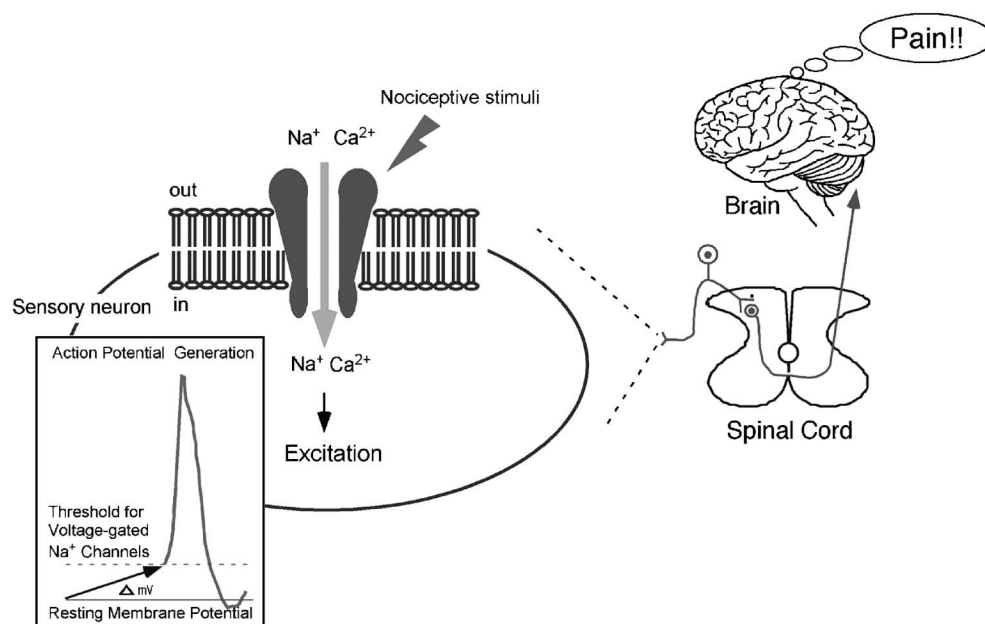


Fig. 1. Mechanisms for Pain Sensation from the Detection of Nociceptive Stimuli

Cation influx through the channels at sensory nerve endings causes depolarization necessary for action potential generation, then the nociceptive information can be transmitted to the brain where we feel pain sensation.

初 vanilloid receptor subtype 1 (VR1) と命名された²⁾が、現在では、TRP スーパーファミリーの中の TRPV サブファミリーの最初の分子として TRPV1 と呼ばれている。TRPV1 遺伝子は感覚神経（後根神経節細胞及び三叉神経節細胞）の中の無髄の C 線維に特異的に発現していることが明らかとなり、特異的抗体を用いた解析から TRPV1 タンパク質は後根神経節細胞、三叉神経節細胞及び自律神経求心線維に加えて一次求心性線維が投射される脊髄後角の表層（第 I, II 層）と尾側三叉神経核において発現が観察された³⁾が、その後、中枢神経系での発現も報告されている。TRPV1 を発現させた細胞を用いた電気生理学的解析に加え、TRPV1 欠損マウスの解析によって個体レベルでも TRPV1 が複数の侵害刺激の受容体として機能していることが確認されている⁴⁾が、TRPV1 欠損マウスの最も顕著な表現型は熱性痛覚過敏の減弱であり、TRPV1 が炎症性疼痛の発生に強く関わっていることと合致する。

TRPV1 は Ca²⁺ 透過性の高い非選択性陽イオンチャネルであり、カプサイシンと同様に生体に痛みを惹起する熱や酸（プロトン）によっても活性化する (Table 1).^{5,6)} この TRPV1 の性質はカプサイシン感受性の侵害受容神経が複数の刺激に応答する (polymodal nociceptors) ことと合致する。TRPV1

の熱による活性化の温度閾値は約 43 度で、この温度は生体に痛みを引き起こす温度閾値とほぼ一致している。以前からカプサイシン受容体のリガンドと考えられていた resiniferatoxin (*Euphorbia resinifera* というサボテンの成分) を含めて vanillyl 基を持つ化合物は vanilloid と総称され、piperine (胡椒の辛み成分)、capsiate (辛くないトウガラシ CH19 甘の成分)、gingerol (生姜の辛み成分)、shogaol (生姜の辛み成分)、sanshool (山椒の辛み成分)、allicin (タマネギや生ニンニクの辛み成分) などがある。TRPV1 の発見後、それらの作用標的の 1 つが TRPV1 であることが明らかとなった。ある種のクモ毒 vanillotoxin も TRPV1 に作用して痛みを惹起するという。

カプサイシンは生体内には存在しないことから、内因性リガンドの存在が推定されてきた。これまで報告されてきた内因性リガンドは、内因性 cannabinoid の anandamide や cannabidiol, lipoxygenase 産物である 12-(S)-hydroxyicosatetraenoic acids (12HP-ETE), N-arachidonoyl dopamine (NADA), OLDA (N-oleoyl dopamine), OEA (oleoylethanolamide) などである。その多くは直接 TRPV1 を活性化するとともに、他刺激による TRPV1 の活性化電流を増大させる。lipoxygenase 産物はブラジキニンやヒス

Table 1. Effective Stimuli for TRPV1

capsaicin	Nature 389: 816, 1997
heat (> 43°C)	
protons	Neuron 21: 531, 1998
resiniferatoxin	Molec. Pharmacol. 56: 581, 1999
capsiate	Neuropharmacol. 44: 958, 2003
piperine	Br. J. Pharmacol. 144: 781, 2005
eugenol, gingerol	Neuron 41: 849, 2004
shogarol	Nutr. Neurosci. 9: 169, 2006
sanshool	Biosci. Biotechnol. Biochem. 69: 1951, 2005
	Euro. J. Neurosci. 26: 1139, 2007
allicin	Current Biol. 15: 929, 2005
ethanol	Nat. Neurosci. 5: 546, 2002
vanillotoxin	Nature 444: 208, 2006
anandamide	Nature 400: 452, 1999
cannabidiol	Br. J. Pharmacol. 134: 845, 2001
lipoxygenase products	P.N.A.S. 97: 6155, 2000
NADA (<i>N</i> -arachidonoyl dopamine)	P.N.A.S. 99: 8400, 2002
OLDA (<i>N</i> -oleoyl dopamine)	J.B.C. 278: 13633, 2003
OEA (oleoylethanolamide)	J.B.C. 278: 30429, 2003
omega-3 poly unsaturated acids	J. Physiol. 578.2: 397, 2007
2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate)	J.B.C. 279: 35741, 2004
propofol (2,6-diisopropylphenol)	Neurosci. Lett. 312: 45, 2001
camphor	J. Neurosci. 25: 8924, 2005
NO	Nature Chem. Biol. 2: 596, 2006
extracellular cations	J. Neurosci. 25: 5109, 2005
lidocaine	J. Clin. Invest. 118: 763, 2008

タミン等の代謝型受容体活性化の下流でアラキドン酸から産生されるため、炎症性疼痛の発生経路の1つとして働くことが示唆されている。Na⁺等の細胞外陽イオンはTRPV1の細胞外ドメインにあるプロトン結合部位に作用してTRPV1を活性化させるという。NO (nitric oxide) はcGMPの活性化ではなくイオンチャネルのポア領域のシステイン残基をnitrosyl化することによってTRPV1を活性化すると報告されて注目を浴びた。また、複数の薬剤（全身麻酔の導入薬として使用されるプロポフォールや局所麻酔薬のリドカイン）がTRPV1を活性化させることも明らかになっている。

急性炎症性疼痛発生のメカニズムの1つとして、炎症関連メディエーターの代謝型受容体活性化から種々のタンパク質kinaseによってTRPV1がリン酸化されて機能増強が起こることが推定されている。特に、protein kinase C (PKC) によるリン酸化（2つのセリン残基がリン酸化の基質として明らかになっている）ではTRPV1の活性化温度閾値が約

43度から35度以下に低下することから、炎症時にはTRPV1が体温によって活性化して痛みを惹起し得る。⁷⁾ これら炎症関連メディエーターとTRPV1の機能関連は、TRPV1欠損マウスや炎症関連メディエーターの受容体欠損マウスの行動薬理学的解析によっても証明されている。TRPV1はまた、ほかの複数のタンパク質リン酸化酵素の働きでも機能増強が起こっている。

3. TRPV1の感作と糖尿病性神経症

糖尿病モデル動物においてTRPV1の発現や機能に変化しているとする報告はいくつかあるが、^{8,9)} 詳細な分子メカニズムは明らかでない。そこで、糖尿病状態に類似した低酸素（正常7%O₂に対して4%）高グルコース（正常7.4 mMに対して25 mM）環境（「糖尿病様環境」と呼ぶ）下で細胞を培養して解析を行った（以下、未発表データ）。ラット後根神経節細胞は、糖尿病様環境下で培養することによって有意に大きなカブサイシン活性化電流、プロトン活性化電流を示した。HEK293細胞にTRPV1を強制

発現させて解析すると、両（正常と糖尿病様環境）培養条件で最初のカプサイシン投与による電流の大きさに差はみられなかったが、複数回のカプサイシン投与でみられる細胞外 Ca^{2+} 依存性の脱感作は糖尿病様環境下で培養することによって有意に抑制された（電流の増大）。これは、強制発現系では大量のタンパク質が発現するために電流量に差がみられなかったものの、感作が脱感作を上回ったものと解釈された。以前に、TRPV1 の PKC によるリン酸化によって細胞外 Ca^{2+} 依存性の脱感作の抑制が起こることを報告していた¹⁰⁾ので、PKC によるリン酸化に係わる2つのセリン残基をアラニンに置換した変異体を用いて解析したところ、糖尿病様環境下で培養しても細胞外 Ca^{2+} 依存性の脱感作の抑制は起こらなかった。これは、糖尿病様環境による TRPV1 の細胞外 Ca^{2+} 依存性脱感作の抑制（感作）に PKC によるリン酸化が関わっていることを示している。この結果と一致して、糖尿病様環境下での培養によって、TRPV1 発現 HEK293 細胞と後根神経節細胞の両方で TRPV1 タンパク質量に変化はなかったものの、リン酸化 TRPV1 量は著しく増加した。これらの結果から、糖尿病様環境では感覚神経細胞の TRPV1 機能が PKC によるリン酸化を介して増強され、糖尿病性神経症の発症につながるもの

と推定された。

4. ワサビ受容体 TRPA1

TRPM8 より低温の 17 度以下の侵害性冷刺激によって活性化される新たな温度感受性 TRP チャネルとして TRPA1 が 2003 年に報告された。¹¹⁾ TRPA1 は主に感覚神経細胞（後根神経節と三叉神経節の小径の C 線維の細胞体）に発現し TRPV1 との共発現が観察されたことから、TRPA1 は侵害刺激受容に深く関わっていると考えられている。事実、冷刺激による痛覚過敏に TRPA1 が細胞増殖促進物質活性化タンパク質リン酸化酵素 mitogen-activated protein kinase (MAPK) を介して強く関わっていることが報告されている。また、マスタード、シナモン、生ニンニクの成分であるそれぞれ allyl isothiocyanate (AITC), cinnamaldehyde, allicin などによって TRPA1 が活性化されることが報告された (Table 2)。^{5,6)} このことはマスタードオイル等による炎症や熱性痛覚過敏の発症のメカニズムとして考えられる。加えて、tetrahydrocannabinol (THC), 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), acrolein, formaldehyde 等の aldehydes, methyl paraben, Ca^{2+} イオンなど非常に多くの物質によって活性化することが報告されている。その多くは痛みを惹起する物質として知られており、TRPA1 が侵害刺激受容に

Table 2. Effective Stimuli for TRPA1

cold (<17°C)	Cell 112: 819, 2003
icilin	
allyl isothiocyanate	Neuron 41: 849, 2004 Nature 427: 260, 2004
cinnamaldehyde	Neuron 41: 849, 2004
THC (tetrahydrocannabinol)	Nature 427: 260, 2004
allicin	Current Biol. 15: 929, 2005 P.N.A.S. 102: 12248, 2005
acrolein, 2-pentenal	Cell 124: 1269, 2006
methyl paraben	Br. J. Pharmacol. 151: 134, 2007
Ca^{2+}	Nature Neurosci. 10: 277, 2007
cysteine-modifying agents	Nature 445: 541, 2007 P.N.A.S. 103: 19564, 2007
2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate)	P.N.A.S. 103: 19564, 2007
formalin	P.N.A.S. 104: 13525, 2007
4-hydroxynonenal (aldehyde)	P.N.A.S. 104: 13519, 2007
menthol	J. Neurosci. 27: 9874, 2007
isovelleral, polygodial	J. Biol. Chem. 283: 24136, 2008
intracellular alkalization	J. Clin. Invest. 118: 4049, 2008
Zn^{2+}	Nature Chem. Biol. 2009

関与することは明らかである。TRPA1が侵害刺激受容体として機能することは、TRPA1欠損マウスの行動解析によっても確かめられている。^{12,13)}しかし、明らかになったTRPA1刺激物質は冷感をもたらさない。また、TRPA1が冷刺激によって活性化しないと報告もあり、TRPA1欠損マウスの解析からもTRPA1の冷刺激感受性に結論は得られていない。^{12,13)}臨床的に冷刺激アロディニアは多く認められるが、その発生にTRPA1が関わっているかどうか、更なる検討が必要であろう。しかし、TRPA1が侵害刺激受容に関わっていることは明らかであり、また、炎症関連メディエーターによって受容体活性化を介して感作されることが報告されており、¹⁴⁾炎症性疼痛の発生にも関わっているようである。

5. TRPA1とアルカリ感受性

生体の細胞内外のpHは中性付近に保たれているが、病態において酸性化あるいはアルカリ化すると痛み感覚の発生をもたらす。酸のセンサー分子はいくつか報告され、TRPV1やacid sensing ion channels (ASICs)などがある。しかし、アルカリのセンサー分子は明らかでない。そこで、TRPV1と対照的な (TRPV1が熱センサーでTRPA1が冷刺激センサー) TRPA1のアルカリ感受性を検討した。¹⁵⁾TRPA1を強制発現させたHEK293細胞に細胞外アルカリ刺激 (pH 8.5) やアンモニウムクロライド 5 mM (アンモニウムは細胞内入ってプロトンと結合することによって細胞内のアルカリ化をもたらす) を投与することによって細胞内Ca²⁺濃度の上昇をもたらされた。パッチクランプ法を用いて解析する

と、細胞内アルカリ化、細胞外アルカリ化、アンモニウムクロライド投与によって外向き整流性を有し、ルテニウムレッドやカンファーで阻害されるTRPA1に特徴的な全細胞電流の活性化が観察された。アンモニウムクロライドのEC₅₀は約9.2 mMで細胞内pHを約8.0にする量である。細胞体から離れた感覚神経終末ではpH緩衝能力が低いことが予想され、病態時には十分pH 8.0程度になり得るものと推定される。Inside/outモードでの単一チャネル電流記録で、細胞内ドメインのアルカリ化によるTRPA1単一チャネルの開口増大が確認された (Fig. 2)。アンモニウムクロライドによる応答は後根神経節細胞でも観察され、アンモニウムクロライド投与による活動電位発生も確認された。アンモニウムクロライド応答はAITC感受性の細胞でしか観察されず、TRPA1欠損マウスの後根神経節細胞では認められなかったことから、TRPA1を活性化しているものと考えられた。マウスの後肢足底にアンモニウムクロライドを投与することによって痛み関連行動が観察され、それがルテニウムレッドで抑制され、TRPA1欠損マウスでは認められなかったことから (Fig. 2)、アンモニウムクロライドによるTRPA1活性化が痛み感覚を惹起しているものと推定された。病態においてアルカリ化の頻度は高くない。しかし、腓炎時に高pH腓液の高腹膜への漏出によって激痛が起こることはよく知られている。また、pH 10を超えるアルカリ性の薬剤は静脈注射時に強い痛み (血管痛と解釈されている) を引き起こす。これらの現象はTRPA1のアルカリによる活性化で説明し得る。アンモニアを吸ったときの鼻腔

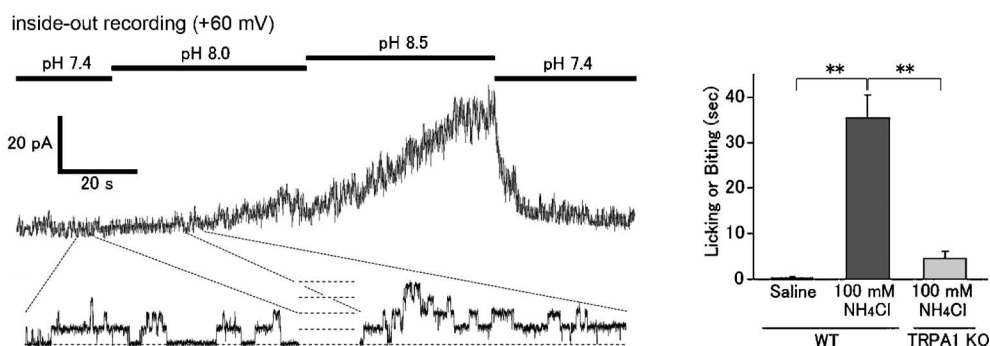


Fig. 2. Alkalization Causes TRPA1 Activation in the Membrane-delimited Manner, Leading to the Pain Related Behaviors in Mice (from Ref. 15)

Intracellular alkaline pH activates TRPA1 in the inside-out configuration (membrane potential +60 mV, left). Ammonium chloride injection into mouse hind paws causes pain-related licking or biting behaviors which was little observed in the TRPA1-deficient mice (right). ** $p < 0.05$.

でのツンとした感覚はワサビのツンとした感覚に似ているが、これらは TRPA1 の活性化によると解釈できる。TRPA1 は多くの侵害刺激によって活性化されることから、新たな鎮痛薬開発の有望な標的となるであろう。

REFERENCES

- 1) Venkatachalam K., Montell C., *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 387–417 (2007).
- 2) Caterina M. J., Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., Levine J. D., Julius D., *Nature*, **389**, 816–824 (1997).
- 3) Tominaga M., Caterina M. J., Malmberg A. B., Rosen T. A., Gilbert H., Skinner K., Raumann B. E., Basbaum A. I., Julius D., *Neuron*, **21**, 531–543 (1998).
- 4) Caterina M. J., Leffler A., Malmberg A. B., Martin W. J., Trafton J., Petersen-Zeitz K. R., Koltzenburg M., Basbaum A. I., Julius D., *Science*, **288**, 306–313 (2000).
- 5) Dhak A., Viswanath V., Patapoutian A., *Annu. Rev. Neurosci.*, **29**, 135–161 (2006).
- 6) Talavera K., Nilius B., Voets T., *Trends Neurosci.*, **31**, 287–295 (2008).
- 7) Tominaga M., Caterina M. J., *J. Neurobiol.*, **61**, 3–12 (2004).
- 8) Hong S., Wiley J. W., *J. Biol. Chem.*, **280**, 618–627 (2005).
- 9) Pabbidi R. M., Cao D. S., Parihar A., Pauza M. E., Premkumar L. S., *Mol. Pharmacol.*, **73**, 995–1004 (2008).
- 10) Mandadi S., Tominaga T., Numazaki M., Murayama N., Saito N., Armati P. J., Roufogalis B. D., Tominaga M., *Pain*, **123**, 106–116 (2006).
- 11) Story G. M., Peier A. M., Reeve A. J., Eid S. R., Mosbacher J., Hricik T. R., Earley T. J., Hergarden A. C., Andersson D. A., Hwang S. W., McIntyre P., Jegla T., Bevan S., Patapoutian A., *Cell*, **112**, 819–829 (2003).
- 12) Bautista D. M., Jordt S. E., Nikai T., Tsuruda P. R., Read A. J., Poblete J., Yamoah E. N., Basbaum A. I., Julius D., *Cell*, **124**, 1269–1282 (2006).
- 13) Kwan K. Y., Allchorne A. J., Vollrath M. A., Christensen A. P., Zhang D. S., Woolf C. J., Corey D. P., *Neuron*, **50**, 277–289 (2006).
- 14) Dai Y., Wang S., Tominaga M., Yamamoto S., Fukuoka T., Higashi T., Kobayashi K., Obata K., Yamanaka H., Noguchi K., *J. Clin. Invest.*, **117**, 1979–1987 (2007).
- 15) Fujita F., Uchida K., Moriyama T., Shima A., Shibasaki K., Inada H., Sokabe T., Tominaga M., *J. Clin. Invest.*, **12**, 4049–4057 (2008).