

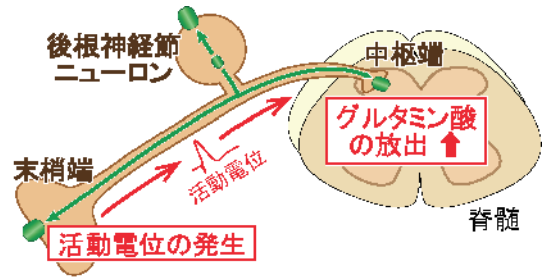
TRP チャンルとシナプス活動

熊本栄一, 藤田亜美, 蔣 昌宇, 徐 志昊, 大坪瀬奈, 松下晋大 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野)

1次感覚(後根神経節)ニューロンに存在し痛みの伝達に参与する非選択的な陽イオン透過性TRPチャンネルとして、TRPV1, TRPM8およびTRPA1がある。これらは、グルタミン酸作動性で有髄細径のA δ 線維や無髄のC線維に発現している。1次感覚ニューロンの皮膚末梢端に存在するものは、侵害性の温度や植物などに由来する化学物質の刺激に応じて開口する。これにより膜が脱分極することで活動電位が発生し、その刺激情報が中枢へ伝わる。例えば、TRPV1, TRPM8, TRPA1の作動物質には、それぞれ、唐辛子成分カプサイシン、ミント成分メントール、ワサビ成分アリルイソチオシアネート(AITC)がある。これらのTRPは細胞体で合成されるが、軸索輸送により末梢端ばかりでなく中枢端にも運ばれる(図1)。痛み情報を運ぶ線維の多くは脊髄後角の第II層(膠様質)に入力している。このため膠様質ニューロンから記録されるグルタミン酸を介するシナプス応答が、TRP作動物質によりどのような影響を受けるかを調べることで、その中枢端のTRPの性質を知ることができる。

成熟ラットから作製した脊髄横断薄片の膠様質ニューロンにパッチクランプ法を適用し、自発性興奮性シナプス伝達に及ぼすカプサイシンの作用を調べたところ、自発性興奮性シナプス後電流(sEPSC)の発生頻度(神経終末からのグルタミン酸放出の目安)が増加し、この作用はTRPV1阻害薬カプサゼピン(Capz)により抑制された。その増加は、神経終末において、(1)TRPV1活性化による膜の脱分極を介した電位作動性Ca²⁺チャンネルの活性化、(2)開口したTRPV1の高いCa²⁺透過性により、細胞外から細胞内へのCa²⁺流入量が増加した結果、細胞内のCa²⁺濃度が高まったためである。AITCもカプサイシンと同様にsEPSCの発生頻度を増加させた。この作用はCapz抵抗性である一方、非選択的TRP阻害薬ルテニウムレッドにより抑制されたためTRPA1活性化を介すると考えられた。その増加は電位作動性Ca²⁺チャンネル阻害剤La³⁺により抑制されなかったため、神経終末に存在する電位作動性Ca²⁺チャンネルの関与はない。メントールも同様にsEPSCの発生頻度を増加させた(図1)。

TRPの性質の多くは、1次感覚ニューロンの細胞体あるいは異種細胞に強制発現させたものを用いて調べられている。1次感覚ニューロンの細胞



①: TRPチャンネル (TRPV1, TRPM8, TRPA1)

図1. 痛み伝達におけるTRPチャンネルの役割

体でTRPV1を活性化する黒胡椒成分ピペリン、月桂樹成分オイゲノールおよび生姜成分ジゲロンが膠様質ニューロンの自発性興奮性シナプス伝達に及ぼす作用を調べた。いずれもsEPSCの発生頻度を増加させたが、ピペリン作用のみCapz感受性で、他の2つの作用はCapz抵抗性である一方、TRPA1阻害薬HC-030031感受性であった。つまり、1次感覚ニューロンの細胞体と中枢端ではTRPの性質が異なることが示唆された。

オピオイドなど様々な鎮痛物質が膠様質ニューロンの自発性の興奮性シナプス伝達に及ぼす作用が調べられており、それらの多くはsEPSCの発生頻度を減少させた。つまり、1次感覚ニューロンの中枢端におけるTRP作動物質の作用は、これらの鎮痛物質の作用と逆であり、その中枢端のTRP活性化は痛みを引き起こすことが示唆された。この考えは、疼痛モデルラットにおいて、(1)TRPの発現量が増加すること、(2)TRP阻害薬の脊髄腔内投与により鎮痛が起こること、などの実験結果から支持される。

中枢神経系に存在するTRPが生理状態で植物由来成分により活性化されることはないが、最近、アラキドン酸代謝物など、様々な内因性のTRP作動物質が明らかにされつつある。また、中枢に存在するTRPは、痛み伝達制御や呼吸調節などに働くが、その性質は末梢に存在するものと比べて性質が異なる可能性があり、今後、さらに検討する必要がある。

本シンポジウム発表において、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

軽度低酸素刺激による覚醒と呼吸促進にはTRPA1が必要である

桑木共之 (鹿大院・医歯学・統合分子生理学)
Transient Receptor Potential (TRP) チャンネル

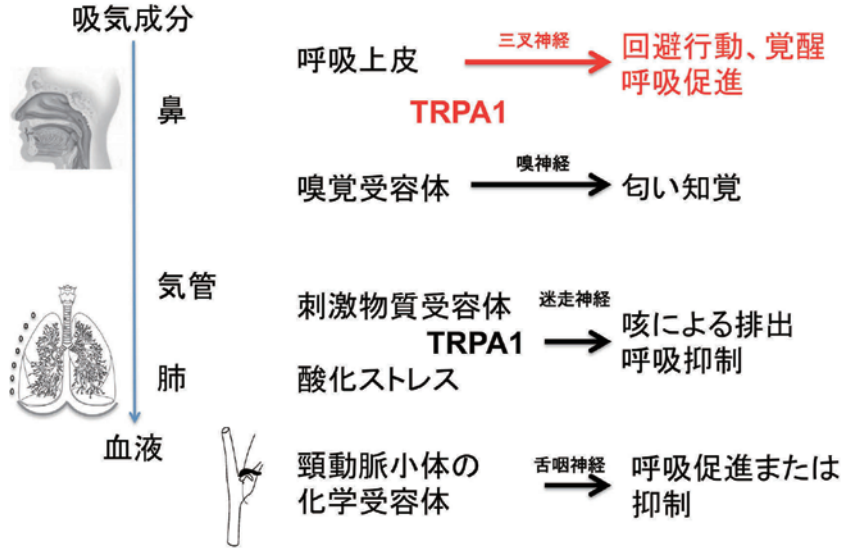


図 吸入ガス成分が生体に影響を及ぼす神経回路
最上段 (赤字) が今回明らかになった神経回路である

は1989年にショウジョウバエのイオンチャンネルとして同定されて以来、世界中で精力的に研究され、哺乳類にも広く存在し、温度・機械刺激・浸透圧・カプサイシンを初めとする種々の化学物質・pH等を検出するセンサーとしての機能も持つ事が明らかになってきた。我々は種々のTRPチャンネルについて酸素センサーとしての能力を比較定量し、TRPファミリーの中でもTRPA1が最も感受性が高いことを既に明らかにした [1]。体内(血中)の酸素センサーは頸動脈小体のグロムス細胞に存在することが広く知られているが、鼻から取り込まれた吸気は肺に到達し血中に入るまでに三叉神経、嗅神経、気管迷走神経の受容体を刺激する可能性がある(図参照)。中でも三叉神経は鼻腔内に取り込まれたガスが最初に接する感覚神経であり、しかもTRPA1が存在している。つまり、血中の酸素濃度が変化するよりもはるか以前に、外界のガス環境変化を検出して警告を発する系として機能している可能性があると考えられる。この「TRPA1アラーム仮説」を検証するためにTRPA1欠損(KO)マウスと対照野生型(WT)マウスを用いて以下の実験を行い、肯定的結論を得た [2] (図参照) ので紹介する。

まず、忌避/近接行動を利用して酸素濃度や刺激物質の検出に寄与している可能性を調べた。WTマウスはホルマリン蒸気で充満した部屋に決して入室しなかったのに対し、KOマウスは平気で侵

入し滞在させた。TRPA1刺激剤であるわさび成分のAITCやタバコ煙成分のアクロレインの蒸気でも同様であった。TRPA1阻害薬のAP18をWTマウスの鼻腔内に投与するとKOマウスと同様の症状が観察された。次に睡眠中のマウスにホルマリン又は低酸素を暴露して、覚醒までの時間を脳波と筋電図の記録から計測した。いずれの刺激でもKOマウスの覚醒時間は有意に延長していた。覚醒後の呼吸促進についてもKOマウスでは有意に減弱していた。最後に形態学的確認を行った。鼻腔内にトレーサーのDiIを投与して1週間後に三叉神経節を取り出し抗TRPA1抗体で染色したところ、多数の2重染色像が観察された。すなわち、TRPA1は鼻腔内に分布する三叉神経の神経枝に存在していた。マウスをホルマリン蒸気で充満した部屋に3分間滞在させてから2時間待った後に脳を摘出し、三叉神経の1次感覚中枢である三叉神経脊髄核尾部ニューロンの活性化をc-fosの発現で定量したところ、WTマウスでは有意な活性化が観察されたがKOマウスでは観察されなかった。

以上の結果から、三叉神経鼻腔内領域に存在するTRPA1は、低酸素やホルマリンなどの有害ガスの検出とそれに引き続く回避行動・覚醒をトリガーする警報装置としての役割を果たしており、危機回避による生命維持に必須のセンサーである、と結論した。

利益相反無し

1. Takahashi N et al: Nat Chem Biol 7: 701-711, 2011
2. Yonemitsu T: Sci Rep 3: 3100, 2013

Putative mechanisms underlying pH sensitivity of the brainstem astrocytes

Nephtali Marina, Vitaliy Kasymov and Alexander V Gourine (Neuroscience, Physiology & Pharmacology, University College London, London WC1E 6BT, United Kingdom)

Introduction: Glial cells residing in the ventral aspect of the medulla oblongata are functionally specialized to monitor physiological increases in PCO_2 /[H^+]. Medullary astrocytes, unlike cortical astrocytes, respond to acidification with elevations in intracellular Ca^{2+} and increased rate of exocytosis of ATP-containing vesicular compartments. Released ATP propagates Ca^{2+} excitation among neighbouring astrocytes and activates neurones of the ventral respiratory column triggering adaptive increases in breathing. However, the mechanism(s) underlying pH sensitivity of astrocytes which reside near the ventral surface of the medulla oblongata (VMS) remains unknown. Ion channels of the transient receptor potential (TRP) family are key chemosensory ion channels in the respiratory system. However, the role of TRP channels in the control of respiratory chemosensitivity has never been described. We have performed a pharmacological survey aiming to determine the mechanisms underlying pH sensitivity of astrocytes which reside near the ventral surface of the medulla oblongata.

Results: In organotypic cultures of the ventral medullary surface, acidification-evoked [Ca^{2+}]_i responses in VMS astrocytes were unaffected by blockade of TRPA1 or TRPV channels (HC030031, AMG9810, ruthenium red).

Conclusions: Despite their role in the chemosensory detection of changes in pH, TRP receptors are not involved in pH/ CO_2 -evoked activation of VMS astrocytes.

There is no COI to disclose concerning this study.

呼吸パターン調節における TRP チャネルの役割 小泉英彦 (米国・国立衛生研究所 (NINDS, NIH))

呼吸運動は生命維持に極めて重要な活動であ

り、その中枢神経系調節機構はあらゆる状況に応じて適切に機能しなければならない。われわれは、この複雑でかつ巧妙に作られた呼吸調節機構を解明するために、イオンチャネル、ニューロン、シナプス、ならびにネットワークレベルで、多角的に解析を行っている。呼吸リズムならびに呼吸パターン形成メカニズムを明らかにすることは、様々な呼吸関連疾患の病体解明のみならずその治療法の確立という点において、極めて重要である。呼吸リズムや呼吸パターンの発現には、Pre-Böttinger complex (Pre-BötC) が重要な役割を担っていることが知られているが、Pre-BötCニューロン群が、どのようなメカニズムで呼吸リズムや呼吸パターンを制御しているかは、十分には明らかにされていない。われわれは、これまでに、Pre-BötC呼吸ペースメーカーニューロンの Bursting 機構において Persistent sodium チャネルが中心的役割を担うことを明らかにした [1] が、このチャネルに依存しない Pre-BötC ペースメーカーニューロンが存在することも知られている。これらのニューロンの Bursting 機構には、Calcium-activated non-selective cationic currents (ICAN) が関わっているものと推測されているが、その詳細については未だ明らかではない。一方、近年 Transient Receptor Potential (TRP) チャネルが、呼吸調節機構に関わっていることが示唆され、とくに、TRPM チャネルについては ICAN チャネルと考えられていることから、Pre-BötC における呼吸調節機構への関与が注目されている [2]。また、TRPC チャネルについても、呼吸調節への関与が報告されている [3]。今回、われわれは、呼吸調節機構における TRPM4/5 および TRPC3/7 チャネルの役割について、Pre-BötC 呼吸リズムネットワークを内包した in vitro 新生児ラットおよびマウス脳幹スライス標本を用いて検討した。

まず、免疫染色の手法を用いて、Pre-BötC に存在するニューロン群の TRP チャネル expression について検討を行なった。その結果、Pre-BötC ニューロンは TRPM4, TRPM5, TRPC3 ならびに TRPC7 チャネル陽性であることが明らかとなった。つぎに、リズム性脳幹スライスにおいて Pre-BötC ニューロンからパッチクランプ記録を行うことにより、呼吸性 Pre-BötC ニューロンを同定した後、その Cytoplasm を採取し、Single-cell multiplex RT-PCR の手法を用いて、Neurotransmitter タイプ (VGluT2: glutamatergic, GlyT2: Glycerinic, GAD67: GABAergic) ならびに TRP チャネル expression について検討した。その結

果, 主に興奮性ニューロンに, TRPM4 と TRPC3 チャネルがみられ, 少数の抑制性ニューロンに TRPC3 チャネル陽性ニューロンがみられた. さらに, TRPM/C チャネルの呼吸リズムや呼吸パターン形成への関わりを検討するため, リズム性脳幹スライスにおいて, 舌下神経から吸気性リズム活動を記録し, TRP チャネルブロッカーあるいは ICAN ブロッカー投与 (bath application) による舌下神経吸気性活動の活動振幅ならびに呼吸リズムへの影響について解析した. その結果, すべてのブロッカー投与により舌下神経吸気性活動振幅の著明な減少がみられたが, 呼吸リズムへの影響は少なかった.

以上のことから, Pre-BötC 興奮性ニューロンは, TRPM4 と TRPC3 チャネル陽性であり, この TRPM4/TRPC3/ICAN メカニズムは呼吸パターン調節において重要な役割を担っていることが明らかとなった.

本シンポジウム発表について, 利益相反 なし.

1. Koizumi H et al: *J Neurosci* **28**: 1773-1785, 2008
2. Guinamard R et al: *Physiology (Review)* **25**: 155-164, 2010
3. Ben-Mabrouk F et al: *Euro J Neurosci* **31**: 1219-1232, 2010

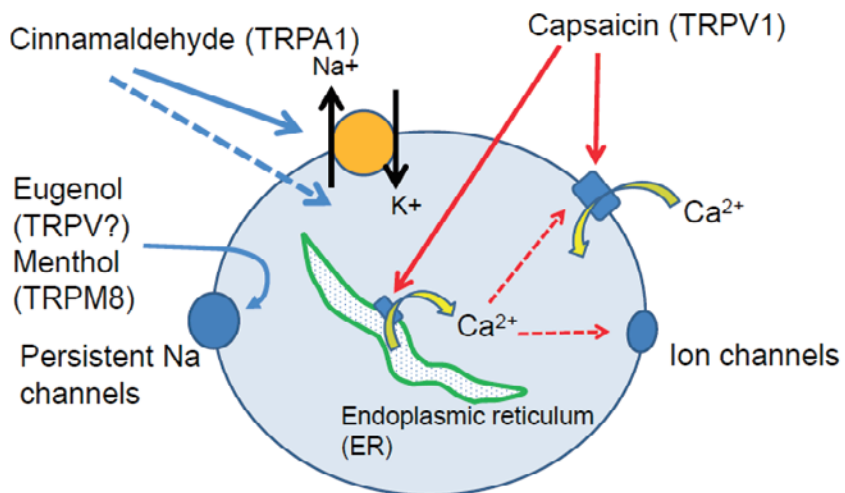
TRP channel 関連物質の呼吸中枢ニューロンに対する作用の神経機構

鬼丸 洋¹, 谷まりほ¹, Lin Shih-Tien¹, 小谷さゆみ¹, 津澤佳代¹, 釋尾知春¹, 矢澤 格², 池田啓子³ (¹昭和大学・医・生体調節機能学, ²昭和大学・医・解剖, ³兵庫医大・生物)

Transient receptor potential (TRP) チャネルのアゴニストまたはアンタゴニストとして知られている化学物質が, 延髄呼吸中枢にどのような影響を与えるかは良くわかっていない. 最近我々は, いくつかの TRP チャネル関連物質が延髄呼吸中枢のニューロン活動にどのような作用を及ぼすかについて, 新生ラット摘出脳幹-脊髄標本を用いて調べてきた. この標本における呼吸リズムは, 傍顔面神経呼吸ニューロングループ (parafacial respiratory group, pFRG) 及び pre-Bötzinger complex に存在するリズムジェネレーターニューロンの相互作用により形成される [1, 2]. 前者は主に前吸気性 (Pre-I) ニューロンにより構成され, 後者は吸気性ニューロンにより構成される. C4 吸気性活動をモニターしながら, これら延髄吻側腹外側部の呼吸性ニューロンからホールセル記録により膜電位を記録し, TRP チャネル関連物質

の作用を調べた.

これらの化学物質は, 基本的に興奮性の作用を持つもの (抑制→興奮の 2 相性も含めて) と抑制性の作用を持つものの大きく 2 つのグループに分けられた. 前者には capsaicin (TRPV1 アゴニスト) と cinnamaldehyde (TRPA1 アゴニスト) があり, 呼吸リズムの一時的抑制 (投与後 5 分以内) とそれに続く興奮の 2 相性の反応を引き起こした. Menthol (TRPM8 アゴニスト) および carvacrol と eugenol (TRPV3 アゴニスト) は強い抑制を引き起こした. それぞれのアゴニストはその作用に関して, 以下のような特徴があった. Capsaicin の作用の特徴の 1 つとして, 強い脱感作が観察された. つまり, 2 度目の投与に対して, 反応が見られなくなった. この脱感作は, 低カルシウム溶液によって影響を受けなかったことから, 細胞外のカルシウムイオンには依存しないと考えられ, capsaicin が細胞膜レセプターのみならず, 細胞内カルシウムストア部位である小胞体に直接作用する可能性が示唆された. cinnamaldehyde (および allyl isothiocyanate) は washout 後, 2 時間以上続く呼吸リズムの長期促進を引き起こした. この反応は Pre-I ニューロンの脱分極とバースト頻度の上昇を伴っており, その誘導には, pFRG の存在が不可欠であった. この細胞機構の 1 つとして Na/K ポンプの持続的抑制の可能性が想定された. cinnamaldehyde による呼吸リズムの長期促進は, 生後 11-13 日齢のラットの動脈灌流標本における実験でも確認された. Menthol は Pre-I ニューロンのバースト持続時間の減少を引き起こし, Pre-I ニューロンにおける tonic GABA チャネルの活性化が関与する可能性が示唆された [3]. 一方, carvacrol と eugenol は呼吸リズムの強い抑制と, Pre-I ニューロンおよび吸気性ニューロンのバーストの持続時間の顕著な短縮を引き起こした. この吸気バーストの短縮は, washout 後, 呼吸リズムが回復した後も, 1 時間以上続いた. 呼吸性ニューロンにおけるバースト形成は呼吸相を形成するために不可欠であり, carvacrol と eugenol はこのバースト形成 (つまりバーストの一定時間の持続) に必要な細胞機構を抑制すると考えられた. これらの物質によるリズム形成の抑制には, 持続性 Na⁺ チャネルに対する抑制作用が一部関与するものと考えられた. 図にこれらの新しいメカニズムについての概略を示した. これらの化学物質の効果は, 従来の神経修飾物質などでは見られないものを含んでおり, 呼吸リズム形成の細胞機構に関して, 新しい側面からのアプローチを提示するかもしれない.



図

TRP チャンネル関連物質は従来の神経修飾物質などでは見られないユニークな作用を呼吸リズム形成ニューロンに及ぼす。細胞膜上の TRP チャンネル以外にも、Na/K ATPase、小胞体 Ca ストアー部位、あるいは持続性 Na チャンネルなどがその作用部位として想定される。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Onimaru H et al: J Neurophysiol **96**: 55-61, 2006
2. Onimaru H et al: J Physiol **584**: 271-284, 2007
3. Tani M et al: NeuroReport **21**: 1095-1099, 2010