

学位論文

「Tris-hydroxymethyl-aminomethane enhances capsaicin- induced
intracellular Ca^{2+} influx through transient receptor potential V1
(TRPV1) channels.

(トリスヒドロキシメチルアミノメタン(THAM)はカプサイシン
によって起こる TRPV1 チャンネルからの細胞内カルシウムイオン
流入を増強する)」

指導教授名 金井 昭文

申請者氏名 村上 敏史

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

諸言

Transient Receptor Potential(TRP)チャネルは TRPC、TRPV、TRPM、TRPML、TRPA などのファミリーからなるカチオンチャネルである。その一つである TRPV チャネルサブファミリーに属する TRPV1 は、カプサイシン、酸、熱などの侵害刺激で活性化され痛みの伝達に関与するほか、アルカリであるアンモニアでも活性化されることが報告されてきた。トリスヒドロキシメチルアミノメタン(THAM)は、アシドーシスの治療や緩衝液として用いられるアルカリ化剤である。しかし、TRPV1 における THAM の効果は不明である。本研究では、TRPV1 発現細胞を用いて THAM による TRPV1 チャネル活性への効果を解析した。

方法

Baby hamster kidney (BHK)細胞に TRPV1 及び Ca^{2+} 濃度指示蛋白 G-CaMP2 を共発現させ、カプサイシン(1 μM)、KRP 緩衝液(pH6.0)、HEPES 緩衝液(pH8.5)、THAM(0.3mM)、カプサゼピン(10 μM)を様々なタイミングで 30 秒間投与した。共焦点レーザー顕微鏡により Ca^{2+} イメージング法を用いて細胞 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)を測定し、AUC(Area Under the Curve)を算出し解析を行った。

結果

TRPV1 ならびに Ca^{2+} 濃度指示蛋白 G-CaMP2 を共発現させた BHK 細胞(TRPV1 発現細胞)、ならびに発現していない細胞に HEPES 緩衝液、カプサイシン、KRP 緩衝液をそれぞれ単独投与したところ、TRPV1 非発現細胞では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に変化はなかったが、TRPV1 発現細胞ではカプサイシンならびに KRP 緩衝液により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇した。また、カプサイシンと KRP 緩衝液による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は TRPV1 阻害剤であるカプサゼピンを共存により完全に抑制された。

次に TRPV1 発現細胞に HEPES 緩衝液、THAM をそれぞれ投与したところ、有意な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は認められなかったが、カプサイシン投与 60 秒後に THAM を投与したところ、強力かつ持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を認めた。カプサイシンと THAM との投与間隔をカプサイシン投与 0、30、60、90 秒後に設定したところ、30 秒後、60 秒後においてのみ THAM による著しい $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められた。

TRPV1 発現細胞に①カプサイシンとカプサゼピンを同時投与後、THAM を単独投与、②カプサゼピン投与後カプサイシン投与し、その後 THAM 投与を行ったが、いずれも $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は上昇しなかった。また、カプサイシン投与に引き続いてカプサゼピン THAM を順次投与したところ、カプサイシン単独投与とほぼ同様の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められた。また③カプサイシンに代えて KRP 緩衝液を投与し、その後 30、60、90 秒に THAM を投与、④カプサイシンを投与し、0、30、60、90 秒後に HEPES 緩

衝液を投与、⑤THAM を投与し、0、30、60、90 秒後にカプサイシンを投与したが、③、④、⑤とも有意な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は認められなかった。

考察

我々は、TRPV1 がカプサイシンにより活性化されている状況下において、THAM (pH8.5)が TRPV1 を強く活性化することを初めて見出した。カプサイシン投与後の THAM 投与で起こる持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は TRPV1 チャネルアンタゴニスト、カプサイゼピンにより完全に抑制されたことから、THAM の作用はカプサイシンによる TRPV1 活性化を介することが示唆された。

カプサイシン投与 0、30、60、90 秒後にそれぞれ THAM を投与したところ、30 秒および 60 秒後に有意な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められたが、0 秒、90 秒後では有意差を認めなかった。おそらく THAM の作用部位は TRPV1 の細胞内サイトに存在し、カプサイシン投与後 TRPV1 チャネルが開口し、THAM が細胞に流入することが活性化の条件であると考えられ、すなわち 0 秒後ではチャネルが開口しておらず、90 秒後ではチャネルが閉じていると考えられた。

THAM、HEPES 単独投与では $[Ca^{2+}]_i$ は上昇しなかったため、アルカリ物質による TRPV1 活性化には細胞内のアルカリ化が必要と考えられた。以前の研究で、アルカリ性物質であるアンモニアが TRPV1 を活性化することが報告されているが、アンモニアは細胞膜を通過し迅速な細胞内アルカリ化を起こすため、カプサイシンによる先行 TRPV1 チャネル開口は不要と考えられた。

本研究より、カプサイシン等により TRPV1 チャネルが活性化されている状況下では、THAM は侵害刺激となることが示唆された。アルカリ物質による疼痛惹起の機序として TRPA1 の活性化が報告されているが、TRPV1 活性化が関与することを示した研究、およびそのメカニズムについては本研究が初めてである。本研究により、アルカリ物質による疼痛惹起のメカニズムの一つとして TRPV1 の活性化が関与する可能性を示した。

目次

	頁
1. 序論 -----	1
2. 方法	
2-1. 実験系構築と使用薬剤 -----	1
2-2. 細胞培養と共発現 -----	2
2-3. Ca^{2+} イメージングアッセイ -----	2
2-4. カプサイシン投与 -----	2
2-5. 統計解析 -----	2
3. 結果	
3-1. リアルタイム Ca^{2+} イメージングアッセイの最適化 -----	2
3-2. THAM によるカプサイシンを介した Ca^{2+} 流入増加 -----	3
3-3. カプサイシン/THAM 投与による Ca^{2+} 流入増加のメカニズム解析 -----	3
4. 考察 -----	4
5. 総括 -----	5
6. 今後の課題 -----	5
7. 謝辞 -----	6
8. 引用文献 -----	7
9. 業績目録 -----	8
10. 図表 -----	13

1. 序論

Transient Receptor Potential(TRP)チャネルは TRPC、TRPV、TRPM、TRPML、TRPA などのサブファミリーからなるカチオンチャネルであり(1-3)、その一つである TRPV (Transient Receptor Potential Vanilloid) チャネルはカプサイシンや熱(>43°C)、酸(プロトン)などの物理的・化学的な刺激によって活性化される。TRPV のサブファミリーには TRPV1~V6 があるが、機能、配列上の違いから TRPV1~4 と TRPV5~6 に分けられる。TRPV1~4 は皮膚や神経など、感覚に関わる部位に発現している非選択性カチオンチャネルであり、TRPV5~6 は腎臓や腸において発現し、カルシウムイオン(Ca^{2+})吸収に関わっていると考えられている。TRPV1 は皮膚や消化管、口腔内などに発現し、カプサイシンのほか、カプサイシンと同様に生体に痛みを惹起する酸(プロトン)、熱(>43°C)といった物理的・化学的な侵害刺激によって活性化され、痛みの伝達に関与することが知られている(4-6)。ラットの神経後根神経節細胞を用いた研究では、酸を投与するとカルシウムイオンとナトリウムイオンが TRPV1 を介して細胞内に流入することによって膜電位が誘発されることが報告されている(6)が、近年、TRPV1 は酸のみならずアンモニアや細胞内のアルカリ化など、アルカリによっても活性化されることが報告されている(7)。

トリスヒドロキシメチルアミノメタン(THAM)は、アシデミアを認める代謝性アシドーシスや体外循環・低体温による手術及び保存血大量注入によるアシドーシスの治療や緩衝液として用いられるアルカリ化剤である(8-10)。しかし、TRPV1 チャネルへの THAM の効果は十分検証されていない。

本研究は、TRPV1 発現細胞を用いて THAM による TRPV1 チャネル活性への直接的効果を解析したものである。Baby hamster kidney (BHK)細胞に TRPV1 ならびに細胞内カルシウム濃度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)変化を可視化できる Ca^{2+} 濃度指示蛋白 G-CaMP2 を共発現させ、さまざまな薬物を投与し、各薬剤の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に与える影響を共焦点レーザー顕微鏡で経時的に観察し、解析を行った(11-13)。

2. 方法

2-1. 実験系構築と使用薬剤

ヒト TRPV1 の cDNA は大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター バイオセンシング研究領域 細胞生理研究部門の富永真琴先生よりご提供いただき、同 cDNA を pCI-neo vector (Promega, Madison, WI, USA)にサブクローン化したものを用いた。 Ca^{2+} 濃度指示蛋白である GCaMP2 cDNA は、pN1 vector (Promega, Madison, WI, USA)にサブクローン化した pN1-GCaMP2 を埼玉大学脳末梢科学研究センター 中井淳一先生より提供頂いた。カプサイシンおよび THAM は Sigma (St. Louis, MO, USA)より購入し、その他の薬剤は Nacalai Tesque (Kyoto)より購入した。

2-2. 細胞培養と共発現

BHK 細胞はダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)に 10%ウシ胎児血清、100U/ml ペニシリン、100mg/ml ストレプトマイシン含有を添加し 5% CO₂-95%air、37°Cの環境下で培養した。

Ca²⁺イメージングは、35mm dish(WillCo Wells B.V., Amsterdam, Netherlands)に播種した baby hamster kidney (BHK)細胞(6×10⁴ cells)を用いた。BHK 細胞にヒト TRPV1 をコードする cDNA (0.3μg)と G-CaMP2 (0.1μg)を Effectene transfection reagent (Qiagen, Tokyo)を用いて遺伝子導入した。測定は処置後 24~36 時間後に行った。

2-3. Ca²⁺イメージングアッセイ

Ca²⁺イメージングは、TRPV1 ならびに Ca²⁺濃度指示蛋白 G-CaMP2 を共発現させた BHK 細胞を用いた(11-13)。細胞は HEPES 緩衝液 (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, and 10 mM D-glucose, pH 7.4)にて 2 回洗浄した後、各薬剤 (カプサイシン、THAM、HEPES 緩衝液)を投与した。酸 (pH6.0) による TRPV1 活性化には、Krebs-Ringer Phosphate (KRP)緩衝液(pH 6.0)を用いた。

Ca²⁺イメージングは LSM 510 META 共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss Japan, Tokyo)を用いて G-CaMP2 の蛍光強度を 510nm の波長で持続的に測定した。データ解析は LSM510 META software (Carl Zeiss, Jena, Germany)を使用し、薬物添加前の蛍光強度と薬物添加時のピーク値の差を算出し、GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いてグラフを作成した。

2-4. カプサイシン投与

TRPV1 を発現させた BHK 細胞に HEPES 緩衝液(pH7.4)にて還流を行い、カプサイシン(1μM)、KRP 緩衝液(pH6.0)、HEPES 緩衝液(pH8.5)、THAM(0.3mM)、カプサイゼピン(10μM)を様々なタイミングで 30 秒間投与した。ウォッシュアウト時間を 10 分間行い、共焦点レーザー顕微鏡にて Ca²⁺イメージング法にて[Ca²⁺]_iを測定し、AUC(Area Under the Curve)を算出した。

2-5. 統計解析

GraphPad Prism 6 を用いてデータ解析を行った。二群比較はマン・ホイットニー検定、多群比較は一元配置分散分析法、クラスカル・ワリス検定をそれぞれ用いた。

3. 結果

3-1. リアルタイム Ca²⁺ イメージングアッセイの最適化

TRPV1、G-CaMP2 を共発現させた BHK 細胞(TRPV1 発現細胞)では、すでに持続的な G-CaMP2 に由来する緑色の蛍光を発していた。同細胞にカプサイシン(1mM)を投与すると G-CaMP2 の蛍光が上昇し、[Ca²⁺]_iの上昇が認められた(Fig. 1A)。

同細胞に酸性溶液(KRP 緩衝液(pH 6.0))を投与したところ、一過性に $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を認めた。TRPV1 非発現細胞ではカプサイシン(1mM)、KRP 緩衝液(pH 6.0)による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は認められなかった(Fig. 1B)。

カプサイシン投与濃度の最適化のため、1pM から 10mM までの各濃度を投与した。1nM においても $[Ca^{2+}]_i$ の増加は認めたが、最大変化を示す最小濃度は 1 μ M であったため、本研究では以降の実験において 1 μ M を用いることとした(データ非提示)。カプサイシン、KRP 緩衝液(pH 6.0)による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、TRPV1 アンタゴニストであるカプサゼピン(10 μ M)の同時投与で完全に抑制された(Fig. 1C)。これは以前の報告と一致していた(1-6)。

また、アルカリ剤により TRPV1 活性が増強するとする報告がある(7)。そのため、我々は HEPES 緩衝液(pH8.5)および臨床的にアシドーシス治療に用いる THAM(pH8.5、3mM)を用い実験を行った(8, 10)。

HEPES 緩衝液単独投与および THAM 単独投与では、 $[Ca^{2+}]_i$ の有意な上昇は認められなかった(Fig. 1D)。

3-2. THAM によるカプサイシンを介した Ca^{2+} 流入の増加

TRPV1 発現細胞にカプサイシン(1 μ M)を 30 秒間投与しその 60 秒後に THAM(pH8.5、0.3mM)を投与したところ、20 分以上続く著しい $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めた (Fig. 2A)。

この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は THAM 投与のタイミングによって変化した。カプサイシンと THAM を同時に投与しても THAM による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は認めなかったが、カプサイシン投与 30 秒後、60 秒後では著しい $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を認めた。また、カプサイシン投与 90 秒後では、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は認めなかった(Fig. 2B)。

TRPV1 発現細胞に①カプサイシンとカプサゼピンを同時投与後、THAM を単独投与、②カプサゼピン投与後、カプサイシンを投与し、その後 THAM 投与を行ったが、いずれも $[Ca^{2+}]_i$ は上昇せず、完全に抑制された。また、カプサイシン投与に引き続いてカプサゼピンを投与し、その後 THAM を投与したところ、カプサイシン単独投与とほぼ同様の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めた(Fig. 2C,E)。

3-3. カプサイシン/THAM 投与による Ca^{2+} 流入増加のメカニズム解析

酸により TRPV1 が活性化されることはすでに報告されている(5)。今回の研究でも KRP 緩衝液(pH6.0)投与により有意な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めた。一方、THAM(pH8.5)単独投与では有意な変化は認めなかった(Fig. 1C)。またカプサイシンに代わり KRP 緩衝液(pH6.0)を投与し、その後 THAM(0.3mM)を様々な投与タイミング(0秒後、30秒後、60秒後、90秒後)で投与したが、いずれも有意な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は認めなかった(Fig. 3)。加えて、THAM を HEPES 緩衝液(pH8.5)に変更し、カプサイシン(1 μ M)投与 0、30、60、90 秒後に HEPES 緩衝液(pH8.5)を投与したが、いずれも有意な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は認めなかった(Fig. 4)。

さらに、カプサイシンと THAM の投与順を変更し、THAM(0.3mM)投与 0、30、60、90 秒後にカプサイシン(1 μ M)投与を行ったが、いずれもカプサイシン単独投与と同様の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認め、持続的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は認められなかった(Fig. 5)

4. 考察

TRPV1 はカプサイシンや熱、酸、そしてアルカリといった様々な侵害刺激により活性化される(1-6)。今回我々は、TRPV1 がカプサイシンにより活性化されている状況下において、アルカリである THAM(pH8.5)が TRPV1 をより強く活性化することを見出した。本研究では、THAM、HEPES 緩衝液(pH 8.5)の単独投与では $[Ca^{2+}]_i$ の有意な上昇増加を認めなかったが、カプサイシン投与後に THAM を投与すると、 $[Ca^{2+}]_i$ は持続する著明な上昇を認めた。この上昇は TRPV1 アンタゴニストであるカプサゼピンの同時投与によって完全に抑制されたことから、THAM による反応はカプサイシン投与による TRPV1 チャネル活性化を介するものであることが示唆された。カプサイシン投与 0、30、60、90 秒後にそれぞれ THAM を投与したところ、30 秒、60 秒後に有意な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められたが、0 秒後(早期)、90 秒後(遅発期)では有意差を認めなかった。このことから、カプサイシン投与後の THAM 投与による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は THAM を投与するタイミングに依存することが明らかとなった。おそらく、60 秒後に最大効果が得られたことから、THAM の作用部位は TRPV1 が細胞内に存在することが重要で、カプサイシン投与による TRPV1 チャネルの開口により THAM が細胞に流入することがその条件であると考えられた。つまり 0 秒後ではカプサイシン投与の影響後の TRPV1 チャネル開口が不十分であったこと、90 秒後ではカプサイシンによる影響がピークを過ぎ TRPV1 チャネル開口が終了しているため THAM の十分な流入が起こらず、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起きなかったと推察された。

THAM、HEPES 緩衝液(pH8.5)単独投与では $[Ca^{2+}]_i$ は上昇しなかったことから、アルカリ性物質が TRPV1 活性を増強させるためには、何らかの形で細胞内にアルカリ化成分が流入することが必要であると考えられた。先行研究において、アルカリ性物質であるアンモニアが TRPV1 を活性化することが報告されているが(7)、アンモニアは単独投与で細胞膜を通過することができるため、迅速に細胞内に流入し、本研究で見られたカプサイシン先行投与といったあらかじめ TRPV1 チャネルを開口させることは必要なかったと考えられた。

本研究で得られた結果より、我々はカプサイシン等によりすでに TRPV1 チャネルが活性化されている状況下では、THAM は侵害刺激となりうることを示した。アルカリ物質による疼痛惹起の機序として TRPA1 活性化が報告されているが、今回の私たちの研究のように TRPV1 活性化の関与を示したものはない。

THAM はアシドーシスを伴う急性肺障害に対する有用性などが報告されている(14)ほか、アシドーシスに対する治療薬として現在臨床において使用されている(15)。しかし、侵害刺激を報告した研究はない。アルカリ性物質はしばしば痛み刺激とな

る。先行研究では、ウサギの耳静脈に THAM(0.3M)を静注することより注入周囲組織に壊死が認められたことが報告されている(16)ほか、過換気による呼吸性アルカローシスは末梢神経障害の原因となりうることが報告されている(17)。また、アルカリ性物質により TRPA1 が活性化することで疼痛を惹起することが報告されている(18)。本研究での結果はアルカリ性物質による疼痛惹起のメカニズムの一つとして TRPV1 の活性化の TRPA1 の活性化のように疼痛惹起に関与する可能性を示したものである。このことは、ある条件下においては THAM も侵害刺激となりうるということが考えられる。

5. 総括

我々はカプサイシンを事前に投与することで、アルカリ化剤である THAM が TRPV1 チャネルを通り、持続的な TRPV1 チャネル活性化を示すことを見出した。また THAM による細胞内カルシウム濃度上昇は、前もって TRPV1 チャネルが開くことが重要であることを示した。すなわち、カプサイシンにより TRPV1 チャネルが開き、そこから THAM が細胞内に流入し、TRPV1 チャネルを活性化させると考えられた。以上より、カプサイシン等により TRPV1 チャネルが活性化されている状況下では、THAM は侵害刺激となることが示唆された。アルカリ物質による疼痛惹起の機序として TRPA1 活性化が報告されているが、TRPV1 活性化が関与すること示した研究は殆どなく、本研究はアルカリ物質による疼痛惹起のメカニズムの一つとして TRPV1 の活性化が関与する可能性を示した。

6. 今後の課題

現在、様々な注射製剤が臨床の場で使用されているが、その一部に副作用として血管痛を認めるものが存在する。血管痛は患者に著しい苦痛をもたらすものであり、場合によっては薬剤投与が制限されてしまい、結果として治療の質の低下をもたらす危険性もある。血管痛のメカニズムは注射製剤の成分などにより一部解明されているものもあるが、頻度自体が少ないといった理由により、十分な解明には至っていない。

本研究は、アルカリ物質による疼痛惹起のメカニズムの一つとして TRPV1 の活性化が関与する可能性を示したものであり、このような疼痛惹起のメカニズムは、これらの血管痛のメカニズムのひとつである可能性があると考えられる。本研究が、現時点では十分に解明されていない血管痛のメカニズムの解明の一助になればと期待するとともに、今後の医療の質の向上のためにも、更なる研究が必要であると考えられる。

7. 謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金第3次対がん総合戦略研究事業（上園保仁、的場元弘）、科学研究費助成事業 基盤研究(C)(上園保仁（21590740）、白石成二(23592318))、若手研究(B)（宮野加奈子(23790315、25860199))、平成23年度国立がん研究センター研究開発費(上園保仁（23-A-29）、白石成二(23-A-30))の研究助成、昭和薬品化工株式会社、日本新薬株式会社の研究助成を受けて行われた。

本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご助言を頂きました北里大学医学部附属新世紀医療開発センターの金井昭文教授、北里大学医学部麻酔科学教室の岡本浩嗣教授に対し、謹んで感謝の意を表します。

また、折にふれ数々のご指導、ご助言を賜りました国立がん研究センター研究所がん患者病態生理研究分野 上園保仁先生、白石成二先生、宮野加奈子先生、須藤結香先生、西村瞳先生、日本赤十字社医療センター 的場元弘先生、日本大学スポーツ科学部 今野広紀准教授に対し厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究にご協力頂きました、国立がん研究センター研究所 がん患者病態生理研究分野 各研究員の皆様に心から感謝致します。

最後に、陰ながら励まし支えてくれた友人達、そして勉学の機会を与えて下さると共に精神面、経済面において多大なる援助を頂きました両親をはじめとする家族に心より御礼申し上げます。

8. 引用文献

- (1) Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 2003; 426: 517-24.
- (2) Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol*. 2012; 166: 510-21.
- (3) O'Neill J, Brock C, Olesen AE, Andresen T, Nilsson M, Dickenson AH. Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain. *Pharmacol Rev*. 2012; 64: 939-71.
- (4) Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997; 389: 816-24.
- (5) Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci*. 2001; 24: 487-517.
- (6) Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 1998; 21: 531-43.
- (7) Dhaka A, Uzzell V, Dubin AE, Mathur J, Petrus M, Bandell M, et al. TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J Neurosci*. 2009; 29: 153-8.
- (8) Kallet RH, Jasmer RM, Luce JM, Lin LH, Marks JD. The treatment of acidosis in acute lung injury with Tris-hydroxymethyl-aminomethane (THAM). *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161: 1149-53.
- (9) Nahas GG, Sutin KM, Fermon C, Streat S, Wiklund L, Wahlander S, et al. Guidelines for the treatment of acidaemia with THAM. *Drugs*. 1998; 55: 191-224.
- (10) Weber T, Tschernich H, Sitzwohl C, Ullrich R, Germann P, Zimpfer M, et al. Tromethamine buffer modifies the depressant effect of permissive hypercapnia on myocardial contractility in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162: 1361-5.
- (11) Sudo Y, Matsuo K, Tetsuo T, Tsutsumi S, Ohkura M, Nakai J, et al. Derived (mutated)-types of TRPV6 channels elicit greater Ca₂p influx into the cells than ancestral-types of TRPV6: evidence from *Xenopus* oocytes and mammalian cell expression system. *J Pharmacol Sci*. 2010; 114: 281-291.
- (12) Lee MY, Song H, Nakai J, Ohkura M, Kotlikoff MI, Kinsey SP, et al. Local subplasma membrane Ca²⁺ signals detected by a tethered Ca²⁺ sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 13232-7.
- (13) Tallini YN, Ohkura M, Choi BR, Ji G, Imoto K, Doran R, et al. Imaging cellular signals in the heart in vivo: cardiac expression of the high-signal Ca²⁺ indicator GCaMP2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 4753-8.
- (14) Flury KE, Dines DE, Rodarte JR, Rodgers R. Airway obstruction due to inhalation of ammonia. *Mayo Clin Proc*. 1983; 58:389-93.

- (15) Wolf AL, Levi L, Marmarou A, Ward JD, Muizelaar PJ, Choi S, et al. Effect of THAM upon outcome in severe head injury: a randomized prospective clinical trial. *J Neurosurg.* 1993; 78: 54-9.
- (16) Roberts M, Linn S. Acute and subchronic toxicity of 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol. *Ann N Y Acad Sci.* 1961; 92: 724-734.
- (17) Mogyoros I, Kiernan C, Burke D, Bostock H. Excitability changes in human sensory and motor axons during hyperventilation and ischaemia. *Brain.* 1997; 120: 317-325.
- (18) Fujita F, Uchida K, Moriyama T, Shima A, Shibasaki K, Inada H, et al. Intracellular alkalization causes pain sensation through activation of TRPA1 in mice. *J Clin Invest.* 2008; 118: 4049-57.

9. 業績目録

(I) 原著

- ◎1. Murakami S, Sudo Y, Miyano K, Nishimura H, Matoba M, Shiraishi S, Konno H, Uezono Y: Tris-hydroxymethyl-aminomethane enhances capsaicin-induced intracellular Ca^{2+} influx through transient receptor potential V1 (TRPV1) channels. *J Pharmacol Sci.* 130: 72~7, 2016.
- ◎2. Miyano K, Minami K, Yokoyama T, Ohbuchi K, Yamaguchi T, Murakami S, Shiraishi S, Yamamoto M, Matoba M, Uezono Y: Tramadol and its metabolite m1 selectively suppress transient receptor potential ankyrin 1 activity, but not transient receptor potential vanilloid 1 activity. *Anesth Analg.* 120: 790~8, 2015.
- ◎3. 村上敏史、岩瀬哲、西川満則、的場元弘：在宅医療におけるがん疼痛治療の評価と治療の実態について。日本緩和医療学会誌、8:158~167, 2013
- ◎4. Oya H, Matoba M, Murakami S, Ohshiro T, Kishino T, Satoh Y, Tsukahara T, Hori S, Maeda M, Makino T, Maeda T. Mandatory palliative care education for surgical residents: initial focus on teaching pain management. *Jpn J Clin Oncol.* 43:170-5, 2013.
5. 吉本鉄介、久田純生、余宮きのみ、富安志郎、長谷川徹、村上敏史、的場元弘：がん性疼痛治療を目的とした複方オキシコドン注射液の有効性と安全性—多施設での処方調査—*施がんと化学療法*、37:871~878, 2010.
6. 丸山美由紀、的場元弘、伊藤伸大、磯野雅子、村上敏史、国分秀也、伊東俊雅、外須美夫：がんと痛治療におけるオキシコドン徐放錠から塩酸オキシコドン・塩酸ヒドロコタルニン複方注射液への変換の有用性。緩和医療学、7:65~69, 2005
7. 国分秀也、村上敏史、的場元弘、伊藤俊雅、志真泰夫、外須美夫、矢後和夫：オキシコドン徐放錠(オキシコンチン)のゴーストピルにおけるオキシコドン含量。日本病院薬剤師会雑誌、40:1011~1013, 2004
8. 金井昭文、清水要、村上敏史、岡本浩嗣、外須美夫：キセノン光の種々の痛みに対する鎮痛効果の検討。ペインクリニック、24:65~71, 2003

(II) 著 書

1. 高橋秀徳、村上敏史、戸谷美紀、下山直人：緩和医療. 再発乳癌診療ガイドブック、103～116、2006

(III) 総説・講座

1. 村上敏史、齋藤理、三浦耕資、周東千緒、工藤尚子、的場元弘：経口モルヒネからオキシコドン注射剤への切り替え症例. がん患者と対症療法、23:59～64、2012
2. 村上敏史：緩和医療（在宅緩和医療も含めて）. からだの科学、270:103～108、2011
3. 村上敏史、的場元弘：オピオイドの導入の仕方. 緩和ケア増刊号、21:25～29、2011
4. 村上敏史：緩和ケアチームへの依頼症例から考えるがん性疼痛治療の基本. がん患者と対症療法、21:140～146、2010
5. 村上敏史、温泉川真由：非オピオイド鎮痛薬で十分な鎮痛が得られない、または、中等度以上の痛みのある癌患者. がん疼痛の薬物療法に関するガイドライン 2010年版、112-127、2010
6. 村上敏史、首藤真理子：基本的ながん疼痛治療のメカニズム-疼痛治療の進め方. がん患者と対症療法、19:82～89、2008
7. 的場元弘、村上敏史、首藤真理子、赤木徹、井手真弓：緩和医療におけるオピオイドの使い方. pharmavision、12:2～9、2008
8. 村上敏史、下山直人：緩和医療における麻酔科医の役割. LISA、14:226～230、2007
9. 村上敏史、服部政治、下山直人：痛みが増すごとにオピオイドの増量をくり返し、かなり大量のオピオイドを使用した際、副作用の管理が困難になるケース、また鎮痛効果が認められないケースがあります。このような場合、どのような対応が適切でしょうか. 薬局、58：2943～2946、2007
10. 村上敏史、高橋秀徳、中山理加、首藤真理子、服部政治、下山直人：がん対策基本法. 緩和医療学、9:312～313、2007
11. 村上敏史：フェンタニルの臨床使用に必要な基礎知識. Anet、11:6～9、2007
12. 村上敏史、高橋秀徳、下山直人：疼痛外来. 小児看護事典、590～591、2007
13. 木俣有美子、片山博文、高橋秀徳、村上敏史、服部政治、下山直人：肺がんの合併症対策 1) がん性疼痛の管理. 呼吸器科、11:156～163、2007
14. 中山理加、高橋秀徳、村上敏史、服部政治、下山直人：癌性疼痛. 臨牀と研究、84:811～815、2007
15. 中山理加、村上敏史、高橋秀徳、門田和気、服部政治、下山直人：疼痛コントロール. 内科、100:1037～1045、2007
16. 服部政治、村上敏史、高橋秀徳、下山直人：オピオイドローテーション. 緩和医療学、9:179～185、2007
17. 村上敏史、高橋秀徳、下山直人：癌の痛みに対するアセトアミノフェンの使い

方. In these cases..., 1:1~3, 2006

18. 村上敏史、下山直人：がん性疼痛における痛みのアセスメント. 痛みと臨床、6:328~333、2006
19. 村上敏史、高橋秀徳、中山理加、首藤真理子、戸澤育文、下山直人：早期からの緩和ケアの実践における治療に伴う痛み治療の意義. Progress in Medicine、26:2429~2434、2006
20. 下山直人、村上敏史、高橋秀徳：緩和ケアにおける麻酔科の役割. 日本医師会雑誌、135:806~808、2006
21. 高橋秀徳、村上敏史、下山直人：モルヒネ、フェンタニル、オキシコドンを使い分ける（オピオイドローテーション）. モダンフィジシャン、26:1210~1211、2006
22. 高橋秀徳、村上敏史、下山直人：モルヒネの効かないがんの痛みをどうするか？モダンフィジシャン、26:1024、2006
23. 戸澤育文、村上敏史、高橋秀徳、下山直人：最新の塩酸モルヒネ経口徐放製剤と従来のオピオイド製剤との比較. 実験 治療、681:82~86、2006
24. 石野裕理、中山理加、高橋秀徳、村上敏史、戸澤育文、下山直人：鎮痛補助薬. 実験 治療、681:93~97、2006
25. 高橋秀徳、村上敏史、戸谷美紀、下山直人：より多くの患者のニーズに応えるための緩和ケアチームのかかわり方とは？—国立がんセンター中央病院における「かかわりのレベル」表の紹介—. 緩和医療学、8:128~136、2006
26. 首藤真理子、中山理加、高橋秀徳、村上敏史、下山直人：便秘-末梢性オピオイド受容体拮抗薬. 緩和医療学、8:187~190、2006
27. 高橋秀徳、村上敏史、下山直人：小児がんの痛みに対するオピオイド鎮痛薬による治療の実際. がん患者と対症療法、17:24~29、2006
28. 村上敏史、高橋秀徳、下山直人：突出痛とレスキュー・ドーズ. 薬局、56:1401~1408、2005
29. 村上敏史、高橋秀徳、下山直人：坐薬、口腔粘膜吸収薬、吸入薬. Drug Delivery System、20-5:538~542、2005
30. 村上敏史、高橋秀徳、下山直人：がん治療における緩和ケアチームの役割. 癌の臨床、51:781~786、2005
31. 村上敏史、高橋秀徳、下山直人：WHO 方式癌疼痛治療法. カレントセラピー、23:102~103、2005
32. 村上敏史、高橋秀徳、下山直人：癌性疼痛に対する緩和ケア. JOHNS、121:910~914、2005
33. 下山直人、村上敏史、高橋秀徳、中山理加、首藤真理子、下山恵美：麻酔科医がペインクリニシャン、そして緩和ケア医となって. 日本臨床麻酔学会誌、26:18~24、2005

34. 下山直人、村上敏史、高橋秀徳、中山理加、首藤真理子、下山恵美：オピオイドスイッチングにおけるオキシコドン徐放錠の役割. *がん患者と対症療法*, 16:33～38、2005
35. 高橋秀徳、村上敏史、下山直人：緩和医療. *モダンフィジシャン*, 25:1289～1295、2005
36. 下山直人、中田稚子、村上敏史、高橋秀徳、中山理加、首藤真理子、下山恵美：モルヒネは現在でもがん性疼痛治療におけるスタンダードである. *日本臨床麻酔学会誌*, 25:526～532、2005
37. 下山直人、村上敏史、高橋秀徳：疼痛コントロール. *治療*, 87:1571～1574、2005
38. 下山直人、村上敏史、高橋秀徳、笹子三津留：がんの Informed Consent の最近の変化. *癌と化学療法*, 32:152～155、2005
39. 村上敏史、志真泰夫：がん性疼痛治療薬 最近の動向. *看護技術*, 50:275～278、2004
40. 村上敏史、土井千春、磯野雅子、志真泰夫：食欲不振を訴える患者への対応. *今月の治療*, 12:949～953、2004
41. 的場元弘、国分秀也、伊藤伸大、木下伸、清水要、小坂康晴、村上敏史、外須美夫：フェンタニルパッチとわが国のがん疼痛治療の転換. *緩和医療学*, 6:3～10、2004
42. 志真泰夫、土井千春、磯野雅子、村上敏史：ホスピス・緩和ケアにおける役割と問題点. *緩和医療学*, 5:225～228、2003
43. 村上敏史、的場元弘、外須美夫：第3段階へのステップアップとモルヒネのはじめ方. わかる できる がんの症状マネジメントⅡ、ターミナルケア 10月増刊号. 11:47～55、2001
44. 的場元弘、村上敏史、外須美夫：硫酸モルヒネ徐放性細粒剤（モルペス細粒®）—新しいモルヒネ製剤. わかる できる がんの症状マネジメントⅡ、ターミナルケア 10月増刊号. 11:56～59、2001
45. 村上敏史、的場元弘、外須美夫：痛みがとれるまでのプロセス. わかる できる がんの症状マネジメントⅡ、ターミナルケア 10月増刊号. 11:60～62、2001
46. 村上敏史、的場元弘、外須美夫：モルヒネによる傾眠とその対策. わかる できる がんの症状マネジメントⅡ、ターミナルケア 10月増刊号. 11:72～75、2001

(IV) 症例・臨床治験・その他

- 1. Murakami S, Herai M, Suzuki S, Fujii T, Tanaka H, Shinozaki M, Kokubun H, Akagi T, Uezono Y, Murakami-Ando Y, Shiraishi S, Matoba M: Plasma Concentration of Oxycodone and Pain during Hemodialysis in a Patient with Cancer. *J Palliat Care Med* 6:2, 2016
2. 八代英子、國府田正雄、村上敏史、田口奈津子：頸椎転移による頸部痛に対しハ

ローベスト装着により自宅退院が可能となった食道癌、多発骨転移の1例. 日本緩和医療学会誌、10:535～538,2015

3. 工藤尚子、三浦耕資、周東千緒、村上敏史、齊藤理、的場元弘：くも膜下モルヒネに高用量のブピバカインを併用し良好な鎮痛が得られた2症例. 日本ペインクリニック学会誌、20:491～495、2013
4. 齊藤理、赤木徹、竜野真維、三浦耕資、周東千緒、工藤尚子、村上敏史、的場元弘：抗真菌薬との薬物間相互作用で、少量ケタミンがせん妄を惹起したと思われる1例. 日本緩和医療学会誌、7: 506～509, 2012
5. 遠藤将宏、田中進一郎、村上敏史、門田和気、下山直人：硬膜外カテーテル抜去後、抗凝固療法開始に伴い重篤な硬膜外血腫を生じた1症例. 麻酔、55:424～427、2008
6. 高良真紀子、新井民江、伊藤伸大、戸田雅也、村上敏史、外須美夫：高度気道閉塞を来した気管腫瘍に対しラリンジアルマスク使用下にCO₂レーザー切除術を施行した心疾患合併患者の麻酔経験. 麻酔、55：441～444、2006

10. 図表

Fig. 1A

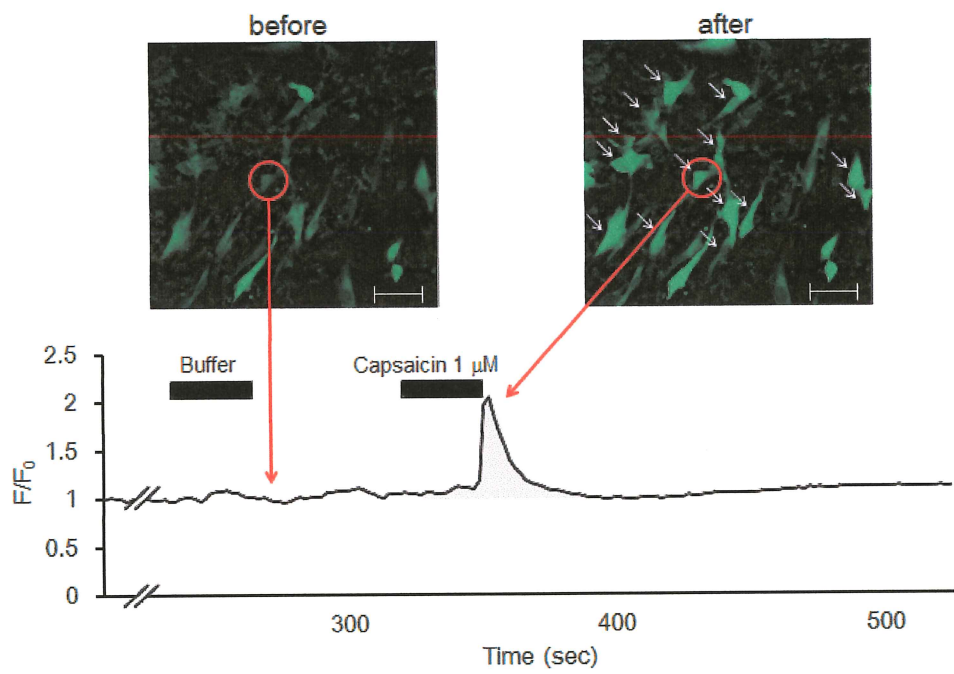


Fig. 1B

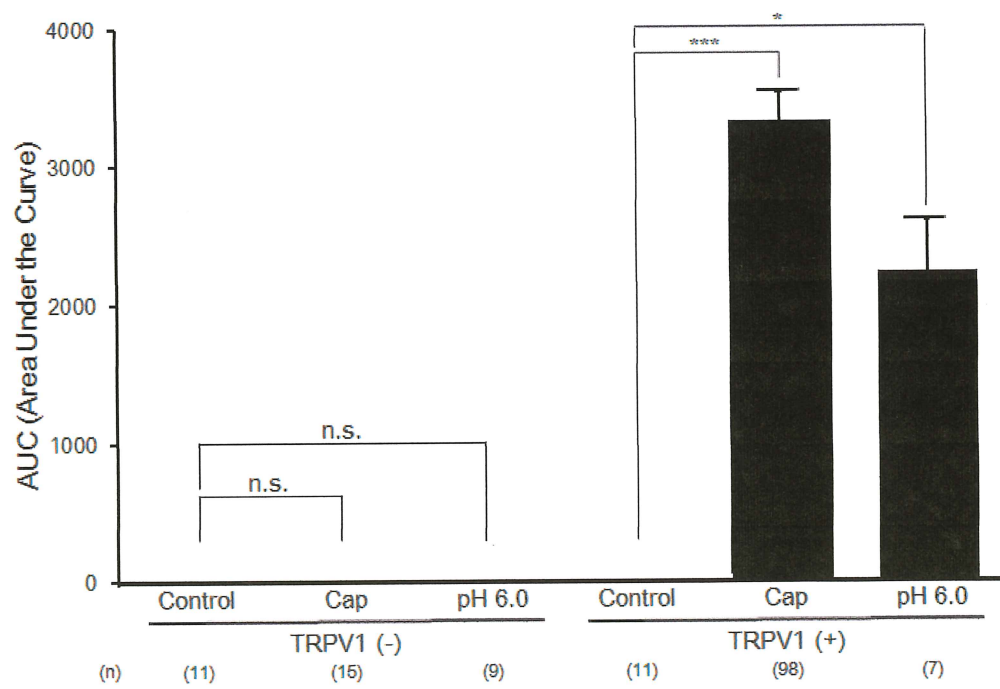


Fig. 1C

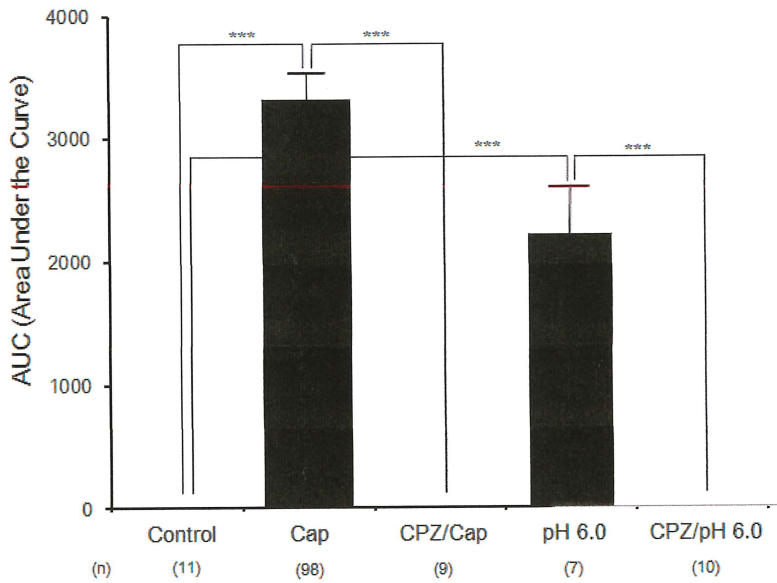


Fig.1D

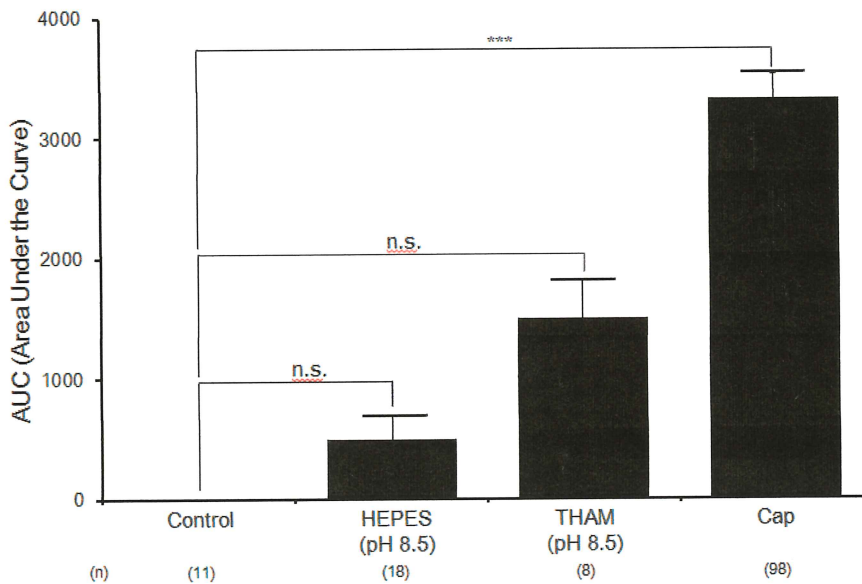


Fig. 1 Effects of compounds or buffers on the changes in intracellular concentrations of Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in BHK cells expressing hTRPV1 and GCaMP2. (A) A typical tracing for hTRPV1 activation induced by 1 μM capsaicin in cells expressing hTRPV1. (B) The effects of 1 μM capsaicin and KRP (pH 6.0), on the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in BHK cells with or without hTRPV1 expression. (C) The effects of 1 μM capsaicin, KRP (pH 6.0) with or without 10 μM capsazepine. (D) The effects of HEPES (pH 8.5), and 0.3 mM THAM (pH 8.5) on the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in BHK cells with hTRPV1 expression. Data are shown as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Cap, capsaicin; CPZ, capsazepine; NS, not significant. n, number of experiments

Fig. 2A

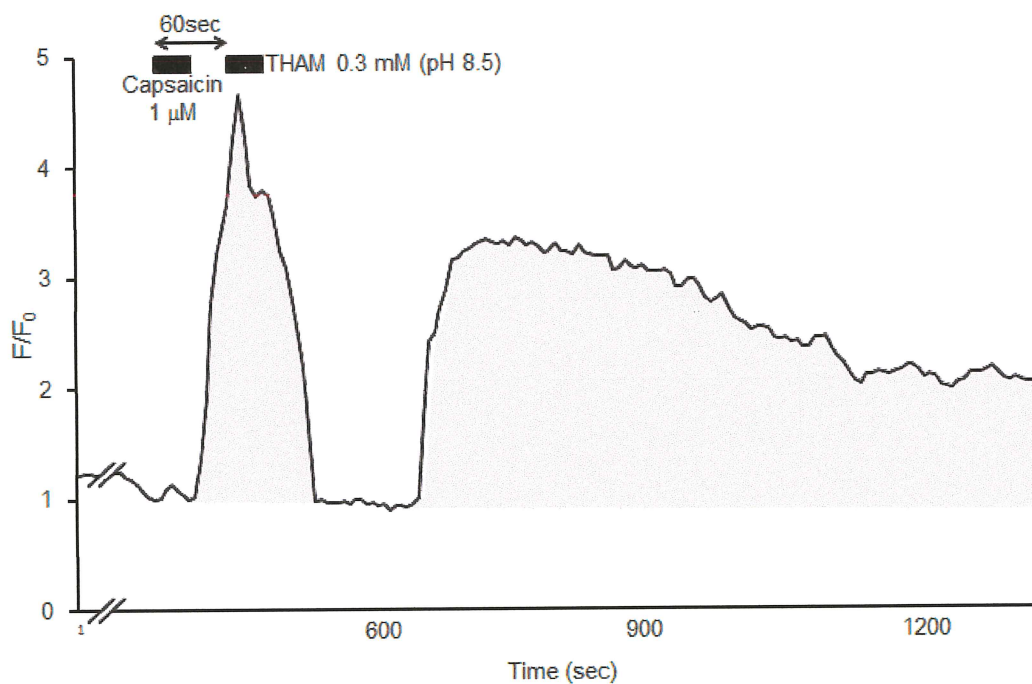


Fig.2B

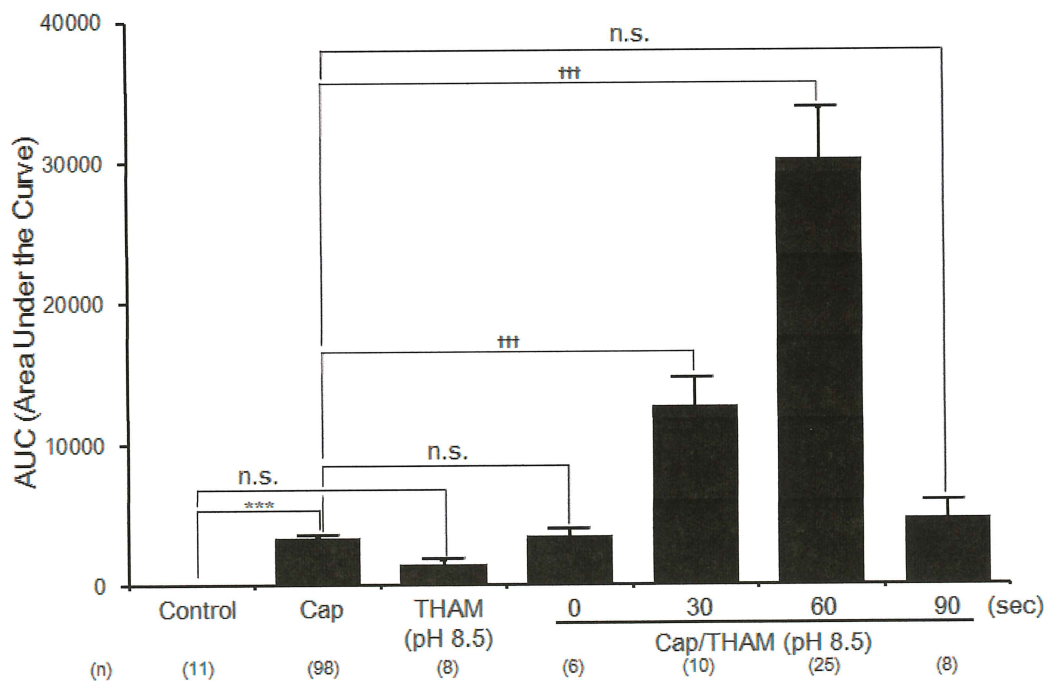


Fig.2C

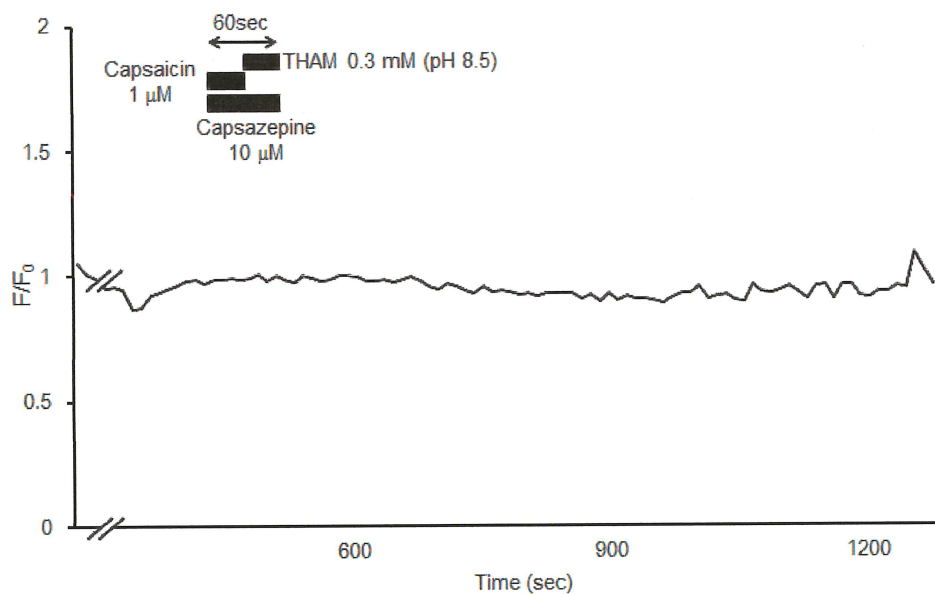


Fig.2D

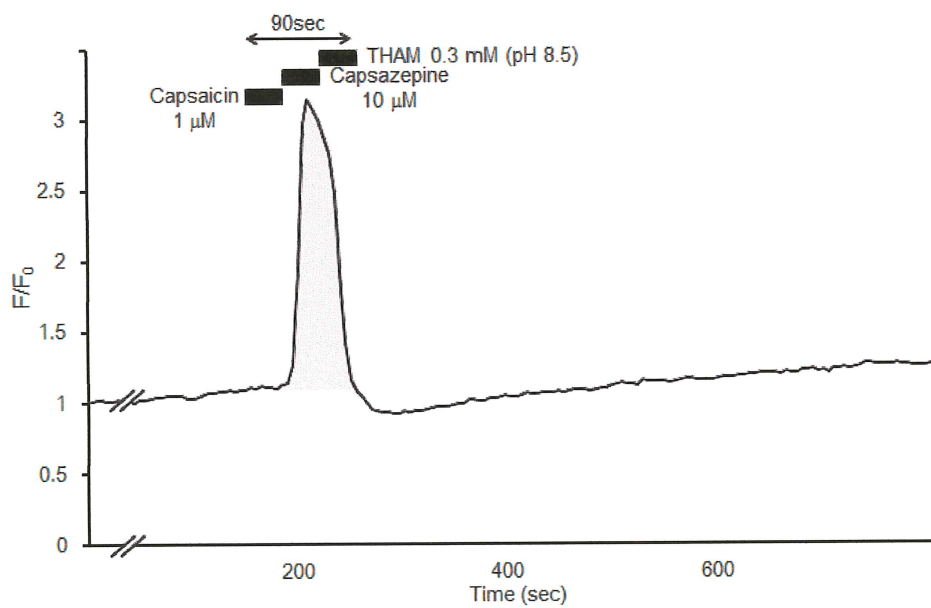


Fig.2E

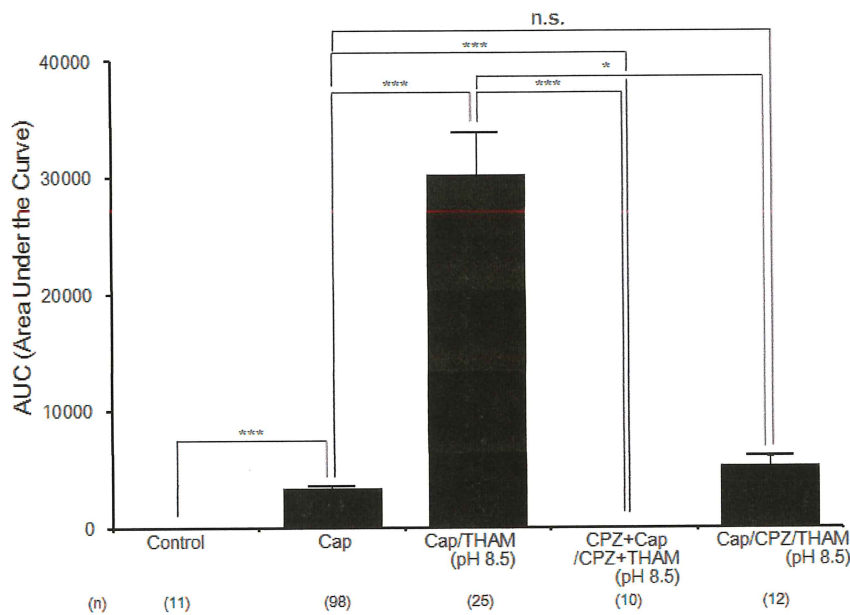


Fig. 2 Enhanced TRPV1 channel activity by THAM following application of capsaicin. (A) Increase in $[Ca^{2+}]_i$ following stimulation with 1 μ M capsaicin for 30 s followed by 0.3 mM THAM (pH 8.5) for 30 s. The interval time of applications between capsaicin and THAM is 30 s. (B) Time-dependent effects of THAM application after capsaicin application. Data are expressed as AUC (area under the curve) of $[Ca^{2+}]_i$ and shown as the mean \pm SEM. (C) Increase in $[Ca^{2+}]_i$ following stimulation with 1 μ M capsaicin for 30 s followed by 0.3 mM THAM (pH 8.5) for 60 s application with capsazepine. (D) Calcium influx following stimulation with 1 μ M capsaicin for 30 s followed by 10 μ M capsazepine for 30 s and followed by 0.3 mM THAM (pH 8.5) for 30 s. (E) Effects of capsazepine on capsaicin/THAM-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ in cells expressing hTRPV1. Data are expressed as AUC (area under the curve) of $[Ca^{2+}]_i$ and shown as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control; ††† $p < 0.001$ vs. 1 μ M capsaicin; CPZ, capsazepine. n, number of experiments.

Fig.3

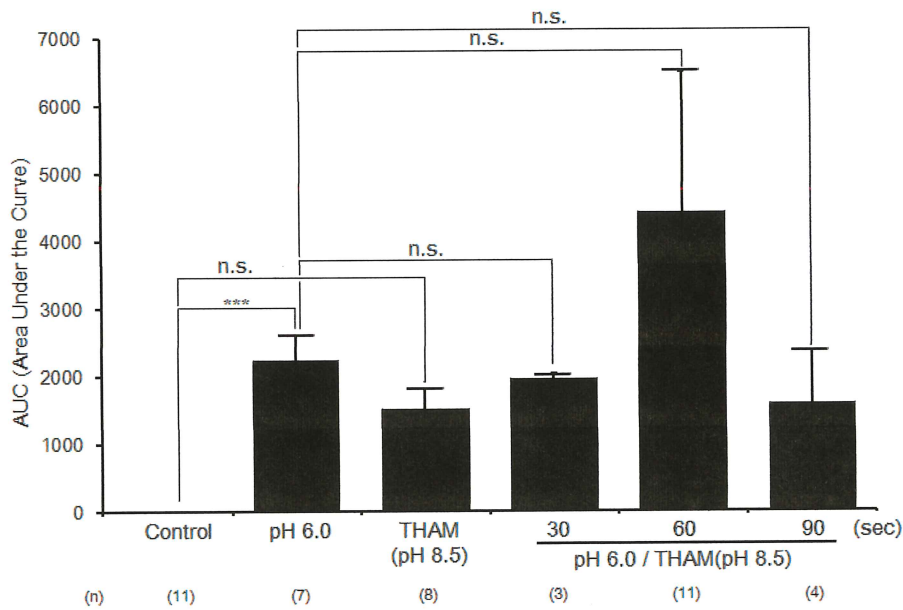


Fig. 3 Effects of varying timing of THAM application following KRP (pH 6.0) buffer treatment. Data are expressed as AUC (area under the curve) of $[Ca^{2+}]_i$ and shown as the mean \pm SEM. *** $p < 0.001$ vs. control. n, number of experiments.

Fig.4

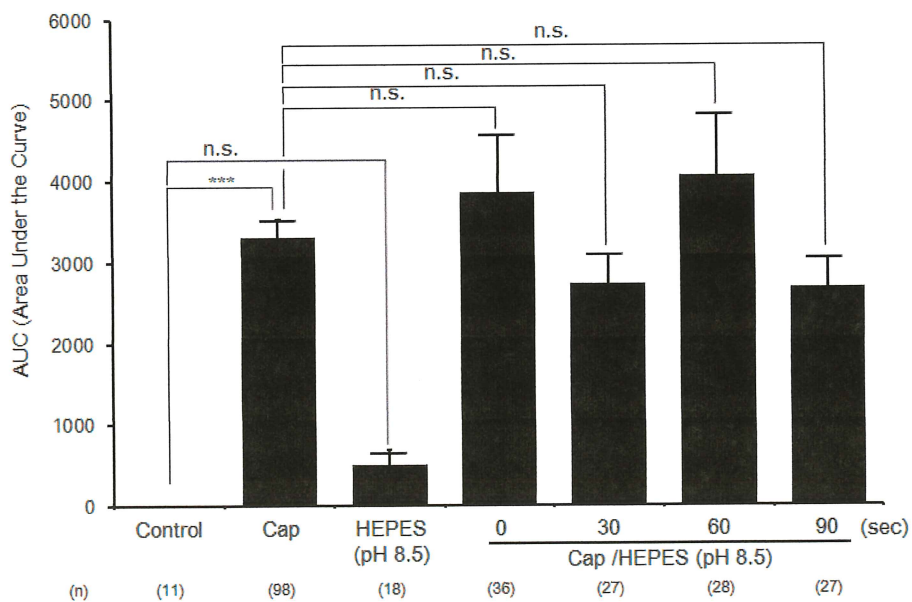


Fig. 4 Effects of varying timing of HEPES (pH 8.5) application following capsaicin application. Data are expressed as AUC (area under the curve) of $[Ca^{2+}]_i$ and shown as the mean \pm SEM. *** $p < 0.001$ vs. control. n, number of experiments.

Fig.5

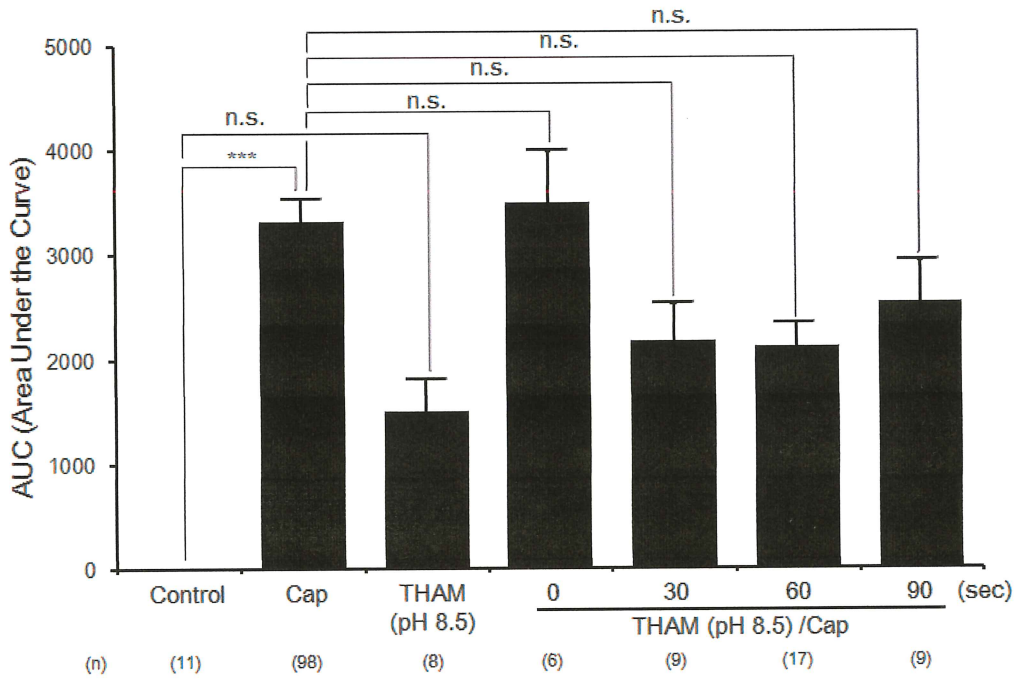


Fig. 5 Effects of varying timing of capsaicin application following THAM (pH 8.5) application. Data are expressed as AUC (area under the curve) of $[Ca^{2+}]_i$ and shown as the mean \pm SEM. *** $p < 0.001$ vs. control. n, number of experiments.