

# 学位論文要旨

氏名 村上 敏史



論文題目

「Tris-hydroxymethyl-aminomethane enhances capsaicin-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  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)」

指導教授承認印

金井 昭文



Tris-hydroxymethyl-aminomethane enhances capsaicin-  
induced intracellular Ca<sup>2+</sup> 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)

氏 名 村上 敏史

諸言

Transient Receptor Potential (TRP) チャンネルは TRPC、TRPV、TRPM、TRPML、TRPA などのファミリーからなるカチオンチャンネルである。その一つである TRPV チャンネルのサブファミリーである 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 チャンネル活性化への効果を解析した。

方法

Baby hamster kidney (BHK) 細胞に TRPV1 及びカルシウム指示蛋白 G-CaMP2 を共発現させ、カプサイシン (1 $\mu$ M)、KRP 緩衝液 (pH6.0)、HEPES 緩衝液 (pH8.5)、THAM (0.3mM)、カプサゼピン (10 $\mu$ M) を様々なタイミングで 30 秒間投与した。共焦点レーザーにより Ca<sup>2+</sup>イメージング法を用いて細胞 Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)を測定し、AUC (Area Under the Curve) を算出し解析を行った。

結果

TRPV1、G-CaMP2 を共発現させた BHK 細胞 (TRPV1 発現細胞) と非発現細胞に 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[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は上昇しなかったが、TRPV1 発現細胞ではカプサイシン、KRP 緩衝液により[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が上昇し、AUC の増加を認めた。カプサイシンと KRP 緩衝液による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇を確認後、カプサゼピンを共存させたところ[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は完全に抑制された。

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[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は認めなかったが、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 $[Ca^{2+}]_i$ 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 $[Ca^{2+}]_i$ 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 $[Ca^{2+}]_i$ 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。また③KRP 緩衝液を投与し、30、60、90 秒後に THAM を投与、④カプサイシン投与し、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、いずれの場合も有意な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は認めなかった。

### 考察

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では、THAM (pH8.5) が TRPV1 を強く活性化することを見出した。カプサイシン投与後の THAM 投与で起こる持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はカプサ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 秒後、60 秒後に有意な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められたが、0 秒後、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 チャンネルが開口し、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 秒後ではチャンネル開口しておらず、90 秒後ではチャン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 チャンネル開口は不要と考えられる。

本研究より、カプサイシン等により TRPV1 チャン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。

(1994 文字/2000 文字)