

氏 名 藤田 郁尚

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大乙第 202 号

学位授与の日付 平成 22 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 6 条第 2 項該当

学位論文題目 Chemical stimuli cause pain sensation through TRPA1
activation

論文審査委員 主 査 教授 富永 真琴
教授 久保 義弘
教授 箕越 靖彦
教授 水村 和枝（名古屋大学）

Transient receptor potential (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. TRPA1 belongs to the TRPA subfamily, and has attracted attention for its potential role in nociception. There are increasing numbers of reports about the stimuli causing TRPA1 activation. He focused on two chemicals causing pain sensation. One is alkali pH, the other is methyl p-hydroxybenzoate (methyl paraben). Vertebrate cells require a very narrow range of pH for survival. Cells accordingly possess physiological sensory and defense mechanisms for those occasions when the pH deviate from the permissible range. 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. Moreover, some physiological studies showed alkali pH caused acute pain sensation. On the other hands, parabens are commonly added in pharmaceutical, cosmetic and food products because of their wide antibacterial properties, low toxicity, inertness and chemical stability. However, parabens have been reported to cause contact dermatitis reactions and have been implicated in numerous cases of contact sensitivity on cutaneous exposure, when parabens have been applied to damaged or broken skin. Here, he used Ca^{2+} -imaging methods to show that both alkaline pH and methyl paraben caused increase in intracellular Ca^{2+} concentration in HEK293 cells expressing TRPA1. Moreover, ammonium chloride which causes intracellular alkalization without affecting extracellular pH through ammonia's binding with protons in the cytosol, also caused increase in intracellular Ca^{2+} concentration in the cells expressing TRPA1. In order to facilitate TRPA1 activation by intracellular alkalization and methyl paraben, he used the patch-clamp methods to show that ammonium chloride- or methyl paraben-activated inward currents had an EC_{50} of 9.2 mM or 4.4 mM, respectively. These currents exhibited an outwardly rectifying current-voltage (I-V) relationship. Furthermore, a reversal potentials of the I-V curves were about 0 mV, indicating the involvement of the opening of a nonselective cation channel. These properties are identical to those reported for TRPA1 currents evoked by known stimuli including isothiocyanate and thiosulfinate compounds. Both ruthenium red and camphor, famous TRPA1 blockers, caused almost complete inhibition of both intracellular alkalization and methyl paraben induced TRPA1 currents. In addition, he performed single-channel recordings with an inside-out configuration in HEK293 cells expressing TRPA1 to examine whether intracellular alkaline pH

activates TRPA1 in a membrane-delimited fashion. Increasing bath pH to 8.0 or 8.5 increased the channel opening in a pH-dependent manner in the inside-out configuration, indicating that alkaline pH activated TRPA1 from the inside. In isolated mouse DRG neurons, ammonium chloride and methyl paraben induced increase in intracellular calcium concentration and inward currents in cells which responded to both AITC and CAP like in HEK293 cells. Moreover, in DRG neurons from TRPA1-deficient mice, none of the capsaicin-sensitive cells responded to either ammonium chloride or AITC. Mutant analyses suggested that the two N terminal cysteine residues (C422 and C622), which were recently reported as reversible covalent modified region by structurally unrelated compounds, were involved in activation by intracellular alkalization. Stepwise alkalization potentiates TRPA1 responses evoked by 20 μ M AITC or 4-hydroxy-2-nonenal both of which are known to act on the cysteine residues activating TRPA1, suggest the possibility that there are molecules which have the ability to activate TRPA1 through action on the cysteine residues and are retained even in the excised patch membrane and that alkalization enhance the molecules' action. Moreover, preincubation with dithiothreitol showed significant inhibition of ammonium chloride-evoked inward current, suggesting that disulphide modification of cysteines is necessary for TRPA1 activation by intracellular alkalization. Furthermore, intraplantar injection of ammonium chloride or methyl paraben into the mouse hind paw caused pain-related behaviors, which were significantly reduced by the concomitant application of ruthenium red reported as broad TRP channels blocker. Injection of methyl paraben also induced paw edema, a phenomenon of neurogenic inflammation, and increased licking or biting behavior in a dose-dependent manner. Moreover, these behaviors by ammonium chloride were not observed in the TRPA1-deficient mice. These results suggest that intracellular alkalization and methyl paraben causes pain sensation through activation of TRPA1.

Transient receptor potential (TRP) channels ファミリーに属する TRPA1 チャネルは、種々の化学物質等により活性化されることがこれまでに報告され、侵害刺激受容において役割を果たす分子と認識されている。本論文において、申請者 藤田郁尚氏は TRPA1 チャネルを活性化するふたつの新しい刺激を見いだした。

水素イオン濃度 pH は、細胞の生存にとって重要な因子であるため、当然、細胞は、pH が至適範囲から逸脱した時に感知する機構を有していると考えられる。感覚神経細胞において、酸性 pH が TRPV1 チャネルや ASIC チャネルによって感知されることはよく知られているが、アルカリ性 pH の感知機構の詳細は明らかにされていない。また、抗菌作用等を有し化粧品等の成分として使用されている paraben という物質は、刺すような刺激感覚を与えることも知られているが、その分子機構は明らかにされていない。

藤田氏は、これらの未解決の問題点に、細胞内 Ca^{2+} イメージング法による Ca^{2+} 流入の測定と、全細胞パッチクランプ法による膜電流の測定によりアプローチし、外液のアルカリ性 pH、および methyl paraben が、TRPA1 チャネルを活性化することを見いだした。さらに、inside-out 引き抜きパッチクランプ法により、アルカリ pH が細胞内側から作用していることを明らかにし、また、単一チャネルレベルでの活性化も確認した。また、変異体解析により、アルカリ pH は、N 端細胞内領域の二つの Cys 残基の、酸化剤による修飾の感受性を高めることによって活性化を引き起こしていることを明らかにした。さらに、個体レベルでも、マウスの足底に、細胞内アルカリ性 pH を引き起こす塩化アンモニウム、もしくは methyl paraben を投与すると、痛覚関連の行動を示すこと、そして、TRPA1 遺伝子ノックアウトマウスではその行動が見られないことを観察した。これらの結果から、藤田氏は、アルカリ pH および paraben が、TRPA1 チャネルを活性化することにより痛覚を引き起こしているという結論を明確に導いた。

本研究におけるこれらの知見は、侵害刺激受容体として認識されている TRPA1 チャネルの受容スペクトラムに、2つの新規因子を見いだしたものである。アルカリ pH に関する知見は、種々の生体现象における重要な生理学的意義を有しており、paraben に関する知見は、今後の創薬、化粧品開発等における注意を喚起するもので、社会的な意義をも有する。以上の理由から、審査委員会は、全員一致で、本論文が学位論文として相応しいものであると判断した。