

氏 名 橘高 裕貴

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1693 号

学位授与の日付 平成26年3月20日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Involvement of lysophosphatidic acid-evoked TRPA1 and
TRPV1 activation in peripheral itch sensation in mice

論文審査委員 主 査 教授 久保 義弘
教授 富永 真琴
教授 深田 正紀
教授 倉石 泰 富山大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

The sensation of itch, formally called pruritus is defined as ‘an unpleasant cutaneous sensation that provokes a desire to scratch’. So far, many pruritogens have been revealed to activate receptors or ion channels expressed in dorsal root ganglion (DRG) neurons that transmit itch sensation in the periphery. Some kinds of pruritus involved in pathophysiological conditions such as atopic dermatitis, uremia with hemodialysis and cholestasis are often resistant to antihistamines. This suggests that there are histamine-independent mechanisms, however, which have not been fully understood. Lysophosphatidic acid (LPA) is believed to be one of the molecules involved in the histamine-independent mechanisms (cholestatic pruritus in humans) and reported to induce itch-related and pain-related behaviors in mice. However, whether LPA induces itch, pain or both in the periphery is unclear. In addition, the cellular and molecular mechanisms of the LPA-induced itch and/or pain sensation are not elucidated.

First, I investigated whether LPA induces itch and/or pain using a cheek injection model to distinguish itch- and pain-related behaviors. LPA markedly induced itch-related scratching behaviors without increases in pain-related wiping behaviors in wild-type (WT) mice. The physiological role of LPA was suggested to induce itch sensation rather than pain sensation in the periphery in mice. Therefore, I examined the effect of LPA on mouse DRG neurons and how LPA affects the DRG neurons using a Ca^{2+} -imaging method. LPA robustly increased intracellular Ca^{2+} concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in approximately half of mouse DRG neurons, suggesting that DRG neurons directly responded to LPA. The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases were abolished under an extracellular Ca^{2+} -free condition, suggesting that there were LPA-responding Ca^{2+} -permeable molecules expressed in the plasma membrane of DRG neurons. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and vanilloid 1 (TRPV1) are Ca^{2+} -permeable non-selective cation channels, which are reported to be expressed in DRG neurons and contribute to the peripheral itch transduction. Therefore, the functional expressions of TRPA1 and TRPV1 in LPA-responding (LPA^+) DRG neurons were investigated by application of the

selective agonists, allyl isothiocyanate and capsaicin, respectively. Approximately 90% of the LPA⁺ DRG neurons functionally expressed TRPA1 and/or TRPV1. To further examine the involvement of TRPA1 and/or TRPV1 in the LPA actions, cells were treated with selective antagonists of TRPA1 and TRPV1 (A967079 and capsazepine, respectively) before application of LPA. As a result, both A967079 and capsazepine decreased LPA⁺ neurons. To further clarify the contribution of TRPA1 and TRPV1 to the LPA-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases, DRG neurons obtained from WT, TRPA1 knock-out (TRPA1KO), TRPV1KO and TRPA1/TRPV1 double KO (A1V1DKO) mice were used and I found that LPA⁺ neurons were decreased in each of the KO strain. These results of the Ca^{2+} -imaging study suggested that LPA caused $[Ca^{2+}]_i$ increases through activation of both TRPA1 and TRPV1. Furthermore, I observed that LPA-induced scratching behaviors in a cheek-injection model were reduced in TRPA1KO, TRPV1KO and A1V1DKO mice, indicating that the LPA-induced scratching behaviors were TRPA1- and/or TRPV1-dependent, which was consistent with the results of the Ca^{2+} -imaging study. The LPA-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases were inhibited by not only antagonists of TRPA1 and TRPV1 but also an LPA receptor antagonist (H2L 5765834), suggesting the possible signaling cascade to activate TRPA1 and/or TRPV1 after LPA receptor activation. Possibility of direct activation of TRPA1 by LPA was also examined by the inside-out patch-clamp recording of human embryonic kidney 293T cells expressing mouse TRPA1. Increases in single channel openings upon LPA application in an excised membrane patch were observed, which indicated that TRPA1 can be directly activated by LPA in a membrane-delimited manner. These results indicated that there were direct and indirect pathways in the LPA-induced TRPA1 activation.

Taken together, I concluded that LPA induced itch-related scratching behaviors in a TRPA1- and/or TRPV1-dependent manner without increasing pain-related wiping behaviors and that LPA caused $[Ca^{2+}]_i$ increases in DRG neurons through TRPA1 and/or TRPV1 activation. I also found that LPA directly activated TRPA1 and that LPA could activate TRPA1 and/or TRPV1 through some signaling cascade after LPA receptor activation as well. The results presented in this study suggest that the action of LPA on TRPA1 could be involved in the

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

peripheral itch signaling in humans. Thus, it is intriguing to speculate that antagonizing TRPA1 or TRPV1 function could lead to novel anti-itch therapies.

痒みの感覚受容に関して、様々な報告がなされているが、依然として、その分子機構については不明な点が多い。また、Lysophosphatidic acid (LPA) は、痛みに関与するとともに、痒みを引き起こすとも報告されているが決着はついていない。出願者 橘高 裕貴 氏は、痒み感覚において LPA が果たす役割と、その感覚受容の分子機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

マウスを用いて行動生理学的に痒み感覚を解析するためには、痛み応答行動と痒み応答行動の識別が重要である。橘高氏は、痛み受容の場合には、ぬぐいとり行動が見られ、一方、痒み受容の場合は、引っ掻き行動がみられ、両者が識別可能であることを示した。この実験結果に立脚して、LPA に対するマウスの応答を解析したところ、LPA が主として、痒み感覚を与えていることが明らかにされた。

次に、橘高氏は、LPA を受容する分子の同定を行った。まず、分離培養したマウスの後根神経節の神経細胞に LPA を投与することにより、細胞外からの Ca^{2+} 流入による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がおこることを明らかにした。化学受容により Ca^{2+} 流入に関わる後根神経節神経細胞に発現する分子として TRPA1 チャンネル、TRPV1 チャンネルが知られているため、次のステップとして、これらに対する選択的アゴニスト、アンタゴニストを用いた実験を行い、両チャンネルが、LPA に対する応答に関与していることを示すデータを得た。また、橘高氏は、パッチクランプ法によるインサイドアウトモードでの単一チャンネル記録実験に取り組み、LPA 投与による TRPA1 チャンネルの活性化の記録に成功し、このことから、細胞質の情報伝達系等を介さない膜局所での活性化があることを明確に示した。さらに、多数の変異体を用いた分子機能解析により、LPA 投与による活性化に関わる TRPA1 チャンネルのアミノ酸残基が、N 末端細胞内領域にある Lysine672- Lysine673、および C 末端細胞内領域にある Lysine977- Arginine978 であることを明らかにした。

さらに、橘高氏は、TRPA1 チャンネルの遺伝子破壊 (KO) マウス、TRPV1 チャンネル KO マウス、もしくはその両者の二重 KO マウスを用いた実験を行った。二重 KO マウスでは、後根神経節神経細胞の細胞外 LPA 投与に対する細胞内 Ca^{2+} 応答、および痒み行動が失われたことから、TRPA1 および TRPV1 が必須であることを示した。

一方、LPA には、G タンパク質結合型の受容体の存在が知られているため、橘高氏は、マウス後根神経節神経細胞に対し、LPA 受容体のアンタゴニストを投与する実験も行った。その結果、部分的に応答が抑制されたことから、細胞外に投与された LPA に対する応答には、TRPA1 チャンネルを、直接活性化する部分と、LPA 受容体の活性化を介して間接的に活性化する部分の両方があることが、明らかになった。

以上、本研究は、分子生物学的手法を組み合わせた細胞生理学的解析およびマウス行動生理学的解析の実験結果を統合して、LPA を痒み物質として同定し、その作用の分子基盤が、感覚神経節神経細胞に発現する TRPA1 チャンネルおよび TRPV1 チャンネルの活性化によることを明確に示したもので、その科学的価値は高く評価できる。以上の理由から、審査委員会は、

(Separate Form 3)

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。