

いのうえ たかし

氏名（本籍地） 井上 貴詞

学位の種類 博士（農学）

学位記番号 農博第968号

学位授与年月日 平成21年3月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項

研究科，専攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科生物産業創成科学専攻

論文題目 揮発性有機化合物（VOCs）刺激による三叉神経応答の発現に関する神経科学的研究—ラット三叉神経節細胞の細胞内カルシウムイメージング法による解析—

博士論文審査委員（主査）教授 駒井 三千夫

教授 加藤 和雄

教授 有本 博一（生命科学研究所）

# 論文内容要旨

## 第1章 序論

体性感覚系の化学物質に対する感受性は、有害化合物への曝露に対する生体防御システムとしての役割を担い、惹起される痛みは侵害に対する警告信号となっている。多くの揮発性有機化合物 (Volatile Organic Compounds, VOCs) は三叉神経終末を活性化し、痛みを伴う侵害性の感覚を惹起するほか、呼吸不全<sup>1)</sup>などの生体反応を引き起こすことが知られ、VOCs の中でも、燃焼生成物 (排気ガス、燃焼木材等) に含まれる不飽和アルデヒド類は、強力な感覚刺激物質とされている。しかし、それら化学物質の受容および感覚シグナルの伝達に関する検討は少なく、カプサイシン (CAP)、ニコチンなど一部の化学物質について、標的受容機構が知られているのみである。CAP による脱感作試験から、複数の VOCs 応答に CAP 感受性神経が機能するとされるが<sup>2)</sup>、一方で CAP 受容体 (TRPV1) 自身は少なくとも数種の VOCs 応答に関与しないとされるなど<sup>3)</sup>、VOCs による感覚刺激の詳細な機構については更なる解析が必要とされている。本研究では化合物の疎水性、官能基種、不飽和結合有無などの化学構造的要因が、体性感覚活性に与える影響の把握、ならびに重大な環境汚染物質とされる $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒドによる神経細胞応答に関与する受容機構を明らかにするための検討を実施した。

## 第2章 多様な細胞機構を介した揮発性化合物 (VOCs) による体性感覚発現

VOCs の体性感覚活性に影響を与える化学構造的要因および関与する細胞機構に関する知見を得ることを目的に、炭素数 4-7 の $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒド (Enaldehydes, EA)、直鎖アルデヒド (Aldehydes, AL) および直鎖アルコール (Alcohols, OL) (図 1) に対する三叉神経節 (TG) 細胞の感受性を、細胞内カルシウムイオン濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の変化をその指標として検討した。

実験動物は、生後 1-3 日齢の Sprague-Dawley ラット (雌雄問わず) を用いた。6-10 匹を断頭処置後、TG を摘出し、酵素処理、密度勾配遠心法により神経細胞を単離した。カバーガラス上に TG 細胞を培養し、カルシウムイメージング法による細胞活性測定に供した。

### 【濃度応答連関】

炭素数 5 の各化合物群に対する典型的な細胞応答例を図 2 に示す。濃度-応答細胞割合の関係から、細胞活性化能は EA>AL>OL の順となった (図 3)。EA は高濃度域で応答細胞割合が頭打ちとなり、AL、OL ではより急勾配の関係が認められた。EA は一部細胞上に限定的 (約 35%) に発現する機構、AL、OL は細胞上に幅広く分布する機構へ作用する可能性が示された。

【疎水性】 AL、OL は、炭素鎖の長い化合物ほど、より低濃度域から細胞の活性化を開始した。一方、EA では C4-C7 EA の曲線の間統計的に有意な差異はなかった ( $\chi^2$ -test,  $\chi^2 = 19.998$ ,  $df = 51$ ,  $P = 0.9999$ )。AL、OL の結果は、ヒトを被験者とした試験結果<sup>4)</sup>と一致する。一方、EA に関しては、この炭素

鎖数の範囲において、疎水性、立体特異性が化合物と神経細胞表面との相互作用に影響を与えないことが示された。

【官能基】 同一濃度において、AL は対応する OL よりも高い活性を示したが、ヒトを被験者とした試験では、逆の傾向が報告されている<sup>5)</sup>。C4-C7 の AL、OL について、OL は対応する AL よりも高いオクタノール-水分配係数を有しており、本試験結果とヒトによる結果との不一致が解釈可能となる(上皮組織の有無)。

【分子内二重結合】 低濃度水準において、EA は AL に比べ多くの細胞に応答をもたらし、マウス行動実験による報告<sup>6)</sup>と同様の傾向となった。当該報告においては、複数の化合物種に関して $\alpha$ 位二重結合が体性感覚活性を大幅に上昇させるとしており、 $\alpha$ 位炭素に対する生体組織の求核的作用が、その主要因であると考察しているが、本試験における EA、AL の活性差異についても同様の解釈が可能となる。

### 【 $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒド(EA)、直鎖アルデヒド(AL)、および直鎖アルコール(OL)に応答する神経種】

5EA、CAP および cooling に対する典型的な細胞応答例を図 4a および図 4b に示す。5EA、5AL、5OL に応答性の細胞はいずれも CAP、cooling 感受性細胞に制限されず分布した(図 5)。加えて、EA、AL は、CAP、cooling 両者に非感受性の細胞も活性化した(図 6)。

TRPV1 陽性の侵害受容性神経の活性化は、灼熱感、痛み、痒み等の原因メカニズムとされる<sup>7-9)</sup>。5EA、5AL、5OL も CAP 感受性細胞の一部を活性化したことから、この作用が既に報告される刺激性発現<sup>5),10)</sup>の初期メカニズムであると考えられる。また、各化合物は cooling 感受性の神経細胞の一部も活性化したことから、冷刺激やメントール等冷感剤と感覚的な相互作用を有する可能性がある。

### 【 $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒド(EA)、直鎖アルデヒド(AL)および直鎖アルコール(OL)による神経細胞活性化メカニズム】

5EA、5AL、5OL に対する応答は、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の存在に依存した(図 7)。また、5EA、5AL 応答は、細胞外の  $\text{Na}^+$  の存在に対しても依存した(図 8)。一方、5OL 応答性細胞は  $\text{Na}^+$  除去条件下で多様な挙動を示した(図 9)。これら結果より、各化合物による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は、細胞内ストアからの遊離ではなく、細胞外からの流入によるものと考えられる。また、5EA、5AL については、初期的に Na 電流を誘発し、その後電位依存性カルシウムチャネル(VGCC)を活性化するものと考えられる。5OL については VGCC<sup>11),12)</sup>が細胞応答に直接介在している可能性がある。

TRPV1 受容体阻害剤、カプサゼピンの適用は、5EA による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇をわずかに減少させたが(図 10)、対照試験と比較して統計的に有意な差は無く(unpaired *t*-test,  $P > 0.05$ )、5EA 応答に TRPV1 受容体が大きく関与する可能性は低いことが示された。また、5EA、5AL、5OL は、一部の CAP、cooling 感受性細胞のみを活性化したことから、細胞応答に TRPV1 受容体や cooling に対応する TRPM8 受容体<sup>13),14)</sup>が直接的に関与する可能性は低いものと推察される。

### 第3章 *trans*-2-ペンテナール応答に関与する陽イオンチャネル

環境中 VOCs の中でも重大な汚染物質として知られる EA に注目し、炭素数 5 の *trans*-2-ペンテナール (5EA) をモデル化合物とした検討を実施した。具体的には、三叉神経上に発現する各種陽イオンチャネルの 5EA 応答への関与を調査することを目的に、主に薬理学的手法による検討を実施した。

#### 【5EA 感受性神経細胞のサイズ分布】

5EA 感受性は広範囲なサイズ領域の細胞に観測されたが、サイズ分布の形状は非感受性細胞のパターンと比較してやや小径側にシフトしており (図 11)、5EA が小径から中径のサイズ領域に属する細胞群 (C 線維、Aδ線維) を優先的に活性化する可能性が示された。

#### 【5EA 応答に対する電位依存性ナトリウムチャネル (VGSC) の寄与】

第 2 章の結果<sup>15)</sup>を受け、5EA 応答における電位依存性ナトリウムチャネル (VGSC) の寄与を調査するため、5EA 応答に与えるテトロドトキシン (TTX) の影響を検討した。その結果、5EA 応答の一部が、TTX の適用により強く抑制された (約 35 % の抑制、 $P < 0.000001$ , unpaired *t*-test、図 12a, b)。

#### 【5EA 応答に対する侵害受容性カチオンチャネルの寄与】

5EA 応答に関与し得る候補機構として、2 種のカチオンチャネル、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) および P2X 受容体について調査を実施した。それぞれ対応する阻害剤の適用は、5EA 応答に対して大きな抑制効果をもたらさず ( $P > 0.05$ 、図 13a, c;  $P > 0.05$ 、図 13b, c)、nAChR、P2X 受容体が 5EA 応答へ関与する可能性は低いことが示された。

#### 【5EA 応答に対する電位依存性カルシウムチャネル (VGCC) の寄与】

第 2 章の結果<sup>15)</sup>を受け、5EA 応答における VGCC の寄与を調査するため、L-、P/Q-および N-タイプの VGCC について検討した。L-および P/Q タイプ VGCC に対応する阻害剤は、両者とも 5EA 応答を一定程度抑制 (19% の抑制、 $P < 0.001$ 、図 14a,d; 44% の抑制、 $P < 0.000001$ 、図 14b,d) し、各タイプ VGCC が 5EA 応答に関与する可能性が示された。一方、N-タイプ VGCC 阻害剤は 5EA 応答に微小な抑制作用を示し ( $P > 0.05$ 、図 14c,d)、当該チャネルが大きく関与する可能性は低いものと推察される。ラット TG 細胞上には、T-、L-、N-タイプ<sup>11)</sup>、P/Q-および R-タイプ<sup>12)</sup>の VGCC の存在が確認されている。本試験で抑制されなかった残りの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、1) T-、R-タイプ VGCC によって担われているか、2) 阻害剤による抑制が不十分であった可能性についても否定できない。

## 総括

揮発性有機化合物 (VOCs) の体性感覚発現機構を明らかにするための検討を行ない、以下の新しい知見が得られた。

1. 炭素数 4-7 の EA、AL、OL のラット TG 細胞に対する濃度-細胞応答割合の関係から、1) EA は TG 細胞上に限定的 (約 35%) に発現する機構、2) AL、OL は疎水性の影響を受け、且つ TG 細胞上に幅広く分布する機構を介して活性発現していることが示唆された。
2. 5EA、5AL、5OL は CAP、cooling 感受性細胞を部分的に活性化したことから、既知の侵害受容性チャネルである TRPV1、TRPM8 受容体を介して活性発現している可能性は低い。
3. 5EA、5AL、5OL による細胞応答は、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の存在に依存しており、5EA、5AL については細胞外  $\text{Na}^{+}$  の存在に対しても強く依存したことから、5EA、5AL は初期様式として VGSC 由来電流の誘発があり、その後 VGCC の活性化へと繋がっている可能性が示された。
4. TTX の適用により一部の TG 細胞における 5EA 応答が有意に抑制されたことから、TTX 感受性 Na チャネルの 5EA 応答に対する関与が示唆された。一方、5EA 応答に nAChR、P2X 受容体が関与する可能性は低く、L-および P/Q-タイプ VGCC が 5EA 応答に関与する可能性が高いことが示された。

本研究によって揮発性有機化合物 (VOCs) の体性感覚発現機構の一部が明らかにされた。

## 引用文献

- 1) CASSEE, F.R., ARTS, J.H., GROTEN, J.P., FERON, V.J. (1996). Sensory irritation to mixtures of formaldehyde, acrolein, and acetaldehyde in rats. *Arch. Toxicol.*, 70, 329-337.
- 2) SILVER, W.L., MASON, J.R., MARSHALL, D.A., MARUNIAK, J.A. (1985). Rat trigeminal, olfactory and taste responses after capsaicin desensitization. *Brain. Res.*, 333, 45-54.
- 3) SYMANOWICZ, P.T., GIANUTSOS, G., MORRIS, J.B. (2004). Lack of role for the vanilloid receptor in response to several inspired irritant air pollutants in the C57Bl/6J mouse. *Neurosci. Lett.*, 362, 150-153.
- 4) COMETTO-MUÑIZ, J.E., CAIN, W.S. (1995). Relative sensitivity of the ocular trigeminal, nasal trigeminal and olfactory systems to airborne chemicals. *Chem. Senses*, 20, 191-198.
- 5) COMETTO-MUÑIZ, J.E., CAIN, W.S., ABRAHAM, M.H. (1998). Nasal pungency and odor of homologous aldehydes and carboxylic acids. *Exp. Brain Res.*, 118, 180-188.
- 6) ALARIE, Y., SCHAPER, M., NIELSEN, G.D., ABRAHAM, M.H. (1998). Structure-activity relationships of volatile organic chemicals as sensory irritants. *Arch. Toxicol.*, 72, 125-140.
- 7) CATERINA, M.J., JULIUS, D. (2001). The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev.*

*Neurosci.*, 24, 487-517.

- 8) SCHMELZ, M., SCHMIDT, R., BICKEL, A., HANDWERKER, H.O., TOREBJORK, H.E. (1997). Specific C-receptors for itch in human skin. *J. Neurosci.*, 17, 8003-8008.
- 9) JORDT, S.E., BAUTISTA, D.M., CHUANG, H.H., MCKEMY, D.D., ZYGMUNT, P.M., HOGESTATT, E.D., MENG, I.D., JULIUS, D. (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*, 427, 260-265.
- 10) DOTY, R.L., COMETTO-MUÑIZ, J.E., JALOWAYSKI, A.A., DALTON, P., KENDAL-REED, M., HODGSON, M. (2004). Assessment of upper respiratory tract and ocular irritative effects of volatile chemicals in humans. *Crit. Rev. Toxicol.*, 34, 85-142.
- 11) KIM, H.C., CHUNG, M.K. (1999). Voltage-dependent sodium and calcium currents in acutely isolated adult rat trigeminal root ganglion neurons. *J. Neurophysiol.*, 81, 1123-1134.
- 12) IKEDA, M., MATSUMOTO, S. (2003). Classification of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in trigeminal ganglion neurons from neonatal rats. *Life Sci.*, 73, 1175-1187.
- 13) MCKEMY, D.D., NEUHAUSSER, W.M., JULIUS, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416, 52-58.
- 14) PEIER, A.M., MOQRICH, A., HERGARDEN, A.C., REEVE, A.J., ANDERSSON, D.A., STORY, G.M., EARLEY, T.J., DRAGONI, I., MCINTYRE, P., BEVAN, S., PATAPOUTIAN, A. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, 108, 705-715.
- 15) INOUE, T., BRYANT, B.P. (2005). Multiple types of sensory neurons respond to irritating volatile organic compounds (VOCs): calcium fluorimetry of trigeminal ganglion neurons. *Pain*, 117, 193-203.

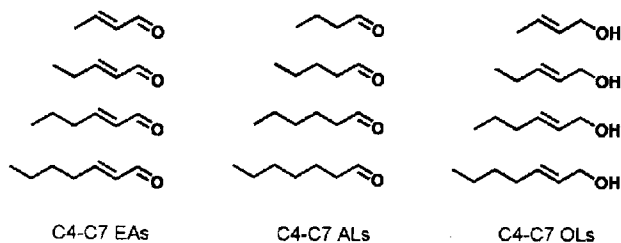


図 1. 本研究で対象とした化合物群:  $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒド群 (EA)、直鎖アルデヒド群 (AL) および直鎖アルコール群 (OL)

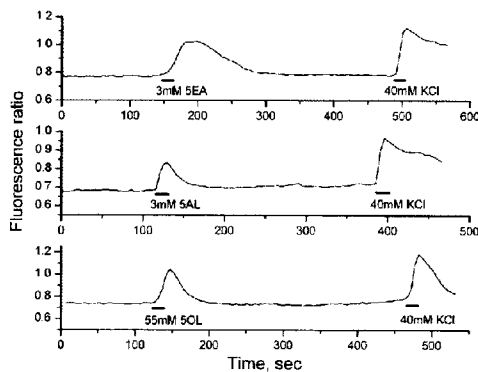


図 2. Responses of intracellular calcium in single neurons; 3 mM pentenal (upper graph), 3 mM pentanal (middle graph), and 55 mM pentanol (lower graph). KCl (40 mM) served as a positive control. Stimulus delivery is indicated by a horizontal bar.

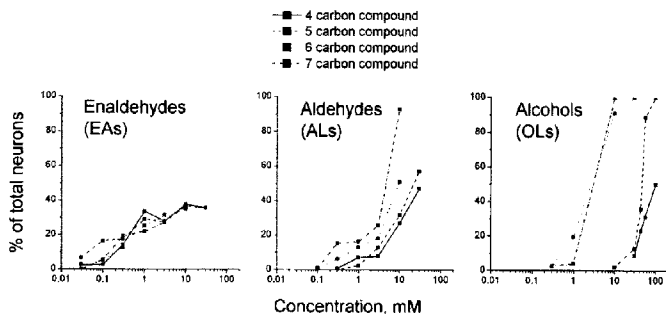


図 3. Concentration response functions of trigeminal neurons for enaldehydes (left), aldehydes (middle) and alcohols (right) of differing carbon chain length. Results are presented as the % of neurons responding. Four carbon compounds are plotted as solid lines, five carbon compounds as dashed lines, six carbon compounds as dotted lines and seven carbon compounds as dashed/dotted lines.

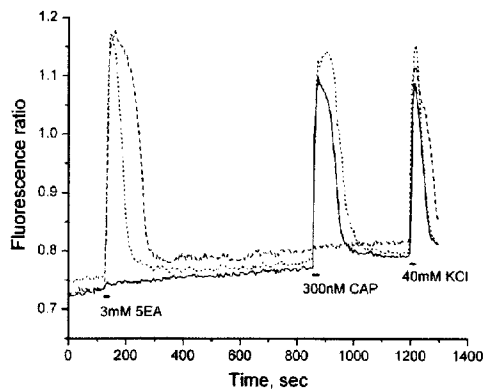


図 4a. Responses of neuronal intracellular calcium to 3 mM 5EA and 300 nM CAP. The responses of three neurons are plotted; two, each one sensitive to a single compound and one sensitive to both 5EA and CAP.

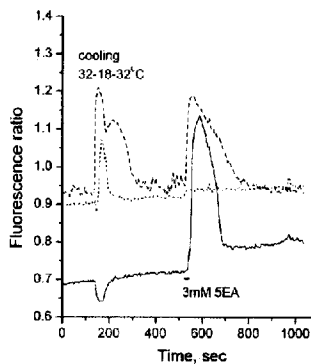


図 4b. Responses of neuronal intracellular calcium to 3 mM 5EA and cooling (32 to 18 °C). The responses of three neurons differentially sensitive to 5EA and cooling are shown.

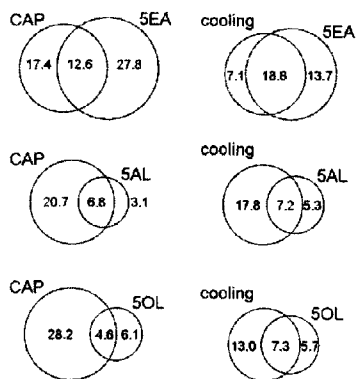


図 5. Distribution of sensitivity to 5EA (3 mM), 5AL (3 mM) and 5OL (30 mM) as a function of the type of neuron, defined by sensitivity to 300 nM CAP or cooling from 32 to 18 °C. Numbers in the Venn diagrams indicate the percentage of total neurons tested that belong to each category.

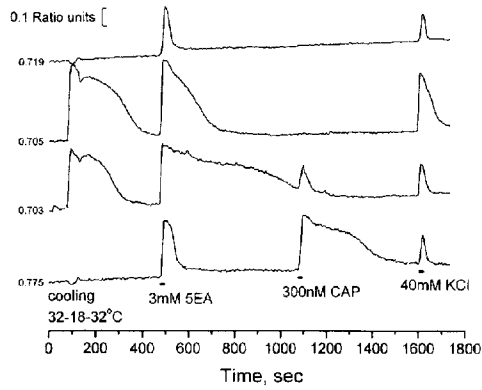


Figure 6. Multiple types of trigeminal neurons respond to 5EA. In this example, 2 different types of CAP-sensitive neurons (bottom 2 traces) as well as a cool-sensitive neuron (second from top) and a neuron that is neither a cool nor CAP-sensitive neuron (top trace) responded to 5EA. Plots have been moved vertically for clarity. Baseline fluorescence ratios are indicated at the left of each trace.

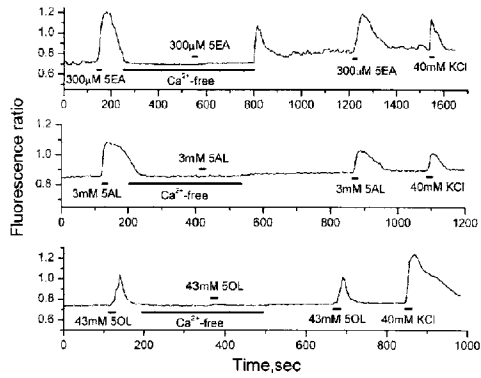


Figure 7. Calcium dependence of neural responses to pentanal (upper), pentanal (middle) and pentanol (lower). Calcium-free conditions were obtained with 1 mM EGTA-containing Ringer's solution substituting for the calcium-containing Ringer's solution. Delivery of stimuli is indicated by small horizontal bars.

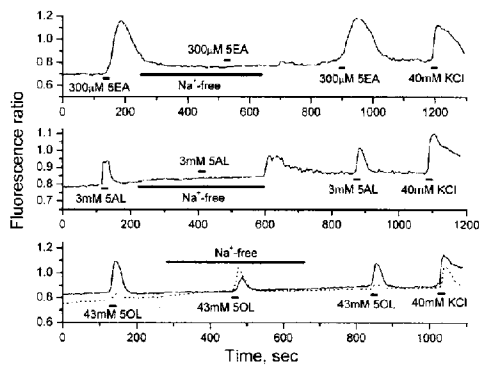


Figure 8. Sodium dependence of neural responses to pentanal (upper), pentanal (middle) and pentanol (lower). NMDG-containing Ringer's solution (bar) was substituted for the sodium-containing Ringer's solution to produce sodium-free conditions. Delivery of stimuli is indicated by small horizontal bars.

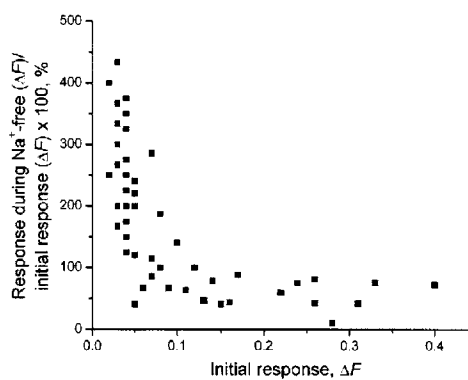


Figure 9. Response to pentanol during extracellular sodium-free conditions as a function of the initial response to pentanol. Responses of individual neurons to pentanol (43 mM) during superfusion with NMDG-Ringer's solution are plotted vs. initial responses to pentanol (43 mM) in the presence of 138.3 mM extracellular sodium.

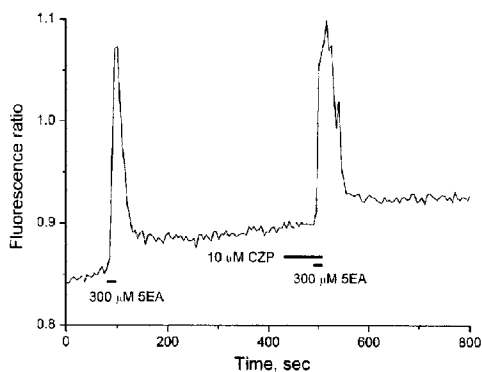


Figure 10. Lack of effect of capsazepine (CZP) on responses to 300  $\mu$ M 5EA. A typical neuron, the response of which was unaffected by 10  $\mu$ M CZP. Neurons were preincubated with CZP for 1 min before delivery of a mixture of 5EA and CZP.



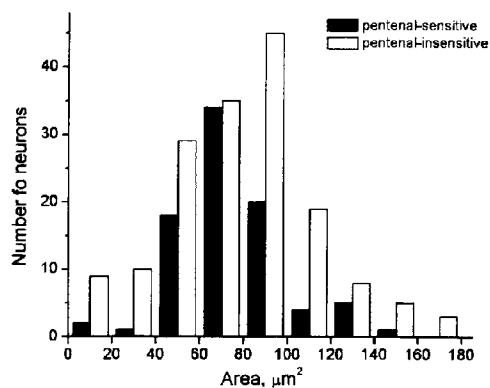


Figure 11. Size distribution of pentenal-sensitive and -insensitive neurons. Sensitivity to pentenal was found throughout size range of TG neurons.

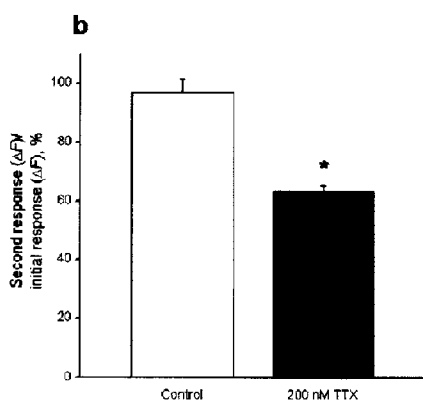


Figure 12b. Inhibition of TTX-sensitive sodium channels in TG neurons by tetrodotoxin. Bars indicate the mean amplitude of second responses relative to initial responses (+/- s.e.mean). \* $P < 0.000001$ , significance compared to the control experiment.

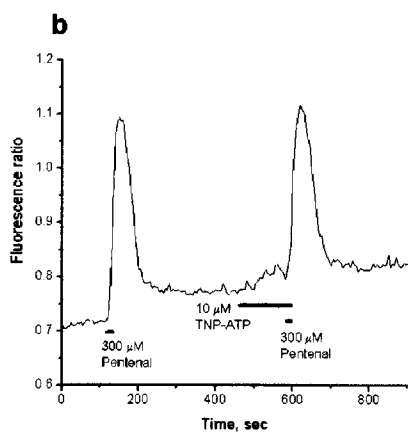


Figure 13b. Effects of TNP-ATP on the pentenal-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase in TG neurons. The increases in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by 300  $\mu M$  pentenal were not blocked by 10  $\mu M$  TNP-ATP.

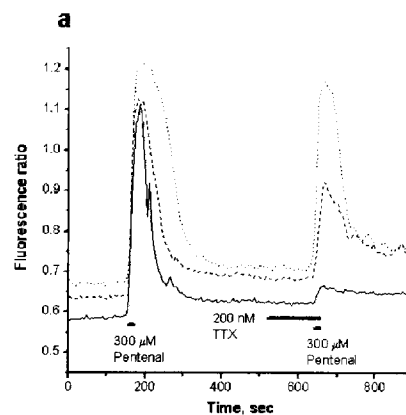


Figure 12a. Inhibition of TTX-sensitive sodium channels in TG neurons by tetrodotoxin. Application of 300  $\mu M$  pentenal in Ringer's solution induced  $[Ca^{2+}]_i$  increases that were variably inhibited by 200 nM tetrodotoxin.

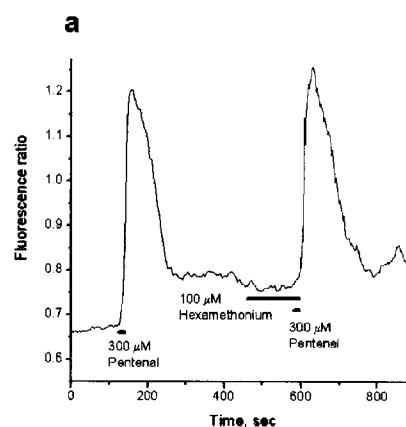


Figure 13a. Effects of hexamethonium on the pentenal-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase in TG neurons. The increases in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by 300  $\mu M$  pentenal were not blocked by 100  $\mu M$  hexamethonium.

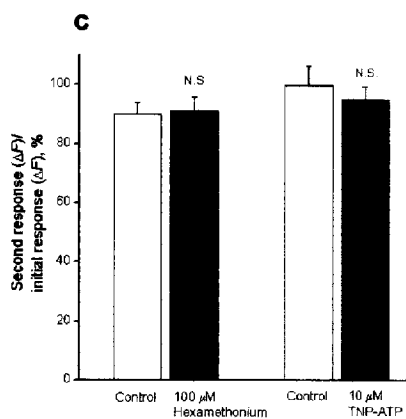


Figure 13c. Effects of hexamethonium and TNP-ATP on the pentenal-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase in TG neurons. Bars indicate the mean amplitude of second responses relative to initial responses (+/- s.e.mean). N.S., not significant.

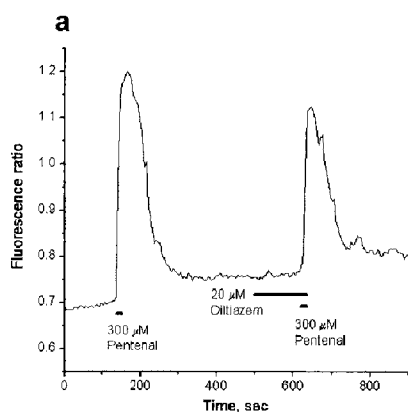


Figure 14a. Effects of voltage-gated calcium channel antagonists on the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  produced by pentenal. Responses to 300  $\mu$ M pentenal were partially blocked by 20  $\mu$ M diltiazem.

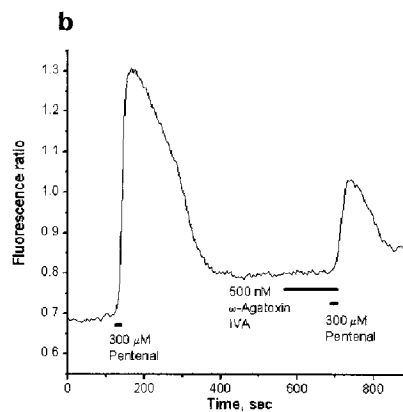


Figure 14b. Effects of voltage-gated calcium channel antagonists on the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  produced by pentenal. Responses to 300  $\mu$ M pentenal were partially blocked by 500 nM  $\omega$ -agatoxin IVA.

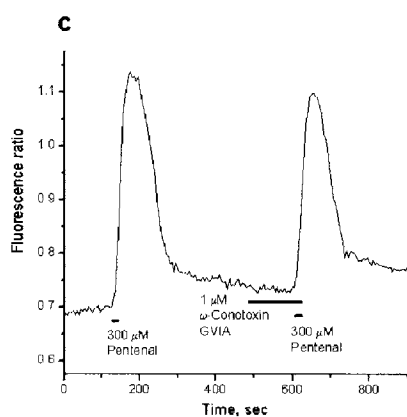


Figure 14c. Effects of voltage-gated calcium channel antagonists on the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  produced by pentenal.  $\omega$ -Conotoxin GVIA (1  $\mu$ M) caused only a small reduction of pentenal-induced response amplitude compared to the control experiment.

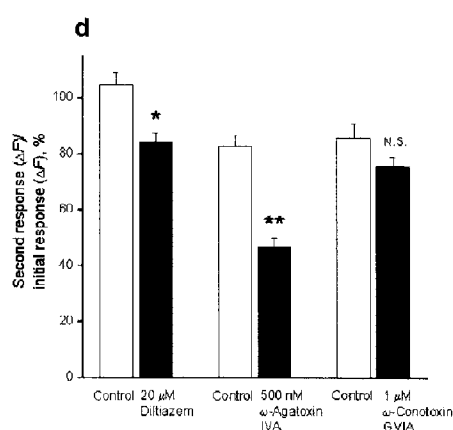


Figure 14d. Effects of voltage-gated calcium channel antagonists on the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  produced by pentenal. Bars indicate the mean amplitude of second responses relative to initial responses ( $\pm$  s.e.mean). \* $P$  < 0.001, \*\* $P$  < 0.000001, significance compared to the control experiment. N.S., not significant.

## 論文審査結果要旨

体性感覚刺激性の化学物質は、鼻腔・口腔・目などに分布する三叉神経により受容・伝達される。こうした刺激物質に対する感受性は、有害化合物への暴露に対する生体防御システムとしての役割を担い、もたらされる痛みはその侵害に対する警告信号となっている。多くの揮発性有機化合物 (Volatile Organic Compounds, VOCs) は三叉神経終末を活性化し、痛みを伴う侵害性の感覚を惹起するほか、呼吸不全などの生体反応を引き起こすことが知られ、VOCs の中でも、燃焼生成物 (排気ガス、燃焼木材等) に含まれる不飽和アルデヒド類は、とりわけ強力な感覚刺激物質とされている。しかし、これら化学物質の受容および感覚シグナルの伝達に関する検討は少なく、不明な点が多い。

本研究では、環境中 VOCs の中でも特に高い反応性を有し、痛みを惹起する重大な汚染物質として知られる $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和アルデヒドに着目し、この化合物がもたらす神経細胞応答に関与する受容メカニズムを明らかにするための検討を行なった。その結果、以下の新しい知見が得られた。

1. 炭素数 4~7 の $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和アルデヒド (EA)、直鎖アルデヒド (AL) および直鎖アルコール (OL) の三叉神経節細胞に対する濃度・細胞応答性の計測結果から、1) EAs は三叉神経系のある種の細胞上に限定的 (約 35%) に発現する特定のメカニズムを介して受容・伝達されていること、2) ALs および OLs は疎水性に強く影響を受け、かつ三叉神経上に幅広く存在するメカニズムを介して受容・伝達されていることが示唆された。2. ペンテナール (5EA)、ペンタナール (5AL) およびペンタノール (5OL) は、既知の侵害刺激受容性イオンチャンネルである TRPV1 受容体や TRPM8 受容体を介してその活性を発現している可能性は低いものと推察された。3. 5EA、5AL および 5OL がもたらす細胞応答は、細胞外カルシウムイオンの存在に依存しており、初期様式として電位依存性ナトリウムチャンネル由来電流の誘発があり、その後電位依存性カルシウムチャンネルの活性化へと繋がっている可能性が示された。4. 5EA 応答には、テトロドトキシン (TTXs) ナトリウムチャンネルが関与していることが示唆された。さらに、5EA 応答に TRPV1, nAChR および P2X 受容体が関与する可能性は低く、L-および P/Q-タイプ電位依存性カルシウムチャンネルが関与する可能性が高いことが示された。

以上の井上貴詞氏の本研究によって、揮発性有機化合物 (VOCs) の体性感覚発現機構の一部が新たに明らかにされ、学術論文も 2 編出版され、残り 1 編も査読中となった。よって審査員一同は、本研究者に博士 (農学) の学位を授与するに値すると判定した。