

厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

気道障害性を指標とする室内環境化学物質のリスク評価手法の開発に関する研究

気道障害性の *in vitro* 評価

研究分担者	香川(田中) 聡子	横浜薬科大学薬学部 教授
研究協力者	大河原 晋	横浜薬科大学薬学部 准教授
研究協力者	神野 透人	名城大学薬学部 教授

研究要旨：TRP (Transient Receptor Potential) チャネルは温度や化学物質の刺激を感知する侵害刺激受容体で、特に TRPA1 と TRPV1 は気道過敏性に重要な役割を果たしている。本研究では、生活環境化学物質による侵害刺激を明らかにする目的で、これまでに確立したヒト TRPA1 評価系を用いて、研究班共通検討対象物質に選定した 2-Ethyl-1-hexanol、2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol monoisobutyrate (TexanolTM, TMPD-MIB と略す)および 2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate (TXIBTM, TMPD-DIB と略す)の 3 物質のうち、ヒト TRPA1 チャネルに対して濃度依存的な活性化を引き起こした、2-Ethyl-1-hexanol と TMPD-MIB について、化粧品や家庭用品に使用される (-)-Menthol との複合曝露の影響を検討した。その結果、2-Ethyl-1-hexanol、TMPD-MIB および(-)-Menthol 処理によって、これら化合物の単独処理では TRPA1 の活性化が認められない濃度域において、TMPD-MIB と (-)-Menthol の同時処理、2-Ethyl-1-hexanol と(-)-Menthol の同時処理によって顕著な TRPA1 の活性化が認められることが判明した。さらに、化学物質複合曝露による活性化機構をあきらかにする目的で、作用機序の異なるアゴニストを用いて検討したところ、作用機序の異なる 2 種化合物の処理により、TRPA1 が相乗的に活性化することが明らかとなり、この相乗的な活性化には TRPA1 の C 末端への Calmodulin の結合が関与していることが示唆された。

研究協力者：前川 梨沙 (名城大学薬学部薬学科)、森 葉子 (名城大学薬学部薬学科)、桃井 夢子 (横浜薬科大学薬学部)

A. 研究目的

TRP (Transient Receptor Potential) チャネルは 6 回膜貫通型の非選択的 Cation チャネルで、TRPV、TRPA、TRPM、TRPC、TRPP および TRPML の 6 つの Subfamily で構成され、ヒトでは 28 種類の遺伝子が同定されている。気道において、幾種類かの TRP チャ

ネルが末梢の知覚神経をはじめ、鼻腔や気管支、肺などの上皮系の細胞にも発現しており、咳などの侵害応答や炎症に関与することが明らかにされている。著者らは、既に後根神経節 Total RNA からクローニングしたヒト TRPV1 (hTRPV1) およびヒト TRPA1 (hTRPA1) を安定的に発現する Flp-In 293 細胞株を樹立し、多種多様な生活環境化学物質がこれらの TRP チャネルを活性化することを明らかにしてきた^{1,2)}。初年度の研究に

においては、hTRPV1 および hTRPA1 に加えて、気道での侵害刺激への関与が最近明らかにされたヒト TRPM8 (hTRPM8) について安定発現細胞株を用いるアッセイ系の確立を行い、研究班共通検討対象物質の評価を行うとともに、TRPA1 活性化について比較的大きな種差の存在が報告されていることから、生活環境化学物質による侵害刺激の種差を明らかにする目的で、マウス TRPA1 (mTRPA1)アッセイ系の開発についてもあわせて行った³⁾。

また、昨年度の研究では、これまでに樹立した hTRPA1 および mTRPA1 安定発現細胞株を用いる TRPA1 活性化のハイスループットアッセイ法を用いて、生活環境化学物質による TRPA1 の活性化とその種差について検討した。

本年度においては、第 21 回 シックハウス (室内空気汚染) 問題に関する検討会において室内濃度指針値策定候補物質として追加されることが検討された 2-Ethyl-1-hexanol、2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol monoisobutyrate (TexanolTM, TMPD-MIB と略す) および 2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate (TXIBTM, TMPD-DIB と略す) について TRPA1 に対する活性化を評価するとともに、それら化合物の侵害刺激におよぼす(-)-Menthol の効果について hTRPA1 高発現細胞株を用いて評価した。さらに、作用機序の異なる 2 種類の TRPA1 アゴニストの相互作用について検討を加えた。

B. 実験方法

B-1. Calcium Mobilization Assay

hTRPA1 安定発現細胞株 (Flp-In-293/hTRPA1 細胞) はそれぞれ 100 µg/mL

Hygromycin を添加した選択培地で培養した。Assay 前日に Flp-In-293/hTRPA1 細胞を Poly-D-Lysine-coated 96-well Dish に 3.5×10^5 cells/mL の細胞濃度で播種した。翌日に培地を除去して FLIPR Calcium 6 試薬溶液に置換し、37°C で 2 時間培養したのちに、分注機能付きマイクロプレートリーダー FlexStation3 を用いて下記の測定条件で被検物質曝露による Flp-In-293/hTRPA1 細胞 n の細胞内 Calcium 濃度の変動を記録した。

FlexStation3 測定条件

[Temperature]

37°C

[Read Mode]

Fluorescence/Bottom Read

[Wave Length]

Excitation: 485 nm

Emission: 525 nm

Cut off: 515 nm

[Sensitivity]

Readings: 3

PMT: Medium

B-2. Western Blot Assay と Immuno-Precipitation Assay

Flp-In 293/hTRPA1 細胞を 60 mm ディッシュ (IWAKI 社製) に播種し一晩培養したのち、Component B 4 mL を各ディッシュに添加して 2 時間培養後、被験物質 1 mL を加えて 1 分後に Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-free) を含む RIPA buffer 500 µL で細胞を回収して Whole cell lysate を調製した。

7.5% ミニプロテイン® TGXTM プレキャストゲル (BIO-RAD 社製) を用いて Whole cell lysate を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜 (ATTO 社製) に転写した。3% BSA 溶液で一晩ブロッキング後、一次抗体として anti-phosphoserine antibody、二次抗体として peroxidase -linked anti-mouse antibody を用い

てリン酸化タンパク質を検出した。

また、Calmodulin と TRPA1 タンパク質との相互作用をあきらかにする目的で、Whole cell lysate を anti-Calmodulin で免疫沈降し、上記と同様 Anti-V5-HRP Antibody を用いる Western Blot Assay を行った。

タンパク質の検出には Pierce™ ECL Plus を用い、Typhoon FLA-9000 (GE ヘルスケア社製)にて蛍光シグナルを解析した。

C. 結果と考察

C-1. hTRPA1 活性化における新規室内濃度指針値策定候補物質と(-)-Menthol の相乗作用

TMPD-MIB 、 2-Ethyl-1-hexanol および (-)-Menthol 単独処理による hTRPA1 の活性化を図 1 に示す。これら化合物単独処理によって hTRPA1 の濃度依存的な活性化が認められるが (図 1)。これら化合物の単独処理では hTRPA1 の活性化が認められない濃度領域において、 TMPD-MIB と (-)-Menthol の同時処理、2-Ethyl-1-hexanol と(-)-Menthol の同時処理によって顕著な hTRPA1 の活性化が認められることが判明した (図 2)。

C-2. Cinnamaldehyde 前処理による(-)-Menthol の TRPA1 活性化増強

(-)-Menthol の TRPA1 活性化における Cinnamaldehyde を前処理の影響を検討した。Cinnamaldehyde 単独処理では TRPA1 の顕著な活性化認められない濃度領域において、Cinnamaldehyde で処理し、その約 20 秒後に (-)-Menthol で処理することにより、濃度依存的な TRPA1 活性の増強が認められた (図 3)。

C-3. Cinnamaldehyde 処理による TRPA1 タンパク質リン酸化ならびに Calmodulin との相互作用

Allyl Isothiocyanate や Cinnamaldehyde などは、hTRPA1 チャンネルのシステイン残基の酸化修飾反応により活性化する可能性が示されているが、この活性化に關与する 3CK (C621, C641, C665, K710) 領域とは別に、 (-)-Menthol や Linalool が作用する ST (S873, T874) 領域が存在し、 3CK 領域はシステイン残基との共有結合による活性化部位として、また ST 領域はリガンド結合による活性化部位として作用すると考えられている。

近年、プロテインキナーゼ A による TRPA1 の Ser 残基のリン酸化⁴⁾、ならびに低濃度のカルシウムイオンの流入による C 末端領域への Calmodulin の結合⁵⁾が TRPA1 の活性化の増強機序として示唆された。そこで本研究では、作用機序の異なる 2 種類の TRPA1 アゴニストの複合曝露時の活性化メカニズムをあきらかにする目的で、TRPA1 のリン酸化ならびに TRPA1 の C 末端領域への Calmodulin の結合に関して検討した。

Flp-In-293/hTRPA1 細胞を Cinnamaldehyde (15.6 μ M, 31.2 μ M) で処理しても、今回の実験条件下では、hTRPA1 タンパク質のリン酸化の亢進は認められなかった (図 4)。

一方、Cinnamaldehyde (15.6 μ M, 31.2 μ M) で処理した Flp-In-293/hTRPA1 細胞の whole cell lysate を anti-Calmodulin で免疫沈降して、抗 V5 抗体を用いて検出したところ、Cinnamaldehyde 処理群では、hTRPA1

に相当する分子サイズの位置にシグナルが検出された (図 5)。この結果は、Cinnamaldehyde によって Calmodulin と TRPA1 の結合が促進される可能性を示唆している。すなわち、Cinnamaldehyde の処理によって細胞内の Ca イオン濃度が増加し、Calmodulin が TRPA1 の C 末端に結合することが相乗的活性化に寄与している可能性が考えられる。

D. 結論

本研究では、これまでに樹立した hTRPA1 安定発現細胞株を用いる TRPA1 活性化のハイスループットアッセイ法を用いて、生活環境化学物質による TRPA1 の活性化とそれら化学物質の複合曝露による影響を検討した。その結果、新指針値策定候補物質として提案された、2-Ethyl-1-hexanol および TMPD-MIB による hTRPA1 の活性化は、化粧品や家庭用品に使用される (-) -Menthol の同時処理によって相乗的に増強されることが判明した。

また、作用機序の異なる 2 種類のアゴニストを処理することにより TRPA1 が相乗的に活性化することが明らかとなり、その機序として TRPA1 の C 末端への Calmodulin の結合が関与している可能性が示唆された。

E. 参考文献

1. 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業「家庭用品から放散される揮発性有機化合物の気道刺激性及び感受性を指標とするリスク評価 (H22 - 化学 - 一般 - 002)」研究代表者 香川聡子, 平成 22 年度~24 年度 総合研究報告書

2. 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業「家庭用品から放散される揮発性有機化合物の健康リスク評価モデルの確立に関する研究 (H25 - 化学 - 一般 - 006)」研究代表者 香川聡子, 平成 25 年度~27 年度 総合研究報告書
3. 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業「気道障害性を指標とする室内環境化学物質のリスク評価手法の開発に関する研究 (H27 - 化学 - 一般 - 009)」研究代表者 神野透人, 平成 27 年度 総括・分担研究報告書
4. Meents JE, Fischer MJM, McNaughton PA: Sensitization of TRPA1 by Protein Kinase A. PLoS ONE 12(1): e0170097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170097> (2017).
5. Hasan R, Leeson-Payne ATS, Jaggar JH, Zhang X: Calmodulin is responsible for Ca²⁺-dependent regulation of TRPA1 Channels. Sci Rep., 7, 45098 doi:10.1038/srep4509845098 (2017).

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 磯部 隆史, 青木 明, 植田 康次, 岡本 誉士典, 埴岡 伸光, 神野 透人: 室内濃度指針値策定候補物質によるヒト侵害受容体 TRPA1 活性化とその種差: 第 44 回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2017 年 7 月

2. 前川 梨沙, 青木 明, 岡本 誉士典, 植田 康次, 大河原 晋, 埴岡 伸光, 香川(田中) 聡子, 神野 透人: 作用機序の異なる 2 種類のアゴニストによるヒト侵害受容器 TRPA1 の相乗的活性化, フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー, 仙台, 2017 年 9 月
 3. 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 磯部 隆史, 長谷川 達也, 埴岡伸光, 神野透人: 侵害刺激受容体を活性化する金属化合物に関する研究, メタルバイオサイエンス研究会 2017, 岡山, 2017 年 10 月
 4. 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 磯部 隆史, 青木 明, 植田 康次, 岡本 誉士典, 埴岡 伸光, 神野 透人: 新規室内濃度指針値策定候補物質によるヒト侵害受容体 TRPA1 活性化とその種差, 平成 29 年室内環境学会学術大会, 佐賀, 2017 年 12 月
 5. 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 百井 夢子, 磯部 隆史, 青木 明, 植田 康次, 岡本 誉士典, 埴岡 伸光, 神野 透人: TRPA1 活性化における新規室内濃度指針値策定候補物質と(-)-Menthol の相乗作用, 日本薬学会第 138 年会, 金沢, 2018 年 3 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
- 特許取得
なし
- 実用新案登録
なし

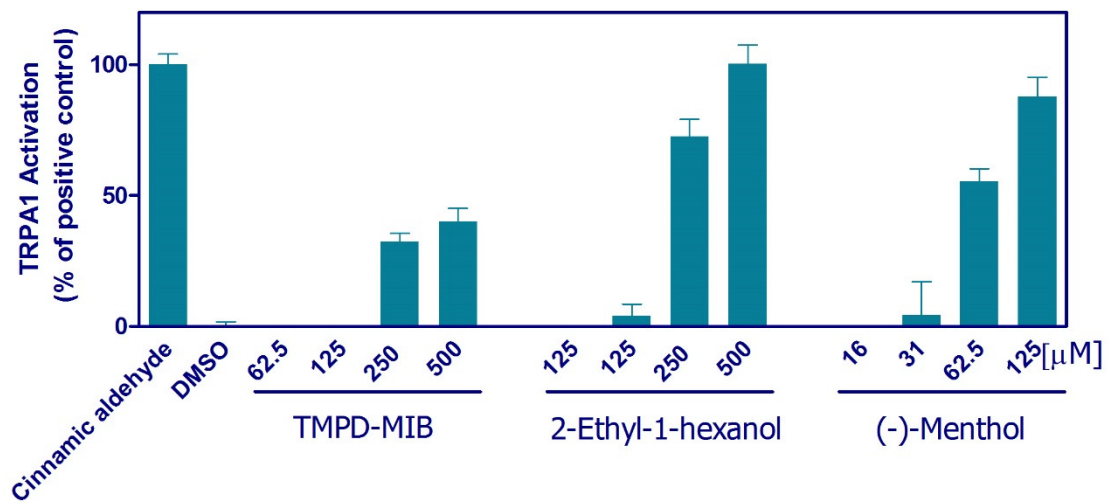


図1 TMPD-MIB、2-Ethyl-1-hexanol およびによるヒト TRPA1 の活性化

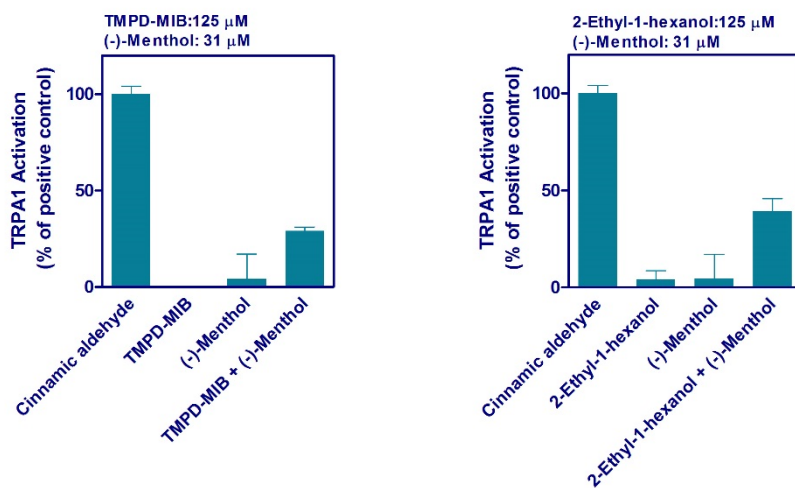


図2 TMPD-MIB および 2-Ethyl-1-hexanol によるヒト TRPA1 の活性化における (-) - Menthol による増強

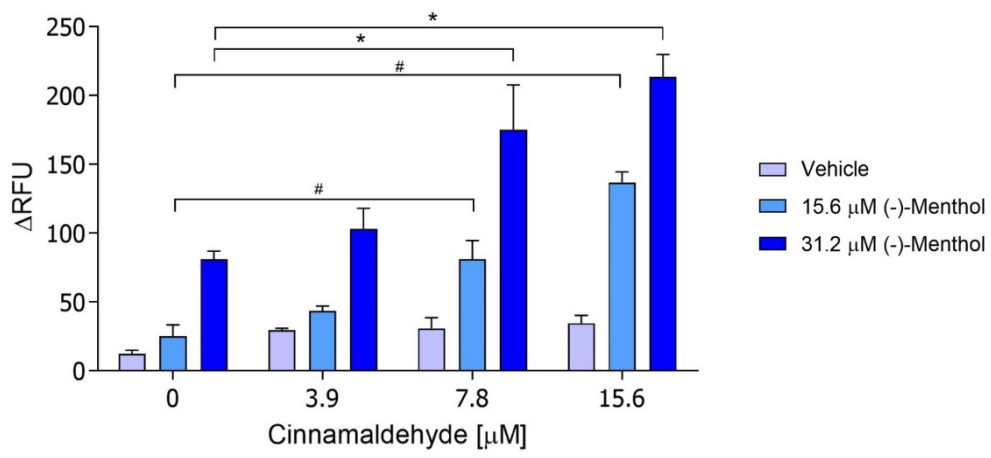


図3 (-) - Menthol によるヒト TRPA1 の活性化における
 Cinnamaldehyde 前処理の影響
 (#, * ; $p < 0.001$)

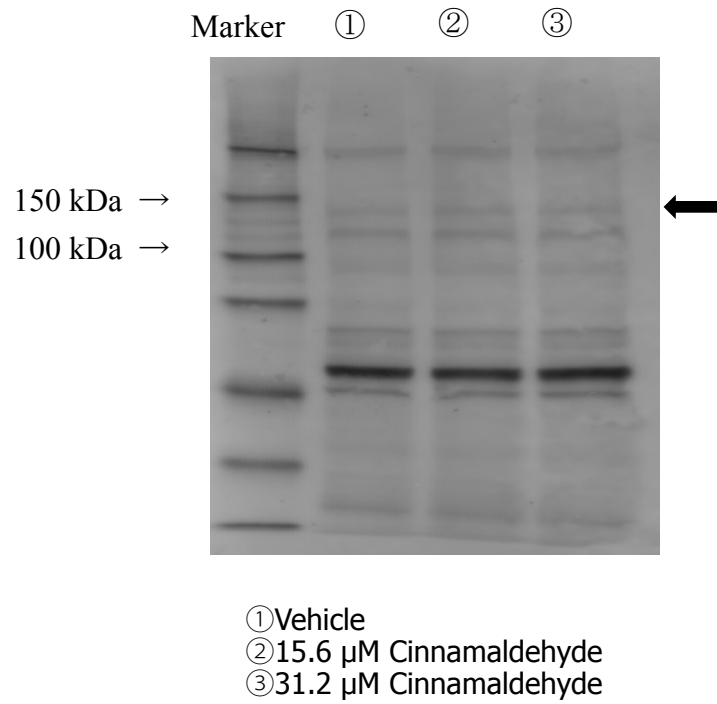


図4 ヒト TRPA1 のリン酸化におよぼす Cinnamaldehyde の影響

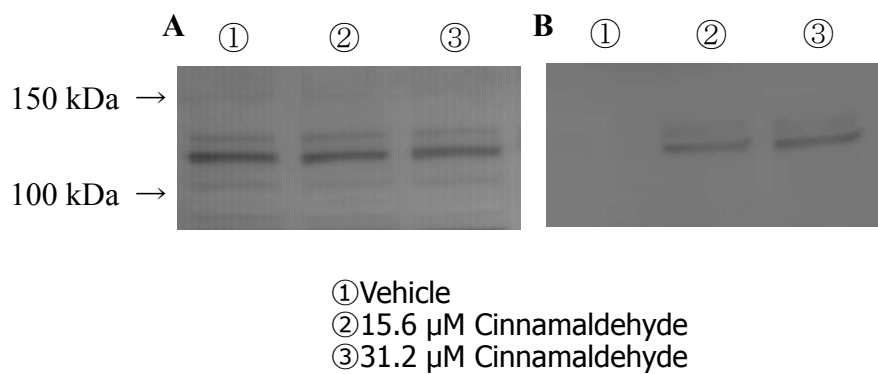


図5 Cinnamaldehyde によるヒト TRPA1 への Calmodulin の結合

(A) IB: anti-V5 (Whole cell lysate), (B) IP: anti-Calmodulin, IB: anti-V5