

薬剤性便秘モデルの構築と  
新規 TRPA1 アゴニスト ASP7663 の評価

2019 年 1 月

小島 良介

薬剤性便秘モデルの構築と  
新規 TRPA1 アゴニスト ASP7663 の評価

筑波大学大学院  
生命環境科学研究科  
生命産業科学専攻  
博士（生物工学）学位論文

小島 良介

## 目次

目次.....	i
略語.....	ii
序論.....	1
本論	
第一章 薬剤性便秘モデルの構築	
第一節 背景.....	12
第二節 実験項.....	14
第三節 結果.....	19
第四節 考察.....	26
第二章 新規 TRPA1 アゴニスト ASP7663 の評価	
第一節 背景.....	30
第二節 実験項.....	34
第三節 結果.....	41
第四節 考察.....	52
総括.....	60
参考文献.....	66
謝辞.....	79
発表論文目録.....	80

## 略語

2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborane
4 $\alpha$ -PDD	4 $\alpha$ -Phorbol 12,13-Didecanoate
5-HT	5-Hydroxytryptamine
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
CCK-8	Cholecystokinin-8
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate
CRD	Colo-rectal distention
DAMGO	D-Ala <sup>2</sup> , N-MePhe <sup>4</sup> , Gly-ol]-enkephalin
DMEM	Dulbecco's modified ragle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine
EC	Enterochromaffin cells
FLIPR	Fluorometric imaging plate reader
GABA	Gamma-aminobutyric acid
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HSRRB	Health science research resources bank
IBS	Irritable bowel syndrome
NO	Nitric oxide
PAF	Platelet-activating factor
QoL	Quality of life
S.E.M.	Standard error of mean
TRPA	Transient receptor potential ankyrin
TRPV	Transient receptor potential vanilloid
VIP	Vasoactive intestinal peptide

## 序論

便秘はいきみ、硬便や排便困難といった症状を呈する消化器疾患である。便秘の罹患率は、北米では人口の 2-27%、400 万人から 5,600 万人程度と推定されている (Drossman et al., 1993; Pare et al., 2001; Longstreth et al. 2006; Wald et al., 2007)。日本における有訴者の割合は、2016 年度国民生活基礎調査によると 2-5%であり、男性よりも女性の方が多い。加齢により有病率は増加し、若年層では女性が多く、高齢になると男性の比率が上昇する(厚生労働省:平成 28 年度:国民生活基礎調査, Fig. 1)。便秘患者の QoL を健常人と比較すると、MOS 36-Item Short Form Health Survey (SF-36)や Psychological General Well Being Index (PGWBI)において有意に低く、QoL の低下は腹部症状のスコアである Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS)もしくは身体活動度との相関が報告されている (Wald et al., 2007; Glia et al., 1997)。さらに便秘患者においては労働生産性の低下も報告されている (Glia and Lindberg, 1997; Sun et al., 2011)。慢性的に便秘症状を呈している患者における心理的異常については、抑うつおよび身体化症状を指摘した報告が複数ある。高齢の便秘症患者に対して Symptom Checklist-90-Revised (SCL-90-R) を評価したところ、便秘患者群では心気症尺度および抑うつ尺度が有意に高く、ヒステリー尺度も高い傾向があることが報告されている (Heymen et al., 1993)。また、腹部膨満感を有する患者の身体化症状を Somatic Symptom Checklist で評価したところ、身体化のスコアが健常人よりも高いことも報告されている (Jian et al., 2008)。便秘患者では、パーキンソン病および多発性硬化症の神経疾患の罹患率が高く、うつ病および不安神経症などの精神疾患との関連も報告がある (Choung et al., 2016)。さらに心筋梗塞および狭心症などの虚血性心疾患を併発率が高いことも報告されており、日本においても排便回数の減少が心血管障害の死亡率の上昇に関連する

報告もある (Salmorirago-Blotcher et al., 2011; Honkura et al., 2016)。便秘は内科的治療が可能であり、予後が良好であると考えられているが、便秘以外の重篤な疾患の罹患率が予後へ影響する可能性がある。

便秘の診断は症状の期間（急性もしくは慢性）、器質的な変化の有無、原因によって分類される (Fig. 2)。便秘症状を訴える患者に対しては、最初に問診および検査により、器質的疾患を疑う。さらに薬剤使用歴を確認し、薬剤性便秘の可能性を検討する。これらの可能性が除外された場合に、本研究で注目した慢性便秘および便秘型過敏性腸症候群（便秘型 IBS）の診断がなされる。慢性便秘および便秘型 IBS は、慢性の器質的な変化を伴わない機能性便秘である (Cash et al., 2007)。消化器疾患の国際的なガイドラインである RomeIII によると、機能性慢性便秘の診断基準は Table1 のようになり、一方の便秘型 IBS の診断基準は Table2 に示すとおりである。両疾患は、排便回数の減少および硬便といった症状は共通するが、便秘型 IBS は排便障害に加えて腹痛もしくは腹部不快感を症状として併せ持つことが診断基準となる。一方、慢性機能性便秘は「過敏性腸症候群の診断基準を満たさない」という除外診断が含まれている。診断ガイドライン上は明確に区別される両疾患であるが、実際の臨床においては、RomeIIIにあるような適正な除外診断は難しく、慢性機能便秘における IBS の除外診断を除くと両疾患の判定は大きく重複することも報告されている (Fig. 3, Wong et al., 2010)。

このようにガイドライン上の類似点があり、診断が重複する両疾患であるが、消化管の機能的な変化に注目すると両疾患は大きく異なる。慢性便秘は消化管が弛緩性に運動不全を起こすのに対して、便秘型 IBS は痙攣性に運動不全を起こしていると考えられている。Hasler らの研究によると便秘型 IBS 患者の直腸内圧は健常人や慢性便秘患者と比較すると、有意に上昇しており、IBS 患者では

直腸が攣縮していることが示唆されている (Hasler et al., 2009)。

便秘の治療には薬剤治療以外に生活改善も実施される。改善ポイントは大きく分けて、食事面、生活様式および運動面の3つの改善に分けられる。食事面の改善は便の組成の75%は水分であるため、水分摂取を調整すること。1日3食の食事、特に朝食をしっかりととること。食物繊維の適度な摂取とヨーグルトなど乳酸菌食品により腸内細菌を整えることが挙げられる。食物繊維に関しては、不足している場合には、摂取量を増やすと効果があるとされているが (Leung et al., 2011)、過剰摂取は便秘症状を増悪させる可能性もある (Muller-Lissner et al., 2005)。生活様式の改善としては、生活リズムに規則性を持たせること、十分な睡眠をとること、毎日決まった時間にトイレに入るようにして排便習慣を付けること、が挙げられる。運動面の改善は、適度な運動およびその後の休息と腹部のマッサージやストレッチの実施がある。生活改善による便秘治療は、患者自身で内容や程度を調整できるうえに副作用の懸念もないことは利点であるが、治療法として統一したものが確立されておらず、その有用性についてエビデンスレベルの高い報告はない。また生活改善のみで便秘症状が寛解することはないため、薬剤治療との組み合わせで用いられる。

便秘における薬物治療としては下剤が用いられる。下剤には大きく分けて、刺激性、浸透圧性および膨張性下剤がある。ガイドラインでは慢性便秘の治療には、浸透圧性下剤の使用が推奨されている。浸透圧性下剤は、酸化マグネシウムなど塩類下剤と呼ばれるものであり、市販の薬局でも購入できる。酸化マグネシウムは慢性便秘だけでなく便秘型 IBS においても推奨されているが、大規模な臨床試験は慢性便秘でのみ実施されており便秘型 IBS においては検証されておらず (Medoff et al., 2004)、腹痛や腹部症状に対する効果は不明である (Khoshoo et al., 2006)。膨張性下剤は水分を吸収し膨張するものであり、主に食事が少

ない患者の治療に用いられる。刺激性下剤は腸管管腔の粘膜層を刺激することにより蠕動運動を亢進する。慢性便秘の治療で用いられるが、長期的な使用には不向きであり、ガイドライン上も弱い推奨にとどめられている。また便秘型 IBS においてはガイドラインに記載はあるがエビデンスは少なく、逆に症状を悪化させる懸念もある。

上で述べた両疾患の特性の違い（弛緩性と痙攣性）は、薬剤評価モデルを構築する際には重要な留意点となる。さらに臨床において両疾患は明確に判別しにくいことを考慮すると、慢性便秘および便秘型 IBS どちらに対しても有効性を示す薬剤は臨床上使い勝手がよく、有用性が高いと考えられる。また、便秘型 IBS の治療薬の場合、腹痛に対する抑制作用も重要と考えられる。そのため、私は動物モデルにおいて、定量的に消化管運動機能に対する作用を評価できる動物モデルの構築と TRPA1 受容体アゴニストの便秘治療薬としての可能性を検証するために研究を行った。

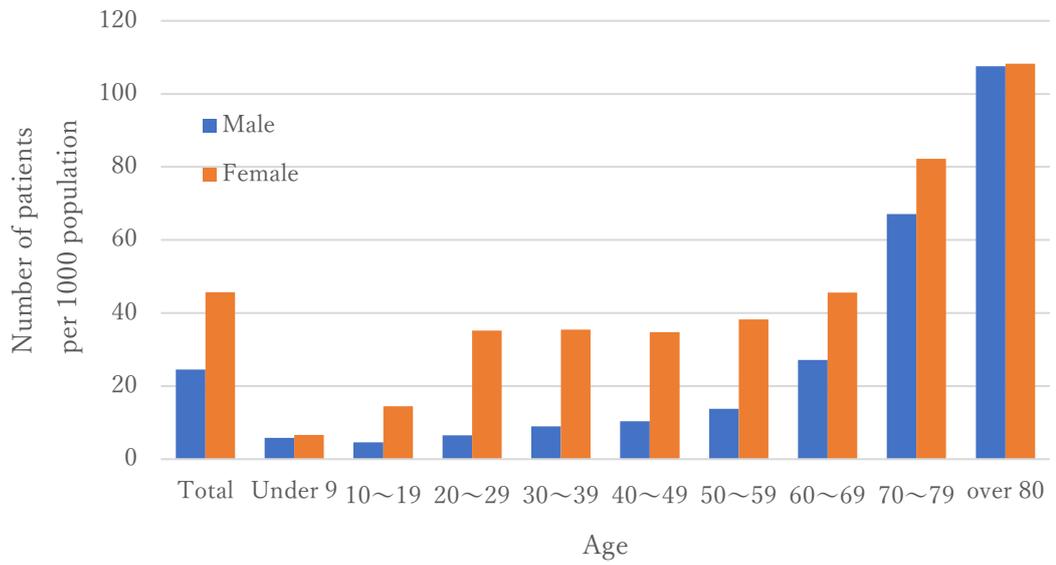


Fig. 1 The prevalence of constipation in Japan (data from National Life Basic Survey in 2016).

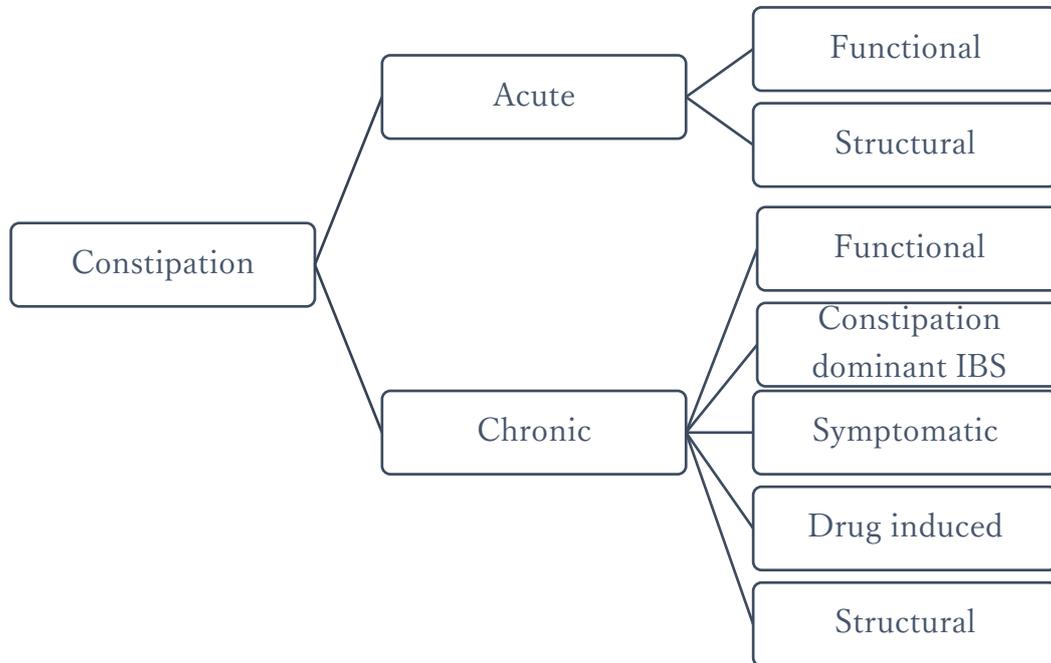


Fig. 2 Classification of constipation.

---

To include two or more of the following and present for the past three months, with symptoms starting for at least 6 months prior to diagnosis

1, There are two or more symptoms out of A) to F)

- A) Straining during defecation for at least 25% of bowel movements
- B) Lumpy or hard stools in at least 25% of defecations
- C) Sensation of incomplete evacuation for at least 25% of defecations
- D) Sensation of anorectal obstruction/blockage for at least 25% of defecations
- E) Manual maneuvers to facilitate at least 25% of defecations
- F) Fewer than 3 defecations per week

2, Loose stools are rarely present without the use of laxatives

3, There are insufficient criteria for irritable bowel syndrome

---

Table1. Diagnosis criteria of chronic constipation (RomeIII)

---

There are symptoms more than 6 months ago. There are abdominal pain or abdominal discomfort more than once per week in the last 3 months. And it satisfies two or more of the following items

1. Improvement with defecation
2. Onset associated with a change in stool frequency
3. Onset associated with a change in stool form (appearance)
4. Hard or lumpy stools at least 25% of the time, and loose or watery stools less than 25% of the time.

---

Table2. Diagnosis criteria of constipation dominant IBS (RomeIII).

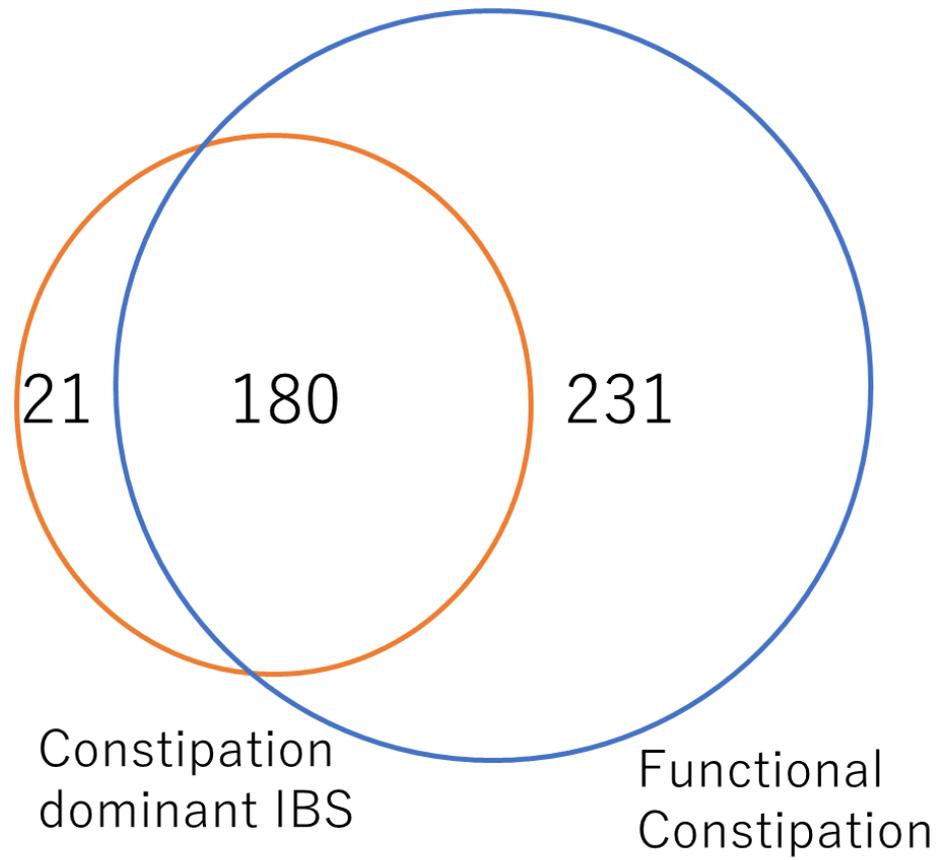


Fig. 3 Overlap between functional constipation and constipation dominant IBS in the case of ignoring exclusion diagnostic criteria adapted from Wong et al., 2010.

## 本論

## 第一章 薬剤性便秘モデルの構築

## 第一節 背景

前臨床において便秘に対する薬剤評価を行う場合、臨床と同様に排便回数および排便量を指標とすることもできる。しかし排便を指標とした場合、評価時間が長くなること、および評価薬剤が摂食や一般行動に影響した場合にも評価指標である排便に影響を与える懸念がある。そのため、より短期に評価可能であり、かつ消化管の運動能を測定できる、定量的な指標を用いた評価系の構築を目指した。

そこで消化管蠕動運動の評価は、Jacoby らおよび Schotteck らによる結腸にビーズを挿入する方法を参考にした (Jacoby et al., 1987; Schotteck, 1967)。病態症状の惹起に関しては、臨床において機能性便秘はストレスや生活習慣の乱れなどにより起こると考えられている。しかし、ラットやマウスにおいては、ストレスを負荷しても下痢症状は惹起できるが、便秘症状を惹起することは難しい。Yamada および Okada により、 $\alpha_2$  アドレナリン受容体作動薬である clonidine および  $\mu$  オピオイド受容体作動薬である loperamide により消化管運動が遅延することが報告されており (Yamada and Onoda, 1993)、薬剤性に輸送能を遅延させることで評価系の構築を検討した。Clonidine は摘出腸管を弛緩させる作用があり (Chahl, 1985; Coupar and Kirby, 1972)、loperamide は消化管の攣縮性収縮を惹起することが報告されている (Sohji et al., 1978)。しかし、これまでに両薬剤の *in vivo* における特性の違いを詳細に検討した報告はない。

本研究では、 $\alpha$  アドレナリン受容体拮抗薬(yohimbine)、 $\mu$  オピオイド受容体拮抗薬(naloxone)に加えて、ムスカリン受容体拮抗薬である atropine および臨床で慢性便秘および便秘型 IBS の治療薬として用いられている 5-HT<sub>4</sub> 受容体作動薬である tegaserod を用いて clonidine および loperamide による結腸輸送能に対する作用を検討した。さらに mustard oil の主成分である ally isothiocyanate を

評価した。Ally isothiocyanate は TRPA1 受容体の活性化作用をもつことが報告されている。そこで TRPA1 受容体が消化管内でも特に消化管上皮クロム親和性細胞 (EC 細胞) に特に発現量が高く、*in vitro* 評価において TRPA1 活性化により EC 細胞から 5-HT の放出することおよび摘出組織を用いた検討により消化管運動に関与する可能性を報告した (Nozawa et al., 2009)。この結果から私は構築した薬剤性便秘モデルにおける TRPA1 受容体アゴニストの *in vivo* における消化管運動に対する作用を検証することにした。

## 第二節 実験項

### 試薬

Loperamide hydrochloride (以下 loperamide)、clonidine hydrochloride (以下 clonidine)、naloxone hydrochloride (以下 naloxone)、yohimbine hydrochloride (以下 yohimbine) および atropine sulfate salt monohydrate (以下 atropine)は Sigma Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) から購入した。Ally isothiocyanate は和光純薬工業 (東京, 日本) から購入した。Tegaserod hydrochloride (以下 tegaserod)はアステラス製薬にて合成した。

Loperamide は 1 % Tween 80 を含んだ生理食塩水に溶解し、clonidine は生理食塩水に溶解した。Naloxone および atropine は蒸留水に溶解した。Tegaserod は 0.5 % methylcellulose 溶液で懸濁させた。Ally isothiocyanate は 10 % DMSO および 10 % Cremophor を含んだ蒸留水に溶解した。

### 方法

雄性 ddY マウス (体重 27–30 g)を日本 SLC 社より購入し、使用した。動物は 12 時間の明暗周期、温度および湿度が管理された飼育室にて、実験前日まで自由摂食および自由飲水条件下で飼育した。実験前日夕方から腸管内の内容物を除く目的で絶食し、自由飲水可能な状態は維持した。実験当日、マウスは測定用の個別飼育ケージに最低 1 時間以上馴化させた。実験中は絶食および絶水状態とした。マウスにジエチルエーテルで軽く麻酔をかけ、直径 3 mm のガラスビーズを肛門から 2 cm の位置まで、先端にシリコンがついた棒で挿入した。挿入後マウスを測定ケージに戻し、麻酔から覚醒してからビーズが排出されるまでの時間を測定した (Fig. 4)。麻酔から覚醒するまでの時間はおおよそ 1 分程度であり、個体間で大きく異なることはなかった。

Loperamide と clonidine はビーズ挿入の 30 分前に皮下投与した。Yohimbine、naloxone および atropine はビーズ挿入 60 分前に経口投与し、tegaserod および ally isothiocyanate はそれぞれビーズ挿入の 90 分および 3 分前に経口投与した。各薬剤の投与用量、経路およびタイミングを Table 3 に、薬剤の構造を Table 4 にまとめた。

なお、すべての動物実験はアステラス製薬の動物実験委員会にて、飼育方法及び実験方法について承認を得て実施した。動物は 12 時間の明暗周期、温度および湿度が管理された飼育室にて、実験前日まで自由摂食および自由飲水条件下で飼育した。

## 解析

ビーズの排出時間は平均排出時間および標準偏差を算出した。2 群間の有意差検定は Unpaired Student's *t*-test を用い、3 群以上の群間検定には Dunnett's multiple range test を用いた。すべての検定において有意水準は  $p < 0.05$  の場合に有意差ありと判定した。ビーズ排出の改善率は、溶媒投与群の平均排出時間を 0 %、loperamide もしくは clonidine 非投与群 (control 群) の平均排出時間を 100 %として算出した。

Loperamide 0.3 mg/kg sc  
Clonidine 10g/kg sc injection

Insertion of a glass bead

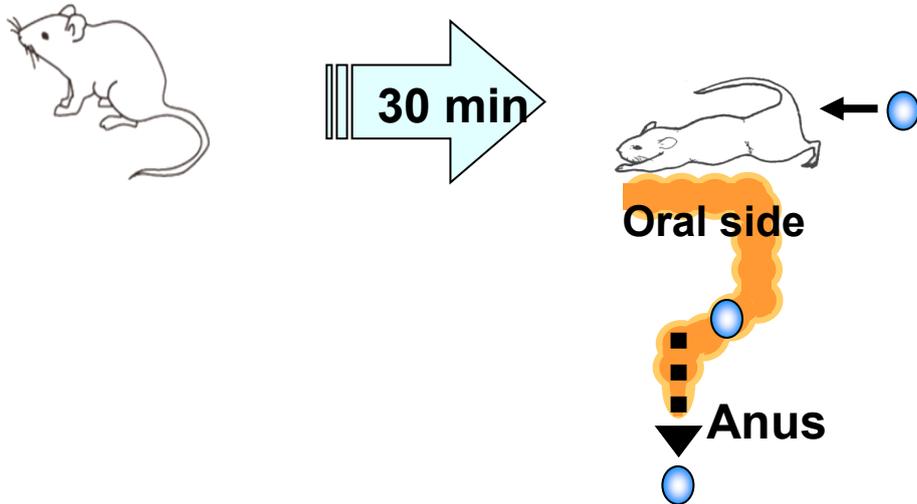
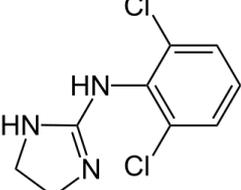
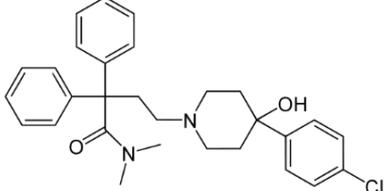
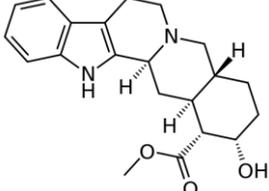
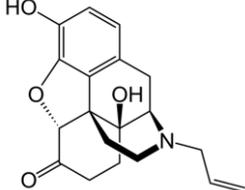
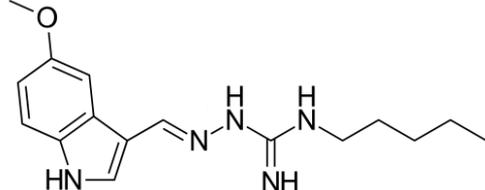
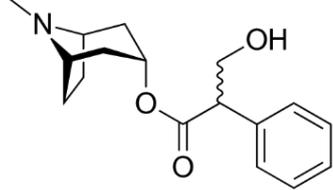
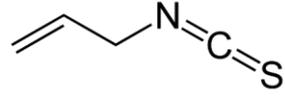


Fig. 4 Schematic image of anti-constipation models.

Table 3. List of administration dose and timing of drug

Drug	mechanism	Dose	Time (Before beads insertion)
Clonidine	$\alpha_2$ adrenergic receptor agonist	1, 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sc	30 min
Loperamide	$\mu$ opioid receptor agonist	0.03, 0.1, 0.3, 1 $\text{mg}/\text{kg}$ sc	30 min
Yohimbine	$\alpha_2$ adrenergic receptor antagonist	0.1, 0.3, 1, 3 $\text{mg}/\text{kg}$ po	60 min
Naloxone	$\mu$ opioid receptor antagonist	1, 3, 10 $\text{mg}/\text{kg}$ po	60 min
Tegaserod	5-HT <sub>4</sub> receptor agonist	0.1, 0.3, 1, 3 $\text{mg}/\text{kg}$ po	90 min
Atropine	Muscarinic receptor antagonist	30, 100, 300 $\text{mg}/\text{kg}$ po	60 min
Ally isothiocyanate	TRPA1 receptor agonist	0.01, 0.1, 1 $\text{mg}/\text{kg}$ po	3 min

Table 4. Structure of evaluated drugs

Drug name	Structure
Clonidine	
Loperamide	
Yohimbine	
Naloxone	
Tegaserod	
Atropine	
Allyl isothiocyanate	

### 第三節 結果

Clonidine の皮下投与により用量依存的なビーズ排出時間の遅延が認められた(Fig. 5A)。Clonidine 10 µg/kg 投与により、正常群と比較しておよそ 3 倍のビーズ排出時間の遅延が認められた。また clonidine 30 µg/kg 投与群では、正常群と比較しておよそ 6 倍のビーズ排出時間の遅延が認められた。薬剤評価においては、遅延作用の惹起が強すぎると評価化合物の薬効が検出しにくくなる懸念もあるため、有意かつ正常群との S/N が十分に確保可能な 10 µg/kg を惹起用量として採用することにした。Clonidine 10 µg/kg によるビーズ排出遅延作用は、yohimbine を事前に経口投与することにより用量依存的な拮抗作用がみとめられ、yohimbine 1 mg/kg 投与群で優位なビーズ排出時間遅延の改善作用が認められ、さらに yohimbine 3 mg/kg 投与により完全に遅延は改善された(Fig. 5B)。

同様に loperamide の皮下投与でも用量依存的なビーズ排出時間の遅延が認められた(Fig. 6A)。Loperamide 0.3 mg/kg 投与により、正常群と比較しておよそ 3 倍のビーズ排出時間の遅延が認められた。用量を loperamide 1 mg/kg にするとおよそ 4 倍のビーズ排出時間遅延作用が認められた。Clonidine 投与時と同じ排出遅延条件とするために、0.3 mg/kg の用量を採用した。Loperamide 0.3 mg/kg 投与によるビーズ排出時間遅延は、naloxone をビーズ挿入 60 分前に経口投与することにより用量依存的な拮抗がみとめられ、naloxone 3 mg/kg 投与により有意な改善作用が認められ、naloxone 10 mg/kg 投与により完全に遅延は改善された(Fig. 6B)。

5-HT<sub>4</sub> 受容体アゴニストである tegaserod をビーズ挿入 90 分前に経口投与することにより、clonidine によるビーズ排出時間遅延の改善が認められた (Fig. 7A)。Tegaserod 0.3 mg/kg 投与により最大薬効(82 %改善)が認められたが、高用量 (3 mg/kg) では改善効果の減弱し、有意な改善作用が消失した。Tegaserod

は同様に loperamide によるビーズ排出時間遅延を改善した (Fig. 7B)。Tegaserod 1 mg/kg 投与時に最大薬効 (81%) が認められたが、3 mg/kg 投与時には有意ではあったが、薬効の減弱が認められた。

ムスカリン受容体阻害薬である atropine は投与用量範囲 (3–300 µg/kg) においては、clonidine によるビーズ排出時間遅延に対する改善作用はみとめられなかった (Fig. 8A)。一方、atropine 30 µg/kg は loperamide によるビーズ排出時間遅延を優位に改善し、改善率は 70% であった。しかし高用量において改善作用は消失した (Fig. 8B)。

TRPA1 受容体アゴニストである allyl isothiocyanate は loperamide 誘発のビーズ排出時間遅延に対して用量依存的な改善作用を示し、1 mg/kg po にて有意差を示し、3 mg/kg po においても作用の減弱は認められず、正常群と同定の排出時間まで改善を示した (改善率 102%, Fig. 9A)。一方、clonidine 誘発のビーズ排出遅延時間遅延に対しては、有意差はしめさないが 1 mg/kg po で改善傾向をしめし、3 mg/kg po では有意な改善作用を示した。3 mg/kg po 時の改善率は 82% であった (Fig. 9B)。

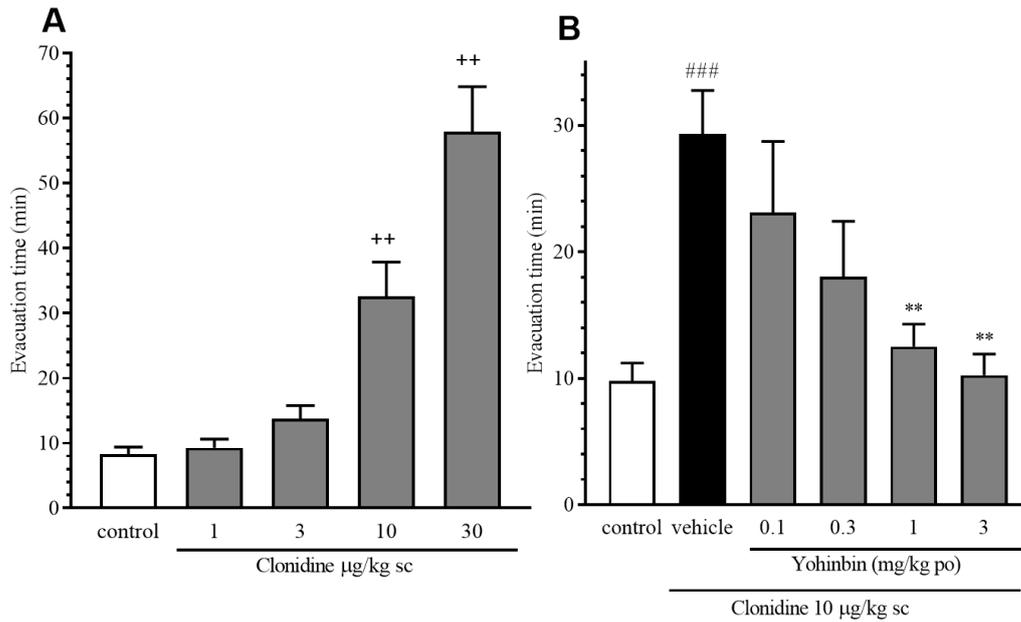


Fig. 5 Effects of clonidine on colonic propulsion in mice.

Dose-dependent delay of colonic propulsion induced by clonidine (A).

All values are presented as the means  $\pm$  S.E.M. (n =6 or 10). ++  $p < 0.01$  compared with the control group (Dunnett's test); ###  $p < 0.01$  compared with the control group (Student's *t*-test); \*\*  $p < 0.01$  compared with the vehicle group (Dunnett's test).

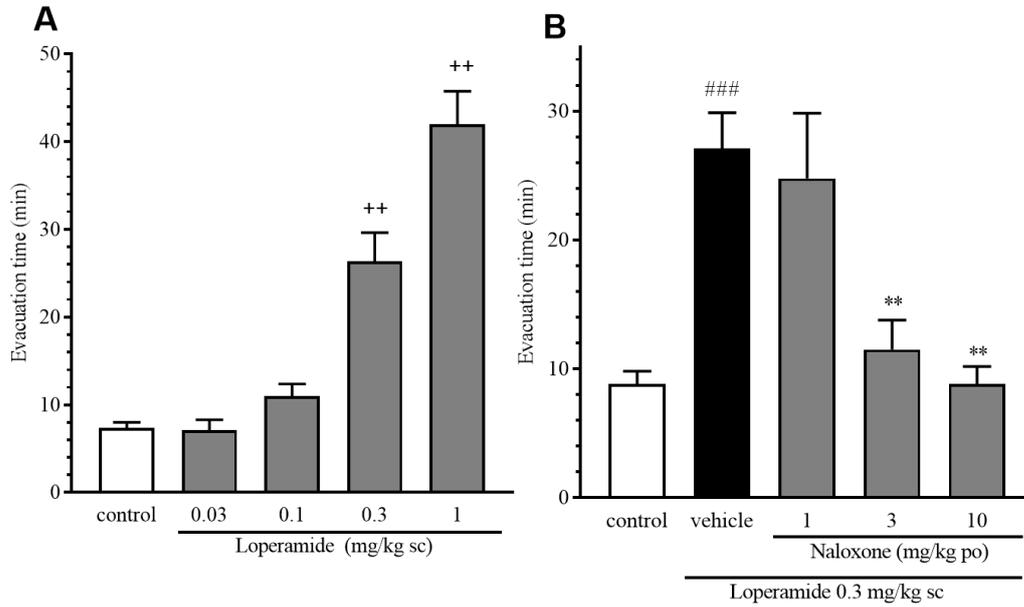


Fig. 6 Effects of loperamide on colonic propulsion in mice.

All values are presented as the means  $\pm$  S.E.M. (n =6 or 10). ++  $p < 0.01$  compared with the control group (Dunnett's test); ###  $p < 0.01$  compared with the control group (Student's  $t$ -test); \*\*  $p < 0.01$  compared with the vehicle group (Dunnett's test).

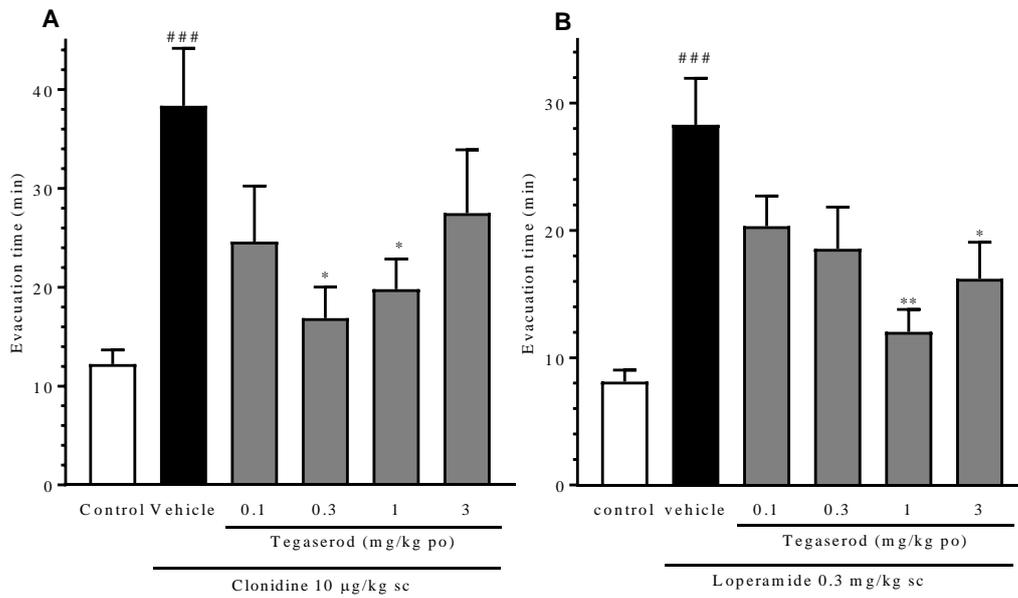


Fig. 7 Effects of tegaserod on the clonidine- and loperamide-induced delay of colonic propulsion in mice.

All values are presented as the means  $\pm$  S.E.M. (n = 10). ###  $p < 0.001$  compared with the control group (Student's  $t$ -test); \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with the vehicle group (Dunnett's test).

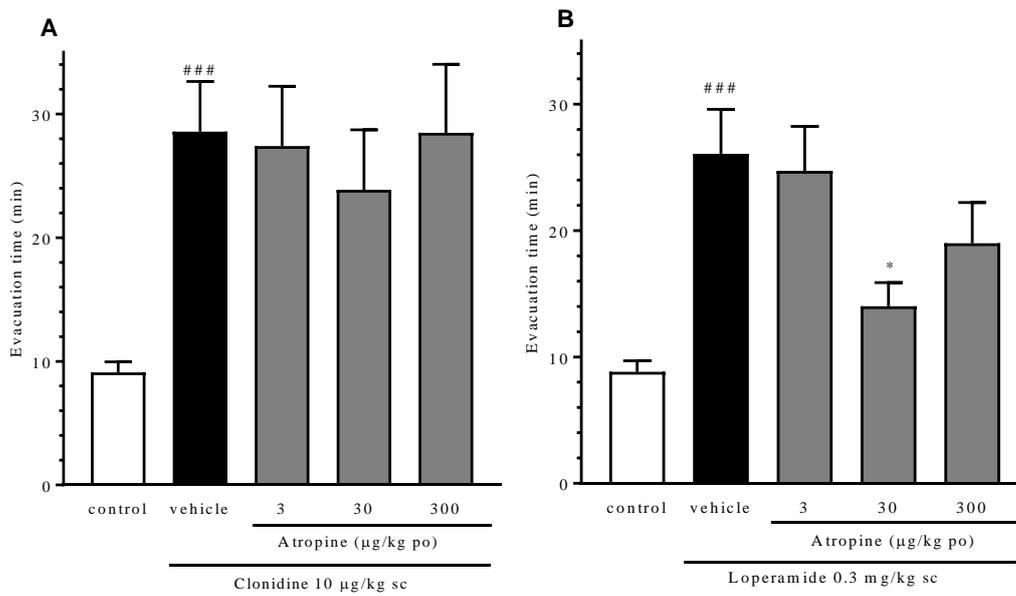


Fig. 8 Effects of atropine on the clonidine- and loperamide-induced delay of colonic propulsion in mice.

All values are presented as the means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 10$ ). <sup>###</sup>  $p < 0.01$  compared with the control group (Student's t-test); \*  $p < 0.05$  compared with the vehicle group (Dunnett's test).

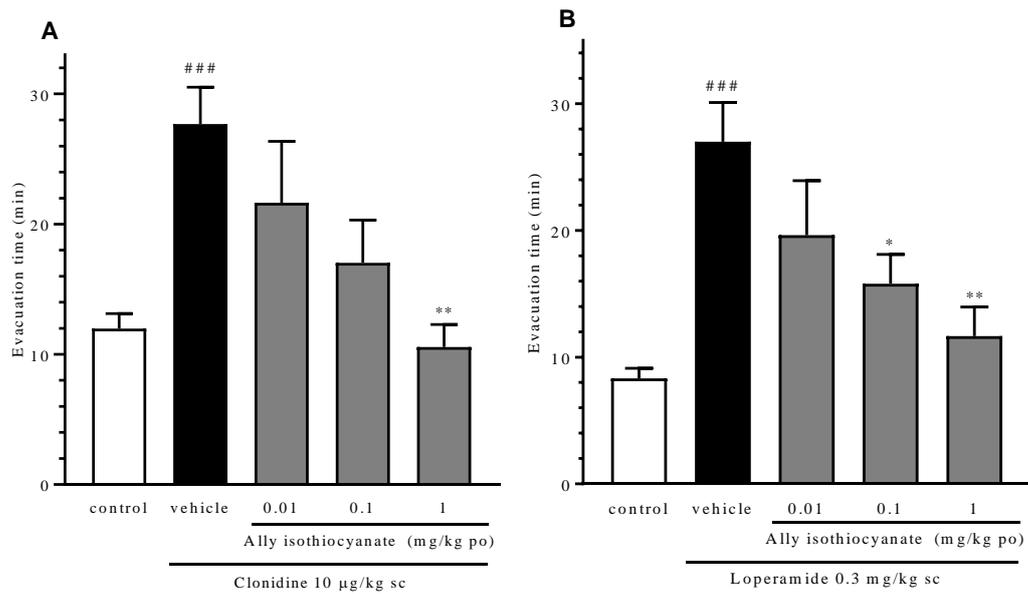


Fig. 9 Effects of allyl isothiocyanate on the clonidine- and loperamide-induced delay of colonic propulsion in mice.

All values are presented as the means  $\pm$  S.E.M. (n = 10). ###  $p < 0.01$  compared with the control group (Student's  $t$ -test); \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with the vehicle group (Dunnett's test).

#### 第四節 考察

機能性便秘は弛緩性の便秘である慢性便秘および痙攣性便秘である便秘型 IBS に大きく大別される (Cash et al., 2007)。今回の研究では、マウスを用いて clonidine および loperamide による腸管輸送能遅延を肛門より挿入したビーズの排出時間を指標として評価する方法を検討し、複数の薬剤を評価することで、その特性を検証した。Clonidine はこれまでにマウスおよびラットにおいて、消化管の収縮を抑制することにより、下痢を抑制することが報告されている (Doherty and Hancock, 1983; Thollander et al., 1989; Hallerback et al., 1987)。さらに clonidine は臨床においても便秘を起こすことが報告されている (Bostock, 1975; Ferder et al., 1987; Gonzales-Gomez et al., 1983)。本研究で clonidine は用量依存的に腸管輸送能を遅延させ、その遅延効果は yohimbine により拮抗された。この結果は clonidine が確かに  $\alpha_2$  adrenergic 受容体を介して腸管輸送能を遅延していることを示している。

また loperamide も臨床で排便回数を減少させるが、モルモットの摘出腸管を用いた実験やイヌを用いた消化管運動測定において腸管の収縮頻度を増加させることが報告されている (Sohji et al., 1978, Fioramonti et al., 1987)。本研究では loperamide も用量依存的に腸管輸送能を遅延させ、その遅延効果は naloxone により拮抗された。この結果は loperamide が確かに  $\mu$  opioid 受容体を介して腸管輸送能を遅延していることを示している。

さらに本研究では、両モデルの臨床妥当性および痙攣性および弛緩性という特性の違いを検証する目的で、tegaserod および atropine の評価を行った。Tegaserod は 5-HT<sub>4</sub> 受容体作動薬であり、腸管神経叢にある神経終末からアセチルコリンおよび GCRP を放出することにより腸管蠕動運動を促進することが知られている (Grider et al., 1998, Liu et al., 2005)。Tegaserod は循環器系の副作

用を理由に市場から一時期撤退していたが、臨床において弛緩性便秘および痙攣性便秘の両方に有効性を示すことが報告されている (Appel et al., 1997, Jin et al., 1999, Scott and Perry, 1999)。そのため、tegaserod の両モデルにおける有効性の検証は、病態モデルの臨床妥当性を検証するために有用と考える。

一方、atropine は *in vivo* および *in vitro* において消化管収縮を阻害し、消化管運動を抑制する (Bush et al., 2000, de Ponti et al., 1993)。臨床においても、抗コリン製剤は痙攣性便秘に対して改善作用を示すことが報告されている (Dobrilla et al., 1990, Passaretti et al., 1989) が、抗コリン剤の主な副作用として便秘も報告されている (Lampela, 2015)。これらのことから atropine の評価は両モデルにおけるビーズ排出時間遅延作用が痙攣性であるか、弛緩性であるかを明らかにするために有効な手段であると考えられる。

本研究結果においても、tegaserod は loperamide 誘発および clonidine 誘発ビーズ排出時間遅延に対して有意な改善作用を示した。一方、atropine は loperamide 誘発ビーズ輸送能遅延モデルにおいてのみ有意な改善作用を示した。本研究結果は、報告されている tegaserod および atropine と同じ抗コリン薬の臨床結果と相同しており、loperamide 誘発ビーズ輸送能遅延モデルは痙攣性便秘モデルとして、clonidine 誘発ビーズ輸送能遅延モデルは弛緩性便秘モデルとしてそれぞれ有用であると考えられる。

本研究において、tegaserod は高用量においてビーズ輸送の遅延改善作用が減弱した。これまでも tegaserod は動物実験や臨床試験においても高用量において作用が減弱することが報告されている (Appel et al., 1997, Jin et al., 1999, Scott and Perry, 1999)。高用量において tegaserod の作用が減弱する理由は、CGRP、 substance P および VIP の放出活性が減少することによるものと推測される (Grider et al., 1998)。

TRPA1 受容体は神経終末に存在し、熱刺激、聴覚および炎症性の痛みの伝達に関与することが報告されている (Bautista et al., 2006, Kwan et al., 2006, Nagata et al., 2005)。これまでに TRPA1 受容体活性化作用がある mustard oil の主成分である allyl isothiocyanate がマウスの摘出腸管と同様にモルモット摘出腸管において収縮作用を示すことを明らかにした (Penuelas et al., 2007; Nozawa et al., 2009)。このため、私は構築した両モデルにおける allyl isothiocyanate の作用を検証した。その結果、allyl isothiocyanate は loperamide 誘発および clonidine 誘発どちらのビーズ輸送能遅延に対しても優位な改善作用を示した。さらに tegaserod とは異なり高用量において作用の減弱は認められなかった。これは *in vivo* における allyl isothiocyanate の腸管輸送能に対する初めての知見である。

これまでに TRPA1 は活性化すると、EC 細胞から 5-HT を放出すること、また摘出組織を用いた検討において、TRPA1 による消化管運動促進作用は、少なくとも部分的には内在性 5-HT の放出を介していることを報告してきた (Nozawa et al., 2009)。*In vitro* 実験において allyl isothiocyanate の 5-HT 放出活性は減弱しないことは、本研究において allyl isothiocyanate が tegaserod とは異なり高用量においても薬効が減弱しなかった理由と推測される。

本研究において、私は loperamide と clonidine を用いた 2 つの薬剤性便秘モデルを構築し、各種薬剤評価によって loperamide は痙攣性便秘、clonidine は弛緩性便秘のモデルであることと臨床で有効性を示す薬剤の評価により臨床予見性のあるモデルであることを明らかにした。さらに、allyl isothiocyanate が両モデルで有効性を示したことから、TRPA1 受容体アゴニストが慢性便秘および弛緩性便秘の治療薬となる可能性を示すことができた。

## 第二章 新規 TRPA1 アゴニスト ASP7663 の評価

## 第一節 背景

TRPA1 受容体は TRP ファミリーの一つである。TRP 受容体はショウジョウバエの光受容に異常をきたす原因遺伝子として同定されたのをきっかけに、ホモログが多数同定され、スーパーファミリーが形成している (Clapham et al., 2001; Moran et al., 2004)。TRP 受容体は 7 つのサブファミリーに分かれている。基本的構造は、6 回膜貫通ドメインとポア形成ドメインからなるサブユニットの 4 量体で受容体を形成する。

Table5 にまとめたように、TRP 受容体は温度感受性があり、様々な刺激物質、pH 変化、機械刺激に対しても反応することが報告されている。そのなかでも TRPA1 受容体は冷温 (17°C以下) に対して反応することが知られており、allyl isothiocyanate、allicin および cinnamaldehyde のような刺激性物質に対しても反応する。発現は、感覚神経と EC 細胞にあり、非選択的要因チャネルであるため、末梢神経において刺激性の反応を惹起することで痛みの伝達に関与することが多く報告されている (Bandell et al. 2004; Bautista et al. 2005; Jordt et al., 2004)。

Penuelas により TRPA1 受容体が消化管に発現していることが報告されているが (Penuelas, 2007)、これまでに消化管内でも特に EC 細胞に特に発現量が高く、TRPA1 活性化により EC 細胞から 5-HT の放出を介して、消化管運動に関与する可能性を報告されている (Nozawa et al., 2009)。

便秘型 IBS の患者は、食後に腹痛、腹部膨満感や悪心といった症状を呈する頻度が高いことが報告されている (Dunlop et al., 2005)。一般的に食後には消化管の運動が亢進されるため、食後の血中 5-HT 濃度の上昇が認められるが、便秘型 IBS 患者では食後の血中 5-HT 濃度の上昇が健常人と比較して低いことが報告されている (Atkinson et al., 2006)。また、前臨床および臨床において、5-HT<sub>3</sub>

受容体アゴニストや 5-HT<sub>4</sub> 受容体アゴニストが慢性便秘および便秘型 IBS に対して改善作用を示すことも報告されている (Appel et al., 1997; Jin et al., 1999; Scott and Perry, 1999; Imanishi et al., 2003; Moore et al., 2013)。以上のことから、便秘型 IBS 患者においては、5-HT の産生もしくは放出の低下が疾患の原因の一つであると考えられる。

上述の通り、これまでに TRPA1 受容体アゴニストが消化管 EC 細胞から 5-HT を放出することを見出しており、さらに前章の結果から、TRPA1 受容体アゴニストが慢性便秘および便秘型 IBS どちらに対しても有効性を示す新規の便秘治療薬となる可能性を示した。これら研究結果をもとに、新規 TRPA 受容体アゴニストの取得を目指して high throughput screening を実施し、取得したインドール母核の化合物を最適化合成することにより ASP7663 ((*E*)-[7-fluoro-1-(2-methylpropyl)-2-oxo-1,2-dihydro-3H-indol-3-ylidene]acetic acid) を見出した (Fig. 10)。本章においては、TRPA1 受容体アゴニスト活性、選択性、5-HT 放出作用を検証した。さらに前章で構築した薬剤誘発便秘モデルにおける作用と腹痛に対する作用を検証するために、結腸拡張誘発腹痛モデル (CRD モデル) を評価した。さらに投与経路の変更などにより、便秘に対する改善作用と腹痛に対する作用機序を明らかにした。

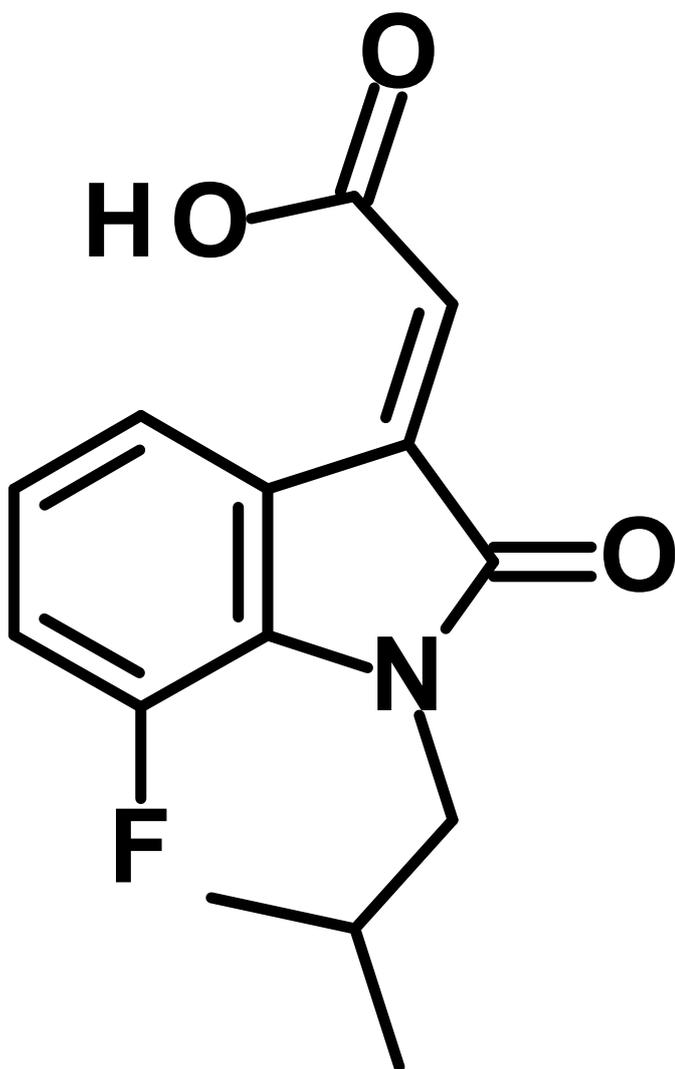


Fig. 10 Chemical structure of ASP7663.

Table 5. Summary of thermo-sensitive TRP family.

Receptor type	Threthold of temperature	Distribution	Stimulator
TRPV1	43°C <	Sensory neuron, Brain	Capsaicin, Acid, Camphor, Lipid 2-APB, NO, Vanilotoxin, Resiniferatoxin
TRPV2	52°C <	Sensory neuron, Brain, Spinal cord, Lung liver, Spleen, Colon Bladder epithelium, Muscle, Immune cells	Growth factor, Thymol, Menthol, Eugenol, Camphor, Carvacrol, Unsaturated fatty acid
TRPV3	32-39°C	Skin, Sensory neuron, Brain, Spinal cord, Stomach, Colon	Low osmotic stimulation, GSK 1016790, Lipid, Mechanical stimulation, 4 $\alpha$ -PDD
TRPV4	27-35°C	Skin, Brain, Bladder epithelium, Kidney, Lung, Inner ear, Vascular endothelial	Calcium
TRPM4	Warm	Heart, Liver	Calcium
TRPM5	Warm	Taste cells, Spleen	
TRPM2	36°C <	Brain, Spleen, Immune cells	cyclic ADP-ribose, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , $\beta$ -NAD <sup>+</sup> , ADP-ribose
TRPM8	25-28°C	Sensory neuron, Prostate	Menthol, Icilin, Membrane phospholipid
TRPA1	17°C <	Sensory neuron, EC cells	Allyl isothiocyanate, Allicin, Cinnamaldehyde, Mechanical stimulation, 2-APB, Carvacrol, Calcium intracellular alkalization, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

## 第二節 実験項

### 方法

### 試薬

Loperamide と clonidine は第一章と同じく Sigma Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) から購入した。ASP7663(Fig.10)と HC-030010(Fig.11)はアステラス製薬にて合成した。

### *In vitro* 評価

#### 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度測定

ヒト、ラットおよびマウス TRPA1 受容体に対する ASP7663 のアゴニスト活性を評価した。ヒト、ラットおよびマウスの TRPA1 受容体を強制発現させた HEK293 細胞は Doihara らの報告で構築した細胞を用いた (Doihara et al., 2009c)。ヒト、ラットおよびマウスの TRPA1 受容体発現 HEK293 細胞を Poly-D-lysine コートした黒色クリアボトム の 96 well plate にそれぞれ 16,000 cells/well, 20,000 cells/well および 20,000 cells/well で播種した。培養液は 10% FBS および 1% penicililin / streptomycin を含んだ DMEM を用いた。播種した細胞は 37°Cにて一晩培養した。実験当日は、溶液を 20 mmol/L HEPES (pH 7.4) および 0.02% CHAPS を含んだ HBSS (HBSS-HEPES-CHAPS 溶液)に  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬である 2  $\mu\text{mol/L}$  Fluo-4 を添加した溶液に入れ替え 2 時間静置した。80  $\mu\text{L}$  の HBSS-HEPES-CHAPS 溶液で 2 回洗浄し評価に用いた。ASP7663 と HC-030010 は DMSO に溶解したのち、HBSS-HEPES-CHAPS 溶液に DMSO の最終濃度が 0.1%になるように調整し、添加した。

測定は FLIPR tetra (Molecular Devices 社)で行った。ASP7663 添加後 30 分間の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を測定し、最大値と最小値の差を蛍光シグナルとした。

## 5-HT 放出評価

HSRRB から取得した QGP-1 を用いた (JCRB0183)。24 well plate に  $3 \times 10^5$  cells/well で播種し、3 日間培養した。培養液は 10% FBS と 1% penicillin / streptomycin を含んだ DMEM を用いた。0.5% FBS と 2  $\mu$ mol/L fluoxetine を含んだ HBSS で 3 回洗浄した。ASP7663 を所定の濃度含んだ HBSS-FBS-fluoxetine 溶液に溶液を置換し、37°C で 60 分間培養した。浮遊した細胞を除くために 3,000 rpm で 5 分間遠心したのち、上清を回収した。上清は測定までの間 80°C で凍結保存した。5-HT は Serotonin EIA Kit (IM-1749, Immunotech 社) を用いて、プロトコル記載の測定方法で行った。405 nm の吸光度は SpectraMax (Molecular Devices 社) を用いて、Spectra Max (Molecular Devices 社製) で測定した。

## *In vivo* 評価

すべての動物実験はアステラス製薬の動物実験委員会にて、飼育方法及び実験方法について承認を得て実施した。動物は 12 時間の明暗周期、温度および湿度が管理された飼育室にて、実験前日まで自由摂食および自由飲水条件下で飼育した。

## 薬剤誘発性便秘モデル

ビーズ挿入方法は前章の詳細と同じ方法で実施した。ASP7663 はビーズ挿入の三分前に経口投与ないしは静脈投与した。経口投与時に ASP7663 は 10% dimethylformamide と 10% Tween 80 を含んだ蒸留水に溶解した。静脈内投与時には、5% dimethylformamide と 5% cremophore を含んだ生理的塩類溶液に

溶解した。TRPA1 受容体阻害剤である HC-030010 による拮抗実験では、HC-030010 をビーズ挿入の 45 分前に経口投与し、ASP7663 を 30 分前に経口投与した。HC-03010 は 0.5% MC 溶液に懸濁し、経口投与した。

迷走神経切断方法は、Ghia らの方法を参考に修正を加えて実施した (Ghia et al., 2006)。ddY マウスに 50 mg/kg sodium pentobarbital を腹腔内投与し麻酔した。腹部を正中切開し、横隔膜下の腹側および背側の迷走神経分枝を切除した。マウスは個別飼育にて 1 週間の回復期間をおいてから実験に使用した。

#### 結腸拡張誘発腹痛評価モデル

腹痛に対する作用を検証するために Fioramonti らの方法を修正した CRD 誘発の痛みモデルの評価を行った (Fioramonti et al., 2003)。雄性 Wistar rat を日本 SLC 社から購入し、使用した。5% イソフルラン麻酔下で、長さ 5 cm のラツテクス製バルーンを肛門より挿入した。挿入時はバルーンの終端が肛門より 1 cm の位置まで挿入し、バルーンが押し出されないようにチューブをテープで尻尾に軽く固定した。その後ラットは個別ケージに入れ、麻酔が覚めてから実験を行った。バルーンには機械制御された Barostat である DISTENDER SERIES III (G&J Electronics 社)を用いて、15~60 mmHg の圧を 15 mmHg ごとにかけた。バルーンに圧をかける時間は 5 分間とし、各圧刺激の間に 5 分間のインターバルを設けた。バルーンに圧をかけている間のラットの腹痛反応の回数を数えた (Fig. 11)。ASP7663 は評価開始 5 分前に尾静脈より投与した。

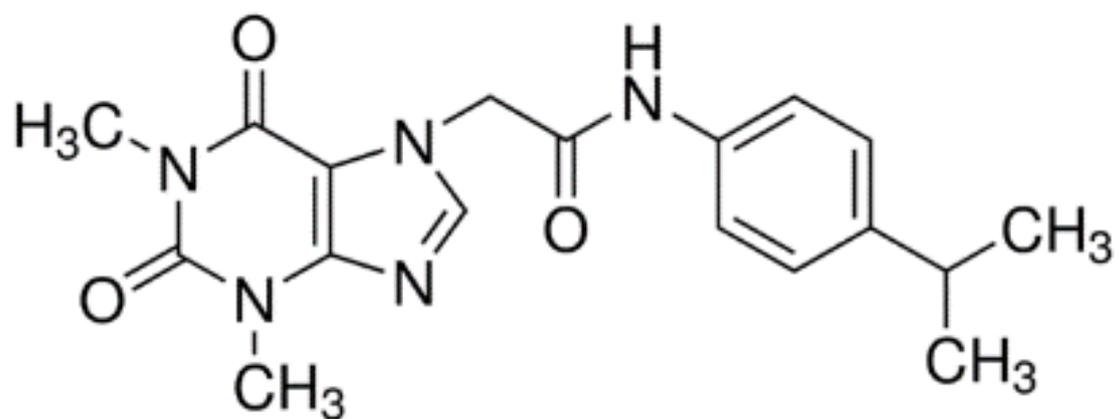


Fig.11 Structure of HC-030100.

## Insertion of the balloon

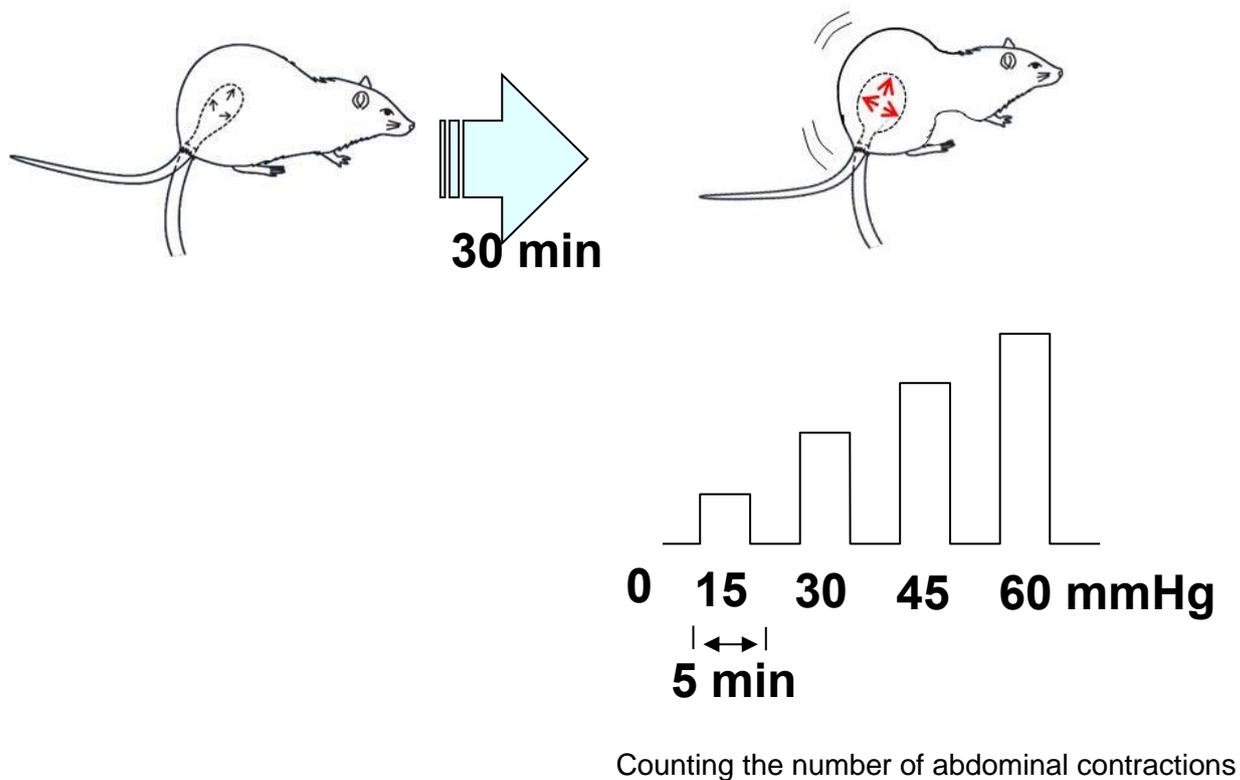


Fig. 12 The method of CRD model.

### 酢酸誘発痛みモデル

雄性 ICR マウス (4-5 週齢) を日本 SLC より購入し、使用した。動物は 12 時間の明暗周期、温度および湿度が管理された飼育室にて、実験前日まで自由摂食および自由飲水条件下で飼育した。

実験当日、測定ケージ 30 分以上馴化した。ASP7663 は酢酸投与 30 分前に経口投与した。0.6% 酢酸溶液は作成し、10 mL/kg を腹腔内投与した。酢酸投与後 20 分間の侵害受容性疼痛行動である writhing (体軀よじり行動) の回数を測定した。

### 薬剤

ASP7663 と HC-030010 はアステラス製薬にて合成した。Loperamide hydrochloride および clonidine hydrochloride は Sigma Aldrich から購入した。

Ca<sup>2+</sup> assay および 5-HT assay では、ASP7663 および HC-030010 は 10 mmol/L DMSO 溶液を作成し、HBSS-HEPES-CHAPS もしくは HBSS-FBS-fluoxetine に溶かして最終濃度とした。

### 統計処理

TRPA1 受容体アゴニスト作用および 5-HT 放出活性の EC<sub>50</sub> 値は、Sigmoid-E<sub>max</sub> 非線形回帰分析により算出した。各試験は n=3 例の独立した 4 試行の幾何平均および 95% 信頼区間を求めた。

動物実験においては、すべての結果は平均 ± 標準誤差で記載した。有意差検定に関しては、2 群間比較の場合には、unpaired Student's *t*-test を行い、3 群以上の比較の場合には Dunnett's multiple comparison test を用いた。有意水準は  $p < 0.05$  を有意差ありと判定したが、腹痛評価の場合には、複数地点での統計を

行うため、多重性を考慮して、Bonferroni's 補正を行った。

### 第三節 結果

ヒト、ラットおよびマウスの TRPA1 受容体を強制発現させた HEK293 細胞において、ASP7663 は同じような濃度依存性をもって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を増加させた。それぞれの強制発現細胞における  $\text{EC}_{50}$  値(95%信頼区間)は、ヒト、ラット、マウス TRPA1 受容体の順に 0.51 (0.40 - 0.66)、0.54 (0.41 - 0.72) および 0.50 (0.41 - 0.63)  $\mu\text{mol/L}$  であった (Fig. 12)。それぞれの強制発現細胞において、ASP7663 10  $\mu\text{mol/L}$  による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇作用は、TRPA1 受容体阻害剤である HC-030031 により抑制された。

ヒト膀胱由来の細胞である QGP-1 細胞を用いた 5-HT 放出作用の検討において、ASP7663 は濃度依存的に 5-HT 放出を促進した。 $\text{EC}_{50}$  値(95%信頼区間)は、72.5 (52.6 - 99.9)  $\mu\text{mol/L}$  であった (Fig. 13)。

第一章で構築した 2 つの便秘モデルにおける ASP7663 の作用を評価した。Clonidine 0.01 mg/kg および loperamide 0.3 mg/kg 皮下投与による有意なビーズ排出時間遅延に対して、ASP7663 を経口投与すると、loperamide による輸送能遅延に対しては、0.3 および 1 mg/kg において有意な改善作用を示した (Fig. 14A)。ASP7663 は同様に clonidine による輸送能遅延作用に対しても 1 および 3 mg/kg において有意な改善作用を示した (Fig. 14B)。ASP7663 は経口投与では有意な改善作用を示した。一方、尾静脈投与ではビーズ排出遅延改善作用を示さなかった (Fig. 15A)。また、ASP7663 経口投与によるビーズ排出能遅延改善作用は迷走神経を切除したマウス (Fig. 15B) および HC-030031 100 mg/kg を事前に経口投与すると消失した (Fig. 15C)。

ASP7663 の腹痛に対する作用を検証するために CRD モデルと酢酸モデルに対する評価を行った。両モデルにおいて ASP7663 単独投与で痛覚反応への影響は認められなかった。CRD モデルにおいて、腹痛反応は直腸内圧の上昇に伴い

増加した。ASP7663 1 mg/kg において、腹痛刺激に対する反応回数の減少傾向が認められて、3 mg/kg において、30、45 および 60 mmHg の圧刺激に対する腹痛反応の有意な減少が認められた (Fig. 16A)。CRD モデルにおいては、ASP7663 は尾静脈投与でも腹痛反応を抑制した (Fig. 16B)。

酢酸誘発痛みモデルの評価において、酢酸投与により有意な腹痛反応の増加が認められた。これに対して ASP7663 は有意な抑制作用を示した (Fig. 17)。

ASP7663 の選択性評価として、60 種類の受容体および TPRV1 に対する作用を検討した結果、ASP7663 は高い選択性持つことが示された (Fig. 18, Table 6)。

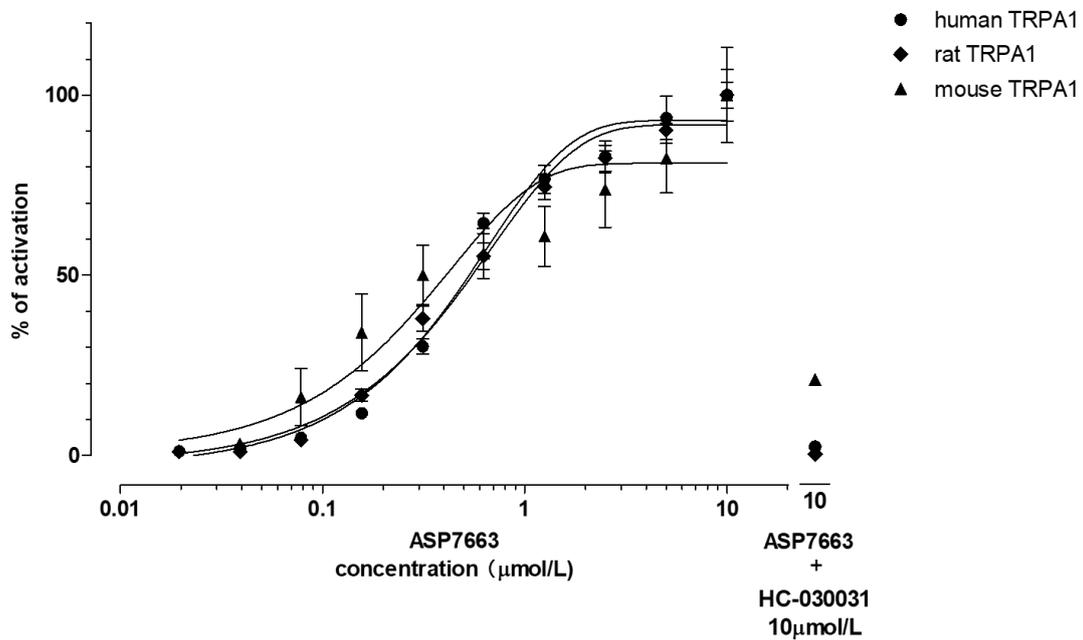


Fig. 13 Activating effects of ASP7663 on human, rat, and mouse TRPA1. ASP7663 increases the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in HEK293 cells expressing human, rat and mouse TRPA1. HC-030031 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) effects on ASP7663 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) induced an increase in levels of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Data are expressed as mean values  $\pm$  S.E.M. (n = 4).

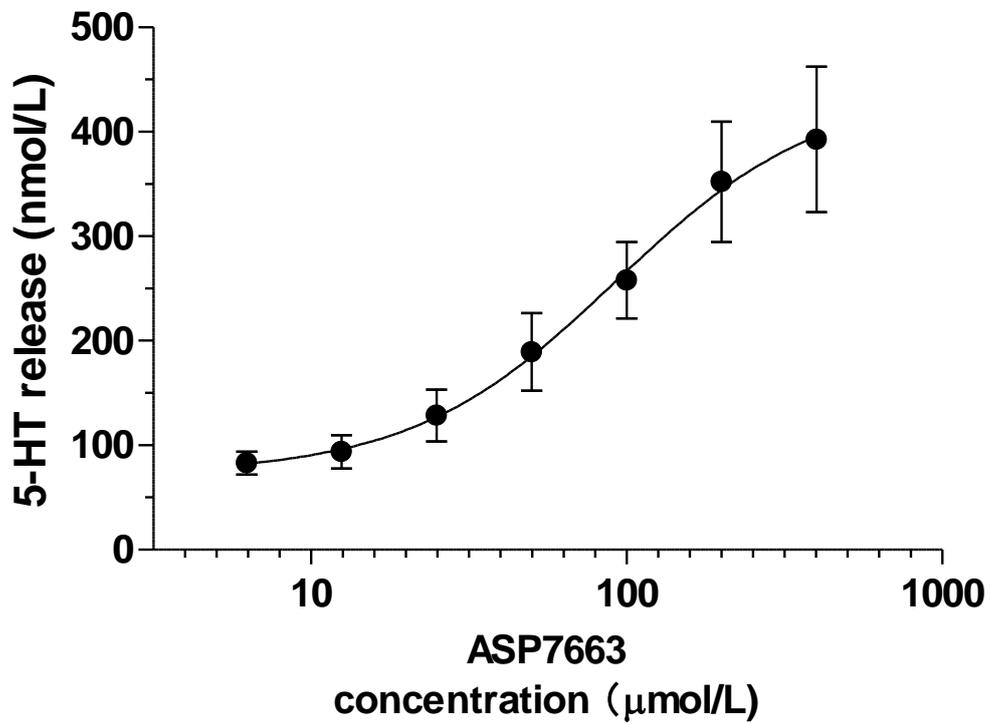


Fig. 14 Effects of ASP7663 on 5-HT released from human QGP-1 Cells. ASP7663 releases 5-HT from QGP-1 cells in a concentration-dependent manner. Data are expressed as mean values  $\pm$  S.E.M. (n = 4).

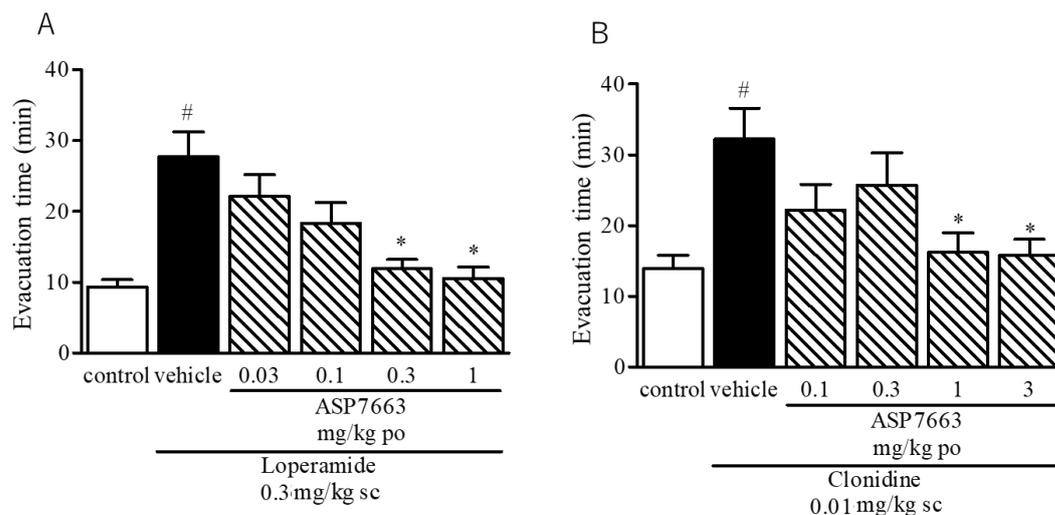


Fig. 15 Effects of orally administered ASP7663 in loperamide- and clonidine-induced constipation models in mice.

ASP7663 improves delays in colonic propulsion induced by loperamide (A) and by clonidine (B). All values are represented as mean  $\pm$  S.E.M (n = 10). #  $p < 0.05$  compared with the control group (Student's t-test); \*  $p < 0.05$  compared with the vehicle group (Dunnett's test).

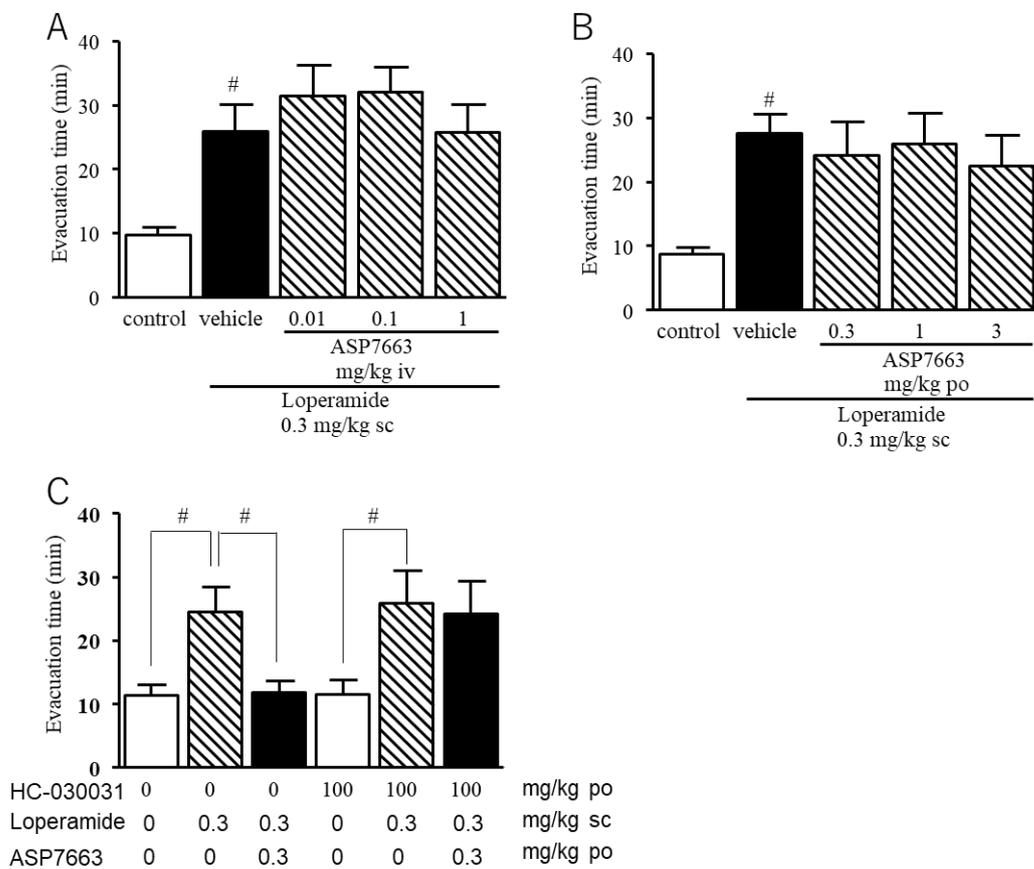


Fig. 16 Effects of ASP7663 in the loperamide-induced constipation model in mice.

Effects of intravenous administration of ASP7663 (A) and effects of oral administration of ASP7663 in vagotomized mice (B). Effects of oral administration of ASP7663 is diminished in HC-030031-pretreated mice (C). All values are presented as the mean  $\pm$  S.E.M (n = 5 or 6). #  $p < 0.05$  compared with the control group (Student's  $t$ -test).

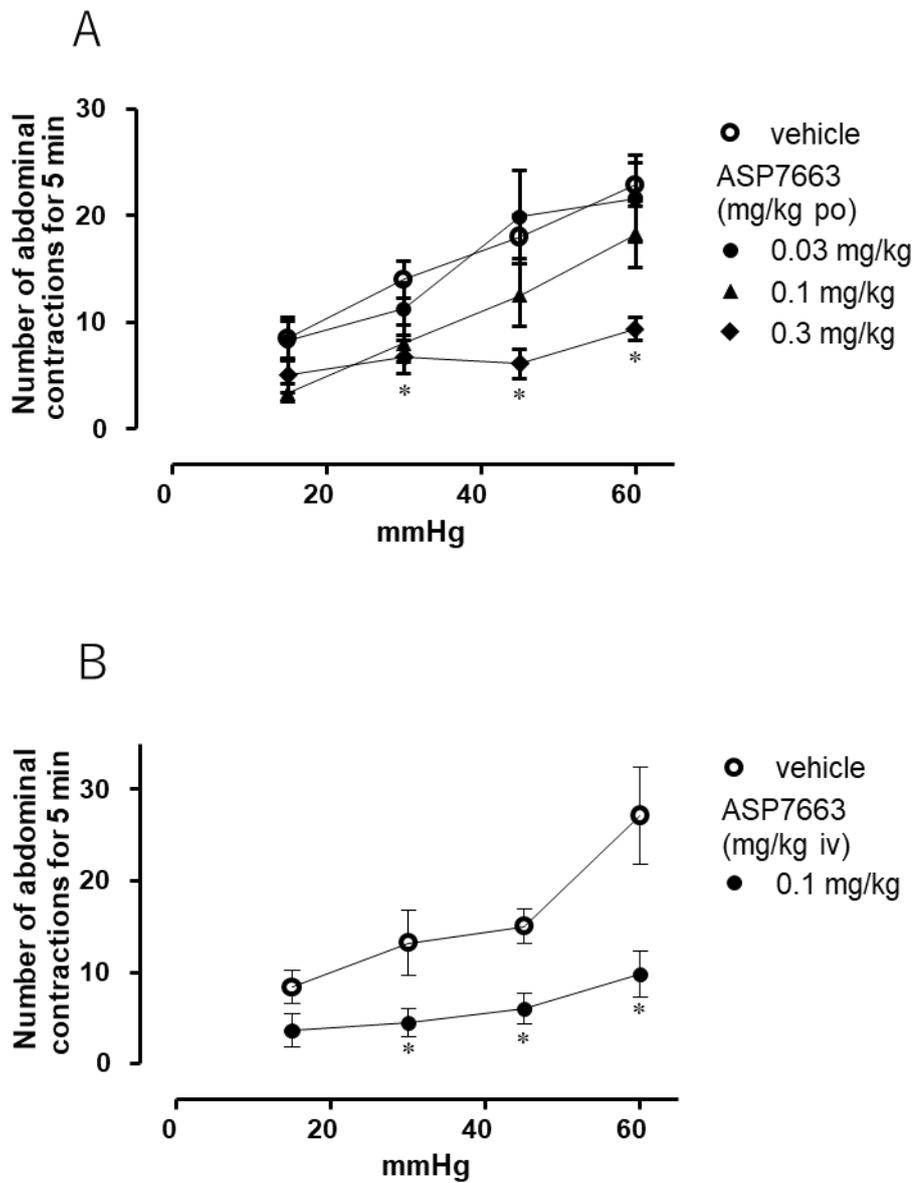


Fig. 17 Inhibitory effects of ASP7663 on colorectal distension in rat.

ASP7663 decreased the number of abdominal contractions induced by increasing the pressure of colorectal distension. All values are presented as the mean  $\pm$  S.E.M (n = 6 or 8). \*  $p < 0.0178$  compared with the vehicle group (Dunnett's test (A) or Student's t-test (B) with Bonferroni correction).

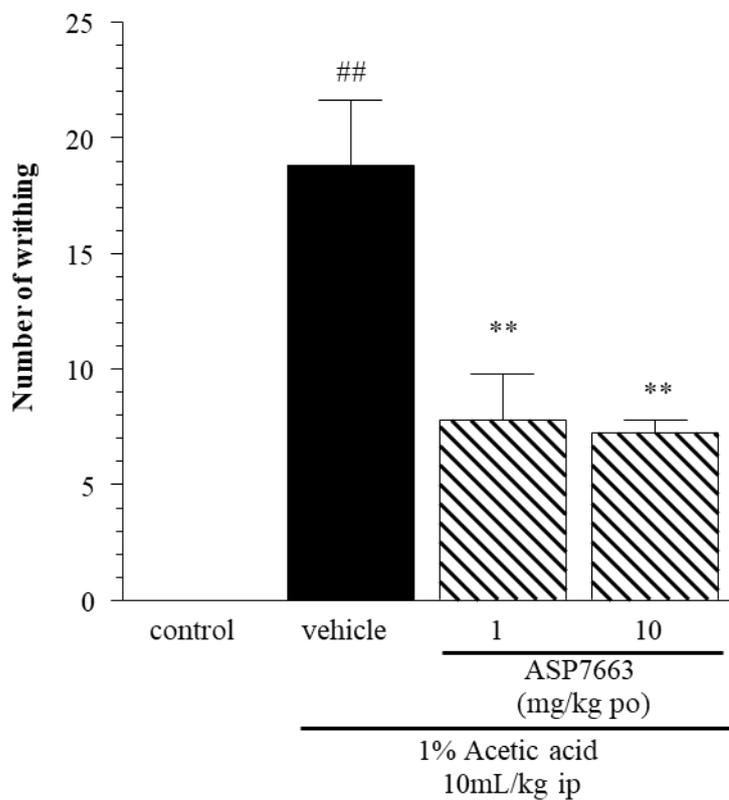


Fig. 18 Effect of ASP7663 on acetic acid-induced writhing behavior in mice.

Number of writhing was counted. All values are presented as the mean  $\pm$  S.E.M (n = 10). ##  $p < 0.01$  compared with the control group (Student's  $t$ -test); \*\*  $p < 0.01$  compared with the vehicle group (Dunnett's test).

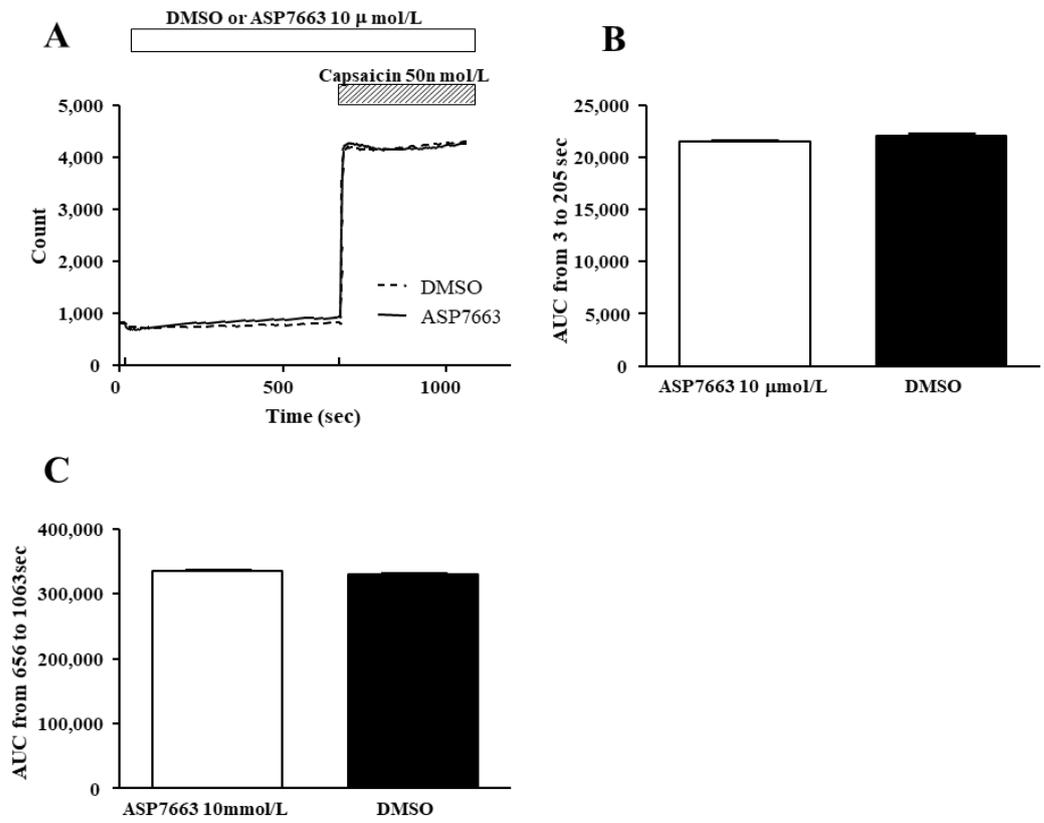


Fig. 19 Effect of ASP7663 on human TRPV1.

The effect of ASP7663 in HEK293 cells expressing human TRPV1 (A). The same experiment data were summarized to evaluate agonist activity (B) and antagonist activity (C). ASP7663 (10  $\mu$ mol/L) did neither increase intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  nor inhibit the effect of capsaicin. Data are expressed as mean values  $\pm$  S.E.M. (n = 3).

Table 6. Inhibition effect of ASP7663 on radioligand binding to various receptors, ion channels, transporters and enzymes.

Assay name	Inhibition (%)	
	ASP7663 10 $\mu$ mol/L	Positive substance
Adenosine A1 (Rat)	0.90	99.42 (DPCPX)
$\alpha_1$ -Adrenergic (Non-selective) (Rat)	0.00	100.00 (Prazosin)
$\alpha_2$ -Adrenergic (Non-selective) (Rat)	0.34	100.00 (Yohimbine)
$\beta$ -Adrenergic (Non-selective) (Rat)	4.50	99.80 (Propranolol)
Angiotensin AT1 (Human)	17.61	99.76 (Angiotensin II)
Angiotensin AT2 (Mouse)	0.00	99.04 (Angiotensin II)
Bradykinin B2 (Human)	0.73	98.66 (HOE140)
Ca channel (Type L, Dihydropyridine) (Rat)	1.16	99.35 (Nitrendipine)
Ca channel (Type N) (Rat)	0.00	97.80 ( $\omega$ -Conotoxin)
Cannabinoid CB1 (Human)	0.00	100.00 (WIN55212-2)
Cannabinoid CB2 (Human)	16.45	100.00 (WIN55212-2)
CCK A (Human)	16.00	99.58 (CCK-8 sulfated)
CCK B (Human)	0.00	100.00 (CCK-8 sulfated)
CRF1 (Human)	0.00	100.00 (Human Urocortin)
Dopamine D1 (Rat)	5.82	99.48 (SCH23390)
Dopamine D2 short (Human)	0.50	99.36 ((+)-Butaclamol)
Dopamine transporter (Human)	0.00	100.00 (GBR12909)
Estrogen (Rat)	42.43	99.19 ( $\beta$ -Estradiol)
Endothelin ETA (Human)	1.82	98.28 (Endothelin)
Endothelin ETB (Human)	7.30	97.87 (Endothelin)
GABA A (Agonist site) (Rat)	1.31	100.00 (Muscimol)
GABA A (BZ central) (Rat)	0.42	100.00 (Diazepam)
GABA B (Rat)	0.00	87.14 (GABA)
Glutamate (AMPA) (Rat)	1.65	95.30 (AMPA)
Glutamate (Kainate) (Rat)	1.51	97.91 (Kainic acid)
Glutamate (NMDA agonist site) (Rat)	1.32	96.01 (Glutamic acid)
Glutamate (NMDA glycine site) (Rat)	0.00	94.08 (MDL105519)
Glycine (Strychnine sensitive) (Rat)	3.18	97.36 (Strychnine)
Histamine H1 (Central) (Guinea pig)	9.00	100.00 (Pyrilamine)
Histamine H2 (Rat)	6.01	94.95 (Cimetidine)
Histamine H3 (Rat)	0.77	99.76 ( $\alpha$ -Methyl histamine)
K channel KATP (Rat)	0.00	100.00 (Glibenclamide)
K channel SkCa (Rat)	9.40	97.83 (Apamin)

Continued			
Leukotriene B4 (Guinea pig)	16.93	100.00	(Leukotriene B4)
Leukotriene D4 (Guinea pig)	0.61	100.00	(Leukotriene D4)
Melatonin MT1 (Human)	0.88	99.16	(Melatonin)
Muscarinic (Non-selective) (Rat)	0.91	99.84	(Atropine)
Muscarinic M1 (Human)	0.00	100.00	(Atropine)
Muscarinic M2 (Human)	2.02	100.00	(Atropine)
Na channel Site 2 (Rat)	13.36	100.00	(Dibucaine)
Neurokinin NK1 (Human)	20.45	100.00	(L-703,606)
Neurokinin NK2 (Human)	0.20	100.00	(Neurokinin A)
Neurokinin NK3 (Human)	3.23	98.24	(Senktide)
Norepinephrine transporter (Human)	8.11	95.36	(Desipramine)
Nicotinic Ni (Rat)	4.18	100.00	(Nicotine)
Opiate (Non-selective) (Rat)	23.93	98.62	(Naloxone)
Opiate $\mu$ (Human)	4.83	100.00	(DAMGO)
Oxytocin (Rat)	5.36	99.40	(Oxytocin)
PAF (Rabbit)	0.04	100.00	(PAF)
Serotonin 5HT1 (Non-selective) (Rat)	3.92	100.00	(Serotonin)
Serotonin 5HT2B (Human)	18.86	100.00	(Serotonin)
Serotonin transporter (Human)	7.47	100.00	(Imipramine)
Sigma (Non-selective) (Guinea pig)	2.27	99.82	(Haloperidol)
Testosterone (Human)	55.86	100.00	(Testosterone)
Vasopressin V1 (Rat)	2.02	100.00	([Arg <sup>8</sup> ]- Vasopressin)
VIP 1 (Human)	3.36	100.00	(VIP)
Acetylcholinesterase (Human)	5.47	99.34	(Eserine)
MAO-A (Rat)	2.69	98.22	(Clorgyline)
MAO-B (Rat)	6.52	77.68	(Ro 16-6491)

Data are expressed as the mean values of duplicate samples. Positive substance concentration: 1  $\mu$ mol/L for HOE140, human urocortin and endothelin, leukotriene B4, leukotriene D4 and VIP, or 10  $\mu$ mol/L for the others.

The inhibition rate was calculated from “100 – binding ratio.”

Binding ratio:  $[(B - N) / (B_0 - N)] \times 100$  (%)

B: Radioactivity or fluorescence intensity in the tube for calculation of inhibition rate (individual value),

B<sub>0</sub>: Radioactivity or fluorescence intensity in the tube for calculation of total reaction (mean value), N:

Radioactivity or fluorescence intensity in the tube for calculation of non-specific reaction (mean value)

#### 第四節 考察

本研究において、ASP7663 はヒト、ラットおよびマウスの TRPA1 受容体を強制発現させた HEK293 細胞において濃度依存的に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を増加させた。それぞれにおける  $\text{EC}_{50}$  値はほぼ同じであることから ASP7663 の活性に種差はないと考えられる。これまでの検討において、allyl isothiocyanate のアゴニスト活性はヒト、マウス、ラット TRPA1 受容体に対する  $\text{EC}_{50}$  値はそれぞれ 1.23、4.23、5.08  $\mu\text{mol/L}$  および cinnamaldehyde の  $\text{EC}_{50}$  値はそれぞれ 21.1、15.2、10.2  $\mu\text{mol/L}$  であった (Doihara et al., 2009c)。ASP7663 の  $\text{EC}_{50}$  値はそれぞれ 0.51、0.54 および 0.50  $\mu\text{mol/L}$  だったため、ASP7663 は既存の TRPA1 受容体アゴニストよりも強い親和性を持つことが明らかとなった。

また、ASP7663 による効果は TRPA1 受容体阻害剤である HC-030010 によって阻害されることから、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 流入は TRPA1 受容体を介した反応であることが確認できた。Allyl isothiocyanate は TRPV1 を直接活性化する作用も報告されており、TRPA1 受容体に対する選択性は高くない (Everaerts, 2011; Ohta, 2007)。一方、ASP7663 の選択性に関しては、60 種の受容体に対する結合親和性評価および TRPV1 受容体に対する活性評価の結果から、TRPA1 受容体に対して高い選択性を持つ化合物であると考えられる。

Takahashi らは、TRPA1 受容体は高酸素濃度および低酸素濃度のいずれにおいても、TRPA1 受容体が活性化するが、高酸素濃度条件下では TRPA1 の Cys 残基のスルフヒドリル基 (-SH) が酸化されてスルフェン基 (-SOH) となり、ジスルフィド結合を形成することで構造が変化し、活性化すること報告している (Takahashi et al., 2011)。Macpherson らの報告では、allyl isothiocyanate が N 末端側にあるシステイン残基 (Cys619, Cys639, Cys663) と結合することにより TRPA1 受容体を活性化する (Macpherson et al., 2007)。一方、Takaya らは

Cys621 残基に結合する新規 TRPA1 受容体アゴニストを見出した (Takaya et al., 2015)。以上の報告から TRPA1 受容体の活性化には Cys 残基へ共有結合することで TRPA1 受容体の構造を変化させて、活性化させていると考えられる。Allyl isothiocyanate を含めて TRPA1 受容体アゴニスト作用を持つ化合物の多くは求電子性化合物である。ASP7663 も同様にインドリノン 3 位もしくはカルボン酸の隣にある二重結合をもつ求電子性化合物であり、どちらか二重結合を介して TRPA1 受容体のシステイン残基と共有結合することで TRPA1 受容体の構造を変化させて活性化する可能性が考えられる。

これまでに、ヒト膵臓上皮細胞由来の細胞である QGP-1 が TRPA1 受容体と 5-HT 合成酵素であるトリプトファンヒドロキシラーゼを発現しており、TRPA1 活性化作用をもつ allyl isothiocyanate および cinnamaldehyde 刺激により 5-HT を放出すること (Doihara et al., 2009b) と、その特徴が EC 細胞と類似していることを明らかとなっている (Nozawa et al., 2009)。これらの知見から QGP-1 細胞が TRPA1 受容体アゴニストによる 5-HT 放出活性を評価するのに適した細胞であると考えられる。ASP7663 は濃度依存的に QGP-1 細胞から 5-HT を放出させたことから、ASP7663 は生体内においても消化管クロム親和性細胞から 5-HT を放出させることができるものと推測される。

生体において 5-HT は、そのほとんどが EC 細胞において合成され、消化管蠕動運動に重要な役割を担っていると考えられている (Gershon, 2003; Spiller, 2007)。そのため、私は ASP7663 が EC 細胞からの 5-HT 放出を介して、消化管蠕動運動に関与する可能性があると考えた。

前章で構築した 2 つの薬剤誘発性ビーズ排出時間遅延モデルにおいて、ASP7663 は有意な改善作用を示した。ASP7663 は評価 3 分前に経口投与することにより、ビーズ排出時間遅延を改善させたため、ASP7663 が結腸へ到達し、

管腔側から EC 細胞を活性化し、消化管運動を亢進したとは考えにくい。そこで尾静脈投与による評価を行い、血中移行後に EC 細胞に作用する可能性を検討した。その結果、尾静脈投与では ASP7663 によるビーズ排出時間遅延の改善作用は認められなかったため、経口投与後素早く吸収され、血中から作用する可能性は低いと考えられた。

胃の内皮層にも EC 細胞が多く存在しており、EC 細胞から放出された 5-HT が迷走神経の活性化を介して結腸運動を亢進する胃-結腸反射と呼ばれる生理現象があること (Gershon and Tack, 2007; Rindi et al, 2004; Lang, 1999) から、ASP7663 は胃-結腸反射を介して結腸蠕動運動に関与する可能性を考えた。そこで迷走神経を切除したマウスを用いて検討した結果、ASP7663 のビーズ排出遅延改善作用は消失した。

これまでに allyl isothiocyanate によるラット胃排出遅延作用が 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬やトリプトファンヒドロキシラーゼ阻害剤により消失することおよび allyl isothiocyanate がイヌ消化管運動測定において経口投与直後下部消化管の運動を亢進することが報告されている (Doihara et al., 2009a,b)。これらの結果は、胃の上皮細胞層には EC 細胞にはある TRPA1 受容体を活性化すると、5-HT の放出を起こすこと、また TRPA1 受容体アゴニストは経口投与直後に鼠消化管運動を亢進することを示している。

以上の結果から、ASP7663 は胃の EC 細胞にある TRPA1 受容体を活性化することにより、5-HT の放出を介して迷走神経を活性化し、胃-結腸反射により結腸運動を亢進させることが示唆された。さらに静脈内投与による作用が認められないことから、EC 細胞の TRPA1 受容体は管腔側にのみ発現しており、血中の ASP7663 が基底膜側から EC 細胞を活性化することはできないと考えられる。

腹痛や腹部不快感は既存の便秘薬の一般的な副作用である (Johnson, 2006; Tack et al., 2011)。膨張性下剤は小管内の水分吸収を抑制することで管腔内の便の水分量を増加させる一方、浸透圧調節剤は消化管からの水分分泌を亢進させることで便性状を柔らかくする (Stephen and Cummings, 1979)。膨張性下剤と浸透圧調整下剤の両薬剤とも管腔内容物の容積を増加させるため、腹部膨満感や腹部痙攣を引き起こすことがある。刺激性緩下剤は消化管管腔壁を直接刺激するため、腹部不快感や腹部痙攣を起こしやすく (Bengtsson and Ohlsson, 2005; Whitehead et al., 2011)、便秘型 IBS 患者においては、頻繁に腹痛を引き起こすことが報告されている (Saito et al., 2002)。これらのことから、腹痛および腹部不快感に対する改善作用を併せ持つことは、新規の便秘薬の既存薬に対する優位性の一つになりえると考え、私は腹痛に対する ASP7663 の評価を行った。ラット CRD モデルは腹痛および腹部不快感に対する薬剤評価系として一般的に用いられるモデルである (Kiso et al., 2001; Liang et al., 2005)。本研究において、ASP7663 は CRD モデルにおいて有意な腹痛抑制作用を示した。この結果は、ASP7663 が腸管輸送能遅延改善作用に合わせて、腹痛および腹部不快感を改善する作用を併せ持つことを示唆しており、既存の便秘薬に対する訴求点になると考えられる。

TRPA1 受容体の活性化は、感覚神経を刺激し、痛みを惹起することが知られており (Brierly et al., 2009; Jordt et al., 2004)、TPRA1 活性化作用をもつ allyl isothiocyanate は CRD モデルで腹痛亢進作用が報告されている (Cattaruzza et al., 2010)。一方で、本研究においては、ASP7663 は経口および静脈内投与のいずれにおいても CRD モデルにおいて有意な腹痛抑制作用を示した。さらに ASP7663 は酢酸誘発腹痛モデルにおいても優位な抑制作用を示した。この結果は、ASP7663 が消化管内圧の感受性に作用して鎮痛作用を示すのではなく、痛

みの伝達経路を抑制することで鎮痛作用を示していると考えられる。また定量評価は実施していないが、ASP7663 は投与後に刺激していない状態では疼痛反応を示すことはなかった。

Cattaruzza らの報告では、allyl isothiocyanate は大腸内に直接投与されている (Cattaruzza et al., 2010)。そのため、高濃度の allyl isothiocyanate が直腸管腔壁に暴露されることになる。Allyl isothiocyanate は TRPA1 に対する選択性が低く、高濃度では TRPV1 受容体の活性化作用もある (Everaerts, 2011; Ohta, 2007)。また、allyl isothiocyanate は TRPA1 受容体を介さずに TRPV1 受容体の温度感受性を増強することも報告されている (Alpizar, 2014)。これらの報告から allyl isothiocyanate は TRPA1 を介さず、TRPV1 受容体の活性化を介して痛みを惹起する可能性が考えられる。一方、60 種類の受容体および TRPV1 受容体に対する選択性評価の結果から、ASP7663 は TRPA1 受容体に対する高い選択性を有しているといえる。このことから allyl isothiocyanate では腹痛反応を惹起し、ASP7663 では腹痛反応を發揮しない理由は、投与経路の違いと TRPA1 に対する選択性の差が考えられる。

本研究では ASP7663 は腹痛抑制作用を示している。また、酢酸誘発痛みモデルでも有効を示していることから、CRD モデルにおける機械刺激のみならず、酢酸といった化学物質による刺激に対しても抑制作用を示している。さらに ASP7663 は静脈内投与でも CRD モデルで有効性を示したことから、ビーズ排出能遅延改善作用とは異なる作用機序により腹痛を抑制すると考えられる。

痛みの伝達に関与する受容体の中には脱感作用により、鎮痛作用を示す受容体も報告されている。一つ目の可能性としては、5-HT 受容体の脱感作の可能性が考えられる。TRPA1 受容体を活性化すると 5-HT が放出されるが、5-HT により活性化する受容体のサブタイプにより腹痛に対する寄与が異なる可能性が

ある。Kiso らの報告によると、5-HT<sub>3</sub> 受容体の活性化剤は CRD モデルにおいて腹痛を抑制させるか、もしくは増悪させる作用はなかった (Kiso et al, 2001)。一方で、5-HT<sub>4</sub> 受容体の活性化は CRD モデルにおいて腹痛反応を抑制する (Liang et al., 2005)。この違いは、前章でも述べたように tegaserod の作用が高用量において、CGRP、 substance P や VIP の放出活性が消失することにより減弱するためと考えられる (Grider et al., 1998)。

もう一つの可能性として TRPA1 受容体自体の脱感作の可能性が考えられる。TRPA1 受容体と同じく TRP ファミリーである TRPV1 は末梢求心性神経終末に発現しており、痛覚伝達に関与すること、さらに活性化剤が TRPV1 受容体の脱感作により鎮痛作用を示すことが報告されている (Bhave et al., 2002; Vyklicky et al., 2008)。臨床においても高濃度 capsaicin を主成分とする Qutenza TM は鎮痛剤として用いられている (Blair, 2018)。TRPA1 受容体も求心性神経終末に発現しており、腸管において機械刺激および化学刺激に対して反応することが報告されている (Brierly et al., 2009; La et al., 2011)。TRPV1 受容体と TRPA1 受容体は同じ求心性神経に共発現しており (Jordt et al., 2004; Kobayashi K. et al 2005; Nagata et al., 2005)、 TRPA1 受容体の活性化により TRPV1 受容体および TRPA1 受容体の脱感作が起きることが報告されている (Akopian et al., 2007; Kistner et al., 2016)。同じ TRPA1 受容体アゴニストである curcumin も TRPA1 受容体の脱感作により鎮痛作用を示すことが報告されている (Leamy et al., 2011)。そのため、ASP7663 も同様に TRPA1 受容体の脱感作により、TRPA1 もしくは TRPV1 を介した痛覚伝達を抑制することにより、腹痛抑制作用を示している可能性が考えられる。

ASP7663 は 5-HT<sub>4</sub> 受容体活性化薬である tegaserod とは異なり、高用量投与においてもビーズ輸送能遅延作用が減弱しなかったことや酢酸誘発痛みモデル

でも有効性を示していることから、5-HT<sub>4</sub>受容体の活性消失よりも TRPA1 受容体の脱感作によると考えているが、より詳細な機序の解明にはさらに詳細な検討が必要と考える。

本章での研究により、TRPA1 受容体に対して選択性の高いアゴニストである ASP7663 を見出した。ASP7663 は胃の EC 細胞にある TRPA1 受容体を活性化することにより、5-HT を放出すると考えられる。5-HT は迷走神経の活性化し、胃-結腸反射を介して下部消化管の運動を亢進することにより、clonidine 誘発および loperamide 誘発の 2 つの便秘モデルにおいて有効性を示していると考えられる。一方、ASP7663 は求心性神経の TRPA1 受容体を脱感作することにより、腹痛抑制作用を示すことが明らかとなった。以上の結果より、ASP7663 は排便症状の改善と腹痛抑制作用を併せ持つ新規の便秘治療薬となる可能性が示唆された。

## 総括

本研究では、薬剤誘発性の2つの便秘モデルを構築し、薬理評価結果から両モデルの特性の違いを明らかにした(Table 7)。そして両便秘モデルにおけるTPRA1受容体アゴニストの評価結果から、TRPA1受容体アゴニストが便秘治療薬となる可能性を示唆し、HTSによる新規化合物探索を開始した。その結果、新規TRPA1受容体アゴニストであるASP7663を見出し、便秘薬としての可能性を検討した。

まず clonidine および loperamide の2薬剤により誘発する直腸運動不全を挿入したビーズの排出時間を指標とすることで定量的に評価できる条件を見出した。これまでも clonidine は消化管を弛緩させることで運動不全を起こすこと (Chahl, 1985; Coupar and Kirby, 1972) および loperamide が痙攣性に消化管運動不全を起こすこと報告されていた (Sohji et al., 1978)。しかし両者の特性の違いを *in vivo* 評価において詳細に検証した報告はなかった。本研究では、clonidine および loperamide の2薬剤による排出遅延の特性を明らかにするために、atropine の評価を行い、atropine による改善作用が認められなかったことから、clonidine は腸管を弛緩させることで運動不全を起こしていること、ならびに loperamide による遅延作用は atropine により改善することから痙攣性の運動不全モデルであることを明らかにした。

臨床において、慢性便秘は弛緩性の便秘であり、便秘型 IBS は痙攣性の便秘であると考えられており、今回構築した clonidine 誘発輸送能遅延モデルは慢性便秘モデルであり、loperamide 誘発輸送能遅延モデルは便秘型 IBS モデルと考えられる。さらに5-HT<sub>4</sub>アゴニストである tegaserod の評価を行った。Tegaserod は臨床において、慢性便秘および便秘型 IBS に対して有効性を示している。高用量において作用が減弱することも両モデルで再現できており、両モデルの臨床妥当性についても示すことができた。

病態モデルの妥当性を判断基準には、表面妥当性、構成妥当性および予測的妥当性の3つがある。表面妥当性とは、動物が示す変化がヒトの症状と類似していることである。構成妥当性とは、病態が惹起される原因がヒトの病態発症の原因と類似していることである。最後に予測的妥当性とは、ヒトにおいて有効性を示している薬剤が病態モデルにおいても有効性を示すことである。今回構築したモデルは、薬剤誘発性であり、ストレスや生活習慣の乱れが原因とされるヒトの病態とは異なるため、構成妥当性はない。しかし、ヒトの病態と同様に弛緩性および痙攣性の消化管運動機能の低下（表面妥当性）と臨床でも有効性を示す tegaserod が有効性を示している（予測的妥当性）の2つを満たした病態モデルと考える。

さらに今回構築した2つのモデルは、肛門から挿入したビーズの排出時間を指標としており、弛緩性および痙攣性の消化管運動機能低下に対する薬剤の効果惹起薬剤以外は同一の条件において比較検討することができる点が便秘治療薬の開発において優れていると考える。また、異なる機序の便秘治療薬候補の薬効を直接的に評価可能でもある。

これまでに TRPA1 受容体が消化管 EC 細胞に多く発現しており、5-HT 放出を介して消化管運動に関与する可能性を示唆されてきた (Nozawa et al., 2009)。本研究において、TRPA1 受容体活性化作用を持つ allyl isothiocyanate が両モデルで有効性を示すことから、TRPA1 活性化薬が新規の便秘治療薬になる可能性を示唆した。そして HTS を実施し、修飾合成を行うことにより新規 TRPA1 受容体アゴニストである ASP7663 を見出した。

TRPA1 強制発現細胞を用いた検討から、ASP7663 はヒト、マウスおよびラット間では種差のないこと、さらに 60 種類の受容体に対する結合親和性評価結果と TRPV1 受容体に対する作用評価結果から選択的な TRPA1 受容体アゴニス

トであることを明らかにした。ASP7663 は ally isothiocyanate および cinnamaldehyde など既存の TRPA1 受容体アゴニストと比較すると活性が強く (Doihara et al., 2009c)、選択性も高いため、公知の TRPA1 受容体アゴニストよりも強力かつ高い安全性が期待される。

QGP1 細胞を用いた検討により、ASP7663 は TRPA1 受容体活性化を介して、EC 細胞から 5-HT を放出させることを明らかにした。5-HT は消化管運動に重要な役割を持つ伝達物質であり、ASP7663 が 5-HT 放出を介して消化管運動に作用することを示唆した。

ASP7663 は構築した 2 つの薬剤誘発性輸送遅延モデルにおいて有効性を示した。投与から薬効発現の速さと、静脈内投与では有効性を示さなかったこと、さらに迷走神経を切除したマウスでは有効性が消失したことから、ASP7663 は胃の EC 細胞にある TRPA1 受容体を活性化し、5-HT を放出することにより、迷走神経を活性化し、胃結腸反射により下部消化管の運動を亢進することを明らかにした。

TRPA1 受容体は痛みの伝達に関与することが報告されており、ASP7663 も疼痛反応を惹起する懸念があったため、直腸拡張刺激誘発の腹痛モデルと酢酸モデルにおける ASP7663 の作用を検討した。ASP7663 は両モデルにおいて鎮痛作用を示した。さらに ASP7663 は静脈内投与でも腹痛抑制作用を示すことから消化管運動に対する作用とは機序が異なることが示唆された。TRPA1 受容体は TRPV1 と相互的に脱感作を起こすことが報告されている (Akopian et al., 2007; Kistner et al., 2016)。このことから ASP7663 は求心性神経路の TRPA1 受容体を脱感作することにより腹痛抑制作用を示す可能性が考えられる。

以上の結果より、ASP7663 は消化管 EC 細胞からの 5-HT 放出および迷走神経活性化を介した胃-結腸反射による消化管運動亢進作用と求心性神経の

TPRA1 受容体を脱感作することによる鎮痛作用を併せもつことが示唆された (Fig. 19)。

慢性便秘および便秘型 IBS は、器質的変化を伴わず、持続的な便秘症状を呈する疾患であり、診断基準も類似している。ASP7663 は弛緩性便秘モデルおよび痙攣性便秘モデルのいずれに対しても有効性を示していることから、慢性便秘および便秘型 IBS いずれに対しても有効性が期待できるため、临床上使いやすい便秘治療薬となることが期待される。また、便秘型 IBS では、腹痛症状も主訴の一つとなっている。本研究において ASP7663 は TRPA1 受容体脱感作により、腹痛評価モデルにおいて抑制作用を示している。このことから ASP7663 は腹痛症状に対して直接的に効果を持つ治療薬となる可能性が示唆される。以上をまとめると、本研究結果より ASP7663 は直接的な腹痛改善作用を有し、消化管運脳機能亢進作用発現が速い新規の便秘治療薬となる可能性があると考えられる。

Table 7. Comparison of two constipation animal models.

	Clonidine induced constipation model	Loperamide induced constipation model
Dose	10 µg/kg sc	0.3 mg/kg sc
Time	30 min prior beads insertion	
Beads evacuation time	Approximately 3 times longer than control	
Yohimbine ( $\alpha_2$ adrenergic antagonist)	Effective	Not tested
Naloxone ( $\mu$ opioid antagonist)	Not tested	Effective
Tegaserod (5-HT <sub>4</sub> receptor agonist)	Effective (Weakened at high dose)	Effective (Weakened at high dose)
Atropine (Muscarinic receptor antagonist)	Not effective	Partially effective
Allyl isothiocyanate (TRPA1 receptor agonist)	Effective	Effective
Type of colonic dysfunction	Atonic	Spastic
Pathological model	Functional constipation	Constipation dominant IBS

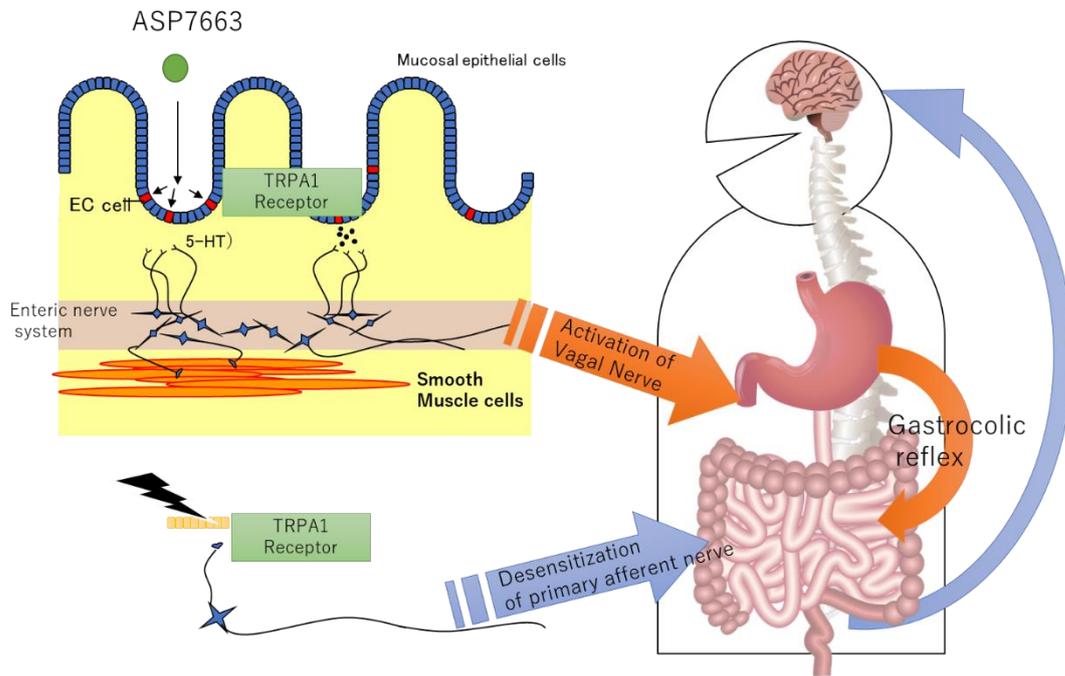


Fig. 20 Schematic image of dual action of TRPA1 receptor activation by ASP7663.

## 参考文献

- Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Hargreaves KM. 2007. Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *Journal of Physiology* 583(Pt 1), 175-93.
- Alpizar YA, Boonen B, Gees M, Sanchez A, Nilius B, Voets T, Talavera K. 2014. Allyl isothiocyanate sensitizes TRPV1 to heat stimulation. *Pflügers Archiv* 466(3):507-15
- Appel S, Kumle, A, Meier, R. 1997. Clinical pharmacodynamics of SDZ HTF 919, a new 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist, in a model of slow colonic transit. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 62, 546-555.
- Atkinson W, Lockhart S, Whorwell PJ, Keevil B, Houghton LA. 2006. Altered 5-hydroxytryptamine signaling in patients with constipation- and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 130(1), 34-43.
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. 2004. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41: 849-857.
- Bassotti G, Chistolini F, Marinozzi G, Morelli A. 2003. Abnormal colonic propagated activity in patients with slow transit constipation and constipation-predominant irritable bowel syndrome. *Digestion* 68, 178-183.
- Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D. 2006. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124: 1269-1282.
- Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Hogestatt ED,

- Julius D, Jordt SE, Zygmunt PM. 2005. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 12248-12252.
- Bengtsson M, Ohlsson B. 2005. Psychological well-being and symptoms in women with chronic constipation treated with sodium picosulphate. *Gastroenterology Nursing* 28: 3-12.
- Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW. 2002. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* 35: 721-731.
- Blair HA. 2018. Capsaicin 8% Dermal Patch: A Review in Peripheral Neuropathic Pain. *Drugs* 2018 Sep 24.
- Bostock MI. 1975. A clinical trial of clonidine (Catapres) in private practice. *The New Zealand Medical Journal* 81, 6-8.
- Brierley SM, Hughes PA, Page AJ, Kwa KY, Martin CM, O'Donnell TA, Cooper NJ, Harrington AM, Adam B, Liebrechts T, Holtmann G, Corey DP, Rychkov GY, Blackshaw LA. 2009. The ion channel TRPA1 is required for normal mechanosensation and is modulated by algescic stimuli. *Gastroenterology* 137: 2084-2095 e2083.
- Bush TG, Spencer NJ, Watters N, Sanders KM, Smith TK. 2000. Spontaneous migrating motor complexes occur in both the terminal ileum and colon of the C57BL/6 mouse in vitro. *Autonomic Neuroscience* 84, 162-168.
- Cash BD, Chang E, Talley NJ, Wald A. 2007. Fresh perspectives in chronic constipation and other functional bowel disorders. *Reviews Gastroenterol Disorder* 7: 116-133.

- Cattaruzza F, Spreadbury I, Miranda-Morales M, Grady EF, Vanner S, Bunnett NW. 2010. Transient receptor potential ankyrin-1 has a major role in mediating visceral pain in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 298: G81-91.
- Chahl LA. 1985. The properties of the clonidine withdrawal response of guinea-pig isolated ileum. *British Journal of Pharmacology* 85, 457-462.
- Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. 2001. The TRP ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience* 2(6):387-96.
- Coupar IM, Kirby MJ. 1972. The effect of clonidine on human isolated smooth muscle. *European Journal of Pharmacology* 17, 50-58.
- Dobrilla G, Imbimbo BP, Piazzzi L, Bensi G. 1990. Long-term treatment of irritable bowel syndrome with cimetropium bromide: a double-blind placebo controlled clinical trial. *Gut* 31, 355-358.
- Doherty NS, Hancock AA. 1983. Role of alpha-2 adrenergic receptors in the control of diarrhea and intestinal motility. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 225, 269-274.
- Doihara H, Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Kojima R, Yokoyama T, Ito H. 2009a. TRPA1 agonists delay gastric emptying in rats through serotonergic pathways. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 380: 353-357.
- Doihara H, Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Kojima R, Yokoyama T, Ito H. 2009c. Molecular cloning and characterization of dog TRPA1 and AITC stimulate the gastrointestinal motility through TRPA1 in conscious dogs. *European Journal of Pharmacology* 617(1-3):124-9.
- Doihara H, Nozawa K, Kojima R, Kawabata-Shoda E, Yokoyama T, Ito H.

- 2009b. QGP-1 cells release 5-HT via TRPA1 activation; a model of human enterochromaffin cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 331: 239-245.
- Drossman DA, Li Z, Andruzzi E, Temple RD, Talley NJ, Thompson WG, Whitehead WE, Janssens J, Funch-Jensen P, Corazziari E, et al. 1993. U.S. householder survey of functional gastrointestinal disorders. Prevalence, sociodemography, and health impact. *Digestive Diseases and Sciences* 38: 1569-1580.
- Dunlop SP, Coleman NS, Blackshaw E, Perkins AC, Singh G, Marsden CA, Spiller RC. 2005. Abnormalities of 5-hydroxytryptamine metabolism in irritable bowel syndrome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 3(4):349-57.
- Everaerts W, Gees M, Alpizar YA, Farre R, Leten C, Apetrei A, Dewachter I, van Leuven F, Vennekens R, De Ridder D, Nilius B, Voets T, Talavera K. 2011. The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil. *Current Biology* 21(4):316-21.
- Everhart JE, Go VL, Johannes RS, Fitzsimmons SC, Roth HP, White LR. 1989. A longitudinal survey of self-reported bowel habits in the United States. *Digestive Diseases and Sciences* 34: 1153-1162.
- Ferder L, Inserra F, Medina F. 1987. Safety aspects of long-term antihypertensive therapy (10 years) with clonidine. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 10 Suppl 12, S104-108.
- Fioramonti J, Gaultier E, Toulouse M, Sanger GJ, Bueno L. 2003. Intestinal anti-nociceptive behavior of NK3 receptor antagonism in conscious rats: evidence to support a peripheral mechanism of action.

Neurogastroenterology and Motility 15: 363-369.

Gershon MD, Tack J. 2007. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 132: 397-414.

Gershon MD. 2003. Plasticity in serotonin control mechanisms in the gut. *Current Opinion in Pharmacology* 3: 600-607.

Ghia JE, Blennerhassett P, Kumar-Ondiveeran H, Verdu EF, Collins SM. 2006. The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* 131: 1122-1130.

Glia A, Lindberg G. 1997. Quality of life in patients with different types of functional constipation. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 32(11), 1083-9.

Gonzalez-Gomez A, Diaz Novas J, Gamio Capestany F, Rodriguez de la Vega A, Garcia-Barreto D. 1983. Clonidine and prazosin in the treatment of hypertensive outpatients--a preliminary study. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy, and Toxicology* 21, 524-528.

Grider JR, Foxx-Orenstein AE, Jin JG. 1998. 5-Hydroxytryptamine<sub>4</sub> receptor agonists initiate the peristaltic reflex in human, rat, and guinea pig intestine. *Gastroenterology* 115, 370-380.

Hallerback B, Glise H, Sjoqvist A. 1987. Reflex sympathetic inhibition of colonic motility in the cat. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 22, 141-148.

Hasler WL, Saad RJ, Rao SS, Wilding GE, Parkman HP, Koch KL, McCallum RW, Kuo B, Sarosiek I, Sitrin MD, Semler JR, Chey WD. 2009. Heightened

colon motor activity measured by a wireless capsule in patients with constipation: relation to colon transit and IBS. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 297(6):G1107-14.

Heymen S, Wexner SD, Gullledge AD. 1993. MMPI assessment of patients with functional bowel disorders. *Diseases of the Colon and Rectum* 36(6):593-6.

Honkura K, Tomata Y, Sugiyama K, Kaiho Y, Watanabe T, Zhang S, Sugawara Y, Tsuji I. 2016. Defecation frequency and cardiovascular disease mortality in Japan: The Ohsaki cohort study. *Atherosclerosis* 246:251-6.

Imanishi N, Iwaoka K, Koshio H, Nagashima SY, Kazuta K, Ohta M, Sakamoto S, Ito H, Akuzawa S, Kiso T, Tsukamoto S, Mase T. 2003. New thiazole derivatives as potent and selective 5-hydroxytryptamine 3 (5-HT<sub>3</sub>) receptor agonists for the treatment of constipation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 11(7):1493-502.

Jacoby MB, Jacoby HI, Mathiasen JR, Raffa RB. 1987. The effect of Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (FMRFamide) on morphine-induced inhibition of colonic propulsive motility in mice. *Neuroscience Letters* 83, 128-132.

Jiang X, Locke GR 3rd, Choung RS, Zinsmeister AR, Schleck CD, Talley NJ. 2008. Prevalence and risk factors for abdominal bloating and visible distention: a population-based study. *Gut* 57(6):756-63

Jin JG, Foxx-Orenstein, AE, Grider JR. 1999. Propulsion in guinea pig colon induced by 5-hydroxytryptamine (HT) via 5-HT<sub>4</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 288, 93-97.

Johnson DA. 2006. Treating chronic constipation : How should we interpret the recommendations? *Clinical Drug Investigation* 26: 547-557.

- Jones MP, Talley NJ, Nuyts G, Dubois D. 2002. Lack of objective evidence of efficacy of laxatives in chronic constipation. *Digestive Diseases and Sciences* 47: 2222-2230.
- Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID, Julius D. 2004. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427: 260-265.
- Khoshoo V, Armstead C, Landry L. 2006. Effect of a laxative with and without tegaserod in adolescents with constipation predominant irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* ;23(1):191-6.
- Kiso T, Ito H, Miyata K, Kamato T, Naitoh Y, Iwaoka K, Yamaguchi T. 2001. A novel 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist, YM-31636, increases gastrointestinal motility without increasing abdominal pain. *European Journal of Pharmacology* 431: 35-41.
- Kistner K, Siklosi N, Babes A, Khalil M, Selescu T, Zimmermann K, Wirtz S, Becker C, Neurath MF, Reeh PW, Engel MA. 2016. Systemic desensitization through TRPA1 channels by capsazepine and mustard oil - a novel strategy against inflammation and pain. *Scientific Reports* 6, 28621.
- Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, Noguchi K. 2005. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *Journal of Comparative Neurology* 2005, 493(4), 596-606.
- Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP. 2006. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50: 277-

289.

- La JH, Schwartz ES, Gebhart GF. 2011. Differences in the expression of transient receptor potential channel V1, transient receptor potential channel A1 and mechanosensitive two pore-domain K<sup>+</sup> channels between the lumbar splanchnic and pelvic nerve innervations of mouse urinary bladder and colon. *Neuroscience* 186: 179-187.
- Lampela P, Lavikainen P, Garcia-Horsman JA, Bell JS, Huupponen R, Hartikainen S. 2015. Anticholinergic drug use, serum anticholinergic activity, and adverse drug events among older people: a population-based study. *Drugs and Aging* 30(5):321-30
- Lang IM. 1999. Noxious stimulation of emesis. *Digestive Diseases and Sciences* 44: 58S-63S.
- Leamy AW, Shukla P, McAlexander MA, Carr MJ, Ghatta S. 2011. Curcumin ((E,E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) activates and desensitizes the nociceptor ion channel TRPA1. *Neuroscience Letters* 503: 157-162.
- Leung L, Riutta T, Kotecha J, Rosser W. 2011. Chronic constipation: an evidence-based review. *Journal of the American Board of Family Medicine* 24(4):436-51.
- Liang LX, Zhang Q, Qian W, Hou XH. 2005. Antinociceptive property of tegaserod in a rat model of chronic visceral hypersensitivity. *Chinese Journal of Digestive Diseases* 6: 21-25.
- Liu M, Geddis MS, Wen Y, Setlik W, Gershon MD. 2005. Expression and function of 5-HT<sub>4</sub> receptors in the mouse enteric nervous system. *American*

- Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 289, G1148-1163.
- Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. 2006. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 130: 1480-1491.
- Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF, Patapoutian A. 2007. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 445(7127):541-5.
- Medoff J, Katz S, Malik P, Pambianco D, Pruitt R, Poulos J, Rank J, Rose M. 2004. Open-label, dose-ranging pilot study of 4 weeks of low-dose therapy with sodium phosphate tablets in chronically constipated adults. *Clinical Therapeutics* 26(9):1479-91.
- Moore NA, Sargent BJ, Manning DD, Guzzo PR. 2013. Partial agonism of 5-HT<sub>3</sub> receptors: a novel approach to the symptomatic treatment of IBS-D. *ACS Chemical Neuroscience* 4(1):43-7
- Moran MM, Xu H, Clapham DE. 2004. TRP ion channels in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 14(3):362-9.
- Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J. 2005. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *Journal of Neuroscience* 25: 4052-4061.
- Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Doihara H, Kojima R, Okada H, Mochizuki S, Sano Y, Inamura K, Matsushime H, Koizumi T, Yokoyama T, Ito H. 2009. TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 3408-3413.

- Ohta T, Imagawa T, Ito S. 2007. Novel agonistic action of mustard oil on recombinant and endogenous porcine transient receptor potential V1 (pTRPV1) channels. *Biochemical Pharmacology* 73(10):1646-56.
- Pare P, Ferrazzi S, Thompson WG, Irvine EJ, Rance L. 2001. An epidemiological survey of constipation in Canada: definitions, rates, demographics, and predictors of health care seeking. *American Journal of Gastroenterology* 96: 3130-3137.
- Passaretti S, Guslandi M, Imbimbo BP, Daniotti S, Tittobello A. 1989. Effects of cimetropium bromide on gastrointestinal transit time in patients with irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 3, 267-276.
- Penuelas A, Tashima K, Tsuchiya S, Matsumoto K, Nakamura T, Horie S, Yano S. 2007. Contractile effect of TRPA1 receptor agonists in the isolated mouse intestine. *European Journal of Pharmacology* 576, 143-150.
- Rindi G, Leiter AB, Kopin AS, Bordi C, Solcia E. 2004. The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1014: 1-12.
- Saito YA, Schoenfeld P, Locke GR, 3rd. 2002. The epidemiology of irritable bowel syndrome in North America: a systematic review. *American Journal of Gastroenterology* 97: 1910-1915.
- Salmoirago-Blotcher E, Crawford S, Jackson E, Ockene J, Ockene I. 2011. Constipation and risk of cardiovascular disease among postmenopausal women. *American Journal of Medicine* 2011 Aug;124(8):714-23.
- Schottek W. 1967. [The "glass ball test"--an informative method for testing the

influence of drugs on colonic peristalsis of rats]. *Arzneimittel Forschung* 17, 649-650.

Scott LJ, Perry CM. 1999. Tegaserod. *Drugs* 58, 491-496; discussion 497-498.

Sohji Y, Kawashima K, Shimizu M. 1978. [Pharmacological studies of loperamide, an anti-diarrheal agent. II. Effects on peristalsis of the small intestine and colon in guinea pigs (author's transl)]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 74, 155-163.

Spiller R. 2007. Recent advances in understanding the role of serotonin in gastrointestinal motility in functional bowel disorders: alterations in 5-HT signalling and metabolism in human disease. *Neurogastroenterology and Motility* 19 Suppl 2: 25-31.

Stephen AM, Cummings JH. 1979. Water-holding by dietary fibre in vitro and its relationship to faecal output in man. *Gut* 20: 722-729.

Sun SX, Dibonaventura M, Purayidathil FW, Wagner JS, Dabbous O, Mody R. 2011. Impact of chronic constipation on health-related quality of life, work productivity, and healthcare resource use: an analysis of the National Health and Wellness Survey. *Digestive Diseases and Sciences* 2011 56(9):2688-95.

Tack J, Muller-Lissner S, Stanghellini V, Boeckxstaens G, Kamm MA, Simren M, Galmiche JP, Fried M. 2011. Diagnosis and treatment of chronic constipation--a European perspective. *Neurogastroenterology and Motility* 23: 697-710.

Takahashi N, Kuwaki T, Kiyonaka S, Numata T, Kozai D, Mizuno Y, Yamamoto S, Naito S, Knevels E, Carmeliet P, Oga T, Kaneko S, Suga S, Nokami T, Yoshida J, Mori Y. 2011. TRPA1 underlies a sensing mechanism for O<sub>2</sub>. *Nat*

Chemistry and Biology 7(10):701-11.

Takaya J, Mio K, Shiraishi T, Kurokawa T, Otsuka S, Mori Y, Uesugi M. 2015.

A Potent and Site-Selective Agonist of TRPA1. *Journal of the American Chemical Society* 137(50):15859-64.

Thollander, M., Hellstrom, P.M., Svensson, T.H., 1989. Suppression of small intestinal motility and morphine withdrawal diarrhoea by clonidine: peripheral site of action. *Acta Physiologica Scandinavica* 137, 385-392.

Vyklicky L, Novakova-Tousova K, Benedikt J, Samad A, Touska F, Vlachova V.

2008. Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. *Physiological Research* 57 Suppl 3: S59-68.

Wald A, Scarpignato C, Kamm MA, Mueller-Lissner S, Helfrich I, Schuijt C, Bubeck J, Limoni C, Petrini O. 2007. The burden of constipation on quality of life: results of a multinational survey. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 26, 227-236.

Whitehead WE, Palsson OS, Gangarosa L, Turner M, Tucker J. 2011.

Lubiprostone does not influence visceral pain thresholds in patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology and Motility* 23: 944-e400.

Wong RK, Palsson OS, Turner MJ, Levy RL, Feld AD, von Korff M, Whitehead

WE. 2010. Inability of the Rome III criteria to distinguish functional constipation from constipation-subtype irritable bowel syndrome. *American Journal of Gastroenterology* 105(10):2228-34.

Yamada K, Onoda Y. 1993. Comparison of the effects of T-1815, yohimbine and naloxone on mouse colonic propulsion. *Journal of Smooth Muscle*

Research 29, 47-53.

de Ponti F, Einaudi A, Cosentino M, D'Angelo L, Lecchini S, Frigo GM, Crema A. 1993. Differential effects of antimuscarinic agents on intestinal motility in the conscious dog. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 264, 789-794.

厚生労働省：平成 28 年度国民生活基礎調査

## 謝辞

本論文の作成にあたり、終始御懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました筑波大学生命環境系 繁森 英幸 教授、白井 健郎 教授、吉田 滋樹 准教授、山田 小須弥 准教授に心より厚く御礼申し上げます。

山之内製薬（現アステラス製薬）入社時より創薬研究への多大なご指導ご助言をいただきましたアステラス製薬研究本部 伊東 洋行 博士、横山 俊英 博士、土居原 仁 博士、加来 英貴 博士、アステラス製薬リアルワールドインフォマティクス機能 野沢 桂 博士、メディカルアフェアーズ本部 毛戸 祥博 博士 ならびに製品戦略部 正田 絵里氏に心より感謝致します。

本論文の作成の機会をお与えいただきましたアステラス製薬株式会社研究本部長 岩井 晃彦 博士、薬物動態研究所 田端 健司 博士、リアルワールドインフォマティクス機能 角山 和久 博士に心より深謝致します。

本研究を行うにあたり、アステラス製薬キャンディデートディスカバリー研究所第 4 ユニットの諸氏とリアルワールドインフォマティクス機能 アナリティクス&インフォマティクス室の諸氏を含む多くの方々にお世話になりました。ここに深く御礼申し上げます。

## 発表論文目録

1. Kojima R, Nozawa K, Doihara H, Keto Y, Kaku H, Yokoyama T, Ito H. Effects of novel TRPA1 receptor agonist ASP7663 in models of drug-induced constipation and visceral pain. *European Journal of Pharmacology*, 723, 288 - 293, 2014 Jan.
  
2. Kojima R, Doihara H, Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Yokoyama T, Ito H. Characterization of two models of drug-induced constipation in mice and evaluation of mustard oil in these models. *Pharmacology*, volume84(4), 227 - 233, 2009 Sep.