

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07721

研究課題名(和文)非神経細胞に発現する侵害受容体の炎症病態に対する役割解明

研究課題名(英文)Evaluation of roles of polymodal receptors in non-neural cells under the inflammatory conditions

研究代表者

高橋 賢次 (Takahashi, Kenji)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00400143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：侵害受容体TRPA1チャネルは非神経細胞にも発現するが、その調節メカニズムは明らかとなっていない。本研究では、TRPA1を内因性に発現する肺がん由来細胞A549を用い、炎症性サイトカインであるIL-1の作用について検討した。IL-1は濃度および時間依存的にTRPA1の反応性を増加した。この増強反応はextracellular-regulated kinase (Erk)阻害薬で抑制された。IL-1はTRPA1タンパク質の細胞膜表面への移行を増加した。以上の結果から、A549細胞において、IL-1はErkの活性化を介してTRPA1の膜移行を誘発し、TRPA1反応を増強することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：TRPA1, a nociceptor, expresses in non-neural cells in inflammatory sites. However, the regulatory mechanisms for the reactivity of TRPA1 in these cells under the inflammatory condition are not clear. To clarify these mechanisms, we examined the effects of inflammatory cytokines on TRPA1 reactivity and expression in the endogenously TRPA1-expressing lung tumor cell line A549. Treatment with interleukin [IL]-1 increased the responsiveness of TRPA1 in a dose- and time-dependent manner. The IL-1-induced increase of TRPA1 responsiveness was inhibited by an extracellular-regulated kinase (Erk) inhibitor (PD98059). IL-1 increased the TRPA1 levels on biotinylated cell surface proteins. These results suggest that IL-1 enhances the translocation of TRPA1 to the plasma membrane via the activation of Erk in A549. TRPA1 may have a pathophysiological role in non-neural lung cells under inflammatory conditions.

研究分野：炎症

キーワード：侵害受容体 TRPA1 炎症性サイトカイン 細胞膜移行

1. 研究開始当初の背景

痛みは知覚神経の自由終末にある侵害受容器が活性化されインパルスを発生し、神経線維を伝導したのち、脳で知覚する。温度刺激・機械的刺激・化学的刺激等に対して様々な侵害受容器が応答する。炎症組織の発痛もこれらの刺激を介して生じている。例えば、損傷した組織からは、プロスタグランジンやブラジキニンなどの炎症性因子が産生・放出され、発痛や痛覚過敏を引き起こす。また、温度刺激・機械的刺激・化学的刺激に応答する侵害受容器として transient receptor potential (TRP) チャンネルが知られている。

TRP チャンネルは6つのサブファミリー (TRPV, TRPM, TRPC, TRPML, TRPP, TRPA) に分類され、侵害受容器としては TRPV, TRPM, TRPA チャンネルが注目されている。TRPV1 チャンネルはトウガラシに含まれる辛味成分であるカプサイシンの受容体として知られ、痛みの刺激となる熱や酸をも認識する侵害受容器である。また、炎症組織で放出されるサイトカインや脂質、プロトンなどの様々な因子がチャンネルや受容体を介して侵害刺激を発生させることも明らかとなり、痛みを認識する分子実体の解明は大きく進展している (Nature Neurosci. 5: 1062-1067, 2002, Cell 139: 267-284, 2009)。

一方、炎症性疼痛の要因の1つであるプロスタグランジンやブラジキニンは痛みの認識だけでなく、炎症組織中の神経細胞以外の細胞が受容体を発現し、炎症の増悪にも作用している。このように侵害受容器が神経細胞以外の非神経細胞にも発現していることが報告されつつある。前述の TRPV1 チャンネルは気管支上皮細胞に発現し、酸誘発の気管支粘液の分泌を促進しているという報告がなされている。また、酸誘発の咳・気管収縮に関わるとされているものの議論の最中である (Mediators Inflamm 2014:712962, 2014)。

2. 研究の目的

侵害受容器は知覚神経に発現し、痛みセンサーとして機能している。一方では、これら侵害受容器は神経細胞だけでなく他の組織構成細胞においても発現が認められているものの、その役割は明らかとなっていない。特に、炎症病態組織で産生される発痛物質は神経細胞において痛みを誘発するほか炎症

応答そのものにも関わっている可能性がある。しかしながら、この全容は明らかとなっていない。

本研究では、炎症病態における神経細胞以外の組織構成細胞や間質細胞 (非神経細胞) に発現する侵害受容器の役割を明らかにし、新しい炎症病態調節の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) Chemicals

主として以下の薬物を使用した (vehicle, 濃度)。IL-1 α (0.1%ウシ血清アルブミン, 10 μ g/mL) はペプロテック (米国) から購入した。イソチオシアン酸アリル (AITC) (ジメチルスルホキシド [DMSO], 1 M) はナカライテスク (京都) から購入した。PD98059 (Erk 阻害薬) (DMSO, 10 mM), SB203580 (p38 MAPK 阻害薬) (DMSO, 10 mM), JNK inhibitor II (DMSO, 10 mM) は Calbiochem (東京) から購入した。LY294002 (PI3K 阻害薬) (DMSO, 10 mM) と HC-030031 (TRPA1 アンタゴニスト) (DMSO, 0.1 M) は和光純薬 (大阪) より購入した。

(2) 細胞培養

ヒト肺がん細胞株 A549 は理化学研究所細胞材料開発室より得た。細胞は、10%ウシ胎児血清, 100 μ g/mL ストレプトマイシン, 100 U/mL ペニシリン含有 DMEM 培地で培養した。細胞は、37 °C で CO₂ インキュベーターで培養した。

(3) 細胞内 Ca²⁺濃度測定

細胞に指示薬である Fura-2-AM (Life technologies, 東京) を取り込ませた (10 μ M, 40 min, 37 °C)。細胞は専用のチャンバー内に設置し、溶液を還流した。検出は 340 nm と 380 nm の励起光による蛍光量 (500 nm) を 5 秒おきに測定した (Aqua Cosmos, 浜松ホトニクス, 浜松)。

(4) ウェスタンブロット解析

RIPA バッファー (1%プロテアーゼ阻害剤, 1%ホスファターゼ阻害剤含有) で試料を調製し、サンプルバッファー (625 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% SDS, 2%メルカプトエタノール, 2%グリセリン) と等量で混合し、泳動用の試料とした。SDS-PAGE で分離した。ニトロセ

ルロース膜に転写したのち、5%スキムミルク /Tris バッファーでブロッキングし(室温, 1時間), 一次抗体および二次抗体を反応させた。一次抗体には, Erk, リン酸化型 Erk (Cell signaling technology, 東京) および TRPA1 (LifeSpan BioSciences, 米国), β -actin (Santa Cruz Biotechnology, 米国) を用いた。検出には, 化学発光法を用いた。

(5) 細胞表面タンパク質のビオチン標識

細胞に IL-1 α を適用し, 24 時間インキュベーションした細胞を回収し, PBS で洗浄し, 0.5 mg/mL EZ-Link Sulfo-NHS-LC-biotin (Thermo Fisher, 東京) でビオチン化した (4℃, 1 hr)。グリシン (50 mM) でビオチンを取り除き, RIPA バッファーで細胞を溶解した。遠心 (13,200 \times g, 4℃, 30 min) ののち, 上清を回収し, ストレプトアビジンアガロースビーズ (Solulink, 米国) でビオチン標識された細胞表面タンパク質を分離した。得られた試料をウェスタンブロット解析に用いた。

(6) 統計

データは, 平均値 \pm 標準誤差で表示した。2群の比較は, *t*-test を用い, 3群以上は一元分散分析ののち Turkey-kramer test を用いた。

4. 研究成果

(1) IL-1 α は A549 細胞の TRPA1 反応性を増強した。

A549 細胞は内因性に TRPA1 を発現し, アゴニストである AITC によって活性化される。AITC の細胞内 Ca²⁺ 増加反応は 0.3 mM で最大となるため, この濃度を使用した。AITC は A549 細胞の細胞内 Ca²⁺ 濃度を増加した。IL-1 α (1 ng/mL) 適用 24 時間後の A549 細胞では, AITC の細胞内 Ca²⁺ 反応性が増加した。これらの反応は, TRPA1 アンタゴニストである HC-030031 によって抑制された (図 1A)。

IL-1 α は濃度依存的に AITC 反応性を増加したが, 細胞内 Ca²⁺ 量は非処理群のそれと変わらなかった (図 1B)。加えて, IL-1 α (1 ng/mL) は時間とともに 24 時間まで AITC の反応性を増加した (図 1C)。これらの結果は, IL-1 α が A549 細胞の TRPA1 反応性を増加したことを示す。肺の障害や疾患では, さまざまな炎症性サイトカインが重要な役割を果たしている。本実験において, IL-1 β と TNF α

を試験したが, IL-1 α と異なり AITC の応答性に有意な増加作用は見られなかった。このことは, 典型的な炎症性サイトカインの中で IL-1 α が選択的に TRPA1 の反応性を増強していることを示唆した。

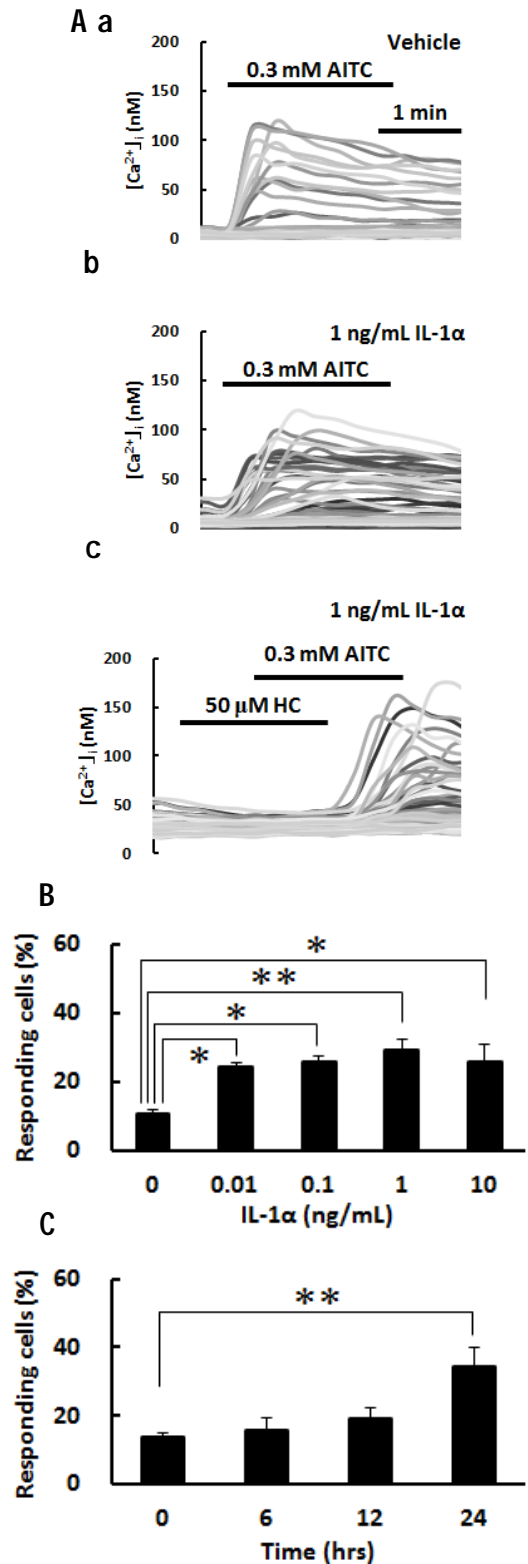


図 1 A549 細胞の IL-1 α による AITC の TRPA1 反応性の増強

(A) A549 細胞における vehicle (a) および

IL-1 α (b , 1 ng/mL, 24 時間) による AITC による細胞内 Ca²⁺増加反応 (c)IL-1 α (1 ng/mL, 24 時間) の AITC 誘発細胞内 Ca²⁺増加反応に対する TRPA1 阻害薬 HC-030031(HC , 50 μ M) の効果 . (B) AITC の TRPA1 反応性における IL-1 α 濃度依存性 (24 時間) . * ; p < 0.05 vs 0 ng/mL (C) AITC の TRPA1 反応性における IL-1 α (1 ng/mL) の適用時間依存性 . * ; p < 0.05 , ** ; p < 0.01 , vs 0 hr .

(2) IL-1 α による TRPA1 反応性の増加に Erk が関与した .

IL-1 α の TRPA1 反応性増加作用のメカニズムを明らかにするために、細胞内シグナル経路の阻害薬の効果を明らかにした . Extracellular-regulated kinase (Erk)の阻害薬である PD98059 を IL-1 α 適用 1 時間前から処理したところ、AITC の反応性の増加が抑制された . PI3K , JNK および p38MAPK の阻害薬も用いたが、それらの抑制効果は見られなかった (図 2 A) . 次に Erk の活性化が IL-1 α に関与しているかどうか試験した . Erk の活性化型であるリン酸化型 Erk は IL-1 α の適用により増加した . IL-1 α を A549 細胞に適用すると 30 分でリン酸化型 Erk1 と Erk2 が増加し、その後減少したが、時間経過とともに 24 時間後まで再び増加した . 一方、Erk1 と Erk2 発現量については IL-1 α の適用によって変化しなかった (図 2 B) .

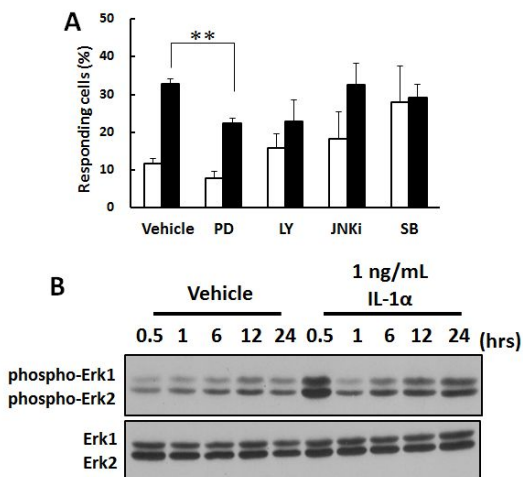


図 2 IL-1 α による TRPA1 反応性の増加における Erk の関与

(A) IL-1 α (1 ng/mL , 24 時間) 適用 (■) および非適用 (□) A549 細胞における AITC (0.3 mM) の細胞内 Ca²⁺反応性に対する各細胞内

シグナル経路阻害薬の効果 (Vehicle ; ジメチルスルホキシド , PD ; 10 μ M PD98059 , LY ; 10 μ M LY294002 , JNKi ; 10 μ M JNK inhibitor II , SB ; 10 μ M SB203580) . ** ; p < 0.01 , vs vehicle (B) IL-1 α による Erk の活性化像 (時間経過) .

(3) IL-1 α は Erk の活性化を介して TRPA1 の細胞表面への局在を増加した .

IL-1 α は A549 細胞の TRPA1 発現を増加する可能性が考えられたため、TRPA1 の発現をウェスタンブロット解析で明らかにした . A549 細胞の TRPA1 発現量は IL-1 α の適用群と対照群の間では差が見られなかった (図 3 A) . これに対して、ビオチン化した細胞表面のタンパク質のみを解析したところ、細胞表面に存在する TRPA1 の量が IL-1 α によって増加していることが明らかとなった . Erk 阻害薬によって、IL-1 α 誘発の細胞表面 TRPA1 局在の増加は抑制された (図 3 B) . これらの結果は、IL-1 α が Erk を介して TRPA1 の細胞内から細胞膜への移行を誘導することが示唆された .

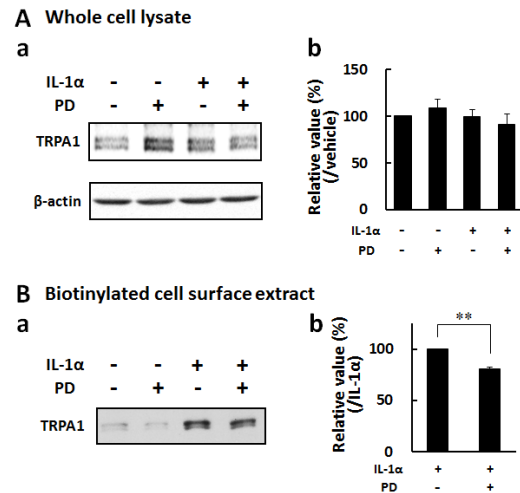


図 3 Erk を介した IL-1 α 誘発 TRPA1 細胞表面移行 .

(A) 全細胞と (B) 細胞表面の TRPA1 の発現 . (a) 典型的なウェスタンブロット解析像 . (b) 各条件におけるバンド強度の相対比較 . ** ; P < 0.01 , vs IL-1 α 単独

(4) 考察

本研究では、IL-1 α が A549 細胞の AITC による TRPA1 の反応性が増加することを明らかにした . これは TRPA1 の発現量の増加で

はなく, TRPA1 の細胞表面への移行を促進するものであった。いくつかの TRP チャンネルにおいても, 細胞膜表面の発現が細胞外因子によって調節されることが報告されている (EMBO J, 2005, 24:4211, Mol Pain, 2005, 1:17)。異所性に発現した TRPV1 チャンネルは神経成長因子 (NGF) やインスリンによって細胞表面のレベルが増加した。また, 炎症性の刺激が TRPA1 の発現量を増加することも滑膜細胞や肺上皮細胞での報告がある (JBC, 2012, 287:31962, Mediat Inflamm, 2015, 2015:148367)。IL-1 は, IL-1 α と IL-1 β の 2 つのサブタイプがあり, いずれも炎症性サイトカインとして機能する。IL-1 α は損傷を受けた細胞から放出され, 活性を示す。IL-1 β は caspase-1 によって分解されることで活性を示すようになる。2 つの IL-1 はともに IL-1 受容体を活性化するが, その特徴は必ずしも一致していない (Semin Immunol, 2013, 25:469)。本研究の結果においても, IL-1 β ではなく, IL-1 α が肺がん上皮由来細胞 A549 の AITC の応答性を増加した。このことは, IL-1 α が IL-1 β よりも炎症病態に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。Erk は様々な組織や細胞において発現し, 生存や増殖, 遊走, 分泌などの多様な機能を示す。Erk は Erk1 と Erk2 の 2 つのサブタイプが存在し 80%以上の相同性を示す。これらのサブタイプが異なる機能を示す報告がある (J Biol, 2006, 5:13)。また, Erk の活性化パターンは一過性のものと持続性のものがあり刺激によって異なることが示されている (BioEssays, 2003, 25:1085)。本研究でも, IL-1 α は適用後 30 分以内で Erk1 と Erk2 を活性化した。それらの活性化はその後減弱し基底レベルに戻ったのち適用 24 時間後までに再び徐々に活性化した。TRPA1 の応答性が 24 時間後に最大となることから, Erk1 と Erk2 の持続した活性化が TRPA1 の細胞表面への移行には必要であると考えられた。TRPA1 は知覚神経において侵害受容器として痛みを感知するだけでなく, 非神経細胞において炎症性因子の放出にも関与している。実際, A549 細胞も TRPA1 の活性化を介して炎症性サイトカインである IL-8 を放出することが報告されている (J Recept Sig, 2011, 31:650)。それゆえ, 初期の炎症性サイトカインである IL-1 α は TRPA1 の調節を介して炎症を増悪する可能

性がある。さらには, TRP チャンネルは腫瘍細胞に発現し, 増殖と関連性があることが報告されている (Br J Pharmacol, 2014, 171:2582)。したがって, TRPA1 と炎症性サイトカインによる相互作用を標的とすることは炎症病態や腫瘍に対する新しい治療方法につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Involvement of nociceptive transient receptor potential channels in repellent action of pulegone. A. Majikina, K. Takahashi, S. Saito, M. Tominaga, T. Ohta, Biochem Pharmacol., 151: 89-95, 2018, 査読あり。

Possible involvement of transient receptor potential ankyrin 1 in Ca²⁺ signaling via T-type Ca²⁺ channel in mouse sensory neurons. Y. Nishizawa, K. Takahashi, N. Oguma, M. Tominaga, T. Ohta, J Neurosci Res., 96: 901-910, 2018, 査読あり。

Membrane translocation of transient receptor potential ankyrin 1 induced by inflammatory cytokines in lung cancer cells. K. Takahashi and T. Ohta, Biochem. Biophys. Res. Commun., 490: 587-593, 2017, 査読あり。

[学会発表](計 2件)

高橋賢次, メントールによるヒト肺がん由来細胞 A549 の細胞増殖抑制作用, 第 160 回日本獣医学会, 2017

高橋賢次, Interleukine-1 α によるヒト肺がん由来細胞 A549 における TRPA1 応答増加作用, 第 159 回日本獣医学会, 2016

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 賢次 (TAKAHASHI, Kenji)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号: 00400143

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

太田 利男 (OHTA, Toshio)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：20176895

(4)研究協力者

()