

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15127

研究課題名(和文) 貪食細胞におけるサイレントカリウムチャネルのon-off スwitchング機構の解明

研究課題名(英文) Functions of functionally silent potassium channels in macrophages

研究代表者

鈴木 良明 (Suzuki, Yoshiaki)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：80707555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージは自然免疫系において非常に重要な役割を担っている。マクロファージの一連の免疫応答に対するイオンチャネルの寄与については未だ不明な点が多い。本研究では、マクロファージに発現するK⁺チャネルのうち役割が未知である2ポアドメインK⁺チャネル(TWIK-1)と内向き整流性K⁺チャネル(Kir2)の生理的意義の解明を目的とした。TWIK-1はマクロファージにおいてK⁺チャネルではなくむしろ非選択的な陽イオンチャネルとして機能し、膜電位制御を介してサイトカイン産生などに寄与することが示唆された。一方、Kir2.1はマクロファージのM1分化に対する抑制因子の1つとして機能すると推測される。

研究成果の概要(英文)：Macrophages play key roles in innate immunity. Ion channels in macrophages modulate membrane potentials and control intracellular calcium signaling to cause immune responses against various types of stimulation. In the present study, we focused on two kinds of potassium channels, TWIK-1 (a member of two pore domain K⁺ channel family) and Kir2.1 (a member of inwardly rectifying K⁺ channel family), whose roles in macrophages are unknown. In our study it was indicated that TWIK-1 functions as a non-selective cation channel not a K⁺ channel and modulates membrane potentials and cytokine production. On the other hands, Kir2.1 may be one of the negative regulators of differentiation into M1 state.

研究分野：薬理学

キーワード：イオンチャネル 薬理学 薬学 カルシウムシグナル マクロファージ 蛍光イメージング パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは自然免疫系において非常に重要な役割を担っている。マクロファージの主な機能として、生体外から侵入した異物の貪食作用、貪食した異物の情報を他の免疫細胞に伝える抗原提示作用、他の免疫細胞の活性化をコントロールするサイトカインの産生作用などが挙げられる。マクロファージは一連の免疫応答を引き起こすために、細胞外の環境変化を感知し、細胞内に情報を伝達する多様な機構を備えている。この情報伝達機構の一つに、イオンチャネルによる細胞膜電位の制御がある。骨髄由来マクロファージの静止時、あるいはM1/M2の各活性化状態において、K⁺チャネル発現は大きく変化するが (Moreno ら *J Immunol.* 2013), その意義については十分に解明されていない。

我々は、マウス腹腔マクロファージを単離し、K⁺チャネルのうち2ポア型K⁺チャネル(K₂P)の発現を調べた。その結果、単独では細胞膜に発現せず機能を持たない“サイレント”チャネルであるTWIK-1, TWIK-2などの発現を見出した。これまでに、TWIK-1がサイレントである原因として、(1)Small Ubiquitin Modifier (SUMO)化によるという説と、(2)定常的なエンドサイトーシスによるという説の2つがあるが、いずれも再構築系の実験に基づくものであり、生体内でのTWIK1の機能は依然不明な点が多い。

2. 研究の目的

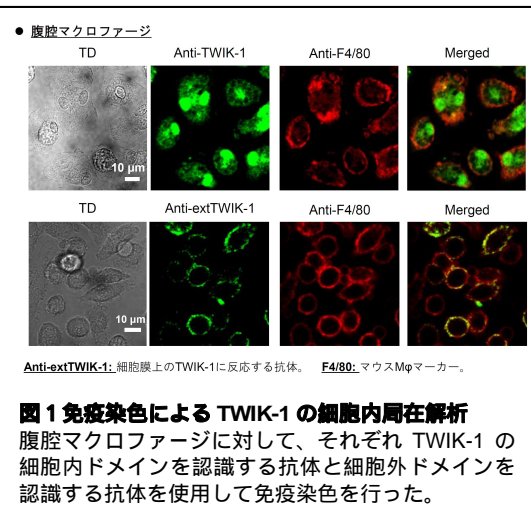
本研究では、サイレントチャネル TWIK-1、マクロファージの状態で発現レベルが大きく変動する内向き整流性K⁺チャネル(Kir2)の、マクロファージ機能への寄与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウス腹腔マクロファージあるいは骨髄由来マクロファージを用いて実験を行った。パッチクランプ法により、イオンチャネル電流あるいは膜電位変化を解析した。さらに、カルシウム蛍光色素や膜電位感受性蛍光色素によるイメージング解析を行った。siRNAによる特異的ノックダウンあるいは過剰発現を行い標的イオンチャネルの機能解析を行った。免疫染色法や定量的PCR法、ウエスタンブロッティング法など汎用されている生化学的手法も用いた。

4. 研究成果

発現解析の結果、マウス腹腔マクロファージにおいてTWIK-1のmRNAおよびタンパク質レベルでの発現が検出された。TWIK-1は持続的にエンドサイトーシスを受けるため、細胞膜発現が不安定であることが報告されている。そこで、TWIK1の細胞外ドメインを認



識する抗体を用いて、非膜透過処理下で染色したところ、意外なことに TWIK-1 がマウス腹腔 M の細胞膜上に安定的に発現することが明らかになった (図1)。

ホールセルパッチクランプ法により膜電流を測定したところ、想定されるK⁺電流は検出されなかった。細胞外のK⁺を除くと、TWIK-1は非選択的陽イオンチャネルとして機能することが知られている。そこで、0 mM K⁺条件下で膜電流を測定したところ、非選択的陽イオン電流が検出された (図2)。この電流は shTWIK-1 によるノックダウンにより有意に減少した。パッチクランプ法あるいは膜電位感受性色素 DiBAC4(3)による膜電位測定を行ったところ、TWIK-1のノックダウンにより静止膜電位が脱分極方向にシフトすることが示唆された。最後に、ATP あるいはシリカビーズによって引き起こされるサイトカイン (IL-1β) 産生に対する TWIK-1 の寄与を調べた。その結果、ATP による IL-1β 産生量に変化はなかったが、シリカビーズによる IL-1β 産生量は TWIK-1 ノックダウン群で減少傾向であった。以上より、TWIK-1 は M において K⁺チャネルではなくむしろ非選択的な陽イオンチャネルとして機能し、膜電位制御を介してサイトカイン産生などに寄与する可能性が示唆された。

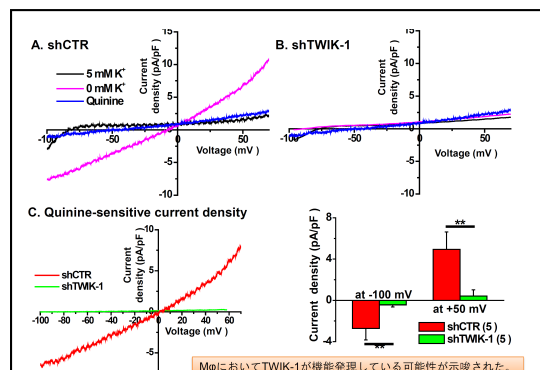


図2 パッチクランプ法による TWIK-1 電流解析

shRNA による TWIK-1 のノックダウンを行った結果、細胞外の K⁺ を除去することで発生する非選択的陽イオン電流が有意に減少した。

マウス骨髄細胞に MCSF を処置してマクロファージに分化させた。ホールセルパッチクランプ法により膜電流を測定した結果、Kir2.1 と Kir2.2 由来の内向き整流性電流が観察された。ストア作動性 Ca^{2+} 流入 (SOC) に対する Kir2 活性の影響を調べたところ、Kir2 活性は SOC 活性を上昇させることが明らかになった。SOC 活性は様々な細胞で分化・増殖などに関与することが知られている。そこで、Kir2 の特異的阻害剤である低濃度 Ba^{2+} を用いて、単球からマクロファージへの分化に対する Kir2 の関与を調べた。しかし、マクロファージの分化に対する Kir2 の関与は認められなかった。さらに細胞増殖やピーズ貪食に対する Kir2 の影響を調べたが、いずれの場合も Ba^{2+} 投与による変化は見られなかった。

一方、LPS でマクロファージを刺激して M1 に分化させると、Kir2.1 の mRNA レベルおよび電流量は有意に低下した。また M1 時では、静止膜電位の脱分極シフトと静止時の細胞内 Ca^{2+} 濃度の低下が観察された。マクロファージに対して Kir2.1 を過剰発現させた後に、LPS 刺激により M1 状態に分化させるとサイトカイン産生 (IL-1b や TNF α など) は有意に低下した。以上より、Kir2.1 は M の M1 状態への分化に対する抑制因子の 1 つとして機能しており、LPS 刺激後の発現減少は M1 分化へのスイッチとして働く可能性がある。

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 14 件)

1. Matsuki K, Kato D, Takemoto M, Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S, Takeshima H, Imaizumi Y. Negative regulation of cellular Ca^{2+} mobilization by ryanodine receptor type 3 in mouse mesenteric artery smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* in press. 【査読有】 doi:10.1152/ajpcell.00006.2018
2. Yamamura H, Suzuki Y, Yamamura H, Asai K, Giles W, Imaizumi Y. Hypoxic stress up-regulates Kir2.1 expression by a pathway including hypoxic-inducible factor-1 and dynamin2 in brain capillary endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* in press. 【査読有】 doi: 10.1152/ajpcell.00154.2017.
3. Yamamura H, Kawasaki K, Inagaki S, Suzuki Y, Imaizumi Y. Local Ca^{2+} coupling between mitochondria and sarcoplasmic reticulum following depolarization in guinea pig urinary bladder smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 314(1):C88-C98 (2018). 【査読有】 doi: 10.1152/ajpcell.00208.2017.
4. Yamamura H, Nishimura K, Hagihara Y, Suzuki Y, Imaizumi Y. TMEM16A and TMEM16B channel proteins generate Ca^{2+} -activated Cl^- current and regulate melatonin secretion in rat pineal glands. *J Biol Chem.* 293(3):995-1006 (2018). 【査読有】 doi: 10.1152/ajpcell.00208.2017.
5. Hatano N, Ohya S, Imaizumi Y, Clark RB, Belke D, Giles WR. ATP increases $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and activates a Ca^{2+} -dependent Cl^- current in rat ventricular fibroblasts. *Exp Physiol.* 103(5):666-682. 【査読有】 doi:10.1113/EP086822.
6. Matsuki K, Takemoto M, Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S, Takeshima H, Imaizumi Y. Ryanodine receptor type 3 does not contribute to contractions in the mouse myometrium regardless of pregnancy. *Pflügers Arch.* 469(2):313-326 (2017). 【査読有】 doi: 10.1007/s00424-016-1900-z.
7. Sakamoto K, Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S, Muraki K, Imaizumi Y. Molecular mechanisms underlying pimelic acid-induced modulation of voltage-gated K^+ channels. *J Pharmacol Sci.* 133(4):223-231 (2017). 【査読有】 doi: 10.1016/j.jphs.2017.02.013
8. Yamamura H, Suzuki Y, Imaizumi Y. Physiological roles of mitochondria and mitofusins on Ca^{2+} signaling in smooth muscles. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 149(6):260-263 (2017).doi: 10.1254/fpj.149.260.
9. Ogiwara K, Ohya S, Suzuki Y, Yamamura H, Imaizumi Y. Up-Regulation of the Voltage-Gated KV2.1 K^+ Channel in the Renal Arterial Myocytes of Dahl Salt-Sensitive Hypertensive Rats. *Biol Pharm Bull.* 40(9):1468-1474 (2017). 【査読有】 doi: 10.1248/bpb.b17-00289.
10. Suzuki Y, Tsutsumi K, Miyamoto T, Yamamura H, Imaizumi Y. Heterodimerization of two pore domain K^+ channel TASK1 and TALK2 in living heterologous expression systems. *PLoS One.* 12(10):e0186252 (2017).
11. Mizutani H, Yamamura H, Muramatsu M, Hagihara Y, Suzuki Y, Imaizumi Y. Modulation of Ca^{2+} oscillation and melatonin secretion by BK_{Ca} channel activity in rat pinealocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 310(9):C740-7 (2016). 【査読有】 doi: 10.1152/ajpcell.00342.2015.

12. Hirata T, Terai T, Yamamura H, Shimonishi M, Komatsu T, Hanaoka K, Ueno T, Imaizumi Y, Nagano T, Urano Y. Protein-coupled fluorescent probe to visualize potassium ion transition on cellular membranes. *Anal Chem.* 88(5):2693-700 (2016). 【査読有】doi: 10.1021/acs.analchem.5b03970
13. Yamamura H, Suzuki Y, Yamamura H, Asai K, Imaizumi Y. Hypoxic stress up-regulates Kir2.1 expression and facilitates cell proliferation in brain capillary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 476(4):386-92 (2016). 【査読有】doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.131.
14. Suzuki Y, Ohya S, Yamamura H, Giles WR, Imaizumi Y. A new splice variant of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) channel subunit alters human chondrocyte function. *J Biol Chem.* 291(46):24247-60 (2016). 【査読有】doi:10.1074/jbc.M116.743302 【査読有】doi: 10.1371/journal.pone.0186252.

[学会発表](計 58 件)

1. **野田さゆり、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治**
気管支平滑筋における BK_{Ca} チャンネル修飾サブユニット 1 の生理機能
日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 26 日(金沢); GS01-4.
2. **山村英斗、鈴木良明、山村寿男、浅井清文、Wayne Giles、今泉祐治**
低酸素ストレスは、
HIF-1 -Dynamin2-Kir2.1 シグナルを介して、脳微小血管内皮細胞の細胞増殖亢進に寄与する。
日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 28 日(金沢); 28G-am06S
3. **川崎桂輔、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治**
改変遺伝子導入培養細胞系を用いた K_{2p} チャンネル標的作用薬の新規高効率評価方法
日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 28 日(金沢); 28M-pm02S
4. **Hideto Yamamura, Yoshiaki Suzuki, Hisao Yamamura, Kiyofumi Asai, Yuji Imaizumi**
Hypoxic stress facilitates cell proliferation via Kir2.1 up-regulation in brain endothelial cells
Alberta-Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) workshop for medical innovation, Feb 24-25, 2017, (Calgary); 18A.
5. **Yoshiaki Suzuki, Susumu Ohya, Hisao Yamamura, Wayne R. Giles, Yuji Imaizumi**
Involvement of calcium related ion channels in inflammatory response in chondrocyte
Alberta-Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) workshop for medical innovation, Feb 24-25, 2017, (Calgary); 18B.
6. **山村英斗、鈴木良明、山村寿男、浅井清文、今泉祐治**
脳血管内皮細胞において低酸素ストレスは、dynamin-2 を介して細胞膜上の Kir2.1 発現量を増加させ、細胞増殖の亢進に寄与している
第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日(長崎); 1-0-56.
7. **堀香菜子、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治**
Two-pore-domain K^+ チャンネル TASK1、TALK2 の異種 2 量体形成の解明
第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日(長崎); 1-SS-47.
8. **鈴木良明、大矢進、山村寿男、Wayne R. Giles、今泉祐治**
BK チャンネル サブユニット新規スプライズバリエーション体による軟骨細胞機能の修飾
第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 16 日(長崎); 2-NS-09.
9. **川崎桂輔、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治**
改変遺伝子導入培養細胞系を用いた K_{2p} チャンネル作用薬の新規高効率評価法の開発
第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 16 日(長崎); 2-YIA-06.
10. **山越大槻、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治**
2 ポアドメイン K^+ チャンネルによるマウス腹腔マクロファージの膜電位形成
第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 17 日(長崎); 3-P-080.
11. **鈴木良明、堀香菜子、宮本達也、山村寿男、今泉祐治**
TASK1-TALK2 異種 2 量体形成によるチャンネル機能の多様化
日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 27 日(仙台); 27W-am01.
12. **山村英斗、鈴木良明、山村寿男、浅井清文、今泉祐治**
低酸素培養下における
HIF-1 -Dynamin2-Kir2.1 シグナルは、脳血管内皮細胞の細胞増殖亢進に寄与する。
第 131 回日本薬理学会近畿部会、2017 年 6 月 30 日(名古屋); B-18
13. **鈴木良明、堀香菜子、宮本達也、山村寿男、今泉祐治**

- TASK1-TALK2 異種 2 量体形成によるチャネル特性の変化
第 131 回日本薬理学会近畿部会、2017 年 6 月 30 日 (名古屋) ; A-22
14. **鈴木良明、野田さゆり、山村寿男、今泉祐治**
大コンダクタンス Ca²⁺活性化 K⁺チャネル新規修飾サブユニットによる気管支平滑筋機能の制御と気管支病態形成への関与
公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団 第 29 回助成研究発表会、2017 年 7 月 19 日 (東京) ; 46
15. **鈴木良明、野田さゆり、山村寿男、今泉祐治**
大コンダクタンス Ca²⁺活性化 K⁺チャネル新規修飾サブユニットによる気管支平滑筋機能の制御
第 59 回日本平滑筋学会総会、2017 年 8 月 24 日 ~ 25 日 (福岡) ; P-25
16. **山村英斗、鈴木良明、山村寿男、浅井清文、Wayne Giles、今泉祐治**
低酸素培養下脳微小血管内皮細胞の細胞増殖に対する HIF-1 -Dynamins-Kir2.1 シグナルの関与
生体機能と創薬シンポジウム 2017、2017 年 8 月 24 ~ 25 日 (京都) ; P-11
17. **野田さゆり、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治**
気管支平滑筋における サブユニットによる BK_{Ca} チャネル活性制御機構の解明
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017、2017 年 8 月 26 日 (京都) : 0-19
18. **Hideto Yamamura, Yoshiaki Suzuki, Hisao Yamamura, Kiyofumi Asai, Wayne Giles and Yuji Imaizumi**
Hypoxic stress facilitates cell proliferation via dynamins-Kir2.1 pathway in brain capillary endothelial cells.
20th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease (CaBP20), Oct 22-26, 2017, (Awaji); P-27
19. **Yoshiaki Suzuki**
A new splice variant of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channel a subunit alters human chondrocyte function.
20th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease (CaBP20), Oct 22-26, 2017, (Awaji); P-28
20. **前田和輝、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治**
マウス骨髄由来マクロファージ機能に対する Kir2.1 の役割

- 第 132 回日本薬理学会近畿部会、2017 年 11 月 24 日 (大阪) : B-17
21. **山村英斗、鈴木良明、山村寿男、浅井清文、今泉祐治**
低酸素ストレス負荷脳血管内皮細胞の細胞増殖に対する Kir2.1 の役割
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2016、2016 年 8 月 24 日 (仙台) ; Y4-3 .
22. **野田さゆり、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治**
マウス気管支平滑筋における Ca²⁺活性化 K⁺チャネル修飾サブユニット 1 の生理機能解明
生体機能と創薬シンポジウム 2016、2016 年 8 月 26 日 (仙台) ; P-C6 .
23. **山越大槻、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治**
2 ポアドメイン K⁺チャネルによるマウス腹腔マクロファージの膜電位形成
第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2016 年 11 月 17 日 (名古屋) ; Pos-8 .
24. **堤香菜子、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治**
2 ポアドメイン K⁺チャネルのヘテロ 2 量体形成によるチャネル特性の変化
第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2016 年 11 月 17 日 (名古屋) ; Pos-16 .
25. **山田啓史、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治**
軟骨細胞において CIC3 チャネルは低浸透圧応答に關与する
第 130 回日本薬理学会近畿部会、2016 年 11 月 19 日 (京都) ; C04 .
26. **山村英斗、鈴木良明、山村寿男、浅井清文、今泉祐治**
脳虚血時を想定した低酸素ストレス負荷脳血管内皮細胞の細胞増殖に対する Kir2.1 の機能的役割
第 26 回日本循環薬理学会、2016 年 12 月 2 日 (松本) ; Y1A-07 .

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: イオンチャネルに作用する化合物のスクリーニング用材料及びその利用 (追加特許出願)

発明者: 今泉祐治, 山村寿男, 鈴木良明, 川崎桂輔, 成田寛

権利者: 公立大学法人名古屋市立大学, 株式会社チャネロサーチテクノロジー

種類: 特許

番号: 特願 2016-214685

出願年月日: 2016 年 11 月 1 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ysg/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木良明 (Suzuki Yoshiaki)

名古屋市立大学・薬学研究科・助教

研究者番号：80707555