

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07594

研究課題名(和文) 双極性障害で認めるストレスシグナル伝達破綻に関わるカルシウムチャネルの解析

研究課題名(英文) Functional analysis of calcium channels related to intracellular stress signal transduction in bipolar disorder

研究代表者

上村 拓治 (Uemura, Takuji)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：60377497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、双極性障害で認めるストレスシグナル伝達破綻に関わるカルシウムチャネルの機能解析を行った。双極性障害と関連を認める電位依存性カルシウムチャネルの1サブユニット(CACNA1C)の遺伝子多型“rs1006737”の機能解析として、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術によりG A(リスクバリエーション)に置換した細胞株を作製した。同細胞株では、CACNA1Cの発現が上昇しているだけでなく、酸化ストレスによる細胞膜電位の変化や細胞内カルシウム濃度の上昇も認めた。また、細胞内貯蔵作動性カルシウムチャネル“TRPC3”の発現も上昇しており、両遺伝子の相互作用が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数のゲノムワイド関連解析で、CACNA1C遺伝子内に存在するSNP rs1006737は双極性障害と強い関連を認める。本研究は、CACNA1CとTRPC3の相互作用におけるSNP rs1006737の役割を同定し、リチウムの薬理学的作用を含めたストレスシグナル伝達破綻に関わるカルシウムチャネルの役割を詳細に検討することを目的としており、双極性障害の発症機序の解明に貢献するだけでなく、バイオマーカーの樹立などの臨床応用・発展へと繋げていくことを目指している。

研究成果の概要(英文)：Our research focus is on the functional interaction among calcium channels related to intracellular stress signal pathway in bipolar disorder (BD). To confirm the function of SNP rs1006737 (G A) located within the CACNA1C gene associated with BD, we created SNP rs1006737 AA cells (CACNA1C AA cells) using genome editing technique with CRISPR/Cas9 in human glioblastoma, YKG-1 cells. Both CACNA1C and TRPC3 expression were increased in CACNA1C AA cells, compared with the wild type of YKG-1 cells (WT). Additionally, hydrogen peroxide-stimulated Ca²⁺ mobilization and membrane potential were altered in this cell model compared with WT. Our study reveals that genetic variation in CACNA1C affects both CACNA1C and TRPC3 expression, intracellular Ca²⁺ homeostasis and membrane potential.

研究分野：分子精神医学

キーワード：CACNA1C TRPC3 リチウム 酸化ストレス 細胞内カルシウム濃度 細胞膜電位

1. 研究開始当初の背景

双極性障害の発症機序は明らかとなっていないが、酸化ストレス、ミトコンドリア/小胞体ストレスなどによる細胞内シグナル伝達破綻が発症要因と考えられている。双極性障害患者では、細胞内ストレスシグナル伝達を担うセカンドメッセンジャーであるカルシウム (Ca^{2+}) の恒常性異常を認め (Warsh et al. 2004; Uemura et al. 2011)。原因として、『ストレス応答に関わる電位依存性や細胞内貯蔵作動性といった Ca^{2+} チャンネルの相互的機能障害』が示唆されるが、詳細は不明である。

複数のゲノムワイド関連解析で、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの 1 サブユニット (*CACNA1C*) の遺伝子多型 “SNP rs1006737 (G A)” と双極性障害で強い関連を認め、*CACNA1C* は双極性障害の有力な候補遺伝子であり (Bhat et al. 2012)、同多型は細胞内 Ca^{2+} 恒常性に影響を与える (Uemura et al. 2016)。一方で、*CACNA1C* は、細胞内貯蔵作動性 Ca^{2+} チャンネル “TRPC3” と連携して心血管系の Ca^{2+} 恒常性に関与している (Sabourin et al. 2011) と報告もある。TRPC3 は、酸化ストレスなどで活性が上昇するだけでなく (Miller & Zhang, 2011) 双極性障害患者で発現が上昇し (Perova et al. 2008)、気分安定薬であるリチウムによって TRPC3 を介した細胞内 Ca^{2+} ストレスシグナルが抑制される (Uemura et al. 2016)。以上より、双極性障害の発症機序を解明するためには、気分安定薬 (リチウム) の薬理学的作用を含めた双極障害における *CACNA1C* と TRPC3 の相互作用における SNP rs1006737 の役割を解明することが必要と考えた。

2. 研究の目的

本研究は、まだ明らかとなっていない双極性障害の発症機序を解明するために、*CACNA1C* と TRPC3 の相互作用における SNP rs1006737 の役割を同定し、リチウムの薬理学的作用を含めたストレスシグナル伝達破綻に関わる Ca^{2+} チャンネルの役割を詳細に検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 酸化ストレス時の細胞生存率および酸化ストレス時のリチウムの効果を評価するために、ヒトグリア芽腫である YKG-1 細胞に 1mM LiCl (0~2 mM、1~7 日間) を投与後、 H_2O_2 による酸化ストレス負荷 (0.6 mM H_2O_2 、18h) を行い、Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Japan) を使用して、細胞生存率を比較した。

(2) YKG-1 細胞に 1mM LiCl (1~7 日間) を投与後、 H_2O_2 による酸化ストレスを行った細胞を回収し、リアルタイム RT-PCR 法で *CACNA1C*、TRPC3 mRNA の発現を定量的に測定した。

(3) 双極性障害と強い関連を認める *CACNA1C* の遺伝子多型 “rs1006737” [G A (リスクバリアント)] の機能解析として、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術により rs1006737 を G A に置換した細胞株 (*CACNA1C*^{A/A} YKG-1 細胞) を作製し、リアルタイム RT-PCR 法で *CACNA1C*、TRPC3 mRNA の発現を定量的に確認した。

(4) *CACNA1C*^{A/A} YKG-1 細胞における酸化ストレス時の細胞内 Ca^{2+} 動態を確認するために、1mM LiCl (0~7 日間) を投与後、 H_2O_2 による酸化ストレスを負荷した際の細胞内 Ca^{2+} 動態を蛍光プローブ Fluo4 AM (Dojindo, Japan) で測定した。

(5) *CACNA1C*^{A/A} YKG-1 cells における酸化ストレス時の細胞膜電位を確認するために、1mM LiCl (0~7 日間) を投与後、 H_2O_2 による酸化ストレスを負荷した際の細胞膜電位の変化を蛍光プロ

ブ DiBAC4(3) (Dojindo, Japan) で測定した。

なお、得られたデータは、Tukey's multiple comparisons test あるいは Student's t test による統計学的解析を行った (有意水準 = 0.05)。

4. 研究成果

(1) YKG-1 細胞に LiCl (0~2.0 mM, 1~7 日間) を投与後、H₂O₂ による酸化ストレス負荷 (0.6 mM, 18h) を行ったところ、LiCl を投与していない群に比べて、2.0 mM LiCl 群では 1 日間投与から酸化ストレスによる細胞生存率の低下が減弱し、1.0 mM LiCl では 7 日間投与時から細胞生存率の低下が減弱していた。LiCl 7 日間投与時には、1.0 mM と 2.0 mM LiCl 間では細胞生存率の統計学的有意差を認めなかった (図 1)。

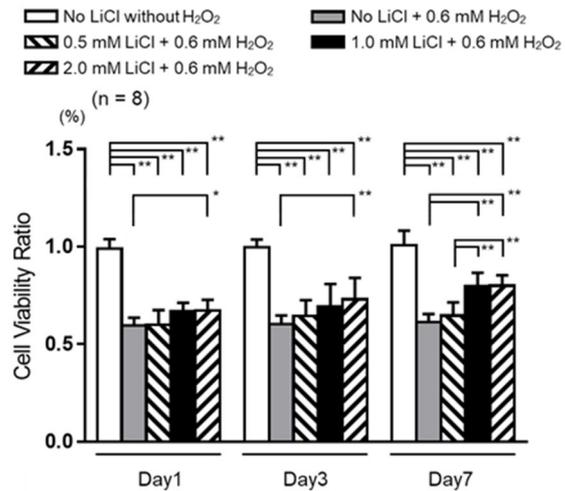


図1 H₂O₂-induced (18h) cell Viability in LiCl-treated YKG-1 cells

* p < 0.05, ** p < 0.01

(2) YKG-1 細胞に 1mM LiCl (1~7 日間) を投与後、H₂O₂ による酸化ストレス (0.6 mM, 18h) を行い、CACNA1C および TRPC3 の発現変動をリアル

タイム RT-PCR 法で確認したところ、H₂O₂ によって、CACNA1C、TRPC3 ともに発現の上昇を認めたが、両遺伝子ともに LiCl によって発現量が経時的に低下していた (図 2、3)。

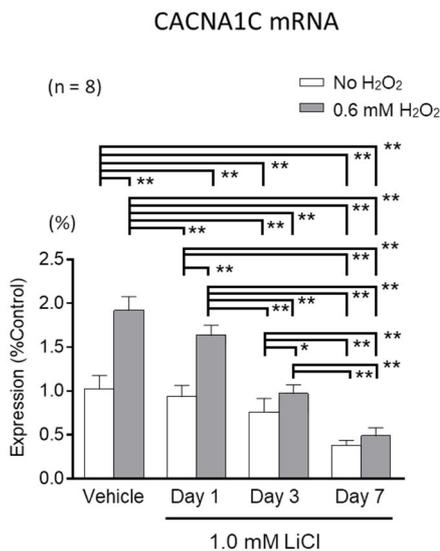


図2 H₂O₂-induced CACNA1C expression in LiCl-treated YKG-1 cells

* p < 0.05, ** p < 0.01

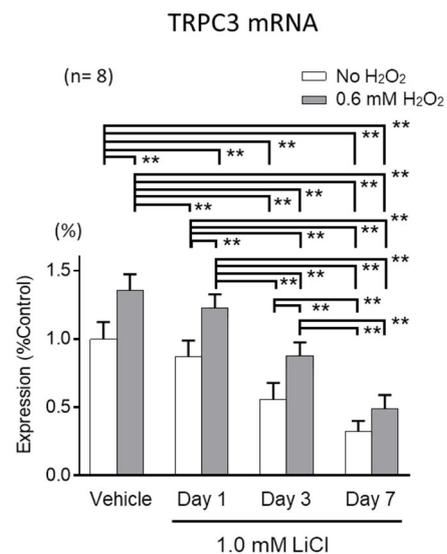


図3 H₂O₂-induced TRPC3 expression in LiCl-treated YKG-1 cells

** p < 0.01

(3) CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術により rs1006737 を G A に置換した細胞株 (CACNA1C^{A/A} YKG-1 細胞) を作製し、DNA シークエンシング法で DNA 配列を確認した (図 4)。リアルタイム RT-PCR 法 (n = 5) で CACNA1C、TRPC3 mRNA の発現を確認したところ、YKG-1 wild

type(WT)細胞に比べて、CACNA1Cだけでなく TRPC3 mRNA の発現量が上昇していた(図5、6)。

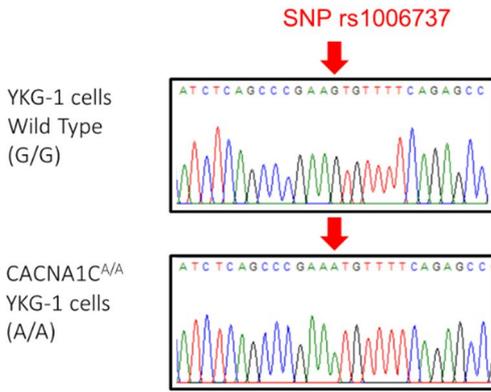


図4 DNA sequence of CACNA1C^{A/A} cells

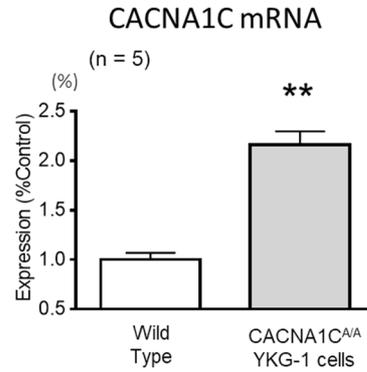


図5 CACNA1C expression in CACNA1C^{A/A} cells ** p < 0.01

(4) CACNA1C^{A/A} YKG-1 細胞における酸化ストレス時の細胞内 Ca²⁺動態を確認するために、1mM LiCl (0~7日間)を投与後、酸化ストレス(0.6 mM H₂O₂)による細胞内 Ca²⁺動態を Fluo4 AM で測定した。H₂O₂により、CACNA1C^{A/A} YKG-1 細胞では、YKG-1 WT 細胞に比べて細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を強く認めた。CACNA1C^{A/A} YKG-1 細胞、YKG-1 WT 細胞ともに H₂O₂ による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇は、LiCl によって経時的に低下しており、LiCl を7日間投与した細胞では、両細胞群間で統計学的有意差を認めなかった(図7)。

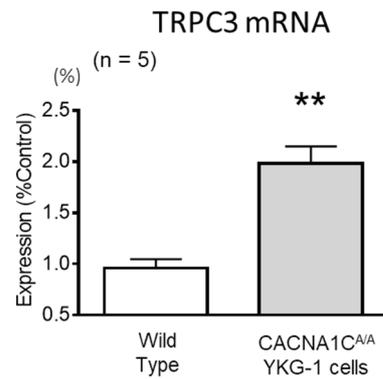


図6 TRPC3 expression in CACNA1C^{A/A} cells ** p < 0.01

(5) 蛍光プローブ DiBAC4(3)は、Bis-oxonol 型のアニオン性膜電位感受性色素であり、刺激によって細胞膜が脱分極すると電位変化を受けて細胞中の存在率が高くなり蛍光が増強することで、膜電位の変化を確認することができる。YKG-1 WT 細胞と比較しながら、CACNA1C^{A/A} YKG-1 細胞における 1mM LiCl (0~7日間)投与後の酸化ストレス(0.6 mM H₂O₂)時の細胞膜電位を確認したところ、図8の結果を得た。YKG-1 WT 細胞、CACNA1C^{A/A} YKG-1 細胞ともに、酸化ストレス(0.6 mM H₂O₂)によって、細胞膜電位が変化し、その変化はLiClによって減弱することがわかった。また、CACNA1C^{A/A} YKG-1 細胞は、YKG-1 WT 細胞と比べて、細胞膜電位の変化を強く認めたが、興味深いことに、1 mM LiCl を7日間投与した際、YKG-1 WT 細胞とCACNA1C^{A/A} YKG-1 細胞間における細胞膜電位の変化は、統計学的有意差を認めなかった。

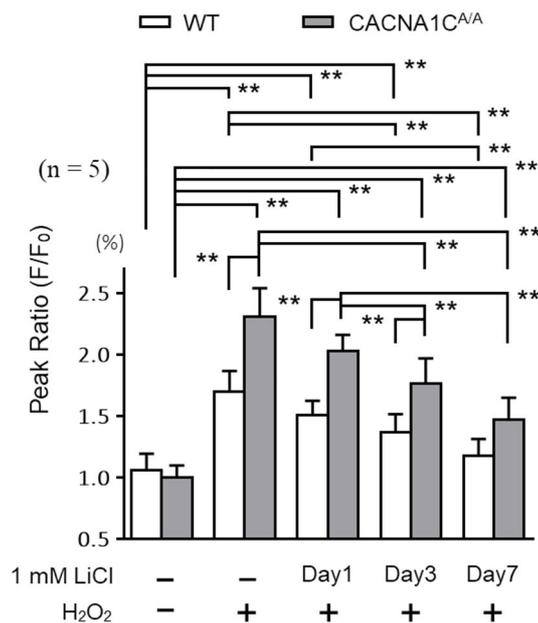


図7 H₂O₂ - stimulated [Ca²⁺]_s in CACNA1C^{A/A} YKG-1 cells ** p < 0.01

以上より、ヒトグリア芽腫である YKG-1 細胞を使った研究ではあるが、気分安定薬であるリチウムは、酸化ストレス (0.6 mM H₂O₂) 時における細胞生存率の低下を抑える作用があること、酸化ストレスによって CACNA1C および TRPC3 の発現は上昇するが、リチウムによりこれらの遺伝子の発現が抑えられることがわかった。また、双極性障害のリスクバリエーションと考えられる CACNA1C^{A/A} YKG-1 細胞では、CACNA1C の発現だけでなく、TRPC3 の発現も上昇しており、H₂O₂ による酸化ストレス (0.6 mM, 18h) 時に、細胞内 Ca²⁺ 動態および細胞膜電位の変化を強く認め、細胞内 Ca²⁺ の恒常性異常を認めた。これらの変化は、リチウムによって時間依存的に減弱する。つまり、リチウムは、酸化ストレス時に、電位依存性 Ca²⁺ チャンネルの 1 サブユニット “CACNA1C” および細胞内貯蔵作動性 Ca²⁺ チャンネル “TRPC3”

の発現を減弱させて、細胞内ストレスシグナル伝達を担う Ca²⁺ の恒常性を保つ作用があることが示唆された。本研究では、TRPC3、CACNA1C に加え、関連する遺伝子の発現が安定にノックダウンしている YKG-1 細胞株を各々作製し、CACNA1C と TRPC3 の遺伝子間相互作用に関して多面的な評価も行った。

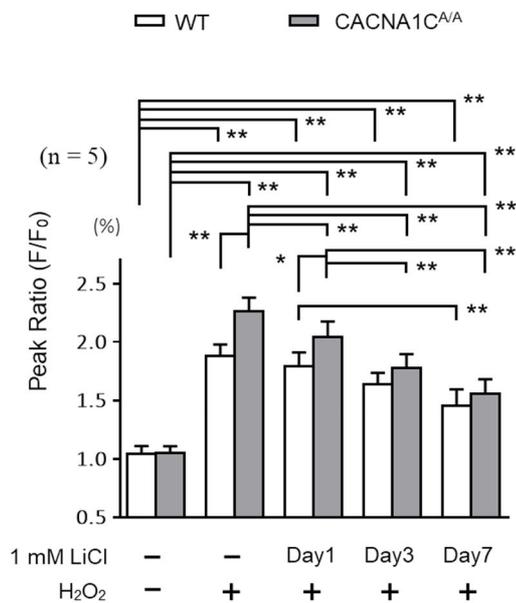


図8 Membrane potential in H₂O₂ -stimulated CACNA1C^{A/A} YKG-1 cells
* p < 0.05, ** p < 0.01

< 引用文献 >

- Warsh JJ, Andreopoulos S, Li PP. Role of intracellular calcium signaling in the pathophysiology and pharmacotherapy of bipolar disorder: current status. *Clin Neurosci Res.* 2004;4:201-213.
- Uemura T, Green M, Corson TW, Perova T, Li PP, Warsh JJ. Bcl-2 SNP rs956572 associates with disrupted intracellular calcium homeostasis in bipolar I disorder. *Bipolar Disord.* 2011;13:41-51.
- Bhat S, Dao DT, Terrillion CE, Arad M, Smith RJ, Soldatov NM et al. CACNA1C (Cav1.2) in the pathophysiology of psychiatric disease. *Prog Neurobiol.* 2012;99:1-14.
- Uemura T, Green M, Warsh JJ. CACNA1C SNP rs1006737 associates with bipolar I disorder independent of the Bcl-2 SNP rs956572 variant and its associated effect on intracellular calcium homeostasis. *World J Biol Psychiatry.* 2016;17:525-534.
- Sabourin J, Robin E, Raddatz E. A key role of TRPC channels in the regulation of electromechanical activity of the developing heart. *Cardiovasc Res.* 2011;92:226-236.
- Miller BA, Zhang W. TRP channels as mediators of oxidative stress. *Adv Exp Med Biol.* 2011; 704: 531-544.
- Perova T, Wasserman MJ, Li PP, Warsh JJ. Hyperactive intracellular calcium dynamics in B lymphoblasts from patients with bipolar I disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2008;11:185-196.
- Uemura T, Green M, Warsh JJ. Chronic LiCl pretreatment suppresses thrombin-stimulated intracellular calcium mobilization through TRPC3 in astroglia cells. *Bipolar Disord.* 2016;18:549-562.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------