

令和元年6月4日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08278

研究課題名(和文) 門脈圧亢進症に關するTMEM16チャンネルの発現および機能解析

研究課題名(英文) Functional expression of TMEM16 channels in portal hypertension

研究代表者

山村 寿男 (YAMAMURA, Hisao)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：80398362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝硬変や門脈閉塞症などに起因する門脈圧亢進症の病態機構には不明な点が多く、適切な治療薬が存在しない。本研究課題において、門脈圧亢進症モデルマウスでは、カルシウム活性化クロライドチャンネルTMEM16Aの発現が低下していること、カルシウム活性化クロライド電流が減少していること、TMEM16Aチャンネル阻害薬感受性の収縮成分が減弱していること、を見出した。以上より、門脈圧亢進症の病態機構にTMEM16Aが関与していることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

門脈圧亢進症とは門脈圧が亢進する疾患群の総称であり、その約80%は肝硬変に伴って発症する。しかし、その病態形成メカニズムには未解明な部分が多いため、門脈圧亢進症に対する根本的な治療法は確立していない。そのため、本研究課題で明らかになった、門脈圧亢進症でのカルシウム活性化クロライドチャンネルTMEM16Aの発現低下は、門脈圧亢進症の病態形成機構の解明および新規治療薬の標的創薬につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Portal hypertension is a major complication in patients with chronic liver diseases and cirrhosis, but its pathogenic mechanism remains unclear. Here, we demonstrate that, in portal hypertensive mice, 1) expression of calcium-activated chloride channel TMEM16A is downregulated, 2) calcium-activated chloride currents are reduced, and 3) component of TMEM16A-mediated contraction is attenuated. These results suggest that TMEM16A is involved in the molecular mechanism of the development of portal hypertension.

研究分野：薬理学

キーワード：TMEM16A 門脈圧亢進症 クロライドチャンネル カルシウム 門脈 平滑筋 肝硬変 線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

門脈圧は、通常 100 mmH<sub>2</sub>O (7.4 mmHg) 程度であり、200 mmH<sub>2</sub>O (14.7 mmHg) を超えると門脈圧亢進症と定義する。肝硬変や肝外門脈閉塞症、特発性門脈圧亢進症、バッド・キアリ症候群などが原因となって門脈圧が亢進する。門脈圧 250 mmH<sub>2</sub>O (18.4 mmHg) 以上が持続すると、門脈 - 体循環シャントが発達する。その結果、食道・胃静脈瘤、脾腫、腹水などの重篤な病態を引き起こす。門脈圧亢進症の原因の約 80% を占める肝硬変では、静脈瘤出血に続いて肝不全が誘発されやすく、出血後 1 か月以内の死亡率は 30 ~ 50% と高い。一方、特発性門脈圧亢進症は、肝臓や門脈に病変が存在しないにも関わらず、門脈圧が上昇し、食道静脈瘤や脾腫などの症状を呈する。本邦での年間有病者数は 1,000 人程度であり、人口 100 万人当たり 7.3 人の有病率と推定されている。特発性門脈圧亢進症は、厚生労働省が定める特定疾患治療研究事業対象疾患 (難病) に指定されている。

門脈圧亢進症では、門脈に定常的かつ異常な圧負荷がかかるため、門脈を構成する平滑筋の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) が大きく上昇することが推測される。血管平滑筋に発現している Ca<sup>2+</sup>感受性イオンチャンネルの中でも、Ca<sup>2+</sup>活性化 Cl<sup>-</sup> (Cl<sub>Ca</sub>) チャンネルが門脈平滑筋に特徴的に機能発現していることが報告されている (Large & Wang, *Am J Physiol*, 1996; Leblanc et al., *Can J Physiol Pharmacol*, 2005)。Cl<sub>Ca</sub> チャンネルは、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇により活性化され、血管平滑筋を脱分極すなわち収縮方向へ誘導する (Galiotta, *Biophys J*, 2009; Ferrera et al., *Physiology*, 2010; Huang et al., *Pharmacol Rev*, 2012)。Cl<sub>Ca</sub> チャンネルは、自発運動能を有する門脈や血圧を規定する腸間膜動脈などのごく一部の血管組織でのみ高発現していることも興味深い知見である (Kunzelmann, *Pflügers Arch*, 2011)。長い間、Cl<sub>Ca</sub> チャンネルの分子実体が不明であったため、その生理的・病理学的意義の解明は非常に遅れていた。最近、TMEM16 遺伝子ファミリー (TMEM16A~K、アノクタミンとも呼ばれる; Duran & Hartzell, *Acta Pharmacol Sin*, 2011: 図 1) に属するタンパク質の一部 (TMEM16A と TMEM16B) が Cl<sub>Ca</sub> チャンネル活性を有することが報告された (Yang et al., *Nature*, 2008; Caputo et al., *Science*, 2008; Schroeder et al., *Cell*, 2008) ため、この分子群が新規 Cl<sub>Ca</sub> チャンネルとして注目されている (Hartzell et al., *J Physiol*, 2009: 図 2)

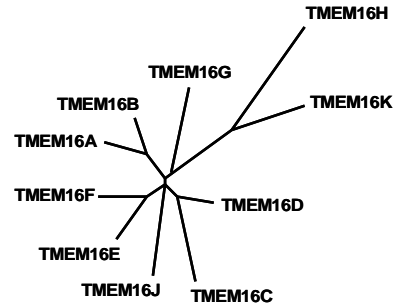


図 1 TMEM16 遺伝子ファミリーの樹形図  
TMEM16 ファミリーには、10 種類 (TMEM16A~K) の遺伝子が含まれる。現在までに、TMEM16A および TMEM16B が、Cl<sub>Ca</sub> チャンネル活性を有するタンパク質であることが報告されている。

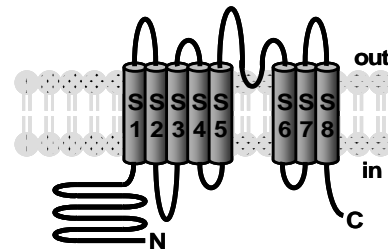


図 2 TMEM16 チャンネルの推定構造  
TMEM16 チャンネルは、N 末端および C 末端領域を細胞内に配し、8 回膜貫通型構造であると推定されている。第 5 (S5) と第 6 膜貫通 (S6) 領域の間が、イオン透過孔である推測されている。

2. 研究の目的

我々の先行論文において、TMEM16A が、門脈平滑筋細胞に発現している (図 3)、Cl<sub>Ca</sub> チャンネルとして機能している (図 4)、2 量体を形成している (図 5)、細胞骨格 (アクチン) によって活性制御されている (図 4) ことを示し、門脈平滑筋における興奮性の制御に TMEM16A チャンネルが寄与していることを明らかにした (Ohshiro et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2014; Ohshiro et al., *J Pharmacol Sci*, 2014; Yamamura et al., *J Pharmacol Sci*, 2015)。

これまでに門脈 TMEM16A チャンネルの生理機能を明らかにしてきたが、病態における役割は依然不明である。最近、TMEM16A の発現変動が、肺高血圧症 (Sun et al., *J Physiol*, 2012; Forrest et al., *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012) や本態性高血圧症 (Wang et al., *Circulation*, 2012; Heinze et al., *J Clin Invest*, 2014; Wang et al., *J Mol Cell Cardiol*, 2015) のモデル動物で報告された。本研究では、門脈圧亢進症における TMEM16 ファミリーの発現・機能変化について解析し、病態の発症・進行における TMEM16 分子の関与を解明することを目指した。

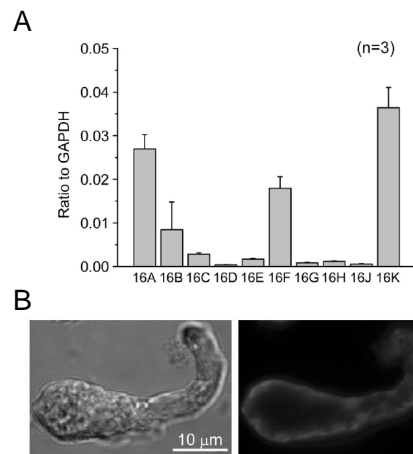


図 3 門脈平滑筋における TMEM16A の発現解析  
(A) マウス門脈平滑筋細胞に TMEM16A の mRNA が高発現していた [定量的 PCR 法]。 (B) マウス門脈平滑筋の細胞膜上に TMEM16A タンパク質が発現していた [免疫抗体染色法]。

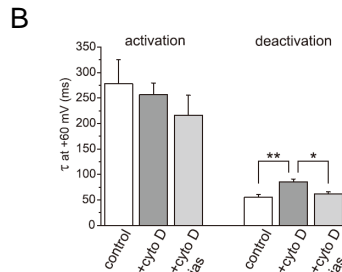
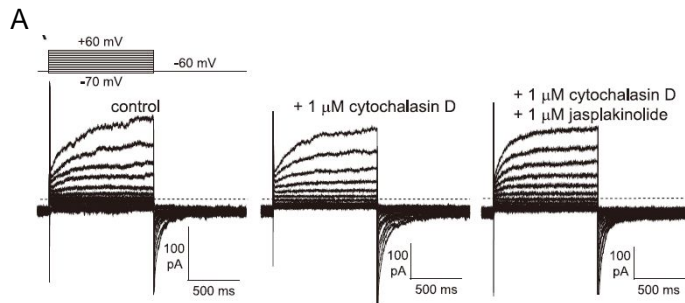


図4 門脈平滑筋細胞におけるCl<sub>Ca</sub>チャンネル電流 (A)マウス門脈平滑筋細胞で観察されたCl<sub>Ca</sub>電流(左図)。Cl<sub>Ca</sub>電流に対するアクチン重合阻害薬(サイトカラシンD:中図)と促進薬(ジャスプラキノリド:右図)の効果【ホールセルパッチクランプ法】。(B)Cl<sub>Ca</sub>電流の脱活性化は、細胞骨格(アクチン)により制御されていた。\*p<0.05, \*\*p<0.01。

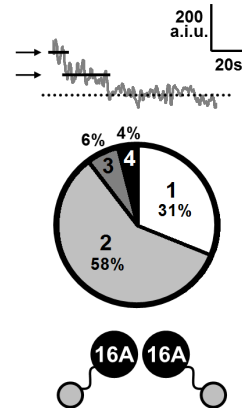


図5 TMEM16Aの二量体形成 GFP標識したTMEM16A分子を一分子レベルでフォトブリーチングした(上段)結果、二段階のGFP消光が多数を占めた(中段)。この結果、TMEM16Aは二量体(ダイマー)で機能的Cl<sub>Ca</sub>チャンネルを形成することが分かった(下段)【一分子イメージング】。

### 3. 研究の方法

胆管結紮により胆汁鬱滞性の肝硬変に併発して門脈圧亢進症を発症させるBDL (bile duct ligation)マウスと門脈部分結紮により特発的門脈圧亢進症を発症させるPPVL (partial portal vein ligation)マウスを作製した。門脈圧亢進症マウスより摘出した門脈平滑筋の組織や単離細胞を使用した。発現解析は、定量的リアルタイムPCR法と細胞免疫染色法により行った。Cl<sub>Ca</sub>電流の測定には、細胞内pCa 6.0 (1 μM)の環境下でホールセルパッチクランプ法を適用した。門脈の等張性収縮も測定した。組織培養実験では、野生型マウスの門脈平滑筋を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 門脈圧亢進症マウスにおけるTMEM16ファミリーの発現解析

BDL群の門脈平滑筋では、TMEM16AのmRNAおよびタンパク質発現量がSham群と比較して減少していた。一方、PPVL群では、TMEM16Aの発現変化は認められなかった。

#### (2) 門脈圧亢進症マウスにおけるTMEM16Aチャンネルの細胞機能解析

BDL群の門脈平滑筋細胞では、Cl<sub>Ca</sub>電流密度がSham群と比較して減少していた。一方、PPVL群の電流密度は、Sham群と同程度だった。

#### (3) 門脈圧亢進症マウスにおけるTMEM16Aチャンネルの組織機能解析

Sham群、BDL群ともに門脈平滑筋の自発収縮が観察された。しかし、BDL群ではSham群と比較して、収縮力減少と収縮頻度増加の傾向が観察された。また、TMEM16A阻害薬によって、Sham群の自発収縮は消失したが、BDL群では殆ど抑制されなかった。一方、PPVL群の自発収縮は、TMEM16A阻害薬によって減弱した。

#### (4) TMEM16Aチャンネルの発現調節機構

肝硬変患者の血清中で上昇するアンジオテンシン<sub>1-7</sub>の存在下で、野生型マウスの門脈を組織培養した結果、TMEM16Aの発現低下が認められた。一方、アンジオテンシン<sub>1-7</sub>は、内液pCa 6.0 (1 μM)環境下でのCl<sub>Ca</sub>電流活性に変化を与えなかった。

#### (5) 結論

肝硬変由来門脈圧亢進症モデルの門脈平滑筋細胞では、TMEM16Aの機能発現が低下することを見出した。肝硬変由来門脈圧亢進症モデル(BDLマウス)の門脈平滑筋とは異なり、特発性門脈圧亢進症モデル(PPVLマウス)においては、TMEM16Aの機能発現に変化が認められなかったことから、肝臓の線維化がTMEM16Aの機能発現低下に関与していることが示唆された。肝臓の障害時に生体内濃度が上昇するアンジオテンシン<sub>1-7</sub>は、発現調節機構を介してTMEM16Aの活性を抑制することが分かった。血管平滑筋におけるCl<sub>Ca</sub>チャンネル機能発現は、細胞膜の脱分極を介して血管収縮をもたらすことから、TMEM16Aの発現低下は門脈圧亢進症の悪化に対して抑制的に働くことが考えられる。本研究で得られた知見は、門脈圧亢進症における病態形成機構の解明につながることを期待される。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. 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):386-392 (2016). [doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.131]
2. Suzuki Y, Ohya S, Yamamura H, Giles WR, Imaizumi Y. A new splice variant of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK) channel  $\alpha$  subunit alters human chondrocyte function. **J Biol Chem**, 291(46):24247-24260 (2016). [doi: 10.1074/jbc.M116.743302]
3. 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). [doi: 10.1007/s00424-016-1900-z]
4. Yamamura A, Fujitomi E, Ohara N, Tsukamoto K, Sato M, Yamamura H. Tadalafil induces antiproliferation, apoptosis, and phosphodiesterase type 5 downregulation in idiopathic pulmonary arterial hypertension *in vitro*. **Eur J Pharmacol**, 810:44-50 (2017). [doi: 10.1016/j.ejphar.2017.06.010]
5. Suzuki Y, Tsutsumi K, Miyamoto T, Yamamura H, Imaizumi Y. Heterodimerization of two pore domain K<sup>+</sup> channel TASK1 and TALK2 in living heterologous expression systems. **PLoS One**, 12(10):e0186252 (2017). [doi: 10.1371/journal.pone.0186252]
6. Yamamura H, Kawasaki K, Inagaki S, Suzuki Y, Imaizumi Y. Local Ca<sup>2+</sup> 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). [doi: 10.1152/ajpcell.00208.2017]
7. Yamamura H, Nishimura K, Hagihara Y, Suzuki Y, Imaizumi Y. TMEM16A and TMEM16B channel proteins generate Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> current and regulate melatonin secretion in rat pineal glands. **J Biol Chem**, 293(3):995-1006 (2018). [doi: 10.1074/jbc.RA117.000326]
8. Matsuki K, Kato D, Takemoto M, Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S, Takeshima H, Imaizumi Y. Negative regulation of cellular Ca<sup>2+</sup> mobilization by ryanodine receptor type 3 in mouse mesenteric artery smooth muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**, 315(1):C1-C9 (2018). [doi: 10.1152/ajpcell.00006.2018]
9. Yamamura H, Suzuki Y, Yamamura H, Asai K, Giles W, Imaizumi Y. Hypoxic stress upregulates Kir2.1 expression by a pathway including hypoxic-inducible factor-1 $\alpha$  and dynamin2 in brain capillary endothelial cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, 315(2):C202-C213 (2018). [doi: 10.1152/ajpcell.00154.2017]
10. Yamamura H, Suzuki Y, Imaizumi Y. Physiological and pathological functions of Cl<sup>-</sup> channels in chondrocytes. **Biol Pharm Bull**, 41(8):1145-1151 (2018). [doi: 10.1248/bpb.b18-00152]
11. Saeki T, Kimura T, Hashidume K, Murayama T, Yamamura H, Ohya S, Suzuki Y, Nakayama S, Imaizumi Y. Conversion of Ca<sup>2+</sup> oscillation into propagative electrical signals by Ca<sup>2+</sup>-activated ion channels and connexin as a reconstituted Ca<sup>2+</sup> clock model for the pacemaker activity. **Biochem Biophys Res Commun**, 510(2):242-247 (2019). [doi: 10.1016/j.bbrc.2019.01.080]
12. Kawasaki K, Suzuki Y, Yamamura H, Imaizumi Y. Rapid Na<sup>+</sup> accumulation by a sustained action potential impairs mitochondria function and induces apoptosis in HEK293 cells expressing non-inactivating Na<sup>+</sup> channels. **Biochem Biophys Res Commun**, 513(1):269-274 (2019). [doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.129]
13. Kawasaki K, Suzuki Y, Yamamura H, Imaizumi Y. Development of a novel cell-based assay system for high-throughput screening of compounds acting on background two-pore domain K<sup>+</sup> channels. **SLAS Discov**, in press. [doi: 10.1177/2472555219829745]

### 〔学会発表〕(計 13 件)

1. 山村寿男, 大城隼也, 近藤るびい, 古川奈美, 鈴木良明, 今泉祐治. 門脈平滑筋における TMEM16A チャネルの生理機能と門脈圧亢進症での発現変化. 生理学研究所研究会 2016「心臓・血管系の包括的な機能統合研究」, 2016.
2. 萩原由実子, 山村寿男, 西村歌織, 鈴木良明, 今泉祐治. 松果体の Ca<sup>2+</sup>活性化 Cl<sup>-</sup>チャネルとして構成する TMEM16A/B ヘテロ二量体. 第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2016.
3. 古川奈美, 山村寿男, 近藤るびい, 鈴木良明, 今泉祐治. 肝硬変由来門脈圧亢進症モデルマウスの門脈平滑筋における TMEM16A チャネルの発現及び機能低下. 第 130 回日本薬理学会近畿部会, 2016.
4. 山村寿男, 近藤るびい, 古川奈美, 鈴木良明, 今泉祐治. 門脈圧亢進症における Ca<sup>2+</sup>活性化 Cl<sup>-</sup>チャネル TMEM16A の発現低下. 第 90 回日本薬理学会年会, 2017.
5. 萩原由実子, 山村寿男, 西村歌織, 鈴木良明, 今泉祐治. ラット松果体細胞において Ca<sup>2+</sup>活性化 Cl<sup>-</sup>チャネルとして機能する TMEM16A/B ヘテロ二量体. 日本薬学会年会第 137 年会, 2017.
6. 古川奈美, 山村寿男, 鈴木良明, 近藤るびい, 今泉祐治. 肝硬変門脈圧亢進症マウスの門脈平滑筋における TMEM16A の機能発現低下. 日本薬学会第 137 年会, 2017.
7. 萩原由実子, 山村寿男, 西村歌織, 鈴木良明, 今泉祐治. 松果体 Ca<sup>2+</sup>活性化 Cl<sup>-</sup>チャネルを構

成する TMEM16A と TMEM16B のホモ・ヘテロ複合体の電流特性 . 第 131 回日本薬理学会近畿部会、2017 .

8. 古川奈美、山村寿男、近藤るびい、鈴木良明、今泉祐治 . 門脈圧亢進症モデルマウスの門脈平滑筋における TMEM16A 発現調節機構について . 第 59 回日本平滑筋学会総会、2017 .
9. 鈴木貴久、山村寿男、安本美貴、鈴木良明、今泉祐治 . 脳微小血管内皮細胞における TMEM16A の機能解析 . 第 132 回日本薬理学会近畿部会、2017 .
10. 山村寿男、近藤るびい、古川奈美、鈴木良明、今泉祐治 . 肝硬変由来門脈圧亢進症と Ca<sup>2+</sup>活性化 Cl<sup>-</sup>チャンネル TMEM16A . 第 95 回日本生理学会大会、2018 .
11. 鈴木貴久、安本美貴、鈴木良明、今泉祐治、山村寿男 . 脳微小血管内皮細胞における Ca<sup>2+</sup>活性化 Cl<sup>-</sup>チャンネル TMEM16A の機能解析 . 第 64 回日本薬学会東海支部大会、2018 .
12. Hisao Yamamura, Yoshiaki Suzuki, Yuji Imaizumi. Downregulation of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel TMEM16A in cirrhotic portal hypertension. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018), 2018.
13. 鈴木貴久、安本美貴、鈴木良明、今泉祐治、山村寿男 . 脳微小血管内皮細胞における TMEM16A の生理機能への寄与 . 生理学研究所研究会 2018「心臓・血管系の頑健性と精緻な制御を支える分子基盤の統合的解明」、2018 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔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)研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号 (8 桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。