

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14929

研究課題名（和文）骨形成制御におけるイオンチャネル発現・活性変動の役割と創薬への応用

研究課題名（英文）Role of KCa channels in preosteoblast proliferation

研究代表者

鬼頭 宏彰 (Kito, Hiroaki)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：40749181

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マウス前骨芽細胞（MC3T3-E1）において機能発現するイオンチャネルの分子同定とその生理機能の解析を目的として研究を行い、以下の点を明らかにした。Ca²⁺活性化K⁺チャネルKCa_{3.1}が機能発現し、Ca²⁺シグナル制御を介して細胞増殖を促進した。ビタミンD刺激により誘導されるマウス前骨芽細胞の増殖抑制作用において、AP-1およびHDAC2発現低下によるKCa_{3.1}低下が一部寄与した。KCa_{3.1}は細胞周期依存的に発現が変動し、G1期からS期への細胞周期進行に寄与した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨芽細胞におけるイオンチャネル研究は、ストア作動性Ca²⁺流入の構成分子であるOrai1/STIM1を介したCa²⁺シグナルが骨芽細胞分化を制御することが報告されたものの、Ca²⁺流入の調節因子としてK⁺チャネルに焦点を置いた研究はほとんど行われていない。また、Ca²⁺透過チャネルはユビキタスに発現するのに対して、組織ごとに多様な発現を示すK⁺チャネルを対象とした創薬研究は組織特異的な薬物治療の可能性を広げることが期待される。以上のことから、応募者は本研究課題が、骨代謝性疾患の新規治療薬の開発において、有益な情報を提供し得るものと考えている。

研究成果の概要（英文）：In present study, we showed that KCa_{3.1} were functionally expressed in mouse preosteoblast MC3T3-E1, and the activation of KCa_{3.1} promoted the cell growth of MC3T3-E1 cells. To clarify the physiological function of KCa_{3.1} in MC3T3-E1 cells, contribution of KCa_{3.1} to VDR agonists-induced suppression of cell proliferation were examined. Treatments with VDR agonists markedly decreased the expression levels of KCa_{3.1} transcripts and proteins in MC3T3-E1 cells. Treatments with VDR agonists also significantly decreased the expression of several transcriptional regulators of KCa_{3.1} such as histone deacetylase 2 (HDAC2) and Fra-1 composed of activation protein 1. Our results suggest that KCa_{3.1} is a new downstream target of VDR signaling and the down-regulation of KCa_{3.1} through the transcriptional repression of KCa_{3.1} contribute, at least partly, to the antiproliferative effects of VDR agonists in mouse pre-osteoblasts.

研究分野：薬理学

キーワード：骨芽細胞 カルシウム活性化カリウムチャネル 細胞増殖 VDR

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨リモデリングのうち骨形成を担う骨芽細胞は、間葉系幹細胞から前骨芽細胞を経て骨芽細胞へと分化する。分化過程において細胞増殖性は損なわれるため、前骨芽細胞は細胞増殖能を有する一方で、非増殖性の骨芽細胞は骨基質を産生することで骨石灰化を担っている。即ち、正常な骨形成には前骨芽細胞の細胞増殖と骨芽細胞への分化が重要な役割を果たすと考えられる。

骨関連細胞等の非興奮性細胞において K^+ チャネルの活性化による過分極は Ca^{2+} 透過の電気化学的駆動力を増大させ、細胞内への Ca^{2+} 流入を促進させると考えられる。 Ca^{2+} は主要なセカンドメッセンジャーの一つであり、細胞増殖、細胞分化、遺伝子発現などの細胞生理機能制御に寄与している。前骨芽細胞において機能発現する K^+ チャネルサブタイプは解明されておらず、 K^+ チャネルを介した細胞増殖・分化制御に関する報告も充分には行われていない。

2. 研究の目的

K^+ チャネルは、細胞内 Ca^{2+} シグナルを直接または間接的に制御することにより、様々な細胞種において増殖・分化及び細胞死に重要な役割を果たす。骨組織は骨形成と骨吸収による骨リモデリングによりその恒常性を保っており、その破綻が多くの骨代謝性疾患の原因となっている。骨代謝性疾患の治療薬の開発戦略の中で、骨形成を担う骨芽細胞機能の制御機構の解明が注目をされているが、前骨芽細胞に機能発現する K^+ チャネルが骨芽細胞を介した骨組織恒常性機構において、どのような生理的役割を果たしているのかは明らかにされていない。そこで本研究の目的は、骨芽細胞増殖における K^+ チャネルの役割を解明し、骨形成の分子機構における K^+ チャネルの生理的意義を解明することで、骨代謝疾患治療を指向したイオンチャネル創薬戦略を考案することである。

3. 研究の方法

(1)細胞培養

マウス前骨芽細胞 MC3T3-E1 は、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター(理研 BRC)より入手した。MC3T3-E1 細胞は、10% FBS とペニシリン(100 U/mL)-ストレプトマイシン(0.1 mg/mL)混合溶液を加えた MEM- 培地で、5% CO_2 存在下 37 °C で培養した。細胞増殖測定は同仁化学研究所のプロトコールに従って、WST-1 [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] (Dojindo)を用いて行った。MC3T3-E1 を 1000 cells/mL の密度で 96 well plate に播種した。その後、薬物処置後の 72 時間を 37 °C 5% CO_2 存在下で培養した。WST-1 投与後 2 時間で吸光度を測定した。vehicle 処理した細胞の生存率を 1.0 として表した。

(2)リアルタイム PCR

抽出した RNA から、逆転写酵素 ReverTra Ace®(ToYoBo)を用いて逆転写反応させ、cDNA を作成した。得られた cDNA 産物は遺伝子特異的プライマーを用いて増幅させた。real-time PCR による定量は Sybr Green アッセイ法(SYBR® Premix EX Taq™)(TaKaRa BIO)を用いてサイクル毎の蛍光を測定し、内部標準として GAPDH に対する比として発現量を測定した。

(3)ウェスタンブロッティング

回収した細胞を遠心後、RIPA buffer で懸濁した。懸濁液をホモジナイズ処理後、遠心により全細胞タンパク質溶液を取得した。タンパク質試料(20 µg/lane)を 12% SDS-PAGE により分画化し、PVDF 膜(GE Healthcare UK Ltd.)に転写した。一次抗体は次のような希釈倍率で使用した。

(4) Ca^{2+} イメージング

細胞内のカルシウムイオン濃度変化測定には Ca^{2+} 指示薬として Fura-2AM(Dojindo)を、終濃度 10 µM となるように細胞に負荷し行った。

(5)電気生理学実験

MC3T3-E1 細胞の膜電流測定にはホールセルパッチクランプ法を用いた。

4. 研究成果

(1)MC3T3-E1 細胞において機能発現する K^+ チャネルサブタイプの同定

MC3T3-E1 細胞において機能発現する K_{Ca} チャネルサブタイプの同定のために、リアルタイム PCR 法により検討したところ、 $K_{Ca3.1}$ mRNA の発現が高いことを見出した。そこで実際に $K_{Ca3.1}$ の機能を測定するために $K_{Ca3.1}$ 活性化薬である 10 µM DCEB10 を用いて Ca^{2+} イメージングを行ったところ、DCEB10 投与によって生じる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、 $K_{Ca3.1}$ 選択的阻害薬 TRAM-34(1 µM)の前処置により有意に抑制された。また、MC3T3-E1 細胞に機能発現する $K_{Ca3.1}$ チャネル機能

を直接評価するために電気生理学的検討によりホールセルパッチクランプ法を適用したところ、TRAM-34 感受性の $K_{Ca3.1}$ 電流が測定された。 $K_{Ca3.1}$ 活性化を介した Ca^{2+} シグナル制御による細胞増殖への影響を検討したところ、 $K_{Ca2,3}$ チャネル活性化薬 DCEB10 による細胞増殖の亢進は $K_{Ca3.1}$ 阻害薬 TRAM-34 併用により有意に抑制された。以上の結果より、MC3T3-E1 細胞において $K_{Ca3.1}$ チャネルが機能発現しており細胞増殖の制御に関与することが明らかとなった。

(2) 細胞周期制御における $K_{Ca3.1}$ の役割

細胞増殖は細胞周期の進行によって制御されており、cyclin と cyclin 依存性キナーゼ (CDK) を中心にそれらが複合体を形成し細胞周期を進行させる。また、ヒト乳癌細胞や B リンパ腫細胞において $K_{Ca3.1}$ は G1 期から S 期への細胞周期進行に寄与することが報告されている。 $K_{Ca3.1}$ 阻害が MC3T3-E1 細胞の細胞増殖を抑制させたことから、細胞周期進行に対する $K_{Ca3.1}$ の寄与を検討した。FACS を用いた細胞周期解析により、G0/G1 期、S/G2/M 期の細胞群の割合を測定した。TRAM-34 (1, 10 μ M) 前処置 MC3T3-E1 細胞では、TRAM-34 の濃度依存的に G0/G1 期の細胞の割合が有意に増加した。

同調培養は細胞周期に関する研究において広く用いられており、細胞周期ごとの細胞機能を検討する実験手法として有用である。MC3T3-E1 細胞において細胞周期同調を行い、 Ca^{2+} イメージングを用いて機能解析を行ったところ、S/G2/M 同調細胞と比較して、G0/G1 同調細胞において DCEB10 (10 μ M) 投与による細胞内 Ca^{2+} 流入の有意な増加が見られた。この結果より、MC3T3-E1 の G0/G1 期において $K_{Ca3.1}$ の発現・活性が亢進することで、細胞の膜電位が過分極し、 Ca^{2+} 透過チャンネルを介した Ca^{2+} 流入が亢進することで、G1 期から S 期への細胞周期進行を促進させることが示唆された。

(3) ビタミン D 刺激による $K_{Ca3.1}$ 発現変動と細胞増殖への影響

$K_{Ca3.1}$ の生理的役割を検討するために、ビタミン D3 刺激において誘導される前骨芽細胞の細胞増殖抑制機構への寄与について検討した。動物個体へのビタミン D 投与は、小腸上皮細胞における TRPV5/6 の発現を上昇させ、小腸からの Ca^{2+} 吸収を促進させることで骨量の増加をもたらすことが知られている。しかしながら、骨芽細胞特異的 VDR ノックアウトマウスを用いた検討及びマウス骨芽細胞を用いた in vitro 研究では、骨量に対して負の制御因子として機能することが示唆されている。そこで、前骨芽細胞の細胞増殖に対する VDR アゴニストの細胞増殖に対する影響を検討するとともに、 $K_{Ca3.1}$ の寄与について検討した。VDR アゴニストである calcitriol を MC3T3-E1 の投与し、48 時間培養後に $K_{Ca3.1}$ 発現を検討したところ、calcitriol 投与細胞において有意に $K_{Ca3.1}$ mRNA 及びタンパク発現が低下した。また、calcitriol 投与による細胞増殖への影響を検討したところ calcitriol 投与により有意に細胞増殖が抑制された。さらに、calcitriol 処置による細胞増殖の低下に対して、 $K_{Ca3.1}$ 活性の低下が関与するかを明らかにするために、 $K_{Ca3.1}$ 作用薬を使用したところ、TRAM-34 投与では変化が見られないのに対して DCEB10 投与により calcitriol 誘導性細胞増殖の抑制が部分的に回復した。以上に結果から、MC3T3-E1 に対する calcitriol 処置は $K_{Ca3.1}$ の発現を低下させることで細胞増殖を部分的に抑制することが明らかになった。

VDR アゴニスト処置による $K_{Ca3.1}$ の発現抑制メカニズムを明らかにするために、 $K_{Ca3.1}$ の転写制御因子について検討した。 $K_{Ca3.1}$ の転写促進因子として、Fos/Jun 二量体からなる AP-1 が知られている。そこで、calcitriol 処置細胞における AP-1 の mRNA 発現変化について検討した。リアルタイム PCR の結果、Fos ファミリーのうち Fra-1 の発現が減少し Fra-2 の発現が増加する一方で、Jun ファミリーである Jun-B, c-Jun, Jun-D の発現亢進が明らかとなった。そこで、Fos ファミリーのうち Fra-1 と $K_{Ca3.1}$ 発現制御に関わると報告がされている c-Jun のタンパク発現解析を行ったところ、c-Jun の発現に影響がないのに対して Fra-1 及び活性化体であるリン酸化 Fra-1 の発現が calcitriol 処置細胞において有意に減少することを明らかにした。また、Fra-1 の発現低下が $K_{Ca3.1}$ の発現を抑制するかを明らかにするために siRNA を使用した Fra-1 発現抑制実験を行ったところ、control siRNA 導入細胞と比較して、Fra-1 siRNA 導入細胞において $K_{Ca3.1}$ 発現が有意に低下した。

また、我々はこれまでに乳癌細胞において、 $K_{Ca3.1}$ の発現制御にヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) が関与することを明らかにしている。そこで、MC3T3-E1 における calcitriol 誘導性 $K_{Ca3.1}$ 発現抑制に HDAC の発現変化が影響するかどうかを検討した。HDAC クラス 1 に属する HDAC1, 2, 3, 8 について calcitriol 処置による発現変化を検討したところ、HDAC2 mRNA 及びタンパク質発現が有意に減少することが明らかになった。さらに、HDAC の活性低下により $K_{Ca3.1}$ の発現が制御されるかを検討するために、pan-HDAC 阻害薬 vorinostat 処置による $K_{Ca3.1}$ 発現を検討した。vorinostat (1, 10 μ M) を 48 時間処置し、 $K_{Ca3.1}$ 発現を比較したところ、vehicle 群と比較して有意に発現が減少した。calcitriol 処置により発現抑制が生じた HDAC2 による $K_{Ca3.1}$ 発現制御への影響を明らかにするために、HDAC2 siRNA による HDAC2 の発現抑制実験を行ったところ、siControl 群と比較して siHDAC2 群において有意に $K_{Ca3.1}$ mRNA 発現が低下した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsui Miki, Terasawa Kyoko, Kajikuri Junko, Kito Hiroaki, Endo Kyoko, Jaikhan Pattaporn, Suzuki Takayoshi, Ohya Susumu	4. 巻 19
2. 論文標題 Histone Deacetylases Enhance Ca ²⁺ -Activated K ⁺ Channel KCa _{3.1} Expression in Murine Inflammatory CD4 ⁺ T Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2942 ~ 2942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19102942	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsui Miki, Kajikuri Junko, Kito Hiroaki, Endo Kyoko, Hasegawa Yuki, Murate Shinya, Ohya Susumu	4. 巻 95
2. 論文標題 Inhibition of Interleukin 10 Transcription through the SMAD2/3 Signaling Pathway by Ca ²⁺ -Activated K ⁺ Channel KCa _{3.1} Activation in Human T-Cell Lymphoma HuT-78 Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 294 ~ 302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/mol.118.114405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Endo Kyoko, Kito Hiroaki, Tanaka Ryo, Kajikuri Junko, Tanaka Satoshi, Elboray Elghareeb E., Suzuki Takayoshi, Ohya Susumu	4. 巻 21
2. 論文標題 Possible Contribution of Inflammation-Associated Hypoxia to Increased K ₂ P _{5.1} K ⁺ Channel Expression in CD4 ⁺ T Cells of the Mouse Model for Inflammatory Bowel Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 38 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21010038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kito Hiroaki, Morihito Haruka, Sakakibara Yuka, Endo Kyoko, Kajikuri Junko, Suzuki Takayoshi, Ohya Susumu	4. 巻 319
2. 論文標題 Downregulation of the Ca ²⁺ -activated K ⁺ channel KCa _{3.1} in mouse preosteoblast cells treated with vitamin D receptor agonist	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C345 ~ C358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpcell.00587.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鬼頭宏彰、大矢進
2. 発表標題 内向き整流性Kir2.1K ⁺ チャネル発現亢進による骨芽細胞分化促進
3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鬼頭宏彰、大矢進
2. 発表標題 骨芽細胞分化制御における内向き整流性カリウムチャネルKir2.1の役割
3. 学会等名 第65回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鬼頭宏彰、大矢進
2. 発表標題 マウス前骨芽細胞におけるビタミンD受容体を介した中コンダクタンスCa ²⁺ 活性化K ⁺ チャネル活性抑制機構の解明
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鬼頭宏彰、大矢進
2. 発表標題 内向き整流性カリウムチャネルKir2.1発現亢進による骨芽細胞分化の促進
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroaki Kito, Haruka Morihira, Yuka Sakakibara, Masanori Fujii, Susumu Ohya
2. 発表標題 Down-regulation of Ca ²⁺ -activated K ⁺ channel KCa _{3.1} in mouse pre-osteoblast cells treated with vitamin D receptor agonists
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鬼頭宏彰、森広晴香、大矢 進
2. 発表標題 マウス前骨芽細胞におけるビタミンD受容体を介したCa ²⁺ 活性化K ⁺ チャネルKCa _{3.1} の発現抑制機構
3. 学会等名 第134回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鬼頭宏彰、大矢 進
2. 発表標題 骨芽細胞分化における内向き整流性K ⁺ チャネルKir2.1の役割
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鬼頭宏彰、大矢 進
2. 発表標題 骨芽細胞機能制御におけるカリウムチャネルの生理学的役割
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Kito, Haruka Morihira, Susumu Ohya
2. 発表標題 Down-regulation of KCa3.1 K+ channel by the treatment with VDR agonists in mouse pre-osteoblasts
3. 学会等名 9th FAOPS Congress (FAOPS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋市立大学大学院医学研究科薬理学分野 http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/pharma.dir/index.html

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
---------	---------