

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11036

研究課題名(和文)陽イオンチャンネルに起因する口腔軟組織疾患の病態生理学的解析

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of oral diseases caused by dysregulation of cation channels

研究代表者

若森 実 (Wakamori, Minoru)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：50222401

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)：タバコ煙に含まれる有機化学物質が口腔や気道に対する影響を調べるために、TRPA1チャンネルをコードする遺伝子をHEK293細胞に一過的に発現させて、タバコ主流煙に含まれている化学物質に対する応答を記録した。5つのカルボニル化合物のうちホルムアルデヒド、ブチルアルデヒド、メチルエチルケトンが有意なCa濃度上昇を惹起し、アセトン、クロトンアルデヒドは引き起こさなかった。アクリロニトリル、NNKは有意なCa<sup>2+</sup>濃度上昇を惹起した。TRPA1チャンネル選択的活性化薬のAITC投与時と同様にアクリロニトリルは外向き整流性を示す電流を惹起し逆転電位の結果から、TRPA1チャンネルを活性化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We studied the effects of the stimulating ingredients on TRPA1 channel recombinantly expressed in HEK293 cells using the Ca<sup>2+</sup> imaging analysis and the patch-clamp technique. Formaldehyde, butylaldehyde, methyl ethyl ketone, and NNK (4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butane) activated TRPA1 channel, although acetone, crotonaldehyde, isoprene, and nicotine did not induce Ca<sup>2+</sup> transient. Acrylonitrile induced TRPA1 channel current. We examined the responses to the cigarette smoke elements in trigeminal ganglion neurons and human gingival fibroblast 1. TRPA1 channel was expressed in TRG neurons and HGF-1 cells. Similar to the selective TRPA1 agonist allyl isothiocyanate (AITC), the chemical substances contained in the smoke of tobacco increased intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, and induced the outwardly rectifying currents. The responses were blocked by the selective TRPA1 antagonist HC-030031. Therefore it is suggested that TRPA1 channel is activated by the ingredients.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：TRP チャンネル

## 1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜・粘膜下組織の疾患の病理組織学的解析と免疫学的解析は進んでいるが、両解析以外の病態生理学的解明は遅れている。つまり、生理学的実験手法を用いた口腔軟組織の病理学的検討がほとんど行われていない。一方、口腔領域での TRP チャンネルの研究は疼痛・温度などの感覚生理学的研究が中心であり、日腔軟組織疾患の原因としての TRP チャンネル研究は行われていない。

## 2. 研究の目的

上記背景の下、TRP チャンネルが口腔軟組織疾患の病態形成に関わると仮説を立て、TRP チャンネルと口腔内疾患との関係を分子レベルで解明し、疾患予防及び治療法の開発に寄与することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 細胞培養

HGF-1 細胞 (ATCC より入手) は 10% 胎児仔牛血清、30 U/mL ペニシリン、30 µg/mL ストレプトマイシンを含有した DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培地を使用して培養した。細胞は、電気生理学的実験では poly-L-lysine コートしたカバーガラス上に播きなおし、細胞内カルシウム測定実験では poly-L-lysine コートしていないカバーガラスに播き直して 48-60 時間の間に使用した。

### 細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度測定

細胞内の Ca<sup>2+</sup>インジケータとして fura-2/AM (DOJINDO) を用いた。HGF-1 細胞に対して DMEM 中で最終濃度 5 µM の fura-2/AM を 37 °C で 40 分間インキュベーションした。細胞が張り付いたカバーガラスを倒立顕微鏡のステージに設置した環流チャンパーの中に静置した。細胞への励起光 (340 nm/380 nm) の照射はフィルターチェンジャーを用いて交互に行い、510 nm の蛍光を測定した。細胞内 Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 濃度は顕微鏡に接続された CCD カメラにより蛍光を検出し、MetaMorph ソフトウェアにより解析した。

### 細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度測定

HGF-1 細胞を PBS (-) で洗浄後、ISOGEN II (日本ジーン) を用いて溶解、RNA の回収を行った。得られた total RNA より iScript™ Reverse Transcriptase (BIO RAD) を用いて cDNA の合成を行った。Human TRPA1、TRPV1、TRPM8 に対する PCR 用 primer セットは次に示すように各々 2 種類使用した。hTRPA1-1 (5' -GCTCATCTGCAGTGGCAATG-3'、5' -GGAGAGCTGAA GGGATCCTG-3'、221 bp)、hTRPA1-2 (5' -CCACCAT CGTGTATCCCAACA-3'、5' -GAAAAGTAAGATCCTTCAG CCG-3'、165 bp)、hTRPV1-1 (5' -AGCACCTCACAGACAA CGAG-3'、5' -CGATGTGCAGTGTCTCTGG-3'、201 bp)、hTRPV1-2 (5' -CCTGTCCAGGAAGTTCACCG-3'、5' -GAGCATGTCGTGGCGATTAGG-3'、148 bp)、hTRPM8-1 (5' -GAACTCCACGACGTCTCC-3'、5' -CC

AGCAGCATTGATGTCGTTTC-3'、191 bp)、hTRPM8-2 (5' -GACACTCTGGACAGCACCCG-3'、5' -CGTGGCCTTG GAATCTTTGGTA-3'、147 bp)。使用した PCR サイクル条件は 94 °C 2 min、94 °C 30 sec、60 °C 30 sec、70 °C 3 min のセットを 25 サイクル、72 °C 7 min の後室温まで温度を下げた。その後 3% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、GelRed (Biotium) を用いて DNA を染色しトランスイルミネーター (312 nm) により露光してプリントグラフ AE-6933 (ATTO) により画像を取り込んだ。

### 免疫染色

HGF-1 細胞をガラスボトムディッシュに播種後 3 日後に 4% PFA を用いて固定した。PBS (-) で洗浄後、0.2% Triton X-100 を 10 分適用することにより細胞膜の透過性を確保した。PBS (-) で洗浄後、5% BSA を用いて 1 時間ブロッッキングを行った。1 次抗体としてラビット抗 TRPA1 ポリクローナル抗体 (SAB1411593 SIGMA) を 100 倍希釈濃度で用いた。反応液は Can Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution A (TOYOBO) を用い、室温で 1 時間反応させた。ネガティブコントロールとしては 1 次抗体の代わりに H<sub>2</sub>O を同用量用いた。PBS (-) で洗浄後 2 次抗体として DyLight 488 Conjugated A. P. Anti-Rabbit IgG (ROCKLAND) を 500 倍希釈濃度で 1 時間室温で反応させた。また同時に核染色用に Hoechst 33342 (Dojindo) を用いた。細胞を PBS (-) で洗浄後、共焦点顕微鏡 TCS SP8 (Leica) を用いて観察した。対物レンズは HC PL APO CS2 63X/1.40 OIL を使用した。

### 膜電流測定

HGF-1 細胞に対してパッチクランプ法ホールセルモードを適用し保持膜電位 -60 mV で膜電流を記録した。電流 電圧関係は -80 mV から 80 mV までの 1/3 Hz の 320 ms のランブ波を用いて記録した。EPC-10 amplifier を Patch-Master ソフトウェアにより駆動し、データも取得した。薬物の投与は "Y-tube" 法を用い、1 秒以内に細胞周囲の外液を交換した。

## 4. 研究成果

### HGF-1 における TRPA1 発現確認

ヒトの歯肉線維芽細胞株である HGF-1 に TRPA1 が発現しているかどうかを調べるために HGF-1 より RNA を採取して RT-PCR を行った。このとき同時に他の TRP チャンネルタンパク質である TRPV1 と TRPM8 に対する RT-PCR も行った。TRPV1 は熱 (42 °C)、酸、辛味で活性化されるチャンネルであり、TRPM8 は低温 (16 °C)、メントールなどで活性化され、ともに口腔内の感覚受容において重要なチャンネルである。RT-PCR を行った結果、2 種類設定したプライマーセットで共に想定された大きさのバンドが見られたことから HGF-1 には TRPA1 が発現していることが明らかになった。しかし、TRPV1、TRPM8 においてはどちらもバ

ンドが確認されなかったことから HGF-1 では mRNA の発現は無いと思われた。

抗 TRPA1 抗体を用いて免疫染色を行うことにより HGF-1 細胞に TRPA1 がタンパク質として発現しているかを調べた。共焦点顕微鏡を用いて観察したところ HGF-1 の細胞膜において蛍光シグナルが確認できた。しかし、1 次抗体を使用していないネガティブコントロールではほとんどシグナルが確認できなかったことから TRPA1 タンパク質は HGF-1 の細胞膜上で発現していることが確認された。

#### TRPA1 活性化薬とタバコ煙に含まれる成分による HGF-1 細胞内カルシウム応答

TRPA1 の活性化薬やタバコ煙に含まれている物質で活性化されるかを明らかにするために fura-2 を用いた細胞内カルシウム測定を行った。先ずこれまでに TRPA1 タンパク質を活性化することが明らかである AITC (allyl isothiocyanate) を 100  $\mu$ M HGF-1 細胞に適用したところ一過的に細胞内のカルシウム濃度が上昇することが確認された。この応答は AITC の濃度を 300  $\mu$ M に上昇させると濃度依存的に細胞内カルシウム濃度上昇が大きくなった。個々の細胞を見ると濃度を高くすることにより細胞内カルシウム上昇が大きくなるだけでなく、応答する細胞の割合も大きくなることを確認された (28.6% から 66.7% へ)。

タバコ煙にも含まれている Formaldehyde でも HGF-1 を活性化することが出来たが、その濃度は高く、300  $\mu$ M 以上必要であった。Acrylonitrile はタバコ煙に含まれている成分であるが、我々の以前の研究で HEK293 細胞に強制発現させた rat TRPA1 を 100  $\mu$ M で活性化できることを見出している。そこで acrylonitrile が HGF-1 を活性化できるかどうかを調べるために 1 mM の濃度で適用したところほとんど細胞内カルシウム上昇は見られなかった (応答率 13.3%)。これらのことから HGF-1 は TRPA1 の活性化薬を曝露することにより細胞内カルシウムが上昇することが確認できたが、HEK293 細胞への rTRPA1 チャネルタンパク質の強制発現を用いた実験よりも高濃度の試薬が必要であり、またそのカルシウム上昇の大きさも小さいことが明らかになった。

#### TRPA1 活性化薬とタバコ煙に含まれる成分による HGF-1 細胞の電流応答

細胞内  $Ca^{2+}$  濃度測定の実験結果から、用いる薬物の濃度を決定し、パッチクランプ法ホールセル法を適用した HGF-1 細胞に薬物を投与した。膜電位をランプ波で -80 mV から 80 mV まで変化させ、電流-電圧関係を記録した。固定下に膜電流を測定した。ホールセル形成後の時間に対し膜電位 -70 mV と 70 mV での膜電流をプロットした。Formaldehyde で電流が惹起され、この電流は TRPA1 チャネルの選択的阻害剤である HC-030031 で遮断され

た。同一の細胞で AITC を投与すると、Formaldehyde が惹起した電流よりも大きい電流が記録できた。Formaldehyde と AITC で活性化されたチャネルの電流-電圧関係は弱い外向き整流性を示し、膜電位 10 mV 付近に逆転電位があり、選択性の弱い陽イオンチャネルであることが示唆された。

ヒト歯肉線維芽細胞において TRPA1 チャネルが発現し、TRPA1 チャネルの作動薬である AITC でチャネルが活性化し、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇し、膜電流も記録できた。更に、タバコ煙に含まれる Formaldehyde でも HGF-1 細胞は反応し、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇が記録でき、膜電流も記録できた。タバコの煙に含まれる TRPA1 チャネルを活性化させる有害物質のタバコ主流煙中の収量は微量であり、nicotine と比べても収量は少ない。従って、一番活性化しやすい formaldehyde でも単独ではヒト歯肉線維芽細胞に発現する TRPA1 チャネルを活性化できない可能性があるが、混合物としては効力が加算され、有害作用を惹起する可能性が示唆された。

#### 骨芽細胞における亜鉛の効果

亜鉛はヒトのからだにも微量ながら含まれており、鉄などとともに生体内必須微量元素と呼ばれている。亜鉛は核酸・蛋白・糖・脂質代謝や DNA・RNA の合成に関与する酵素に不可欠で、生体機能に重要な役割を果たしている。亜鉛の 90% は骨や筋肉に存在するが、海馬 CA3 領域のシナプス間隙では活動電位の発生に伴い亜鉛イオン ( $Zn^{2+}$ ) がシナプス終末から遊離されて、間隙での  $Zn^{2+}$  濃度は 100  $\mu$ M 以上になる。 $Zn^{2+}$  は NMDA 受容体や P2X 受容体などのイオンチャネルの機能を修飾すると報告されている。従って、本研究では非興奮性細胞である骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞にパッチクランプ法ホールセル法を適用し、イオンチャネルに対する  $Zn^{2+}$  の効果を検討した。更に、マウス初代培養骨芽細胞を購入し、MC3T3-E1 細胞と同様にイオンチャネルに対する  $Zn^{2+}$  の効果を検討した。

骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞にホールセル法形成後、膜電流固定法に切り替え細胞の静止膜電位を記録すると  $-7.7 \pm 0.7$  mV ( $n = 25$ ) であった。150 ms 5 pA の過分極電流を 0.1 Hz で注入しながら 1 mM  $Zn^{2+}$  を投与すると、2 つのグループに分けられる過分極応答が記録できた。 $-6.1 \pm 0.6$  mV の膜電位が膜抵抗の上昇を伴い  $-14.2 \pm 1.1$  mV ( $n = 9$ ) まで過分極したグループと、 $-8.5 \pm 1.1$  mV の膜電位が膜抵抗の低下を伴い  $-64.6 \pm 1.3$  mV ( $n = 16$ ) まで過分極したグループに分類できた。後者のグループの細胞を膜電位固定下にランプ波形を用いて電流-電圧関係を記録すると、逆転電位は  $-69.1 \pm 1.3$  mV ( $n = 14$ ) であり、内外液の組成から計算される  $K^+$  の平衡電位 ( $= -58 * \log (155 / 5) = -86.5$  mV) に近い値を示した。従って、細胞外に投与した  $Zn^{2+}$  が  $K^+$  チャネルを開口し、膜を過分極させたことが

示唆された。

同様にマウス初代培養骨芽細胞でホールセル法形成後、膜電流固定法に切り替え細胞の静止膜電位を記録すると $-9.4 \pm 0.4$  mV ( $n = 6$ )であった。150 ms 5 pAの過分極電流を0.1 Hzで注入しながら1 mM  $Zn^{2+}$ を投与すると、2つのグループに分けられる過分極応答が記録できた。膜抵抗の上昇を伴い $-15.1 \pm 0.4$  mV ( $n = 2$ )まで膜電位が過分極したグループと、膜抵抗の低下を伴い $-75.3 \pm 1.4$  mV ( $n = 2$ )まで過分極したグループに分類できた。外液とパッチピペット内液の組成から前者は陽イオンチャンネルが $Zn^{2+}$ で遮断されて過分極したことが示唆され、後者は $K^+$ チャンネルが開閉し $K^+$ の平衡電位に向かって過分極したことが示唆された。これらの結果は、骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞で得られた結果と同じ傾向を示し、MC3T3-E1細胞で得たデータが骨芽細胞に外挿できることを示唆した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Yabuki, Y., Matsuo, K., Izumi, H., Haga, H., Yoshida, T., Wakamori, M., Kakei, A., Sakimura, K., Fukuda, T., and Fukunaga, K. (2017) Pharmacological properties of SAK3, a novel T-type voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel enhancer. *Neuropharmacology* **117**, 1-13. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.01.011、査読あり
2. Tsukamoto, T., Chiba, Y., Wakamori, M., Yamada, T., Tsunogae, S., Cho, Y., Sakakibara, R., Imazu, T., Tokoro, S., Satake, Y., Adachi, M., Nishikawa, T., Yotsu-Yamashita, M., and Konoki, K. (2017) Differential binding of tetrodotoxin and its derivatives to voltage-sensitive sodium channel subtypes (Nav 1.1 to Nav 1.7). *Br J Pharmacol* **174**, 3881-3892. DOI: 10.1111/bph.13985、査読あり
3. Aikawa, T., Watanabe, T., Miyazaki, T., Mikuni, T., Wakamori, M., Sakurai, M., Aizawa, H., Ishizu, N., Watanabe, M., Kano, M., Mizusawa, H., and Watase, K. (2017) Alternative splicing in the C-terminal tail of Cav2.1 is essential for preventing a neurological disease in mice. *Hum Mol Genet* **26**, 3094-3104. DOI: 10.1093/hmg/ddx193、査読あり
4. Tsukamoto, T., Chiba, Y., Nakazaki, A., Ishikawa, Y., Nakane, Y., Cho, Y., Yotsu-Yamashita, M., Nishikawa, T., Wakamori, M., and Konoki, K. (2017) Inhibition of veratridine-induced delayed inactivation of the voltage-sensitive sodium channel by synthetic analogs of crambescin B. *Bioorg Med Chem Lett* **27**, 1247-1251. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.01.054、査読あり

5. Hori, M., Kubo, H., Shibato, J., Saito, T., Ogawa, T., Wakamori, M., Masuo, Y., Shioda, S., and Rakwal, R. (2016) Unraveling the rat blood genome-wide transcriptome after oral administration of lavender oil by a two-color dye-swap DNA microarray approach. *Genom Data* **8**, 139-145. DOI: 10.1016/j.gdata.2016.05.005、査読あり
6. Nakao, A., Miki, T., Shimono, K., Oka, H., Numata, T., Kiyonaka, S., Matsushita, K., Ogura, H., Niidome, T., Noebels, J. L., Wakamori, M., Imoto, K., and Mori, Y. (2015) Compromised maturation of GABAergic inhibition underlies abnormal network activity in the hippocampus of epileptic  $Ca^{2+}$  channel mutant mice, tottering. *PLoS Arch* **467**, 737-752. DOI: 10.1007/s00424-014-1555-6、査読あり

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 高橋かおり, 吉田卓史, 若森実 機械刺激を受けた歯根膜細胞が産生する Wnt5a の神経突起伸長効果 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017 年
2. 高橋かおり, 吉田卓史, 若森実 機械刺激依存的な歯根膜由来 Wnt5a による三叉神経突起伸長作用 第 68 回日本薬理学会北部会 2017 年
3. Takahashi K, Yoshida T, Wakamori M. The regulatory function of Wnt5a, secreted from periodontal ligament cells loaded with mechanical stimuli, in axonal elongation of peripheral nerves. 第60回日本神経化学会 2017年
4. Wakamori M. Patch-Clamp Recording of High-Voltage-Activated  $Ca^{2+}$  Channels. International Society for Neurochemistry (ISN), Asian-Pacific Society for Neurochemistry (APSN) and Japanese Society for Neurochemistry (JSN) Advanced School 2017年
5. 若森実, 光夢凱, 吉田卓史, 中村卓史, 宮 幸 骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞に於けるIKとBKチャンネルを介した亜鉛イオンによる過分極応答 第90回日本薬理学会年会 2017年03月17日
6. 吉田卓史, 高橋かおり, 若森実 機械刺激を受けた歯根膜による神経分化誘導機構の解明 2017年03月17日
7. 光夢凱, 吉田卓史, 中村卓史, 若森実 骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞に於ける亜鉛イオンによる過分極応答 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 2016 年 8 月 24 日
8. 中村卓史, 中村友昭, 若森実, 福本敏 エピプロフィンによる骨代謝調節 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 2016 年 8 月 24 日
9. 高橋かおり, 吉田卓史, 若森実 機械刺激

を負荷した歯根膜細胞による神経分化誘導機構の解明 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 2016 年 8 月 24 日

10. 若森実, 光夢凱, 吉田卓史, 中村卓史, 高橋かおり 亜鉛イオンによる骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞の過分極応答 第 67 回日本薬理学会北部会 2016 年 9 月 30 日
11. Yoshida T, Takahashi K, Wakamori M. The evaluation of inhibitory effect of eugenol on TRPV1 activity stimulated by capsaicin, proton and heat. 第89回日本薬理学会年会、2016年3月9日
12. Yoshida T, Takahashi K, Wakamori M. Differential inhibitory effects of eugenol on TRPV1 channel activity. The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science. 2016 年 1 月 16 日
13. 若森実, 窪田寿彦, 吉田卓史 海馬 CA3 領域でのシナプス伝達に対するフェニトインの作用、第 66 回日本薬理学会北部会 2015 年 9 月 18 日
14. Yoshikawa S, Oh-Hora M, Wakamori M, Miyake K, Li L, Ohta T, Horiguchi K, Yamanishi Y, Karasuyama H. STIM1 plays an essential role in basophil recruitment during IgE-mediated chronic allergic inflammation. TRPs and SOCs ~ Unconventional Ca<sup>2+</sup> Physiology ~ 2015 年6月4日
15. Wakamori M. Electrophysiological properties of P-type Ca<sup>2+</sup> channel in Purkinje cells dissociated from three types of tottering mice. The International Symposium on Neuroscience in Orofacial sensory-motor functions 2015. 2015年5月11日

〔図書〕(計 1 件)

1. 若森実 現代 歯科薬理学第6版 医歯薬出版 (分担執筆) 19頁/総頁425 2018年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

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

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
若森 実 (WAKAMORI Minoru)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：50222401

(2) 研究分担者  
吉田卓史 (YOSHIDA Takashi)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：30455795

高橋 哲 (TAKAHASHI Tetsu)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：60226850

熊本裕行 (KUMAMOTO Hiroyuki)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：70215028

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
( )