

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21474

研究課題名(和文)骨代謝におけるカルシウムシグナルを制御するイオンチャンネルと骨免疫疾患との関連

研究課題名(英文)Role of Ca²⁺ signaling due to the activation of K⁺ channels in bone remodeling

研究代表者

鬼頭 宏彰(Kito, Hiroaki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40749181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000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ン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⁺チャンネルKCa3.1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、KCa3.1活性低下が一部寄与した。ビタミンD刺激によるKCa3.1発現抑制メカニズムを検討したところ、AP-1およびHDAC2の活性低下が関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In present study, we showed that KCa3.1 were functionally expressed in mouse preosteoblast MC3T3-E1, and the activation of KCa3.1 promoted the cell growth of MC3T3-E1 cells. To clarify the physiological function of KCa3.1 in MC3T3-E1 cells, contribution of KCa3.1 to VDR agonists-induced suppression of cell proliferation were examined. Treatments with VDR agonists markedly decreased the expression levels of KCa3.1 transcripts and proteins in MC3T3-E1 cells. Treatments with VDR agonists also significantly decreased the expression of several transcriptional regulators of KCa3.1 such as histone deacetylase 2 (HDAC2) and Fra-1 composed of activation protein 1. Our results suggest that KCa3.1 is a new downstream target of VDR signaling and the down-regulation of KCa3.1 through the transcriptional repression of KCa3.1 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：薬理学 パッチクランプ法 カルシウム活性化カリウムチャンネル VDR 前骨芽細胞

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。

我々は、これまでにイオンチャネルを介した細胞内 Ca^{2+} シグナルに焦点を当て研究を行っており、脳血管内皮細胞の膜電位を制御する K^+ チャネルと Ca^{2+} シグナルとの機能的連関について研究を行うことで過剰な過分極が Ca^{2+} 流入を促進させ細胞死を誘導することを明らかにした (Kito *et al*, *BBRC*, 2011; Yamazaki *et al*, *Am J Physiol*, 2011)。また、炎症性疾患モデルマウスより単離した $CD4^+$ T 細胞において K^+ チャネル活性化が病態形成に寄与することを明らかにしている (Ohya *et al*, *Am J Physiol*, 2014; Ohya *et al*, *Br J Physiol*, 2014)。内皮細胞や免疫細胞、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、遺伝子発現、細胞分化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

前骨芽細胞の増殖・分化に対して、 K^+ チャネル (特に Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル K_{Ca} 、内向き整流性 K^+ チャネル K_{ir}) の機能解析により骨代謝制御におけるイオンチャネルの役割を解明し、骨代謝性疾患におけるイオンチャネル創薬を目指す。

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。

(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) WST-1 アッセイ

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。

(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 μ M 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) MC3T3-1 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、 $K_{Ca}3.1$ mRNA の発現が高いことを見出した。そこで実際に $K_{Ca}3.1$ の機能を測定するために $K_{Ca}3.1$ 活性化薬である 10 μ M 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、 $K_{Ca}3.1$ 選択的阻害薬 TRAM-34 (1 μ M) 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 $K_{Ca}3.1$ 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 $K_{Ca}3.1$ 電流が測定された。 $K_{Ca}3.1$ 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、 $K_{Ca}2,3$ チャネル活性化薬 DCEB10 による細胞増殖の亢進は $K_{Ca}3.1$ 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 $K_{Ca}3.1$ 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) ビタミン D 刺激による $K_{Ca}3.1$ 発現変動と細胞増殖への影響

$K_{Ca}3.1$ 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

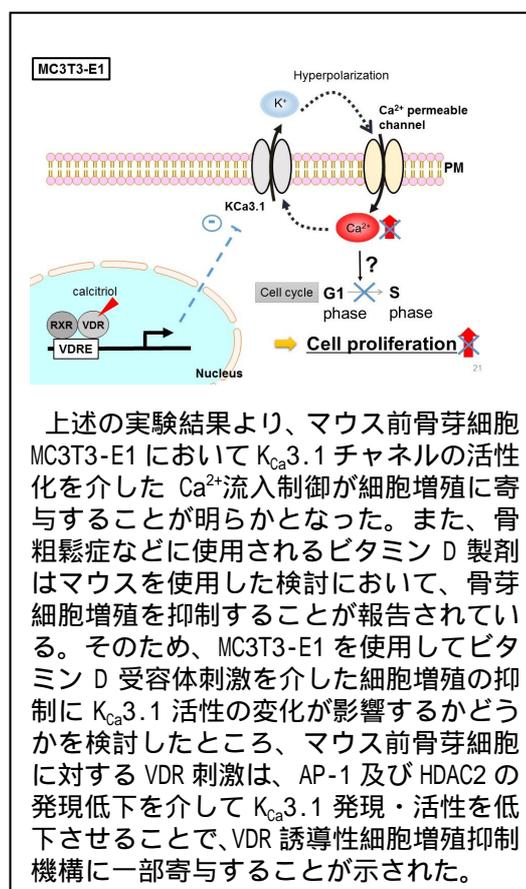
骨量の増加をもたらすことが知られている。しかしながら、骨芽細胞特異的 VDR ノックアウトマウスを用いた検討及びマウス骨芽細胞を用いた in vitro 研究では、骨量に対して負の制御因子として機能することが示唆されている。そこで、前骨芽細胞の細胞増殖に対する VDR アゴニストの細胞増殖に対する影響を検討するとともに、 $K_{Ca}3.1$ の寄与について検討した。VDR アゴニストである calcitriol を MC3T3-E1 の投与し、48 時間培養後に $K_{Ca}3.1$ 発現を検討したところ、calcitriol 投与細胞において有意に $K_{Ca}3.1$ mRNA 及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、 $K_{Ca}3.1$ 活性の低下が関与するかを明らかにするために、 $K_{Ca}3.1$ 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 $K_{Ca}3.1$ 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。

(3) VDR 刺激による $K_{Ca}3.1$ 発現抑制メカニズムの解明

Calcitriol 処置による $K_{Ca}3.1$ の発現抑制メカニズムを明らかにするために、 $K_{Ca}3.1$ の転写制御因子について検討した。 $K_{Ca}3.1$ の転写促進因子として、Fos/Jun のヘテロ二量体からなる 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 Fra1 の発現が減少し Fra2 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 Fra1 と $K_{Ca}3.1$ 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、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。一方で、c-Jun のタンパク発現に変化は生じなかった。また、Fra-1 の発現低下が $K_{Ca}3.1$ 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 導入細胞に比較して、Fra-1 siRNA 導入細胞において $K_{Ca}3.1$ 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、 $K_{Ca}3.1$ 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 $K_{Ca}3.1$ 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 発現が有意に減少することが明らかになった。また、HDAC2 のタンパク発現変化を検討したところ、calcitriol 処置により mRNA と同様に有意に発現が減少していた。さらに、HDAC の活性低下により $K_{Ca}3.1$ 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 $K_{Ca}3.1$ 発現を検討した。vorinostat (1, 10 μ M) を 48 時間処置し、 $K_{Ca}3.1$ 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 $K_{Ca}3.1$ 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 $K_{Ca}3.1$ mRNA 発現が低下した。



上述の実験結果より、マウス前骨芽細胞 MC3T3-E1 において $K_{Ca}3.1$ チャンネルの活性化を介した Ca^{2+} 流入制御が細胞増殖に寄与することが明らかとなった。また、骨粗鬆症などに使用されるビタミン D 製剤はマウスを使用した検討において、骨芽細胞増殖を抑制することが報告されている。そのため、MC3T3-E1 を使用してビタミン D 受容体刺激を介した細胞増殖の抑制に $K_{Ca}3.1$ 活性の変化が影響するかどうかを検討したところ、マウス前骨芽細胞に対する VDR 刺激は、AP-1 及び HDAC2 の発現低下を介して $K_{Ca}3.1$ 発現・活性を低下させることで、VDR 誘導性細胞増殖抑制機構に一部寄与することが示された。

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 7 件)

1. Anowara Khatun, Motoki Shimosawa, Hiroaki Kito, Mayu Kawaguchi, Mayu Fujimoto, Moe Ri, Junko Kajikuri, Satomi Niwa, Masanori Fujii, Susumu Ohya. Transcriptional Repression and Protein Degradation of the Ca^{2+} -Activated K^+ Channel $K_{Ca}1.1$ by Androgen Receptor Inhibition in Human

- Breast Cancer Cells. *Front Physiol* 9:312 (2018) doi: 10.3389/fphys.2018.00312 (査読有).
2. Mayu Fujimoto, Takahiro Inoue, Hiroaki Kito, Satomi Niwa, Takayoshi Suzuki, Katsuhiko Muraki, Susumu Ohya. Transcriptional repression of HER2 by ANO1 Cl⁻ channel inhibition in human breast cancer cells with resistance to trastuzumab. *Biochem Biophys Res Commun*. 482(1):188-194 (2017) doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.033 (査読有).
 3. Anowara Khatun, Mayu Fujimoto, Hiroaki Kito, Satomi Niwa, Takayoshi Suzuki, Susumu Ohya. Down-Regulation of Ca²⁺-Activated K⁺ Channel K_{Ca}1.1 in Human Breast Cancer MDA-MB-453 Cells Treated with Vitamin D Receptor Agonists. *Int J Mol Sci*. 17(12). E2083 (2016)(査読有).
 4. Kazutaka Tagishi, Ayaka Shimizu, Kyoko Endo, Hiroaki Kito, Satomi Niwa, Masanori Fujii, Susumu Ohya. Defective splicing of the background K⁺ channel K_{2p}5.1 by the pre-mRNA splicing inhibitor, pladienolide B in lectin-activated mouse splenic CD4⁺ T cells. *J Pharmacol Sci*. 132(3):205-209 (2016) doi: 10.1016/j.jphs.2016.10.007 (査読有).
 5. Hiroaki Kito. Calcium signaling and inflammasome. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 148(1):57 (2016) doi: 10.1254/fpj.148.57 (査読無).
 6. Susumu Ohya, Saki Kanatsuka, Noriyuki Hatano, Hiroaki Kito, Azusa Matsui, Mayu Fujimoto, Sayo Matsuba, Satomi Niwa, Peng Zhan, Takayoshi Suzuki, Katsuhiko Muraki. Downregulation of the Ca²⁺-activated K⁺ channel K_{Ca}3.1 by histone deacetylase inhibition in human breast cancer cells. *Pharmacol Res Perspect*. 4(2):e00228 (2016) doi: 10.1002/prp2.228(査読有).
 7. Susumu Ohya, Hiroaki Kito, Noriyuki Hatano, Katsuhiko Muraki. Recent advances in therapeutic strategies that focus on the regulation of ion channel expression. *Pharmacol Ther*. 160:11-43(2016)doi:10.1016/j.pharmthera.2016.02.001(査読有)
1. 鬼頭宏彰, 森広晴香, 川岸怜子, 榊原侑香, 大矢進: 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Ca²⁺活性化K⁺チャネルの活性制御. 日本薬学会第138年会 (金沢), 2018.3.
 2. Anowara Khatun, 下澤 基, 鬼頭 宏彰, 川口 真由, 藤本 万由, 丹羽 里実, 藤井 正徳, 大矢 進 : Antiandrogen-induced protein degradation of Ca²⁺-activated K⁺ channel K_{Ca}1.1 in human breast cancer cells. 日本薬学会第 138 年会 (金沢), 2018.3.
 3. 遠藤京子, 鬼頭宏彰, 藤井正徳, 大矢 進: 炎症性T 細胞におけるtwo-pore 型カリウムチャネルK_{2p}5.1 の役割とpre-mRNA スプライシング阻害剤によるその発現・活性制御. 日本薬学会第138年会 (金沢), 2018.3.
 4. Kyoko Endo, Natsumi Kurokawa, Kazutaka Tagishi, Ayaka Shimizu, Hiroaki Kito, Masanori Fujii, Susumu Ohya: Identification of novel splicing isoforms of two-pore domain K⁺ channel, K_{2p}5.1 and suppressive effects of the pre-mRNA splicing inhibitor on K_{2p}5.1 activity in activated T lymphocytes. ConBio2017(Kobe), 2017.12.
 5. Susumu Ohya, Mayu Fujimoto, Hiroaki Kito: Down-regulation of Ca²⁺-activated K⁺ channel K_{Ca}1.1 by the treatment with antiandrogens in human breast cancer cells. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association(Yokohama), 2017.9
 6. Mayu Fujimoto, Susumu Ohya, Hiroaki Kito: Contribution of Cl⁻ channels to the transcription of HER2 in breast cancer cells. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association(Yokohama), 2017.9
 7. 森広晴香, 鬼頭宏彰, 川岸怜子, 榊原侑香, 大矢進: 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Ca²⁺活性化K⁺チャネルK_{Ca}3.1の活性制御. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2017 (京都), 2017.8.
 8. 鬼頭宏彰, 森広晴香, 川岸怜子, 榊原侑香, 大矢進: 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Ca²⁺活性化K⁺チャネルK_{Ca}3.1の活性制御. 生体機能と創薬シンポジウム2013 (京都) 2017.6.
 9. 鬼頭宏彰, 森広晴香, 川岸怜子, 榊原侑香, 大矢進: マウス前骨芽細胞におけるビタミンD受容体を介したCa²⁺活性化K⁺チャネルK_{Ca}3.1の活性制御. 第131

回日本薬理学会近畿部会（名古屋），
2017.6.

10. 鬼頭宏彰、森広晴香、川岸怜子、榊原侑香、大矢進：骨芽細胞の細胞周期進行に対するCa²⁺活性化K⁺チャネルK_{Ca}3.1の寄与。第94回日本生理学会大会（浜松），2017.3.
11. 鬼頭宏彰、森広晴香、川岸怜子、榊原侑香、大矢進：前骨芽細胞の細胞増殖における中コンダクタンスCa²⁺活性化K⁺チャネルK_{Ca}3.1の役割。日本薬学会第137年会（仙台），2017.3.
12. 鬼頭宏彰、森広晴香、川岸怜子、榊原侑香、大矢進：骨芽細胞の細胞増殖に対するCa²⁺活性化K⁺チャネルK_{Ca}3.1の寄与。第90回日本薬理学会年会（長崎），2017.3.
13. 川岸怜子、鬼頭宏彰、森広晴香、大矢進：マウス前骨芽細胞の中コンダクタンスCa²⁺活性化K⁺チャネル阻害による細胞周期制御。第130回日本薬理学会近畿部会（京都），2016.11.
14. 下澤基、升野祐里、中園裕利華、鬼頭宏彰、Anowara Khatun、丹羽里実、大矢進：アンドロゲン受容体陽性ヒト乳癌細胞における抗アンドロゲン剤によるカルシウム活性化カリウムチャネルK_{Ca}1.1転写抑制。第66回日本薬学会近畿支部大会（大阪），2016.10.
15. 鬼頭宏彰、榊原侑香、大矢進：マウス前骨芽細胞における内向き整流性K⁺チャネルKir2.1を介した細胞分化制御。2016年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 新規分子標的治療薬創薬に向けた大学発ベンチャー基盤の確立 Annual Meeting（京都），2016.9.
16. 榊原侑香、鬼頭宏彰、大矢進：マウス前骨芽細胞における内向き整流性K⁺チャネルを介した細胞分化制御。次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2016（仙台），2016.8.
17. 森広晴香、鬼頭宏彰、榊原侑香、川岸怜子、大矢進：前骨芽細胞における中コンダクタンスCa²⁺活性化K⁺チャネルを介した細胞増殖制御機構の解明。第129回日本薬理学会近畿部会（広島），2016.6.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

名古屋市立大学大学院医学研究科薬理学分野 HP

[http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/pharma.d
ir/index.html](http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/pharma.d
ir/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼頭 宏彰 (KITO, Hiroaki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40749181

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし