

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：42208

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K12047

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞の細胞周期制御における機械刺激受容チャネルTRPC6の役割

研究課題名(英文) The role of mechanosensitive TRPC6 channel in cell cycle progression of bone marrow mesenchymal stem cells

研究代表者

市川 純 (Ichikawa, Jun)

佐野日本大学短期大学・その他部局等・准教授(移行)

研究者番号：70368207

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)：骨髄間葉系幹細胞は再生医療分野での臨床応用が最も進んでいる体性幹細胞であり、移植に用いる細胞を効率良く増やす培養方法の開発が求められている。本研究は骨髄間葉系幹細胞の細胞周期進行に、非電位依存性Ca透過型陽イオンチャネルTRPC6を介した機械刺激受容機構が果たす役割とその分子制御機構の解明を目的として遂行された。TRPC6チャネルの特徴である、受容体応答発生前に機械刺激が加わるとチャネル活性が増幅される性質(受容体・機械刺激協働作用)はM期進行に重要であること、協働的に刺激することで増殖効率が改善されることが明らかになった。また協働刺激により制御を受ける細胞内分子についても知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

圧刺激やすり応力等の機械的刺激は生体の組織や細胞のシグナル伝達経路にはたらきかけ、増殖をはじめ様々な応答を引き起こす。再生医療分野で臨床的に広く用いられている骨髄間葉系幹細胞もまた機械刺激に対し感受性を示し、機械刺激が分化の方向決定等重要な制御に関与することがわかっているが、メカニズムに関しては不明な点も多い。本研究ではTRPC6が機械刺激を細胞周期制御シグナルに変換する重要な分子であることを明らかにした。さらにこの結果を応用すれば増殖効率が向上することを示した。この方法で得られた細胞は癌化のおそれなく分化能も正常に維持されていたため、安全で効率的な新しい培養方法の確立に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) can be used as a reliable therapeutic resource for regenerative medicine and bioengineering. Controlling the proliferative potential and cell cycle progression of BMSCs is an attractive approach to maximising the yield of BMSCs during expansion in vitro. In this study, we explored the contribution of TRPC6 channel, which is a mechanosensitive Ca²⁺-permeable cation channel, in cell cycle progression of BMSCs. The mechanical potentiation of receptor-activated TRPC6 channel was enhanced at M phase. The proliferative activity was enhanced by the synergistic activation of TRPC6 channel by receptor and mechanical stimulation. We also investigated the intracellular molecules relating to the TRPC6-mediated mechanosensitive signaling pathways.

研究分野：生体医工学、イオンチャネル細胞分子生理学

キーワード：骨髄間葉系幹細胞 イオンチャネル TRPC6 機械刺激 細胞周期 増殖 細胞骨格 再生医療

1. 研究開始当初の背景

生体の組織や細胞は外界から来る多様な物理化学的刺激(温冷、機械、磁気、電氣的刺激等)に対する感受性を有し、それにより様々な調節を受けている。本研究の対象である骨髄間葉系幹細胞(bone marrow mesenchymal stem cell, 以下 BMSC)の増殖・分化にも機械刺激が重要な役割を果たしている。過去の報告によれば、骨髄内で発生する血流負荷により BMSC が ATP を放出し増殖を促進する[1]。他、細胞外基質が固いと筋細胞や骨・軟骨細胞、柔らかいと神経細胞へ分化することも報告されている[2]。これは細胞外基質が固いと細胞膜の張力が増し、機械刺激に対する感受性が高まるためと考えられている。以上のことから BMSC の増殖・分化と機械刺激は密接な関わりを持つことが明白であるが、そのメカニズムに関しては不明な点も多く残されている。BMSC は骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、心筋細胞等の中胚葉由来細胞のみならず外胚葉系、例えば神経細胞等にも分化することができ、扱い易く自家移植が可能のため再生医療分野では現在最も臨床応用が進んでいる幹細胞リソースである。体外で培養してから移植に利用するまでの期間を短縮するために増殖や分化の効率を高めるという観点からも、機械刺激—細胞内シグナル変換機構の解明は必要とされる。

機械刺激を細胞内シグナルへと変換するには、イオンチャネル・接着因子とそのアダプタータンパク・ストレスファイバー等の細胞骨格が複合的に働くと考えられている。transient receptor potential (TRP)チャネルファミリーは物理化学的刺激に対し応答する陽イオン透過型チャネル群であり、その1つである TRPC6 は G タンパク共役型受容体($G_{q/11}$)—フォスホオリパーゼ C(PLC)系活性化により開く受容体活性化型・Ca 透過型陽イオンチャネルである。TRPC6 は受容体刺激と機械刺激が協働的に作用することで活性が増強することが明らかにされている[3]。我々はこれまでに細胞周期同調培養を施した BMSC において、TRPC6 の発現量が G_1 期で増加し S 期で減少することでカチオン流入量ひいては静止膜電位の細胞周期依存的変動が発生し、Ca 流入の駆動力に影響を及ぼした結果、細胞周期動員の制御に繋がることを報告した[4]。この成果に加え、TRPC6 発現量自体に顕著な変化はみられない M 期進行においても何らかの役割を果たしていることを示唆する解析結果を得たため、TRPC6 の機械刺激応答性に着目し、細胞周期制御との関連を探る必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、TRPC6 を介した機械刺激応答が BMSC の増殖(細胞周期制御)に果たす役割と、機械刺激シグナルが増殖シグナルへと変換される機構について明らかにすること、およびそれらの知見を応用して増殖効率の向上を目指すことである。

3. 研究の方法

ラット大腿骨より採取・初代培養した BMSC を用いて各実験を行った。チャネル活性評価には、パッチクランプによるチャネル電流測定および Ca 蛍光色素を用いたタイムラプスイメージングを用いた。受容体刺激薬(G タンパク共役型受容体アゴニスト)で TRPC6 チャネルを活性化した後に機械刺激(浸透圧刺激や膜伸展刺激薬)を加えて応答の増幅率を解析した。増殖に対する効果は、細胞を 96 穴プレートに播種し calcein-AM による生細胞染色あるいは MTT アッセイ法により細胞数をカウントして解析した。

4. 研究成果

(1) BMSC における TRPC6 チャンネルを介した機械刺激応答

BMSC の機械刺激応答性カチオン電流の性質をパッチクランプおよび細胞内カルシウムイメージングにより検討した。その結果、機械刺激単独では応答が見られなかったが、受容体活性化直後に機械刺激を加えると応答が増強することが明らかになった。詳細な刺激条件を検討したところ、機械刺激の添加によるチャンネル活性の増幅率は、低濃度の受容体アゴニスト投与時に高まることがわかった。これらの性質は、TRPC6 を強制発現させた HEK 細胞での実験結果と一致していた。

この様な BMSC の機械刺激時応答増幅は、TRPC6 特異的阻害薬または siRNA 法による TRPC6 発現抑制により低減されたことから、TRPC6 チャンネル由来の応答であると裏付けられた。

(2) BMSC の細胞周期進行における TRPC6 チャンネルの役割

同調培養により G₁、S、G₂、M 期に停止した BMSC を準備し、各ステージにおけるチャンネル活性をパッチクランプおよび細胞内 Ca²⁺ イメージングにより解析した。その結果、TRPC6 チャンネルの特徴である受容体刺激と機械刺激の協働的応答が M 期において有意に増強することが明らかになった。このことから、TRPC6 チャンネルの機械刺激感受性の増幅が M 期進行に何らかの役割を果たしていることが推測された。

(3) 機械刺激による TRPC6 チャンネル活性の増幅が BMSC の増殖に及ぼす効果および安全性の検討

次に受容体刺激と機械刺激の協働作用が BMSC の増殖に及ぼす効果を検討した。具体的には 96 穴培養プレートに BMSC を播種し、10%FCS を含む通常培地に各アゴニストを添加して、細胞数の推移を calcein-AM 染色あるいは MTT アッセイ法により解析した。その結果、無添加く受容体刺激のみく受容体刺激+機械刺激の順に増殖効率が高いことがわかった。増殖促進効果を示す受容体アゴニストの濃度と機械刺激の強度には一定の範囲が存在することもわかった。この増殖は TRPC6 特異的阻害薬により抑制された。これらの結果から、TRPC6 チャンネルの受容体刺激と機械刺激の協働作用により増殖促進効果が得られることが明らかとなった。

さらに、これらの刺激を受けて増殖した BMSC の品質検討を、癌化および正常分化能(骨芽細胞あるいは脂肪細胞への分化)に着目して行った。通常培養した細胞と同様、癌細胞マーカーによる染色結果はネガティブであり、骨芽細胞および脂肪細胞への分化誘導は正常に成功した。

以上の結果から、TRPC6 チャンネルの受容体刺激と機械刺激の協働作用によって BMSC の増殖効率が促進され、且つ再生医療応用に不可欠な安全性と品質を保持していることが明らかになった。TRPC6 の受容体刺激・機械刺激協働作用を利用すれば、安全で効率の良い BMSC の培養法が確立できると期待できる。

(4) BMSC の TRPC6 を介した機械刺激応答と細胞内分子の関連

①細胞骨格

TRPC6 の N 端には細胞骨格との相互作用に重要とされるアンキリン様リピート配列がある。我々は既に HEK 発現系を用いて、TRPC6 とアクチン蛋白の相互作用が機械刺激時に強化されること、細胞骨格構造の破壊により受容体刺激・機械刺激協働作用時の増幅を含む TRPC6 チャンネル応答が減弱することを明らかにしている[5]。BMSC にサイトカラシンDを添加しストレスファイバー構造を断片化させた状態で検討したところ、TRPC6 チャンネル応答が減衰し増殖停止が観察された。これらの結果から、TRPC6 チャンネルの機械刺激応答と増殖(細胞周期進行)にはアクチン骨格の維持が必要であることが明らかになった。

②β-catenin

BMSC の増殖・分化と関連が深い β-catenin の核移行について、抗体を用いた免疫染色観察により検討した。その結果、受容体刺激と機械刺激の協働条件下で β-catenin の核移行が最も高頻度で観察される傾向にあることがわかった。この現象は siRNA 実験による TRPC6 の発現抑制、あるいは TRPC6 特異的阻害薬により抑制された。上流のシグナル伝達経路に対する影響については現在解析中である。今後も BMSC における TRPC6 を介した機械刺激受容機構と細胞周期制御との関連について、シグナル伝達経路を含めた統合的解析を進める必要がある。

【引用文献】

1. Riddle RC. *et al.*, **J. Bone Miner. Res.**, 22 (4):589-600, 2007, doi: 10.1359/jbmr.070113
2. Engler AJ. *et al.*, **Cell**, 126 (4):677-689, 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.06.044
3. Inoue R. *et al.*, **Circ. Res.**, 104 (12):1399-1409, 2009, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.193227
4. Ichikawa J. *et al.*, **Br. J. Pharmacol.**, 171(23): 5280-5294, 2014, doi: 10.1111/bph.12840
5. Ichikawa J. *et al.*, **J.Physiol.Sci.** 64(Suppl.1): S174, 2014, doi: 10.1007/BF03405837

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Polat OK., Uno M., Maruyama T., Tran HN., Imamura K., Wong CF., Sakaguchi R., Ariyoshi M., Itsuki K., Ichikawa J., Morii T., Shirakawa M., Inoue R., Asanuma K., Reiser J., Tochio H., Mori Y., Mori MX.	4. 巻 30
2. 論文標題 Contribution of coiled-coil assembly to Ca ²⁺ /calmodulin-dependent inactivation of TRPC6 channel and its impacts on FSGS-associated phenotypes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Am. Soc. Nephrol.	6. 最初と最後の頁 1587-1603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2018070756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takahashi K., Umebayashi C., Numata T., Honda A., Ichikawa J., Hu Y., Yamaura K., Inoue R.	4. 巻 6(14)
2. 論文標題 TRPM7-mediated spontaneous Ca ²⁺ entry regulates the proliferation and differentiation of human leukemia cell line K562.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiol. Rep.	6. 最初と最後の頁 e13796
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.13796	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 4件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 市川 純、中川 緑、井上隆司
2. 発表標題 腎系球体ポドサイトTRPC6チャネルの機械刺激感受性および濾過障壁機能に対するcGMPの効果.
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 市川 純、中川 緑、井上隆司
2. 発表標題 受容体・機械共刺激による腎系球体ポドサイトの濾過障壁機能強化に対するcGMPの効果.
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市川 純、中川 緑、井上隆司
2. 発表標題 腎系球体ポドサイトTRPC6チャネルの受容体・機械刺激の協働作用による濾過障壁機能の強化とcGMPの効果.
3. 学会等名 第149回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市川 純、中川 緑、井上隆司
2. 発表標題 機械刺激応答チャネルTRPC6による腎系球体濾過機構制御と機能破綻の関連.
3. 学会等名 第15回栃木県栄養改善学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市川 純、中川 緑、井上隆司
2. 発表標題 FSGSの原因となる腎系球体ポドサイトTRPC6チャネルN端変異は受容体・機械刺激応答およびタンパク濾過障壁機能に影響を及ぼす.
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市川 純、中川 緑、井上隆司
2. 発表標題 TRPC6チャネルのFSGS変異が腎系球体ポドサイトのタンパク濾過障害に及ぼす影響.
3. 学会等名 第251回生理学東京談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市川 純、中川 緑、井上隆司
2. 発表標題 TRPC6チャネルのFSGS変異が腎系球体ポドサイトのタンパク濾過機能に及ぼす影響.
3. 学会等名 第20回氷川フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市川 純、中川 緑、井上隆司
2. 発表標題 受容体・機械刺激によるTRPC6活性化が腎系球体ポドサイトの濾過障壁機能に及ぼす影響.
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市川 純、中川 緑、井上隆司
2. 発表標題 受容体・機械刺激によるTRPC6の同時刺激が腎系球体ポドサイトの濾過障壁機能を増強する.
3. 学会等名 第99回日本生理学会年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市川純、井上隆司
2. 発表標題 骨髄間質細胞における細胞周期進行へのTRPC6機械刺激感受性の関与
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Ichikawa, Ryuji Inoue
2. 発表標題 Analysis of electrically-modulated molecules that enhance bone marrow stromal cell proliferation.
3. 学会等名 9th FAOPS (Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies) Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuji Inoue, Yaopeng Hu, Yanghua Shen, Keizo Hiraishi, Lin Hai-Kurahara, Jun Ichikawa, Tomohiro Numata, Xin Zhu
2. 発表標題 A multi-hierarchical study on the arrhythmogenicity of a Ca-activated cation channel TRPM4.
3. 学会等名 9th FAOPS (Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies) Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市川 純、中川 緑、井上隆司
2. 発表標題 腎スリット膜メカノセンサー-podocinは受容体刺激で活性化されたTRPC6チャネルの機械刺激応答の増強を制御する.
3. 学会等名 第92回日本薬理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuji Inoue, Yaopeng Hu, Lin-Hai Kurahara, Jun Ichikawa, Tomohiro Numata, Yanghua Sheng, Wenfeng Sheng, Xin Zhu.
2. 発表標題 An integrative approach to investigating remodeling-associated arrhythmias: Computer simulation based on the gating analysis of TRPM4 channel.
3. 学会等名 16th Nanjing Course on Cardiac Revascularization & ACS Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryuji Inoue, Yaopeng Hu, Lin-Hai Kurahara, Jun Ichikawa, Tomohiro Numata, Yanghua Sheng, Xin Zhu.
2. 発表標題 A theoretical approach to investigating the arrhythmogenicity of TRPM4 channel.
3. 学会等名 NCCR TransCure Lecture (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 井上隆司、市川 純、崔 媛媛	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 7
3. 書名 TRPCサブファミリーの分子構造と活性化・制御機序の新知見：医学のあゆみ 270巻10号、特集「TRPチャネルのすべて」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

ResearchMap(市川 純) https://researchmap.jp/read0144341/
--

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
研究協力者	井上 隆司 (Inoue Ryuji) (30232573)	福岡大学・医学部生理学教室・研究特任教授 (37111)	

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