

機関番号：33902
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008 年 ~ 2010 年
 課題番号：20590263
 研究課題名 (和文) 転写調節・エピジェネティック修飾による脈管系カチオンチャネル発現制御機構の解明
 研究課題名 (英文) Regulation of expression of vascular cation channels by transcriptional and epigenetical modulation
 研究代表者 村木 克彦
 (MURAKI KATSUHIKO)
 愛知学院大学・薬学部・教授
 研究者番号：20254310

研究成果の概要 (和文)：

転写やエピジェネティクス制御によるイオンチャネルの発現変化は、疾病の進展・進展に関与する。そこでヒト滑膜細胞 (SC) における $\alpha 7$ 型アセチルコリン受容体チャネル ($\alpha 7$) の発現制御について検討した。リウマチ患者および非患者由来 SC (NRSC) で、 $\alpha 7$ の mRNA 発現を比較すると、その発現は NRSC で低く、そのプロモーターはメチル化されていた。またメチル化の阻害は NRSC で $\alpha 7$ の発現を上昇させた。 $\alpha 7$ プロモーターの非メチル化がリウマチ症の進展に関与する可能性が高い。

研究成果の概要 (英文)：

Change of ion channel expression by transcriptional and epigenetical modulation plays a pivotal role in development of human diseases. We thus investigated regulation of expression of a non-selective cation channel, nicotinic ACh receptor $\alpha 7$ (nAChRa7) in human synovial fibroblasts (HSFs). Analysis of expression of nAChRa7 mRNA transcripts between HSFs with or without rheumatoid arthritis (RA) revealed that nAChRa7 was lower in normal HSFs. Promoter of nAChRa7 gene was methylated only in normal HSFs. The expression of nAChRa7 mRNA transcripts was increased when the methylation was inhibited by treatment of normal HSFs with 5-aza-CdR. In HSFs with RA, expression of nAChRa7 is increased due to inhibition of methylation of nAChRa7 gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：薬効解析学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学

キーワード：カチオンチャネル、エピジェネティクス、転写

1. 研究開始当初の背景

イオンの透過性を制御するイオンチャネ

ルタンパク質は、電気信号の発生や伝導、イ

オン輸送制御に中心的な役割を演じ、生体の恒常性維持に深く関与する。そのためイオンチャネルの不全は、不整脈や高血圧、てんかんなどの疾患の発症や進展に関与することが明らかになっている。また最近では、疼痛の発生、細胞増殖制御や免疫機構の一部にもイオンチャネルの関与が示唆され、イオンチャネルの機能解析や発現解析が精力的に行われてきた。とくにカルシウム (Ca^{2+}) を透過させるカチオンチャネルは、 Ca^{2+} が極めて重要な細胞内情報分子のひとつであることから、国内外で解析が進められ、transient receptor potential (TRP) 遺伝子はその分子実体となることも明らかになりつつある。最近、こうしたイオンチャネルについて、電気生理学的性質は不変であるが、その発現が大きく変化することで細胞の情報伝達系が変化し、細胞の性質が変わることが明らかになってきた。とくに細胞内 Ca^{2+} 濃度を変化させ、細胞情報伝達系に影響を与えるカチオンチャネルの発現変化と細胞機能の連関が注目され、一部の疾患や疾病の発症や進展に関与する可能性が指摘されている。たとえば、血管平滑筋の形質変化により、種々のイオンチャネルの発現が変化することが報告されており、この発現変化が血管肥厚時の細胞増殖に関与する可能性が指摘されている。また血管内皮のカチオンチャネルの異常が癌転移の際の血管新生に一部関与する可能性もある。しかし、カチオンチャネルをはじめイオンチャネルの発現制御メカニズムの詳細はほとんど明らかになっていない。一部のイオンチャネルについては、国内外においてその転写を制御する転写因子が明らかになっているが、イオンチャネル遺伝子プロモーターにおける転写因子の結合部位や他の転写調節因子との相互作用など、遺伝子レベルでの転写調節の解析はほとんど行われていない。

い。さらにイオンチャネルのゲノム DNA のメチル化状態の詳細情報やヒストンのメチル化、アセチル化によるイオンチャネル遺伝子の発現調節など、イオンチャネル遺伝子のエピジェネティック修飾については解析が手つかずの状態である。

2. 研究の目的

本研究では、血管平滑筋や内皮に発現するカチオンチャネルの転写調節やエピジェネティック修飾について明らかにし、その発現調節機構を基に、血管肥厚抑制薬や血管新生制御薬などの開発に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

細胞培養：Cell Applications より入手したリウマチ患者由来滑膜細胞及び正常滑膜細胞は、滑膜細胞増殖培地にペニシリン G、ストレプトマイシン及び 10%非働化 FBS を加えて、5% CO_2 存在下 37°C で培養した。

RNA 抽出と逆転写酵素反応：AGPC 法により total RNA を抽出し、標準のプロトコールにより逆転写反応を行った。

定量的 PCR 法：定量的 PCR 法は SYBR Green を用いたインターカレーター法により検討した。 β -actin を内部標準として使用し、各遺伝子の発現を相対値で表した。使用したヒト $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体プライマー配列は (5' -CCTGGCACATCCGTACCA-

3' , 5' -CTTCCAGGCAGTGGGCTAA-

3' , β -actin(5' -TGGCACCCAGCACAATGAA-

3' , 5' -CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA- 3')。

DNA のメチル化解析：細胞から染色体 DNA を抽出し、標準のプロトコールに従ってバイサルファイト処理を行った。メチル化配列特異的プライマーにより $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体プロモーターの DNA メチル化を解析した。プライマーの配列は (5' -GTGTTCCGGAGCGTATTTAGC- 3' , 5' -TCTCCACGTAACGAACCC- 3')。

4. 研究成果

リウマチ患者由来滑膜細胞および正常滑膜細胞細胞において $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体の mRNA 発現を比較したところ、リウマチ患者由来滑膜細胞において、 $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体が 20 倍以上高発現していた。

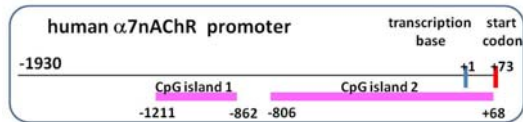


図 1. $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体(ヒト)のプロモーターにおける CpG island (ピンク). ヒト $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体のプロモーターにはメチル化修飾をうけやすい CpG island が 2 カ所存在する。

図 1 に示すように、 $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体のプロモーターには、エピジェネティクス制御のひとつであるメチル化修飾が起きやすい CpG island 部位が存在する。そこで $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体のプロモーター部位のメチル化について検討した。リウマチ患者由来滑膜細胞および正常滑膜細胞細胞からゲノム遺伝子を取得し、バイサルファイト法により $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体のプロモーター部位のメチル化を解析した。その結果、図 2 に示すように、正常滑膜細胞のみ $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体のプロモーターがメチル化されていることが明らかとなった。

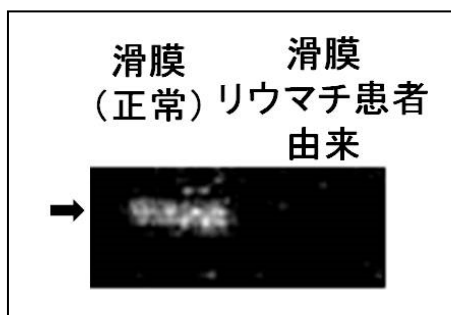


図 2. $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容

体のプロモーター部位のメチル化. 滑膜細胞 (正常およびリウマチ患者由来) における $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体のメチル化をバイサルファイト法で検討した. 矢印はメチル化された遺伝子の存在を示すバンド.

次に薬理的試薬を用いて、滑膜細胞遺伝子のメチル化と $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体の発現変化を検討した。図 3 では、図 2 で確認された $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体プロモーターのメチル化が受容体遺伝子の発現を変化させるか否か、正常滑膜細胞をメチル化阻害剤の 5-aza-CdR (2.5 μ M) で 24 時間処理して、遺伝子発現解析実験を行った。またエピジェネティクス機構の一つであるヒストンのアセチル化の関与についても、ヒストンの脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 (TSA (200nM)) を用いて $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体の発現変化を検討した。図 3 に示すように、正常滑膜細胞プロモーターのメチル化を阻害すると、 $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体の遺伝子発現が約 2 倍に増加した。しかし HDAC を阻害しても $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体遺伝子の発現は変化しなかった。さらに $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体遺伝子の発現上昇に対するメチル化阻害薬の効果は、HDAC を阻害しても変化しなかった (図 3, ++).

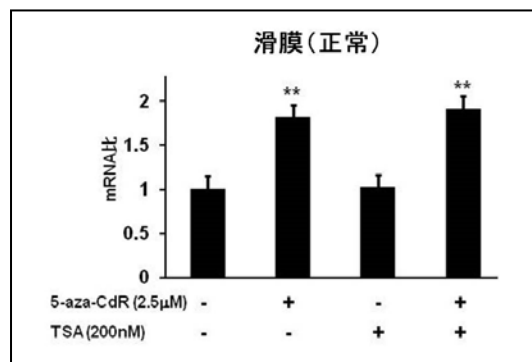


図 3. $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体発現に対するメチル化阻害剤 (5-aza-CdR) および脱アセチル化阻害剤 (TSA) の効果. 滑膜細胞 (正常) を 24 時間 5-aza-CdR あるいは

は TSA で処理し、 $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体発現を定量的 PCR 法で比較した。未処理の受容体発現量 (--) を 1 として表した。

遺伝子の化学修飾がタンパク質発現を変えることで様々な疾病の発症につながる可能性が指摘されている。これらの遺伝子では、今回検討した Ca 透過性のイオンチャネル遺伝子と同じく (図 1)、プロモーター領域に化学修飾の標的となる CpG island をもつものが多い。一般に、この CpG island がメチル化されると、遺伝子の転写活性が減少すると考えられている。今回、リウマチ患者由来滑膜細胞において $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体が高発現していることが明らかとなった (論文準備中)。また $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体にはメチル化の標的となる CpG island が存在し、このため正常滑膜細胞において $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体遺伝子のプロモーターがメチル化されていると予測したが、事実、正常滑膜細胞でのみプロモーター部位のメチル化が観察された (図 2)。さらにメチル化の阻害は正常滑膜細胞の $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体の遺伝子発現を増加させた。これらのことから、正常滑膜細胞では、 $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体遺伝子の転写がプロモーター部位のメチル化により抑制されていると考えられる。

$\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体はおもに 5 量体モノマーでイオンチャネルを形成し、滑膜細胞では炎症反応に関与することが報告されている。今後、滑膜細胞における $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体量が転写だけでなく、mRNA の安定性や受容体の分解などでも制御されている可能性を検討する必要がある。

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 10 件)

- ① Y Majeed, M Amer, A Agarwal, L McKeown, K Porter, D O'Regan, J Naylor, C Fishwick, K Muraki, D Beech, Stereo-selective inhibition of TRPC5 channels by neuroactive steroids. *B. J. Pharmacol.*, 162, 1509-1520 (2011)、査読有
- ② J Naylor, E Shawaf, P Manna, L McKeown, P Manna, K. Porter, D O'Regan, K Muraki, D Beech, TRPC5 channel sensitivities to antioxidants and hydroxylated stilbens. *J. Biol. Chem.*, 286, 5078-5086 (2011)、査読有
- ③ K Funahashi, S Ohya, H Yamamura, N Hatano, K Muraki, WR Giles, Y Imaizumi. Accelerated Ca^{2+} entry by membrane hyperpolarization due to Ca^{2+} -activated K^{+} channel activation in response to histamine in chondrocytes. *Am. J. Physiol., Cell-Physiol.* 298, C786-C797 (2010)、査読有
- ④ Y Majeed, A Agarwa, J Naylor, V Seymour, S Jiang, K Muraki, C Fishwick, D Beech. Cis-isomerism and other chemical requirements of steroidal agonists and partial agonists acting at TRPM3 channels. *B. J. Pharmacol.*, 161, 430-441 (2010)、査読有
- ⑤ 伊藤友香、波多野紀行、村木克彦、Ca 透過性カチオンチャネル遺伝子発現のエピジェネティクス制御と降圧薬感受性への影響. *臨床薬理の進歩* 31, 40-51 (2010)、査読無
- ⑥ Y Itoh, N Hatano, H Hayashi, K Onozaki, K Miyazawa, K Muraki. An environmental sensor, TRPV4 is a novel regulator of intracellular Ca^{2+} in human synoviocytes. *Am. J. Physiol., Cell-Physiol.*, 297, C1082-C1090 (2009)、査読有

⑦ N Hatano, Y Itoh, K Muraki. Cardiac fibroblasts have functional TRPV4 activated by 4 α -phorbol 12,13-didecanoate. Life Sci., 85, 808-814 (2009) 、査読有

⑧ R Tanaka, K Muraki, S Ohya, Y Itoh, N Hatano, Y Imaizumi. Cell-culture dependent change of Ca response of rat aortic myocytes to sphingosine-1-phosphate. J Pharmacol Sci., 107, 434-442 (2008) 、査読有

⑨ R Tanaka, K Muraki, S Ohya, H Yamamura, N Hatano, Y Itoh, Y Imaizumi. TRPV4-like non-selective cation currents in cultured aortic myocytes. J Pharmacol Sci., 108, 179-189 (2008) 、査読有

⑩ Y Itoh, N Hatano, K Muraki. Regulation of vascular tone by purinoceptor-activation in vascular smooth muscle and endothelial cells. Aichi-Gakuin J. Pharmaceut. Sci., 1, 31-37 (2008) 、査読有
〔学会発表〕(計 9 件)

① 波多野紀行, 伊藤友香, 村木克彦: ヒト脳毛細血管内皮細胞におけるカルシウム活性化クロライドチャネルの役割. 平成 21 年度日本薬学会東海支部例会. 2009 年 11 月 23 日 (四日市) ; D-29.

② 伊藤友香, 波多野紀行, 林 秀敏, 小野寄菊夫, 村木克彦: 滑膜細胞における浸透圧センサー-TRPV4 のケモカイン産生に及ぼす影響. フォーラム 2009 : 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2009 年 11 月 5 日 (沖縄) ; P039.

③ Noriyuki Hatano, Yuka Itoh, Katsuhiko Muraki: TRPV4 plays a regulatory role of intracellular Ca²⁺ in cultured cardiac fibroblasts. Satellite Symposium of the IUPS2009 "Post-genomic Advances in the Physiology of Smooth Muscle" 2009 年 7 月

23 日 (Nagoya) ; P-34.

④ Yuka Itoh, Noriyuki Hatano, Hidetoshi Hayashi, Kikuo Onozaki, Katsuhiko Muraki: A novel regulator of intracellular Ca²⁺ TRPV4 in human synoviocytes. Satellite Symposium of the IUPS2009 "Post-genomic Advances in the Physiology of Smooth Muscle" 2009 年 7 月 23 日 (Nagoya) ; P-31.

⑤ 伊藤友香, 波多野紀行, 鈴木賀央里, 武田良文, 林 秀敏, 小野寄菊夫, 廣田耕作, 村木克彦: 滑膜細胞における TRPV4 による細胞内カルシウム濃度変化と TRPV4 活性化薬である 4 α -phorbol 12, 13-didecanoate のサイトカイン産生への影響. 平成 21 年度日本薬学会東海支部総会・大会. 2009 年 7 月 11 日 (名古屋) ; C-22.

⑥ 波多野紀行, 伊藤友香, 村木克彦: ヒト脳毛細血管内皮細胞における TRPV4 発現機能調節機構の解析. 平成 21 年度日本薬学会東海支部総会・大会. 2009 年 7 月 11 日 (名古屋) ; B-21.

⑦ 伊藤友香, 鈴木翔太, 波多野紀行, 林 秀敏, 小野寄菊夫, 村木克彦: ヒト関節リウマチ滑膜細胞株におけるアセチルコリン受容体の発現とその機能解析. 平成 21 年度日本薬学会東海支部総会・大会. 2009 年 7 月 11 日 (名古屋) ; B-18.

⑧ 伊藤友香, 波多野紀行, 林 秀敏, 小野寄菊夫, 村木克彦: スフィンゴシルホスホリルコリンによる関節リウマチ滑膜細胞死の制御. 日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 27 日 (京都) ; 27P-pm064.

⑨ 波多野紀, 伊藤友香, 村木克彦: ラット心線維芽細胞における TRP channel を介した Ca²⁺ 流入. 日本薬学会東海支部総会・大会. 2008 年 7 月 5 日 (名古屋) ; D-7.

〔その他〕
ホームページ等

http://www.phar.agu.ac.jp/laboratory/chemical_pharmacology/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村木克彦 (MURAKI KATSUHIKO)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：20254310

(2) 研究分担者

波多野紀行 (HATANO NORIYUKI)

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：50454319

伊藤友香 (ITOH YUKA)

名古屋市立大学大学院・薬学研究科・助教

研究者番号：40454326