

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07599

研究課題名（和文）がん細胞における機械刺激感受性PIEZOチャネルの機能および病態生理学意義の解明

研究課題名（英文）Mechanosensitive PIEZO channel functions in cancer cells and their pathophysiological significance

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

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）：3年間の研究成果で、Piezo1に関する解析は順調に進めることができた。とくにPiezo1の詳細な3次元構造データが公表され、種差を基にしたPiezo1タンパク中の重要なアミノ酸の同定が可能になったことは大きい。このデータと本成果から、gPiezo1の構造中に伸展刺激を増幅する可能性のある構造ドメインを見出した（ICMSで発表）。一方、Piezo2のクローニングに関しては、まだ成功しておらず、今後も作業を継続する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Piezo1の詳細な3次元構造データが公表され、種差を基にしたPiezo1タンパク中の重要なアミノ酸の同定が可能になった。この構造データと本成果から、gPiezo1の構造中に伸展刺激を増幅する可能性のある構造ドメインを見出した（ICMSで発表）。この領域ががん性疼痛の受容機構に関係するか検討することは、臨床的にも大きな意義があると考えている。

研究成果の概要（英文）：Over the course of three years, significant progress has been made in the analysis of Piezo1. Particularly noteworthy is the publication of detailed three-dimensional structural data for Piezo1, enabling the identification of crucial amino acids within the protein based on species variations. This finding holds great significance. Based on this data and the obtained results, a structural domain potentially capable of amplifying tensile stimuli within the structure of gPiezo1 has been discovered and presented at the ICMS conference. On the other hand, the cloning of Piezo2 has not yet been successful, and further efforts are planned to continue this work.

研究分野：イオンチャネル分子薬理学

キーワード：Piezo 伸展刺激 種差 分子構造 がん

様式 C-19、 F-19-1、 Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 最近、機械刺激の受容に関わる有力なタンパク質分子として、PIEZO チャンネルが同定され、その機能や病態時の役割が解明されつつある。しかし PIEZO チャンネルの機能解析は未だ不十分であり、また病態との関わりもほとんど明らかになっていない。さらに選択的な PIEZO チャンネル遮断薬も報告されていない。

(2) 我々は9種類のヒトがん細胞において、*PIEZO1* 遺伝子が高発現していることを発見した。また PIEZO1 活性化薬の Yoda1 をヒトがん細胞に投与すると、PIEZO1 を介した細胞内 Ca 濃度の上昇が引き起こされ、がん細胞で PIEZO1 が機能していることを報告した。さらに PIEZO1 が核膜に発現しやすく、その発現が機械刺激で変化することも見出している。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ヒトがん細胞における PIEZO1 および PIEZO2 の機能解析、とくに機械刺激とがん細胞の遊走や細胞増殖、細胞死との関係を明らかにすることを目的とする。

(2) また PIEZO チャンネルの細胞内局在とがんの病態との関係も明らかにする。

(3) さらに PIEZO1 および PIEZO2 が高発現するヒトがん細胞を用いて、有効なチャンネル活性化薬や拮抗薬の探索も目的とした。

3. 研究の方法

(1) 電気生理学的手法を用いて、ヒト骨肉腫細胞(MG63)およびヒト肺がん細胞(A549)における Piezo チャンネルの性質を、ヒト腎由来細胞(HEK 細胞)に強制発現したヒト Piezo1 チャンネル(hPiezo1)と比較した。なお実験においては、Piezo チャンネル由来の電気信号観察下、細胞膜を直接伸展負荷する装置(電磁弁調節型リニア陽圧ポンプ)を自作し、がん細胞発現 Piezo チャンネルの圧力感受性や薬物応答性(Piezo1 活性化薬 Yoda1、伸展活性化チャンネル阻害薬ガドリニウム)を詳細に検討した。

(2) トリ Piezo1(gPiezo1)チャンネルをクローニングして、その遺伝子ベクターをヒト腎由来細胞(HEK 細胞)に強制発現させた。電気生理学的手法を用いて、gPiezo1 チャンネルの性質を hPiezo1 チャンネルと詳細に比較した。

(3) hPiezo1 チャンネルの分子構造データをもとに gPiezo1 ホモロジーモデルを構築し、その両者を比較して、構造的特徴を検討した。さらに細胞伸展負荷装置(ShellpaPro、メニコン社)を導入し、細胞伸展負荷前後の遺伝子変化、タンパク質変化、機能変化を検討した。

4. 研究成果

(1) A549 細胞に発現した Piezo1 チャンネルは hPiezo1 ときわめて類似した性質を持つこと、一方、MG63 細胞に発現した Piezo1 チャンネルは hPiezo1 と類似した圧力感受性を示すものの、薬物応答性が明らかに異なることを見出した。またこれまでに検討したがん細胞と異なり、MG63 細胞には Piezo2 チャンネルが高発現していること、またこの Piezo2 チャンネルは圧力感受性が低いことも発見した。さらに圧力感受性が報告され、がん細胞でも広く発現が報告されている TRPV4 チャンネルの圧力感受性を検討したところ、TRPV4 チャンネルは細胞膜の伸展負荷刺激でほとんど活性化されないこと、伸展負荷で活性化された Piezo1 チャンネルは TRPV4 チャンネル活性化で、抑制されることを見出した。

(2) 2 年がかりで進めていた gPiezo1 のクローニングに成功し、gPiezo1 を強制発現させた HEK を用いて、その薬理的・電気生理学的特性を詳細に解析した。その結果、gPiezo1 は hPiezo1 と比較し、細胞膜発現の効率が数十倍高いこと、hPiezo1 活性化薬の Yoda1 の感受性も数倍高いこと、アミノ酸の相同性が 60-70% であった gPiezo1 も hPiezo1 と同様、圧力感受性を示すが、その不活化特性が弱いこと、などが明らかとなった(村木、Ion Channel Modulation Symposium2022 (ICMS2022) で招待講演、2022 年 6 月、英国、ケンブリッジ)。

さらに細胞伸展負荷装置を導入し、がん細胞 Piezo チャンネルの活性化が細胞機能に及ぼす影響(具体的には、遺伝子レベル、タンパクレベル、機能レベルなど) を詳細に検討した。その結果の一部として、Yoda1 による Piezo1 の活性化と細胞伸展負荷による Piezo1 活性化は、その下流シグナルが異なることを見出した。

(3) Piezo1 の詳細な 3 次元構造データが公表され、種差を基にした Piezo1 タンパク中の重要なアミノ酸の同定が可能になった。このデータと本成果から、gPiezo1 の構造中に伸展刺激を増幅する可能性のある構造ドメインを見出した (ICMS で発表)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 M Matsubara, Y Muraki, N Hatano, H Suzuki, K Muraki	4. 巻 23
2. 論文標題 Potent Activation of Human but Not Mouse TRPA1 by JT010.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 1429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 E M Sasso, K Muraki, N Eaton-Fitch P Smith, O L Lesslar, G Deed, S Marshall-Gradisnik.	4. 巻 28
2. 論文標題 Transient receptor potential melastatin 3 dysfunction in post COVID-19 condition and myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Med	6. 最初と最後の頁 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 N Eaton-Fitch, S D Preez, H Cabanas, K Muraki, D Staines, S Marshall-Gradisnik.	4. 巻 20
2. 論文標題 Impaired TRPM3-dependent calcium influx and restoration using Naltrexone in natural killer cells of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome patients.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Trans Med	6. 最初と最後の頁 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 S Luostarinen, M Hamalainen, N Hatano, K Muraki, E Moilanen	4. 巻 70
2. 論文標題 The Inflammatory Regulation of TRPA1 Expression in Human A549 Lung Epithelial Cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pulm Pharmacol Ther.	6. 最初と最後の頁 102059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

1. 著者名 H Cabanas, K Muraki, N Eaton-Fitch, D Staines, S Marshall-Gradisnik.	4. 巻 12
2. 論文標題 Potential therapeutic benefit of Low Dose Naltrexone in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: Role of Transient Receptor Potential Melastatin 3 ion channels in pathophysiology and treatment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunol.	6. 最初と最後の頁 687806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 N Hatano, M Matsubara, H Suzuki, Y Muraki, K Muraki.	4. 巻 22
2. 論文標題 HIF-1 dependent upregulation of ZIP8, ZIP14, and TRPA1 modify intracellular Zn ²⁺ accumulation in inflammatory synoviocytes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 6349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 K Muraki
2. 発表標題 Comparison of TRPA1 and PIEZO1 channel functions among species.
3. 学会等名 Ion Channel Modulation Symposium2022 (ICMS2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K Muraki
2. 発表標題 うつ病・不安症に対する扁桃体の関与とその神経基盤-TRPC1/4/5サブファミリーの生理機能と精神疾患への関与.
3. 学会等名 第14回日本不安症学会学術大会 ランチョンセミナー2 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K Muraki
2. 発表標題 PIEZO Channels as a sensor for mechanical stress.
3. 学会等名 CFS/ME International 2021: RID - Research Innovation and Discovery Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 村木克彦, 今泉祐治	4. 発行年 2020年
2. 出版社 別冊・医学のあゆみ	5. 総ページ数 158
3. 書名 TRPC1 / 4 / 5チャンネルの生理機能および疾病との関連と標的創薬 特異的な活性化薬・抑制薬の発見による研究展開	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	鈴木 裕可 (SUZUKI HIROKA) (00581026)	愛知学院大学・薬学部・講師 (33902)	
研究分担者	波多野 紀行 (HATANO NORIYUKI) (50454319)	愛知学院大学・薬学部・講師 (33902)	

	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	村木 由起子 (MURAKI YUKIKO)		

6. 研究組織（つづき）

	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	松原 匡希 (MATSUBARA MASAKI)		

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