

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09876

研究課題名（和文）臨床ゲノム研究に基づく非興奮性細胞における電位依存性カルシウムチャネル機能の解明

研究課題名（英文）Elucidation of voltage-gated calcium channel function in nonexcitatory cells based on clinical genomic studies

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：CACNA1Cのp.A36Vが日本人の超まれな一塩基変異体である可能性が示唆された。電位依存性Ca²⁺チャネルの補助サブユニット（ α_2 と β_2 サブユニット）を恒常的に発現したBHK細胞にコントロール又は本変異を導入したCACNA1Cを遺伝子導入した。3日後にBHK細胞にパッチクランプ法ホールセル法を適用し、膜電位固定下に膜電流を記録した。本変異によりCa²⁺依存性不活性化が減少し、変異チャネルを介した過剰なCa²⁺流入をもたらされた。これらの結果から、CACNA1Cにおけるこの新規一塩基変異体は、Ca²⁺恒常性に影響を与えることにより統合失調症の素因となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はヒトの疾患の原因を臨床ゲノム研究から見出し、原因タンパク質を発現していない細胞に遺伝子を導入し、蛋白の機能解析を行った研究である。具体的には電位依存性L型カルシウムチャネルCACNA1CのA36Vが日本人の超まれな変異であり、統合失調症の一塩基変異である可能性が示唆された。BHK細胞にコントロール又は本変異CACNA1Cを遺伝子導入し、パッチクランプ法を用いて電位依存性L型カルシウムチャネルの機能解析を行った。電流のカルシウム依存性不活性化が抑制されカルシウム流入量が増加するgain-of-functionの変異であることが判明した。本成果は病態の解明と治療法の開発にヒントを与える。

研究成果の概要（英文）：The mutation of p.A36V in CACNA1C may be an ultra-rare single-nucleotide variant in Japan individuals. CACNA1C with control or this mutation was transfected into BHK cells that constantly expressed the auxiliary subunits (α_2 and β_2 subunits) of voltage-gated Ca²⁺ channels. After 3 days, the whole-cell mode of the patch-clamp technique was applied to BHK cells, and the membrane current was recorded under the voltage-clamp condition. This mutation reduced Ca²⁺-dependent inactivation and resulted in excessive Ca²⁺ influx via mutation channels. These results suggest that this novel single-nucleotide variant in CACNA1C may contribute to the risk of schizophrenia by affecting Ca²⁺ homeostasis.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：電位依存性 カルシウム チャネル パッチクランプ法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

電位依存性 Ca^{2+} チャネルは筋肉や神経などの興奮性組織で細胞膜の興奮性の制御などに重要な役割を担っているが、非興奮性細胞における電位依存性 Ca^{2+} チャネルの生理機能は不明である。しかし、自閉症を呈する Timothy 症候群は電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの変異 (G406R) が原因で、エナメル質減形成や上顎骨劣成長、合指症などを呈することから (Cell 119, 19-31, 2004)、非興奮性組織でも電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルが重要な働きをしていることが示唆される。

2. 研究の目的

Timothy 症候群は電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの変異 (G406R) が原因と判明しているが、名古屋大学で新たに自閉症患者から見出された稀な L 型 Ca^{2+} チャネルの変異の機能解析を行う。また、背景に記載のように興奮性細胞に発現し、膜の脱分極で活性化する電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルが非興奮性細胞で重要な働きをしていることが報告されているが、「非興奮性細胞の膜電位は変動するか？」はまだ不明である。本研究では硬組織における電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの生理機能を解明し、Timothy 症候群のエナメル質減形成機序を生理学的・生化学的・薬理的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

名古屋大学で新たに自閉症患者から見出された稀な L 型 Ca^{2+} チャネルの変異の機能解析は baby hamster kidney 細胞 (BHK 細胞) に電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの副サブユニット (α_2 と サブユニット) を恒常的に発現させ、更にその BHK 細胞に主サブユニットである野生型 α_1 サブユニット又は新たに見いだされた変異型 α_1 サブユニットを一過性に発現させてパッチクランプ法ホールセル法を用いて解析した。 α_1 サブユニットを発現している細胞は緑色蛍光タンパク質 GFP を共発現させることで見分けた。

非興奮性細胞の膜電位の計測実験は骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞にパッチクランプ法を適用し、 K^+ を含むピペット内液を用いて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した。

transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1)チャネルは human embryonic kidney 293 (HEK293)細胞に強制発現させ実験に用いた。

4. 研究成果

研究成果は大きく 6 つの部分に分けられる。

(1) 統合失調症と自閉症スペクトラム障害の患者の電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルをコードする遺伝子から見出された極めて稀な変異

統合失調症 (SCZ) および自閉症スペクトラム障害 (ASD) の患者を対象としたいくつかの大規模な全エクソームシーケンシング研究では、遺伝的危険因子として中程度または強い稀な変異が特定されている。細胞の Ca^{2+} 恒常性調節不全が SCZ/ASD の病態形成に関与している可能性があり、最近、電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル (VGCC) サブユニット $\text{Ca}_v1.1$ (CACNA1S)、 $\text{Ca}_v1.2$ (CACNA1C)、 $\text{Ca}_v1.3$ (CACNA1D)、および T 型 VGCC サブユニット $\text{Ca}_v3.3$ (CACNA1I) をコードする遺伝子が精神疾患のリスク遺伝子座として同定された。日本人 SCZ 患者 370 名、ASD 患者 192 名を対象に、これら 4 つの候補遺伝子 (CACNA1C、CACNA1D、CACNA1S、CACNA1I) のエクソン領域について、Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) を用いたスクリーニング研究を実施した。バリエーションフィルタリングを適用して、dbSNP データベースに登録されていない、またはデータベースからの東アジアサンプルでマイナー対立遺伝子頻度が 1%未満の生物学的に関連する変異を特定した。nonsense, frameshift, canonical splicing site single nucleotide variants (SNV)、およびインシリコ分析によって 5 つの異なる損傷が予測される non-synonymous SNVs などは潜在的に病気に繋がる変異である。これらの検出された変異の各々は、Sanger sequencing によって確認した。親のサンプルが利用可能な場合は、遺伝パターンを測定するために分離分析を用いた。我々のフィルターを使用して、1 つのナンセンス SNV (CACNA1D の p.C1451*)、1 つの de novo SNV (CACNA1C の p.A36V)、1 つのまれな短い欠失 (CACNA1D の p.E1675del)、および 14 の NSstrict SNV (5 つのインシリコ分析すべてによって損傷があると予測された非同義の SNV) を発見した。CACNA1C の p.A36V も CACNA1D の p.C1451* も、独立したサンプルセットでは、1871 人の SCZ 症例、380 人の ASD 症例、または 1916 人の健常対照で見出されておらず、これらの SNV が日本人集団の超稀な SNV である可能性が示唆されました。本研究で発見された p.A36V 変異を有する $\text{Ca}_v1.2$ のニューロンスプライシングアイソフォームは、 Ca^{2+} 依存性阻害の減少を示し、変異チャネルを介した過剰な Ca^{2+} 流入をもたらした。これらの結果から、CACNA1C におけるこの de novo SNV は、 Ca^{2+} 恒常性に影響を与えることにより SCZ の素因となる可能性が示唆された。従って、

私達の分析は、いくつかの超まれで潜在的に病気に繋がる遺伝子変異を特定することに成功し、VGCCをコードする遺伝子がSCZ / ASDのリスクに寄与する可能性があるという仮説を部分的に支持した。

(2) 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞における Zn^{2+} による過分極応答

亜鉛イオン (Zn^{2+}) は、骨の発達と成長に不可欠なミネラル元素である。骨芽細胞における Zn^{2+} の生理的役割を明らかにするために、骨芽細胞様株である MC3T3-E1 細胞にパッチクランプ法の全細胞モードとカルシウムおよび亜鉛イメージングを適用した。電流クランプモードで Zn^{2+} (1 mM) は膜を過分極させ、電圧クランプモードでは外向き K^+ 電流ウィ惹起し非選択的陽イオンチャンネル電流を遮断した。 Zn^{2+} による K^+ 電流の惹起には、細胞内外の Ca^{2+} が必要であった。 K^+ 電流は、中間コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (IK) チャンネルブロッカーと大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (BK) チャンネルブロッカーによってブロックされたが、低コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (SK) チャンネルブロッカーによってブロックされなかった。更に、細胞外 Ca^{2+} は、transient receptor potential melastatin type 7 (TRPM7) チャンネルを介して細胞に流入した。ホスホリパーゼ C (PLC) 阻害剤と非加水分解性 GDP アナログ (GDP- γ -S) は、それぞれ細胞内 Ca^{2+} および Zn^{2+} 誘導 K^+ 電流の増加を阻止した。細胞外 Zn^{2+} は、TRP チャンネルおよび/または Zrt-Irt 関連タンパク質 (ZIP) を介して細胞に流入した。ピペット溶液中の Zn^{2+} キレート剤である TPEN (10 μ M) は BK 電流を消失させたが IK 電流は消失させず、細胞内 Zn^{2+} は BK チャンネルを直接活性化するが、IK および SK チャンネルは活性化しないことを示唆した。 Zn^{2+} は細胞増殖を促進し、osteoprotegerin (OPG) mRNA 発現を増強した。興味深いことに、 Zn^{2+} のこれらの生物学的効果は、IK 阻害剤である TRAM-34 によって減少しました。これらの結果は、 Zn^{2+} が MC3T3-E1 細胞の 2 つの異なる経路を介して IK チャンネルと BK チャンネルを活性化できることを示唆している。 Zn^{2+} は細胞内の遊離 Ca^{2+} および遊離 Zn^{2+} 濃度を増加させ、MC3T3-E1 細胞を相乗的に過分極させる。そして、 Zn^{2+} は MC3T3-E1 細胞の増殖と分化を促進した。

(3) TRPV1 チャンネルの脱分極応答の活性化キネティクスに対するカプサイシンとプロトンの修飾様式の相違

transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) チャンネルは、脊髄後根神経節および三叉神経節の小型および中型サイズのニューロンにおいて transient receptor potential ankyrin type 1 (TRPA1) と共発現する非選択的陽イオンチャンネルである。TRPV1 は、カプサイシン、43 °C を超える熱刺激、機械的ストレス、およびプロトン (H^+) によって活性化される。TRPV1 チャンネルは、その膜貫通セグメント上に一定の間隔で正に荷電した残基を持たないが、膜電位の変化も TRPV1 チャンネルの状態に影響を与える。カプサイシンの存在下では、TRPV1 チャンネルの開閉確率と開閉動態の電位依存性が検討されているが、低 pH での特性は不明である。TRPV1 チャンネル活性化の電位依存性を理解するために、カプサイシンおよびプロトン依存性 TRPV1 チャンネル電流を異種発現系で記録した。カプサイシンまたはプロトンの存在下で脱分極矩形パルスによって誘発される外向きの電流は、時間に依存しない成分を持つ 2 次指数関数でフィットできた。これら 3 成分の振幅の電圧依存的な変化は変化の小さい曲線を示し、総電流に対するそれらの比の変化はカプサイシン存在下および低 pH 下で同様の傾向を示した。しかし、カプサイシン存在下での 2 つの時定数 (fast and slow time constants) は、低 pH 条件下で得られたものよりもそれぞれ 5 倍と 8 倍小さかった。これらの結果は、TRPV1 チャンネルが疼痛感覚のフィードフォワードサイクルをゆっくりと駆動し、カプサイシンとプロトンが電圧依存性の TRPV1 チャンネルゲーティングを異なる方法で変調することを示唆している。

(4) TRPV1 チャンネルに対するユーゲノールのモード選択的抑制効果

transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) チャンネルは、感覚神経のポリモーダル受容体であり、痛みの感覚に関与している。TRPV1 には、カプサイシン、有害な熱、およびプロトンの異なる刺激によって選択的に活性化されるが、少なくとも 3 つの異なる活性化モードがある。鎮痛効果のために多くのモード選択的 TRPV1 アンタゴニストが開発されているが、副作用のため製品化された薬品はない。オイゲノールは歯科治療の鎮痛剤として使用されているバニロイドであり、その TRPV1 活性化能が報告されている。しかし、3 つの異なるモードによって誘導される TRPV1 活性化に対するオイゲノールの拮抗作用のメカニズムに関する報告は少ない。今回の実験では human embryonic kidney 293 (HEK293) 細胞にマウス TRPV1 チャンネルを強制発現さ

せ、オイゲノールのカプサイシン活性化内向き電流に対する効果をパッチクランプ法を用いて詳細に検討した。オイゲノールはカプサイシン活性化内向き電流を用量依存的に阻害した。低 pH 条件下では、低濃度のオイゲノールはプロトン誘発 TRPV1 電流を増強しただけであった。高濃度のオイゲノールは最初はプロトン誘発 TRPV1 電流を増強したが、その後すぐにプロトン誘発 TRPV1 電流を遮断した。最後に、オイゲノールは、電気生理学および Fura-2 を用いた Ca²⁺イメージング実験において、熱活性化 TRPV1 に対して増強も遮断効果もなかった。我々の結果は、オイゲノールが TRPV1 のモード選択的アンタゴニストであり、重篤な副作用なしに TRPV1 を標的とする鎮痛薬のリード化合物となる可能性を示唆した。

(5) 唾液腺発達中の副交感神経神経伝達物質による筋上皮細胞分化

唾液腺(SG)、汗腺、乳腺などの腺組織は神経刺激が筋上皮細胞(MEC)を収縮させ線分泌が促進される。副交感神経からの放出されるアセチルコリン(ACh)はムスカリン受容体を介して腺房/導管細胞を収縮させることにより、漿液性唾液の分泌を引き起こす。副交感神経の生理学的刺激に応答するために、神経-筋上皮接合部を形成することによって唾液腺上皮細胞由来筋上皮細胞は、唾液腺の副交感神経系神経末端に隣接して誘導および配置されることが想定される。したがって、唾液分泌が副交感神経制御下で機能するためには、唾液腺上皮細胞の特定の領域をマッピングし、神経近傍の上皮を筋上皮細胞に分化させて、器官形成中に神経-筋上皮接合部を形成する必要がある。我々は、副交感神経近傍の上皮が筋上皮細胞への分化を誘導し、それによって神経伝達物質 ACh がムスカリン受容体を介して誘導されると仮定した。ex vivo 臓器培養系における qPCR およびホールマウント免疫組織化学的解析により、副交感神経近傍の唾液腺上皮細胞が ACh 作動薬であるカルバコール(CCh)によりコリン作動性受容体ムスカリン 1 (M1 受容体) を介して筋上皮細胞に分化誘導されることを明らかにした。更に、CCh は、ラット顎下腺上皮細胞における筋上皮細胞分化の誘導のための ERK および Akt シグナル伝達を活性化した。これらの知見は、筋上皮細胞の誘導と神経-筋上皮接合部の形成にムスカリン作用が必要であることを示している。本研究では、唾液腺を含む神経機能器官形成中に神経-筋上皮接合部を形成する組織構造の新しい概念を提案した。

(6) 機械刺激を受けた歯根膜細胞により産生・分泌された Wnt5a による三叉神経節細胞の神経突起の伸長

外部環境の変化を知覚するには、末梢感覚神経を健全に維持する必要がある。重力、歩行中の地面からの反発、咬合力などの毎日の生理学的機械的刺激は、神経の恒常性に直接的または間接的に影響を与える。直接的な軸索膜の伸張は、機械受容チャネル活性化を介して軸索伸長を増強するが、間接的なメカニズムはまだ解明されていない。この研究では、Wnt5a が機械的に刺激されたラット歯周靭帯(rPDL)細胞から放出されるメカニズムを解明した。qRT-PCR および ELISA により、rPDL 細胞への機械刺激が Ca²⁺依存的に Wnt5a 発現量および Wnt5a タンパク質を増強した。PI3K 阻害剤(LY294002)および MEK1/2 阻害剤(U0126)は、ウェスタンブロットング解析においてそれぞれ Akt/PKB および ERK1/2 のリン酸化を抑制し、その結果、Wnt5a 発現の増加を消失させた。同様に、focal adhesion kinase 阻害剤である PF573228 は、Akt および ERK1/2 のリン酸化および Wnt5a 発現を減少させた。伸展刺激を受けた PDL 細胞の培養培地は、PDL に投射する三叉神経節ニューロンにおける神経突起の伸長、発芽、および分岐を促進した。さらに、Wnt5a 活性を中和する抗 Wnt5a 抗体、AP7677a(抗 Ryk 抗体、Ryk 受容体活性を遮断する)、または strictinin (Ror1 阻害剤)による処理は、形態変化を抑制した。今回の研究により、Wnt5a が機械的刺激に反応して結合組織から放出され、末梢神経の成長を増強する間接的なメカニズムを明らかにした。今回の研究は、末梢結合組織が末梢神経恒常性を調節し、Wnt5a シグナル伝達が末梢神経障害の治療の標的となる可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahashi Kaori, Yoshida Takashi, Wakamori Minoru	4. 巻 556
2. 論文標題 Mode-selective inhibitory effects of eugenol on the mouse TRPV1 channel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 156 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.126	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 Kaori Takahashi, Kentaro Araki, Hideo Miyamoto, Rikimaru Shirakawa, Takashi Yoshida and Minoru Wakamori	4. 巻 12
2. 論文標題 Capsaicin and Proton Differently Modulate Activation Kinetics of Mouse Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Channel Induced by Depolarization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontier Pharmacology	6. 最初と最後の頁 672157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.672157	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 Shindo Yuki, Nakamura Hannah M., Nakai Junichi, Wakamori Minoru, Nakamura Takashi	4. 巻 416
2. 論文標題 A parasympathetic neurotransmitter induces myoepithelial cell differentiation during salivary gland development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 113137 ~ 113137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2022.113137	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 -
1. 著者名 Takahashi Kaori, Yoshida Takashi, Wakamori Minoru	4. 巻 323
2. 論文標題 Periodontal ligaments enhance neurite outgrowth in trigeminal ganglion neurons through Wnt5a production induced by mechanical stimulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C1704 ~ C1719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpcell.00302.2022	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 -

1. 著者名 Wang Chenyao, Horigane Shin-ichiro, Wakamori Minoru, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of ultra-rare disruptive variants in voltage-gated calcium channel-encoding genes in Japanese samples of schizophrenia and autism spectrum disorder	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-022-01851-y	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 藤村 菜奈、若森 実
2. 発表標題 抗うつ薬によるCRACチャネル電流の抑制
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 真藤 裕基, 若森実, 中井淳一, 中村 卓史
2. 発表標題 副交感神経から分泌されるアセチルコリン (ACh) が唾液腺の発生過程で筋上皮細胞の分化誘導と機能的器官配置を決定している
3. 学会等名 基礎歯科医学会 (徳島)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 かわり、吉田 卓史、中村 卓史、若森 実
2. 発表標題 機械刺激を受けた歯根膜細胞から産生されるWnt5aによる三叉神経細胞の分化作用の解明
3. 学会等名 日本薬理学会 第73回北部会 (札幌)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takashi Nakamura, Minoru Wakamori
2. 発表標題 Challenge for the Neurotransmitter-Guided Regeneration of Functional Salivary Glands
3. 学会等名 日本薬理学会 第96回年会 (横浜)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minoru Wakamori, Kaori Takahashi, Takashi Yoshida
2. 発表標題 Mechanical stimulus to periodontal ligaments regulates neurite outgrowth through Wnt5a production
3. 学会等名 日韓薬理学シンポジウム 日本薬理学会 第96回年会 (横浜) (招待講演) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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	中村 卓史 (Nakamura Takashi) (90585324)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	

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