

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号： 14301  
 研究種目： 若手研究(B)  
 研究期間： 2011 ~ 2012  
 課題番号： 23790294  
 研究課題名（和文） 脂質メディエーターによるアストロサイト機能制御における TRP チャネルの役割  
 研究課題名（英文） Research on the physiological roles of TRP channels in astrocyte activation induced by a lipid mediator  
  
 研究代表者 白川 久志  
 ( SHIRAKAWA HISASHI )  
 京都大学・大学院・薬学研究科・助教  
 研究者番号： 50402798

## 研究成果の概要（和文）：

脂質メディエーターの脳におけるシグナリング経路および生理学的・病態生理学的役割に関しては不明な点が多く残されている。そこで本研究では脳内で作用する脂質メディエーターのうち、スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) に着目し、アストロサイトに対する影響およびその意義について TRP チャネル研究の観点から解析を行った。その結果細胞外から適用した S1P はアストロサイトに対して TRPC チャネルを介した  $Ca^{2+}$  応答を惹起し、ケモカインである CXCL1 遊離を惹起することが明らかとなった。その生理的意義や細胞内メカニズムに関しては更なる解析を必要とする。

## 研究成果の概要（英文）：

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a biologically active lipid that has an important role in regulating the growth, survival and migration of a variety of cells; however their roles in the brain remain to be elucidated. Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) channels,  $Ca^{2+}$ -permeable nonselective cation channels, are expressed in astrocytes and involved in  $Ca^{2+}$  influx after G-coupled receptor stimulation. In the present study, we demonstrate that S1P-induced  $Ca^{2+}$  responses and resultant CXCL1 release can be attributed to TRPC-mediated extracellular  $Ca^{2+}$  entry in cultured astrocytes. Further investigations are required to identify the mechanisms of S1P-evoked astrocyte activation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医師薬学 基礎医学

科研費の分科・細目：薬理学一般

キーワード：脂質メディエーター、スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P)、アストロサイト、TRP チャネル、TRPC3、細胞内カルシウム動態、形態変化、CXCL1

## 1. 研究開始当初の背景

脂質メディエーターとしてはプロスタグランジンやロイコトリエン、内因性カンナビノイドなどの生理活性がよく知られているが、細胞膜を構成するセラミドの分解代謝物

スフィンゴシンから sphingosine kinase によって産生されるスフィンゴシン-1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate; S1P) もまた近年その生理活性に注目が集まりつつある。S1P の特異的な受容体には、S1P<sub>1-5</sub> の 5 つの

GPCR サブタイプが同定されている。S1P がこれら特異的な GPCR に結合することで、多様な細胞において、増殖や遊走・神経栄養因子やサイトカインの遊離など、様々な細胞応答が引き起こされることが報告されている。しかしながら、S1P や S1P 受容体は脳内に豊富にその存在が認められているものの、その生理活性については不明な点が多くのことされていた。また、アストロサイトに S1P 受容体が発現していることや、S1P が作用をおよぼすことも数報報告されていたものの、その細胞内シグナリングや生理的役割についてはほとんど明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

当研究室では以前、血液由来因子であるトロンビンのアストロサイトに適用することにより、アストロサイトが活性化することを見出し、そのメカニズムとして、Ca<sup>2+</sup>透過型カチオンチャンネルである TRPC チャンネルの一種 TRPC3 を介する Ca<sup>2+</sup>流入が重要な役割を果たしていることを報告していた。S1P は thrombin と同様に、アストロサイトにおいて GPCR を介した細胞内 Ca<sup>2+</sup>応答を惹起することが知られているが、過去に報告されている S1P 誘発アストロサイト機能変化と Ca<sup>2+</sup>シグナリングの関与についての詳細なメカニズムはこれまで明らかになっていなかった。そこで、本研究では S1P 適用により誘発されるアストロサイトの細胞機能変化における TRPC チャンネルを介した Ca<sup>2+</sup>シグナリングのメカニズムおよびその生理学的意義に関して検討を行った。

## 3. 研究の方法

実験に用いた初代培養大脳皮質アストロサイトは、Wistar 系ラット新生仔より全脳を摘出して大脳皮質を単離後調製した。培養 2-4 週間後に振とう法によりエンリッチ作業を行いアストロサイト以外の細胞を除去した後、各種実験に用いた。各遺伝子の mRNA 発現量変化は real-time RT-PCR 法により、CXCL-1 遊離は ELISA 法により検出した。それ以外の方法に関しては、適宜研究成果欄に記載した。

## 4. 研究成果

はじめに、アストロサイトにおける TRPC ファミリーの発現を RT-PCR 法を用いて確認した。TRPC ファミリーのうち、TRPC1 および TRPC3 から TRPC6 までの発現が観察され、TRPC7 の発現は認められなかった。続いて、アストロサイトにおける S1P 受容体サブタイプの発現を確認した。S1P 受容体サブタイプのうち S1P<sub>1</sub>、S1P<sub>2</sub>、および S1P<sub>3</sub> の発現が観察された (図 1)。

S1P は細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度増大を誘発するこ

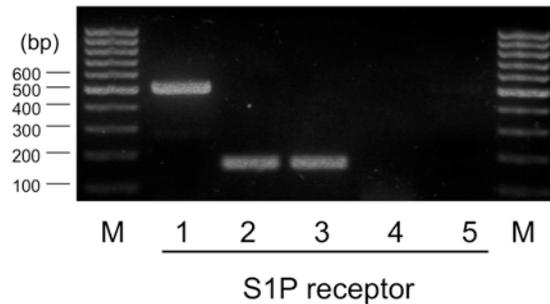


図 1. ラット大脳皮質アストロサイトにおける S1P 受容体の RT-PCR による解析。マーカー (M) は 100bp DNA size ladder を示す。

いた Ca<sup>2+</sup>イメージング法により観察した。アストロサイトに、S1P の濃度を 0.01 μM から 10 μM の 4 点の濃度で適用したところ、S1P の濃度依存的に、一過性 Ca<sup>2+</sup>応答や、その後の持続性の Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が観察された。次に、S1P 誘発 Ca<sup>2+</sup>応答に関して、TRPC チャンネルの関与を検討した。細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度上昇の機構には、細胞内の Ca<sup>2+</sup>ストアからの放出と細胞外からの Ca<sup>2+</sup>流入がある。そこで細胞外 Ca<sup>2+</sup>不含条件下において、S1P (1 μM) を適用したところ、一過性応答には差が無く、その後の持続的な Ca<sup>2+</sup>応答が消失した。このことから、一過性 Ca<sup>2+</sup>応答は、細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストアからの Ca<sup>2+</sup>放出に依存し、持続的な Ca<sup>2+</sup>応答は、細胞外からの Ca<sup>2+</sup>流入に起因すると考えられる (図 2)。そこで、細胞内への Ca<sup>2+</sup>流入経路として報告されている TRPC チャンネルの広範な阻害薬である Pyr2 を適用したところ、一過性応答は変化しなかったのに対し、持続的な Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇は有意に減少したことから、S1P 誘発 Ca<sup>2+</sup>応答に TRPC チャンネルが関与することが示唆された。さらに、TRPC ファミリーのうち TRPC3 に着目し、選択的阻害薬である Pyr3 を適用したところ、Pyr2 と同様に、S1P 単独適用群に比べ持続的な Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が有意に減少した。この結果から、S1P 誘発 Ca<sup>2+</sup>応答において、TRPC3 が主に関与することが示唆された。

さらに JTE013 (S1P<sub>2</sub> 選択的阻害薬) および CAY10444 (S1P<sub>3</sub> 選択的阻害薬) の投与により一過性応答、持続的な Ca<sup>2+</sup>応答の両方が減弱傾向を示した。この結果は更なる解析を必要とする。また、PLC 阻害薬の投与により S1P 誘発 Ca<sup>2+</sup>応答が抑制されたが Gβγ阻害薬である gallein は影響を及ぼさなかった。また S1P<sub>1</sub> 受容体選択的アゴニストである SEW2871 はほとんど Ca<sup>2+</sup>応答を起こさなかった。これらの結果から、アストロサイトにおける S1P 誘発 Ca<sup>2+</sup>応答は Gq 共役型受容体である S1P<sub>2</sub> および S1P<sub>3</sub> を介していると考えられる。

次に、アストロサイトにおいて S1P により誘発される機能変化に、TRPC チャンネルを介した Ca<sup>2+</sup>シグナリングが関与しているかを

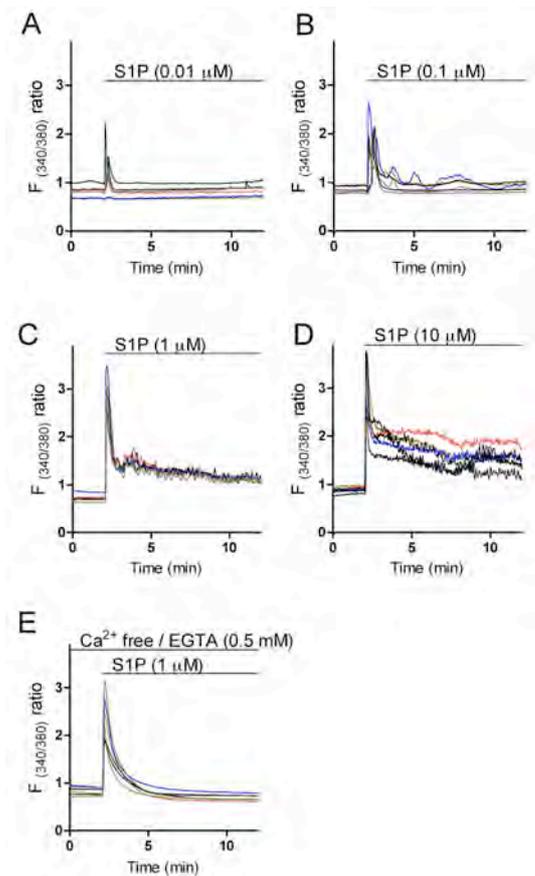


図2. ラットアストロサイトにおける S1P 誘発  $\text{Ca}^{2+}$  応答。A-D, S1P (0.01-10  $\mu\text{M}$ )適用による 2 相性の  $\text{Ca}^{2+}$  応答。6つの細胞の代表例を示す。E,  $\text{Ca}^{2+}$  不含条件下における S1P (1  $\mu\text{M}$ )誘発  $\text{Ca}^{2+}$  応答の消失。

検討する為、S1Pにより惹起されるアストロサイトの形態変化を観察した。写真において、緑はファロイジン染色によりアクチン骨格を、青はヘキスト染色により核を表している。無血清条件下で3時間培養した際、放射状の突起を持つ星状化したアストロサイトが観察されたのに対し、1  $\mu\text{M}$ のS1P処置群では、突起の消失とアストロサイトのストレスファイバーが観察された。そこで、S1Pによって惹起される形態変化に対する  $\text{Ca}^{2+}$ シグナリングと TRPC チャンネルの関与を検討した。細胞膜透過性の  $\text{Ca}^{2+}$ キレータである BAPTA-AM、及び Pyr2、Pyr3は、S1Pで誘発された形態変化に影響を及ぼさなかった。このことから、S1P誘発アストロサイト形態変化は TRPC チャンネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$ シグナリングに依存的ではないと考えられる(図3)。

次に、S1Pにより惹起されるアストロサイトの遊走における TRPC チャンネルの関与を検討するため、scratch-wound assayを行った。24時間の無血清処置後、細胞をscratchし、72時間薬物処置を行った。遊走面積を定量した結果、S1P (1  $\mu\text{M}$ )処置群において、ア

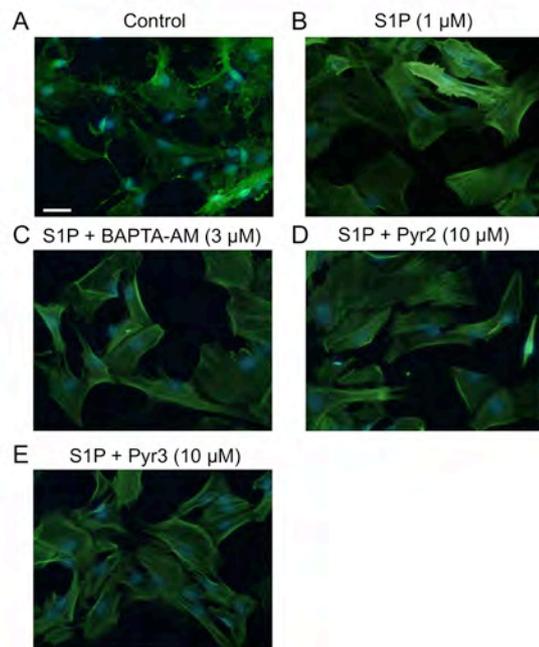


図3. ラットアストロサイトにおける S1P 誘発形態変化。写真は以下の3時間の各処置の代表例を示す。(A), S1P (1  $\mu\text{M}$ ) (B), S1P and BAPTA-AM (3  $\mu\text{M}$ ) (C), S1P and Pyr2 (10  $\mu\text{M}$ ) (D), S1P and Pyr3 (10  $\mu\text{M}$ ) (E) スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

ストロサイトの遊走が有意に増大した。また、Pyr3 との共処置群において、S1P 単独適用により誘発された遊走度に対し、有意差はみられなかったものの、抑制傾向がみられた。この点に関して今後の更なる検討が必要である。

次に S1P (1  $\mu\text{M}$ ) 処置によりアストロサイトにおいて、遺伝子発現量変化があるかどうか追求した。その結果、TRPC1,3,6やbFGF、BDNF、NGF、GDNFの mRNA 発現量には変化は見られなかったが、S1P (1  $\mu\text{M}$ )の12時間処置でケモカインの一種である CXCL1の mRNA 発現量に増大が観察された。

次に ELISA 法により検討したところ、S1P (1  $\mu\text{M}$ )の6時間処置により CXCL1 遊離量は有意に増加した。またこれは TRPC チャンネル阻害薬の Pyr2、また  $\text{S1P}_3$  選択的アンタゴニストである CAY10444 の共処置によって抑制された。一方で  $\text{S1P}_1$  選択的アンタゴニストの W146、 $\text{S1P}_2$  選択的アンタゴニストの JTE013 の共処置は影響しなかった。

以上の結果より、細胞外適用した S1P はアストロサイトに対して Gq 共役型 GPCR である  $\text{S1P}_2$  受容体および  $\text{S1P}_3$  受容体を介して TRPC チャンネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$  応答を惹起し、ケモカインである CXCL1 遊離を惹起することが示された(図4)。その生理的意義や細胞内メカニズムに関しては更なる解析を必要とする。

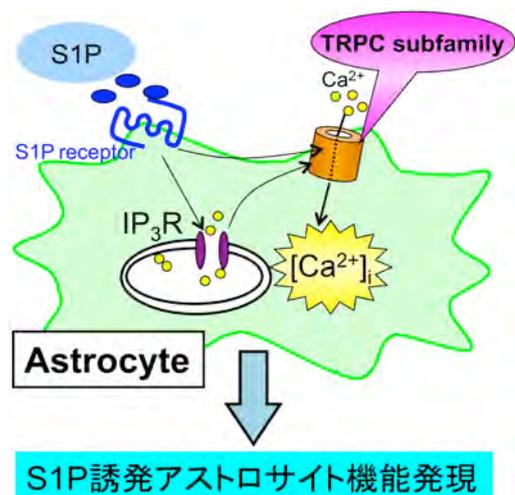


図4. S1Pによる特異的受容体を介したアストロサイトへの作用の模式図

#### 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5件)

① Zhao M, Isami K, Nakamura S, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. “Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice.” *Molecular Pain* (査読有り) 8:55, 2012. DOI: 10.1186/1744-8069-8-55.

② Shirakawa H. “Pathophysiological significance of the canonical transient receptor potential (TRPC) subfamily in astrocyte activation[.]” *Yakugaku Zasshi.* (査読無し) 132:587-593, 2012. DOI: 10.1248/yakushi.132.587.

③ Haraguchi K, Kawamoto A, Isami K, Maeda S, Kusano A, Asakura K, Shirakawa H, Mori Y, Nakagawa T, Kaneko S. “TRPM2 contributes to inflammatory and neuropathic pain through the aggravation of pronociceptive inflammatory responses in mice.” *Journal of Neuroscience* (査読有り) 32:3931-3941, 2012. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4703-11.2012.

④ Konno M, Shirakawa H, Iida S, Sakimoto S, Matsutani I, Miyake T, Kageyama K, Nakagawa T, Shibasaki K, Kaneko S. “Stimulation of transient receptor potential vanilloid 4 channel

suppresses abnormal activation of microglia induced by lipopolysaccharide.” *Glia* (査読有り) 60:761-770, 2012. DOI: 10.1002/glia.22306.

⑤ Konno M, Shirakawa H, Miyake T, Sakimoto S, Nakagawa T, Kaneko S. “Calumen, a Ca<sup>2+</sup>-binding protein on the endoplasmic reticulum, alters the ion permeability of Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> (CRAC) channels.” *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有り) 417:784-789, 2012. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.035.

[学会発表] (計24件)

① 白川久志ら「TRPC3阻害薬はマウス脳内出血モデルにおける神経機能障害を改善する」日本薬学会第133回年会、2013年3月27-30日、パシフィコ横浜(神奈川県)

② 三宅崇仁ら「Physiological implications of TRPV1 in microglial migration and phagocytosis」第86回日本薬理学会年会、2013年3月21-23日、福岡国際会議場(福岡県)

③ 崎元伸哉ら「TRPM2-mediated induction of iNOS in microglia/macrophage is involved in the progression of cerebral ischemic injury in mice」第86回日本薬理学会年会、2013年3月21-23日、福岡国際会議場(福岡県)

④ 崎元伸哉ら「ミクログリア/マクロファージにおけるTRPM2を介したNO産生が脳虚血傷害の進展に関与する」第22回神経行動薬理若手研究者の集い、2013年3月20日、九州大学コラポステーション(福岡県)

⑤ 崎元伸哉ら「TRPM2 channel contributes to the progression of ischemic brain injury in mice」第6回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2012年11月23-24日、京都大学薬学部(京都府)

⑥ 宗像将也ら、「マウス自家血注入による出血性脳機能障害に対するTRPC3阻害薬の寛解作用」第122回日本薬理学会近畿部会、2012年11月16日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府)

⑦ 景山慶子ら「培養オリゴデンドロサイト前駆細胞におけるTRPチャネルの発現解析」第62回日本薬学会近畿支部会、2012年10月20日、武庫川女子大学薬学部(兵庫県)

⑧ 白川久志ら「TRPV4開口刺激は細胞膜の脱分極を介してミクログリア活性化を抑制する」平成24年度生理研研究会TRPチャネル群の動作原理と生理・病理機能の統合的理解、2012年6月14-15日、岡崎コンベンションセンター(愛知県)

⑨ 金子周司ら「脳内出血後神経障害を軽減

するためのアストロサイト TRPC3 活性制御」第 89 回日本生理学会年会、2012 年 3 月 29-31 日、松本文化会館（長野県）

⑩ 白川久志ら「TRPV4 開口刺激は細胞膜の脱分極を介してミクログリア活性化を制御する」日本薬学会第 132 回年会、2012 年 3 月 28-31 日、北海道大学（北海道）

⑪ 白川久志ら「Glial TRP channels as therapeutic targets for stroke」第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14-16 日、京都国際会議場（京都府）

⑫ 金野真和ら「Stimulation of TRPV4 channel suppresses abnormal activation of microglia induced by lipopolysaccharide」第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14-16 日、京都国際会議場（京都府）

⑬ 崎元伸哉ら「TRPM2 channel contributes to the progression of ischemic brain injury in mice」第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14-16 日、京都国際会議場（京都府）

⑭ 飯田将太ら「Involvement of TRPC channels in sphingosine-1-phosphate-induced astrocytic responses」第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14-16 日、京都国際会議場（京都府）

⑮ 橋本恵美奈ら「Comprehensive behavioral analysis of TRPM2-deficient mice」第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14-16 日、京都国際会議場（京都府）

⑯ 三宅崇仁ら「ミクログリア活性化における TRPM2 チャネルの病態生理学的役割」第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14-16 日、京都国際会議場（京都府）

⑰ Shirakawa H, et al. 「Functional coupling of TRPC1 and TRPC3 in thrombin-induced astrocyte activation」Neuroscience2011 (the 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience)、2011 年 11 月 12-16 日 ワシントンコンベンションセンター（アメリカ）

⑱ 宗像将也ら、「マウス脳内出血モデルにおける脳機能障害に対する TRPC3 阻害薬の寛解作用」第 120 回日本薬理学会近畿支部会、2011 年 11 月 11 日、グランビア京都（京都府）

⑲ 白川久志ら「アストロサイト異常活性化における TRPC subfamily の重要性-脳内出血における病態生理学的役割に着目して-」第 61 回日本薬学会近畿支部会・奨励賞受賞講演、2011 年 10 月 22 日、神戸学院大学薬学部（兵庫県）

⑳ 橋本恵美奈ら「酸化還元センサーTRPM2 チャネルを破壊したマウスの行動」第 61 回日本薬学会近畿支部会、2011 年 10 月 22 日、神戸学院大学薬学部（兵庫県）

㉑ Shirakawa H, et al. 「Involvement of TRPM2 channel in mechanisms underlying microglial activation」第 34 回日本神経科学

大会、2011 年 9 月 14-17 日、パシフィコ横浜（神奈川県）

㉒ Sakimoto S, et al. 「A pathophysiological role of TRPM2 in ischemic injury after transient focal cerebral ischemia in mice」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 14-17 日、パシフィコ横浜（神奈川県）

㉓ 白川久志ら「脳出血傷害時に惹起されるアストロサイト活性化における TRPC1 および TRPC3 の病態生理学的役割」平成 23 年度生理研研究会 TRP チャネル群の動作原理と生理・病理機能の統合的理解、2011 年 6 月 2-3 日、岡崎コンベンションセンター（愛知県）

㉔ Konno M, et al. 「Stimulation of TRPV4 channel suppresses aberrant activation of microglia induced by lipopolysaccharide」The 6th SKO Symposium、2011 年 6 月 2-3 日 ソウル（韓国）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/channel/ja/research/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白川 久志 (SHIRAKAWA HISASHI)

京都大学・大学院・薬学研究科・助教

研究者番号：50402798

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

金子 周司 (KANEKO SHUJI)

京都大学・大学院・薬学研究科・教授

研究者番号：60177516

中川 貴之 (NAKAGAWA TAKAYUKI)

京都大学・大学院・薬学研究科・准教授

研究者番号：30303845