

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590281

研究課題名(和文)酸感受性イオンチャネルを介した新規内分泌調節機構の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of acid-sensitive ion channels in mouse pituitary gland.

研究代表者

植田 高史 (UEDA, Takashi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90244540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス下垂体において、前葉と中葉に酸感受性イオンチャネル(ASIC)1と4が、後葉に一過性受容体電位型チャネルバニロイド2 (TRPV2)チャネルが分布していた。プロトン(水素イオン)による刺激は、ASIC1はもちろんのこと、ASIC4をも活性化した。TRPV2のアゴニストprobenecidは、下垂体初代培養細胞において、全細胞の約12%で細胞内カルシウム濃度の上昇とともに、全体として細胞外へのATPの放出を引き起こした。ATPは後葉細胞から傍分泌され、周囲に存在するバゾプレッシンニューロンの働きを調節することが知られており、TRPV2がこの内分泌調節機構に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In mouse pituitary gland, the anterior (AL) and intermediate lobes (IL) expressed acid-sensing ion channel 1(ASIC1) and ASIC4, whereas the posterior lobe (PL) expressed transient receptor potential vanilloid type 2 (TRPV2) channel. TRPV2, not TRPV4, was expressed in a unique subpopulation of glia-like pituicytes in the PL. Proton activated ASIC4 as well as ASIC1 in *Xenopus* oocytes. A TRPV2 agonist probenecid elevated the intracellular calcium concentration in a subset of the isolated pituitary gland cells (approximately 12 % of total cells) and evoked ATP release in these cells. Since ATP is known to be a paracrine modulator of vasopressin release in the PL, TRPV2 may be involved in the regulation of the endocrine system.

研究分野：医歯薬学

キーワード：刺激分泌関連 イオンチャネル型オーファン受容体 酸感受性イオンチャネル 下垂体後葉 傍分泌

1. 研究開始当初の背景

神経内分泌系は、常に生体内環境をモニタリングすることにより、その変化に対して適切な応答を行っている。例えば、下垂体では、ストレスなどを感知して、種々のホルモンを放出することが知られているが、その調節機構の詳細は不明である。ASIC チャンネル (acid-sensing ion channel; 酸感受性イオンチャンネル) は虚血などのストレスで生じる局所水素イオンの上昇に応答するストレスセンサーである。ASIC は6つのサブタイプから構成されているが、これらの下垂体での発現や機能については全く分かっていない。さらに、TRP チャンネル (transient receptor potential channel; 一過性受容体電位型チャンネル) の特定のサブタイプ (TRPV1, TRPV2, TRPV4 など) も酸に感受性のあることが知られており、加えて低浸透圧に応答する性質を備えている。これは下垂体後葉に投射するパゾプレッシンニューロンの神経終末を取り囲む後葉細胞に発現する低浸透圧センサーの候補分子と考えられるが、発現の有無を含めその詳細は不明である。そこで我々は、下垂体におけるこれらの酸感受性イオンチャンネル (ASIC ならびに TRP チャンネル) の発現と機能の解析について研究することにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、第1に、内分泌細胞に存在する新規イオンチャンネルの生体機能を解明することにある。内分泌系は様々な生体反応を制御しているが、最近我々は、ASIC4 という ASIC に分類されているものの他の ASIC と同一性が低く機能不明な分子が、下垂体と副腎の内分泌細胞に豊富に発現していることを見いだした。この分子は、哺乳類ではまだ報告のないペプチド作動性イオンチャンネルである可能性も高く、本研究ではこの分子の機能を解析して、ASIC の内分泌機能における役割についての可能性を探った。第2に、ASIC 以外の酸感受性を持つ分子として TRP チャンネルが知られている。中には浸透圧に応答するファミリーメンバーも存在し、下垂体後葉の内分泌機能に影響している可能性がある。我々はその観点からも研究を実施し、下垂体後葉の後葉細胞が備える低浸透圧感受性の分子実態についても検索した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現と形態学的解析

ASIC と TRP チャンネルについて、RT-PCR による遺伝子発現と cRNA プローブによる *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法を行い、各 mRNA の発現と組織内局在を決定した。具体的には、C57BL6J マウスから下垂体などを摘出後、1) RNA を抽出して、RT-PCR 法、または 2) クリオスタットにて凍結未固定切片を作製し、DIG または ³⁵S 標識 cRNA プローブによる ISH 法を実施した。さらにタンパクレ

ベルでの局在を決定するため、市販の特異抗体を用いた蛍光間接免疫染色を実施した。抗体の特異性は、Western blot と抗原による吸収試験により確認した。ASIC1a と ASIC1b については、各ノックアウトマウスの組織を使用しても確認した。さらに下垂体後葉細胞は性質の異なる幾つかの細胞群から構成されているので、これを分類するマーカー分子 (GFAP, vimentin, S100B など) と二重染色して、発現している細胞の細胞垂種を決定した。

(2) 生理学的解析

ASIC4 の機能を探るため、アフリカツメガエル卵母細胞に ASIC4 を強制発現させ、下垂体を刺激するリガンドを購入し応答を観察した。またアミロライド以外の ASIC4 の阻害剤についても幾つかの候補について検討した。また、ASIC4 は ASIC1 とヘテロマーを形成して ASIC1 の機能を修飾している可能性もあるので、ASIC1 とともに発現させ、酸、低浸透圧、乳酸、アラキドン酸など、ASIC1 チャンネルを賦活化する物質を投与して反応の変化を観察した。

ex vivo でも解析を実施して目的分子の機能的な発現を確認した。具体的には下垂体を単離し、そのままあるいは酵素処理で単細胞にした組織/細胞を用いて生理学的解析を行った。ASIC1a と TRP チャンネルに関しては活性化によりカルシウムイオンを通すので、カルシウムイメージングにより、酸や特異的なリガンドに対する応答を観察した。

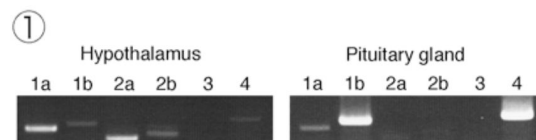
(3) ASIC4 レポーターマウスおよびノックアウトマウスの作製と解析

ASIC4 のレポーターマウスを作製し、ASIC4 プロモーターの細胞特異性について検索した。下垂体だけでなく、脳の視床下部での発現や末梢の神経内分泌器官での発現の有無を注視した。合わせて ASIC4 ノックアウトマウスの作製にも着手した。

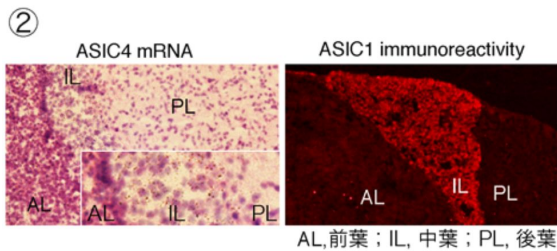
4. 研究成果

(1) ASIC チャンネルの発現

マウス視床下部と下垂体における ASIC の発現を RT-PCR 法により解析し、視床下部では ASIC1a と ASIC2a の転写産物が、下垂体では ASIC1 および ASIC4 が発現していることを確認した (図)。

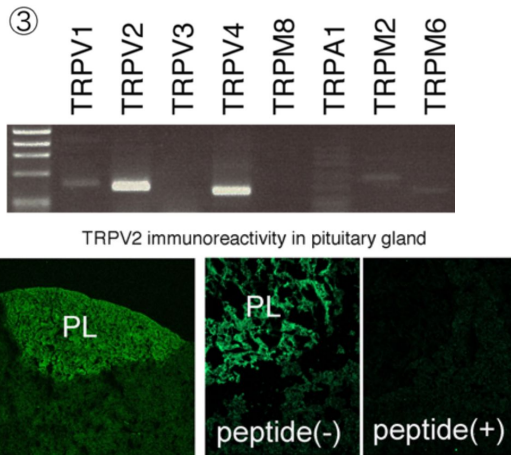


さらに、マウス下垂体組織を使って *in situ* ハイブリダイゼーション法と免疫染色法を実施し、ASIC4 mRNA は前葉と中葉に、ASIC1 は中葉に強く発現していることを見いだした (図)。



(2) 下垂体における TRP チャンネルの発現

下垂体における TRP チャンネルについては、TRPV2 と TRPV4 の転写産物が検出され、免疫染色により下垂体後葉(PL)における TRPV2 の発現が示唆された(図)。



(3) 強制発現系での電気生理学的解析

ASIC4 をアフリカツメガエル卵母細胞に強制発現させた電気生理学的実験では、ASIC4 が常時活性化型の陽イオンチャンネルで、水素イオンに応答してさらに活性化されること、アミロライドより Zn^{2+} により効果的に抑制されることが明らかとなった(柴田ら、学会発表、2015)。

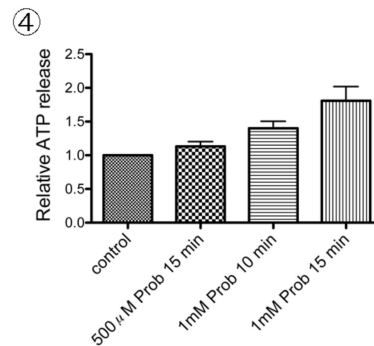
(4) *ex vivo* の機能解析

下垂体を摘出後、酵素消化により single cell suspension にしたサンプルをカルシウムイメージングにて解析したところ、全細胞数の約 12% に TRPV2 のアゴニストである probenecid に対する応答が観察された。一方 TRPV4 を活性化する 4α -PDD に応答する細胞は観察されなかった。

さらに酵素処理なしの下垂体組織によるイメージング解析により、下垂体後葉の紡錘形の後葉細胞が TRPV2 のアゴニストに応答することがわかった。

(5) 下垂体からの ATP の放出

ATP やタウリンは下垂体後葉にてバゾプレッシンの放出を制御していることが知られているので、TRPV2 のアゴニスト probenecid を作用させた時の ATP の放出を測定した。その結果、probenecid(Prob)が濃度および時間依存的に下垂体細胞から ATP の放出を引き起こすことを見出した(図)。



TRPV2 は低浸透圧に応答することが報告されており(文献)今回その活性化によりバゾプレッシン分泌調節因子 ATP が放出されることが明らかとなった。従って、後葉細胞に発現する TRPV2 は低浸透圧を感知して ATP を放出していると考えられる。以上より TRPV2 は後葉細胞の低浸透圧センサーとして機能している可能性が高い。

(6) ASIC4 レポーターマウスの解析結果

UC Davis の Knockout Mouse Project (KOMP) より $Asic4^{tm1a(KOMP)Mbp}$ の ES 細胞を入手し、交配と genotyping により ASIC4 レポーターマウスのヘテロマウスを選別した。ASIC4 プロモーターの下流に発現する lacZ を利用して β -ガラクトシダーゼ (β -gal) 染色を行った。 β -gal の活性を示す青色色素は下垂体だけでなく、室傍核を始め脳で広範に発現していることが明らかとなった(星川ら、学会発表、2015)。現在このレポーターマウスより ASIC4 ノックアウトマウスを作製中である。

<引用文献>

Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M, Imaizumi Y. TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res.* 93(9) (2003) 829-838.

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3件)

Watanabe M, Ueda T, Shibata Y, Kumamoto N, Shimada S, Ugawa S. Expression and regulation of Cav3.2 T-type calcium channels during inflammatory hyperalgesia in mouse dorsal root ganglion neurons. *PLoS One.* 査読有 10(5) (2015) e0127572. DOI: 10.1371/journal.pone.0127572.

Watanabe M, Ueda T, Shibata Y, Hoshikawa M, Kumamoto N, Ugawa S. Characterization of Cav3.2 T-type calcium channel expression in mouse dorsal root ganglion neurons. *Nagoya*

Med J. 査読有 54(3) (2015) 131-141.
http://mol.medicalonline.jp/library/archive/select?jo=cm1nagoy&UserID=202.35.208.7

Watanabe M, Ueda T, Shibata Y, Kumamoto N, Ugawa S. The role of TRPV1 channels in carrageenan-induced mechanical hyperalgesia in mice. Neuroreport. 査読有 26(3)(2015) 173-178. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000322.

[学会発表] (計6件)

植田高史、星川真理子、柴田泰宏、熊本奈都子、鶴川眞也 マウス鼻腔上皮におけるTRPV4チャネルの機能発現 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会 合同大会、2015.3.22、神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

星川真理子、柴田泰宏、熊本奈都子、植田高史、鶴川眞也 マウス脳におけるASIC4の分布。第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会 合同大会、2015.3.21、神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

柴田泰宏、渡辺正哉、星川真理子、熊本奈都子、植田高史、鶴川眞也 マウス酸感受性イオンチャネル4は亜鉛感受性常時開口型チャネルである。第120回日本解剖学会総会・全国学術集会、第92回日本生理学会大会 合同大会、2015.3.21、神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

植田高史、熊本奈都子、柴田泰宏、鶴川眞也。下垂体における浸透圧感受性TRPチャネルの解析。第36回日本神経科学大会/第56回日本神経化学学会大会/第23回日本神経回路学会大会・合同大会 (Neuro2013)、2013.6.21、国立京都国際会館(京都府・京都市)

植田高史、熊本奈都子、鶴川眞也。下垂体におけるTRPVチャネルの発現と機能解析。第118回日本解剖学会総会、2013.3.30、サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県・高松市)

植田高史、北條英ミレナ、熊本奈都子、鶴川眞也。神経性下垂体におけるTRPチャネルの機能解析。第35回日本神経科学大会/第55回日本神経化学学会大会・合同大会 (Neuro2012)、2012.9.19、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

植田高史 (UEDA, Takashi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科
・准教授

研究者番号：90244540

(2)研究分担者

鶴川眞也 (UGAWA, Shinya)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20326135

(3)連携研究者

島田昌一 (SHIMADA, Shoichi)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20216063