

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790267

研究課題名(和文) TRPA1を介した細胞内Zn²⁺ + 情報伝達機構による関節リウマチ病態制御研究課題名(英文) Effects of an increase of the intracellular Zn²⁺ via TRPA1 on the regulation of rheumatoid arthritis synoviocyte function.

研究代表者

波多野 紀行 (Hatano, Noriyuki)

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：50454319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：滑膜線維芽細胞において、炎症性サイトカイン刺激により細胞内Zn²⁺濃度が増加し、この細胞内Zn²⁺濃度の増加が滑膜線維芽細胞のケモカイン分泌を制御することを明らかにすることができた。また、この細胞内Zn²⁺濃度蓄積は、炎症性サイトカインによるTRPA1発現誘導だけでなく亜鉛トランスポーター(Zip8およびZip14)発現誘導も寄与していることを明らかにした。さらに、DMARDsの一つであるオーラノフィンやNOX阻害薬がTRPA1活性化作用を有することを見出し、これらの化合物がTRPA1を活性化する分子メカニズムの一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：We showed that inflammatory cytokines (TNF α and IL-1 α) induced TRPA1 expression via nuclear factor- κ B signaling and downstream activation of the transcription factor HIF1 α in human fibroblast-like synoviocytes. The induced TRPA1 channels, which were intrinsically activated by intracellular Zn²⁺, suppressed secretion of IL-6 and IL-8. Inflammatory cytokines induced zinc transporters (ZIP8 and ZIP14) gene expression and increased intracellular Zn²⁺ concentration in inflammatory synoviocytes. These data suggest that intracellular Zn²⁺ regulate cytokine release through TRPA1 activation and may modulate the progression of Rheumatoid Arthritis. Moreover, we showed that auranofin, a disease-modifying antirheumatic drug (DMARD), and five NADPH oxidase (NOX) inhibitors effectively activated human TRPA1 channels.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：TRPA1 関節リウマチ 細胞内亜鉛

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は関節滑膜の炎症を主な病変とする自己免疫疾患である。関節滑膜組織において炎症が慢性化すると、軟骨・骨は破壊され、関節そのものが変形し、ついには強直する。患者は日常生活や社会活動が制限され、患者個人のみならず、その家族や社会全体の損失は甚大である。わが国の RA 罹患率は 0.5 ~ 1% であり、現在の患者数は約 70 万人と推定されている。また RA 罹患率は高齢化の進展に伴い年々増加する傾向にある。

従来 RA 治療は NSAIDs やステロイド剤を用いた対症療法が主流であった。最近になって、メトトレキサート等の強力な抗リウマチ薬 (DMARDs) や抗 TNF 抗体をはじめとする生物学的製剤が治療に導入され、罹患者の病態は大幅に改善されつつある。しかし、DMARDs や生物学的製剤による重篤な副作用の発現や、30%前後ともいわれる non-responder の存在など、未解決の問題を多く残している。そのため、新たな作用機序を持った RA 治療薬の開発が期待されている。

2. 研究の目的

RA 病態形成の中心は関節滑膜組織における炎症である。初期滑膜炎において滑膜内に浸潤したリンパ球が滑膜線維芽細胞と相互に活性化され、プロスタグランジン類、炎症性サイトカイン等、種々の炎症性メディエーターを産生する。これらにより活性化した滑膜組織は、肥大・増殖し、肉芽組織 (パンヌス) を形成して、軟骨・骨を不可逆的に破壊する。滑膜線維芽細胞はパンヌスの主要構成細胞であり、炎症性メディエーター、細胞外マトリックス分解酵素、破骨細胞分化因子を分泌し、滑膜の炎症増悪において中心的な役割を果たしている。つまり滑膜線維芽細胞の増殖型への変化 (滑膜リモデリング) を制御することができれば、パンヌスによる軟骨・骨破壊を効果的に抑制できると考えられる。

そこで、滑膜線維芽細胞のリモデリングに着目し、ヒト初代培養滑膜線維芽細胞を用いて炎症性刺激による遺伝子発現変化について網羅的に検討した。その結果、炎症性サイトカイン刺激が非選択的のカチオンチャンネルである TRPA1 の発現量を著明に増加させることを明らかにした。また、誘導された TRPA1 が滑膜線維芽細胞におけるケモカイン (IL8) 分泌を制御することも明らかにした。この TRPA1 によるケモカイン分泌制御機構を解析する過程で、細胞内 Zn^{2+} を介した情報伝達機構が存在することが分かってきた (N. Hatano, et al., 2012)。

Zn^{2+} は 300 種以上の酵素活性を調節し、タンパク質の立体構造を制御している必要不可欠な因子である。最近 Zn^{2+} が細胞内情報伝達物質としての性質を有しており、アレルギー応答や自己免疫疾患に深く関与していることが報告されている。TRPA1 は Zn^{2+} 透過性を持ち、強制発現させることで細胞内 Zn^{2+} 濃度を増加させる。炎症性サイトカインに曝露した滑膜線維芽細胞

においても、TRPA1 発現量の増加が細胞内 Zn^{2+} 濃度を上昇させると考えられる。

本研究の目的は、TRPA1 を介して細胞内へ流入した Zn^{2+} が RA 病態形成に与える影響を明らかにすることにある。TRPA1 は感覚神経の炎症慢性疼痛や侵襲性刺激による慢性疼痛の増悪に寄与することが知られている。そのため本研究目標を達成することにより、新たな RA 治療薬の開発だけでなく、新規慢性疼痛治療薬の開発へもつながると期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

健常人由来ヒト初代培養滑膜線維芽細胞は Cell Applications, Inc. より入手した。ヒト初代培養滑膜線維芽細胞は、細胞増殖因子を添加した培地 (Cell Applications, Inc.) で、5% CO_2 存在下 37°C で培養した。ヒト胎児腎臓由来培養細胞 (HEK293) はヒューマンサイエンス研究資源バンク (HSSRB) より入手した。HEK293 は、非働化した 10% FBS を添加し、ペニシリン G (100 U/ml)、ストレプトマイシン (100 μ g/ml) を加えた D-MEM (D-MEM/FBS10%) で、5% CO_2 存在下 37°C で培養した。ヒト腹部神経芽細胞腫 (IMR-32) は American Type Culture Collection (ATCC) より入手した。IMR-32 は、非働化した 10% FBS を添加し、ペニシリン G (100 U/mL)、ストレプトマイシン (100 μ g/mL)、non-essential amino acid を加えた MEM (MEM/FBS10%) で、5% CO_2 存在下 37°C で培養した。

(2) RNA 抽出、逆転写反応および RT-PCR 法

培養細胞から AGPC 法により total RNA を抽出し、 OD_{260} から total RNA 濃度を計算した。次に ABI 社の逆転写反応プロトコルに従い、逆転写酵素とランダムヘキサマー (dN_6) を用いて cDNA を合成した。PCR 増幅装置として Gene Amp 2720、Taq DNA polymerase として Fast Start Taq DNA polymerase (Roche) を用いた。総反応液量を 20 μ L とし、RT-PCR を行った。PCR 産物の分画は、1.5% アガロースゲル電気泳動を用いて行った。臭化エチジウム染色した後、FAS3000 を用いて可視化した。

(3) 定量的 RT-PCR 法

定量的 RT-PCR 法は PCR 検出定量システム (Thermal Cycler Dice Real Time System, TAKARA Bio.) を用いて行った。Syber Green アッセイ法を用いて、サイクル毎の蛍光強度を測定した。測定した蛍光強度とあらかじめ作成した検量線から求めた傾きから、各標的の mRNA 発現量を求めた。また内部標準として β -actin を使用した。

(4) 細胞内 Ca^{2+} 濃度測定法

細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の測定には、高速冷却 CCD カメラ蛍光画像解析システム ARGUS / HiSCa (浜松ホトニクス株式会社) を用い、 Ca^{2+}

蛍光変化を観察した。蛍光指示薬には fura2-AM を用いた。測定用チャンバーに細胞をセットした後、fura2-AM を $10\ \mu\text{M}$ の最終濃度になるように加え、30 分間静置して色素を細胞内に取り込ませた。その後、HEPES 溶液(組成(mM):137 NaCl, 5.4 KCl, 2.2 CaCl_2 , 1.2 MgCl_2 , 14 glucose, 10 HEPES, pH 7.4)で灌流し、過剰な色素を洗浄した後、測定を開始した。実験はすべて室温(25 ± 1)で行った。fura2-AM を用いた実験では、細胞内の色素を励起波長 340 nm および 380 nm の光で励起させ、放出された 510 nm の蛍光をカメラで取得し、蛍光強度比(F_{340}/F_{380})として解析した。

(5) 細胞内 Zn^{2+} 濃度測定法

細胞内 Zn^{2+} 濃度変化の測定には、高速冷却 CCD カメラ蛍光画像解析システム ARGUS/HiSCa を用い、 Zn^{2+} 蛍光変化を観察した。蛍光指示薬には FluoZin-3-AM を用いた。測定用チャンバーに細胞をセットした後、FluoZin-3-AM を $10\ \mu\text{M}$ の最終濃度になるように加え、15 分間静置して色素を細胞内に取り込ませた。その後、HEPES 溶液で灌流し、過剰な色素を洗浄した後、測定を開始した。実験はすべて室温(25 ± 1)で行った。FluoZin-3-AM を用いた実験では、細胞内の色素を励起波長 488 nm の光で励起させ、放出された 516 nm の蛍光をカメラで取得し、測定時における蛍光強度を蛍光強度比(F/F_0)として解析した。

(6) パッチクランプ法

細胞からの電流導出には Hamill 等によって確立されたホールセルパッチクランプ法を使用した。本実験では電極内液を充填した時の電極抵抗が $2\sim 5\ \text{M}\Omega$ の電極を用いた。倒立顕微鏡のステージ上に固定した容量約 $500\ \mu\text{L}$ のチャンバーに細胞を定着させたガラス片を固定し、外液で灌流した。外液として HEPES 溶液を使用した。ピペット内液の組成は、(mM): 110 Cs-aspartate, 30 CsCl, 1 MgCl_2 , 10 HEPES, 1 EGTA, 2 ATP- Na_2 (pH7.2)。実験はすべて室温(25 ± 1)で行った。導出した電流は微小電流増幅器 CEZ-2400(日本光電)を用いて増幅し、コンピュータに AD 変換機を介して取り込んだ。コンピュータへの取り込みとその後の解析は、Dr. John Dempster(University of Strathclyde, UK)が開発した Whole cell Program v4.0 (WCP)を用いた。電流密度は電流量を細胞容量で除することにより算出した。また、液間電位($-10\ \text{mV}$)は補正した。

(7) 遺伝子導入法

Lipofectamine 2000 を用いたりポフェクション法により HEK293 への一過性発現実験を行った。Invitrogen 社のプロトコルに従ってトランスフェクションを行い、トランスフェクションから 24~48 時間程度経過した細胞を実験に使用した。各イオンチャネルの選択的なアゴニストに反応する細胞を計測することによりりポフェクション法による遺伝子導入効率は 80-90%であった。

4. 研究成果

(1) ヒト初代培養滑膜線維芽細胞における炎症性サイトカインによる TRPA1 機能増強

ヒト初代培養滑膜線維芽細胞に TNF を添加すると TRPA1 mRNA 発現量およびタンパク発現量が著明に増加した。この TRPA1 発現量増加は IL1 添加によっても誘導された。これら炎症性サイトカインに曝露した滑膜線維芽細胞(炎症滑膜細胞)では、TRPA1 選択的活性化薬 MO により細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇および非選択的カチオン電流が惹起された。また、IL1 刺激により促進される IL6 および IL8 の分泌は MO 刺激により抑制され、この MO による分泌抑制作用は TRPA1 選択的拮抗薬 HC-030031 により減弱した。さらに炎症滑膜細胞では、TRPA1 の定常的な活性化による Ca^{2+} オシレーションが観察され、この Ca^{2+} オシレーションは過酸化水素スカベンジャーおよび亜鉛キレーター(TPEN)により抑制された。

以上の結果は、滑膜線維芽細胞が炎症状態に陥ると、過酸化水素および細胞内 Zn^{2+} 濃度が増加することを示唆している。また、これらの結果は、炎症性刺激による細胞内 Zn^{2+} 濃度の増加が TRPA1 の活性化を介して IL6 や IL8 の分泌を制御することを示唆しており、細胞内 Zn^{2+} 濃度の調節が RA 病態制御につながると考えられた。

(2) 炎症刺激によって発現誘導された TRPA1 を介した細胞内 Zn^{2+} 濃度制御

蛍光指示薬として Fura-2 および FluoZin-3 を用いて、TRPA1 を発現させた HEK293 (HEK-TRPA1)およびヒト初代培養滑膜線維芽細胞における細胞内の Ca^{2+} 濃度および Zn^{2+} 濃度を測定した。HEK-TRPA1 に TRPA1 選択的アゴニスト MO を添加すると細胞内 Ca^{2+} 濃度だけでなく細胞内 Zn^{2+} 濃度の上昇も確認できた。また、この MO による細胞内 Zn^{2+} 濃度上昇は、HC-030031 および TPEN により抑制された。さらに、炎症性サイトカイン曝露によって TRPA1 の発現を誘導した滑膜線維芽細胞でも同様の結果が観察された。

次に、細胞内の Zn^{2+} 濃度について検討した。その結果、炎症滑膜細胞では炎症性刺激に曝露されていない滑膜細胞に比べて細胞内 Zn^{2+} 濃度が有意に高いことが明らかになった。炎症性サイトカインに曝露された滑膜線維芽細胞では TRPA1 のみならず亜鉛トランスポーター(Zip8 および Zip14)の発現も大きく増加しており、これらの分子が炎症滑膜細胞における細胞内 Zn^{2+} 濃度の増加に寄与していると考えられた。これらの結果は、炎症性刺激による TRPA1、Zip8 および Zip14 の発現増加が炎症性滑膜線維芽細胞における Zn^{2+} 蓄積に寄与することを示唆しており、今後これらの分子を抑制することで RA 病態形成を抑制することが可能であるか、検討する予定である。

(3) DMARDs オーラノフィンによる TRPA1 活性化作用

TRPA1 は、低温刺激、化学刺激、機械刺激により活性化される、外部刺激センサーである。RA は慢性的炎症を主徴とする疾患であり、時に関節痛を引き起こす。そこで、RA 治療薬による TRPA1 活性化制御に着目した。8 種類の DMARDs およびステロイドホルモン、NSAIDs を TRPA1 強制発現 HEK293 (HEK-TRPA1) に添加し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定した。また、パッチクランプ法を用いた TRPA1 電流測定も行った。さらに、ヒト神経細胞における TRPA1 活性化作用を検討するためにヒト腹部神経芽細胞腫 IMR-32 を用いた。

その結果、DMARDs の一つであるオーラノフィンが TRPA1 を低濃度から活性化することが明らかになった。オーラノフィンによる TRPA1 活性化作用は濃度依存的であり、その EC_{50} は約 0.3 μM であった。また、HC-030031 はオーラノフィンによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制した。さらに、オーラノフィンは TRPV1、TRPV2、TRPV3、TRPV4、TRPM8 にはほとんど影響を及ぼさなかった。以上の結果より、オーラノフィンは非常に強力な TRPA1 選択的アゴニストであることが明らかになった。また、オーラノフィンは IMR-32 において発現している TRPA1 も活性化させた。RA 患者では、多発性関節炎や炎症により疼痛が生じることが多い。オーラノフィンはそのような患者に対して、不利益な作用を及ぼすことが考えられた。

(4) NADPH オキシダーゼ (NOX) 阻害剤による TRPA1 活性化作用

TRPA1 は、刺激化合物、pH 変化、機械刺激、冷感など様々な刺激により活性化され、炎症や侵害刺激受容に参与することが報告されている。また過酸化水素によっても活性化されることから、生体内において TRPA1 が酸化ストレスに影響を及ぼすことが考えられる。そこで、生体内において活性酸素種を産生する酵素である NOX に着目し、様々な NOX 阻害剤が TRPA1 の活性化に及ぼす影響を検討した。

HEK-TRPA1 に、NOX 阻害剤であるジフェニレンヨードニウム (DPI)、アポシニン、VAS2870、プルンバギン、2-アセチルフェノチアジン (2-APT) を添加し、細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼす影響について検討した。また、パッチクランプ法を用いた TRPA1 電流測定も行った。その結果、検討した全ての NOX 阻害剤が濃度依存的に HEK-TRPA1 の細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることが明らかになった。その EC_{50} 値は DPI、VAS2870、プルンバギン、2-APT では 0.3 ~ 3 μM 、アポシニンでは約 100 μM であり、NOX 阻害作用を示す濃度と非常に近いことが分かった。さらに、それらの TRPA1 活性化作用は HC-030031 により阻害された。パッチクランプ法を用いた実験結果より、DPI が TRPA1 電流活性化作用を有することも明らかになった。

以上の結果より、検討したすべての NOX 阻害剤が TRPA1 を活性化することが明らかとなった。これら NOX 阻害剤が TRPA1 を活性化させる機構を明らかにすることは、未知の部分が多く

残っている TRPA1 活性化メカニズムを解明する上で重要な鍵となると考えられる。

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 3 件)

(1) N. Hatano, H. Suzuki, Y. Muraki, K. Muraki.

TRPV4 partially participates in proliferation of human brain capillary endothelial cells.

Life Sci. 92: 317-324 (2013)

査読有, DOI: 10.1016/j.lfs.2013.01.002.

(2) N. Hatano, H. Suzuki, Y. Muraki, K. Muraki.

Stimulation of human TRPA1 channels by clinical concentrations of the anti-rheumatic drug, auranofin.

Am. J. Physiol. Cell Physiol. 304: C354-C361 (2013).

査読有, DOI: 10.1152/ajpcell.00096.2012.

(3) N. Hatano, Y. Itoh, H. Suzuki, Y. Muraki, H. Hayashi, K. Onozaki, I.C. Wood, D.J. Beech, K. Muraki.

HIF1 α switches on TRPA1 gene expression via a hypoxia response element-like motif to modulate cytokine release.

J. Biol. Chem., 287, 31962-31972 (2012).

査読有, DOI: 10.1074/jbc.M112.361139.

(学会発表) (計 10 件)

(1) 鈴木裕可、佐々木英至、波多野紀行、村木由起子、村木克彦

ジクロフェナクによる TRPM3 チャネル抑制作用
日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2013、2013 年 11 月 10 日 (鈴鹿); E-4

(2) 波多野紀行、鈴木裕可、村木由起子、大矢進、村木克彦

ヒト脳毛細血管内皮細胞において histamine により惹起される Cl^- 電流における anoctamin チャネルの寄与の検討

第 123 回日本薬理学会近畿部会、2013 年 7 月 12 日 (名古屋); B-5

(3) 波多野紀行、伊藤友香、鈴木裕可、村木由起子、林秀敏、小野寄菊夫、Wood Ian, Beech David、村木克彦

低酸素誘導因子 HIF1 α による TRPA1 チャネル発現制御機構

平成 25 年度日本薬学会東海支部総会・大会、2013 年 7 月 6 日 (名古屋); H1510

(4) 鈴木裕可, 波多野紀行, 村木由起子, 伊藤友香, 林秀敏, 小野寄菊夫, 村木克彦
NADPH オキシダーゼ阻害剤は TRPA1 チャネルを活性化する
日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 29 日(横浜); 29amp-123.

(5) 波多野紀行, 伊藤友香, 鈴木裕可, 村木由起子, 林秀敏, 小野寄菊夫, Wood Ian, Beech David, 村木克彦
滑膜線維芽細胞における TRPA1 発現誘導を介したサイトカイン分泌制御機構
日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 29 日(横浜); 29amp-118.

(6) 波多野紀行, 鈴木裕可, 村木由起子, 伊藤友香, 林秀敏, 小野寄菊夫, Wood Ian, Beech David, 村木克彦
炎症性刺激により誘導される TRPA1 は細胞内亜鉛濃度を制御する
日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 29 日(横浜); 29amp-117.

(7) Noriyuki Hatano, Yuka Itoh, Hiroka Suzuki, Yukiko Muraki, Hidetoshi Hayashi, Kikuo Onozaki, Ian Wood, David Beech, Katsuhiko Muraki.
Transcriptional regulation of transient receptor potential ankyrin 1 channel gene expression by hypoxia inducible factor-1 α .
第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 23 日(福岡); P3-89

(8) Noriyuki Hatano, Hiroka Suzuki, Yuka Itoh, Yukiko Muraki, Hidetoshi Hayashi, Kikuo Onozaki, Katsuhiko Muraki.
TRPA1 channel is a key regulator of intracellular Zn²⁺ in inflammatory synoviocytes.
第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 22 日(福岡); P2-98

(9) Hiroka Suzuki, Noriyuki Hatano, Yukiko Muraki, Yuka Itoh, Hidetoshi Hayashi, Kikuo Onozaki, Katsuhiko Muraki.
Potent activation of TRPA1 channel by NADPH oxidase inhibitors.
第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 21 日(福岡); P1-151

(10) Noriyuki Hatano, Yuka Itoh, Hiroka Suzuki, Yukiko Muraki, Hidetoshi Hayashi, Kikuo Onozaki, Ian Wood, David Beech, Katsuhiko Muraki.
Inflammatory stimulation induces expression of TRPA1 channel to regulate cytokine release.
第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 21 日(福岡); P1-99

(産業財産権)
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

(その他)
愛知学院大学薬学部薬効解析学講座 HP
http://www.phar.agu.ac.jp/lab/cell_pharm/cellpharmacol.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者
波多野 紀行(HATANO, Noriyuki)
愛知学院大学・薬学部・講師
研究者番号:50454319

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: