

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 12 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670260

研究課題名(和文) 生体にはパルス幅0.1ミリ秒の微弱電流を特異的に認識する受容体が存在する

研究課題名(英文) Biological significance of receptors for mild electrical currents at 0.1 ms pulse width

研究代表者

甲斐 広文 (Kai, Hirofumi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授

研究者番号：30194658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：パルス幅0.1ミリ秒の微弱電流の受容機構を解明するにあたり、電流がphysical stressとして受容されることを想定し、生体における物理的刺激受容体 Transient receptor potential (TRP) チャネルファミリーに着目した。本研究は、パルス幅0.1ミリ秒の微弱電流は TRPM7 に受容・認識され、特に kinase domain の機能によってその効果を発揮していることを示した。さらに、線虫を用いた個体レベルでの解析を目指したパルス幅0.1ミリ秒の微弱電流が生体防御作用およびそのメカニズムも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Electrical current at physiological strength has been applied as a therapeutic approach for various diseases. Several of our works showed that mild electrical stimulation (MES) at 0.1-ms pulse width has positive impact on organisms. But despite the growing evidence of the beneficial effects of MES, its effects on individual animals and the molecular underpinnings are poorly understood and rarely studied. We firstly and genetically demonstrated that MES exerts beneficial effects such as stress resistance and suppression of excess fat accumulation, via activation of LKB1-AMPK signaling pathway. In addition, we identified the receptor for the MES.

研究分野：薬理学、細胞生物学

キーワード：物理療法 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

地球上に存在するあらゆる生命は、灼熱から極寒まで過酷な地球環境の変動に暴露されつつも、その環境を受容・適応することで生存し、現代まで進化を遂げてきた。我々ヒトにおいてもそれは例外ではなく、暴露される様々な刺激を感知し、あらゆる環境に順応できるシステムを進化の過程で獲得している。このシステムを最大限に活用した人類の英知の結晶の一つが医薬品であろう。しかしながら、現代においてもその受容機構が明らかにされていない刺激も存在する。その代表的な例が電流である。これまで、生体に対する電流の作用については次の3つが明らかにされている。能動的な電気特性の、活動電位発生を伴う現象、受動的な電気特性の、抵抗損失による組織の発熱・変形・破壊、極めて微弱な電流の長期作用として、骨の発育や損傷治癒の促進作用等の、元来の生理機能に対する補助的効果。このうち、古来からその有用性が経験的に認知されていたにも関わらず、その生体の受容・作用メカニズムについては全く不明であった。そこで、申請者等は、物理療法 (Physical Medicine) の一種である温熱療法関連の研究から、脱分極を起こさない微弱な電流刺激が生体に与える作用に着目し、電流刺激を用いた新規疾患治療法の開発を目指し研究を実施している。

このような背景の中、申請者達は、独自の戦略で電流条件の最適化に挑戦した。その結果、生体が最も応答しうる「パルス幅 0.1 ミリ秒の微弱電流」の存在を世界に先駆けて見出し、医療へ応用が可能な新たな Physical Medicine の開発に至った (平成 24 年度課題解決型医療機器開発事業に採択)。開発に際し、種々の基礎検討および臨床試験を実施し、その医療応用への有用性を証明するエビデンスを構築してきた (*eBiomedicine* 2014; *PLoS ONE* 2014; *J. Biol. Chem.* 2013; *Diabetes* 2012; *J. Cell. Physiol.* 2012; *PLoS ONE* 2008, 2012; *J. Pharmacol. Sci.* 2008; *Int. J. Hyperthermia* 2009; *J. Surg. Res.* 2009 等で発表)。興味深いことに、我々が検討を行った種々の微弱電流条件において、パルス幅 0.1 ミリ秒を中心地とするベル型の用量依存的生体反応が観察された。これはあたかも医薬品 (Chemical Medicine) のような振る舞いで、パルス幅 0.1 ミリ秒という特定条件の微弱電流がまるで特異的な受容体に認識されて生体反応を誘導しているかの様であった。だが、本微弱電流の生体反応を理解する上で最も重要なことが明らかにできていない。それが、0.1 ミリ秒のパルス幅を有する微弱電流の作用点であった。

微弱電流は物理刺激 (physical stress) として、まず、個の細胞を規定する細胞膜に

影響を与えると考えられるが、一般に、細胞膜は電気抵抗が高いために、細胞内のシグナル分子に直接的に影響を与えることは想定しにくいことから、細胞の表層を流れる電流がどのようにして細胞内に刺激を与えるのかという疑問を持った。

申請者は、上述の観点から、パルス幅 0.1 ミリ秒の微弱電流を受容する、細胞膜表面上の何らかの受容体が存在し、この受容体を介した電流の受容機構は、申請者等が見出したような特定の電流条件でなければ応答しないのではないかと、という仮説を立てるに至った。そこで、本仮説の立証を目指し、以下に詳述する2つの解析を実施した。

2. 研究の目的

(1) パルス幅 0.1 ミリ秒の微弱電流を特異的に認識する受容体としての TRPM7 の検証

(2) 個体レベルでの解析を目指したパルス幅 0.1 ミリ秒の微弱電流がモデル生物線虫に与える作用およびそのメカニズムの解析

3. 研究の方法

細胞生物学、分子生物学、生化学的解析のための常法により、(1) 培養細胞レベル (2) 線虫を用いた個体レベルでの検討を行った。

4. 研究成果

(1) パルス幅 0.1 ミリ秒の微弱電流を特異的に認識する受容体としての TRPM7 の検証

パルス幅 0.1 ミリ秒の微弱電流の受容機構を解明するにあたり、電流が physical stress として受容されることを想定し、生体における物理的刺激受容体 Transient receptor potential (TRP) チャネルファミリーに着目した。特に、1) ユビキタスに発現すること、2) 申請者達が同定した微弱電流条件はインスリン非依存的なインスリン受容体の活性化 (=リン酸化) をはじめとし、その下流分子 Akt や、その他 MAPK, p53, AMPK 等の種々の分子のリン酸化を誘導することから TRP チャネルファミリーの中でも、唯一 kinase domain を有し、リン酸化活性を有する TRPM7 に焦点をあてた。

全 29 種類存在する TRP チャネルに対して広範に作用する阻害剤を用いてスクリーニング実験を行ったところ、驚くべきことに、TRPM7 に阻害活性を有する複数の薬物が微弱電流による Akt の活性化を抑制した。また、TRPM7 特異的阻害剤 NS8593 処理および TRPM7 ノックダウンにおいても同様の効果が確認された。一方、TRP チャネルはマグネシウムイオンチャネルとして機能することが報告されているが、微弱電流は細胞内マグネシウム濃度に影響を与えなかった。本知見は、パルス幅 0.1 ミリ秒の微弱電流は TRPM7 に受容・認識され、特に kinase domain の機能によってその効果を

発揮していることを示している。現在、CRISPR/Cas9 systemを用いた TRPM7 KO および常法による TRPM7 安定発現細胞、kinase domain 欠損 TRPM7 安定細胞株の樹立を進めている。今後、これらのツールを用い、仮説のさらなる解明を目指す。

(2) 個体レベルでの解析を目指したパルス幅 0.1 ミリ秒の微弱電流がモデル生物線虫に与える作用およびそのメカニズムの解析 (PLoS ONE 2014)

線虫は遺伝子レベルで細胞から個体まで解析可能な遺伝学的に優れたモデル生物である。申請者等は <研究目的1> の invitro の検討と並行し、線虫の利点を活かした個体レベルでの解析を行うことでパルス幅 0.1 ミリ秒の微弱電流の受容機構の解明に着手した。線虫には、哺乳類 TRP チャネルホモログが存在することから、微弱電流が線虫に与える表現型を TRP チャネルホモログ変異体線虫と比較検討することで、個体レベルでの微弱電流の受容機構解析が可能である。そこでまず、申請者等のこれまでの知見を参考に、微弱電流が線虫の表現型にどのような影響をもたらすのか検討を実施した。

微弱電流を処置した線虫をストレス条件下(熱ストレス、酸化ストレス)で培養したところ、生存率の上昇が確認され、ストレスに対して耐性が付与されていた。また、微弱電流処置群では、グルコース誘導性の過剰な脂肪蓄積が抑制された。微弱電流によるこれらの表現型は、ストレス感受性や脂質代謝制御の決定に重要な LKB1-AMPK 経路の変異株線虫では認められなかった。本知見より、微弱電流が個体レベルに与える影響を線虫を用いて明らかにし、微弱電流受容機構解析における線虫の有用性を示唆した。実際に、予備検討において、TRPM7 ホモログの変異株線虫では微弱電流による AMPK の活性化は顕著に抑制された。今度、TRPM7 ホモログ変異株線虫において微弱電流による表現型への影響が消失するか確認することで、微弱電流が個体レベルに与える表現型に対する TRPM7 の重要性を追求していく。さらに、その後はより高等動物であるマウスを用いた解析に移行する予定である。

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 5 件)

1. Kondo T, Motoshima H, Igata M, Kawashima J, Matsumura T, Kai H, Araki E. The role of heat shock response in insulin resistance and diabetes. *Diabetes Metab J.* 38(2),100-6(2014), 10.4093/dmj.2014.38.2.100. Review, 査読有

2. Kondo T, Ono K, Kitano S, Matsuyama R, Goto R, Suico MA, Kawasaki S, Igata M, Kawashima J, Motoshima H, Matsumura T, Kai H, Araki E. Mild Electrical Stimulation with Heat Shock Reduces Visceral Adiposity and Improves Metabolic Abnormalities in Subjects with Metabolic Syndrome or Type 2 Diabetes: Randomized Crossover Trials *EBioMedicine*.1(1),80-89(2014),10.1016/j.ebiom.2014.11.001, 査読有
3. Matsuyama S, Moriuchi M, Suico MA, Yano S, Morino-Koga S, Shuto T, Yamanaka K, Kondo T, Araki E, Kai H. Mild electrical stimulation increases stress resistance and suppresses fat accumulation via activation of LKB1-AMPK signaling pathway in *C. elegans*. *PLoS One*.9(12),e114690(2014),10.1371/journal.pone.0114690, 査読有
4. Fukuda R, Suico MA, Koyama K, Omachi K, Kai Y, Matsuyama S, Mitsutake K, Taura M, Morino-Koga S, Shuto T, Kai H. Mild Electrical Stimulation at 0.1-ms Pulse Width Induces p53 Protein Phosphorylation and G2 Arrest in Human Epithelial Cells. *J Biol Chem*, 288(22),16117-26(2013), 10.1074/jbc.M112.442442, 査読有
5. Hiraoka N, Arai Y, Takahashi KA, Mazda O, Kishida T, Honjo K, Tsuchida S, Inoue H, Morino S, Suico MA, Kai H, Kubo T. Mild electrical stimulation with heat stimulation increase heat shock protein 70 in articular chondrocyte. *J Orthop Res*.31(6):894-900(2013), 10.1002/jor.22307, 査読有

[学会発表](計 8 件)

1. 甲斐 広文, (「Chemical Medicine と Physical Medicine の併用療法の有用性」), 日本薬学会第 135 年会, 2015.3.25-28, 神戸学院大学(神戸)
2. 甲斐 広文, (Physical medicine の科学的エビデンス構築と有効な疾患モデル), 第 88 回日本薬理学会年会, 2015.3.18-20, 名古屋国際会議場(名古屋)
3. 甲斐 広文, (「Physical Medicine」の臨床的有用性とその科学的エビデンス), 第 22 回クリニカルファーマシーシンポジウム医療薬学フォーラム 2014, 2014.6.28-29, ビックサイト TFT ホール(東京)
4. Y. Kai, R. Fukuda, K. Omachi, Y. Okamoto, M. Suico, T. Shuto, H. Kai, (The effect of Mild Electrical Stimulation with Heat Shock on kidney dysfunction in type 2 diabetic KKAY mice.), The 2014 ascb/ifcb Meeting, 2014.12.6-10, Pennsylvania Convention Center(USA)
5. 甲斐広文, (新たな Physical Medicine ;

最適化された物理ストレスを活用した医療（予防）機器，第11回維持透析患者の補完・代替医療研究会,2013.12.8,名古屋ルーセントタワー（愛知）

6. H. Kai, T. Kondo, M.A. Suico, T. Shuto, E. Araki, (Beneficial effects and their molecular mechanisms of specific pulse width mild electrical stress as physical medicine), VI International Congress on Stress Proteins in Biology and Medicine, 2013.8.18-22, Edge conference Centre(UK)
7. S. Matsuyama, M. Moriuchi, M.A. Suico, T. Shuto, H. Kai, (Specific pulse width mild electrical stress increases stress resistance and suppresses fat accumulation via activation of LKB1-AMPK signaling pathway.), VI International Congress on Stress Proteins in Biology and Medicine, 2013.8.18-22, Edge conference Centre(UK)
8. Y. Kai, T. Koga, R. Fukuda, S. Morino-Koga, M. A. Suico, K. Koyama, T. Sato, T. Shuto, H. Kai, (Mild electrical stimulation with heat shock ameliorates nephritis and proteinuria in mouse model of X-linked alport syndrome.), 15th International congress of immunology, 2013.8.22-27, Mico Milano Congressi (ITALY)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://molmed730.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐 広文 (KAI HIROFUMI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：30194658

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：