

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460349

研究課題名(和文) iPS因子によるカチオンチャネルの転写制御とチャネル発現異常による疾患

研究課題名(英文) Transcriptional regulation of cation channels by iPS factors and the expression deficient diseases

研究代表者

村木 克彦 (Muraki, Katsuhiko)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：20254310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：iPS因子であるSox2やKlf4をHEK細胞に強制発現させ、TRP型カチオンチャネルに対する発現調節機構について検討した。その結果、Sox2の発現によりTRPC6、TRPM1、TRPM2、TRPM6、TRPV2の発現量増加、TRPA1の発現減少が観察された。一方、Klf4の発現によりTRPC5、TRPC6、TRPM2、TRPM4、TRPM6、TRPV2の大きな発現上昇、TRPC1の発現減少が観察された。以上のことから、iPS因子であるSox2やKlf4はイオンチャネルの遺伝子発現も制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We here examined effects of iPS factors, Sox2 and Klf4, on expression of TRP channels in HEK cells where iPS factors were heterologously expressed. Sox2 induced the expression of TRPC6, TRPM1, TRPM2, and TRPV2, whereas it reduced the expression of TRPA1. On the other hand, Klf4 induced the marked expression of TRPC5, TRPC6, TRPM2, TRPM4, TRPM6, and TRPV2, whereas it reduced the expression of TRPC1. These results suggest that iPS factors, Sox2 and Klf4, regulate gene-expression of ion channels. In this study, we also demonstrate that differentiation of non-neuronal cell line neuroblastoma to neuron induces functional expression of TRPM3.

研究分野：薬効解析学

キーワード：iPS カチオンチャネル 転写

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の発現制御は、生物の生老病死に深く関わる生命現象の一つであり、古くからその仕組みの解明が精力的に行われ、多くの知見が集積されてきた。とくに近年のこの領域における最大の進歩は、細胞を未分化状態に戻す誘導多能性幹細胞因子 (iPS 因子 = 山中因子) とよばれる4つの転写因子の発見であり、疾病の治療戦略に再生医療を急速に加えつつある。さらに高度に分化した再生ヒト組織や再生病態組織を利用し、ヒト組織での薬物の標的探索や副作用解析などが可能となり、新薬の開発が飛躍的に進歩する可能性もある。このように細胞の遺伝子発現に強力な作用を示す iPS 因子は、当然のことながら疾病の発症や進展にも影響すると考えられる。すなわち本来なら抑制された遺伝子発現が iPS 因子で過剰に働き、細胞機能を変えることもありうる。

イオンチャネルは細胞の電気興奮性を制御するとともに、イオンの輸送を担うタンパク質であるが、このイオンチャネルもその遺伝子発現が種々の転写因子により制御されている。しかしイオンチャネル研究はこれまで、その機能解析や新規作用薬・遮断薬の開発が中心であり、イオンチャネルの発現制御機構の解明やその発現変化が関わる疾患の探索、発現制御機構を標的とした薬物開発などは、進んでいないのが現状である。とくにイオンチャネルの転写機構の詳細やその異常ともなう疾患、イオンチャネルの転写異常が薬物の副作用の原因となる可能性などは、ほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、Ca透過性のカチオンチャネルである TRPV1~TRPV4 チャンネルについて、強力な転写因子として機能しうる iPS 因子 (Sox2 および KIF4) を用い、チャンネルの転写調節機構を明らかにする。とくに一部の iPS 因子がチャンネルの遺伝子発現を増加させることを見出しており、その転写制御や最近報告されたがん化ともなう TRPV2 チャンネルの発現変化、リウマチ患者由来細胞における TRPV1 チャンネルの機能変化の詳細などを、イオンチャネルの転写制御とチャンネル発現異常による疾患の観点から検討する。また TRP 型カチオンチャネルのひとつである TRPM3 チャンネルについても非神経細胞を神経型細胞へ分化させるとその発現が増加することを見出したので併せて報告する。

3. 研究の方法

(1) 細胞の培養 ヒト神経芽細胞腫細胞

(IMR322) は Cell Applications より、HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞株) はヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手した。細胞は、DMEM に 100 U/ml ペニシリン G、100 µg/ml ストレプトマイシン及び 10% 非働化 FBS を加えて、5% CO₂ 存在下 37 °C で培養した。

(2) RNA 抽出と逆転写酵素反応および PCR 法・定量的 PCR 法 AGPC 法により total RNA を抽出し (0.2 µg/µl に調製) 標準のプロトコール (Applied Biosystems 社) により逆転写反応を行った。PCR 法による遺伝子の増幅には各ターゲット遺伝子特異的なプライマー (human) を用いた。定量的 PCR 法は SYBR Green を用いたインターカレーター法により検討した。-actin を内部標準として使用し、各遺伝子の発現を相対値で表した。

(3) 細胞の分化 IMR32 は 5 µM プロモデオキシウリジン (BrdU) 処理を 2 日おきに 14 日間行うことで神経型 (nIMR32) へと分化させた。

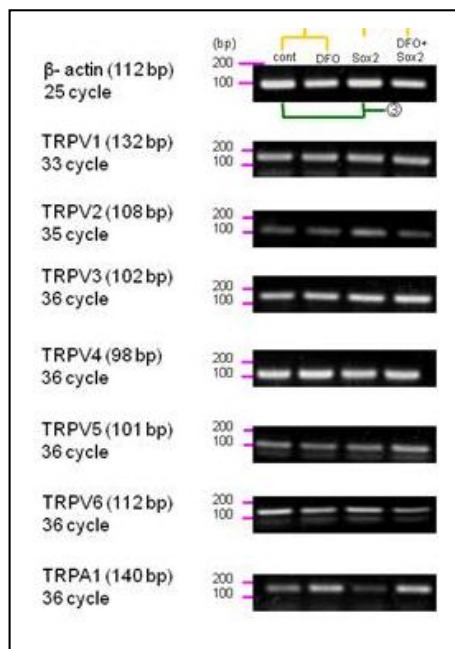
(4) 細胞内 Ca 濃度の測定 細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 測定には、蛍光指示薬として fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2 AM) を用いた。細胞内色素を 340 nm 及び 380 nm の励起光で励起し、放出された 510 nm の各々の蛍光を高感度カメラで取得し、その蛍光強度比を算出した。

(5) 遺伝子導入 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 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 社のプロトコー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。

4. 研究成果

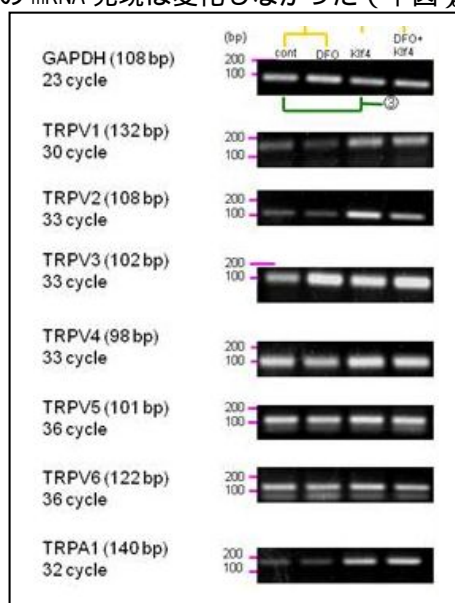
(1) HEK293 の TRP チャンネル mRNA 発現量に対する Sox2 強制発現の効果

HEK293 に DFO 300 □M 刺激 (24hr)、Sox2 強制発現 (36hr)、DFO 300 □M 刺激 + Sox2 強制発現した後、RNA を回収し、RT-PCR を行った。その結果、TRPV サブファミリーおよび TRPA1 チャンネルでは、Sox2 を強制発現することで、TRPV2 mRNA の発現増加および TRPA1 mRNA の発現減少が観察された。一方、TRPV1、V3、V4、V5、V6 の mRNA 発現量は変化しなかった。また低酸素刺激で TRPA1 mRNA の発現量増加が確認できたが、TRPV6 の mRNA 発現は減少した。一方、TRPV1、V2、V3、V4、V5 の mRNA 発現量は変化しなかった。Sox2 の強制発現と低酸素刺激で、TRPA1 の mRNA 発現の増加と、TRPV2、V6 の mRNA 発現の減少が確認できた。TRPV1、V3、V4、V5 の mRNA 発現量は変化しなかった (次項)。



(2) HEK293 の TRP チャンネル mRNA 発現量に対する Klf4 強制発現の効果

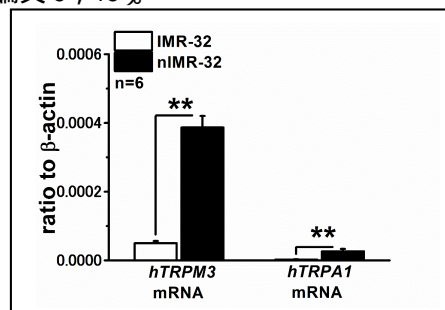
HEK293 に DFO 300 □ M 刺激 (24 hr) , Klf4 強制発現 (36 hr) , DFO300 □ M 刺激 + Klf4 強制発現した後、RNA を回収し、RT-PCR を行った。その結果、TRPV サブファミリーおよび TRPA1 チャンネルでは、Klf4 を強制発現することにより、TRPV2 の mRNA 発現が大きく増加した。また TRPV1、V3、A1 の mRNA 発現も増加したが、TRPV4、V5、V6 の mRNA 発現は変化しなかった。低酸素刺激により、TRPV3 の mRNA 発現が増加したが、TRPV1、V2、V4、V5、V6、A1 の mRNA 発現は変化しなかった。Klf4 を強制発現し、さらに低酸素刺激を行うと、TRPV3 の mRNA 発現は増加したが、TRPV2 の mRNA 発現は減少した。一方、TRPV1、V4、V5、V6、A1 の mRNA 発現は変化しなかった (下図)。



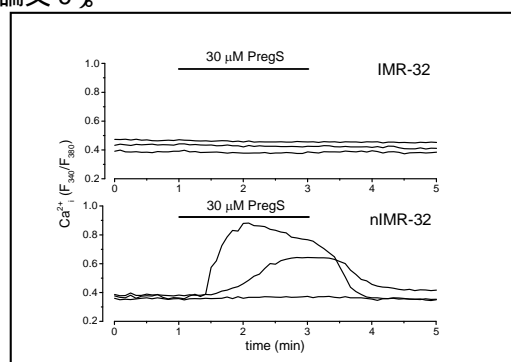
(3) 神経型細胞への分化に伴う TRPM3 の発

現増強と機能発現

非神経型の IRM32 細胞が神経型 IRM32 細胞 (nIRM32) に分化すると、侵害受容器の一種である TRPA1 が機能発現する (下図参照、発表論文 5, 15)。



そこで細胞分化で、他の TRP チャンネルが機能発現する可能性について検討した。BrdU 処理により、IRM32 細胞を nIRM32 に分化させたところ、神経ステロイド感受性の TRPM3 チャンネルの発現が有意に増加し、神経ステロイドのプレグネロン硫酸によって、細胞内 Ca 濃度が上昇することを見出した (下図参照、発表論文 5)。



(4) まとめ

今回、我々が見出した IPS 因子や神経分化による TRP チャンネルの発現調節は、疾病時のチャンネル発現変化を説明する可能性がある。今後はこうした発現調節機構の詳細を明らかにしたい。

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 15 件)

. Rubaiy HN, Ludlow MJ, Henrot M, Gaunt HJ, Miteva K, Cheung SY, Tanahashi Y, Hamzah N, Musialowski KE, Blythe NM, Appleby HL, Bailey MA, McKeown L, Taylor R, Foster R, Waldmann H, Nussbaumer P, Christmann M, Bon RS, Muraki K & Beech DJ. Picomolar, selective and subtype specific small-molecule inhibition of TRPC1/4/5 channels. *J. Biol. Chem.* **292**, 8158-8173 (2017). 査読あり

. K Sakamoto, Y Suzuki, H Yamamura, S Ohya, K Muraki & Y Imaizumi, Molecular mechanisms underlying pimaric acid-induced

modulation of voltage-gated K⁺ channels. *J. Pharmacol. Sci.*, **133**, 223-231 (2017). 査読あり

. MJ Ludlow, HJ Gaunt, HN Rubaiy, KE Musialowski, NM Blythe, NS Vasudev, K Muraki & DJ Beech, (-)-Englerin A-evoked Cytotoxicity is Mediated by Na⁺ Influx and Counteracted by Na⁺ /K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **292**, 723-731 (2017). 査読あり

. M. Fujimoto, T. Inoue, H. Kito, S. Niwa, T. Suzuki, K. Muraki & S. Ohya, Transcriptional repression of HER2 by ANO1 Cl⁻ channel inhibition in human breast cancer cells with resistance to trastuzumab. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **482**, 188-194 (2017). 査読あり

. H Suzuki, E Sasaki, A Nakagawa, Y Muraki, N Hatano & K Muraki. Diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, is an antagonist of human TRPM3 isoforms. *Pharmacol Res & Persp* **4**, e00232 (2016). 査読あり

. S. Ohya, H. Kito, N. Hatano & K. Muraki, Recent advances in therapeutic strategies that focus on the regulation of ion channel expression. *Pharmacol & Therap* **160**, 11-43 (2016). 査読あり

. S. Ohya, S. Kanatsuka, N. Hatano, H. Kito, A. Matsui, M. Fujimoto, S. Matsuba, S. Niwa, P. Zhan, T. Suzuki & K. Muraki, Downregulation of the Ca²⁺-activated K⁺ channel KCa3.1 by histone deacetylase inhibition in human breast cancer cells. *Pharmacol Res & Persp* **4**, e00228 (2016). 査読あり

. Moilanen LJ, Hämäläinen M, Lehtimäki L, Nieminen RM, Muraki K & Moilanen E. Pinosylin Inhibits TRPA1-Induced Calcium Influx In Vitro and TRPA1-Mediated Acute Paw Inflammation In Vivo. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **118**, 238-242 (2016). 査読あり

. J Naylor, A Minard, H Gaunt, M Amer, L Wilson, M Migliore, S Cheung, H Rubaiy, N Blythe, K Musialowski, M Ludlow, W Evans, B Green, H Yang, Y You, J Li, C Fishwick, K Muraki, D Beech & R Bon. Natural and synthetic flavonoid modulation of TRPC5 channels. *Brit. J. Pharmacol.*, **173**, 562-574 (2016). 査読あり

. Y. Akbulut, H. Gaunt, K. Muraki, M. Ludlow, M. Amer, A. Bruns, N. Vasudev, L. Radtke, M. Willot, S. Hahn, T. Seitz, S. Ziegler, M. Christmann, D. Beech & H. Waldmann. (-)-Englerin A is a potent and selective activator of TRPC4 and TRPC5 calcium channels. *Angewandte Chemie Int. Ed.*, **54**, 3787-3791 (2015). 査読あり

. K. Muraki, N. Hatano, H. Suzuki, Y Muraki, Y. Iwajima, Y. Maeda & H. Ono. Oseltamivir blocks human neuronal nicotinic acetylcholine receptor-mediated currents. *Basic Clin.*

Pharmacol. Toxicol., **116**, 87-95 (2015). 査読あり

. Li J, Hou B, Tumova S, Muraki K, Bruns A, et al. Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force. *Nature*, **515**, 279-282 (2014). 査読あり

. K. Muraki & H. Ono. Human nicotinic acetylcholine receptor is a potential pharmacological target of oseltamivir. *Receptors & Clin. Invest. Research Highlight*, **1**, e360 (2014). 査読あり

. S. Matsuba, S. Niwa, K. Muraki, S. Kanatsuka, Y. Nakazono, N. Hatano, M. Fujii, P. Zhan, T. Suzuki & S. Ohya. Downregulation of Ca²⁺-activated Cl⁻ channel TMEM16A by the inhibition of histone deacetylase in TMEM16A-expressing cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **351**, 510-518 (2014). 査読あり

. H. Suzuki, N. Hatano, Y. Muraki, Y. Itoh, S. Kimura, H. Hayashi, K. Onozaki, Y. Ohi, A. Haji & K. Muraki. The NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium activates the human TRPA1 nociceptor. *Am. J. Physiol., Cell-Physiol.* **307**, C384-C397 (2014). 査読あり

[その他]

http://www.phar.agu.ac.jp/lab/cell_pharm/cellpharmacol.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村木克彦 (MURAKI KATSUHIKO)
愛知学院大学・薬学部・教授
研究者番号：20254310

(2)研究分担者

波多野紀行 (HATANO NORIYUKI)
愛知学院大学・薬学部・講師
研究者番号：50454319

鈴木裕可 (SUZUKI HIROKA)
愛知学院大学・薬学部・助教
研究者番号：00581026