

神経細胞の TRPA1 活性に与えるオーラノフィンと有害金属の複合影響

研究代表者：鈴木裕可（生命薬学ユニット）

研究分担者：李辰竜（生命薬学ユニット）

TRP (Transient receptor potential) チャネルは、6回膜貫通領域を有するカチオンチャネルであり、温度変化、化学刺激、浸透圧刺激、pH変化、痛み、酸化ストレスなど多岐にわたる刺激により活性化される。これまでに、生体機能に様々な影響を及ぼすことや、様々な疾患の発症・成因に関与することが明らかとなっており、新たな創薬標的として期待されている。

また、我々は生活環境下において、Cd (Cadmium) およびMeHg (Methylmercury) のような有害金属類に食物などを介して常に曝されている。有害金属類は様々な細胞機能に影響を与えることが報告されており、有害金属類が長期間にわたって体内に蓄積されることにより、生体に多くの作用を示すことが考えられる。これまでに、Zn (Zinc) やCd、Cu (Copper) など多くの有害金属類がTRPチャネルの活性を制御することが報告されており、これら有害金属類が生体内において示す作用にTRPチャネルが関与することも推察される。

そこで本研究では、神経細胞や腎近位尿管上皮細胞のTRPチャネル活性に有害金属類が及ぼす影響を検討した。

1) 有害金属類が神経細胞の TRPA1 (TRP ankyrin1) 機能発現に及ぼす影響

TRPA1は、感覚神経に発現しており、MO (Mustard Oil) などの刺激物、pH変化、冷感刺激など様々な刺激により活性化されるTRPチャネルである。これまでに、喫煙や炎症による気管における痛みや、プロスタグランジンなどの炎症性メディエーターや細胞内アルカリ化による痛みに関与することが報告されている。

我々はこれまでに、関節リウマチの治療に用いられるAUR (Auranofin) がTRPA1を特異的に活性化し、副作用として生体に痛みを引き起こす可能性を報告している (Hatano et al., *Am J Physiol Cell Physiol* 304(4): C354, 2013)。そこで、AURによるTRPA1活性化作用に有害金属類 [Cu、Cd、As (Arsenic)、Hg (Inorganic mercury)、MeHg] が及ぼす影響を検討することにより、AURを服用する際の有害金属類の摂取制限を提案することを目的として検討を行った。

検討には、ヒト腹部神経芽細胞腫であるIMR-32を用い

た。IMR-32は、BrdU (Bromodeoxyuridine) 処理により末梢神経型の細胞へと分化することが報告されており、神経細胞のモデル細胞として広範囲に使用されている細胞である。これまでにIMR-32をBrdU処理することにより、TRPA1が機能発現することが報告されている。

そこで本研究では、IMR-32を分化させ、有害金属類 (Cu、Cd、As、Hg、MeHg) を添加し、TRPA1 mRNA発現および細胞内Ca²⁺濃度の変化を検討することにより、重金属類が神経細胞のTRPA1活性に及ぼす影響を検討した。

その結果、検討した全ての重金属類は分化型IMR-32におけるTRPA1 mRNA発現、TRPA1機能に大きな影響を及ぼさなかった。そのため、神経細胞のTRPA1活性に与えるAURと有害金属の複合影響を検討するには至らなかった。(実施者：細胞内Ca²⁺濃度測定・鈴木 (生命薬学ユニット)、mRNA発現測定・李 (生命薬学ユニット))

2) 有害金属類が近位尿管上皮細胞の TRP チャネル機能発現に及ぼす影響

これまでに、様々な有害金属類が腎臓に蓄積されることにより生体において腎障害を引き起こすことが報告されている。そこで、Cd、Asが腎近位尿管上皮細胞のTRPチャネルに及ぼす影響を検討した。

検討には、ヒト由来の腎近位尿管上皮細胞であるHK-2を用いた。まず、HK-2にCdまたはAsを作用させ、TRPA1活性化薬であるMO、TRPV1活性化薬であるcapsaicin、TRPV1-3活性化薬である2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl borate)、TRPV4活性化薬であるGSK1016790A、TRPM3活性化薬であるPregnenolone sulfate、TRPM8活性化薬であるMentholを添加し、細胞内Ca²⁺濃度に及ぼす影響を検討した。また、TRPチャネルのmRNA発現およびタンパク質発現に及ぼす影響、さらにTRPチャネル活性化薬がCdおよびAsによるHK-2細胞毒性発現に及ぼす影響を検討した。

その結果、CdまたはAs処理により、2-APBによる細胞内Ca²⁺濃度上昇作用の増強、TRPV2、TRPV3 mRNA発現の増加、TRPV3タンパク質発現の増加が観察された。さらに、2-APBはHK-2におけるCd毒性発現作用に影響を及ぼさなかった一方、As毒性発現作用を増悪させた。

そこで、TRPV2、TRPV3をノックダウンしたHK-2を用いて細胞毒性に及ぼす影響を検討したところ、TRPV2、TRPV3ノックダウンにより2-APBによるAs毒性発現作用の憎悪が抑制されたことから、2-APBによるAs毒性発現作用の憎悪にはTRPV2、TRPV3が関与する可能性が考えられた。(実施者：細胞内Ca²⁺濃度測定・鈴木（生命薬学ユニット）、mRNA発現測定、タンパク質発現測定、細胞毒性測定・李（生命薬学ユニット）)

以上の結果より、有害金属類が腎近位尿細管上皮細胞のTRPチャネルの機能発現を変化させることにより、腎機能に影響を及ぼす可能性が考えられた。今後、様々な細胞においても同様の検討を行うことにより、有害金属類が生体に及ぼす影響について、多くのことが明らかになると期待される。

研究成果発表

なし