課題番号	23若22

若手研究者助成金　実績報告書

令和6年4月30日

氏　　名：　　山口　卓哉
所属・資格：生物資源科学部・　　専任講師
実施研究所：生物資源科学部・動物医科学研究センター

1　研究課題

和文表記（40字以内）
TRP チャネルを介して単球や単球由来マクロファージを調節し、炎症を制御できないか

英文表記
The roles of TRP channel families in controlling monocytes and monocyte-derived macrophages.

2　研究期間

令和５年度

※令和　年度　～　令和　年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

3　研究目的

マクロファージは炎症を惹起して生体防御反応を開始させるが、炎症が進展してくると反対に炎症を抑制して恒常性の回復を図る。マクロファージは周囲の微小環境の変化を感知することでこのような機能的変化をおこすが、そのメカニズムには不明な点が多い。近年、多様な環境変化を感知する Transient receptor potential (TRP) チャネル群の一部がマクロファージに存在し、その細胞機能に関わっていることが分かってきた。本研究では、免疫系が関係する炎症病態で重要な細胞である単球やマクロファージの活性化あるいは抑制機構における TRP チャネルの役割を明らかにし、TRP チャネルを介した炎症制御の可能性を探ることを目的とする。

4　研究概要

TRP チャネルとは、温度・pH・機械刺激など多様な刺激によって活性化・開口する非選択的カチオンチャネル群であり、細胞の生理活性を制御する上での起点となる。前述のように、TRP チャネルは免疫系細胞においても発現しており、マウス単球には TRPV2, TRPM2, TRPM7 が主に発現していることが知られている。申請者らは、獣医療の主な治療対象でありヒト疾患モデルとしても重要なイヌ (ビーグル犬) の単球に富む末梢血単核球においても、同様の発現パターンであることを確認している。これらの TRP チャネルのうち、TRPM2 は炎症などの酸化ス

トレス条件下において 過酸化水素 (H_2O_2) 等の活性酸素種 (ROS) によって間接的に活性化され、炎症性サイトカイン IL-8 や CXCL2 の産生に関与していることが報告されている (図 1)。しかし、マウスやヒト以外の哺乳類では単球・マクロファージの機能調節における TRPM2 チャネルの役割は明らかにされていない。TRP チャネルにはその刺激応答性に大きな種差が認められるものもあるため、種を超えた比較解析が必要である。

そこで本研究では、イヌ単球の活性化やサイトカイン産生に TRPM2 が関与しているのかを明らかにするため、イヌの末梢血から分離した単核球集団 (PBMC) と、イヌ TRPM2 強制発現 HEK293 細胞 (HEK293-cTRPM2) を H_2O_2 で刺激し、Ca^{2+} イメージング法、パッチクランプ法 (穿孔パッチ法) ならびに RT-qPCR 法によるサイトカイン遺伝子発現解析 (PBMC のみ) によって反応性を解析した。なお、PBMC は、研究用生体試料として市販されているイヌ血液から分離した。

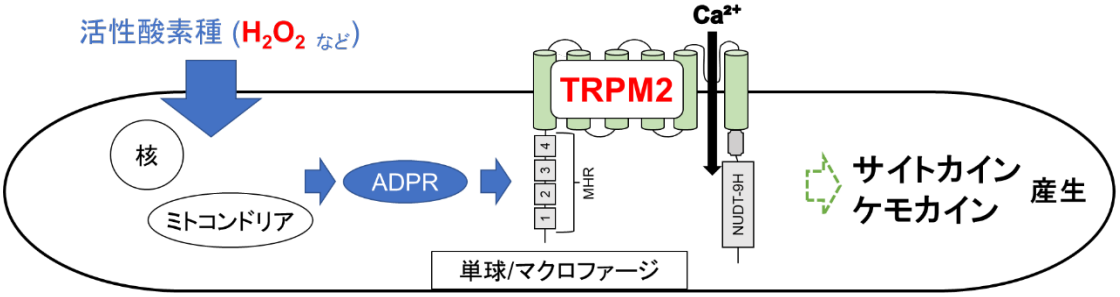
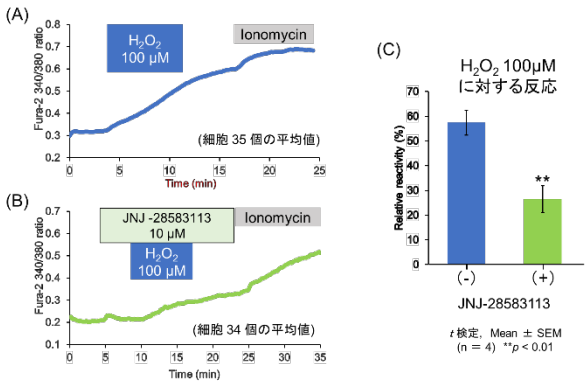


図 1　TRPM2 を介した活性酸素種による単球／マクロファージの活性化

5　研究結果

① - 1. イヌ PBMC における H_2O_2 刺激に応答した細胞内 Ca^{2+} の上昇と、TRPM2 阻害剤による反応の抑制

イヌ PBMC をガラス片上に播種して一晩培養した後、接着している細胞を対象にカルシウムイメージングを行ったところ、H_2O_2 100 μM の刺激に反応した細胞内カルシウムイオンレベル上昇がみられた (図 A)。また、その反応は選択性の高い TRPM2 阻害剤である JNJ-28583113 によって抑制された (図 B)。JNJ-28583113 は H_2O_2 に対する反応を有意に抑制したが、完全な抑制には至らず、JNJ-28583113 非存在下での反応の 6 割程度の抑制に止まった (図 C)。

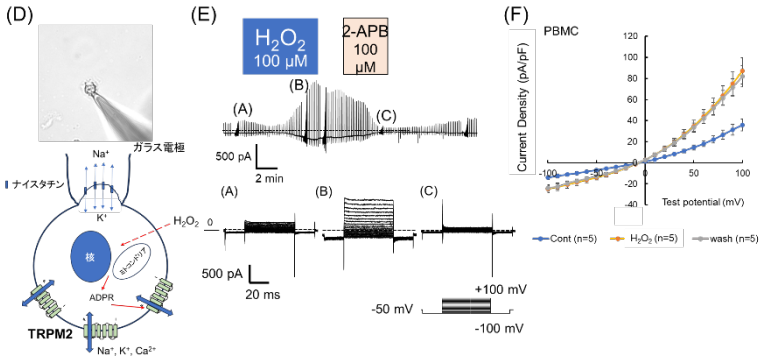


① - 2. イヌ PBMC における H_2O_2 刺激による膜電流の増加

課題番号	23 若 22

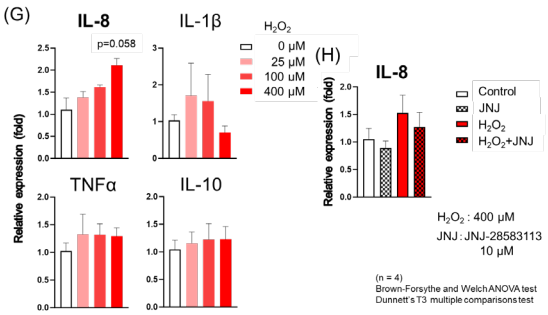
〔5 研究結果(つづき)〕

穿孔パッチ法によって PBMC のホールセル電流を測定し、H_2O_2 100 μM 刺激による細胞膜上のイオンチャネルの活性化があるか調べた (図 D)。膜電位は −50 mV に保持し、−100 ～ 100 mV のステップパルスを与えて、膜電流を検出した。(A), (B), (C) に対応した各時点での電流トレースを重ね書きし (図 E)、5 例の実験における電流電圧関係を示した (図 F)。イヌ PBMC において H_2O_2 刺激による外向きおよび内向き電流の増加がみられ、その反応は H_2O_2 を washout した後でも持続していた。また、この反応は TRPM2 阻害効果がある 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) や、JNJ-28583113 によって抑制された。一方で、PBMC の中にはこのような反応を示さない細胞も認められた。



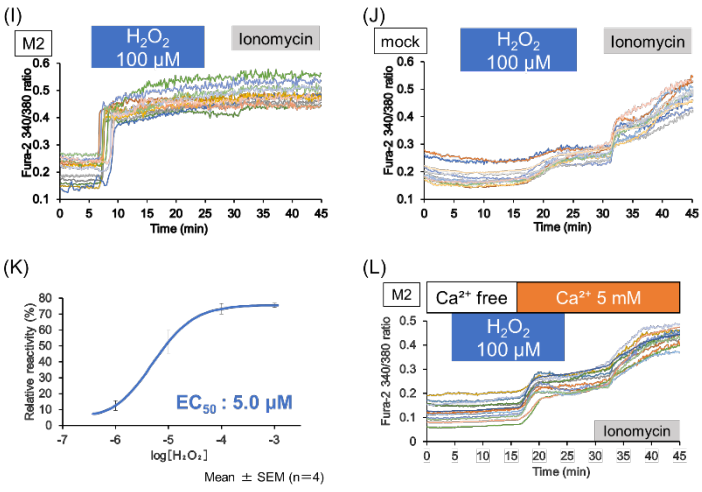
① - 3. イヌ PBMC における IL-8 遺伝子発現調節への TRPM2 の関与

イヌ PBMC を H_2O_2 存在下で 2 時間インキュベートし、単球が産生する種々のサイトカインの遺伝子発現量の変化を RT-qPCR 法で調べた。炎症反応を抑制するサイトカインである IL-10 の遺伝子発現量に変化は見られなかった一方で、好中球機能を刺激する炎症性サイトカインである IL-8 の遺伝子発現量は H_2O_2 濃度依存的に増加する傾向にあった (図 G)。また、JNJ-28583113 存在下で同様の刺激を行ったところ、この IL-8 の遺伝子発現量の増加は抑制される傾向にあった (図 H)。



② - 1. HEK293-cTRPM2 における H_2O_2 刺激に応答した細胞内への Ca^{2+} の流入

HEK293-cTRPM2 を用いてカルシウムイメージングを行ったところ、H_2O_2 100 μM による刺激に反応し、細胞内カルシウムイオンレベルが上昇した (図 I)。一方、TRPM2 遺伝子を導入していない HEK293 細胞では、H_2O_2 100 μM を 15 分程度灌流すると細胞内カルシウムイオンレベルがわずかに上昇したものの、明らかな上昇は見られなかった (図 J)。HEK293-cTRPM2 における H_2O_2 刺激に応答した細胞内カルシウムイオンレベルは H_2O_2 濃度依存的に上昇し、EC_{50} の値は 5.0 μM と算出された (図 K)。HEK293-



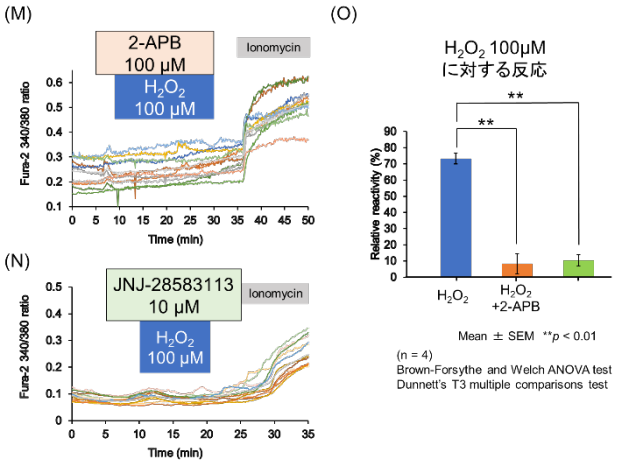
課題番号	23 若 22

〔5 研究結果（つづき）〕

cTRPM2 にカルシウム非添加の条件下で H_2O_2 を作用させた場合は、細胞内カルシウムイオンレベルは上昇しなかったが、還流液にカルシウムを添加すると急速に上昇し、H_2O_2 刺激に反応した細胞内カルシウムイオンレベルの上昇は主に細胞外からの流入によるものであることがわかった (図 L)。

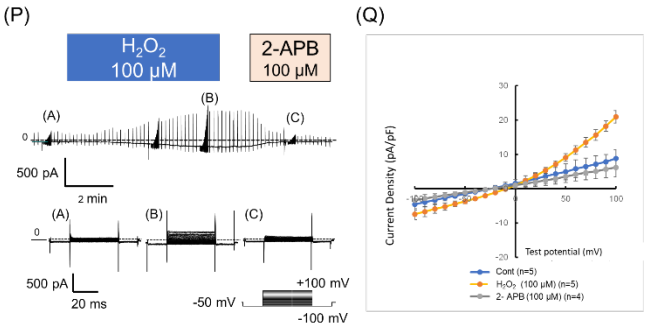
② - 2. HEK293-cTRPM2 における H_2O_2 刺激に対する反応の TRPM2 阻害剤による著しい抑制

HEK293-cTRPM2 における H_2O_2 100 µM に対する反応は、2-APB (図 M) および JNJ-28583113 (図 N) によってほとんど抑制された。これらの薬物による HEK293-cTRPM2 における H_2O_2 に対する反応の抑制は有意であり、9 割程の強い抑制が認められた (図 O)。



② - 3. HEK293-cTRPM2 における H_2O_2 刺激による膜電流の増加

イヌ TRPM2 の電気生理学的特性を調べるため、穿孔パッチ法によって HEK293-cTRPM2 におけるホールセル電流を測定した。イヌ PBMC を用いた解析 (① - 2) と同様に、H_2O_2 刺激により持続的な電流の増加がみられ、また、その反応は 2-APB によって抑制された (図 P, Q)。



以上の結果をまとめると、イヌ PBMC では、H_2O_2 刺激により活性化する細胞が見られ、IL-8 の遺伝子発現が上昇傾向にあった。また、これらの反応は TRPM2 阻害剤によって部分的に抑制されたことから、細胞活性化の機序の一つとして TRPM2 の関与が考えられた。HEK293-cTRPM2 を用いた解析により、イヌ TRPM2 が H_2O_2 によって活性化することが確認された。

これらのことから、イヌ PBMC に含まれる単球などの細胞は TRPM2 を一部介して H_2O_2 により活性化し、IL-8 を産生することで、好中球の走化性を誘導するなどの免疫応答を調節していることが示唆された。

課題番号	23若22

6　将来獲得を目指す学内外の競争的資金の種類　（※研究計画書に記載したものを記入すること）

科研費(基盤研究 B、挑戦的研究)，学内：日本大学特別研究、生物資源科学部学術助成研究費

7　本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

氏　　名	申請年度	研 究 種 目	研　究　課　題	採・否
山口　卓哉	令和6年度	（公財）薬理研究会・研究助成	NASH病態形成に関わるクッパー細胞亜集団の役割と TRP チャネルを介した制御	申請中

8　学会発表等

要旨集の抜き刷り，発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会，発表会名等	発表テーマ	発表年月
上田　直斗 水野　真孝	第97回 日本薬理学会年会 第6回 日本獣医薬理学・毒性学会 春季研究会	イヌ末梢血単核球に発現する TRPM2 の性状解析 TRPM2 はマウス肝マクロファージにおける 炎症性サイトカインの遺伝子発現に関わる	2023年12月 2024年3月

9　著書・雑誌論文

論文作成中

著書，雑誌，抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所

１０　本研究課題に関するその他の発表（新聞，一般雑誌掲載等）

なし

課題番号	23若22

１１　他の研究への発展

本研究の結果から、イヌ単球における H_2O_2 などの酸化ストレス受容には、TRPM2 以外にも経路が存在することが示唆された。単球に存在する他の TRP チャネルに目を向けてみると、マウスでは TRPM7 が酸化ストレス感受性を持つチャネルとして知られていることから、TRPM7 を含む他の分子機構が関与していることが考えられる。これらの点を踏まえ、本研究を含めた今後の研究において検討していく予定である。

１２　その他の成果

該当なし

１３　本研究課題による発明届の提出及び知的財産権の出願・取得状況

該当なし

名　　称	知的財産の種類	発　明　者 （考案者・創作者）	権　利　者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日

※ホームページ等での公開（■可・□否）いずれかをチェックしてください。
否の場合は，理由書を別途添付のこと。