

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト GH 産生下垂体細胞における非選択性陽イオンチャネルの活性化機構
指導教官 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院 医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士過程

内科学専攻

氏名 野口 貴史

細胞は、その内外で各イオンの濃度構成が異なっている。細胞膜にはチャネル蛋白が散在しており、細胞はこのチャネルの開閉を司ることで、そのチャネルを透過するイオンの流入や流出を調節できる。特に興奮性細胞においては、チャネル開閉機構によって細胞内イオン組成を大きく変え、細胞内電位を短時間のうちに変化させることを可能にしている。チャネルの種類としては、特定のイオンに特に高い透過性を示す、 Na^+ チャネルや電位依存性 K^+ チャネルなどが早くから知られていた。しかしその一方で、イオン選択性の比較的低い、非選択性陽イオンチャネルと呼ばれる性質のチャネルもさまざまな組織で存在することが分かっていた。下垂体細胞においても、これまでに我々の研究室において、GH 産生下垂体細胞で GHRH が非選択性陽イオン電流を活性化することや、ACTH 産生下垂体細胞で CRH が非選択性陽イオン電流を活性化することを確認している。

実際に非選択性陽イオンチャネルとして機能しているのはどのような蛋白があるのか、その同定は近年まであまりなされていなかった。しかし、TRPC チャネル

ファミリーや TRPV チャンネルファミリーといった蛋白群が近年相次いで発見され、その多くは非選択性陽イオンチャンネルを形成することが明らかとなった。実際にこれらの蛋白の一部は、今までに同定されていなかった非選択性陽イオンチャンネル分子の候補として挙げられている。

今回、ghrelin や IGF I が下垂体前葉 GH 分泌細胞に作用する際においても、GHRH 刺激の場合と同じように非選択性陽イオン電流が活性化されており、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇や GH 分泌促進といった反応に関与していることが判明した。今回の一連の研究では、これらの非選択性陽イオン電流の活性化機構やその性質について検討を行った。

実験の方法としては、その対象として、GH 産生が認められるヒト下垂体前葉腺腫細胞を初代培養して用いた。電気生理学的実験はナスタチンを用いた perforated whole-cell clamp 法によって行った。また fura 2 を用いて $[Ca^{2+}]_i$ を測定した。抗 TRPV2 抗体を用いた免疫細胞化学染色および RT-PCR により、細胞の TRPV2 の発現を確認した。

実験の結果、ghrelin の投与によって脱分極と活動電位の頻度増加がおり、電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャンネルを介した $[Ca^{2+}]_i$ の一相性の増加が認められた。脱分極の際には内向きの膜電流が発生しており、その反転電位から、非選択性陽イオン電流であることが判明した。 Ca^{2+} に対する透過性は認められなかった。内向き電流は Na^+ の細胞内への流入によるものであった。また、PKC を薬理的に阻害すると、内向き電流の活性化や $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は認められなくなり、GH 分泌量についても ghrelin による増加が抑制された。一方で、PKA や PI3 kinase を阻害しても ghrelin による膜電流活性化や $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は抑制されず、ghrelin による GH 分泌促進作用も抑制されなかった。このことから、この現象は PKC を介した伝達経路によるものであり、それが ghrelin の GH 分泌作用に実際に関わっている可能性が考えられた。まとめると、ghrelin が投与された際には、PKC を介する伝達経路によって非選択性陽イオン電流が活性化し、 Na^+ 流入によって脱分極が起こって電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャンネルが開き、 Ca^{2+} 流入による $[Ca^{2+}]_i$ 増加が起こるものと考えられ、この $[Ca^{2+}]_i$ 増加が GH 分泌を促進させていることが推測される。ghrelin のこのような作用機構は、マウスやブタで今までに観察された作用機構とは異なるものであり、種による差異が大きいことが明らかとなった。また、非選択性陽イオン電流を担うチャンネル分子については、既知のチャンネルには合致する性質のものはみられず、新規のチャンネルである可能性が考えられた。

また、今回明らかとなったこの電流の特徴は、GHRH で活性化される非選択性陽イオン電流とも共通するものであった。ghrelin と GHRH とはともに同じチャンネルを活性化し、GH 分泌を促進させる可能性も考えられた。

次に、細胞の増殖や成長に関して標的細胞に直接作用する IGF I について、その作用機構を調べた。

IGF I を投与した時には $[Ca^{2+}]_i$ の有意な増加が認められた。この増加は、 Ca^{2+} が流入することで起こっていたが、ghrelin の場合と異なり、L 型電位依存性カルシウムチャンネルは介していなかった。電気生理学的手法を用いてそのイオン機構

を調べたところ、IGF I 投与時には内向きの膜電流が発生しており、反転電位の値から、非選択性陽イオンチャネルが開いていることが判明した。また、内向き電流は主に細胞外から細胞内へ Na^+ が流入することによるものであった。このチャネルは Ca^{2+} に対する透過性を持つことが確認された。この細胞を *thapsigargin* で処理して細胞内 Ca^{2+} の枯渇を惹起しても、内向き膜電流の活性化はみられないことから、この細胞には *store operated channel (SOC)* は機能しておらず、IGF I で活性化するチャネルも SOC ではないことが判明した。

PI3 kinase 阻害剤により IGF I による内向き電流の抑制・ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の抑制がみられた。さらに、*tranilast* ならびに *ruthenium red* の前処理によっても、IGF I による膜電流の活性化の抑制・ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇の抑制が確認され、これらはいずれも IGF I で活性化するチャネルに対してブロッカーとして作用することがわかった。ここで、IGF I で活性化するチャネルは TRPV チャネルファミリーの一員である可能性が推測された。なかでも TRPV1 および TRPV2 には、高温で活性化し $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加させるという特徴があることから、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の高温に対する反応を観察した。すると、 45°C 前後から $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加が認められ、*ruthenium Red* によりこの反応は著しく減弱した。一方で、TRPV1 のみのアゴニストである *capsaicin* では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加はみられず、TRPV1 は機能していないことが明らかとなった。以上から、この細胞においては TRPV2 が発現し機能していると考えられた。RT-PCR でも TRPV2 の mRNA の発現が確認され、抗 TRPV2 抗体を用いた細胞免疫染色でも陽性であり、いずれも TRPV2 の発現を支持する結果であった。

そこで、IGF I 投与時に活性化される非選択性陽イオンチャネルは TRPV2 ではないかと予想し、確認のため TRPV2 に対する FITC ラベルしたアンチセンスオリゴを作成・導入した。アンチセンスオリゴが導入され蛍光発色を呈する細胞では、TRPV2 の発現の抑制が免疫細胞染色により確かめられた。これらを対象に膜電流を測定したところ、アンチセンス処理細胞では、IGF I 投与での内向き電流が著しく減弱しており、一方でコントロールオリゴ処理細胞では、IGF I 投与での内向き電流は大きな減弱はみられず両群間で有意な差が認められた。このことから、IGF I により活性化される内向き電流は、TRPV2 チャネルを介した物であることが判明した。

繊維芽細胞においては、IGF I に対して Ca^{2+} 透過性のチャネルの開口がみられ、そのチャネルは CD20 に類似した構造が予測されることが既に報告されている。更に、このチャネルの候補として TRPV2 が挙げられている。また遺伝子導入によりマウス TRPV2 を発現させた CHO 細胞では、IGF I や PDGF による刺激により、TRPV2 が細胞内から細胞膜へと輸送されることが報告されている。これらは、TRPV2 が IGF I で活性化し内向き電流の活性化・ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を担うという今回の結果を支持するものである。

IGF I は細胞の成長や増殖に深く関わるホルモンであり、生体にとって非常に重要な生理的役割を担っている。また、末端肥大症における心肥大をはじめとした症状の多くは過剰な IGF I によるものであり、その作用機構を探ることは新規治療法

の開発にもつながる。更には癌や動脈硬化などにおいても増殖因子の寄与は大きな注目を浴びており、受容体結合後の細胞内現象の解明が重要視されている。今回解析したことについては、IGF Iのさまざまな他の標的細胞においても、さらには他の成長因子の作用においても同様の現象が起こっている可能性が考えられる。