

皮膚に存在する環境センサー TRPV チャネルを介した 保湿関連物質の分泌制御機構の解明

愛知学院大学 薬学部 薬効解析学講座

村 木 克 彦

Recent studies demonstrate that TRPV3, TRPV4, and TRPA1 channels could be useful targets in skin health and cosmetology fields because of their highly expressions in human keratinocytes. Here we examined Ca^{2+} response of HEK293 cells transfected with wild-type TRPV4 (HEK-wTRPV4) and a novel variant of TRPV4 (HEK-vTRPV4) to TRPV4 agonists to determine molecular targets of these agonists on TRPV4. When 4α -phorbol 12,13-didecanoate, an well-known standard TRPV4 agonist, was cumulatively applied to HEK-wTRPV4 and HEK-vTRPV4, intracellular Ca^{2+} concentration was increased in both TRPV4 transfectants in a similar manner. In contrast, a novel and potent TRPV4 agonist, GSK, induced a small Ca^{2+} response in HEK-vTRPV4, while highly effective on HEK-wTRPV4. Moreover, activation of TRPV4 potentiated cell-proliferation, hence suggesting that amino acids mutated in vTRPV4 are putative binding sites of GSK and the activation of TRPV4 by its potent agonists may change the barrier function.

1. 緒 言

正常な皮膚機能の維持において、皮膚の保湿は極めて重要であり、保湿作用を有する機能性化粧品の開発が精力的に進められ、実用化されてきた。またアトピー性皮膚炎や皮膚乾皮症などの治療補助薬としても、皮膚保湿薬は重要な位置を占め、とくに近年、急増するアレルギー性のアトピー症候群への治療補助薬として、より効果的で作用持続時間の長い保湿薬の開発が求められている。またこうした皮膚疾患では炎症も重なることが多く、炎症と保湿との関連も注目されている。しかしこれまでの保湿薬は、皮膚表面からの水分消失防御が主であり、皮膚での水分、コラーゲン、脂質成分の分泌を制御することで保湿を実現した例はほとんどない。

Ca透過性のパニロイド型 TRP カチオンチャネル (TRPV チャネル) は温度変化や圧力、浸透圧変化を感知する環境センサーであり、皮膚をはじめ全身の組織に分布する¹⁾。最近、TRPV チャネルの一種である TRPV3 チャネルや TRPV4 チャネルが、皮膚組織に発現し、皮膚の水分透過性を制御していることが明らかとなってきた^{2, 3)}。そこで本研究では、ヒト表皮角化細胞における TRPV3 チャネルおよび TRPV4 チャネルを介したコラーゲンや脂質成分などの保湿関連物質の分泌機構および水分保湿との関連を明らかにすることを目的し、ヒト表皮角化細胞における TRPV チャネル遺伝子発現の検討や TRPV4 チャネル刺激薬開発の

際に鍵となる刺激薬のチャネル結合部位の同定を試みた。さらに TRPV4 の活性化が細胞増殖に与える影響に関して も検討した⁴⁾。

また TRPV4 と同様にヒト表皮角化細胞に高発現する TRPA1 チャネル⁵⁾ と炎症刺激の関係や臨床応用薬物の TRPA1 チャネルに対する効果についても検討したので併せて報告する^{6, 7)}。

2. 実 験

2.1 細胞培養

ヒト胎児腎由来細胞株 (HEK293細胞) はヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手した。ヒト表皮角化細胞、ヒト滑膜細胞、ヒト脳毛細血管内皮細胞は Cell Applications より入手した。HEK293細胞及びヒト表皮角化細胞は DMEM に 100 U/ml ペニシリン G、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン及び 10% 非燻化 FBS を加えて、5% CO_2 存在下 37℃ で培養した。ヒト滑膜細胞⁶⁾ およびヒト脳毛細血管内皮細胞⁴⁾ については、専用培地で培養した。

2.2 発現プラスミド調製

HEK293細胞に LipofectamineTM2000 (invitrogen) を用いて、pIRES-TRPV4WT (野生型ヒト TRPV4) および pIRES-TRPV4VT (変異型ヒト TRPV4)、pIRES-TRPA1 (TRPA1) を標準のプロトコールによりトランスフェクションし、24時間から48時間以内に実験に供した。

2.3 細胞内 Ca 濃度測定

細胞内カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 測定には、蛍光指示薬として fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2 AM) を用いた⁸⁾。細胞内色素を 340nm 及び 380nm の励起光で励起し、放出された 510nm の各々の蛍光を高感度カメラで取得した後、その蛍光強度比を算出した。細胞内 Ca 濃度測定実験では



Secretion of skin moisture-related substances mediated by environmental sensor TRPV channels in keratinocyte

Katsuhiko Muraki

Laboratory of Cellular Pharmacology,
School of Pharmacy, Aichi-Gakuin
University

以下の細胞外液を使用した (mM)。正常HEPES溶液 (mM) : NaCl 137, KCl 5.9, CaCl₂ 2.2, MgCl₂ 1.2, glucose 14, HEPES 10 (pH7.4 with NaOH)。実験はすべて室温 (25 ± 1°C) で行った。

2.4 RNA抽出と逆転写酵素反応

AGPC法によりヒト表皮角化細胞からtotal RNA を抽出し (0.2μg/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文献中のプライマー (human) を使用した⁷⁾。

2.5 DNA合成反応の定量

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) のDNAへの取り込みを標準プロトコールにより測定した⁴⁾。

3. 結果

3.1 ヒト表皮角化細胞におけるTRPVチャンネルの発現

ヒト表皮角化細胞におけるTRPVチャンネルの遺伝子発現を検討したところ、報告されているようにTRPV4チャンネルが高発現していた。またカプサイシン感受性のTRPV1チャンネルも高発現していた。一方、発現が報告されているTRPV3チャンネルについては、その発現レベルは低かった (図示せず。中間報告図1で発表済み)。

3.2 野生型TRPV4チャンネルおよび変異型TRPV4チャンネルに対するTRPV4チャンネル刺激薬の効果

次にヒト表皮角化細胞に高発現するTRPV4チャンネルの新規刺激薬の開発を目指し、既存のTRPV4チャンネル刺激薬のチャンネル作用部位の同定を試みた。野生型および変異型TRPV4チャンネル遺伝子をHEK293細胞に強制発現し、細胞内Ca濃度測定法によりTRPV4チャンネルの活性変化を検討した。TRPV4チャンネル刺激薬4α-phorbol 12, 13-didecanoate (4αPDD) を0.03μMから3μMまで野生型および変異型TRPV4チャンネルを発現させたHEK293細胞に投与したところ、濃度依存的な細胞内Ca濃度の上昇が観察され、その50%有効濃度は野生型および変異型TRPV4チャンネルとも約0.3μM程度であった (図示せず。中間報告図2で発表済み)。このことから4αPDDは野生型および変異型TRPV4チャンネルに同等に作用すると考えられる。

一方、強力なTRPV4刺激薬のGSKを3nM投与したところ、野生型TRPV4チャンネル発現細胞では大きな細胞内Ca濃度の上昇が観察されたが、変異型TRPV4チャンネル発現細胞では、その細胞内Ca濃度上昇効果は小さかった (図示せず。中間報告図3, 4で発表済み)。このことから、変

異部位はGSKの作用に極めて重要なアミノ酸部位と推定される (論文準備中)。

3.3 TRPV4チャンネルの活性化による細胞増殖作用

最近、TRPV4チャンネルが皮膚組織に発現し、皮膚の水分透過性を制御していることが報告されている^{2, 3)}。そこで皮膚と同じく物質の透過性制御に重要な役割を果たすヒト脳毛細血管内皮細胞を用いて、TRPV4チャンネル活性が細胞増殖に与える影響について検討した。BrdUのDNAへの取り込みを指標にDNA合成を検討したところ、対照に比べ0.3μMおよび1μM 4αPDD処理で、それぞれ約30%および約40% DNA合成が促進した (表1⁴⁾)。また4αPDD処理で細胞数も有意に増加した⁴⁾。TRPV4チャンネルの活性化は、細胞増殖を促すことで、ヒト脳毛細血管内皮細胞の細胞間接着を増強する可能性がある。

3.4 炎症刺激によるTRPA1チャンネルの発現増加

炎症反応においてサイトカイン類は中心的な役割を担う。皮膚組織の炎症時にもインターロイキン1β (IL-1β) や腫瘍壊死因子α (TNF-α) などが炎症反応のメディエーターとして関与することが知られている。そこでIL1やTNF-αなどの炎症性サイトカイン刺激を受けたとき、TRPV4チャンネルやTRPA1チャンネルの発現が変化するか検討した。その結果、ヒト滑膜細胞をIL1αやTNF-αで24時間刺激すると、TRPA1チャンネルの遺伝子発現は数百倍増加した⁶⁾。また炎症時には発現増加したTRPA1チャンネルが自律的に活性化され、炎症刺激で増加したIL-6やIL-8の産生を抑制していることが明らかとなった⁶⁾。

3.5 臨床応用薬物によるTRPA1チャンネルの活性化

皮膚組織を構成する細胞にTRPV4チャンネルやTRPA1チャンネルが高発現していることから、臨床応用されている薬物がこれらのイオンチャンネルを活性化することで薬効あるいは副作用を引き起こしている可能性がある。リウマチの治療薬として臨床応用されているオーラノフィン (AUR) は0.1 ~ 5%の患者で皮膚搔痒感や発疹を引き起こすことが知られている。そこでTRPV4およびTRPA1チャンネルに対するAURの作用について検討した。その結

表1 ヒト脳毛細血管内皮細胞におけるTRPV刺激薬 (4αPDD) 誘発の細胞増殖促進作用

細胞増殖作用をBrdUのDNAへの取り込みとして評価した。対照 (薬物非投与群) を100として、薬物投与群の変化を%表示した。

対照	100
0.3μM 4αPDD	127 ± 4
1μM 4αPDD	140 ± 6

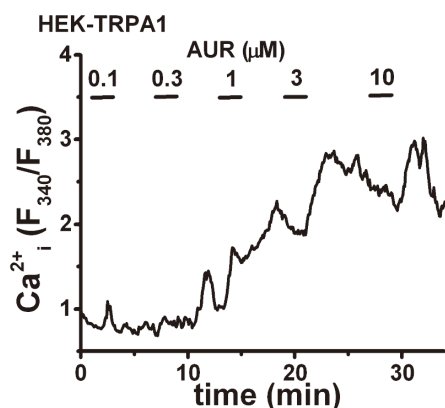


図1 HEK-TRPA1 細胞における AUR 誘発の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇効果

細胞内 Ca^{2+} 濃度 (Ca^{2+} ; $\text{F}_{340}/\text{F}_{380}$) を測定下、AUR を $0.1\mu\text{M}$ から $10\mu\text{M}$ まで段階的に投与した。代表的な変化を示す。

果、図1に示すようにTRPA1チャネル発現細胞(HEK-TRPA1)にAURを投与したところ、TRPA1チャネルの活性化による濃度依存的な細胞内Ca濃度の増加が観察された⁷⁾。AURの血中濃度は約 $20\mu\text{M}$ と報告されていることから、皮膚組織に存在するTRPA1チャネルがAURにより活性化され、掻痒感を引き起こしている可能性が示唆された。一方、AURはTRPV4チャネルには無効であった⁷⁾。

4. 考 察

皮膚組織に発現するTRPV3チャネルやTRPV4チャネルは、皮膚の水分透過性の制御に関わることが報告されている^{2, 3)}。皮膚の保湿は正常な皮膚機能の維持に極めて重要であることから、TRPV3チャネルやTRPV4チャネルを標的とした新規の保湿薬や皮膚機能改善薬の開発が進むと考えられる。本研究で報告した変異型TRPV4チャネルは、現在知られている最強のTRPV4活性薬GSKの作用部位が変異したことで、GSKに低感受性となったと考えられ、今後、このアミノ酸を標的とするさらに高い活性と特異性をもつTRPV4チャネル活性薬が開発できると期待される。

またTRPV4チャネルの活性化は細胞増殖を促進した。細胞増殖の亢進は細胞間隙の減少、すなわち細胞間隙を介する物質透過を減少させる可能性がある。ヒト毛細血管内皮細胞で観察されたこの現象が、皮膚組織でも観察されるか、今後検討する必要がある。

一方、炎症刺激によりTRPA1チャネルの発現が劇的に増加した。TRPチャネルの発現変化と炎症反応がリンクすることを明確に示した結果であり、今後、さらにこの病態生理学的意義を解明する必要がある。一方、臨床応用されているオーラノフィンがその適用濃度範囲内で、強力にTRPA1チャネルを活性化することを見出した。多くの薬剤でその副作用として、掻痒感や発疹の発生が報告されている。皮膚組織に発現したTRPV4チャネルやTRPA1チャ

ネルがその標的となっている可能性もあり、副作用発現率の高い薬剤については、こうしたチャネルへの作用を早急に検討すべきである。

謝 辞

本研究はおもに愛知学院大学 薬学部 薬効解析学講座 波多野紀行博士、鈴木裕可博士との共同研究として実施したものである。支援を頂きましたコスメトロジー研究振興財団に深謝致します。

(引用文献)

- 1) M.J. Gunthorpe, C.D. Benham, A. Randall, J.B. : Davis, The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels, Trends Pharmacol.Sci., 23, 183-191, 2002.
- 2) M. Denda, T. Sokabe, T. Fukumi-Tominaga, M. Tominaga, : Effects of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis, J.Invest. Dermatol., 127, 654-659, 2007.
- 3) S. Mandadi, T. Sokabe, K. Shibasaki, K. Katanosaka, A. Mizuno, A. Moqrich, A. Patapoutian, T. Fukumi-Tominaga, K. Mizumura, M. Tominaga, : TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP, Pflugers Archiv: E.J.Physiol., 458, 1093-1102, 2009.
- 4) N. Hatano, H. Suzuki, Y. Itoh, K. Muraki, TRPV4 partially participates in proliferation of human brain capillary endothelial cells, Life Sci., 92, 317-324, 2013.
- 5) R. Atoyan, D. Shander, N.V. Botchkareva, Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin, J.Invest.Dermatol., 129, 2312-2315, 2009.
- 6) N. Hatano, Y. Itoh, H. Suzuki, Y. Muraki, H. Hayashi, K. Onozaki, I.C. Wood, D.J. Beech, K. Muraki, Hypoxia-inducible Factor-1 alpha (HIF1 alpha) Switches on Transient Receptor Potential Ankyrin Repeat 1 (TRPA1) Gene Expression via a Hypoxia Response Element-like Motif to Modulate Cytokine Release, J.Biol.Chem., 287, 31962-31972, 2012.
- 7) N. Hatano, H. Suzuki, Y. Muraki, K. Muraki, Stimulation of human TRPA1 channels by clinical concentrations of the anti-rheumatic drug, auranofin, Am.J.Physiol., Cell Physiol., 304, C354-C361, 2013.
- 8) Y. Itoh, N. Hatano, H. Hayashi, K. Onozaki, K. Miyazawa, K. Muraki, An environmental sensor, TRPV4 is a novel regulator of intracellular Ca^{2+} in human synoviocytes, Am.J.Physiol., Cell Physiol., 297, C1082-1090, 2009.