

炎症性腸疾患の発症・進行機転におけるTRP蛋白質の役割に関する研究 領域別研究部研究チーム研究成果報告書

研究チーム名：「炎症性腸疾患発症機序の基礎研究」（課題番号：066004）

研究代表者：井上隆司(医学部・生理学)

研究員：井上隆司(医学部・生理学)、向坂彰太郎(医学部・第3内科)、
上原清子(医学部・細胞生物学)、青柳邦彦(医学部・第3内科)

研究協力者：海琳(医学部・生理学)

背景と目的

クローン病や潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患（IBD）は、大腸や小腸の粘膜に慢性的な炎症・潰瘍を引き起こす原因不明の疾患群であり、その有病率は戦後急速に増加している。IBDは、若年で発症し頑固な下痢や便秘を繰り返す経過を辿ることから、長年に亘って生活の質を劣化させる難治性の疾患として問題になっている。しかし、現在のIBDの治療法のほとんどは対症療法に限られ、早急な原因の解明とそれに基づいた原因療法の確立が強く望まれている。

最近の研究から、IBDの発症進行過程には、消化管内に共生する腸内細菌に対する異常な免疫・炎症応答を特徴とする自己免疫異常が密接に関与していることが明らかとなってきた。正常な腸管上皮では、常在するCD14陰性マクロファージが、腸内細菌由来の抗原刺激に対する反応性を欠いているのに対し、外来性細菌の貪食・殺菌、老廃物の貪食・除去といった機能は維持されており、これによって腸管の恒常性が維持されている。これに対して、クローン病等の病的腸管では、CD14陽性マクロファージが著明に増加しており、インターロイキン（IL-6、IL-23）や腫瘍壊死因子アルファ（TNF α ）などの炎症性サイトカインが過剰に産生されている。正常な腸管におけるTNF α 、IL-6等のサイトカインの産生量は少なく、むしろ抑制性サイトカインであるIL-10が多く産生されることによって腸内細菌に対する抑制性の免疫反応が誘導されている（免疫寛容）。しかし、何らかの原因で腸管の慢性的な炎症が起こると、TNF α 、IL-6が過剰産生され（更にIL-12、IL-23などの獲得免疫誘導に寄与するサイトカインも産生される）、過剰な免疫・炎症応答が惹起される。従って、IBDの病態形成には後者の変化が密接に関わっていると考えられている。これを支持する証拠として、2,4,6-trinitrobenzen sulfonic acid (TNBS) やsodium dextran sulfate (DSS) を用いて惹起した消化管炎症動物モデルにおいては、IBDに類似した粘膜部

から筋層部にわたる病理組織学的炎症病変が観察されるが、これらの変化は、炎症性サイトカインTNF α の欠損マウスにおいて著しく減弱していることが報告されている（Kabashimaら、2002）。また最近、抗TNF α 抗体療法を用いたIBDに対する優れた治療成績が得られており（Di Sabatinoら、2007）、慢性腸管炎症におけるTNF α の中心的な役割が注目を集めている。

TNF α の過剰産生が腸管炎症の主要な機序であるという事実がある一方で、TNF α は消化管においてプロスタグランジン、特にPGE₂の産生を促進することが知られている。PGE₂の受容体（EP1-EP4）のノックアウトマウスを用いた解析によると、下部消化管にはEP4が強く発現しており、その欠損によって、IBD様の腸炎の症状が生じるという（Kabashimaら、2002；Sugimoto & Narumiya、2007）。すなわち、PGE₂は腸管のEP4受容体を介して、腸管粘膜上皮に保護的に働いていると考えられる。正常腸管における主要なPGE₂産生の際は、腸管上皮細胞であると考えられてきたが、最近、TNF α 等の炎症性サイトカインの刺激によって、腸管粘膜上皮下の間質に存在する線維芽細胞が、形質変化を起こして筋線維芽細胞となり（Powellら、1999a）、シクロオキシゲナーゼ（COX2）の発現誘導を介してPGE₂を産生することが報告された（Kimら、1998）。

筋線維芽細胞は、線維芽細胞の亜種で、通常、組織を支持する細胞である。線維芽細胞は一定の表現型を示さない異なる細胞群の総称である。従って、異なる組織間では勿論のこと、同じ組織内においてもheterogeneityを示すことが知られている（Friesら、1994；Powellら、1999a,b）。線維芽細胞は、分布する組織に関わらず、種々のサイトカイン、成長因子、ホルモンに対する受容体を発現している。その一部は、炎症時には α -SM-actinを発現し、平滑筋細胞様の特徴を示す筋線維芽細胞へと変化すると考えられている（図1）。そして、組織の傷害・炎症時における創傷治癒や線維化の過程に密接に関与していることが知られている。例えば、皮膚の創傷治癒過

程では、サイトカイン、成長因子、ホルモンの影響下に、線維芽細胞が強い収縮能をもつ筋線維芽細胞へと分化し、肉芽組織を収縮させ傷口を小さくする役割を果たしている。また、肝臓には、肝星細胞 (Hepatic Stellate Cell: HSC、別名、伊東細胞) と呼ばれる、類洞腔に位置して類洞の構築を支持する細胞が存在するが、この細胞は、未分化間葉系細胞から分化した筋線維芽細胞が、非活性型に形質変換した細胞である。更に、腎臓の尿管上皮間質や消化管粘膜上皮下 (上述) にも、同様の形質転換能をもつ線維芽細胞が分布している。これらの線維芽細胞は、細胞障害 (起炎症性物質、増殖性因子等の作用) に伴って形質転換し (α -SM-actin陽性となる)、盛んに増殖してコラーゲンを産生するようになり、組織の線維化を促進する。また自分自身もサイトカイン、ケモカイン、成長因子、炎症性メディエーター (MMPやPGE₂等) を産生して (表1, 2)、免疫・炎症応答にも関与する。筋線維芽細胞の活性化が遷延すると、過剰な線維化が生じ、皮膚の肥厚性瘢痕化やケロイド形成、肝臓の線維化 (肝硬変)、消化管閉塞などの病的な組織改変 (リモデリング) を引き起こされる (Powellら、1999a,b)。しかし、このような種々の炎症性組織改変における重要性にも関わらず、筋線維芽細胞への形質転換を引き起こす機序や種々の生理活性物質の分泌を引き起こす機序については、殆ど明らかでない。

一方、1993年に初めて同定されたTRP (チャンネル) 蛋白質は、消化管上皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞のみならず、消化管の神経終末にも発現しており、消化管機能の発現や調節との関与が注目されている。例えば、感覚神経終末に発現するTRPV1チャンネル蛋白質が活性化されると、細胞内Ca²⁺濃度の上昇によりCGRP (calcitonin gene-related peptide) やサブスタンスPが放出されることが知られているが (Szallasiら、2007)、最近、このチャンネル蛋白質の過剰発現が、IBDの発症・進行に関与しているという仮説が提唱された (Yiangouら、2001)。また、副交感神経による消化管平滑筋細胞の興奮性支配には、ムスカリン受容体/G蛋白質系の活性化で開口する非特異的陽イオンチャンネルが重要であるが (Inoue、1995; Kuriyamaら、1998)、このチャンネルの分子実体はTRPC5蛋白質であることが強く示唆されている (Insukら、2003)。更に、消化管の自動能調節を調節するカハール間質細胞の自発的興奮 (細胞内Ca²⁺濃度の律動的上昇) の生成には、TRPC4チャンネルを介したCa²⁺流入が密接に関与していることが報告されている (Torihashiら、2002)。

哺乳動物のTRP蛋白質は、6つのサブファミリーからなる約30の異なるアイソフォームを含む巨大なNSCCのスーパーファミリーである (Flockerzi、2007)。すなわち、TRPC (canonical or classical; TRPC1-7)、TRPV (vanilloid; TRPV1-6)、TRPM (melastatin; TRPM1-

8)、TRPP (polycystin; TRPP1-4)、TRPML (mucolipin; TRPML1-3)、TRPA (ankyrin; TRPA1) の6つのサブファミリーがこれに属する (図2)。発現実験などから推定されるこれらのTRPの活性化刺激はバラエティーに富んでおり、電位変化以外の多様な物理化学刺激を含む。例えば、(1) ROCC、SOCCとして機能するもの (主にTRPCサブファミリー)、(2) 主に機械刺激 (低浸透圧、膜伸展、ずり応力等)、温度・酸性度変化、化学物質 (カプサイシン、メントール等の辛味、清涼感を惹起する物質) 等の物理化学刺激で活性化されるもの (TRPV1-4、TRPM3、M5、M8、TRPP2、TRPA1)、(3) 自発活性を持ちCa²⁺やMg²⁺の持続的な流入経路として働くもの (TRPV5、TRPV6、TRPM6、TRPM7)、(4) [Ca²⁺]_i上昇によって直接活性化されるもの (TRPM4、TRPM5; 前者はCa²⁺-activated NSCCの分子実体であると考えられている)、などがある (表3)。TRP蛋白質は、6回膜貫通領域の両側に細胞内に大きく突き出たN端、C端を配した、4つのサブユニットによる4量体構造をもつと推定されている。また、N端、C端には、数多くの蛋白質相互作用領域やリン酸化モチーフが存在する。これを介して、多くの膜蛋白質、細胞内蛋白質と共にカベオラなどの特殊な膜領域において「シグナル複合体」を形成し、複雑な細胞内情報伝達を行っていると考えられている。TRP蛋白質は神経系、心血管系、呼吸器系、消化器系、腎泌尿生殖器系、血球細胞等、生体のあらゆる組織に発現しており、その関与する生体機能は、感覚伝導 (痛覚、味覚等)、内蔵機能調節、細胞の生存・増殖・死等、極めて多岐に亘っている。また中には、特定の遺伝性疾患の原因遺伝子であることが判明しているものもある (表4; Inoueら、2006; Flockerziら、2007; Niliusら、2007)。

このように、TRPチャンネルは、腸管の炎症に関わる種々の物理化学的プロセスを説明し得る大変興味深い特徴を有している。実際、上述した炎症性サイトカインやメディエーターの幾つかは (例TNF α 、PGE₂)、消化管以外の組織において、TRP蛋白質 (TRPC1、TRPC5) の活性化や発現増加を直接引き起こし、組織のリモデリングを促進することが知られている (Tabataら、2002; Pariaら、2003; Kumarら、2006)。

筋線維芽細胞は、TNF α 、トロンピン、デーキシコル酸などの刺激によりPGE₂を産生し、IL-1 β の刺激により蛋白分解酵素であるMMPを放出し、上皮細胞のケモカイン分泌にも影響を及ぼすことが報告されているが (Powellら、1999b)、このような炎症応答の過程には、細胞内Ca²⁺濃度の上昇が重要なステップとして働いていることが推測されている (Zhuら、2002)。しかしその詳細な機序については殆ど情報がない。そこで本研究では、上記の認識に基づき、種々の物理化学刺激により活性化される新しいCaチャンネル遺伝子群としてのTRP蛋

白質スーパーファミリーに着目し、筋線維芽細胞におけるCaシグナル伝達と腸管炎症における、その潜在的な役割について以下の検討を行った。実験にはヒト大腸上皮組織から樹立された筋線維芽細胞株CCD-18Coを用いた。

方法

細胞培養

ヒト大腸上皮組織由来、筋線維芽細胞株CCD-18CoはATCC (番号CRL-1459; 米国) から購入し、器内温度37°C、二酸化炭素濃度5%に維持した培養器内で維持した。培養液としては、10%牛胎児血清 (FBS)、2mM L-グルタミン酸、0.1mM 非不可欠アミノ酸混合液を添加したMEM培地を用いた。実験には12-17回passageを行った細胞を用いた。

TRPC1遺伝子導入

ネオマイシン耐性遺伝子を含む発現ベクター pCI-neo に、マウス脳からクローニングしたwild-type TRPC1の全長cDNAを組み込み、大腸菌 (DH5α) による遺伝子大量複製を行った。TRPC1遺伝子および空ベクターの発現には、発現補助剤リポフェクタミンTM2000 (インビトロジェン社、米国) を用い、その最大発現が得られる48-72時間後に各種の測定を行った。

siRNAサイレンシングによるTRPC1発現抑制

TRPC1蛋白質発現の抑制には、リポフェクタミンTM2000 (2.5μl/ml) を発現補助剤として用い、40-50ng/mlのステルスsiRNA duplex (インビトロジェン、米国) を30-50%のconfluenceに達したCCD-18Co細胞に導入した。導入48-72時間後に評価を行った。発現の抑制効果は、TRPC1に特異的な抗体による免疫ブロット法で評価した。用いたsiRNA duplexの配列は (センス/アンチセンス: 5' to 3'); AUAUUUAGAAGUCCGAAAGCCAAGU/ACUUGGCUUUCGACUUCUAAAUAU (TRPC1-HSS110981) 及び AUAUCAAGACGAAACCUGGAAUGCC/GGCAUUC CAGGUUUCGUCUUGAUUAU (TRPC1-HSS110982) であった。

電気生理学的測定

細胞膜電流の測定に使用した方法及びその設備は、以前使用したのと基本的に同じである (Shiら、2004)。手短に述べると、高インピーダンス、低ノイズのパッチクランプ増幅器 (EPC8, HEKA, ドイツ連邦共和国) を用い、細胞への電圧の供給と細胞からの電流信号の取得を行なった。すべての実験はHamillら (1981) の方法に準

拠した。細胞への電圧の印加、細胞からの電流の取得には、2つの出力、16の入力ゲートをもつアナログ・デジタル変換器 (DigiData 1200, Axon Instruments, 米国) を用い、その制御には市販のパッチクランプ実験用ソフトウェアpClamp v.6.03を使用した。更に、得られた信号を、1kHzのlow pass フィルターを通した後、アナログ-デジタル変換器 (Digidata 1200) によって数値化 (2kHz) し、IBM型コンピューター (Aptiva) のハードディスクに保存した。これらの機器の制御には市販のソフトウェアpClamp v.6.03 (Axon Instruments) を用いた。データ解析や図の作成には、市販のソフトウェアClampfit v.6.03 (Axon Instruments)、KaleidaGraph v.3.08 (Synergy Software, Reading, ペンシルバニア、米国) をそれぞれ用いた。使用した電極抵抗値は、Cs⁺細胞内液を用いた場合、2-4MΩであった。また、ホールセルクランプにおいては、パッチクランプ増幅器の補償機能を用いて、直列抵抗 (5-7MΩ) の50~80%を電氣的に補償した。電極と細胞外液の界面で生じる液間電圧は (約6mV)、Neherの方法によって測定し、電流-電圧関係曲線を作成する際に補正した。

長時間の電流記録 (1分以上) には、別のアナログ-デジタル変換器 (MacLab/4, AD Instruments, オーストラリア) を用いた。この際、電流信号は50Hzでlow-passフィルターした後、100Hzで数値化した。また、ノイズ成分の大きい電流に対する薬物の効果を評価する時の誤差を少なくするため、1秒間毎の電流振幅の平均値を算出して用いた。

すべての実験は室温でおこなった。

Ca 蛍光イメージング

ポリ-L-リジンで表面処理した測定用実験槽にトリプシン処理によって単離したCCD-18Co細胞を付着させた後、界面活性剤F-127 (0.05%) を加えて溶解させたfura-2AM (1μM) を負荷 (室温、約25-30分) した。実験に先立ち、生食液を5-10分間灌流して非特異的に結合したfura-2AMを徹底的に洗浄するよう留意した。自家蛍光、背景蛍光は、fura-2AM 負荷直前あるいは実験終了時にMn (1mM)、ionomycin (5μM) を灌流してfura-2蛍光を完全に消退させた後に細胞から取得し、実験で得られた蛍光値から減算して補正を行った。fura-2蛍光の測定に際しては、340および380nmの近紫外励起光を交互に細胞に照射し、それぞれの励起波長に応じて細胞からの放出される光量 (510±10nm) を上記方法で補正した後、蛍光比 (F340/F380) を算出した。測定には、aquacosmos HISCA (浜松ホトニクス) あるいはSlideBook (Roper) のデジタル蛍光画像測定解析システムを使用した。

免疫細胞化学的手法、及びWestern Blotによる蛋白質の検出

免疫細胞化学によるTRPC1蛋白質局在の解析：TRPC1抗体はSanta Cruzから購入した。CCD-18Co細胞をポリリジンでコートしたカバースリップ上に播き、4%パラホルムアルデヒドで15分間固定した後、0.2% Triton / PBS中で室温、15分間処理し、細胞膜のpermeabilizationを行なった。PBSで数回洗浄し、10%正常羊血清 (Jackson) 中で1時間、1:500希釈したTRPM7抗血清中で一晩 (4℃) 反応させ、再びPBSで洗浄した後、FITCラベルした抗ウサギ羊抗血清 (Jackson) で1時間反応させた。最後に、蒸発によるロスを防ぐため、PermaFluor Aqueous 液 (IMMUNON™, SHANDON) でカバースリップをシールした。免疫染色したK562細胞は、アルゴン/クリプトンを光源とする共焦点レーザー顕微鏡 (FV500, Olympus) を用いて観察した。単一波長488nmで励起し、505nm付近で放出される蛍光を80倍拡大の後イメージ画像として取得し、コンピューターのハードディスクに保存した。

Western Blotによる蛋白質発現の解析

培養皿でconfluentになるまで増殖させたCCD-18Co細胞を洗浄後、SDS sample buffer1を加えて懸濁し、100℃で5分ポイルした。その後、アクリルアミドゲルを用いて電気泳動し (20mAで1時間、引き続き30mAで1時間) PVDF membraneにブロットした。Nonspecificなバンドの検出を防ぐため、10% BSAで1時間振盪した後、TBS-T又はPBS-Tで数回洗浄した。その後TBS-T又はPBS-Tで1:500希釈したTRPC1抗体液中で一晩 (4℃) 反応させ、再びTBS-T又はPBS-Tで洗浄した後、抗ウサギヤギIgG (Santa Cruz Biotechnology) で1時間反応させた。その後TBS-T又はPBS-Tで数回洗浄し、Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer) で蛍光発光させ、LAS system (LAS-3000 (FUJI FILM)) で観察し、Image Gauge (FUJI FILM) で解析した。また、コントロールとしてはβアクチンを用いた。βアクチンの抗体にはMouse monoclonal [AC-15] (abcam)、Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from sheep) (Amersham Bioscience) を用いた。

逆転写酵素遺伝子増幅法 (RT-PCR) によるTRP mRNAの検出

Total RNA extraction Kit (RNeasy Minikit, Qiagen, ドイツ連邦共和国) を用いて、約100万個のCCD-18Co細胞からRNAを抽出し、塩基配列を無作為化したプライマー (random hexamer) と逆転写酵素 (Superscript II, Gibco-BRL) を用いて、約1μgのRNAから1st strand DNAを作成した (10μlスケール)。PCRによる

遺伝子増幅には、熱耐性型DNAポリメラーゼ (Tag polymerase) を用い (20μlスケール)、以下のプロトコルに従って、サーマルサイクラー (Biometra, Gottingen, ドイツ連邦共和国) 中で反応させた。用いたプロトコルは以下の通りである：94℃、2分間の熱変性に引き続いて、熱変性、94℃、10秒；アニーリング、58-65℃、30秒；伸長反応、72℃、60秒を1サイクルとして、20、30、35サイクル反応させた。最後の伸長反応は72℃で10分間行った。PCRによって得られた遺伝子転写産物は、1.2%アガロースゲル中を電気泳動し (45-60分)、SYBR Green (Qiagen) をハイブリダイズさせた後、写真撮影した。

PT-PCRに用いたプライマー対の塩基配列は以下の通りである (5'端から3'端に向かってセンス/アンチセンスの配列を示す)：

TRPC1; GCGTAGATGTGCTTGGGAGAAA/
GCTCTCAGAATTGGATCCTCCTCT
TRPC2; GCTGGCCAAGCTGGCCAA/
CATCCTCACTGGCCAGCGAGA
TRPC3; CCTCTCAGCACATCGACAGGT/
GAACACAAGCAGACCCAGGAAGA
TRPC4; CAAGCTTCTAACCTGCATGACCA/
CCAAATATTGACCAAAACAGGGA
TRPC5; CATCCAGTGGTGCAGGAAGA/
CCTAAGTGGGAGTTGGCTGTGAA
TRPC6; GAGGAGGAGCGCTTCTGGACT/
GCCTTCAAATCTGTCAGCTGCA
TRPC7; CCAGGTGGTCTCTGCGGAA/
GGCTCAGACTTGGACGGTGGT

TRPV1; GAAGATCGGGTCTTGGCCTA/
CTCACTGTAGCTGTCCACAAACAAA
TRPV2; GACGTGCCTGATGAAGGCTGT/
CTGGTGTGGGTCTCCAGGA
TRPV3; AGTGGCAACTGGGAGCTGG/
GGGTCAGGGTGATGTTGTAGAAGA
TRPV4; GTGCTGGGCCCCAAGAGAA/
GGGCAGCTCCCCAAGTAGAA
TRPV5; CTCACCCCTTCAAGCTGGCT/
CCCAGCATCTGGAATCCTCG
TRPV6; GCCGAGATGAGCAGAACCTGCT/
GTCTGGTCCAGGATCTGGCGA

TRPM1 : GGGGATGCCTTGAAAGACCA/
GCCAAGCTCAGCTGATCTGGA
TRPM2 : CTTCCGGGAAGGCAAGGATGGT/
GAGGCTCACTCCCTGCACGTT
TRPM3 : GAGGAGACCATGTCCCCAACTT/
GAGTAGCTGTTGGCGCGCT

TRPM4 : GTCATCGTGAGCAAGATGATGAA/
GTCCACCTTCTGGGACGTGC
TRPM5 : CAAGTGTGACATGGTGGCCATCTT/
GCTCAGGTGGCTGAGCAGGAT
或いはGTGACTGTGTTCTCCTGGGGAA/
GACCAGCCAGTTGGCATAGA
TRPM6 : GAGGAGATGGATGGGGGCCT/
GGTCCAGTGAGAGAAAGCCAACAT
TRPM7 : CCATACCATATTCTCCAAGGTTCC/
CATTCCTCTCAGATCTGGAAGTT
TRPM8 : GAAGGCACCCAGATCAACCAAA/
GAGCCTTCCACCACCACACA
或いはCTTCGTGGTCTTCTCCTGGAA/
CATGGCCAGGTAGGGCTC
GAPDH : ATCACCATCTTCCAGGAGCGAG/
TGGCATGGACTGTGGTCATG.

PGE₂ ELISA アッセイ

24穴プレートにCCD-18Co細胞を約50万個/cm²の密度で播き、100% confluenceに達するまで培養した。種々の薬物の存在下で処置した後 (37°C)、PBS (ダルベッコリン酸緩衝液 (PBS、シグマ、セントルイス、米国) で洗浄し、37°Cで培養した後、上清を回収して直ちに-80°Cで凍結した。上清回収に用いた細胞も回収して蛋白質濃度を決定した。PGE₂のレベルは、上清を希釈後、PGE₂酵素免疫アッセイキット (R&D Systems) を用いて測定した。得られた値は、異なる実験条件によるバラツキを少なくするために、予め求めた蛋白質濃度で正規化した。ちなみに、製造元のデータによると、PGE₂の測定に用いた抗体は、PGE₃、PGE₁、PGF_{1α}、PGF_{2α}、6-keto-PGF_{1α}と、それぞれ17.5%、11.9%、7.0%、6.0%、2.5%、交叉活性を示し、エイコサノイドに対しては全く交叉性を示さない。

溶 液

Ca²⁺イメージングやパッチクランプ実験に用いた細胞外液 (PSS) の組成 (mM) : 140 Na, 5 K, 1.2 Mg, 2 Ca, 151.4 Cl, 5glucose, 10HEPES (TrisでpH7.4に調整)。実験に使用した薬物は、この溶液に溶解後、「Yチューブ」とよばれる急速液交換装置を用いて細胞に投与した。ホールセルクランプ記録用Cs⁺電極内液の組成 (mM) : 40 Cs⁺, 24 Cl⁻, 120 aspartate, 10BAPTA/4Ca²⁺, 10 glucose, 10HEPES (TrisでpH7.2に調整した)。Ca²⁺やMg²⁺欠除溶液の作製には、それぞれの二価イオンを除去するだけでなく、1mM EDTAを添加した。

薬 物

1,2-bis (o-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA)、HEPES、GdCl₃、1- (4-aminobenzyl)

ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EDTA)、ethyleneglycol-bis (β-aminoethyl) - N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) はSigma社から購入した。TNFα、4αPDD、OAG、sphinganine、Cyclopiazonic acid (CPA)、NFAT-IH、curcumin、SN-50、SK&F96365、2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB)、はCalbiochem社から購入した。βアクチン抗体、COX2抗体、TRPC1抗体はSanta Cruz社から購入した。

統計処理・検定

すべてのデータは、平均±標準誤差で示した。データ間の統計学的有意差は、一対のグループ間の比較にはStudent *t*-test、多数のグループ間の比較には一元配置分散分析法 (ANOVA) をもちいて評価した。

結 果

CCD-18Coの筋線維芽細胞としての特質の確認

筋線維芽細胞は炎症刺激によって、平滑筋細胞様の性質を示し形質転換し、コラーゲンやmatrix metalloproteinase (MMP)、PGE₂を産生することが報告されている。そこで、CCD18-Co細胞がこれらの特徴を有しているかについてまず確認した。図3に示すように、CCD-18Co細胞は、平滑筋型のα-SMAアクチンやMMPをconstitutiveに発現している。TNFα、IL-1β刺激によって、5種類のMMP (MMP1, 3, 9, 10, 12) の発現が著しく増加すると共に (図4)、PGE₂の産生が増加した (下記参照)。

CCD-18Co細胞におけるTRP mRNAの発現

次に、CCD-18Co細胞から抽出したmRNAに対して、各TRPアイソフォームの特異的なプライマーを用いてPCRによる増幅をおこなった。図5に示すように、ヒト28種のTRPアイソフォームのうち15種が検出された。すなわち、TRPCファミリーでは、TRPC1、C3-C6の発現が見られ、特にTRPC1とC6の発現レベルが高いことが示唆された (Real-time PCRで確認した; データ見提示)。一方、TRPVファミリーではTRPV2-V6の5種が、TRPMファミリーではTRPM1、M3、M4、M6、M7の5種がそれぞれ高いレベルで発現していることが示唆された。これに対して、消化管の自律神経終末や炎症性血球細胞 (単球、マクロファージ等) に高発現し、腸管炎症との関係が強く示唆されているTRPV1、TRPM2の発現は検出できなかった (Yiangouら、2001; Yamamotoら、2008)。

CCD-18Co細胞に発現するTRPの機能測定

RT-PCRによってCCD-18Co細胞から検出された15種のTRPが、果たして蛋白質レベルで機能しているかに

ついて、それぞれのアイソフォームに特異的な活性化薬・方法を用いて検討した(表5)。

CPA (TRPC1を介したストア作動性Ca²⁺流入を活性化、下記参照)、ジアシルグリセロールアナログのOAGやRHC80267 (TRPC3、TRPC6を活性化)、低浸透圧刺激 (TRPV4、TRPM3を活性化)、4αPDD (TRPV4の特異的な活性化薬)、4AB (TRPV1-V4の活性化薬)、sphingamine (TRPM3の活性化薬) のいずれの投与によっても有意な[Ca²⁺]_iの上昇が観察され、更にこれらの[Ca²⁺]_i上昇は細胞外のCaの除去によってほぼ完全に消失した。以上より、CCD-18Co細胞に発現しているTRP蛋白質はほとんどすべて、細胞外からのCa²⁺流入チャンネルとして機能し得ることが示唆された(図6上段)。

更に、Ca²⁺蛍光測定の結果を確認するため、パッチクランプ法による全細胞膜電流測定を行った。細胞膜を-50mVに保持し、上記のTRP活性化薬・方法を適用すると、ゆっくりとした時間経過で活性化される内向き電流の増加が観察された。更に、緩やかに上昇する傾斜上昇電圧(-100-100mV、2秒)によって評価した電流電圧関係は、全ての場合で0mV付近で逆転することから、非特異的な陽イオン電流であることが確認された。更に、強い脱分極による外向き整流が観察された。これらの特徴は、強制発現系におけるTRPチャンネルを介した内向き電流の性質と一致した。また、活性化薬の非存在下で観察される自発性内向き電流は50μMの2-APB投与によって抑制されることから、TRPM7を介した電流であることが示唆された(図6下段)。

以上より、CCD-18Coにおける発現が検出されたTRPのうちの多くが、チャンネル蛋白質として機能し得ることが強く示唆された。

更に消化管の主要な炎症性サイトカインであるTNFα(50ng/ml)をCCD-18Co細胞に投与した場合も、投与後1分以内に、外向き整流を示す非特異的陽イオンチャンネル電流が活性化され、これに伴う[Ca²⁺]_iの上昇が観察された(図7)。

TNFαはTRPC1の発現を増強しSOC活性を増加させる

次のステップでは、CCD-18Co細胞で発現が確認されたTRPのうち、どのアイソフォームがTNFαに感受性を示すかについて検討した。図8Aに示すように、RT-PCRによる検討を行うと、TRPCファミリーのうち、TRPC1の発現のみが、特異的に増加することがわかった。TRPC1蛋白質発現の増加は、TNFα(50ng/ml)の培養液中添加後8時間から検出され、28時間後には元の蛋白質発現レベルの約5倍にも達した(図8B)。これに伴って、ストア枯渇刺激(CPA処理)によって活性化されるCa²⁺流入(SOC)は、TNFα処理後24時間で約4倍に増加し、蛋白質発現の程度と良く一致することが分かった(図9右)。CPA処理によってか活性化される

SOC活性は、他の細胞のSOC活性を阻害することが知られているSK&F96365によって有意に抑制された(図9左下)。

TNFαはCOX2の発現を誘導しPGE₂産生を増強する

TRPC1の発現増加とそれに伴うSOC活性の増強の時間経過にやや先行して、CCD-18Co細胞におけるCOX2の発現とPGE₂産生の増加が観察された。

図10に示すように、CCD-18Co細胞は、炎症性刺激の非存在下ではCOX1をconstitutiveに発現しており、COX2の発現レベルそれよりも低いレベルであった。しかし、一旦TNFα(50ng/ml)を培養液に添加すると、COX1の発現には変化が見られなかったが、COX2の発現レベルは、添加1時間後には上昇し始め、6時間後にはほぼ最大となった(図10A下段)。TNFαによるCOX2発現増加の時間経過とほぼ一致して、培養上清中に放出されるPGE₂量も増加し始め、18時間後にピークに達した後、減少に転じた(図10C)。24時間後にはこのピークより有意に低いレベルまで減少する傾向を示した。24時間後のTNFαによるPGE₂産生増加は、TNFα濃度に依存的であった。また、細胞外や細胞内のCa²⁺をEGTAやBAPTA-AMでキレートすることによって強く抑制された(図10B)。

TNFαによるPGE₂産生の劇的な増加は、COX阻害薬作用を有するインドメタシン(10μM)やデキサメサゾン(100nM)の同時投与によって完全に抑制された(図10C)。

TRPC1の発現抑制・強制発現がTNFαによるCOX2発現、PGE₂産生増強に及ぼす効果

TNFαによるTRPC1(及びSOC活性の増加)とCOX2発現の平行した増加は、二者の間に共通の制御機構が働いている可能性を示唆する。また、細胞内外Ca²⁺のキレートによる抑制は、これらの効果に細胞膜を介したCa²⁺流入が関与している可能性を強く示唆する。そこで、TRPC1の発現増加によるSOC活性の増加がCOX2の発現を誘導するか否かを探るため、TRPC1に特異的な2種のstealth siRNAによるノックダウンを行った。図11A下段に示すように、この処置によって、TRPC1の発現はほとんど検出できないレベルまで減少し、これに伴ってSOC活性も有意に抑制された(図11B&C)。

しかし予想に反して、TRPC1ノックダウンを行うと、いずれのsiRNAによっても、TNFαによるPGE₂産生誘導効果は、更に増強された(図11A上段)。これとは反対に、ヒトTRPC1をCCD-18Co細胞に強制発現すると、TRPC1蛋白質の発現増加(及びSOC活性の増加)に伴って、TNFαによるPGE₂産生誘導の有意な抑制が観察された(図11B)。

以上の結果と前段までの結果(TNFαによる発現増強

効果は、COX2に対する方がTRPC1よりも先行する)を合わせると、TRPC1を介したSOC活性がPGE₂産生へ及ぼす負の効果は、COX2蛋白質発現の誘導に対するブレーキ効果と考えることもできる。

TNF α による細胞内シグナル伝達には転写因子NF- κ Bを介した遺伝子発現の制御が関与していると考えられている (Baud & Karin, 2001)。また、TRPC1のSOC活性を介したCa²⁺流入はカルシニューリンの活性化によってCa²⁺依存性転写因子NFATを脱リン酸化し、NFATの核内移行を促進することに心肥大を起こす種々の遺伝子発現の転写を促進することが報告されている (Gwackら, 2007; Ohbaら, 2007; Inoueら, 2008)。実際、*cox2*および*trpc1*遺伝子の5'-プロモーター領域を転写モチーフの検索プログラムを用いて調べると、-2000bp以内の配列に複数のNF- κ B、NFATの結合配列が見つかる (附図1、2)。

そこで、以下では、上記のTNF α の増強効果に、これらの転写因子の活性化がどのように関与しているか、それぞれに比較的選択的な阻害薬を用いて検討した。

NF- κ B、NFAT阻害薬がTNF α によるCOX2発現、PGE₂産生増強に及ぼす効果

図13Aは2つの構造的に異なるNF- κ B阻害薬curcuminとSN-50が、TNF α によるCOX2発現誘導に対して及ぼす効果をまとめたものである。明らかに、これらの阻害薬の存在下では、TNF α によるCOX2発現誘導効果は顕著な抑制を受けることがわかる。一方、カルシニューリンやNFATの阻害薬であるFK506、NFAT-IHを前処置すると、TNF α によるCOX2発現誘導効果は、TRPC1を抑制した時と同様に、更に増強を受けることがわかった(図13B)。そしてNF- κ B阻害薬を更に添加すると、NFAT阻害薬の増強効果とは関係なく、TNF α によるCOX2発現誘導効果が著しく減少することが分かった(図13B)。

以上の結果は、TNF α によるCOX2発現誘導作用に対するTRPC1/SOCを介した増強効果はNFATの活性化を介していること、またTNF α によるCOX2発現誘導効果は、NF- κ Bによる*cox2*遺伝子転写活性の増加を直接反映していることを強く示唆する。この考えと良く合致して、TNF α によるPGE₂産生増強作用は、NF- κ B阻害薬で強く抑制され、カルシニューリン/NFAT阻害薬あるいはSOC阻害薬SK&F96375の前処置によって有意に増加した(図13C)。一方、TNF α によるTRPC1蛋白質の発現増強とそれに伴うSOC活性の増加は、NF- κ B阻害薬では強く抑制されたが(図14A、B)、NFAT阻害薬では有意な影響を受けなかった(図14A、B下段)。これらの事実は、*trpc1*遺伝子の転写効率はNF- κ Bを介して直接調節されているのに対して、NFATを介した転写調節は、TRPC1/SOCを介したCa²⁺流入の下流で作動し、*cox2*遺伝子の転写・発現を抑制していることを示唆している。

考 察

本研究の結果は次のようにまとめることができる。

1. CCD-18Co細胞は α -SMアクチン陽性であり、消化管の主要な炎症性サイトカインTNF α 刺激に応答して、MMPの発現、PGE₂の産生・分泌など、筋線維芽細胞に特徴的な性質を示した。
2. CCD18Co細胞には、15種のTRP蛋白質 (TRPC1, C3-C6、TRPV2-V6TRPM1、M3、M4、M6、M7) が発現しており、いずれも非特異的陽イオンチャネルとして機能していることが示唆された。
3. CCD-18Co細胞をTNF α で刺激すると、数時間以内に、濃度・時間依存的なCOX2の発現誘導とそれに伴うPGE₂産生の劇的増加が観察された。この効果は、NF- κ Bを介した*cox2*遺伝子転写活性の増加によることが阻害薬を用いた実験の結果から推測された。
4. CCD-18Co細胞をTNF α で刺激すると、NF- κ Bを介した*trpc1*遺伝子の転写活性の増加とTRPC1蛋白質の発現増加が見られた。この効果は、COX2の発現誘導に比べて遅く、刺激後約18-24時間で有意な変化として検出された。
5. TNF α によるTRPC1蛋白質発現の増加は、CCD-18Co細胞のSOC活性を増加させ、その結果増加した細胞内Ca²⁺流入によるcalcineurin/NFAT系の活性化が観察された。さらに活性化されたNFATによって、TNF α によるCOX2発現誘導が拮抗的に抑制されることがわかった。この負のフィードバックの効果は、TNF α の作用が遷延するほどより顕著に現れる傾向が見られた。

図15はこれらの結果を模式図として表したものである。上述したように、ヒトの*cox2*遺伝子、*trpc1*遺伝子の5'制御領域を検索すると、複数のNF- κ B結合モチーフが見つかる。実際、ルシフェラーゼによるレポーターアッセイ法を用いたin vitro実験で、NF- κ Bの活性化によって、これらの遺伝子の転写活性が増加することが直接示されている (Chenら, 2000; Pariaら, 2003)。従って、本研究で観察されたTNF α のCOX2、TRPC1発現誘導効果は、この機序に依っていると考えてよいだろう。一方、これに比し、NFATを介した*cox2*遺伝子転写に対する負の制御機構はより複雑である。本実験の結果を単純に解釈すると、TNF α 刺激によるTRPC1蛋白質発現量の増加 → SOC活性増加 → 細胞内Ca²⁺流入の増加による[Ca²⁺]_i上昇 → カルシニューリン/NFAT系の活性化 → TNF α のCOX2発現誘導効果に対する抑制、というシグナル伝達の流れを考えることができる。しかし、この抑制に、*cox2*遺伝子のプロモーター領域に対するNFATの直接的な結合が関与しているのか、それ

とも別の経路を介したNF- κ B系への抑制効果であるのかは、本研究の結果から区別することができない。ヒト大腸癌由来細胞やラット腎メサンギウム細胞における検討によると、筋線維芽細胞におけるカルシニューリン/NFAT系の活性化は、むしろCOX2発現の増強を引き起こす (Sugimotoら、2001)。また、ヒトやラットの *cox2* 遺伝子の5'-プロモーター領域にはNFATのコンセンサス結合配列 'ggaaa' が複数存在する。これらの事実は、本研究の結果と一見矛盾しているように思われる。一つの可能性として、カルシニューリン/NFATの活性化がI κ Bのリン酸化を介して、NF- κ Bを介した遺伝子転写活性増加作用にブレーキをかけるというシナリオを描くこともできる。今後は、実際に、NFATによる *cox2* 遺伝子の転写活性に対する負の制御があるかどうかについて、レポーターアッセイなどを用いた検討を行う必要があるだろう。

NF- κ Bの活性化は様々な刺激によって起こることが知られているが、[Ca²⁺]_i上昇自体によっても引き起こされる (Lewis、2006)。実際CCD-18Co細胞においても、TNF α 投与後1分以内に、内向き電流の活性化とそれに伴う[Ca²⁺]_iの上昇が観察され、更に1時間以内に、COX2の発現増加が検出された。また、TNF α によるPGE₂産生の増加は、細胞内外のCa²⁺をキレートすることによって有意に抑制された。これらの事実は、NF- κ Bを介したCOX2発現増加の少なくとも一部は、TNF α の[Ca²⁺]_i上昇作用を介して生じていることを示唆している。しかしもしそうならば、TRPC1発現増加 (すなわちSOC活性増加による[Ca²⁺]_iの上昇) を介したカルシニューリン/NFATのCOX2発現誘導に対する抑制効果が、COX2の発現誘導比べてかなり遅れて現れるのはなぜだろうか。これに対する手がかりとして、次のリンパ球における検討の結果は注目に値する。すなわち、NF- κ Bの活性化には、強い一過性の[Ca²⁺]_i上昇あるいは低頻度の[Ca²⁺]_i振動が効果的であるのに対して、NFATの活性化には、弱い持続的なCa²⁺流入あるいは高頻度の[Ca²⁺]_i振動が有効であるという結果である (Lewis、2006)。もし同様の機序がCCD-18Co細胞においても作動しているならば、TRPC1のSOC活性を介したCa²⁺流入の速度は遅く持続的であるので、NFATの活性化のみを選択的に起こしている可能性がある。これに対して、NF- κ BによるCOX2の発現誘導には、TNF α の即時的なCa²⁺動員作用が関与している可能性が考えられる。興味深いことに、本研究で用いたCCD-18Co細胞において、同様の速い[Ca²⁺]_i上昇 (1分以内) とそれに伴うCOX2発現の誘導とPGE₂産生の増加 (数時間以内) が、デオキシコール酸によって引き起こされることが報告されている (Zhuら、2002)。

いずれにせよ、このようなTNF α 刺激による時間差のあるCOX2およびTRPC1蛋白質の発現誘導効果は、腸管

炎症の重症化・進行過程において、重要な鍵を握っている可能性がある。すなわち、腸管炎症の初期には、TNF α 等のサイトカインは、筋線維芽細胞のCOX2発現を誘導することによってPGE₂の産生を高め、腸管を炎症から保護するように働く (代償期)。実際、潰瘍性大腸炎患者の炎症期やDSSで惹起した腸管炎症モデルでは、PGE₂の腸管保護作用を媒介するEP4受容体の発現が有意に増加していることが報告されている (Cosmeら、2000; Kabashimaら、2002)。しかし、炎症が遷延しより高度になると (すなわちTNF α 等のサイトカインの産生量が増しその作用が遷延すると)、COX2の発現に対して抑制がかかるようになり、その結果PGE₂による腸管保護作用が減弱し、炎症が増悪する可能性がある (非代償期)。もしこのような機序が実際に働いているのなら、TNF α の相反する炎症惹起・保護効果の一部は、TNF α 自身の[Ca²⁺]_i上昇作用とTRPC1発現増加を介した間接的な[Ca²⁺]_i上昇効果のバランスの変化によって、影響を受ける可能性がある。今後は、このような作用時間や強度によって決定される相反作用のバランスという観点から、TNF α の腸管への作用を理解していく必要があるだろう。更に、TNF α によるTRPC1発現増強効果がin vivoでもPGE₂産生を減少させ腸管炎症を増悪させる因子として働いているならば、TRPC1を標的とした抗体療法を、それ以外の有効な治療法と組み合わせることによって、IBDに対する治療効果を更に挙げる事が期待できる。既にTRPC1に対する細胞外抗体 (T1E3抗体) が、SOC活性によるCa²⁺流入を介した血管の増殖性閉塞性病変を軽減するのに有効であることを示す基礎データが報告されている (Kumarら、2006)、今後は、このTRPC1抗体の有用性をDSS腸炎モデルなど用いて個体レベルで検証する必要があるだろう。

結 論

本研究の結果から、消化管の筋線維芽細胞モデルとして、CCD-18Co細胞が極めて有用であることを確認することができた。またこの細胞では、腸管炎症の主要なメディエーターであるTNF α の刺激によってCOX2の発現が誘導され、PGE₂産生が劇的に増加すること、これにはNF κ Bによる *cox2* 遺伝子の転写活性の上昇が関与していることが明らかになった。更に、TNF α による刺激が高度になり且つ遷延すると、TRPC1蛋白質の発現が増加し、その結果、カルシニューリン/NFATの活性化を介したCOX2発現誘導に対する負のフィードバックが働き出すことが明らかになった。これらの結果から、TNF α の作用が単に炎症を惹起するだけでなく、炎症の初期には (あるいは正常時も) 腸管を保護するための代償機構として働いている可能性が示唆された。更に、炎症の進行増悪過程においては、SOCチャンネルの分子実体

の一つと考えられているTRPC1蛋白質の発現増加を介してCOX2の発現誘導にブレーキをかかり、PGE₂の腸管保護作用を減弱するという全く新しい機序の存在が明らかとなった。

謝 辞

本研究の一部は、福岡大学研究推進部研究経費、文部科学省科学研究費補助金、車両財団研究助成金、東京生化学研究会国際共同研究補助金の支援下に行われた。

参考文献

- Baud, V., & Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*, 11(9), 372-377.
- Chen, C. C., Sun, Y. T., Chen, J. J., & Chiu, K. T. (2000). TNF- α -induced cyclooxygenase-2 expression in human lung epithelial cells: involvement of the phospholipase C γ 2, protein kinase C α , tyrosine kinase, NF- κ B-inducing kinase, and I- κ B kinase 1/2 pathway. *J Immunol*, 165(5), 2719-2728.
- Cosme, R., Lublin, D., Takafuji, V., Lynch, K., & Roche, J. K. (2000). Prostanoids in human colonic mucosa: effects of inflammation on PGE₂ receptor expression. *Hum Immunol*, 61(7), 684-696.
- Di Sabatino, A., Pender, S. L., Jackson, C. L., Prothero, J. D., Gordon, J. N., Picariello, L., et al. (2007). Functional modulation of Crohn's disease myofibroblasts by anti-tumor necrosis factor antibodies. *Gastroenterology*, 133(1), 137-149.
- Flockerzi, V. (2007). An introduction on TRP channels. *Handb Exp Pharmacol*(179), 1-19.
- Fries, K. M., Blieden, T., Looney, R. J., Sempowski, G. D., Silvera, M. R., Willis, R. A., et al. (1994). Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol*, 72(3), 283-292.
- Gwack, Y., Feske, S., Srikanth, S., Hogan, P. G., & Rao, A. (2007). Signalling to transcription: store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium*, 42(2), 145-156.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch*, 391(2), 85-100.
- Inoue, R. (1995). Biophysical and pharmacological characterization of receptor-operated nonselective cation channels (ROCC) and their regulatory mechanisms in smooth muscle. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 105(1), 11-22.
- Inoue, R., Honda, A., & Lin, H. (2008). New frontier for the pathophysiology of TRP channels in cardiovascular system: cardiovascular remodeling and TRP channels. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 53(7), 844-853.
- Inoue, R., Jensen, L. J., Shi, J., Morita, H., Nishida, M., Honda, A., et al. (2006). Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. *Circ Res*, 99(2), 119-131.
- Kabashima, K., Saji, T., Murata, T., Nagamachi, M., Matsuoka, T., Segi, E., et al. (2002). The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J Clin Invest*, 109(7), 883-893.
- Kim, E. C., Zhu, Y., Andersen, V., Sciaky, D., Cao, H. J., Meekins, H., et al. (1998). Cytokine-mediated PGE₂ expression in human colonic fibroblasts. *Am J Physiol*, 275(4 Pt 1), C988-994.
- Kumar, B., Dreja, K., Shah, S. S., Cheong, A., Xu, S. Z., Sukumar, P., et al. (2006). Upregulated TRPC1 channel in vascular injury in vivo and its role in human neointimal hyperplasia. *Circ Res*, 98(4), 557-563.
- Kuriyama, H., Kitamura, K., Itoh, T., & Inoue, R. (1998). Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. *Physiol Rev*, 78(3), 811-920.
- Lewis, R. S. (2003). Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression. *Biochem Soc Trans*, 31(Pt 5), 925-929.
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., & Peters, J. A. (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev*, 87(1), 165-217.
- Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Takahashi, Y., Iino, K., Kuromitsu, S., et al. (2007). Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 42(3), 498-507.
- Paria, B. C., Malik, A. B., Kwiatek, A. M., Rahman, A., May, M. J., Ghosh, S., et al. (2003). Tumor necrosis factor- α induces nuclear factor- κ B-dependent TRPC1 expression in endothelial cells. *J Biol Chem*, 278(39), 37195-37203.
- Powell, D. W., Mifflin, R. C., Valentich, J. D., Crowe, S. E., Saada, J. I., & West, A. B. (1999a). Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol*, 277(1 Pt 1), C1-9.
- Powell, D. W., Mifflin, R. C., Valentich, J. D., Crowe, S. E., Saada, J. I., & West, A. B. (1999b). Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol*,

- 277(2 Pt 1), C183-201.
- Shi, J., Mori, E., Mori, Y., Mori, M., Li, J., Ito, Y., et al. (2004). Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *J Physiol*, 561(Pt 2), 415-432.
- So, I., & Kim, K. W. (2003). Nonselective cation channels activated by the stimulation of muscarinic receptors in mammalian gastric smooth muscle. *J Smooth Muscle Res*, 39(6), 231-247.
- Sugimoto, T., Haneda, M., Sawano, H., Isshiki, K., Maeda, S., Koya, D., et al. (2001). Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor of activated T-cell transcription factor in glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*, 12(7), 1359-1368.
- Sugimoto, Y., & Narumiya, S. (2007). Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem*, 282(16), 11613-11617.
- Szallasi, A., Cortright, D. N., Blum, C. A., & Eid, S. R. (2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov*, 6(5), 357-372.
- Tabata, H., Tanaka, S., Sugimoto, Y., Kanki, H., Kaneko, S., & Ichikawa, A. (2002). Possible coupling of prostaglandin E receptor EP(1) to TRP5 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 298(3), 398-402.
- Torihashi, S., Fujimoto, T., Trost, C., & Nakayama, S. (2002). Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal: requirement of calcium influx and localization of TRP4 in caveolae. *J Biol Chem*, 277(21), 19191-19197.
- Yamamoto, S., Shimizu, S., Kiyonaka, S., Takahashi, N., Wajima, T., Hara, Y., et al. (2008). TRPM2-mediated Ca^{2+} influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med*, 14(7), 738-747.
- Yiangou, Y., Facer, P., Dyer, N. H., Chan, C. L., Knowles, C., Williams, N. S., et al. (2001). Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *Lancet*, 357(9265), 1338-1339.
- Zhu, Y., Hua, P., Rafiq, S., Waffner, E. J., Duffey, M. E., & Lance, P. (2002). Ca^{2+} - and PKC-dependent stimulation of PGE₂ synthesis by deoxycholic acid in human colonic fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283(3), G503-510.

本研究の遂行中に発表した業績 (平成18年-20年度)
原著

1. Ryuji Inoue, Lars J. Jensen, Zhong Jian, Juan Shi, Lin Hai, Andrew I. Lurie, Freja H. Henriksen, Max Salmonsson, Hiromitsu Morita, Yasuhiro Kawarabayashi, Masayuki Mori, Yasuo Mori, Yushi Ito. Synergistic activation of vascular TRPC6 channel by receptor and mechanical stimulation via PLC/diacylglycerol and PLA₂/ω-hydroxylase/20-HETE pathways. *Circulation Research*, 104, 1399-1409, 2009.
2. Junna Hatae, Noboru Takami, Hai Lin Akira Honda and Ryuji Inoue: 17β-estradiol-induced enhancement of estrogen receptor biosynthesis via MAPK pathway in mouse skeletal muscle myoblasts. *Journal of Physiological Sciences*, 59(3), 181-190, 2009.
3. Shinichi Takahashi, Hai Lin, Naomi Geshi, Yasuo Mori, Yasuhiro Kawarabayashi, Noboru Takami, Masayuki X Mori, Akira Honda, Ryuji Inoue. Nitric oxide/cGMP/protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6. *Journal of Physiology*, 586.17, 4209-4233, 2008.
4. Lars Jørn Jensen, Ryuji Inoue, Masahiro Oike, Niels-Henrik Holstein-Rathlou, Yushi Ito. The role of L- and T-type calcium channels in local and remote calcium responses in rat mesenteric terminal arterioles. *Journal of Vascular Research*, 46(2):138-151, 2008.
5. Hua Zhang, Ryuji Inoue, Juan Shi, Yun-Qing Li_, Xiao-Hang Jin. Synergistic actions of diacylglycerol and inositol 1,4,5 trisphosphate for Ca^{2+} -dependent inactivation of TRPC7 channel. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(1) 90-97, 2008.
6. Juan Shi, Shinichi Takahashi, Xiao-Hang Jin, Yun-Qing Li, Yushi Ito, Yasuo Mori, Ryuji Inoue. Myosin light chain kinase-independent inhibition by ML-9 of murine TRPC6 channels expressed in HEK293 cells. *British Journal of Pharmacology*, 152(1):122-131, 2007.
7. Yuki Nakamura, Midori Yasukouchi, Sei Kobayashi, Kiyoko Uehara, Akira Honda, Ryuji Inoue, Issei Imanaga, Akira Uehara. Cell membrane-derived lysophosphatidylcholine activates cardiac ryanodine receptor channels. *Pflügers Archiv Eur J Physiol*. 453(4):455-62, 2007.

8. Hiromitsu Morita, Akira Honda, Ryuji Inoue, Yushi Ito, Kihachiro Abe, Mark T. Nelson, and Joseph E. Brayden. Membrane stretch-induced activation of a TRPM4-like nonselective cation channel in cerebral artery myocytes. *Journal of Pharmacological Sciences* 103: 417-426, 2007.
9. Motohiro Nishida, Naoya Onohara, Yoji Sato, Reiko Suda, Mariko Ogushi, Shihori Tanabe, Ryuji Inoue, Yasuo Mori, and Hitoshi Kurose. $G\alpha_{12/13}$ -mediated upregulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through NFAT activation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(32):23117-28, 2007
10. Yoshida, I., Monji, A., Tashiro, K., Nakamura, K., Inoue, R., Kanba, S.: Depletion of intracellular Ca^{2+} store itself may be a major factor in thapsigargin-induced ER stress and apoptosis in PC12 cells. *Neurochemistry International* 48: 696-702, 2006.
11. Yoshida, T, Inoue, R., Morii, T., Hara, Y., Takahashi, N., Yamamoto, S., Tominaga, M., Shimizu, S., Sato, Y., Mori, Y. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature Chemical Biology* 2(11):596-607, 2006.
12. Naoya Onohara, Motohiro Nishida, Ryuji Inoue, Hiroyuki Kobayashi, Hideki Sumimoto, Yoji Sato, Yasuo Mori, Taku Nagao and Hitoshi Kurose. Transient receptor potential C3/6 channels are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO Journal*, 25(22):5305-5316, 2006.
- を巡る病態生理の新展開。日本心電図学会誌、2009年、印刷中。
5. 井上隆司、本田啓、海琳。心血管TRPチャネルを巡る病態生理の新展開—心血管リモデリングとTRPチャネル—、蛋白質・核酸・酵素、Vol.53, No.7, 844-853、2008。
6. Ryuji Inoue, Lin Hai, Akira Honda. Pathophysiological implications of transient receptor potential (TRP) channels in vascular function. *Current opinion in Nephrology and Hypertension*. 17; 193-198, 2008,
7. 井上隆司。血管機能制御に関わる Ca^{2+} 透過型チャネル。イオンチャネル創薬—現状とその可能性。医学のあゆみ 223巻6号、6483-6487頁 (2007年11月10日刊行)。
8. Ryuji Inoue, Lars Jørn Jensen, Juan Shi, Hiromitsu Morita, Motohiro Nishida, Akira Honda and Yushi Ito. Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. *Circulation Research* 99: 119-131, 2006.
9. Motohiro Nishida, Yuji Hara, Takashi Yoshida, Ryuji Inoue and Yasuo Mori. TRP channels: molecular diversity and physiological function. *Microcirculation*, 13(7):535-550, 2006.
10. 伊東祐之、井上隆司、大池正宏、森田浩光。血管平滑筋収縮の概観。生体の科学、57巻、第6号、545-553頁、2006年。
11. 上原明、安河内緑、中村友紀、井上隆司。心筋小胞体チャネルの分子機能。心臓、第38巻、第5号、510-519頁、2006。

総説・著書

1. Ryuji Inoue, Juan Shi. TRP channels and blood pressure regulation. *In: TRP channel in health and disease*. ed., A. Szallasi., 2009 in press.
2. Ryuji Inoue, Zhong Jian, Yasuhiro Kawarabayashi. Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology. *Pharmacology & Therapeutics*, 2009 in press.
3. 井上隆司、海琳、波多江純眞。血圧調節とTRPチャネル。日本自律神経学会誌、2009年、印刷中。
4. 井上隆司、瓦林精広、森誠之。心血管TRPチャネル

学会発表

(本研究と直接関連したもの)

1. Hai Lin, Akira Honda, Ryuji Inoue. Functional analysis of TRP isoforms expressed in human colonic myofibroblast cell line CCD-18Co. 第80回日本薬理学会年会、口演。平成19年3月14日、名古屋。
2. Lin Hai, Akira Honda, Ryuji Inoue. Functional analysis of TRP isoforms expressed in human colonic myofibroblast cell line CCD-18Co. 第84回日

- 本生理学会大会、ポスター発表。平成19年3月22日、大阪。
3. 海琳、本田啓、波多江純真、井上隆司。大腸由来筋線維芽細胞CCD-18CoにおけるTRP蛋白質発現パターンと機能解析。第57回西日本生理学会、口演。平成18年10月27日、宮崎。
- (その他)
1. Ryuji Inoue. cGMP-mediated regulation of cardiovascular Ca^{2+} entry channel TRPC6 and its pathophysiological implications. 4th International Conference on cGMP: cGMP Generators, Effectors and Therapeutic implications. June 19-21, 2009. Regensburg, Germany. (国際シンポジウム)
 2. Ryuji Inoue, Zhong Jian. Roles of cytoskeletal-phosphorylation relationship in receptor-mechanical activation of cardiovascular Ca^{2+} entry TRPC6 channel. 第82回日本薬理学会年会シンポジウム。平成21年3月18日、横浜。
 3. Ryuji Inoue. The origin of Mechanosensitivity of cardiovascular receptor-activated Ca^{2+} entry channel TRPC6. The 8th Korea-Japan Joint Symposium. 17. Jan. 2009, Pusan, Korea (国際シンポジウム) .
 4. Ryuji Inoue and Zhong Jian. Modal activation mechanism of cardiovascular TRPC6 channel. IUPS2009 International Conference of Physiological Sciences. 15. Jan. 2009, Pusan, Korea (国際シンポジウム) .
 5. 井上隆司。受容体機械刺激協働による血管平滑筋 Ca^{2+} 動員の制御機構。トランスポーターワークショップ IN 福岡。平成20年11月2日、福岡 (特別講演)
 6. 井上隆司。「電位非依存性 Ca^{2+} 流入チャネルTRP蛋白質による血管緊張度制御とその破綻」。第61回日本自律神経学会総会、シンポジウム「自律神経調節とTRPチャネルファミリー」。平成20年11月7日、横浜。
 7. 井上隆司。「新しい Ca^{2+} 流入チャネル群TRP (Transient receptor potential) 蛋白質をめぐる心血管病態生理の新展開」。第23回犬山不整脈カンファランス、福岡、平成20年8月30日。招待講演。
 8. 井上隆司。TRPチャネル/ Ca^{2+} 流入チャネル群を巡る心血管の病態生理。第50回平滑筋学会、弘前。平成20年7月4日、教育講演
 9. 井上隆司。“Recepto-mechanical synergism in vascular receptor-activated Ca^{2+} entry”。William-Ganzシンポジウム。招待講演。秋田、平成20年4月19日。
 10. Ryuji Inoue. Recepto-mechanical synergism in activation of vascular receptor-operated Ca^{2+} channel TRPC6. Symposium “Sensing function of TRP channel”. The 85th annual meeting of Japanese Physiological Society, Tokyo, 25 March 2008. 国内シンポジウム
 11. 井上隆司。チャネルパシー -channelopathy-イオンチャネルの構造変異と機能改変が意味するもの。平成19年11月1日、福岡国際会議場。教育講演。
 12. 井上隆司。Pathophysiological implications of transient receptor potential (TRP) channels in the cardiovascular system. 第11回Molecular Cardiovascular Conference. Keynote Lecture. 平成19年9月15日、キロロ “ホテルピアノ”。招待講演。
 13. 井上隆司。Dynamic regulation of vascular Ca^{2+} entry channel TRPC6 - involvement of recepto-mechanical synergism and phosphorylation. 信州・甲州・静岡循環セミナー。平成19年8月31日。沼津。招待講演。
 14. 井上隆司。Lipid- and phosphorylation-mediated regulation of vascular receptor-operated Ca^{2+} entry channel TRPC6. 平成19年度第1回班会議 文科省特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」、ハイライトレクチャー。平成19年7月24日、湘南国際村センター。
 15. Ryuji Inoue. An amino acid residue involved in calmodulin-mediated activation of TRPC6 channel. Korea-Japan Joint Seminar, 21st January 2006, Gwangju, Korea
① (日本学術振興会二国間共同シンポジウム)
 16. Ryuji Inoue, Shinichi Takahashi, Yasuhiro Kawarabayashi, Hai Lin, Akira Honda. Nitric oxide (NO) serves as a tonic brake via protein kinase G (PKG) for Ca^{2+} entry through vascular transient receptor potential (TRP) channel TRPC6. 第3回

TRPチャンネル研究会。平成19年7月20日、岡崎。

17. 井上隆司。Pathophysiology of transient receptor potential protein in cardiovascular muscle. 第12回ブンゴイノトロピーアゴラ。平成19年5月25日。大分。招待講演。
18. 井上隆司、高橋真一、瓦林靖広、中村友紀、海琳、本田啓、上原明。血管緊張度制御とリモデリングに関わるTRP蛋白質。日本臨床生理学会、シンポジウム10。平成18年11月10日、福岡。
19. Akira Honda, Ryuji Inoue. Cygnets: Spatial and temporal analysis of intracellular cGMP. 6th Korea-Japan Joint Symposium: session "INTRACELLULAR MECHANISMS". 14th October, 2006, Seoul, Korea.
20. Ryuji Inoue, Shinichi Takahashi, Yasuhiro Kawarabayashi, Yuki Nakamura, Akira Honda, Hai Lin, Akira Uehara. Regulation and function of vascular TRP cation channels. FAOPS2006 symposium, 18th October, 2006, Seoul, Korea
21. Hai Lin, Shinichi Takahashi, Naomi Geshi, Yasuhiro Kawarabayashi, Akira Honda, Yasuo Mori, and Ryuji Inoue: Molecular basis for calmodulin-dependent kinase II (CAMKII)-mediated regulation of vascular receptor-operated Ca²⁺ entry channel TRPC6. 第2回TRPチャンネル研究会平成18年6月12日-13日。岡崎カンファレンスセンター
22. 井上隆司。血管機能を制御する新しいCaチャンネル群TRP蛋白質。福岡大学医学会講演会、平成18年3月1日、福岡。(講演)
23. 井上隆司。血管の受容作動性Ca²⁺流入チャンネルTRPC6の新しい制御機構。第83回日本生理学会大会シンポジウム、3月28日、前橋。(国内シンポジウム)

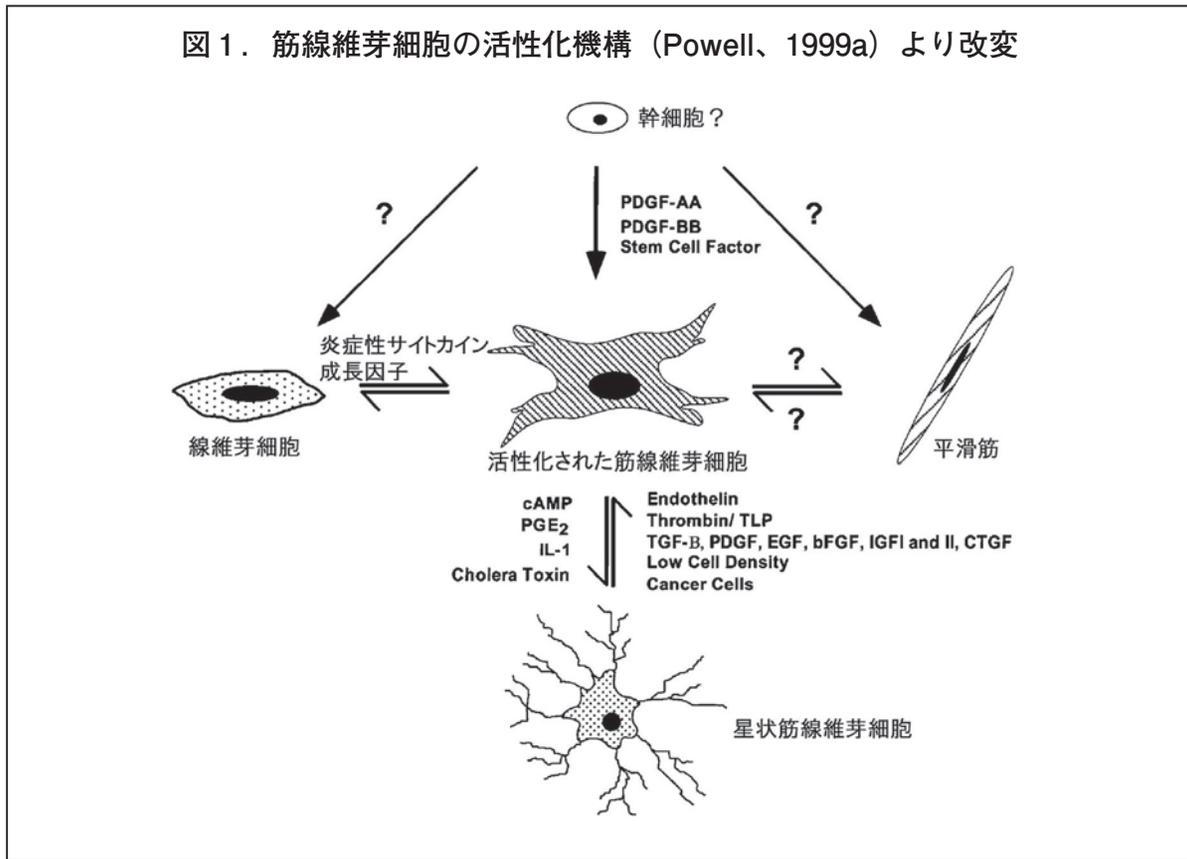


表 1. 筋線維芽細胞で産生分泌される成長因子、ケモカイン、炎症性メディエーター

サイトカイン	成長因子	ケモカイン	炎症性メディエーター
IL-1	TGF-β	IL-8	Phospholipase A ₂ activating protein
IL-6	CSF-1	MCP-1	PGE ₂
TNF-α	GM-CSF	GRO-1α	Prostacyclin
IL-10	PDGF-AA	MIP-1α	HETEs
	PDGF-BB	MIP-2	PAF
	bFGF	RANTES	NO
	IGF-I	ENA-78	CO
	IGF-II		H ₂ O ₂ , O ₂
	NGF		
	KGF		
	HGF		
	SCF		

略 語 : IL, interleukin; TNF-α, tumor necrosis factor-α; TGF-β, transforming growth factor-β; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; CSF-1, colony-stimulating factor I; GM-CSF, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor; PDGF, platelet-derived growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; IGF, insulin-like growth factor; NGF, nerve growth factor; KGF, keratinocyte growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; SCF, stem cell factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; MIP, macrophage protein; RANTES, regulated, upon activation, normal T cell expressed and secreted; ENA-78, epithelial neutrophil-activating peptide 78; GRO-1α, melanoma growth-stimulatory activity; HETEs, hydroxyeicosatetraenoic acids; PAF, platelet activating factor.

表 2. 筋線維芽細胞に発現する受容体

サイトカイン	成長因子	炎症性メディエーター	神経伝達物質、傍分泌活性物質	接着因子
IL-1 IL-1Ra TNF- α IL-6 R IL-8 R IL-4 R IL-11 R	TGF- α /EGFR TGF- β RI and RII PDGF- α PDGF- β c-kit aFGF and bFGF R IGF-IR Thrombin receptor FGFR-II	Prostaglandins HETEs	Acetylcholine Histamine Serotonin Bradykinin Endothelin Atrial natriuretic factor Aldosterone or ANG II	ICAM-1 VCAM-1 NCAM MCP-1 α 1b1 integrin CD18

略語：EGFR, epidermal growth factor receptor; ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; NCAM-1,neural cell adhesion molecule-1; RI and RII, types I and II receptors.

図 2. ヒト TRP 蛋白質スーパーファミリーの dendrogram

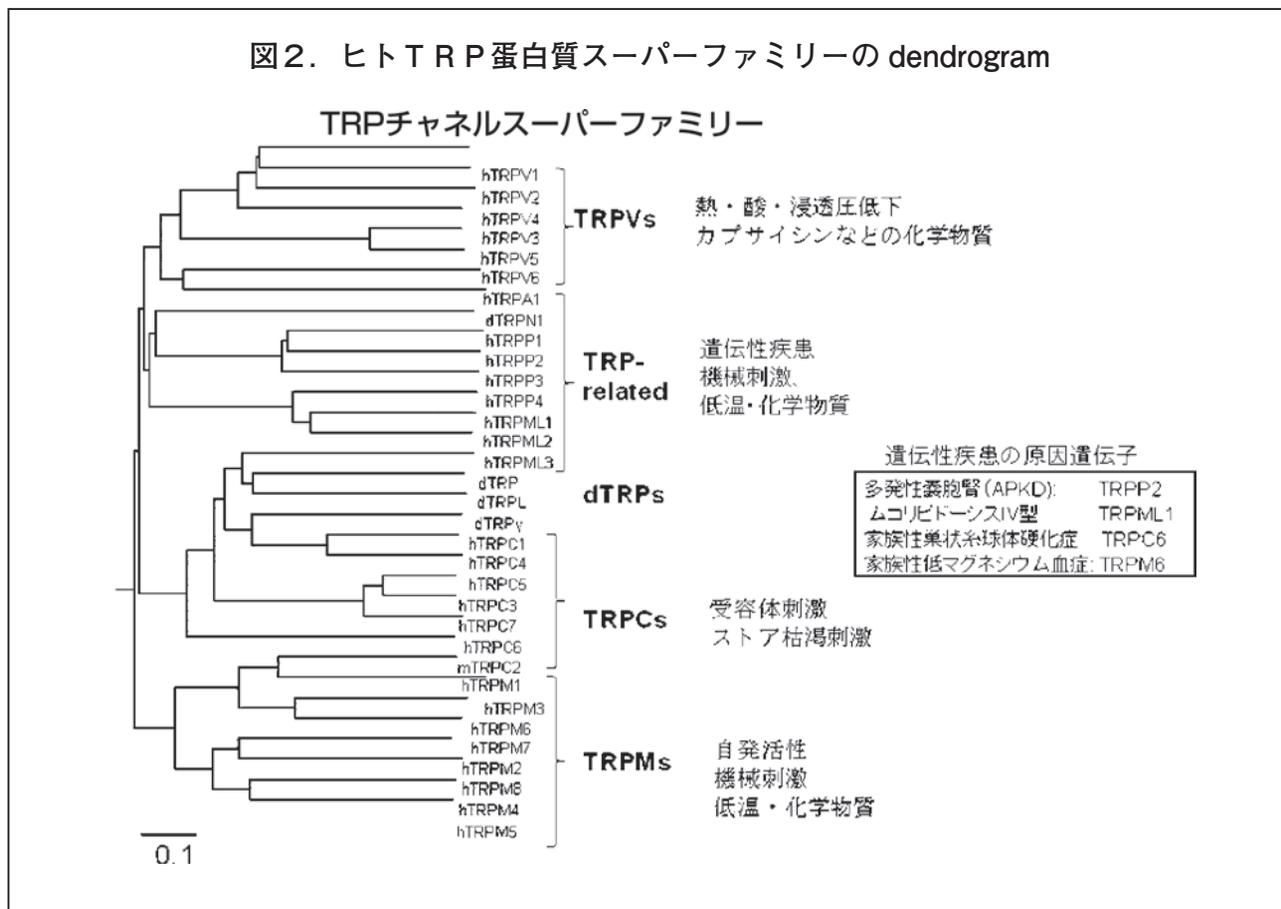


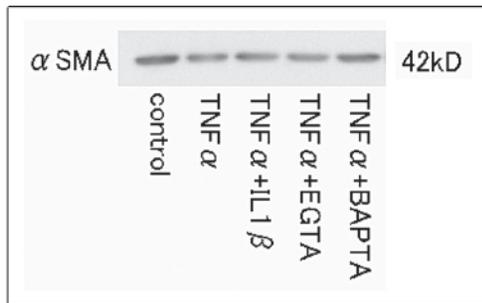
表3. TRP チャネルの活性化因子・修飾因子

1. 脂質代謝、細胞内外生理活性物質 GPCR or TyrR-linked signal transduction、Diacylglycerol, IP ₃ , PIP ₂ /PIP ₃ , LPC, 20-HETE, 12-HETE, 5,6-EET, sphingosin-1, anandamide, ATP, spermine, Mg ²⁺ , Mg-nucleotides, NO, ADP-ribose, thioredoxin
2. Ca ²⁺ /カルモジュリン、細胞骨格系、その他の蛋白質
3. リン酸化・脱リン酸化 PKA, PKC, PKG, CaMKII, Src, Fyn, Calcineurin
4. 温度 (温熱、寒冷)、酸性度、湿度 温痛覚ニューロン (DRG)
5. 機械刺激 (伸展、牽引、圧迫、浸透圧変化など) 浸透圧感受性ニューロン (視床下部)、内耳有毛細胞?、筋原性収縮反応
6. 酸化ストレス、化学物質 活性酸素、味覚刺激、カプサイシン, カンフル、メントール, イチリン, マスタードオイル等
7. 電位変化による活性化修飾

表4. TRP チャネル蛋白質スーパーファミリーが関与する生体内機能と病態

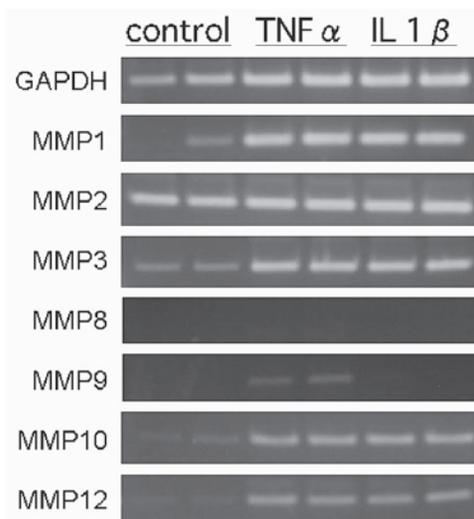
<u>遺伝病の原因遺伝子</u>	
多発性嚢胞腎 (APKD):	TRPP2
ムコリピドーシス IV 型:	TRPML1
家族性限局性巣状糸球体硬化症 (FSGS):	TRPC6
家族性低マグネシウム血症:	TRPM6
<u>多種多彩な生体内機能とその異常との関連</u>	
1. 神経系 (シナプス伝達、神経可塑性、痛覚・味覚伝導、浸透圧制御、アルツハイマー病? パーキンソン病?)	
2. 循環器系 (本態性高血圧、肺高血圧、閉塞性血管障害、心筋肥大・変性)	
3. 消化器系 (消化管運動調節、炎症性腸症候群、過敏性腸症候群?)	
4. 呼吸器系 (気管支喘息などの気道過敏性)	
5. 腎泌尿生殖器系 (腎 Na 利尿・水利尿、膀胱過敏症)	
6. 免疫系 (免疫異常、炎症反応)	
細胞増殖制御 (悪性腫瘍、筋ジストロフィー)	

図3. CCD-18Co 細胞の α -SM アクチン免疫染色・ウェスタンブロット



左： α -SM アクチンに対する細胞免疫染色像。
右：各種刺激条件下の α -SM アクチン発現の変化。

図4. CCD-Co 細胞の MMP 発現パターン



TNF α 10 μ M あるいは IL-1 β 100nM を培養液中に添加し 24 時間後に RNA を採取した。それぞれ 2 例の典型的な結果を示す。
筋線維芽細胞の発現している報告のある 7 種の matrix metallo-proteinase (MMPx) について、特異的なプライマーを用いた RT-PCR を行った。House-keeping enzyme である GAPDH (glyceraldehyde dehydrogenase) を対照として用いた。

図5. CCD-18Co 細胞における TRP mRNA の発現パターン

28 種の各 TRP アイソフォームに対する特異的なプライマーを用いて、CCD-18Co から抽出した mRNA に対する RT-PCR を行った。図中の数字は転写産物の塩基数を表す。

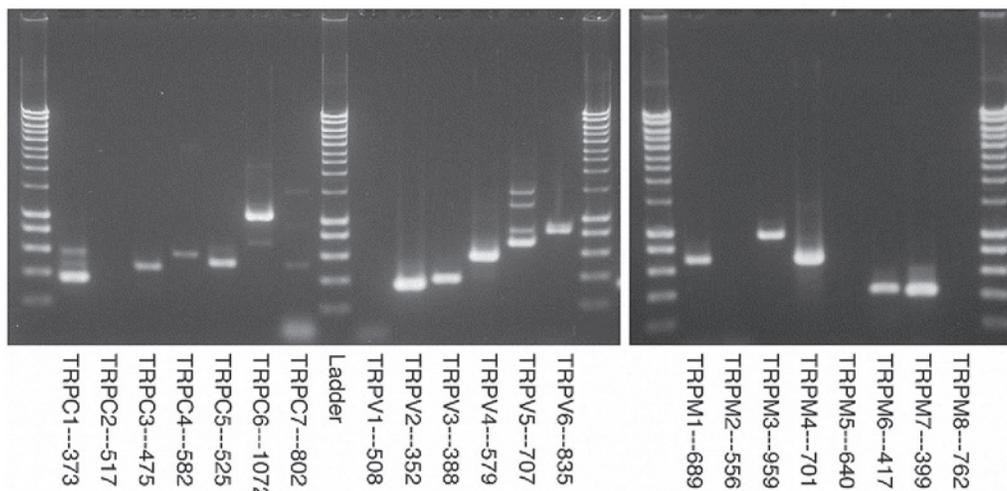


表5. TRP チャネルの活性化物質

TRPC3/C6/C7	G _q /PLC-agonist OAG, RHC80267
TRPV1-V4, TRPM6	2-APB
TRPM7	2-APB (抑制)
TRPV2, V4, TRPM5	低浸透圧
TRPV4	4αPDD
TRPM3	sphinganine

図6. 各種 TRP 活性化薬によって惹起される CCD-18Co 細胞の [Ca²⁺]_i 上昇反応と電流

上段：fura による Ca²⁺ 蛍光測定 (30-50 の細胞の平均)。

中段：パッチクランプによる膜電流測定；下段：中段の電流の電流電圧関係。

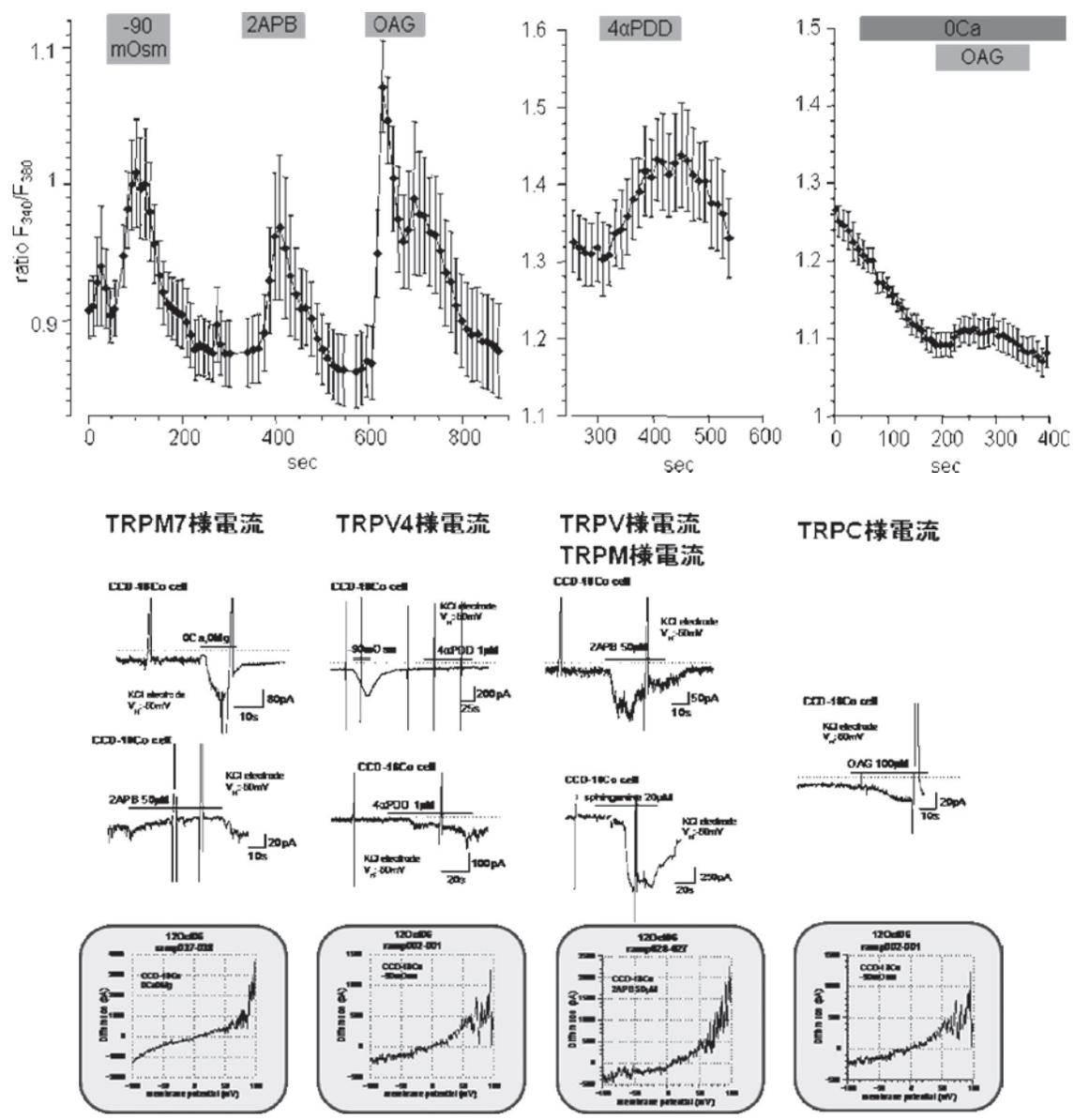


図7. TNF α で誘発される CCD-18Co 細胞の Ca 上昇反応と陽イオン膜電流

左: Ca²⁺ 蛍光測定; 中: 膜電流測定; 右: TNF α で惹起される電流の電流電圧関係。
 保持電位: -50mV。電流電圧関係は 2 秒の傾斜上昇電圧 (-100 - 100mV) を与えて得られる TNF α (50ng/ml) 投与前後の差電流を表している。

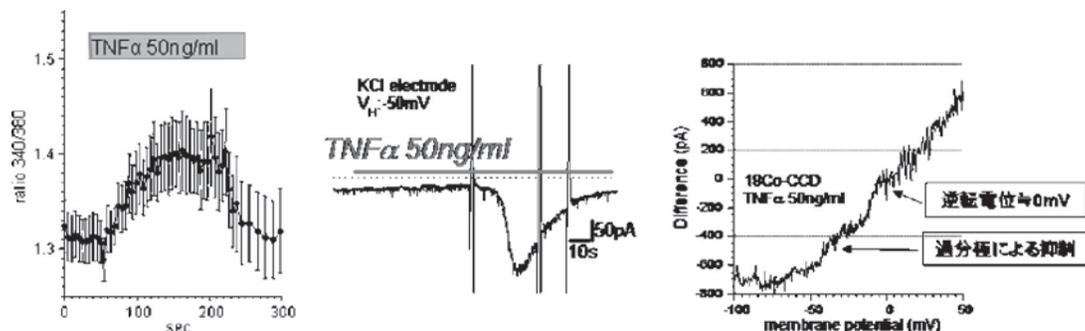


図8. TNF α 刺激による TRPC1 発現の増加

A: RT-PCR による TNF α 投与後の TRPC mRNA レベル変化の検討。実際の例と平均;
 B: TNF α 刺激後の TRPC1 蛋白質発現レベルの時間経過。左: 典型例、中: CCD-18Co 細胞の TRPC1 に対する免疫蛍光像、右: 左実験の平均

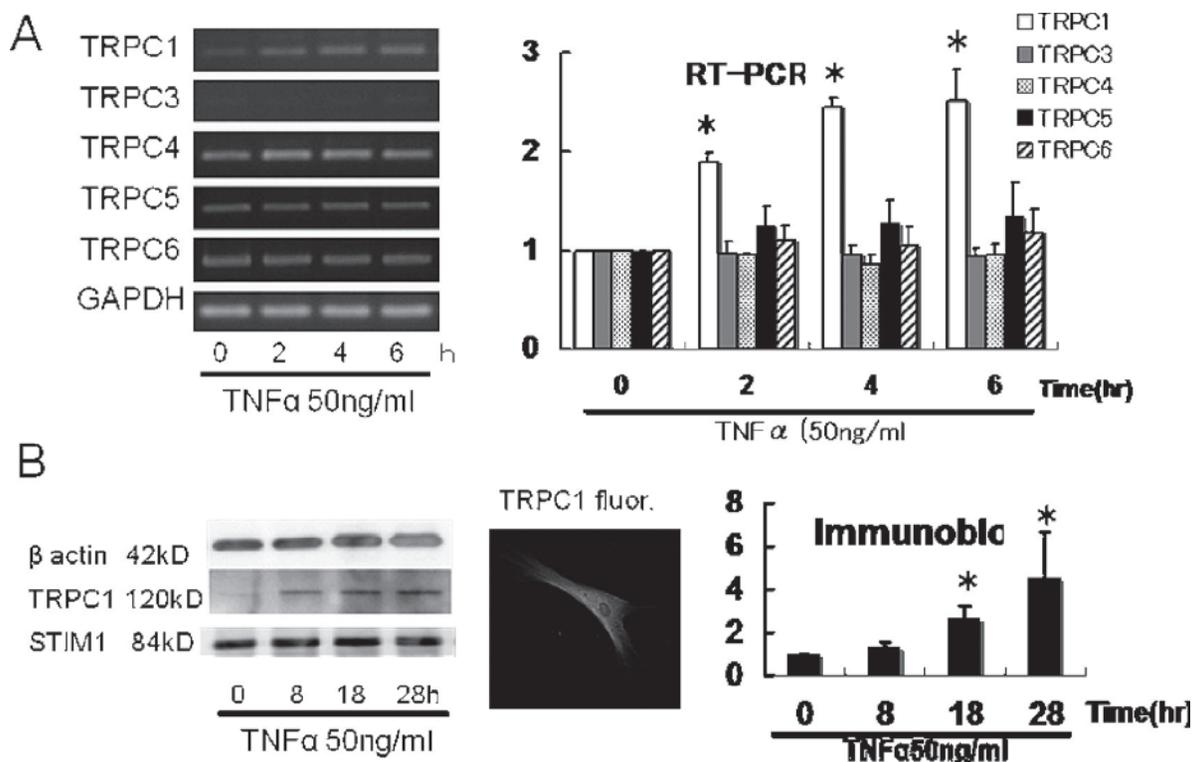
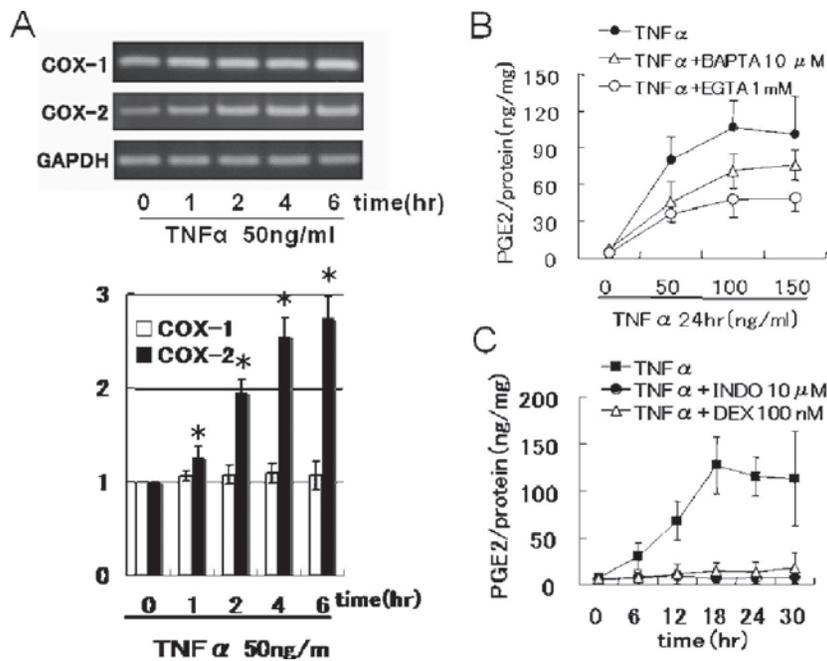


図9. TNF α 刺激による COX2 発現誘導と PGE₂ 産生増加

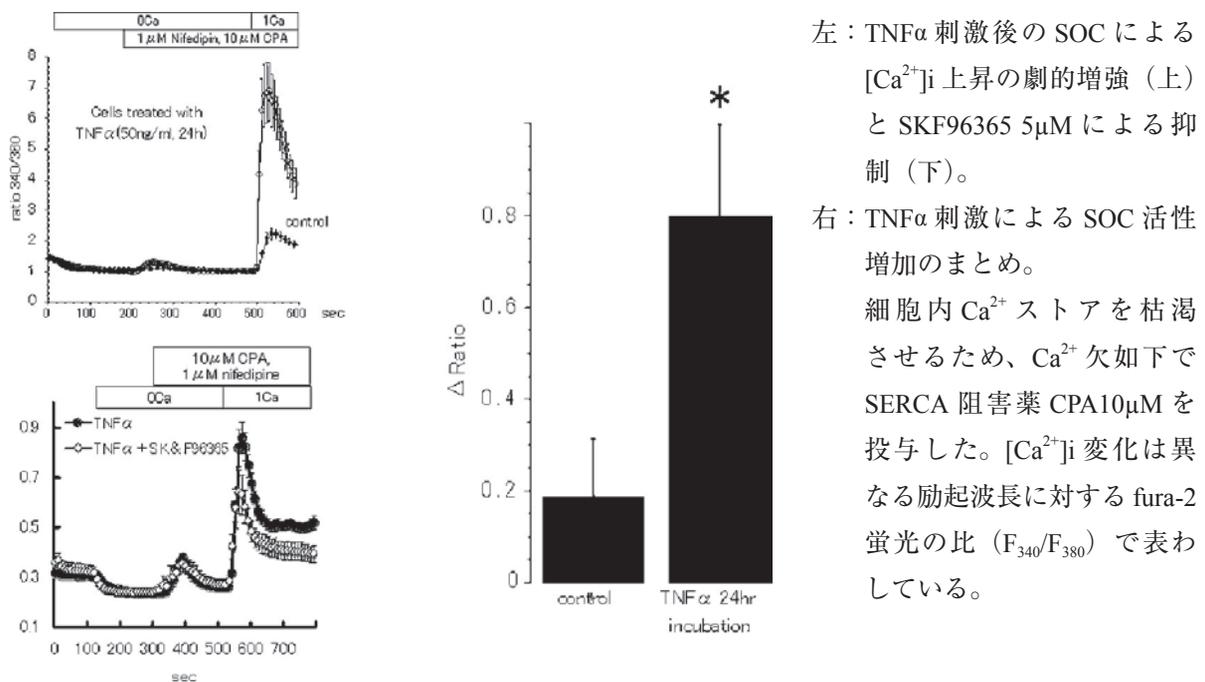


A : TNF α 刺激後の COX、COX2 mRNA レベルの変化。

B : TNF α 刺激による PGE₂ 産生の劇的増加の濃度依存性及びそれに対する細胞内外 Ca²⁺ キレート抑制効果。

C : TNF α 刺激による PGE₂ 産生増加の時間経過とそれに対するインドメタシン、デキサメサゾンの抑制効果。

図10. TNF α 刺激で誘導された TRPC1 発現の増加に伴う SOC 活性上昇



左 : TNF α 刺激後の SOC による [Ca²⁺]_i 上昇の劇的増強 (上) と SKF9365 5 μ M による抑制 (下)。

右 : TNF α 刺激による SOC 活性増加のまとめ。

細胞内 Ca²⁺ ストアを枯渇させるため、Ca²⁺ 欠如下で SERCA 阻害薬 CPA10 μ M を投与した。[Ca²⁺]_i 変化は異なる励起波長に対する fura-2 蛍光の比 (F₃₄₀/F₃₈₀) で表わしている。

図11. CCD-18Co細胞におけるTRPC1発現ノックダウンによるTNF α のPGE₂産生増強効果の抑制

A : TRPC1 に対する siRNA ノックダウンと TNF α 誘発性 PGE₂ 産生の増強。
 B : TRPC1 の強制発現による TNF α 誘発性 PGE₂ 産生の抑制。

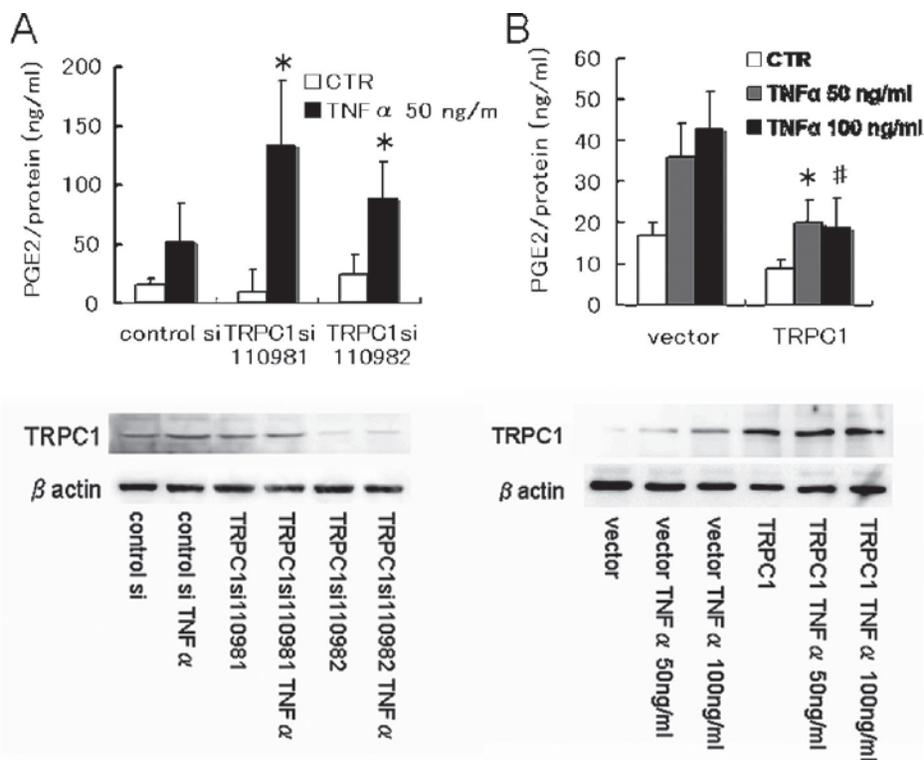


図12. TRPC1発現ノックダウンによるTNF α のSOC活性増強効果の抑制

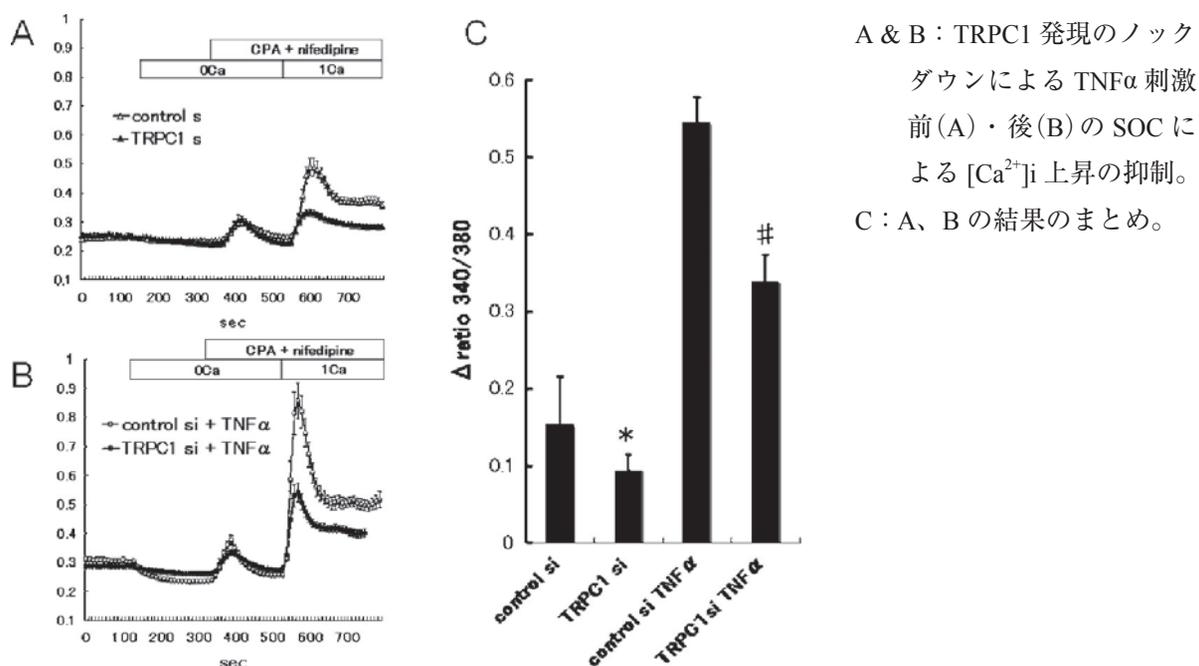


図13. TNF α のPGE₂産生増強作用に対するNF κ B、NFAT系の相反作用

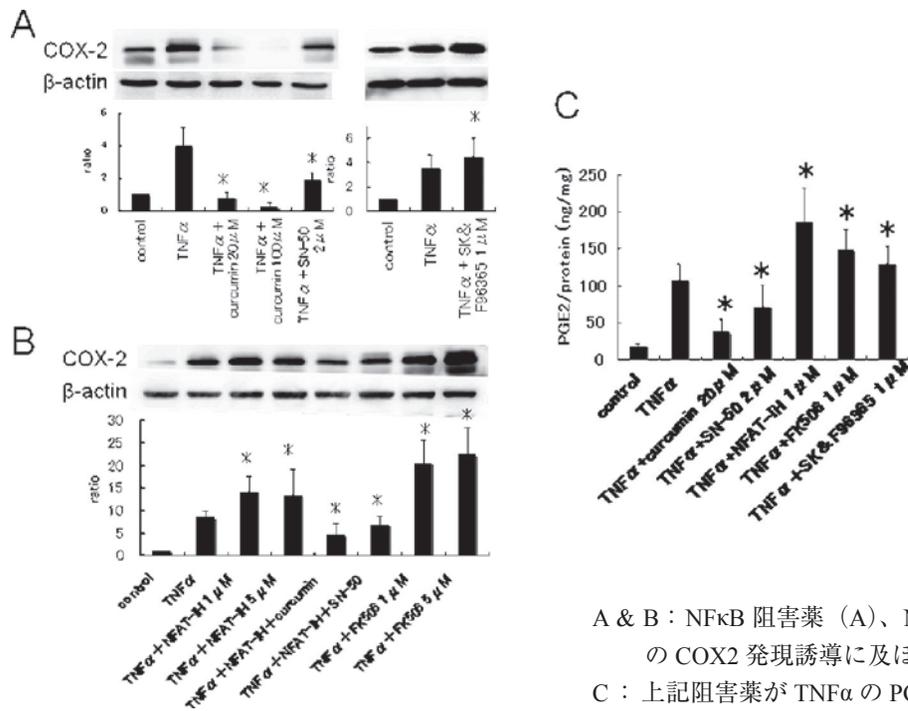


図14. TNF α のTRPC1/SOC増強に対するNF κ B、NFAT系の異なる作用

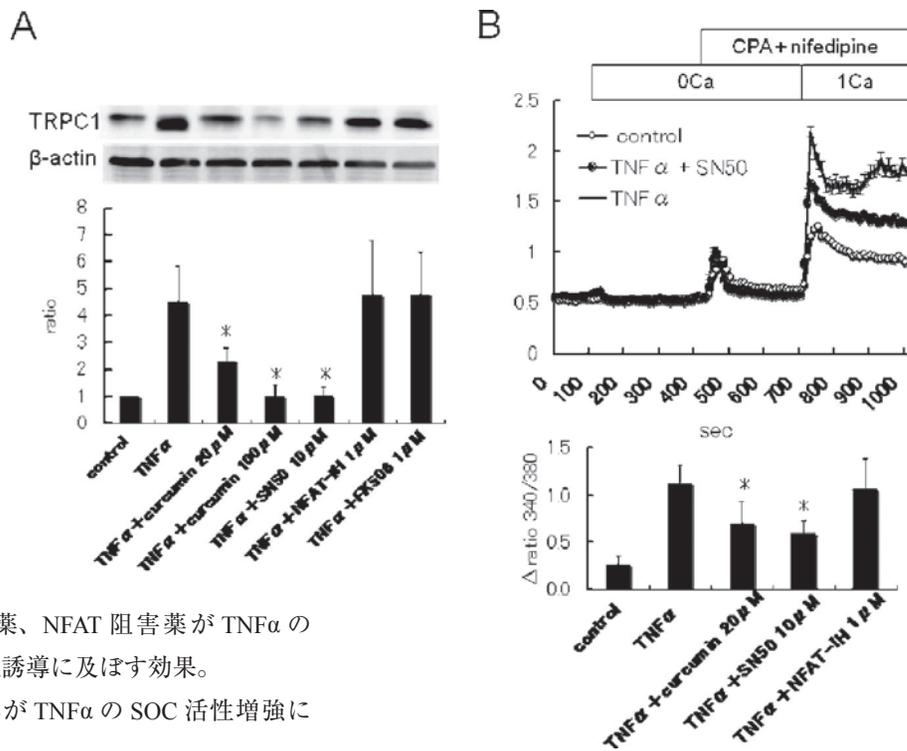
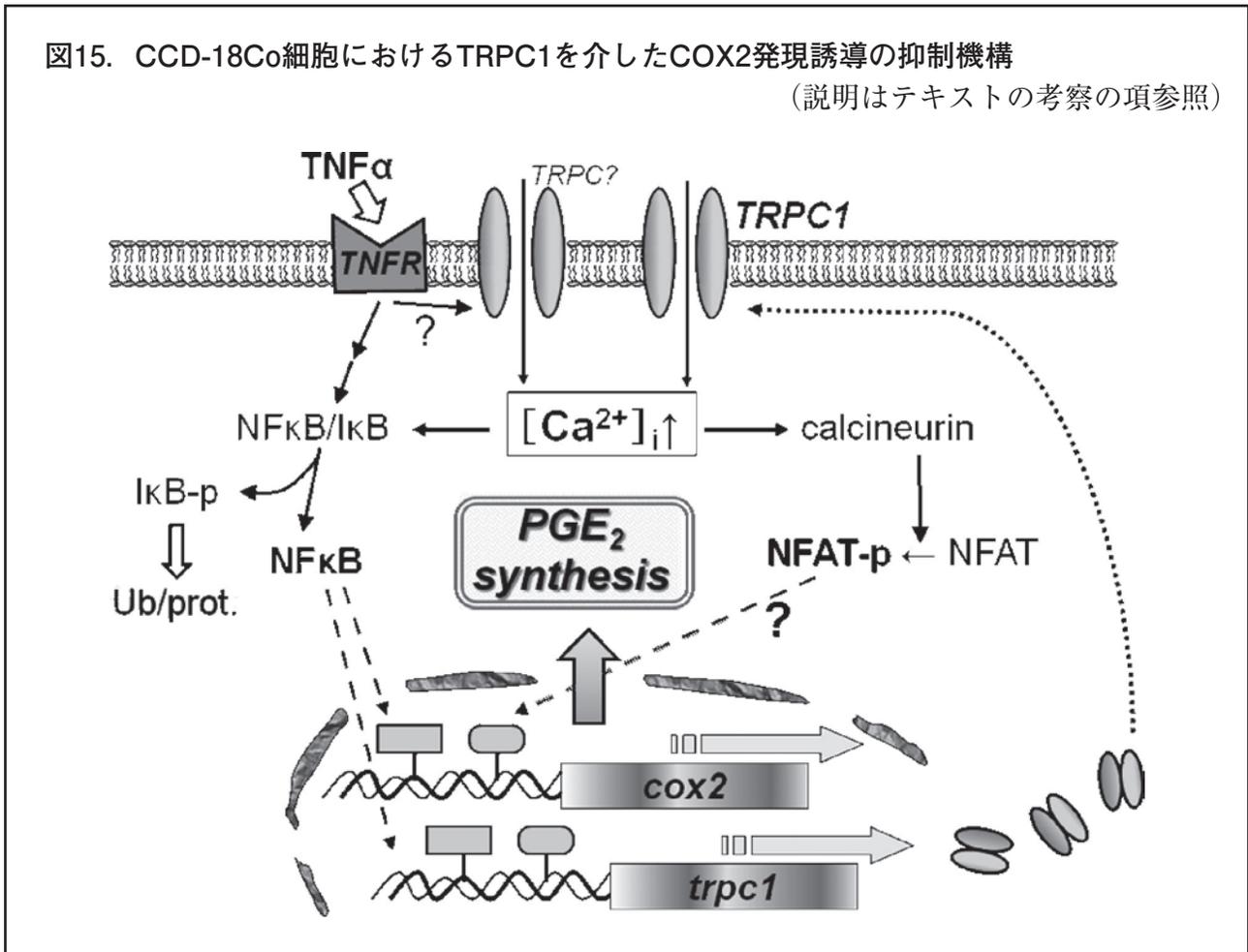


図15. CCD-18Co細胞におけるTRPC1を介したCOX2発現誘導の抑制機構

(説明はテキストの考察の項参照)



附図 1. ヒト *cox2* 遺伝子の 5'領域配列

```

-5022  GTAGGTTTTT  TCCCCTCAAA  GTGAAATATT  TCATTCCACT  CTTTTCTTCT
      TTGTATGGTA  TCTGAGAAGA  AGTCAGATGT  AATTCTTATC  ATTATTACTT
      AAAAGATTGC  TTCTGTTCCT  TTCTCTCTTC  TCCTTCCCTT  CTTTCCTTCT
      CTGTATATTA  CACCTTTTTAT  AGTTGCCCCA  TATTTCTTAG  ATATTATGTT
      TTGGTTTTCT  TCTGTGTTTT  TTTCTTTGAT  TCTCAGTTTT  AGAAGTCTCT
      ATTTATATAT  CTGCAATCGC  AGGGATTCTT  TCCTCTGCCA  TGCCAGTCTC
      ACTAATAAGC  CCTTACAGAC  ATTGTTGACT  TCTGTTCCAG  TGTTTTTGAT
      CTCTAGCATT  TCTCTGATTA  TTTCTTGGAA  TTGCCATCTG  TCTACTTACA
      TTACCAACCT  ATTCTTGTGT  GTTGTCTTAT  CATAGTAATT  GCAGTTGTTT
      TAATTTTCATA  GGTATTGTAA  TTTCAACATC  TCTACCATAT  TTGACATTGA
-4522  TTCTGATGCT  TGCTCTGTCT  TATCAAGCTA  TGTTTTTGTC  TTTTAGTGTG
      ACTTCTAATT  TTTTGTGAA  AGCCAGGCAT  GATGTACTGA  GTGAAAGAAA
      CTAATACAT  TGTAATGTGA  CGATAAGAGT  TCAGGGGAAG  TGAAGCATTC
      TATAGTCCTA  TAGCAGGTCT  CGGCCTTTTA  GTGAGCCTGT  GCCTATGAAC
      GGTGACTTTC  AACAAAGTGCT  TTCATTCCA  CTCTTTTCCT  GTCCTTAAGT
      GGGACAAGAT  CACTGGGGGG  GGGCTAGAAT  TGGGTATTTT  CCTTCTCCAA
      TGTAGAAGCT  AAAGAGAGGG  CTGGAGTTGG  GTATTTTTCT  TCCCCTGTAT
      GGAAGCTAG  AGGCAGTTAA  ATTTGGATAT  TTTCCTTCTT  CTAATTCAGT
      TAGGCTGCGA  CAAAAATCCC  GACAGTTTAG  GCTCTAATAT  TATAAAATAA
      TTTCTCTTGA  GTATAGGCCT  TATTAAGAAC  ACTATACTCT  GATGGAGCTG
-4022  AGGGGGAGTT  TTCCTCTGATA  TTCACTGCGA  GAACCTCGTA  GAGCTCCAGG
      AAGCAAAACT  CACAAAAGTG  TGGGAGTCTT  CCAGAATTTT  TCCTTTGCAG
      ACTTATCTGC  ACTGAACCTC  CAGAAATTCA  TCAATTACAG  TTCAGGTTTT
      CCTACCCAGG  TACTGGTTTT  CATGGAGGTT  TCTGCCTGTG  CATTTCTGCT
      CCAGTAAGTT  GTTCTTCTTG  TATGGTCTGT  CTTTCAAATT  TTTTAAGTAG
      GGTATGACC  TGTCGCCTCA  CTCTCTGAC  AGTTCTGAGA  GTGTTGATTT
      TTCAGTTTGC  TTAGATTTTT  ACTTGTTTTT  AGGATGAAGT  GACAATTTCC
      AAGCTCCTCC  CTGACATGCC  AGATCAGAAA  CTGAAAGTCC  TAAGCCTCAT
      ATTCTGTGCG  TGGGTATGTT  CACATCCTGC  CTGCTCCAGT  GCCCCACCT
-3522  CACACTCTCT  TTCCCTTCCT  TGTCCTCTTG  TGAGATTTCT  AGGTCCAATA
      CAAAGACTGT  GTTCAACTCA  TTCAACTACT  TTGGCTCATC  TGAGTATTAT
      AATGAACAAT  CACAAAAAAA  AATGAAGTAA  AAGAAAAATC  CATCAAAGAA
      TTGAGATATT  TGAGAAAAAG  AAAGGAGATC  AGTGTTTTAT  AAAACTTAGA
      AATAGATTTT  TTAAGTGTTT  CTTCATTGAC  TTATGTGAAA  GGACTTTTTCT
      TAATTTAACA  AATTATGTGC  TTTCGTTTAT  AGCCTCAAAA  CTTCTTGTGT
      AGCTAAGAA  TAAACATTTT  TCAGGCTTTA  CTAAAGGACT  AACGTAAAGA
      TCTTCTGTA  GTAACATTTT  TGCTACTCAA  GGAAGAGATA  AACTTATGG
      CATAACCTTG  CCAAAGTATA  CTAAGAATAA  CCCTGACACA  AAGCTCTTTT
      TTCAGCCAAC  ATGCCATGAA  AGAAAGAAGA  CAAGGGGTGA  TCTCCACTCT
-3022  CTAAGTGAAC  CACTAAACCC  ACCAAAGAAG  AAACGAGGGA  AATAGAAAAGA
      GGACCCTTGC  CTGAGATAAT  GGATCTGTAT  GTATGAGTAG  TAGAACCTTG
      CTCAAAGTAC  AAGGAAGGGA  AAAAAAAGTT  AGTTTATTTG  GAATTTTGG
      CATTAAAGAGT  CTTTATTGTT  CATTTTCTTT  TAACTCACAT  GAATGGCTTA
      TCACTTCAAT  TAATAAATAT  TTCATTTCTT  TTCAACATAT  TCATGAAACA
      AATCTGAAAT  GAACAGTGCA  ACATGTGAAT  GTTTAGAACA  TTATAAAATT
      AAACACAAAA  TCTGTCTGGC  AATCTTCCTA  GCATCTTAAG  AAAAAGTTG
      ACAAATTTT  AAGCAGCAGA  AGGGGGCAGT  AAAACTCAAC  AGAAAGCTCT
      GGAAGATTTT  TAAGATTTCT  CCTATTTTCT  TTTTCATGTA  GATTATTTCC
      CAACAAATTT  CAGACGCTAA  TAGAAATTTT  GTACAACAGA  TCCATATATT
-2522  TGCCTAAAA  AGACACAGAA  ACATTGAATA  TATGCAAACA  TGAGAGCTAT
      AAGTTTTACA  TGATCAAACC  TTTTTTTTAT  GGTACACAAT  AGTCACAGTA
      CTTTTCCATA  TAAAACAGGT  TTAGTGGTCT  TAATTTAGTT  TGGCACATTT
      AATACACTCC  CATGACCAGC  ATCCCAAATG  TACCTATCCG  TTTTATTTTA
      TTGTCTCAGA  ATTGTCAGTT  ATTTAATAAA  TTATGTAACT  TTTTTCCTTA
      TGCTCAGATT  TGCACCTTCT  TCTAAAACCT  TGCCCATCCT  TAAAGTCCCA
      GATTCTCCTT  GAACTTTTTT  TTTTGACTTT  CCAAGTACAT  GGAACTCTTC
      ACTCTATCCT  GCTATATAAG  TGACAGAATT  TCCACTATGG  GATAGATTGA
      GTTCAATTT  TTTGAGTTTA  AAATAATCTA  AATATAATTA  TTCCTTATGC
      CCTGTTTTTC  CCTCACTTTT  GTATCCAAAT  CTCTTTTCAG  ACAACAGAAC
-2022  AATTAATGTC  TGATAAGGAA  GACAATGATG  ATGATCACTT  CAAAATGAAT
      TCAGGATTGT  AATGTAAAA  TTTAGTACTC  TCTCACAGTA  TGGATTCTAA
      CATGGCTTCT  AACCCAAACT  AACATTAGTA  GCTCTAACTA  TAAACTTCAA

```

```

ATTTTCAGTAG ATGCAACCTA CTCCTTTAAA ATGAAACAGA AGATTGAAAT
TATTA AATTA TCAAAAAGAA AATGATCCAC GCTCTTAGTT GAAATTTTCAT
GTAAGATTCC ATGCAATAAA TAGGAGTGCC ATAAATGGAA TGATGAAATA
TGA CTAGAGG AGGAGAAAGG CTTCTAGAT GAGATGGAAT TTTAGTCATC
CGTGTCTCAT GAAGAATCAG ATGTGTACAC TAAGCAAAC AGTTAAAAAA
AAAACCTCCA AGTGAGTCTC TTATTTATTT TTTTCTTATA AGACTTCTAC
AAATTGAGGT ACCTGGTGTA GTTTTATTTT AGGTTTTTATG CTGTCATTTT
-1522 CCTGTAATGC TAAGGACTTA GGACATAACT GAATTTTCTA TTTTCCACTT
CTTTTCTGGT GTGTGTGTAT ATATATATGT ATATATACAC ACACACATAT
ACATATATAT ATTTTTTAGT ATCTCACCCCT CACATGCTCC TCCCTGAGCA
CTACCCATGA TAGATGTTAA ACAAAGCAA AGATGAAATT CCAACTGTCA
AAATCTCCCT TCCATCTAAT TAATTCCTCA TCCA ACTATG TTCCAAAACG
AGAATAGAAA ATTAGCCCCA ATAAGCCCAG GCAACTGAAA AGTAAATGCT
ATGTTGTACT TTGATCCATG GTCACA ACTC ATAATCTTGG AAAAGTGGAC
AGAAAAGACA AAAGAGTGAA CTTTAAA ACT CGAATTTATT TTACCAGTAT
CTCCTATGAA GGGCTAGTAA CCAAATAAT CCACGCATCA GGGAGAGAAA
TGCTTAAGG CATACGTTTT GGACATTTAG CGTCCCTGCA AATTCTGGCC
-1022 ATCGCGCTT CCTTTGTCCA TCAGAAGGCA GGAAA CTTTA TATTGGTGAC
CCGTGGAGCT CACATTA ACT ATTTACAGGG TAACTGCTTA GGACCAGTAT
TATGAGGAGA ATTTACCTTT CCCGCCTCTC TTTCCAAGAA ACAAGGAGGG
GGTGAAGGTA CGGAGAACAG TATTTCTTCT GTTGAAAGCA ACTTAGCTAC
AAAGATAAAT TACAGCTATG TACTACTGAAG GTAGCTATTT CATTCCACAA
AATAAGAGTT TTTTAAAAAG CTATGTATGT ATGTGCTGCA TATAGAGCAG
ATATACAGCC TATTAAGCGT CGTCACTAAA ACATAAAACA TGTCAGCCTT
TCTTAACCTT ACTCGCCCCA GTCTGTCCCG ACGTGA CTTC CTCGACCCTC
TAAAGACGTA CAGACCAGAC ACGCGGCGG CGGCGGAGA GGGGATTCCC
TGCGCCCCCG GACCTCAGGG CCGCTCAGAT TCCTGGAGAG GAAGCCAAGT
-522 GTCCCTTCTGC CCTCCCCCGG TATCCCATCC AAGGCGATCA GTCCAGA ACT
GGCTCTCGGA AGCGCTCGGG CAAAGACTGC GAAGAAGAAA AGACATCTGG
CGGAAA CCTG TGCGCCTGGG GCGGTGGAAC TCGGGGAGGA GAGGGAGGGA
TCAGACAGGA GAGTGGGGAC TACCC CCTCT GCTCCCAAAT TGGGGCAGCT
TCCTGGGTTT CCGATTTTCT CATTTCCGTG GGTAAAAAAC CCTGCCCCCA
CCGGGCTTAC GCAATTTTTT TAAGGGGAGA GGAGGGAAA A TTTGTGGGG
GGTACGAAA GGC GGAAA GA AACAGTCATT TCGTCACATG GGCTTGGTTT
TCAGTCTTAT AAAAAGGAAG GTTCTCTCGG TTAGCGACCA ATTGTCTATC
GACTTGCA GT GAGCGTCAGG AGCACGTCCA GGA ACTCTC AGCAGCGCCT
CCTTCAGCTC CACAGCCAGA CGCCCTCAGA CAGCAAAGCC TACCCCGCG
-22 CCGCGCCCTG CCCGCCGCTG CGATGCTC

```

NFAT consensus sequences in COX2 promotor (binding site): 'ggaaa' yellow

NF-kB consensus sequences in COX2 promoter (binding site):

'gggRNNYYcc' green. Over 80% match is shown!

‘TFSERACH’プログラム (筑波大学) による転写因子検索の結果 (80%以上一致する場所を示した)。

附図 2. ヒト *trpc1* 遺伝子の 5'領域配列

```

AATCCAGCATCCCTTTATGATTTAAAACCTCAGCAAAACTGGCATAACAAG
-3522 GGACATACCACAATGTAATAAAAAGCCATCTATGACAAAACCCACAGCCAAC
ACAATACTGAATGGGGAAAAGTTGAAAGCATTCCCTCTGCAACTGGAAT
AAGACAAGGATGCCCACTCTCACCCTCTTCAACATAGTACTGGAAG
TCCCATCCAGAGCAATCAGAGAAGAGAAAAGAAAGGGCATCCAAGTC
AGTAAAGAGGCAGTCAA ACTGTTGCTGTTGCTGATGATATGATTGTATA
TCTAGAAAACCCTAAAGACTTCTCCAAAATGCTCCTAGAACTGATAAAAAG
AAGTCAGCAAAGTTTCAGGATACAAA ACTAATGTACACACATCAGTAGCC
CTCCTTATACACCAACAGCAACCAAGCTGAGAATCAAACAAAGAACTCAAT
TCCTTTGACAATAGCGGCAAAAAGTATTTTGT TTTATTAGAAAAATAAAAT
ACTTAGGAACATACCTAACAAAAGAAAGGAGAAAAGAACTCTACAA GGAAAAC
-3022 TACAAAACACTGCTGAAAGAAATCAGACGAGGCAAACAAAT GGAAAACA
CATCCCATGCTCATGGATGGGTAGAATCAACATTGTGAAAATGACCATAC

```

TGCCAAAAGCAATCTACAAATTCAATGCAATTCCCATCAAATACCACCA
TCATTCTTCACAGAAGCTAGAAAAAATAATCCTAAAAATCCATATGGAACCA
AAAAAGAGCCTGCATAGCCAATGCAAGATGAAGCGAAAAGAACAATCTG
GAGACATCACATTACCTGATTTCAAACATACTATAAGGCTACTGTCACC
AAAACAGCATGGTACTGGCATAAAAAATAGGCATATAGACCAATGGAACAG
AATAGAGAACCAGAAAATAAACCCAAATACTTACAGCCGACTGATTTTCA
ACAAAGCAAACAAAAACATAAAAGTGGGGGAAAAGACACCCTATTCAACAA
-2522 ATGGTGTCTGGGATAATTTGGCAAGCCACACGTAGGAGAATAAAACTGGATC
TGCATCTCTCACCTTTATACAAAAATAAATCAAGATGGATCAAGAACTTA
AATCTAAGACCTGAAACTATAAAAAATCTAGAAAGATAACATCGGAAAACC
CCTTGTAGACATGGCTTAGGCAAGGATTTTCATGACCAAGAACCACAAAAG
CAAATGCAATGAAAAGAAAAGATAAAATAGCTGGGACTTGATTTAAATGAAAG
AGCTTTTGCATGGCAAAGGGAAGAGTTAGCAGAGTAAACAGACAACCCAC
AGAGTGGGAGAAAATCTTCATAATCTATGCATCTGACAAAGGACTACTAT
CCAGAATCTACAATGAATTCAAACAAATAATCAAGAAAAAAAAAAAAATCCTA
ACAAAAACTGGGCTAAAAACATGAAAAGGGCTGGGGCAGTGGCTCATGC
-2022 TTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCAGGCAGATCACCTGAGGTC
TGGAGTTCGAGACCAGCTGACCAACAGGGAGAAACACTGTCTCTACTAA
AAATACAAAATTAGCCGGGTGTGGTGGCACATGCCGGTAATACCAGCTGG
TCGGAAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCTGGGAGGCGGAAGTTGC
GGTGGACCAAGATCACGCCATTGCACCTCCAGCTGGGCAACAAGAGCAAA
ACTCTGTCTCAAGAAAAAACAAAAAACATGAATAGACAATTCCTCAAAAG
AAGATACACAAATGGCCAACAAACATATGAAAAATGCTCAAGATCACTA
ATGATCAGGGAATTCCAAGTCAAACCTGCTATGCCGTATGTACCACCCTA
CTTCCGCAAGAATGGCCATAATCAAAAAATCAAAAAATAATAGCTGTTG
TTGTGGATGCCGTGAAAAGGGAACACTTCTACATTACTGGTGGGACTGTA
AACTAGTACACCCTATGGAAAACAGTGTGGAGATTCCTTAGAGAACTAA
-1522 AAGTAGAAGTACCATTTGATCCAGTAATCCCACACTGCGGTATCTACCCA
GAGGAAAAGAAGTCATTACACGAAAAAGATACTTGCCCATGCATATTTAT
AGCAGCACAATTCGCAATTGCAAAAATGTGGAGCCAACCCAAATGCCCAT
GAATCAATGAGTGGATAAAAGAAAACGTGATATATATATATATATATATAT
ATGTGGTATATATATATGTGATATATATAATGATGGAATACTACTCAG
CCATAAAAAGGAATGAATAAATGGCATTCGCAGAAACCTGGATGGGACTG
GAGACTATTATTTCTTATTTCTAAATGAAGTAACTCAGGAATGGAAAACCAA
ACATCGTATGTTCTCACTCACAAGTGAGAGCTAAGCTTTGAGGATGCAAA
GGATAGGAATGACACAATGGACTTTTCGGGACTCGGGGAAAGGTTGGGAA
GGGGGAGAGGGATAAAAAGACTACAAAATTAGGTTCAAGTGTATACTGCTCG
-1022 ATGATGGGTACATCAAAATCTCACAATCATCACTAAAGAACTTACTCAT
GTAACCAAAACACCACCTGTTCCCTCAAAAACCTATGGAAATAATATGGAAA
TAAAAATTTATATATTTGTATAAATTAATTAACATAATATAATTTATATA
TCTATATATCCTTTTATAAATGAGAGTTCAATTTCCAGCCTAAAAATGAGTAC
AACATACAAACCCACGAGTCTGGCTCTCCATTTGTGCTTTAAAGCATAGTG
CACCAGAATATGAAATAGCTGGACAATTCACAAAAGGATTTTCGACTAAAC
ATTAAGTCGTAGAGACTCAATTAACATACTGCTCCATATTTGCTTAATTT
ACCTTAAACCAGTACCTGGGTGTGGAAAGGGACGATTGAGCGAAGTCTT
CCTCAGACTGCGGTTACCTCACCCAGAGCGAAGGAAGCTGCAGCGGGCTC
CAGGAGCCCAGTGCCTCCCCACCGCAGGCCCCACCCACCCACGCCCCGCT
TGCCGCAGGCCCCGCCACCCAAGCCCGCCCTTGCCGCAGGCTCCTCCCT
-522 AGTGTGCTCGCTACAGAGGAGCAGAGGATGACGTGAGGACAGAGTCGCGA
ACATCTCCTCGGAGCGCAGCTGGGCCAGCGGTTCCACAGCCC TGAGGCC
CAACGTGCGCAGAAGCGCCTCTTGAGACTCCTCTCCACAGATCTCTCGT
CCTCTTCTGGGCTAGGCCGCCCCAGGCGCGGCCCTGCGACTCCTGGCA
CGGCCCGTGTCTCGGCTGCCGCCCTGGCGCGCGCCACACTGTCGTCCCCG
GACGGGCGCGGACCGGCTCGGCCGGGGCGCCGGCGGCTGGGGAGGGGTCG
CTGGCCCCGGGCCGCGCATGCGCCGCCACCAACTTGGGGCTGTCAGTGG
AGGGCAGTGTCTGGTTCTCAGGGGAGGCGACGCCCTTCGGGGCCAACGGG
CCTCGAGCCGAGGCAGCAGTGGGAACGACTCATCCTTTTTTCCAGCCCTGG
GGCGTGGCTGGGGTTCGGGGTTCGGGGTTCGGGGCCGGTGGGGCCCCGCC
-22 CGTCTCCTGGCCTGCCCTTTCATGGGCCGCGATG

‘TFSERACH’プログラム（筑波大学）による転写因子検索の結果（80%以上一致する場所を示した）。