

痛みを伴う機械刺激を検出する機械受容チャネルの同定

Yale University 織田 麻衣

<研究目的>

皮膚に加わる機械刺激(触、圧、伸展)は、感覚神経の終末(後根神経節; DRG や三叉神経節; TG) やメルケル細胞といった「機械受容器」で検出されている。一方、マウスの DRG 感覚神経に機械刺激(圧入)を負荷すると、それに反応して3種類の興奮性電流(Fast, Intermediate; Int, Slow)を発生することが知られている。Fastタイプの電流特性を持つ神経細胞は弱い機械刺激(light touch)、IntタイプとSlowタイプの電流特性を持つ神経細胞は持続的な痛みを伴う強い機械刺激の検出に特化していることが報告されている。このうち、Fastタイプの電流はPiezo2を介して発生していることが報告されているが(Ranade *et al.*, 2014)、Intタイプ及びSlowタイプの興奮性電流を発生する責任分子は未だ明らかになっていない。しかしながら、これらの興奮性電流は数ミリ秒で発生すること、ガドリニウムやルテニウムレッドといったイオンチャネルの阻害剤によって抑制されることから、Intタイプ及びSlowタイプの興奮性電流を発生する責任分子は非選択性の陽イオンチャネルであると示唆されている(Delmas *et al.*, 2011)。そこで、私は2020年9月からYale UniversityのDr. Bagriantsevの研究室に参画し、IntタイプまたはSlowタイプの興奮性電流を有する機械刺激感受性を持つ細胞株を用いて、痛みを伴う強い機械刺激を検出する未知の機械受容チャネルを同定することを目的として、本研究を開始した。

<研究経過>

1. Immortomouse DRG 感覚神経由来の細胞株の機械刺激に対する応答解析

申請時、マウス神経芽細胞腫 N2A^{ΔP1}(内在性の機械受容チャネル Piezo1 を欠失しているため機械刺激に反応しない細胞株; Moroni *et al.*, 2018) とアヒル TG 感覚神経を融合したハイブリッド細胞株を樹立し、パッチクランプ法で機械刺激(圧入)に対する応答性を解析する予定であった。しかし、研究計画を変更し、DRG 感覚神経から樹立された不死化細胞株を使用して研究を開始することにした。この不死化細胞株は、IFN γ 誘導性の MHC H-2Kb Class I プロモーターの制御下にある温度感受性 SV40 large T 抗原(tsA58)を持つ Immortomouse を用いて樹立されている。このマウスから分散培養した DRG 感覚神経を 33°C、IFN γ を含む培地で培養し続けると、tsA58 が機能し細胞は増殖状態を維持することができ、不死化細胞株を樹立することができる。また、この細胞株を 37°C、IFN γ を含まない培地で培養した場合、tsA58 が機能しないため、細胞は神経細胞様の細胞に分化する。したがって、Immortomouse は様々な組織から不死化細胞株を樹立することが可能であり、Dr. Mohammed のグループ(University of Sheffield)は、胎生期 12 日目または出生後 3 日目の Immortomouse から複数種類の DRG 感覚神経由来の不死化細胞株を樹立した。樹立された細胞株は、神経細胞マーカーである Tuj1 および FOX3 が発現しており、神経細胞様に分化した時に侵害受容器を興奮させる化合物(ATP、カプサイシン)に反応することを報告した(Doran *et al.*, 2015)。よって、これらの細胞株は機械刺激感受性を有する細胞株である可能性が高いと予想し、Mohammed 博士のグループから 13 種類の細胞株を提供していただいた。まず初めに、これらの細胞株が機械刺激感受性を示すかどうかを確認するために、パッチクランプ法を用いて増殖状態の 5 種類の細胞株(Cell 1 - Cell 5)に機械刺激を負荷した時の興奮性電流を測定した。結果、これらの細胞株は機械刺激感受性であることが確認できた(図 1)。さらに、inactivation time (τ) を基に、どのタイプの興奮

性電流を示すのか解析した結果、Cell 1はFastタイプとIntタイプの2種類の興奮性電流を示すことが分かった(図1)。

2. トランスクリプトーム解析

次に、IntタイプまたはSlowタイプの興奮性電流を媒介する新規の機械刺激感受性イオンチャネルを探索するために、Fastタイプの興奮性電流を示すPiezo1を発現するマウス神経芽細胞腫N2A(N2a-wt cellとPiezo1をノックアウトしたN2a^{ΔP1} cell)と5種類の不死化細胞株(Cell 1・Cell 5)のRNA-seqを行い、トランスクリプトームを比較した。そして、興奮性電流を有する不死化細胞株で有意に発現量が増加している(Fold change > 1.5)、機能未知のイオンチャネルや2回以上の膜貫通タンパク質をコードする87遺伝子を候補遺伝子として選定した。また、Fastタイプの興奮性電流を媒介することが報告されているPiezo1とPiezo2の発現量を確認したところ、不死化細胞株にはPiezo1が高発現していることが分かった(図2)。

3. siRNAを用いたスクリーニング解析

(2)で選定した候補遺伝子の中から、IntタイプまたはSlowタイプの興奮性電流を媒介する新規の機械受容チャネルを同定するために、siRNAを用いたスクリーニングを行った。SMART Pool siRNAを用いて、候補遺伝子を1つずつノックダウンしたCell 1の機械刺激に対する応答をパッチクランプ法で解析した。このスクリーニングでは、ネガティブコントロールであるNon-targeting(Control) siRNAを処理した細胞と比較して、機械刺激に対する応答(活性化電流)が著しく減弱した、または興奮性電流の割合が変化した遺伝子を有力な候補遺伝子として選定することとした。

まず、不死化細胞株に高発現していたPiezo1 siRNAを処理した時の機械刺激に対する応答性を解析した。結果、活性化電流は有意に減弱し、FastタイプまたはIntタイプの興奮性電流を示す細胞の割合が減少した。さらに、不死化細胞株での発現量が低かったPiezo2 siRNAの効果についても検討した結果、活性化電流は有意に減少し、Fastタイプの興奮性電流を示す細胞の割合が減少した。以上の結果から、Piezo1とPiezo2はCell 1でのFastやIntタイプの興奮性電流を媒介している機械受容チャネルとして機能している可能性が高いことが示唆された。

次に、昨年Slowタイプの機械受容チャネルとして同定されたTmem120a(TACAN) siRNAの効果について検討した。しかし、最近TACANはイオンチャネルではなく、Coenzyme A結合タンパク質として機能すること、Piezo2の活性化を抑制するnegative modulatorとして機能することが報告された(Rosario *et al.*, 2021; Xue *et al.*, 2021; Niu *et al.*, 2021)。Cell 1での効果を検討した結果、TACAN siRNA処理した細胞の活性化電流はControl siRNAを処理した細胞の電流よりも有意に増強し、Fastタイプを媒介する細胞の割合が減少した。したがって、TACANは不死化細胞株でもPiezo2の活性化を抑制する効果を持っている可能性が高いことが示唆された。さらに、7つの候補遺伝子のsiRNAの効果について検討した結果、候補遺伝子AのsiRNAを処理した細胞の活性化電流は有意に減少し、Fastタイプを示す細胞の割合が減少した。また、候補遺伝子Bと候補遺伝子CのsiRNAを処理した細胞の活性化電流は有意に増強され、Intタイプを示す細胞の割合が減少した。以上のスクリーニングにより、Intタイプ及びSlowタイプの興奮性電流を発生する新規の機械受容チャネルの有力な候補として候補遺伝子A、B、Cを見つけた。

<今後の展望>

(3)の解析で見つけた候補遺伝子A、B、CがIntタイプ及びSlowタイプの興奮性電流を発生する機械受容チャネルとして機能するのかを確認する。そのために、機械刺激に対して反応しないHEK293^{ΔP1}細胞(内在性のPiezo1遺伝子を欠失したHEK293細胞; Dubin *et al.*, 2017)に候補遺伝子A、B、Cを一過性に発現させた時に機械刺激感受性を付与することができるかどうかを確認する。この解析で、候補遺伝子のみを発現した時に機械刺激感受性を示さなかった場合は、候補遺伝子

が Piezo1 または Piezo2 の modulator として機能するかどうかを調べるために HEK 細胞に Piezo1 または Piezo2 と候補遺伝子を共発現した時の活性化電流を調べる。さらに、siRNA を用いてマウス DRG 感覚神経での各候補遺伝子の発現をノックダウンした時に、機械刺激に対する電流の大きさや各興奮性電流の割合が変化するかについても検討する予定である。また、(2)で選定した候補遺伝子リストを基に、siRNA を用いたスクリーニングを今後も続けていく予定である。

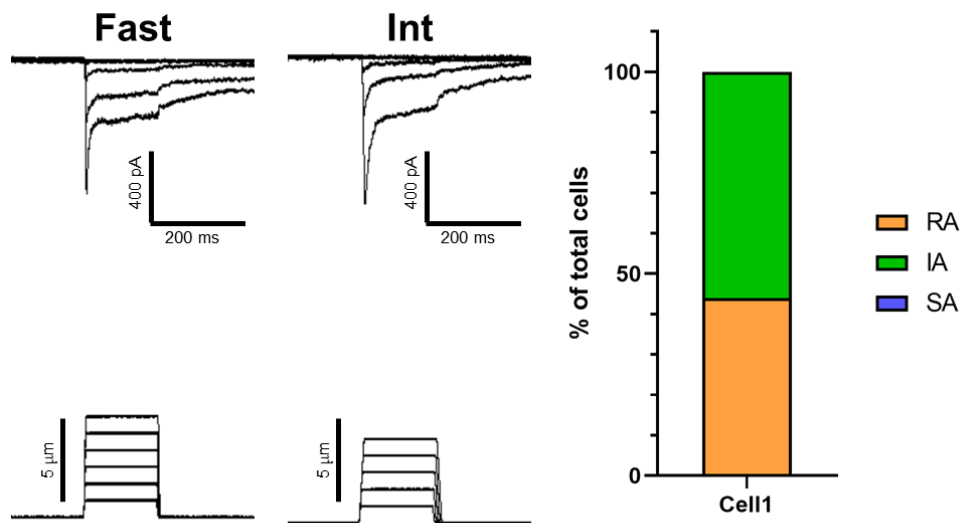


図1. Cell1の興奮性電流

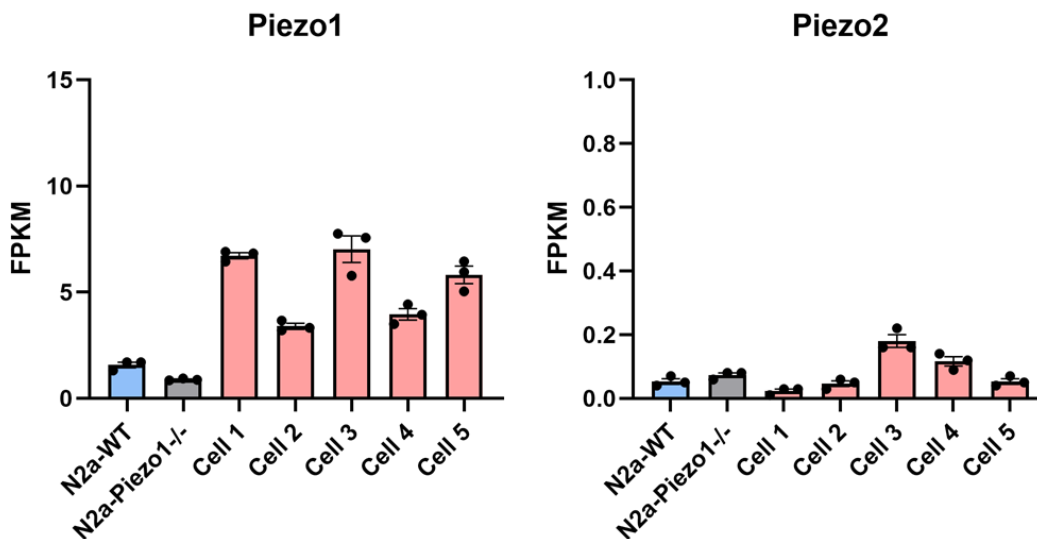


図2. Piezo1とPiezo2の発現量