

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	イオンダイナミクスに着目した骨格筋敗血症応答機構の解明と創薬応用				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	坂本 多穂
	研究分担者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	黒川 洵子
		所属・職名	薬学部・助教	氏名	清水 聡史
		所属・職名	薬学部・助教	氏名	児玉 昌美
	発表者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	坂本 多穂

講演題目	イオンダイナミクスに着目した骨格筋敗血症応答機構の解明と創薬応用
研究の目的、成果及び今後の展望	<p>【目的】骨格筋の炎症応答による萎縮は、呼吸機能や長期生存率の低下要因となる。炎症ストレス応答制御はK<sup>+</sup>チャネルが重要な働きを担い、筋萎縮治療に活用できる可能性がある。Ca<sup>2+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャネル(K<sub>Ca</sub>)は、細胞膜に分布し膜興奮性を制御するだけでなく、ミトコンドリア内膜にも分布しストレス応答制御にも関与する。我々は以前、骨格筋の分化促進と成熟化促進におけるK<sub>Ca</sub>関与を報告した。しかし成熟骨格筋線維の炎症応答におけるK<sub>Ca</sub>の関与は不明である。本研究では、K<sub>Ca</sub>チャネル制御薬の筋炎症応答に対する作用解析を目的とした。</p> <p>【方法】骨格筋ミトコンドリアK<sup>+</sup>チャネル活性をタリウム取込アッセイで評価した。筋炎症応答を検討するため、C2C12マウス筋管細胞を用いて、IL-6、Cxc11のmRNA発現量をRT-qPCR法を用いて測定した。IL-6の分泌量はELISA法を用いて測定した。筋萎縮に対する効果を検討するため、C2C12マウス筋管細胞を用いてAtrogin1のmRNA発現量をRT-qPCR法を用いて測定した。KCa開口作用に伴う網羅的な解析を行うためにRNA-seqを用いた。</p> <p>【成果・今後の展望】マウス骨格筋ミトコンドリア膜におけるKCa活性は不明だった。そこでマウス骨格筋ミトコンドリアにおけるタリウム取込アッセイを実施したところ、KCa開口薬DCEBIO(1-10 μM)により濃度依存的にタリウム取込量が増加し、K<sub>Ca</sub>の機能発現が示された。次に筋炎症応答に対するKCa開口薬・遮断薬の効果を検討した。K<sub>Ca</sub>開口薬DCEBIOは分化させたC2C12マウス筋管細胞にて、非刺激条件および内毒素(LPS)刺激状態におけるIL-6、Cxc11のmRNA発現量、IL-6の分泌量とともに濃度依存的に低下させた。また、筋萎縮関連遺伝子であるAtrogin-1の発現量を濃度依存的に低下させた。さらに、K<sub>Ca</sub>2.x選択的遮断薬NS8593(10-30 μM)は非刺激条件では、筋炎症応答を抑制したが、LPS刺激下では筋炎症応答を増強した。K<sub>Ca</sub>3.1選択的遮断薬TRAM-34は両条件にて筋炎症応答を増強した。さらに、DCEBIOによる筋炎症応答抑制効果はNS8593により抑制されたが、TRAM-34では抑制されなかった。以上の結果は、K<sub>Ca</sub>2.x活性化が炎症応答抑制的に機能することが示唆する。次に、KCa開口薬によるシグナル変化を解析するためにRNA-seqによるエンリッチメント解析を行った。KEGG pathway解析より、KCa開口薬はサイトカインとその受容体を介した免疫応答に関与する遺伝子の変動をもたらすことを示した。GO解析の結果より、ミトコンドリア関連遺伝子の発現変動が示された。以上のことから、DCEBIOは、ミトコンドリアのKCa開口を介して免疫応答を行うことを示唆した。今後は、KCa開口作用による炎症応答抑制を行う詳細なメカニズムを、ミトコンドリア機能に焦点を当てて明らかにしていきたい。</p>