

平成30年7月31日

若手研究者海外挑戦プログラム報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

受付番号 201880241
氏名 平石 敬三

(氏名は必ず自署すること)

若手研究者海外挑戦プログラムによる派遣を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記記載の内容については相違ありません。

記

1. 派遣先: 都市名 コネチカット州ファーマントン (国名 アメリカ合衆国)

2. 研究課題名 (和文) : 肺動脈高血圧症の病態生理における TRPM7 チャネルの影響

3. 派遣期間: 平成 30年 4月 1日 ~ 平成 30年 7月 2日 (93日間)

4. 受入機関名・部局名: Department of Cell Biology, University of Connecticut School of Medicine

5. 派遣先で従事した研究内容と研究状況 (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

・ **TRPM7 チャネル発現細胞のパッチクランプ測定**

TRPM7 チャネル活性を抑制する薬物候補として、肺や肝臓、腎臓などの組織の線維化に対して治療効果を示すことが既に報告されている冬虫夏草(*Ophiocordyceps sinensis*: OCS)に着目し、その TRPM7 チャネルに対する作用をパッチクランプ法により評価した。

テトラサイクリンにより TRPM7 チャネルの発現を誘導させた HEK293 細胞のパッチクランプ測定を行ったところ、TRPM7 チャネルの特徴を示す電流-電圧曲線を得ることができた。これに、様々な濃度に調整した OCS エタノール抽出成分を作用させたところ、濃度依存的に TRPM7 電流を抑制した。TRPM7 チャネルに作用する OCS 構成成分やその他候補薬物についても検討を行った。

・ **TRPM7 チャネルノックアウトマウスの肺高血圧症モデル作成、心肺機能評価**

TRPM7 チャネルと肺高血圧症病態亢進との関係を調べるために、TRPM7 チャネルノックアウトマウスにおける肺高血圧症モデルを作成し、心肺機能の評価を行った。

バッククロスを経た TRPM7 チャネルグローバルノックアウトマウスにタモキシフェンを投与して TRPM7 チャネルノックアウトを誘導した後、モノクロタリンピロールを尾静脈から投与して肺高血圧症モデル動物を作成した。肺高血圧症モデル動物の心肺機能は、エコー、右室内圧測定、病理染色によって評価した。右室内径短縮率、肺動脈血流速度、右室線維化および右心室内圧の測定結果から、肺高血圧症による右心機能障害は、野生型マウスに比し TRPM7 ノックアウトでは有意に改善されていることが分かった。

6. 研究成果発表等の見通し及び今後の研究計画の方向性 (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

・ 研究成果発表等の見通し

[論文]

現在、本研究についての論文を執筆中。

[参加予定学会]

『第60回日本平滑筋学会総会』、東京都、2018年8月 (口頭発表・参加登録済み)

『第92回日本薬理学会年会』、大阪府、2019年3月

『第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会』、兵庫県、2019年3月

・ 今後の研究計画の方向性

- (1) 冬虫夏草 OCS より TRPM7 チャンネルを抑制する単一成分を抽出し、新しい肺高血圧症治療薬の開発を目指す。福岡大学生薬学研究室との共同で OCS からの成分抽出を行い、各成分の TRPM7 チャンネルに対する抑制作用をパッチクランプやカルシウムイメージングにて検討する。
- (2) (1)で同定した OCS 由来の有効成分について、肺動脈内皮細胞における内皮間葉転換や肺動脈平滑筋細胞における異常増殖・遊走等の肺動脈リモデリングに対する影響を、内皮及び間葉系マーカー発現量や増殖・遊走速度の変化を指標にして評価する。有効性が認められたものについて、肺高血圧症モデル動物実験で *in vivo* での効果を確認する。有意な結果が得られた成分については特許を取得する。
- (3) 上述の有効成分を投与した肺高血圧症モデル動物より摘出した組織(心臓、肺)の病理染色・定量 PCR・免疫ブロットを行い、関連シグナル分子・線維化や内皮間葉転換などの組織リモデリング等の各種マーカーの発現挙動を評価し、肺高血圧症病態の改善効果のメカニズムと TRPM7 チャンネルとの関係性を評価する。

7. 本プログラムに採用されたことで得られたこと (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

今回、アメリカで約3ヶ月(別予算による前年度の渡航を含めると約5ヶ月)に亘り研究させていただく機会を頂きました。この間、Lixia Yue 博士の研究室が保有するノックアウトマウスを用いて肺高血圧モデルの実験ができた上、パッチクランプ法による TRPM7 阻害薬のスクリーニングを行うことができました。電気生理学実験は初めてでしたので、大変勉強になりました。

パッチクランプ法は、ガラス電極を細胞に接触し細胞内外で電位差を生じさせることで認められる細胞のイオンチャンネルによる電流値を直接測定する技法ですが、うまくデータを得るには、幾つかの技術的な注意点があります。具体的には、①細胞膜の状態に細心の注意を払いながら細胞を培養する、②ガラス電極の先端が細胞膜とシールしやすい状態になるように電極の太さ・先端の滑らかさを適度に調節する、③細胞外液や電極内液は正確に調製する、④細胞にガラス電極を接触させ非常に高い抵抗値(ギガシール)を得て初めて安定した電流が記録できる、等の点を挙げることができます。どれかひとつでもうまくいかないとイオンチャンネルの挙動を捉えることができないため、研究開始直後は非常に難しく感じました。特にギガシールがうまくとれず、まったくデータが得られないことが続きました。

測定が困難な時は Yue 研究室のメンバーにサポートしていただき、できることから改善し、特に技術や練習が必要な電極作成や、ギガシール作成については非常に多く練習を重ねました。これにより、アメリカでの研究開始後1ヶ月後には、安定した電流値を得ることができ、様々な実験を行うことができました。今回パッチクランプ法を修得したことで、今後の大学院での実験のみならず、大学院修了後の社会人としての研究活動にも非常に役立つと期待しています。