

氏 名 山野井 遊

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2049 号

学位授与の日付 平成 30 年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 TRPV3-ANO1 interaction positively regulates wound healing  
in keratinocytes

論文審査委員 主 査 教授 古瀬 幹夫  
教授 富永 真琴  
教授 鍋倉 淳一  
副会長 丸中 良典  
京都工場保健会

(Form 3)

## Summary of Doctoral Thesis

Name in full Yamanoi, Yu

Title TRPV3-ANO1 interaction positively regulates wound healing in keratinocytes

Transient receptor potential vanilloid 3 (TRPV3) belongs to the family of highly calcium-permeable nonselective cation channels. This channel is strongly expressed in skin keratinocytes and is involved in warmth sensation, itch, wound healing and secretion of several cytokines. Previous studies have shown that anoctamin1 (ANO1), a calcium-activated chloride channel (CaCC), is activated by calcium influx through TRP vanilloid 1 (TRPV1), TRP vanilloid 4 (TRPV4) or TRP ankyrin 1 (TRPA1). The interactions between TRPs and ANO1 are important for TRP channel-mediated physiological functions. ANO1 is expressed in epithelial cells, including those in the choroid plexus. I found ANO1 expression in normal human epidermal keratinocytes (NHEK). Thus, I hypothesized that the physiological significance of ANO1 was linked to TRPV3 in keratinocytes. The aim of this study is the elucidation of the interaction between TRPV3 and ANO1 and its physiological function through this interaction in keratinocytes.

I used a whole-cell patch-clamp method to investigate TRPV3-ANO1 interaction in HEK293T cells and NHEKs in an NMDG-Cl base bath and pipette solutions. Effects of an ANO1 blocker, T16Ainh-A01 (T16A), in migration and proliferation were assessed in a kind of *in vitro* wound-healing assays using NHEKs. Western blot analysis was utilized to clarify intracellular signaling. Cell cycle assays were performed by using a redox dye. Intracellular chloride concentrations were calculated from signals of a chloride indicator, MQAE, by using a two-photon microscope. To clarify the functional interactions, I investigated ANO1-mediated

currents upon TRPV3 activation in HEK293T cells.

The ANO1-mediated currents were dramatically increased following TRPV3 activation, and this event was also observed in NHEKs. Furthermore, the ANO1-mediated currents were dependent upon extracellular calcium. These results suggested that ANO1 functionally interacted with TRPV3 in keratinocytes. In addition, direct interaction was suggested by immunoprecipitation. Next, I investigated the effect of an ANO1 blocker (T16A) in a kind of *in vitro* wound healing using NHEKs. Data showed that T16A inhibited cell migration and proliferation *in vitro*. Consistent with this result, cell migration velocity and proliferation were inhibited by T16A. Low chloride medium (4 mM chloride) also inhibited the cell migration and/or proliferation. These results indicated that chloride flux through ANO1 enhanced cell migration and proliferation by keratinocytes. However, the direction of chloride movement in keratinocytes is still unknown. Chloride permeation through a chloride channel is dependent on intracellular chloride concentration and membrane potential. Although chloride channel function could affect intracellular chloride concentration, basal conditions could be maintained by some chloride transporters. Therefore, I examined chloride transporter expression patterns, including Na-K-Cl cotransporter (NKCC) and K-Cl cotransporter (KCC), by RT-PCR. In this experiment, expression of *NKCC1*, *KCC1*, *KCC2*, *KCC3* and *KCC4* mRNA was suggested. *KCC2* is known as a neuron-specific KCC. Intracellular chloride levels are kept low by *KCC2* in central nerve cells, suggesting that opening of the chloride channel induces chloride influx. In addition, I performed chloride imaging by use of a chloride indicator, MQAE. The intracellular chloride concentration of NHEK was calculated to be  $14.7 \pm 2.7$  mM, and the resulting equilibrium potential of chloride was -56.7 mV. The resting potential of skin keratinocytes is reported to range from -24 to -40 mV. Therefore, this result suggests that chloride influx could occur through ANO1 activation in NHEKs.

Furthermore, T16A or low chloride medium conditions induced phosphorylation of p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK), a member of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family. These MAPKs are known to participate in the cell cycle. Therefore, I investigated the effect of T16A in cell-cycle assays by using a redox dye. T16A induced cell cycle arrest in the kind of *in vitro* wound healing assay. These results suggested that TRPV3-ANO1 interaction positively regulated the process of cell migration and proliferation via MAPK phosphorylation and cell cycle control. Cell cycle arrest could explain the decrease in cell proliferation. Meanwhile, ANO1 inhibition decreased the speed of cell migration. The mechanism by which migration velocity is controlled by ANO1 is unknown. A previous report showed that cell cycle inhibitory molecules, such as p21, rearrange the cytoskeleton by the ROS pathway, thereby regulating cell migration. Thus, chloride could also control cell migration by cell cycle-inhibitory molecules.

In conclusion, my study is the first to characterize the interaction between TRPV3 and ANO1. The results suggest that their interaction could positively regulate keratinocyte proliferation and migration.

## 博士論文審査結果

Name in Full 氏名 山野井 遊

論文題目 TRPV3-ANO1 interaction positively regulates wound healing in keratinocytes (TRPV3-ANO1 相互作用はケラチノサイトの創傷治癒を制御する)

Transient receptor potential (TRP) は一般にカルシウムイオンへの高い透過性を示す非選択性カチオンチャネルファミリーの総称で、膜電位、温度、浸透圧、酸化ストレス、化学物質等の様々な刺激により活性化され、細胞内外の環境変化のセンサーとして機能することが知られている。最近、TRP により引き起こされたカルシウムイオンの細胞内流入がカルシウム活性化クロライドチャネルである anoctamin1 (ANO1) を活性化する例が TRPV1, TRPV4 について報告されたことから、TRP の作用機序における TRP と ANO1 の機能連関の重要性が注目されている。しかし、この TRP-ANO1 機能連関がどのような生理機能に関与するかについてはまだ不明な点が多い。本研究は、ケラチノサイトに発現する TRPV3 が ANO1 と物理的、機能的に相互作用することを新たに示し、ANO1 の作用がケラチノサイトのふるまいを制御することを明らかにしたものである。

出願者である山野井氏は正常ヒト表皮ケラチノサイト (NHEK) において ANO1 が発現していることを見出した。さらにケラチノサイトにおいて創傷治癒に関与すると報告されている TRPV3 が NHEK において実際にその特異的作動薬により活性化されることを確認した。そこで山野井氏は、まず NHEK において TRPV3 と ANO1 が機能連関するとの仮説をたて、その検証を行った。HEK293 細胞に TRPV3 と ANO1 の単独あるいは両方を発現させて whole-cell patch-clamp 法による電流記録を行った結果、両者を同時に発現させた場合のみ、TRPV3 の活性化を引き金とするクロライド電流が誘導されたことから、この電流は ANO1 の活性化によるものであると考えられた。さらに、免疫沈降法により、TRPV3 と ANO1 が物理的に相互作用することを示した。また、NHEK の whole-cell patch-clamp 法による電流記録において、TRPV3 の活性化により誘導される電流の主たる成分がクロライド電流であること、この電流が ANO1 阻害剤により減弱することを示し、NHEK においても TRPV3 と ANO1 が機能連関していることが示唆された。論文の後半において、山野井氏は、ケラチノサイトにおける TRPV3 と ANO1 の機能連関の生理的意義を明らかにするために、ケラチノサイトの *in vitro* 創傷治癒評価系における ANO1 阻害剤の効果を検討した。その結果、ANO1 阻害剤が創傷治癒の重要な要素である細胞の遊走と増殖を阻害すること、低クロライドイオン培地による培養条件でも同様の阻害が見られることを見出した。さらにそのメカニズムの一端として、1) クロライドイオン指示薬を用いた測定により、ANO1 が開口すれば細胞外からクロライドイオンが流入すると予想される程度に NHEK の細胞内クロライドイオン濃度が低いこと、2) ANO1 の阻害あるいは低クロライドイオンの条件において、細胞周期に関わる mitogen-activated protein kinase である p38 と c-Jun N-terminal kinase のリン酸化が上昇すること、3) ANO1 阻害剤により NHEK

の細胞周期の進行が抑制されることを示した。

以上のように、山野井氏は TRP チャンネルの作用機序として TRPV3 と ANO1 の機能的・物理的な相互作用を初めて明らかにした。さらに、ケラチノサイトの創傷治癒に関わる細胞の遊走と増殖を、ANO1 を介したクロライドイオンの流入が正に制御することを示した。その科学的価値は高く評価でき、今後の当該分野の発展に資するものと考えられる。したがって、審査委員全員が、本論文は学位論文として相応しいものであると判断した。

---

(備考)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格 (JIS) A4 縦型とする。
2. 1 行あたり 40 文字 (英文の場合は 80 文字)、1 ページあたり 40 行で作成する。
3. 上マージン、下マージン、右マージンは 2 cm、左マージンは 2.5 cm とする。
4. タイトルと本文の間は、1 行空ける。
5. ページ番号は入れない。
6. 出願者 (申請者) が論文審査に合格し、博士号が授与された場合は、本紙を総合研究大学院大学リポジトリにおいて、インターネット公開する。

Note:

1. The sheets must be Japanese Industrial Standard (JIS) A4 vertical.
2. Each line shall have approximately 40 characters in Japanese or 80 characters in English, and each page shall have 40 lines.
3. The top, bottom, and right margins must be 2 cm and the left one must be 2.5 cm.
4. Single spacing is required between the title and the text.
5. There must be no page numbers.
6. If the applicant is conferred a doctoral degree, this paper will be published on the SOKENDAI Repository.