

氏 名 高山 靖規

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1613 号

学位授与の日付 平成25年3月22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 Functional linkage between TRPV4 and calcium-activated
chloride channels in choroid plexus epithelial cells

論文審査委員 主 査 教授 鍋倉 淳一
教授 富永 真琴
教授 久保 義弘
准教授 渡邊 博之 秋田大学

Transient receptor potential vanilloid 4 channel (TRPV4) is a non-selective cation channel known to be a sensor for hypo-osmolality, cell swelling, warm temperatures and some chemical compounds. Furthermore, the physiological significance of TRPV4 has attracted a great deal of attention, particularly its heat-sensitive properties. Previous reports showed the physiological functions of TRPV4 in several cell types, including skin, esophageal keratinocytes and hippocampal neurons. For instance, TRPV4 expressed in skin keratinocytes contributes to the enhancement of the skin barrier function at body temperature. Moreover, the release of ATP from esophageal keratinocytes or bladder epithelium is enhanced by extension-mediated TRPV4 activation. Additionally, neural activity increases with a rise in temperature in hippocampal neurons. However, the precise function of TRPV4 in the brain is still unknown except for regulation of neural activity in the hippocampus. In this study, the highest expression of TRPV4 in choroid plexus epithelial cells (CPECs) was found using *in situ* hybridization, immunohistochemistry and EGFP expression in transgenic mice in which EGFP was expressed in TRPV4-positive cells. In addition, calcium-activated chloride currents were observed for the first time in CPECs. Moreover, expression of anoctamin 1 (*Ano1*), *Ano4*, *Ano6* and *Ano10* genes in the choroid plexus was found by RT-PCR. These data suggest that upon TRPV4 activation, calcium entering CPECs enhances production of cerebrospinal fluid (CSF), a process dependent upon ion transport. To investigate this hypothesis, whole-cell patch-clamp recordings in HEK293T cells were performed. ANO1-mediated chloride currents were dramatically increased in HEK293T cells expressing mouse TRPV4 and mouse ANO1 when TRPV4 was activated by a low concentration of GSK1016790A (GSK). In contrast, the GSK-induced chloride currents were not significantly affected in the cells expressing ANO4, ANO6 or ANO10 with TRPV4. Additionally, the GSK-induced chloride currents in the cells expressing ANO1 and TRPV4 were not observed in the absence of extracellular calcium. These results indicated that chloride efflux through ANO1 depended on TRPV4 activity. Similar GSK-induced chloride currents were observed in CPECs isolated from the lateral and the fourth ventricle choroid plexus. Interestingly, the GSK-induced chloride currents were strongly inhibited by an ANO1/ANO2 blocker, T16Ainh-A01 (A01). ANO2 expression was not suggested in choroid plexus. These results indicated a functional linkage between TRPV4 and ANO1 in CPECs. This is the first reported case of the linkage of these two proteins in native cells. It was recently reported that ANO1 is activated by noxious heat. In this study, ANO1 was activated by heat in the range of body temperature. Heat-evoked chloride currents were also observed in CPECs isolated from wild-type (WT) and TRPV4 knockout (TRPV4 KO) mice. Furthermore, heat-evoked currents were drastically enhanced after GSK application

in WT, but not in TRPV4 KO CPECs, further supporting the interaction between TRPV4 and ANO1. However, the enhanced currents were not completely blocked by A01. Thus, the possibility of another heat-activated chloride channels was suggested in CPECs.

Accordingly, the author proposes a concept that functional linkage between TRPV4 and ANO1 enhances CSF production. First, the apical membrane of CPECs is extended by water influx from the basolateral side. Second, phospholipase A₂ activity is increased by the extension of the plasma membrane and arachidonic acid is produced from phospholipids by the activated PLA₂. Then, arachidonic acid is metabolized to epoxyeicosatrienoic acid (EET) by cytochrome P450 epoxygenase activity, and TRPV4 is activated by EET at body temperature. The TRPV4 activation leads to calcium influx, which in turn leads to ANO1 activation at body temperature. Finally, water efflux from CPECs is driven by efflux of chloride and some cations through a Donnan equilibrium. Production, transport and reabsorption of CSF are important for the maintenance of the brain environment in fetuses and adults. Among the three CSF-related events, the principle role of CPECs is CSF production. CSF transport is controlled by ependymal cells and the reabsorption is done by arachnoid granulation to the dural venous sinuses. Dysfunction of ciliary motility and the failure of cilia development of ependymal cells induce severe hydrocephalus. This indicates that CSF is continuously secreted from CPECs and the production is independent of the changes in brain pressure. There are currently only palliative therapies for hydrocephalus including external ventricular drainage or placement of a surgical shunt. Control of CSF production through regulation of TRPV4 activity could allow a safer way to treat those diseases. Thus, these studies suggest a fundamental new therapy for hydrocephalus caused by choroid plexus cysts and choroid plexus papillomas.

本論文は、TRPV4チャネルがマウス脳の脈絡叢上皮細胞に発現し、TRPV4を介して流入したCa²⁺がCa²⁺活性化Cl⁻チャネルを活性化することを明らかにしたものである。

高山靖規君は、脳におけるTRPV4発現を解析する過程で、TRPV4遺伝子が脈絡叢に強く発現することを見いだした。抗TRPV4抗体を用いた免疫組織学的解析でも、野生型マウス脈絡叢に強いシグナルを認め、TRPV4欠損マウス脈絡叢では観察されなかったことから、マウス脳脈絡叢にTRPV4が発現すると結論した。さらに、バクテリア人工染色体を用いてTRPV4発現細胞にGFPを発現させるトランスジェニックマウスを作成して解析し、脈絡叢に強いGFP (TRPV4)シグナルを観察して、マウス脈絡叢におけるTRPV4の発現を確認した。加えて、脈絡叢上皮細胞においてNaK ATPase $\alpha 1$ とTRPV4の発現が完全に重なったことから、脈絡叢上皮細胞のアピカル膜にTRPV4が発現すると結論した。次に、パッチクランプ法を用いて単離マウス脈絡叢上皮細胞で膜電流記録を行った。野生型マウスの単離脈絡叢上皮細胞においてTRPV4の特異的活性化剤によって外向き整流性を示す陽イオン電流が観察され、TRPV4欠損マウスの単離脈絡叢上皮細胞では観察されなかったことからマウス脈絡叢上皮細胞に機能的なTRPV4が発現していると結論した。

脈絡叢の最も重要な機能は脳脊髄液の放出である。水の流出は陽イオンと陰イオン (Cl⁻イオン) が駆動すると考えられているが、Cl⁻チャネルの分子実体は明らかにされていない。そこで、単離脈絡叢上皮細胞においてCl⁻電流だけが観察される実験条件で細胞内Ca²⁺濃度を500 nMにすると最初から大きな外向き整流性を示すCl⁻電流が観察され、Cl⁻チャネル阻害剤で抑制された。細胞内Ca²⁺濃度100 nMの条件では、イオノマイシン投与で細胞内Ca²⁺濃度を増加させるとCl⁻電流が観察され、同様にCl⁻チャネル阻害剤によって抑制された。こうした結果から高山君は脈絡叢上皮細胞にはCa²⁺活性化Cl⁻チャネルが存在すると考えた。さらに、TRPV4活性化によって流入したCa²⁺が近傍にあるCa²⁺活性化Cl⁻チャネルを活性化すると仮説した。これを検証すべくCa²⁺活性化Cl⁻チャネルとして知られるanoctaminの脈絡叢上皮細胞における発現を検討した。側脳室、第3脳室、第4脳室のいずれの脈絡叢でもmRNAの発現が観察されたのはANO1, ANO4, ANO6, ANO10であった。この中で最もCa²⁺感受性が高く素早く応答するANO1に注目した。脈絡叢におけるANO1蛋白質の発現を、特異的抗体を用いて確認した。HEK293T細胞にANO1とTRPV4を共発現させると、細胞外にCa²⁺が存在する時にのみTRPV4活性化によって大きなCl⁻電流が観察された。そうした大きなCl⁻電流はTRPV4, ANO1の単独発現細胞では観察されなかったことから、高山君はTRPV4を介して流入したCa²⁺がANO1を活性化させたと考えた。単離脈絡叢上皮細胞でも、TRPV4活性化によって大きなCl⁻電流が観察され、その電流はANO1阻害剤で抑制された。ANO1は熱刺激によっても活性化する。野生型単離脈絡叢上皮細胞でのみ、ANO1活性化によると思われる熱活性Cl⁻電流がTRPV4活性化刺激で増大した。これらの結果は、脈絡叢上皮細胞でTRPV4とANO1の機能連関が存在することを示す。生化学的解析では、TRPV4とANO1の物理的結合は確認できなかった。

以上のように、高山君は、Ca²⁺透過性の高いTRPV4チャネルとCa²⁺活性化Cl⁻チャネルANO1のマウス脳脈絡叢における発現を遺伝子レベル、蛋白質レベル、機能的レベルで明らかにし、TRPV4活性化がANO1活性化をもたらすことを異所性発現系およびマウス脈絡叢上皮細胞で証明した。本研究はTRPV4, ANO1の機能的連関を発見してその意義を議論した非常に優れた研究であり、今後の当該分野の発展に資するものと考えられる。

従って、本論文は学位論文として十分な内容を有しているものと審査委員会において全会一致で判定された。