

# イオンチャネル間機能カップリングに着目した血圧調節機構の解明

加塩 麻紀子

熊本大学生命科学研究部環境分析科学講座細胞生理学研究室

## 概要

高血圧は、日本において高い罹患率を示す病態であり、心疾患および脳血管疾患などのリスク因子ともなることから、血圧コントロールが必至である。心拍出量、体液量に加え、末梢抵抗血管の収縮・拡張が神経性・液性に調節されることで血圧が調節されており、それぞれの調節機構をターゲットとした薬物療法により血圧コントロールがなされる。

末梢抵抗血管である細動脈は血管内皮・平滑筋細胞で構成され、内皮細胞が血管管腔内圧の上昇、血流によるシェアストレスなどの機械刺激を受容し、一酸化窒素の遊離、内皮依存性過分極を生じることで血管を拡張させる。血管内皮に発現する温度依存性 TRPV4 は、上記機械刺激による活性化により細胞内へと  $Ca^{2+}$  を流入させ、 $Ca^{2+}$  依存性  $K^+/Cl^-$  チャネルを活性化し、内皮依存性過分極および血管拡張を引き起こす。本研究は、血管内皮における TRPV4 と  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+/Cl^-$  チャネルの機能カップリングの血管収縮・拡張の調節における生理的意義に加え、高血圧病態における機能変容に注目した。

末梢抵抗血管である腸管膜動脈を用いた RT-PCR により、TRPV4、 $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャネル (KCNN1-4) および  $Ca^{2+}$  依存性  $Cl^-$  チャネル (TMEM16A) の発現が確認された。TRPV4 活性化による  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャネル活性化を TRPV4 電流と切り分けて評価する系の確立を目的とし、TRPV4/KCNN4 共発現 HEK293T 細胞を用いたパッチクランプ測定の実験条件検討を行った。現在のところ、 $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャネル電流と TRPV4 電流を切り分けて測定することはできておらず、TRPV4 活性化剤 (GSK1016790A) および KCNN4 阻害剤 (TRAM-34) の濃度のさらなる最適化が必要であると考えられた。

## 1. 研究目的

本研究は、血圧調節に重要となる末梢抵抗血管の収縮・拡張調節に寄与する Transient receptor potential vanilloid type 4 (TRPV4) および  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+/Cl^-$  チャネルの機能カップリングと高血圧病態におけるその変容をもたらす分子基盤を明らかにすることで、高血圧治療の新規分子標的の同定を目指す。

平成 12 年厚生労働省の循環器疾患基礎調査によると、男性で 51.7%、女性で 39.6% が高血圧状態にあり、高い罹患率を示す。高血圧は、心疾患 (狭心症、心筋梗塞等) および脳血管疾患 (脳梗塞、脳出血等) といった生命を脅かす疾患のリスク因子ともなることから、血圧を適切な範囲でコントロールすることが必至である。心拍出量、体

液量に加え、末梢抵抗血管の収縮・拡張が神経性・液性に調節されることで血圧が調節されており、それぞれの調節機構をターゲットとした薬物療法により血圧コントロールがなされる。

末梢抵抗血管である細動脈は、主に血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の層で構成され、それぞれが血管収縮・拡張の調節に重要な働きを持つ。交感神経および副交感神経からの入力はそれぞれ、平滑筋および内皮細胞の受容体に作用し血管の収縮と拡張をもたらす。また内皮細胞は血管管腔内圧の上昇、血流によるシェアストレスといった機械刺激も直接受容し (Lim & Harraz, 2024)、一酸化窒素 (NO) 等の遊離を介して血管収縮・拡張調節に寄与する。NO 等の液性分子に加え、内皮細胞で生じ

る過分極応答(内皮依存性過分極)も血管拡張に重要な役割を持つ(Giles *et al.*, 2012)。血管内皮における  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  チャンネルの活性化は、上記の内皮依存性過分極に重要な働きをしており、活性化のための  $\text{Ca}^{2+}$  の供給源として、高い  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を有する TRPV4 (Gees *et al.*, 2010) の活性化が重要な役割を果たす。

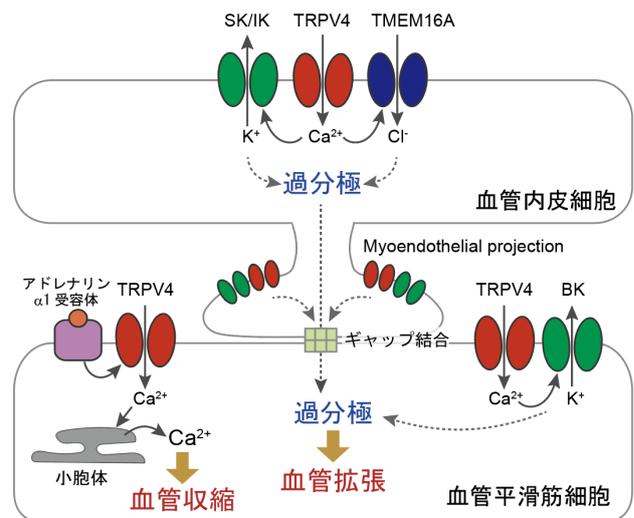
$\text{Ca}^{2+}$  透過性チャンネルの活性化による細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内への流入は、細胞質に存在する内在性の緩衝能によって時空間的に減衰していく(Fakler & Adelman, 2008)。したがって、 $\text{Ca}^{2+}$  透過性チャンネルと  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  チャンネルが細胞内においてどれほど近接しているかにより、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  チャンネルが活性化するかどうかが決定していると考えられる。そこで本研究では、 $\text{Ca}^{2+}$  の供給源である TRPV4 と、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  チャンネルの血管内皮および血管平滑筋細胞における機能カップリングに着目した。

TRPV4 は、体温付近の温度および低浸透圧や機械刺激により活性化し(Liedtke *et al.*, 2000; Strotmann *et al.*, 2000; Loukin *et al.*, 2010; Mendoza *et al.*, 2010; Kashio, 2025)、細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入を介して皮膚バリア機能の維持(Kida *et al.*, 2012)、膀胱収縮(Gevaert *et al.*, 2007)等の種々生理機能調節に関わる。細動脈において、TRPV4 は血管内皮細胞、血管平滑筋の両方で機能することが報告されている。TRPV4 は、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャンネル(SK/IK/BK)との物理的相互作用を有し(Li *et al.*, 2018)、TRPV4 活性下流での  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャンネルの効率的活性化を可能とする機能カップリングが報告されている(Fig. 1)。そのうち血管内皮細胞に発現する  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャンネル(IK)および TRPV4 の機能カップリングは、IK チャンネルの活性化による過分極応答を生じるとともに、IK および TRPV4 は血管平滑筋と密にコンタクトする部位(myoendothelial projection)に多く局在し、ギャップ結合を介した内皮細胞から平滑筋細胞への内皮依存性過分極の伝搬と血管拡張に効率的な配置をとることが報告されている(Sandow *et al.*, 2006; Sonkusare *et al.*, 2014)(Fig. 1)。さらには、TRPV4 と血管内皮の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{Cl}^-$  チャンネル(TMEM16A) (Mata-Daboin *et al.*, 2023)、血管平滑筋の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャンネル(BK) (Chen *et al.*, 2022) の機能カップリングと過分極応答、血管拡張への寄与が報告されている。一方で血管平滑筋において、ア

ドレナリン  $\alpha$  受容体の下流で活性化する TRPV4 は、逆の応答である血管収縮に寄与する(Chen *et al.*, 2022)。また高塩食誘発性の高血圧モデルにおいて、血管内皮細胞における TRPV4 と SK チャンネルの機能カップリングが減弱することが報告されており(He *et al.*, 2017)、これらのチャンネル間機能カップリングの変容と高血圧病態との関連が示唆されている。

上に示した一連の報告から、抵抗血管における TRPV4 活性が血管収縮と血管拡張のいずれをもたらすかは、TRPV4 がどのような部位に位置し、どのような分子と機能カップリングするかにより厳密に決定されていると考えられる(Fig. 1)。

以上の通り、血管収縮・拡張調節と高血圧病態への TRPV4 の関与が強く示唆され、血圧コントロールを目指した薬物治療の分子標的としての TRPV4 の有効性が期待される。しかしながら、上記の複雑な機構と、TRPV4 が関わる他の生理機能(Kashio, 2021)への影響による副作用が問題となると考えられ、単に TRPV4 活性を調節することでは不十分であり、TRPV4 活性調節を血圧降下へと選択的につなげるための分子機構の解明が必至である。本研究では、TRPV4- $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  チャンネル機能カップリングの高血圧病態に伴う機能変容の分子基盤解明を目指す。本研究で明らかとする分子基盤をもとに、高血圧治療を目指した薬物治療の新規分子標的への臨床応用が期待される。



**Fig.1** 血管内皮・平滑筋における TRPV4- $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  チャンネル機能カップリングを介した血管拡張・収縮調節機構

## 2. 研究方法

### 2.1 細胞培養

HEK293T 細胞は理化学研究所バイオリソース研究センターより入手し, 10% FBS および 100 units/mL Penicillin G, 100 µg/mL Streptomycin (15140-122, Gibco) を添加した DMEM 培地 (044-29765, 和光純薬) を用い, 37°C あるいは 33°C (遺伝子導入後) の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて培養した。

プラスミド DNA の導入には Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用い, 手順は使用説明書に従った。遺伝子導入 HEK293T 細胞を用いて行う実験はすべて, 遺伝子導入後 20~36 時間で実施した。

### 2.2 マウス腸管膜動脈 RT-PCR

6 週令の雄性マウスをイソフルラン吸入麻酔下で Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free Phosphate -Buffered Saline ( PBS(-) ) で全身を灌流した後に安楽死させ, 腸間膜動脈第 3 枝 (~100 mm) を摘出した。摘出した組織より, RNA 抽出キット (RNA Basic Kit, 日本ジェネティクス) を用いて RNA を抽出した。SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Thermoscientific) を用いた逆転写反応後, **Table.1** に示したプライマーを用いて PCR 増幅 (EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix, タカラバイオ) を行ったのち, アガロースゲル電気泳動により mRNA 発現を検出した。なお, プライマーはいずれも約 1000 bp 以上のイントロンを挟む領域を増幅配列となるよう設計し, mRNA 配列を特異的に検出した。

**Table 1.** 腸間膜動脈遺伝子発現解析 (RT-PCR) に用いたプライマー配列

	Primer F	Primer R
TRPV4 #1	CATCCTGGACATCGAGCGTT	AGTGAGACCAGTTCACCTCG
TRPV4 #2	AGAGCTCAGATGGCACTCCG	CACCACCGAGGACCAACGAT
KCNN1 #1	TGTTGGTCTTCAGCGTCTCC	ACATGGCTCCCAGGAAGTTG
KCNN1 #2	ACCTACTGTGGGAAGGGTGT	GCATTTTTGACCCGCTTGGT
KCNN2 #1	TGGATAATTGCCGCATGGAC T	GTGCAACCTGCACCCATGAT
KCNN2 #2	GAGCGGGATTCTGGTTACA	TCCTCTTCCTCCAGACCACTA
KCNN3 #1	TCAGCTCACCAAACGGATCAA	TGTTCCATCTTGACACCCCG
KCNN3 #2	CATGGTGCCCCACACATACT	CGGCATTCTTGATCCGTTTG G
KCNN4 #1	GCAAGATTGTCTGCCTGTGC	CCGCTGACTCCTTCATCTCT T
KCNN4 #2	CCTGACCATTGGCTATGGGG	TGACTCCTTCATCTCTTTGG CA
KCNMA1 #1	CTGCAGGCGGCTGATCTATT	TCATGCCTCATCAGCTTCGG
KCNMA1 #1	CAGTTTGACCACAACGCTGG	TGCTTGGCCATTCTAGTCA
TMEM16A #1	TTTGATAACCCTGCCACCGT	GATCCTTGACAGCTTCCTCC T
TMEM16A #1	TCATGGAGCACTGGAAACGG	GCTCTGGGATGATCCTTGAC AG
β-actin	CTGTTCGAGTCGCGTCCA	ACGATGGAGGGGAATACAGC

いずれも, 増幅領域に 1000 bp 程度以上のイントロンを含むように設計した

### 2. 3 ホールセルパッチクランプ測定

K<sup>+</sup>電流の測定は、細胞外液: 140 NMDG-Cl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 Glucose, pH 7.4 (in mM) および 細胞内液: 140 KCl, 5 EGTA, 10 HEPES pH 7.4 (in mM) を用い、膜電位固定下 (V<sub>m</sub> = -60 mV), 3 s 間隔で -100 mV ~ +100 mV (500 ms) のランプパルスを与えることで測定した。Cl<sup>-</sup>電流の測定は、細胞外液: 140 NMDG-Cl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 Glucose, pH 7.4 (in mM) および 細胞内液: 140 NMDG-Cl, 15 EGTA, 10 HEPES, pH 7.4 (in mM) を用い、膜電位固定下 (V<sub>m</sub> = 0 mV), 3 s 間隔で -100 mV ~ +100 mV (500 ms) のランプパルスを与えることで測定した。上記条件において、TRPV4 および Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>チャネル共発現細胞において TRPV4 の活性化が生じれば、細胞外 Ca<sup>2+</sup>の流入および Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>チャネルの活性化が生じる。ホールセルパッチクランプ測定はすべて、室温条件下で行った。パッチクランプシステムは Axopatch 200B/ Digidata 1321A/ pCLAMP8 (Molecular Devices) を用い、電流は 5 kHz の filter をかけ 10 kHz でサンプリングした。

### 2. 4 生化学実験

遺伝子導入 24~36 時間後において、目的遺伝子を発現した HEK293T 細胞を PBS(-) で 2 回洗浄したのち、1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 1x Protease Inhibitor Cocktail (Sigma), 1x Phosphatase Inhibitor Cocktail (Nacalai) を含む PBS(-) で溶解した。各サンプル 10 mg のタンパク量を変性 (50 mM dithiothreitol 含有サンプルバッファー, 37°C,

1h) させたのち、SDS-PAGE 法による電気泳動に供した。ウェスタンブロット法による検出によりタンパク発現量の定量解析 (ImageJ) を行った。

### 2. 5 試薬

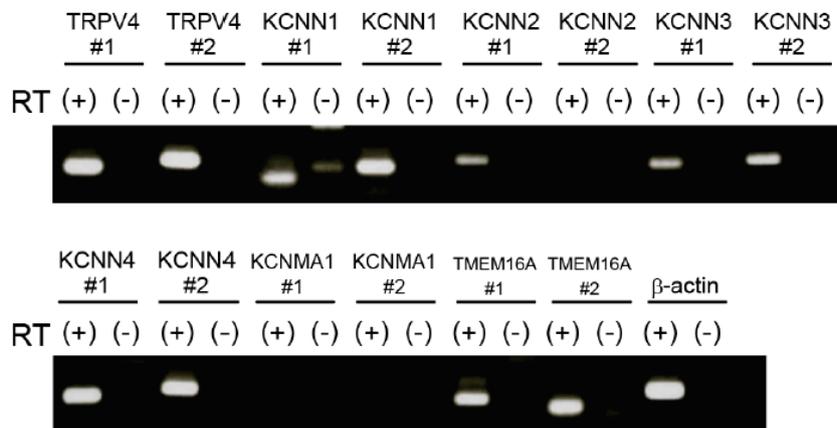
抗 FLAG タグポリクローナル抗体 (MBLL ライフサイエンス, PM020, 1:2000), 抗 HA タグポリクローナル抗体 (MBL ライフサイエンス, 561, 1:1000), 抗 β チューブリンポリクローナル抗体 (Novus Biologicals, NB600-936, 1:1000), GSK1016790A (Cayman chemical), TRAM-34 (Cayman chemical)

## 3. 研究結果

### 3. 1 マウス腸間膜動脈第 3 枝における TRPV4

#### および Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>チャネルの発現

血圧調節に重要な働きをする抵抗血管のモデルとして用いられる腸間膜動脈を、6 週令雄性マウスより摘出し、RNA 分画の抽出後に mRNA 発現を選択的に検出可能なプライマー (Table 1) を用いた RT-PCR により TRPV4 および Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>チャネルの発現を検討した。その結果、逆転写反応依存性に TRPV4 に加え、Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>チャネルの SK チャネル (KCNN1, KCNN2, KCNN3) および IK チャネル (KCNN4), Ca<sup>2+</sup>依存性 Cl<sup>-</sup>チャネルの TMEM16A が検出された (Fig.2)。一方で、Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>チャネルの BK チャネル (KCNMA1) の発現は認められなかった。以上の結果より、腸間膜動脈第3枝では TRPV4 とともに SK チャネル (KCNN1, KCNN2, KCNN3), IK チャネル (KCNN4), TMEM16A が発現していると考えられた。



**Fig.2** 腸間膜動脈第 3 枝における TRPV4 および Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>チャネルの発現 RT(+);逆転写反応あり, RT(-);逆転写反応なし, β-actin;内部標準

### 3. 2 TRPV4/IKチャネル(KCNN4)共発現 HEK293T 細胞を用いたパッチクランプ測定のための遺伝子導入条件の検討

複数の遺伝子の共発現においては、しばしば互いの発現量に影響することがあることから、まずは遺伝子導入に用いるプラスミド量の最適化を行った。Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>チャネルの一つである IK チャネル(KCNN4)に FLAG タグを付加した遺伝子を組み込んだプラスミド(pcDNA)と HA タグ付加 TRPV4 遺伝子を組み込んだプラスミド(pcDNA)を用い、異なる相対量で HEK293T 細胞に遺伝子導入し、タンパク量を SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングにより定量した。なお、TRPV4(HA)および IK(FLAG)タンパク量は  $\beta$ -チューブリンタンパクを内部標準とした相対量で比較した。解析の結果、IK(KCNN4)プラスミド導入量の増加に相関した TRPV4 タンパク量の減少が認められ、TRPV4 および IK チャネル(KCNN4)タンパクの両者が検出された TRPV4:KCNN4 プラスミド比(1:0.5)がパッチクランプ測定に用いる遺伝子導入条件として最適であると判断し(Fig.3)、以下の検討に用いた。

### 3. 3 TRPV4 活性依存的 Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>チャネル活性化機構の評価系確立

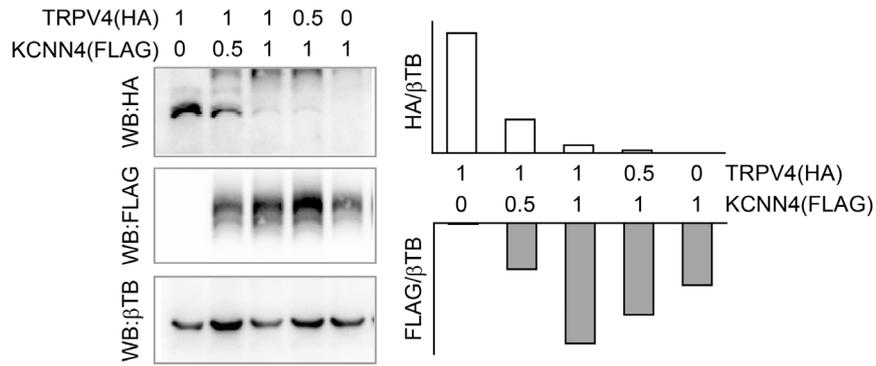
TRPV4 活性化に伴う Ca<sup>2+</sup>依存性 Cl<sup>-</sup>チャネル活性の評価については、報告されている(Takayama *et al.*, 2014)。一方で、TRPV4 と Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>チャネルを共発現する腸間膜動脈血管内皮細胞において、K<sup>+</sup>チャネルの活性を選択的に評価する測定系は認められない。したがって、本検討では TRPV4/TMEM16A 共発現 HEK293T 細胞を用いて、TRPV4 活性化剤である GSK1016790A 処置による TRPV4 活性化に伴う TMEM16A 活性評価に加えて、TRPV4/Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>チャネル共発現 HEK293T 細胞における GSK1016790A 処置による TRPV4 活性化に伴う Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>チャネル活性化の評価系の新規確立を試みた。

既報を参考に(Takayama *et al.*, 2014)、TRPV4/TMEM16A 共発現 HEK293T 細胞を用いたホールセルパッチクランプ

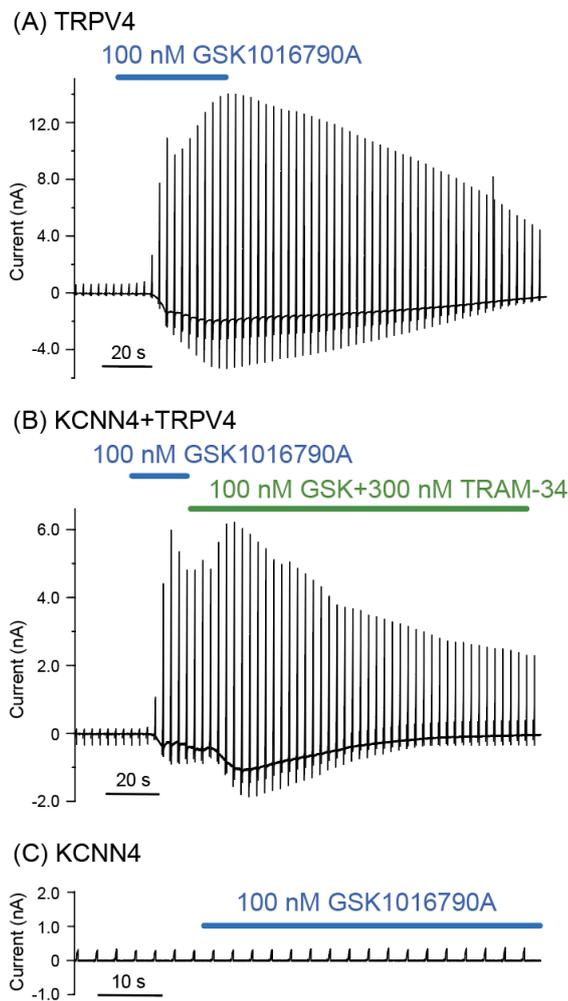
測定により、GSK1016790A 処置による TRPV4 活性化に引き続く TMEM16A 活性を介すると思われる Cl<sup>-</sup>電流を確認した。一方で TMEM16A 単独発現 HEK293T 細胞においては、GSK1016790A 処置による電流の活性化は認められなかった(以上、データ未掲載)。

TRPV4 による血管拡張・収縮の調節を検討するうえで、細胞単離の手技が簡易である点、多くの Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>チャネル発現が報告されている点で、血管平滑筋よりも血管内皮細胞を先行して検討することが妥当と考えた。そこで、マウス急性単離血管内皮細胞における TRPV4 活性を介する Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>チャネル活性評価に用いるホールセルパッチクランプ測定のための条件検討を目的とし、TRPV4 と Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>チャネルの一つであり血管内皮細胞での発現が報告されている KCNN4 遺伝子を導入した HEK293T 細胞を用いて IK チャネル(KCNN4)電流評価系の確立を試みた。

TRPV4/KCNN4 共発現 HEK293T 細胞のホールセルパッチクランプ測定において、GSK1016790A(100 nM)処置により IK チャネル(KCNN4)電流に矛盾しない外向き整流性を示す電流の活性化が認められた。しかしながら、引き続き GSK1016790A(100 nM)と同時に IK チャネル(KCNN4)の選択的阻害剤である TRAM-34(Wulff *et al.*, 2000)の共処置を行ったものの、TRAM-34 による電流の即時の抑制が認められなかった(Fig.4B)。TRPV4/KCNN4 共発現細胞で測定された GSK1016790A および TRAM-34 共投与で認められた電流の減衰は、TRPV4 単独発現細胞で測定された電流と同等の経時変化を示しており(Fig.4A, B)、現段階では TRPV4 電流と IK チャネル(KCNN4)電流の切り分けが出来ていないと判断した。一方で IK チャネル(KCNN4)単独発現細胞では、GSK1016790A(100 nM)による電流の活性化は認められなかった(Fig.4C)。



**Fig.3** TRPV4/ KCNN4 共発現 HEK293 細胞を用いたパッチクランプ測定のための遺伝子導入条件の検討  
HA タグ付加 TRPV4 および FLAG タグ付加 KCNN4 発現プラスミド量を 1:0~1:1 の条件で遺伝子導入した HEK293T 細胞における TRPV4/ KCNN4 タンパク発現量



**Fig.4** TRPV4/KCNN4 共発現細胞を用いた, TRPV4 活性依存的  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャンネル活性化機構の評価系確立  
TRPV4 単独 (A), TRPV4/KCNN4 共発現 (B) および TRPV4 単独発現 (C) 発現 HEK293T 細胞における GSK1016790A (TRPV4 活性化剤) 誘発電流  
電位固定 ( $V_m = 60$  mV) 下, 3 s 間隔で  $-100 \sim +100$  mV (500 ms) のランプパルスを与えた。TRAM-34 (KCNN4 阻害剤)

#### 4. 考察

血圧調節に重要な働きをする抵抗血管のモデルである腸間膜動脈第3枝を用いて、TRPV4 および  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  チャンネルの発現を検討したところ、TRPV4 に加えて SK チャンネル (KCNN1, KCNN2, KCNN3), IK チャンネル (KCNN4) および TMEM16A の発現は確認できた。しかしながら、今回検討に用いた組織サンプルには、血管内皮と血管平滑筋の両者が含まれるにも関わらず、血管平滑筋細胞における発現 (Chen *et al.*, 2022) が報告されている BK チャンネル (KCNMA1) の発現が検出できなかった。

今回の検討においては、腸間膜動脈以外に BK チャンネル (KCNMA1) が発現する組織を用いたポジティブコントロールを設けなかったことが問題点であり、この結果だけでは BK チャンネル (KCNMA1) が発現していないとは結論できない。可能性として、使用したプライマー条件が最適でなかった可能性も考えられる。したがって、脳 (Bailey *et al.*, 2019) など、腸間膜動脈以外のポジティブコントロールを設けたうえで、異なるプライマーペアも追加した検討を実施し、確実な結果をもって結論する必要がある。

今回 TRPV4 活性依存的 IK チャンネル (KCNN4) 電流のパッチクランプ測定に用いた条件では、TRPV4 および IK チャンネル (KCNN4) のいずれも  $\text{K}^+$  が主なキャリアイオンとなると考えられた。したがって、TRPV4 活性化後の IK チャンネル (KCNN4) 電流を IK 阻害剤である TRAM-34 で抑制することが最も妥当なアプローチと考え、検討を行った。しかしながら、現段階では TRPV4 電流と IK チャンネル (KCNN4) 電流を切り分けた測定は成功していない。原因として、今回測定に用いた TRAM-34 (IK チャンネル阻害剤) の濃度 (300 nM) が不十分であり IK チャンネル (KCNN4) が抑制されていない可能性が考えられた。加えて、GSK1016790A (TRPV4 活性化剤) の濃度が高く、TRPV4 活性化が強すぎたために IK チャンネル (KCNN4) 電流に対する TRPV4 電流が大きくなってしまい、IK チャンネル (KCNN4) 阻害作用が潜在化してしまった可能性も考えられる。さらには、TRPV4 単独発現細胞においても GSK1016790A 処置中に TRPV4 の脱感作 (Jin *et al.*, 2011) に起因すると考えられる電流の減衰が認められた。以上の点を考慮し、TRPV4/KCNN4 共発現細胞における GSK1016790A 誘発電流における TRPV4 電流の寄与に加え、TRPV4 の脱感作を極力抑えた条件として、低濃度

の GSK1016790A を用いた条件が、IK チャンネル (KCNN4) 電流の評価に適している可能性が考えられる。

#### 5. 今後の課題

TRPV4 活性を介した  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャンネルの活性化を測定するホールセルパッチクランプ測定の確立は、血管内皮細胞において TRPV4 と  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャンネルの機能カップリングを評価するうえで必須となる。したがって、今回実施したホールセルパッチクランプ測定における問題点として挙げた TRAM-34 (IK チャンネル阻害剤) および GSK1016790A (TRPV4 活性化剤) の濃度の最適化を行うことで、確実に測定系の確立を達成する必要がある。

また、TRPV4 および KCNN4 の遺伝子導入により、HEK293T 細胞状態の著しい悪化が認められたため、遺伝子導入後の細胞培養条件を  $33^\circ\text{C}$  とすることで若干の改善が認められた。しかしながら、実験の成功率としては依然低い状況であった。以上の影響は、遺伝子の過剰発現の影響である可能性が考えられるため、今回用いた CMV プロモーター (pcDNA3.1) よりも弱いプロモーターを使用する、もしくはテトラサイクリン発現誘導システム等により発現量をコントロールするなどの対応をとることで、より安定的な測定が可能となることも考えられる。

今後、血管内皮細胞において発現が報告されている IK チャンネル (KCNN4) 以外の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 SK チャンネル (KCNN1, KCNN2, KCNN3) の活性測定系も確立する必要がある。さらに急性単離血管内皮細胞を用いた TRPV4,  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  チャンネル共局在解析 (免疫染色), パッチクランプ測定を行い、TRPV4- $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  間機能カップリングの存在と高血圧病態における変容を検討していく。

#### 6. 謝辞

末筆ながら、今回本研究に助成いただきましたソルト・サイエンス研究財団に深く感謝申し上げます。

独立准教授 (PI) として異動後の、新規研究室立ち上げにあたるタイミングであったため、必要試薬および備品 (超純水装置) 等の購入、機器修理費 (パッチクランプ測定用電極ブラー) に充てることができ、研究の始動に大いに活用することができました。得られた成果をもとに、引き続き当該研究課題の研究を遂行してまいります。

## 7. 文献

- Bailey CS, Moldenhauer HJ, Park SM, Keros S & Meredith AL. (2019). KCNMA1-linked channelopathy. *J Gen Physiol* **151**, 1173-1189.
- Chen YL, Daneva Z, Kuppusamy M, Ottolini M, Baker TM, Klimentova E, Shah SA, Sokolowski JD, Park MS & Sonkusare SK. (2022). Novel Smooth Muscle Ca(2+)-Signaling Nanodomains in Blood Pressure Regulation. *Circulation* **146**, 548-564.
- Fakler B & Adelman JP. (2008). Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. *Neuron* **59**, 873-881.
- Gees M, Colsoul B & Nilius B. (2010). The role of transient receptor potential cation channels in Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a003962.
- Gevaert T, Vriens J, Segal A, Everaerts W, Roskams T, Talavera K, Owsianik G, Liedtke W, Daelemans D, Dewachter I, Van Leuven F, Voets T, De Ridder D & Nilius B. (2007). Deletion of the transient receptor potential cation channel TRPV4 impairs murine bladder voiding. *J Clin Invest* **117**, 3453-3462.
- Giles TD, Sander GE, Nossaman BD & Kadowitz PJ. (2012). Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **14**, 198-205.
- He D, Pan Q, Chen Z, Sun C, Zhang P, Mao A, Zhu Y, Li H, Lu C, Xie M, Zhou Y, Shen D, Tang C, Yang Z, Jin J, Yao X, Nilius B & Ma X. (2017). Treatment of hypertension by increasing impaired endothelial TRPV4-KCa<sub>2.3</sub> interaction. *EMBO Mol Med* **9**, 1491-1503.
- Jin M, Wu Z, Chen L, Jaimes J, Collins D, Walters ET & O'Neil RG. (2011). Determinants of TRPV4 activity following selective activation by small molecule agonist GSK1016790A. *PLoS One* **6**, e16713.
- Kashio M. (2021). Thermosensation involving thermo-TRPs. *Mol Cell Endocrinol* **520**, 111089.
- Kashio M. (2025). Thermo-TRP regulation by endogenous factors and its physiological function at core body temperature. *Physiol Rep* **13**, e70164.
- Kida N, Sokabe T, Kashio M, Haruna K, Mizuno Y, Suga Y, Nishikawa K, Kanamaru A, Hongo M, Oba A & Tominaga M. (2012). Importance of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in epidermal barrier function in human skin keratinocytes. *Pflugers Arch* **463**, 715-725.
- Li Y, Hu H & O'Neil RG. (2018). Caveolae facilitate TRPV4-mediated Ca(2+) signaling and the hierarchical activation of Ca(2+)-activated K(+) channels in K(+)-secreting renal collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **315**, F1626-F1636.
- Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM & Heller S. (2000). Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* **103**, 525-535.
- Lim XR & Harraz OF. (2024). Mechanosensing by Vascular Endothelium. *Annu Rev Physiol* **86**, 71-97.
- Loukin S, Zhou X, Su Z, Saimi Y & Kung C. (2010). Wild-type and brachyolmia-causing mutant TRPV4 channels respond directly to stretch force. *J Biol Chem* **285**, 27176-27181.
- Mata-Daboin A, Garrud TAC, Fernandez-Pena C, Peixoto-Neves D, Leo MD, Bernardelli AK, Singh P, Malik KU & Jaggar JH. (2023). Vasodilators activate the anion channel TMEM16A in endothelial cells to reduce blood pressure. *Sci Signal* **16**, eadh9399.
- Mendoza SA, Fang J, Gutterman DD, Wilcox DA, Bubolz AH, Li R, Suzuki M & Zhang DX. (2010). TRPV4-mediated endothelial Ca<sup>2+</sup> influx and vasodilation in response to shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H466-476.
- Sandow SL, Neylon CB, Chen MX & Garland CJ. (2006). Spatial separation of endothelial small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (K(Ca)) and connexins: possible relationship to vasodilator function? *J Anat* **209**, 689-698.
- Sonkusare SK, Dalsgaard T, Bonev AD, Hill-Eubanks DC, Kotlikoff MI, Scott JD, Santana LF & Nelson MT. (2014). AKAP150-dependent cooperative TRPV4

channel gating is central to endothelium-dependent vasodilation and is disrupted in hypertension. *Sci Signal* **7**, ra66.

Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G & Plant TD. (2000). OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* **2**, 695-702.

Takayama Y, Shibasaki K, Suzuki Y, Yamanaka A & Tominaga M. (2014). Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anoctamin 1. *FASEB J* **28**, 2238-2248.

Wulff H, Miller MJ, Hansel W, Grissmer S, Cahalan MD & Chandy KG. (2000). Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8151-8156.

## Exploring a Novel Mechanism of Vasoregulation Focusing Ion Channel-Coupling.

Makiko Kashio

Kumamoto University

### Summary

Hypertension (high blood pressure) is a chronic condition with high prevalence in Japan. Because hypertension increases the risk of life-threatening cardiac diseases (angina, cardiac infarction) and cerebrovascular diseases (cerebral infarction, stroke), many antihypertensive drugs are used to control blood pressure within optimal levels. TRPV4 is a non-selective cation channel having sensitivity to warm temperatures and mechanical stimuli. In vascular endothelial cells of small resistant arteries, TRPV4 is activated downstream of mechanical stimuli including blood pressure and shear stress.  $\text{Ca}^{2+}$ -influx through TRPV4 leads following activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  channels which contributes endothelia-dependent hyperpolarization to cause vasodilation. This study has focused on the functional coupling of TRPV4 and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  channels on vascular endothelial cells, a potential target for antihypertensive drugs.

RT-PCR analysis has revealed the expression of TRPV4,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  (KCNN1-4) and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{Cl}^-$  channel (TMEM16A) in the resistant artery (3<sup>rd</sup> order mesenteric artery) having important roles in blood pressure regulation. We aimed to establish the functional analysis of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  channel activities following TRPV4 activation. HEK293T cell co-expressing TRPV4 and KCNN4 ( $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channel) was used to record TRPV4 activator (GSK1016790A, 100nM)-induced KCNN4 current separately from TRPV4 current adapting selective KCNN4 inhibitor (TRAM-34, 1 mM) in whole-cell patch-clamp recordings. As a result, GSK1016790A-treatment caused substantial current activation, however, TRAM-34 failed to inhibit GSK1016790A-induced current in TRPV4/KCNN4-coexpressing cells. The results suggest that concentrations of GSK1016790A and TRAM-34 should be optimized in future studies.