

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890078

研究課題名(和文) 双極性障害における TRPM2 / GSK3 を介した細胞内カルシウム制御障害の解明

研究課題名(英文) Disrupted intracellular calcium homeostasis through TRPM2/GSK3B in bipolar disorder

研究代表者

上村 拓治 (UEMURA, Takuji)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60377497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、双極性障害における TRPM2/GSK3 を介した細胞内カルシウム制御異常を解明し、双極性障害の発症機序を明らかにすることを目的とし、TRPM2/GSK3 クロストークの同定及び双極性障害特異的な TRPM2 バリエーションの機能解析を行った。TRPM2 を knockdown した U-87MG 細胞では、TRPM2 だけでなく GSK3 の発現も低下し、GSK3 を knockdown した U-87MG 細胞でも、GSK3 だけでなく TRPM2 の発現も低下していた。さらに、双極性障害特異的な TRPM2 バリエーションが安定に発現している U-87MG 細胞では、GSK3 の発現が低下していた。

研究成果の概要(英文)：Disturbances of intracellular calcium homeostasis play important roles in the pathophysiology of bipolar disorder (BD). TRPM2 that is one of candidate genes for BD is a calcium-permeable cation channel activated by oxidative stress and induces cell death. Lithium is the most widely used for BD and induces the inhibition of GSK3B. Recently, Xie et al. reported that TRPM2 is associated with maintenance of the level of GSK-3B in mice hippocampal neurons. In this study, we sought to identify TRPM2/GSK3B cross-talk and confirm that the function of the BD-specific TRPM2 variant that has been found in our group. The expression level of TRPM2 was downed in the stable GSK3B knockdown U-87MG cell line. That of GSK3B was reduced in the stable TRPM2 knockdown U-87MG cells and the cell lines that were stable overexpression of BD-specific TRPM2 variant. We found TRPM2/GSK3B cross-talk and that BD-specific TRPM2 variant is reduced the expression of GSK3B.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：双極性障害 細胞内カルシウム制御 TRPM2 GSK3B リチウム

1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリアに関連した細胞内カルシウム制御障害が双極性障害患者で認められる(Warsh et al. Clin Neurosci Res 2004)。我々も、双極性障害 I 型患者で細胞内カルシウム濃度が上昇していることを報告した(Uemura et al. Bipolar Disord 2010)。この原因として酸化ストレスの関与も示唆されている(Amanda et al. Neurochem Res 2010)が、十分に明らかにされていない。

(2) TRPM2 (transient receptor potential melastatin 2) は、双極性障害の疾患遺伝子候補領域(21 番染色体長腕 22.3)に存在する Ca^{2+} チャネルをコードする遺伝子であり、TRPM2 遺伝子内に双極性障害と関連のある多型を発見したという国外からの報告もある(McQuillan et al. Mol Psychiatry 2006 など)ため、TRPM2 は双極性障害の有力な疾患候補遺伝子であると考えられる。このタンパクは、酸化ストレスで活性化されたミトコンドリア由来の ADP - リボース (ADPR) が結合して、細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こし、細胞死を誘発する(Adriana et al. J Physiol 2011)。我々の研究グループは、TRPM2 遺伝子の多型解析を行い、同遺伝子の exon 30 内に双極性障害患者に特異的な DNA 変異(G A)を発見した。この変異は、TRPM2 の機能上、重要なドメイン NUDT9-H (酸化ストレスによって活性化されるミトコンドリア由来 ADPR が結合する部位)に存在するため、TRPM2 の質的变化をもたらす、同タンパクの機能変化が生じると予測される。加えて、我々は、予備実験として、ヒト膠芽腫細胞株 U-87MG に、双極性障害の治療薬(気分安定薬)であるリチウムを投与したところ(LiCl, 1 mM, 7 日間) TRPM2 の発現が低下する($p < 0.001$) ことを見出している。

(3) リチウムの作用機序が、双極性障害の病態解明の大きな手がかりになると期待されているが、まだ、双極性障害の病態解明するような十分な研究報告はない。リチウムの多様な作用の一つとして、神経保護、神経細胞増殖などに関わっている GSK3 (Glycogensynthase kinase 3) の阻害作用がある。最近、GSK3 の発現及び活性化レベルの維持に TRPM2 が関与しているという興味深い報告がなされた(Xie et al. Molecular Brain 2011)。以上から、双極性障害患者で認められる細胞内カルシウム制御障害を明らかにし、その発症機序を解明するためには、TRPM2 と GSK3 の相互作用 (TRPM2/GSK3 クロストーク) を明らかにした上で、双極性障害患者に特異的にみられる TRPM2 バリエーションの機能を解析することが重要と思われる。

2. 研究の目的

本研究は、双極性障害の疾患候補遺伝子である Ca^{2+} チャネル TRPM2 と、気分安定薬であるリチウムによって阻害される GSK3 のクロストークを同定し、双極性障害患者に特異的な TRPM2 バリエーションの機能解析を行うことによって、双極性障害患者で認められる細胞内カルシウム制御障害、そして、その発症機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) リチウム(LiCl)による TRPM2 と GSK3 の発現解析

临床上、リチウムの気分安定薬としての効果は、約 1 週間後から認められる。細胞レベルの実験では、リチウムの薬理学的効果を評価し、臨床にフィードバック可能な濃度として、1 mM を標準としている(Lenox and Manji Textbook of Psychopharmacology 1995)。U-87MG 細胞に LiCl (濃度: 0, 0.5, 1, 2 mM) を投与し、LiCl 投与濃度の異なる U-87MG 細胞群を 0、1、3、7 日後にそれぞれ回収した。RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使って、total RNA を抽出した後、SuperScript III Reverse Transcriptase(Life Technologies) 及び Random Primer (Life Technologies) を用いて First-Strand cDNA を作製した。作製した cDNA を鋳型として、ハウスキーピング遺伝子である β -actin と比較しながら、リアルタイム RT-PCR 法を行い、TRPM2、GSK3 の発現の変動を定量的に測定し(各群は 5 サンプルずつ)、反復測定 2 元配置分散分析、ポストホックテストとしてボンフェローニ検定を行い、各群の発現量を統計学的に評価した。また、TRPM2 バリエーションの細胞株における TRPM2 と GSK3 の発現の相関を最小二乗法を用いて検討した。

(2) TRPM2/GSK3 クロストークの同定

TRPM2 と GSK3 の発現、機能変動及びクロストークを同定するために、shRNA ベクターを作成し、U-87MG 細胞に導入した。pcDNA6.2-GW/miR vector (Life Technologies) を用いて、TRPM2 及び GSK3 を標的とし、各々の遺伝子がノックダウンする発現ベクターを作製し、Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を使って、U-87MG 細胞に各々のプラスミドを導入した。その後、耐性遺伝子として同ベクターに組み込まれている抗生剤(プラストサイジン)で薬剤選択し、コロニーピッキングでクローニングを行うことにより、TRPM2 あるいは GSK3 の発現が安定にノックダウンしている U-87MG 細胞(以下 TRPM2^{Low} 細胞、GSK3^{Low} 細胞)株を作製した。また、コントロールとして、pcDNA

™ 6.2-GW/miR-neg control plasmid (Life Technologies) が安定に発現する U-87MG 細胞株 (U-87MG-neg control) も作製した。各々の細胞株が $0.8 \sim 1 \times 10^7$ まで増殖した後、リアルタイム PCR 法で、アクチンと比較しながら、TRPM2、GSK3 の発現量を定量的に測定した。

(3) 双極性障害患者に特異的に認められる TRPM2 バリエーションの生物学的意義の解明

研究代表者が以前に作成した Flag tag 付の TRPM2 発現ベクター (Uemura et al. Biochem Biophys Res Commun 2005) を鋳型として PCR を行い、再度、FLAG 発現ベクター (p3xFLAG-CMV-14, Sigma) に TRPM2 遺伝子を導入した。作製したプラスミドは、DNA シーケンシング法で導入した TRPM2 遺伝子の DNA 配列を確認した。その後、作製したプラスミドを鋳型にし、QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) を使って、双極性障害患者に特異的に認められる TRPM2 バリエーションを発現するプラスミドを作製した。DNA シーケンシングで DNA 確認した後、作成したプラスミドを U-配列を確認した後、U-87MG 細胞に導入した。耐性遺伝子として同ベクターに組み込まれている抗生剤 (G418) で薬剤選択し、コロニーピッキングでクローニングを行い、双極性障害患者に特異的に認められる TRPM2 バリエーションの細胞株 ($n=5$) を作成した。また、コントロールとして、p3xFLAG-CMV-14 (Sigma) が安定に発現する U-87MG 細胞株も作製した。各々の細胞株が $0.8 \sim 1 \times 10^7$ まで増殖した後、リアルタイム PCR 法で、アクチンと比較しながら、TRPM2、GSK3 の発現量を定量的に測定した。

4. 研究成果

(1) リチウム (LiCl) による TRPM2 と GSK3 の発現解析

TRPM2 の発現解析

1 日後に回収した細胞群では、各群 (LiCl 濃度: 0、0.5、1.0、2.0 mM) で TRPM2 の発現量の差はなかった。3 日後に回収した細胞群では、0.5 mM LiCl (以下、コントロールと比較した平均値 \pm S.D.; 0.78 ± 0.27)、1.0 mM LiCl (0.74 ± 0.25)、2.0 mM LiCl (0.71 ± 0.18) と、TRPM2 の発現量の低下を認めたが、統計学的有意差はなかった。7 日後に回収した細胞群では、0.5 mM LiCl (0.74 ± 0.18)、1.0 mM LiCl (0.49 ± 0.21)、2.0 mM LiCl (0.47 ± 0.19) であった。1.0、2.0 mM LiCl では、統計学的有意差を持って減少していた (1.0、2.0 mM LiCl とともに $p < 0.01$) が、1.0 と 2.0 mM LiCl の間では差を認めなかった (図 1)。

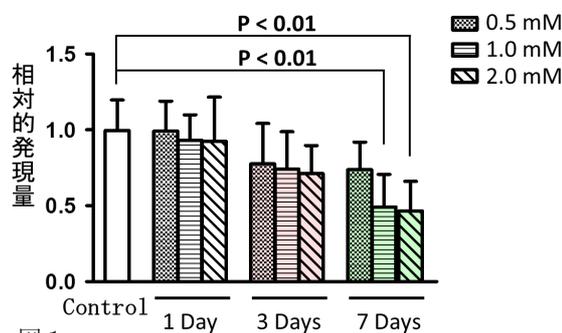


図 1

GSK3 の発現解析

1 日後に回収した細胞群では、各群 (LiCl 濃度: 0、0.5、1.0、2.0 mM) で差はなかった。3 日及び 7 日後に回収した細胞群では、リアルタイム PCR 法による発現解析の結果が変動するため、信頼できるデータは得られなかった。

(2) TRPM2/GSK3 クロストーク

U-87MG-neg control 細胞株と比較しながら、TRPM2^{Low} 細胞株及び GSK3^{Low} 細胞株における TRPM2、GSK3 の発現を定量的に検証したところ、TRPM2^{Low} 細胞株では、U-87MG-neg control 細胞株に比べて、TRPM2 の発現が 27.0%と低下し、GSK3 の発現も 52.2%にまで低下していた。GSK3^{Low} 細胞株でも、GSK3 の発現が 0.01%、TRPM2 の発現が 57.1%と低下していた (図 2)。

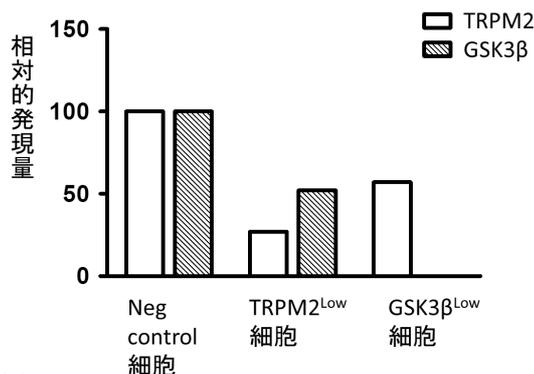


図 2

細胞内シグナル伝達において、例えば、TRPM2 が GSK3 の下流に存在するのであれば、GSK3^{Low} 細胞株では、TRPM2、GSK3 とともに発現が低下し、TRPM2^{Low} 細胞株では GSK3 の発現に変化はないはずである。同様に、GSK3 が TRPM2 の下流に存在するのであれば、TRPM2^{Low} 細胞株では、TRPM2、GSK3 とともに発現が低下し、GSK3^{Low} 細胞株では、TRPM2 の発現に変化は生じないはずである。今回の研究結果は、TRPM2^{Low} 細胞株、GSK3^{Low} 細胞株ともに、TRPM2 と GSK3 の発現が低下していた。このことは、TRPM2 と GSK3 の関係は、細胞

内シグナル伝達において、GSK3、TRPM2の両遺伝子が、上流、下流という関係ではなく、お互いに発現を作用し合っている、つまりクロストークしていることを意味していると思われる。

(3) 双極性障害特異的に認められる TRPM2 バリエーションの機能解析

今回、変異のない TRPM2 が安定に発現する細胞株の作製も試みたが、遺伝子導入効率が非常に悪いので、作製及び解析を断念した。そのため、変異のない TRPM2 が過剰に発現している細胞株との比較はできなかったが、TRPM2 が過剰に発現していない細胞株 (p3xFLAG-CMV-14 が安定に発現する U-87MG 細胞株) と比較したところ、双極性障害特異的に認められる TRPM2 バリエーションが過剰に発現している細胞株 (n = 5) では、同バリエーションの発現量が多くなると GSK3 の発現が低下する傾向を認めた (図 3)。

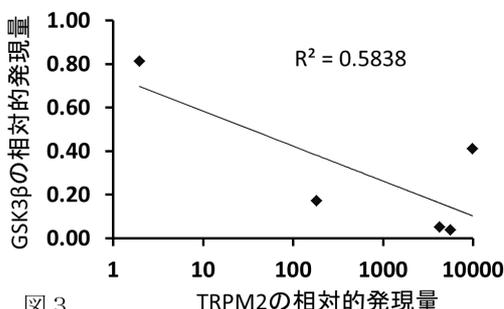


図 3

双極性障害特異的に認められる TRPM2 バリエーションの発現ベクターを構築する際に、TRPM2 の翻訳領域が、約 4.5kb と長いので、DNA シーケンシングで、PCR エラーと思われる変異が複数見つかって、QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit を使って、DNA 配列を修正しながら、DNA シーケンシングで何度も慎重に DNA 配列を確認したこと、GSK3 の発現解析で、リアルタイム PCR 法による結果が変動すること、遺伝子導入効率が非常に悪いので、変異のない TRPM2 が安定に発現する細胞株の作製が思うようにいかず、時間を費やしてしまった。そのため、当初予定していたタンパクレベルでの TRPM2 及び GSK3 の発現及び機能解析を行うことが出来なかった。しかしながら、我々は、ヒト膠芽腫細胞株 U-87MG において、双極性障害の治療薬である LiCl が、TRPM2 の発現を低下させることから、LiCl が TRPM2 を介した細胞死を予防すると思われる結果を得た。また、TRPM2 と GSK3 がクロストークし、お互いの発現を制御し合っていること、双極性障害特異的に認められる TRPM2 バリエーションが、GSK3 の発現を低下させるといった新しい知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 拓治 (UEMURA Takuji)

山梨大学・医学部附属病院 助教

研究者番号：60377497