

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04657

研究課題名(和文) 低マグネシウム血症の回避に向けた革新的創薬基盤の構築

研究課題名(英文) Establishment of the basis for evolutionary drug development toward avoidance of hypomagnesemia

研究代表者

五十里 彰 (IKARI, AKIRA)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50315850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,100,000円

研究成果の概要(和文)：低マグネシウム(Mg)血症は薬物療法において重大な障害になるが、その発症機序は大部分が不明であり、有効な治療法は全く開発されていない。Mg輸送体の分子実体が未解明であったことが、Mg代謝疾患と創薬研究の遅延を招いたと考えられる。申請者は低Mg血症におけるMgチャネルの発現異常機構を検討し、薬剤性および遺伝性低Mg血症の発症機序を分子レベルで解明した。さらに、低Mg血症の治療につながる化合物の同定に成功した。本研究により、低Mg血症の回避に向けた薬剤の開発基盤が構築された。

研究成果の概要(英文)：Hypomagnesemia causes discontinuation of treatment, but the mechanism of pathogenesis has not been fully clarified. In addition, there is no treatment method for hypomagnesemia. Drug discovery research may be delayed because the molecules of Mg²⁺ transporter were unknown. We investigated the abnormal mechanism of Mg²⁺ channel expression in hypomagnesemia and clarified the pathogenic mechanisms of drug-induced and inherited hypomagnesemia. In addition, we succeeded in identification of effective drugs for the treatment of hypomagnesemia. The present studies provide a development basis for a novel drug which prevents hypomagnesemia.

研究分野：生化学

キーワード：低Mg血症 Mgチャネル 細胞局在 クローディング

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化などにより、日本人の Mg 摂取量は厚生労働省が策定する食事摂取基準を満たしていない。低 Mg 血症は高血圧症、糖尿病、癌、腎不全などの現代人が罹患しやすい病気に密接に関与する。また、抗癌剤、利尿剤、免疫抑制剤の投与によって、不整脈などの致死的な副作用を伴う低 Mg 血症が出現することがある。健康の維持と最適な薬物療法の実施には、Mg 恒常性を維持する必要があるが、近年まで Mg 輸送体の分子実体は全く不明であったため、他の主要な金属イオンと比較して Mg の代謝疾患と創薬研究は大幅に遅れている。

生体内の Mg 濃度は、腎尿細管からの再吸収機構によって厳密に調節される。二次性低カルシウム血症を伴う低 Mg 血症 (HSH) の原因遺伝子として TRPM6 Mg チャネルが同定された。TRPM6 は遠位尿細管の管腔膜に局在し、細胞内へ Mg を取り込む。HSH 患者で同定された TRPM6 変異体は、細胞内局在の異常またはチャネル活性の低下を引き起こす。申請者らは免疫抑制剤のシクロスポリンが TRPM6 発現を低下させることを発見した。しかし、未だ低 Mg 血症の発症機序が不明な薬剤は多い。最近、がん分子標的治療薬のチロシンキナーゼ阻害薬が低 Mg 血症を引き起こすことが報告され、国内外で発症機序の解明と治療薬の開発が切望されている。

高カルシウム尿症と腎石灰化を伴う家族性低 Mg 血症 (FHHNC) の原因遺伝子としてクローディン-16 (CLDN16) が同定され、申請者らは CLDN16 が Mg チャネルとして機能することを世界で初めて証明した。CLDN16 はヘンレ上行脚のタイトジャンクションに局在し、細胞間経路を介した Mg 再吸収を担う。FHHNC 患者は TRPM6 の発現が正常であるにも関わらず低 Mg 血症になるため、CLDN16 と TRPM6 は代償的調節を受けないと考えられる。そのため、低 Mg 血症の発症機序の解明には、CLDN16 の発現変化も検討する必要がある。

2. 研究の目的

TRPM6 や CLDN16 の発現と細胞膜への局在を促進する薬剤は、低 Mg 血症の新規治療薬になると考えられる。しかし、このような作用を有する化合物は全く見つかっていない。そこで次の2点の解明を目的として、本研究を実施した。

1) 抗癌剤による薬剤性低 Mg 血症の発症機序を解明し、低 Mg 血症を改善する化合物を開発する。

2) CLDN16 の細胞内局在の調節に関与する分子を解明し、遺伝性低 Mg 血症を改善する低分子リード化合物を創出する。

以上の研究成果を統合し、遺伝性および薬剤性低 Mg 血症の発症機序の全容を解明し、低 Mg 血症回避型薬剤及び治療薬の開発に向けた創薬基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

イヌ腎臓由来の MDCK Tet-OFF 細胞とラット腎臓由来の NRK-52E 細胞を、Dulbecco's modified Eagle's medium で培養した。ベクターの導入には、Lipofectamine 2000 を使用した。G418 や hygromycin B に対する薬剤耐性細胞を選別し、安定発現細胞を樹立した。

(2) プラスミド DNA の構築

ヒトの腎組織から mRNA を抽出し、RT-PCR 法によって CLDN16 の cDNA を作成した。cDNA を pCMV-Tag2A ベクターにサブクローニングし、FLAG タグを融合した。その後、pTRE2hyg ベクターにサブクローニングした。QuichChange site-directed mutagenesis kit を用いて点変異体を作成した。

(3) 細胞抽出物の調製

コンフルエントの状態まで培養した細胞を氷冷 PBS で洗浄し、セルスクレーパーで細胞を回収した。Lysis buffer に懸濁後、超音波処理を行った。遠心処理により、核画分と細胞質画分を分離した。

(4) 免疫沈降

細胞抽出物を抗体、プロテイン G-セファロースビーズと混合し、低温室で転倒混和した。結合したタンパク質複合体を洗浄後、サンプルバッファーに溶解した。

(5) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウェスタンブロット

細胞抽出物と免疫沈降物を、SDS-ポリアクリルアミドゲルに電気泳動した。タンパク質を PVDF 膜に転写後、2% スキムミルクでブロッキングした。リン酸化抗体を使用する場合は、2% BSA でブロッキングした。一次抗体を反応後、HRP 標識二次抗体を反応させた。EzWestLumi plus を用いて発光後、C-DiGit ブロットスキャナーでバンドを検出した。

(6) 細胞間透過性の測定

細胞をトランスウェルに培養し、Volt ohm meter を用いて上皮膜間電気抵抗値 (TER) を測定した。FITC 標識高分子デキストラン (分子量 4,000 Da) を用いて、細胞間分子透過性を測定した。

(7) タンパク質の細胞内局在の測定

カバーガラス上にコンフルエントの状態まで培養した細胞をメタノールで固定後、一次抗体を反応させた。その後、Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 546 標識した二次抗体を反応させた。LSM700 共焦点レーザー顕微鏡を用いて、タンパク質の細胞内分布を調べた。

(8) 酵母ツーハイブリッド法による会合タンパク質の探索

CLDN16 のカルボキシ末端を bait ベクターに組み込み、腎臓の cDNA ライブラリーを prey ベクターに組み込んだ。両者を酵母に形質転換し、寒天培地で培養した。陽性コロニーから DNA を抽出後、塩基配列を解析した。データベースを利用して、CLDN16 に会合するタンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) MDCK 細胞における CLDN16 と PDZRN3 の結合

酵母ツーハイブリッド法で CLDN16 のカルボキシ領域に結合するタンパク質を探索し、PDZ domain-containing RING finger protein 3 (PDZRN3) を同定した。CLDN16 の発現によって、PDZRN3、CLDN とともにタイトジャンクションに分布するオクルディン、タイトジャンクションの裏打ちタンパク質である ZO-1、アドヘレンスジャンクションに分布する E-カドヘリンの発現量は変化しなかった。抗 PDZRN3 抗体を用いて MDCK 細胞のライセートを免疫沈降したが、FLAG-CLDN16 のバンドは検出されなかった。CLDN16 はプロテインキナーゼ A (PKA) 阻害剤の H-89 によって脱リン酸化され、細胞質へ移行することが報告されている。H-89 処理した細胞のライセートを用いて免疫沈降したところ、FLAG-CLDN16 のバンドが検出された。このことから、脱リン酸化型 CLDN16 の細胞質局在化に PDZRN3 が関与すると示唆された。

(2) MDCK 細胞における CLDN16 と PDZRN3 の細胞内局在

野生型 CLDN16 は、ZO-1 とともに、タイトジャンクションに分布した (Fig. 1)。一方、PDZRN3 は細胞質とタイトジャンクションに分布した。H-89 処理により、CLDN16 の一部は細胞質に分布した。細胞質内の CLDN16 は PDZRN3 や Rab7 (初期エンドソームマーカー) と共局在した。このことから、CLDN16 の一部は初期エンドソームに分布することが示唆された。一方、PDZRN3 siRNA を導入した細胞では、H-89 処理後も CLDN16 の大部分はタイトジャンクションに分布し、Rab7 と共局在しなかった。このことから、脱リン酸化型 CLDN16 はタイトジャンクションから細胞質へ移行し、このエンドサイトーシスの調節に PDZRN3 が関与すると示唆された。

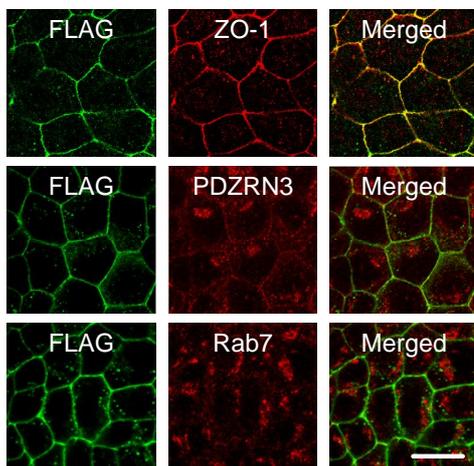


Fig. 1. CLDN16 の細胞局在

FLAG タグを融合した CLDN16 は ZO-1 とともに細胞接着部位に分布した。PDZRN3 は主に細胞質に分布し、一部が細胞膜に分布した。横棒は 10 μ m を表す。

(3) CLDN16 のタイトジャンクション局在に対する PDZRN3 siRNA の効果

細胞膜に分布するタンパク質をビオチン標識し、CLDN16 のタイトジャンクション局在に対する PDZRN3 siRNA の効果を検討した。H-89 処理により細胞膜表面における CLDN16 の分布量が低下した。PDZRN3 siRNA を導入した細胞では、H-89 の効果が阻害された。これらの結果は蛍光免疫染色法で得られた結果と一致し、脱リン酸化型 CLDN16 の細胞内移行に PDZRN3 が関与すると示唆された。

(4) PDZRN3 siRNA による S217A 変異体の細胞内局在の変化

これまでに我々は、CLDN16 の 217 番目のセリン残基がプロテインキナーゼ A によってリン酸化され、タイトジャンクションへの局在がリン酸化によって調節されることを報告している。S217A 変異体は、主に細胞質に分布し、PDZRN3 や Rab7 と共局在した。PDZRN3 siRNA を導入した細胞では、タイトジャンクションにおける S217A 変異体の分布量が増加した。これらの結果は野生型 CLDN16 発現細胞を H-89 処理した際に得られた結果と一致し、脱リン酸化型 CLDN16 の細胞内局在の調節に PDZRN3 が関与することが強く示唆された。

(5) TRPM6 の発現に対する EGF と TNF- α の効果

NRK-52E 細胞を用いて、TRPM6 の発現をウエスタンブロット法により確認した。EGF 処理により TRPM6 発現量が増加し、この効果は EGFR チロシンキナーゼ阻害剤のゲフィチニブ、エルロチニブ、ラパチニブの共処理により阻害された (Fig. 2)。一方、TRPM6 のホモログである TRPM7 の発現量は、EGF や EGFR チロシンキナーゼ阻害剤によって変化しなかった。EGF 以外の TRPM6 発現促進因子を探索したところ、TNF- α が濃度依存的に TRPM6 発現量を増加させることを見出した。

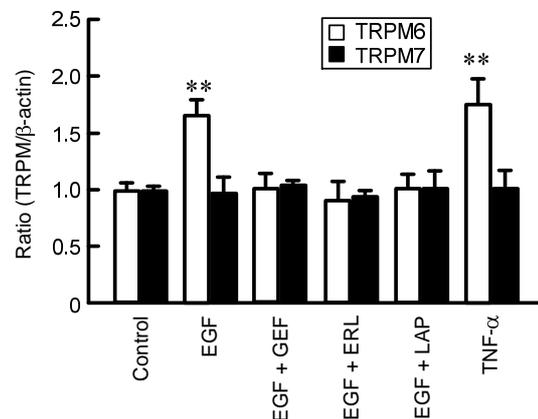


Fig. 2. TNF- α による TRPM6 発現の増加
EGF による TRPM6 発現の増加は、EGFR チロシンキナーゼの共処理によって阻害された。

50 ng/ml TNF- α による効果は、100 ng/ml EGF による効果と同程度であった。EGF による TRPM6 発現量の増加はエルロチニブの共処理によって阻害されたが、TNF- α を添加することによって TRPM6 発現量が増加した。EGF は ERK1/2 のリン酸化量を増加させ、この効果はエルロチニブの共処理によって完全に阻害された。エルロチニブ存在下、TNF- α は ERK1/2 量を増加させなかった。TNF- α はエルロチニブ存在下でも NF- κ B のリン酸化量を増加させ、この効果は NF- κ B 阻害剤の BAY 11-7082 共処理によって阻害された。以上より、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の存在下、TNF- α は NF- κ B の活性化を介して TRPM6 発現量を増加させることが示唆された。

(6) TRPM6 の細胞膜局在に対する TNF- α の効果

TNF- α による TRPM6 発現量の増加は、BAY 11-7082 の共処理によって阻害された。この結果は NF- κ B のリン酸化に対する結果と一致した。細胞膜表面の TRPM6 分布量は TNF- α によって増加し、この効果も BAY 11-7082 の共処理によって阻害された。

(7) TRPM6 レポーター活性に対する TNF- α の効果

EGF はヒト TRPM6 レポーター活性を増加させ、この効果はエルロチニブの共処理によって阻害された。EGF とエルロチニブの存在下、TNF- α は TRPM6 レポーター活性を増加させ、この効果は BAY 11-7082 や PDTC の共処理によって阻害された。NF- κ B の推定上の結合部位に変異を導入したところ、TNF- α の効果が消失した。以上の結果から、TNF- α によって核に移行した NF- κ B は TRPM6 のプロモーター領域に結合し、転写活性を増大させることが示唆された。

(8) TNF- α による Mg²⁺流入の増加

TRPM6 の発現量と細胞内への Mg 流入との関係を解明するため、細胞内 Mg 濃度 ($[Mg^{2+}]_i$) の変化量を測定した。細胞外に 1 mM MgCl₂ を添加すると、時間依存的に $[Mg^{2+}]_i$ が上昇し、1~2 分後にプラトーに達した。 $[Mg^{2+}]_i$ の変化量は EGF 処理により増加し、エルロチニブ共処理によりコントロールレベルまで減少した。また、エルロチニブ存在下、 $[Mg^{2+}]_i$ の変化量は TNF- α 処理により増加し、この効果は BAY 11-7082 の共処理によって阻害された。以上の結果から、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤による TRPM6 発現量と細胞内への Mg 流入の低下は、TNF- α によって回復することが示唆された。

(9) まとめ

本研究により、脱リン酸化型 CLDN16 の細胞内移行に PDZRN3 が関与することが明らかになった。PDZRN3 の発現をノックダウンすることにより、CLDN16 のタイトジャンクション

への局在と Mg 輸送機能が回復したため、PDZRN3 阻害剤を開発することにより、CLDN16 の脱リン酸化が原因となる低 Mg 血症の治療が可能になると示唆された。また、EGFR チロシンキナーゼによって低下した TRPM6 発現が、TNF- α によって回復することが明らかになった。TNF- α は一部の癌や炎症を誘発する可能性があるため、より安全な低 Mg 血症治療薬の開発が必要である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計6件)

1. Ryohei Maruhashi, Risa Akizuki, Tomonari Sato, Toshiyuki Matsunaga, Satoshi Endo, Masahiko Yamaguchi, Yasuhiro Yamazaki, Hideki Sakai, Akira Ikari: Elevation of sensitivity to anticancer agents of human lung adenocarcinoma A549 cells by knockdown of claudin-2 expression in monolayer and spheroid culture models. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1865, 470-479 (2018) 査読有
DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.12.005.
2. Chisa Furukawa, Noriko Ishizuka, Hisayoshi Hayashi, Naoko Fujii, Aya Manabe, Yoshiaki Tabuchi, Toshiyuki Matsunaga, Satoshi Endo, Akira Ikari: Up-regulation of claudin-2 expression by aldosterone in colonic epithelial cells of mice fed with NaCl-depleted diets. *Scientific Reports*, 7, 12223 (2017)
DOI: 10.1038/s41598-017-12494-1.
3. Aya Manabe, Chisa Furukawa, Satoshi Endo, Kana Marunaka, Tsubasa Nishiyama, Naoko Fujii, Yoshiaki Tabuchi, Toshiyuki Matsunaga, Akira Ikari: Chlorpheniramine Increases paracellular permeability to marker fluorescein lucifer yellow mediated by internalization of occludin in murine colonic epithelial cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 40, 1299-1305 (2017)
DOI: 10.1248/bpb.b17-00244.
4. Kana Marunaka, Chisa Furukawa, Naoko Fujii, Toru Kimura, Takumi Furuta, Toshiyuki Matsunaga, Satoshi Endo, Hajime Hasegawa, Naohiko Anzai, Yasuhiro Yamazaki, Masahiko Yamaguchi, Akira Ikari: The RING finger- and PDZ domain-containing protein PDZRN3 controls localization of the Mg²⁺ regulator claudin-16 in renal tube epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 292, 13034-13044 (2017) 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M117.779405.

5. Chisa Furukawa, Naoko Fujii, Aya Manabe, Toshiyuki Matsunaga, Satoshi Endo, Hajime Hasegawa, Yoshinori Ito, Masahiko Yamaguchi, Yasuhiro Yamazaki, Akira Ikari: Up-regulation of transient receptor potential melastatin 6 channel expression by tumor necrosis factor- in the presence of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. Journal of Cell Physiology, (2016) 査読有
DOI: 10.1002/jcp.25709.
6. Naoko Fujii, Yukinobu Matsuo, Toshiyuki Matsunaga, Satoshi Endo, Hideki Sakai, Masahiko Yamaguchi, Yasuhiro Yamazaki, Junko Sugatani, Akira Ikari: Hypotonic stress-induced down-regulation of claudin-1 and -2 mediated by dephosphorylation and clathrin-dependent endocytosis in renal tubular epithelial cells. Journal of Biological Chemistry, 291, 24787-24799 (2016) 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M116.728196

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 眞鍋綾、古川千紗、遠藤智史、松永俊之、長谷川元、五十里彰: 抗がん剤による TRPM6 マグネシウムチャネルの発現低下に対するロシグリタゾンの回復効果
日本薬学会第 138 年会(石川) 2018 年 3 月 26 日
2. 丸中歌菜、古田巧、遠藤智史、松永俊之、五十里彰: プリマキンによるクロードイン-16 変異体の局在異常の改善
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 (兵庫) 2017 年 12 月 6 日
3. 丸中歌菜、古田巧、長谷川元、松永俊之、遠藤智史、五十里彰: PDZRN3 によるクロードイン-16 マグネシウムチャネルのエンドサイトーシス機構の解明
日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2017(三重) 2017 年 11 月 26 日
4. 五十里彰: 健康な体に欠かせないマグネシウムの働き
ソルト・サイエンス・シンポジウム 2017 (東京) 2017 年 10 月 19 日
5. 丸中歌菜、古川千紗、藤井尚子、木村徹、遠藤智史、松永俊之、山口賢彦、山崎泰広、五十里彰: E3-ユビキチンリガーゼによるクロードイン-16 マグネシウムチャネルの細胞内局在の調節
第 81 回日本生化学会中部支部例会(愛知) 2017 年 5 月 20 日
6. 古川千紗、眞鍋綾、藤井尚子、遠藤智史、松永俊之、山崎泰広、山口賢彦、五十里彰: TNF-alpha による TRPM6 マグネシウムチャネルの発現増加機構の解明

- 第 94 回日本生理学会大会(静岡) 2017 年 3 月 28 日
7. 丸中歌菜、古川千紗、藤井尚子、木村徹、遠藤智史、松永俊之、山崎泰広、山口賢彦、五十里彰: PDZRN3 によるクロードイン-16 の細胞内局在の調節
第 94 回日本生理学会大会(静岡) 2017 年 3 月 28 日
8. 古川千紗、藤井尚子、遠藤智史、松永俊之、長谷川元、山口賢彦、山崎泰広、菅谷純子、伊藤善規、五十里彰: 抗がん剤による Mg²⁺チャネルの発現低下に対する TNF-alpha の回復効果
日本薬学会第 136 年会(神奈川) 2016 年 3 月 26 日
9. 藤井尚子、遠藤智史、松永俊之、山崎泰広、山口賢彦、菅谷純子、五十里彰: 高浸透圧によるクロードイン-2 発現の低下における PKCbeta の関与
第 78 回日本生化学会中部支部例会(長野) 2015 年 5 月 23 日
10. Akira Ikari: Hypomagnesemia caused by defective trafficking of claudin-16 in renal tubule.
ACN2015 (京都) 2015 年 5 月 14 日

〔図書〕(計 1 件)

1. 腎尿細管における TRPM チャネルの働き
腎臓内科・泌尿器科, 2, pp.596-601 (2015)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.gifu-pu.ac.jp/lab/seika/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

五十里 彰 (IKARI, Akira)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 50315850

(2)研究分担者

古田 巧 (FURUTA, Takumi)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 30336656

遠藤 智史 (ENDO, Satoshi)

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 60433207

(3)連携研究者

なし