

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16125

研究課題名（和文）過剰なMgイオンによるミトコンドリアのエネルギー代謝異常とがん悪性化

研究課題名（英文）Mitochondrial energy metabolism abnormalities and cancer malignancy induced by excess Mg ions.

研究代表者

橋爪 脩（Hashizume, Osamu）

京都大学・工学研究科・助教

研究者番号：50755692

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内のMgイオンを排出するトランスポーターCNNMの抑制による細胞内でのMgイオンの過剰蓄積の影響を培養細胞や線虫、モデルマウスを用いて解析した。培養細胞では細胞内の過剰なMgイオンはミトコンドリアでのATP産生を加速させ、それに伴いROSが過剰産生されることを、cnnm変異体線虫ではその過剰なROSが寿命短縮の原因となることを、腸で強く発現するCnnm4の欠損マウスではMgイオンが蓄積すると思われる腸上皮細胞で酸化ダメージや細胞増殖が増加することを明らかにした。細胞内でのMgイオン過剰蓄積はがん悪性化を引き起こすことがわかっており、今回の研究からROSがその一因であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Mgイオンは細胞にとって必須な物質の一つであり、細胞内のMgイオンレベルは厳密に保たれている。CNNMの抑制による細胞内でのMgイオンの過剰蓄積によりROSが過剰産生され、線虫では寿命の短縮、マウスでは腸上皮細胞の異常増殖を引き起こすことを明らかにした。CNNMが進化的に広く保存されていることから細胞内のMgイオンの過剰蓄積は細胞にとって避けるべき状況であると考えられ、CNNMのような細胞内のMgイオンを排出するトランスポーターが存在することの生物学的重要性が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The effects of excessive intracellular accumulation of Mg²⁺ by suppression of the Mg²⁺ transporter CNNM, which extrudes intracellular Mg²⁺, were analysed using cultured cells, *C. elegans* and the mouse model. In cultured cells, excess intracellular Mg²⁺ accelerated ATP production in mitochondria, resulting in the overproduction of ROS; in *cnnm* mutant worms, the augmented ROS caused a shortened lifespan; and in the *Cnnm4*-deficient mice, intestinal epithelial cells, where CNNM is highly expressed, caused oxidative stress and increased cell proliferation. Excessive accumulation of Mg²⁺ in cells has been shown to cause cancer malignancy, and this study suggests that ROS are involved in this process.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Mg²⁺ CNNM PRL ATP ミトコンドリア がん悪性化

1. 研究開始当初の背景

マグネシウムイオン(Mg^{2+})は細胞にとって必須であり、細胞内の Mg^{2+} レベルは種々のチャネルやトランスポーターを介した流入と排出のバランスにより一定に保たれている。細胞への Mg^{2+} の取り込みは TRPM6 や TRPM7 などをはじめとする複数の分子が関わることがわかっており、これらの分子の機能欠損の解析などから、細胞内で Mg^{2+} が不足した場合、細胞機能を停止させ、重篤な場合は細胞死を招くことが明らかになっている。一方で、細胞内の Mg^{2+} を排出する分子は長らくその存在が指摘されてきたがその実体は不明だったため、 Mg^{2+} の過剰蓄積が細胞にとってどのような影響があるのかはよくわかっていなかった。

このような状況の中、所属研究室では CNNM ファミリー遺伝子が細胞内の Mg^{2+} を排出するトランスポーターであることを明らかにしている。マウスや線虫を用いた解析から、CNNM は共通して腸の上皮細胞のバソラテラル膜に強く発現しており、その分子機能と合わせて考えると腸管腔から上皮細胞に取り込まれた Mg^{2+} を体の内側へ向けて排出することで腸管腔での Mg^{2+} 吸収に重要な役割を担っていると考えられた。実際に腸で強く発現する CNNM4 の欠損マウスを作製・解析すると体内の Mg^{2+} レベルが減少していたことから、CNNM4 の生体での重要性が明らかになっている。また、CNNM 変異体線虫でも腸細胞に取り込んだ Mg^{2+} を体内に送り出せないため、腸で Mg^{2+} が過剰に蓄積し、その他の部分では Mg^{2+} が減少していた。生殖巣では Mg^{2+} 不足により生殖巣が伸長できず不稔になることがわかった。このように個体レベルでの Mg^{2+} 恒常性維持の重要性は明らかになってきたが、細胞レベルで特に Mg^{2+} が過剰に蓄積した際の影響はほとんど研究されていなかった。

CNNM は PRL という分子が結合することでその Mg^{2+} 排出機能が抑制されることも明らかにしている。この PRL ファミリーのうち、PRL-3 はヒトの大腸がんの転移に関わることが示唆されており、所属研究室の先行研究でも、PRL-3 を発現誘導することでがん細胞が悪性化することを実験的に証明している。PRL-3 の発現だけでなく、CNNM を抑制した場合でも同様にがんの悪性化を引き起こすことがわかり、細胞内での Mg^{2+} の過剰蓄積によりがん悪性化が引き起こされることが示唆されているが、詳細なメカニズムについては未解明な部分が多い。

CNNM 変異体線虫は不稔に加えて寿命が短くなることもわかっている。このメカニズムの解析から、この線虫では ATP レベルが増加していること、腸細胞でミトコンドリアの ROS レベルが増加していることがわかり、腸で発現する Mg^{2+} 取り込みチャネルのノックダウンや抗酸化剤 NAC の投与により寿命が回復したことから、腸細胞での過剰な Mg^{2+} 蓄積による ROS レベルの増加が短寿命の原因であるという実験結果が得られている。

2. 研究の目的

本研究では細胞内での過剰な Mg^{2+} 蓄積による影響を明らかにすることを目的にした。CNNM 変異体線虫の解析から ATP レベルの増加と、ミトコンドリアでの ROS レベルが上昇するという結果を得ている。さらに、この線虫の腸細胞でのみミトコンドリアの膜電位が低下していることもわかっている。このことから、細胞内での過剰な Mg^{2+} 蓄積がミトコンドリアの ATP 産生を促進することで ROS を増加させていることが考えられた。そこで、哺乳類培養細胞を用いて、 Mg^{2+} 過剰蓄積によるミトコンドリアでの ROS レベルの増加が生物種を超えて共通する現象であること、過剰な Mg^{2+} がどのように ROS レベル上昇を引き起こすのかそのメカニズムを解明することに取り組んだ。さらに、 Mg^{2+} 蓄積によるがん悪性化への ROS の関与をマウス生体を用いて解析を行った。

3. 研究の方法

CNNM の抑制や PRL の過剰発現、TRPM7 の過剰発現などの手段により細胞内で Mg^{2+} 過剰蓄積を引き起こした哺乳類培養細胞を用いて ATP や ROS レベル、ミトコンドリア呼吸機能への影響を蛍光プローブや生化学的手法を用いて多角的に調べた。細胞内 Mg^{2+} レベルはレシオ型蛍光化学プローブである Mag-fura2 を、ATP レベルは生化学的な測定に加えて ATP インジケーターである ATeam を用いて調べた。ミトコンドリア呼吸機能の解析では酸素消費速度の測定や $NAD^+/NADH$ レシオの生化学的測定に加え、自家蛍光を利用した NADH の消費速度の比較を行った。マウス生体での解析は Cnnm4 欠損マウスの腸上皮の組織切片で行い、DHE による ROS の染色や酸化ストレスマーカーである 8-oxo-dG、細胞増殖マーカーである Ki67 の抗体染色も使用した解析を行った。

4. 研究成果

CNNM のノックダウンや、PRL-3 の過剰発現を行った哺乳類培養細胞で、蛍光インジケーターを用いた定量解析により細胞内での Mg^{2+} の過剰蓄積が引き起こされていることを確認した。これらの細胞でミトコンドリアに局在する ROS 検出蛍光化学プローブを用いて解析を行うと、どれもミトコンドリアでの ROS レベルが上昇していることがわかった。細胞内に Mg^{2+} を取り込むチャネルである TRPM7 の過剰発現でも細胞内の Mg^{2+} レベルの上昇とミトコンドリアでの ROS レベルが増加していたので、線虫での解析結果と合わせて、細胞内での過剰な Mg^{2+} 蓄積は生物種を超えて

共通して ROS の過剰産生を引き起こすことが明らかになった。次に、ATP 量を生化学的に調べたところ、 Mg^{2+} が過剰に蓄積している細胞では上昇していたので、薬剤により PRL の発現誘導を行うことができる細胞で ATeam を発現させ、継続的な ATP レベルの変化を調べた。その結果、PRL-3 の発現が上昇するにつれ細胞内の ATP レベルも上昇していくことがわかった。これらの結果から Mg^{2+} 過剰蓄積の ATP やミトコンドリア ROS レベルの増加への関与が強く示唆された。

Mg^{2+} は ATP の主要な結合パートナーであり、細胞内の ATP はほとんどが Mg^{2+} と結合して Mg-ATP 複合体として存在していることが知られている。また、ATP は主にミトコンドリアの ATP 合成酵素で産生されるが、その反応も ADP から Mg-ATP を産生するものであり Mg^{2+} が必須である。そこで、過剰な Mg^{2+} によりミトコンドリアの ATP 合成酵素での ATP 産生が亢進しているのではないかと考え、阻害剤である oligomycin A を細胞に処理し ATP 産生を抑制した際の影響を解析した。Oligomycin A は高濃度で処理すると短期的にミトコンドリアが過分極し電子の漏出を引き起こしてしまうことがわかっている。そこで、低濃度で 8 時間処理し、緩やかに ATP 合成を抑制した結果、ROS レベルはコントロール細胞と同程度に抑えられることがわかった。このことから、過剰な Mg^{2+} はミトコンドリア ATP 合成酵素による ATP 産生を亢進させていることが示唆された。この ATP 産生はミトコンドリアの膜電位を消費して行われ、そのミトコンドリアの膜電位はミトコンドリア呼吸鎖での電子伝達により維持されている。そこで、ミトコンドリア呼吸鎖の電子のドナーである NADH を調べてみると、 Mg^{2+} が過剰蓄積している細胞では NADH 量が減少している事がわかった。NADH の自家蛍光を利用しての蛍光観察により、NaCN を細胞に処理し電子伝達を停止させた際の NADH の蓄積速度を比較する事で、それぞれの細胞の NADH の産生速度を比較すると Mg^{2+} が過剰蓄積している細胞では NADH の産生速度は増加していた。さらに、呼吸鎖で伝達された電子は最終的に酸素に受け渡されるので、それぞれの細胞の酸素消費速度を比較したところ、NADH 産生速度の上昇とおおよそ同程度の酸素消費速度の増加が明らかであった。これらの実験結果から以下のようなモデルが考えられる。細胞内での Mg^{2+} 過剰蓄積はミトコンドリアの ATP 合成酵素による ATP 合成を加速させ、それにより消費される膜電位を補償するために呼吸鎖での電子伝達を増加する。ミトコンドリアの呼吸鎖での電子伝達の増加に伴い漏出する電子が増加する。この漏出する電子の増加が ROS 過剰産生の原因となるというものである。実際に CNNM のノックダウン細胞や PRL 発現細胞でミトコンドリアへ Mg^{2+} を取り込む MRS2 をノックダウンすると ROS レベルの上昇を抑制することができたことも、このモデルをサポートする結果が得られている。

先行研究から腸の上皮細胞で強く発現することがわかっている CNNM4 を、腸で上皮細胞に由来する良性腫瘍を多発するモデルマウスで欠損させると、腫瘍の悪性化が引き起こされることがわかっている。CNNM4 欠損マウスの腸上皮細胞では Mg^{2+} 排出の低下により細胞内で Mg^{2+} が過剰に蓄積していると考えられる。そこで CNNM4 欠損マウスの腸組織を用いて、ROS レベルの増加が引き起こされているのかどうか調べた。腸の新鮮凍結切片を用いて ROS の指示薬である DHE で染色を行ったところ、CNNM4 欠損マウスの腸上皮細胞で ROS レベルの増加が明らかになった。さらに、酸化ストレスマーカーでの染色でも陽性細胞が増加していたことから ROS レベルの増加が示唆された。これらの結果は、培養細胞で明らかになった Mg^{2+} 過剰蓄積による ROS レベルの上昇がマウス個体内でも同じように引き起こされていることを示している。この組織で細胞増殖マーカーの発現を調べたところ、CNNM4 欠損マウスでは陽性細胞の割合が増加しており、細胞増殖が異常に増加していることが示唆された。この異常な細胞増殖は腫瘍形成モデルでのがん悪性化に寄与している可能性があり、細胞内の Mg^{2+} 蓄積によるがん悪性化への ROS の関与を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Funato Yosuke, Yoshida Atsushi, Hirata Yusuke, Hashizume Osamu, Yamazaki Daisuke, Miki Hiroaki	4. 巻 55
2. 論文標題 The Oncogenic PRL Protein Causes Acid Addiction of Cells by Stimulating Lysosomal Exocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 387 ~ 397.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2020.08.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Daisuke, Hashizume Osamu, Taniguchi Shiho, Funato Yosuke, Miki Hiroaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Role of adenomatous polyposis coli in proliferation and differentiation of colon epithelial cells in organoid culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83590-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hashizume O, Funato Y, Yamazaki D, Miki H.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Excessive Mg 2+ Impairs Intestinal Homeostasis by Enhanced Production of Adenosine Triphosphate and Reactive Oxygen Species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidant & Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ars.2019.7951	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Funato Yosuke, Hashizume Osamu, Miki Hiroaki	4. 巻 114
2. 論文標題 Phosphatase independent role of phosphatase of regenerating liver in cancer progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 25 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15625	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋爪脩、川邊智史、船戸洋佑、三木裕明
2. 発表標題 CNNM変異により線虫のボディサイズが縮小する仕組みの解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋爪脩
2. 発表標題 細胞内でのマグネシウム蓄積が引き起こす過剰なROSとATP産生
3. 学会等名 ミトコンドリアサイエンスワークショップ2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野 http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/cellreg/index.html 京都大学 工学研究科 合成・生物化学専攻 生体認識化学分野 http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/miki-lab/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------