

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430113

研究課題名(和文)大腸がんにおけるマグネシウム恒常性制御の役割の解明

研究課題名(英文)Clarification of the role of magnesium homeostasis in colorectal cancer

研究代表者

山崎 大輔 (Yamazaki, Daisuke)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：50422415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Mg²⁺輸送体CNNM4はMg²⁺を細胞の内側から外側へと排出することで細胞内Mg²⁺の恒常性を維持しており、Cnnm4遺伝子を欠損した細胞では細胞内のMg²⁺量が増加する。マウスモデルを用いた解析から、Cnnm4遺伝子の欠損が大腸での発がんや腸管に形成される腫瘍の悪性化を促進することが明らかとなり、CNNM4は細胞内Mg²⁺量の恒常性を維持することで腸での発がんやがんの悪性化を抑制していることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：The Mg²⁺ transporter CNNM4 maintains cellular magnesium homeostasis through its Mg²⁺ extrusion activity, and intracellular Mg²⁺ levels are significantly increased in Cnnm4-deficient cells. An analysis using mouse models of colorectal cancers shows that depletion of Cnnm4 promotes tumorigenesis and tumor progression in intestinal tissues. These results suggest that CNNM4 suppresses intestinal tumor development through regulation of the level of intracellular magnesium.

研究分野：疾患生物学

キーワード：大腸がん マグネシウム カルシウムチャネル 腸管上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

PRL-3 は転移性の大腸がんで発現の亢進が報告されている。われわれの研究グループでは、B16メラノーママウス肺転移モデルを用いた実験から、PRL-3の高発現が転移を促進することを明らかにしており、PRL-3は単に転移がんが高発現しているだけではなく、積極的にがんの悪性を促進していると考えられる。われわれはPRL-3によるがん転移促進の分子メカニズムを明らかにするため、PRL-3に結合する分子としてMagEX/CNNM4(以下、CNNM4)を同定し、その機能を解析している。

CNNM4は細胞膜に局在し、細胞の内側から外側へと Mg^{2+} を排出する活性をもつ Mg^{2+} 輸送体である。CNNM4は腸管上皮に強く発現しており、腸管上皮細胞の基底側方膜に局在する。腸管においては、管腔に面する頂端側から腸管上皮細胞内へと取り込まれた Mg^{2+} が、基底側方膜から体腔側へと排出されることで、 Mg^{2+} が腸管上皮を介して体内へと取り込まれる。*Cnnm4*遺伝子欠損マウスでは腸からの Mg^{2+} の吸収が減少し、体内 Mg^{2+} 濃度が低下することから、CNNM4は腸管上皮を介した方向性のある Mg^{2+} の輸送を担う分子であることが明らかになった。

PRL-3はCNNM4に結合することで、その Mg^{2+} 排出活性を阻害する。われわれは、CNNM4と結合することができないPRL-3変異体が、B16メラノーマ細胞の転移を促進することができないことを見つけており、PRL-3が腸管上皮におけるCNNM4依存的な Mg^{2+} 量調節を阻害することでがん転移を促進している可能性が考えられた。しかしながら、CNNM4の機能阻害が腸管上皮細胞の振る舞いにどのような影響を与えるのか、またそのことが大腸がんの悪性化につながっているのか、は不明であった。

2. 研究の目的

(1)PRL-3が大腸がんの転移を促進する分子メカニズムを理解することを目的としてその結合分子CNNM4に注目し、マウスモデルを用いてCNNM4の機能欠損が腸管上皮で形成される腫瘍の悪性化につながるのかを明らかにする。

(2)細胞内の Mg^{2+} 量は細胞外からの流入と細胞外への排出のバランスにより厳密に制御されている。 Mg^{2+} は多くの生化学反応に必須の役割を果たしているものの、細胞内 Mg^{2+} 量の調節がどのような細胞機能と結びついていのかは不明である。細胞外への Mg^{2+} 排出を担うCNNM4が、腸管上皮細胞においてどのような細胞機能につながっているのか、またそれがどのような分子メカニズムで行われるのかを同定することで、細胞内 Mg^{2+} 量を調節することがもつ生物学的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Apcl Cnnm4* 複合変異マウスの解析

家族性大腸腺腫症のモデルマウスである*Apc*遺伝子変異マウスと*Cnnm4*遺伝子欠損マウスの交配により*Apcl Cnnm4*遺伝子複合変異マウスを作成した。7ヶ月齢となった時点で、それらのマウスより腸管組織を回収し、形成された腫瘍の数および大きさを計測した。

また、回収した小腸のスライス標本を薄切した後、H&E染色およびマーカー分子の免疫染色を行った。顕微鏡下で観察を行い、筋層への浸潤の有無を調べることで腫瘍の悪性を評価し、*Cnnm4*遺伝子の欠損が悪性化につながるのかを調べた。

(2) 大腸での発がん

発がんを誘発するアゾキシメタン(AOM)を2ヶ月齢の*Cnnm4*遺伝子欠損マウスに腹腔投与した後、大腸で炎症を引き起こすデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を自由飲水にて投与した。AOM投与後100日目にマウスから大腸を回収し、形成された腫瘍の数および大きさを計測した。また前項目の小腸の場合と同様に、回収した大腸の薄切切片を作製し、腫瘍の悪性を検討した。

(3) CNNM4による Ca^{2+} 流入の制御

*Cnnm4*遺伝子欠損マウスのオスと野生型マウスのメスを交配させ、産仔数を検討することで*Cnnm4*遺伝子欠損マウスのオスがもつ生殖能力を評価した。また*Cnnm4*遺伝子欠損マウスの精巣上体より精子を回収し、その数、形態、運動能力を計測した。また体外受精を行うことで、精子がもつ受精能を調べた。

精子が受精能を獲得するのに必要な、細胞内への Ca^{2+} 流入の過程を調べるために、蛍光 Ca^{2+} 指示薬Fluo-4を用いたイメージングを行った。精巣上体尾部より回収したマウス精子をFluo-4で標識し、予めラミニンでコートしたガラス底培養皿に貼り付けた。それら精子に対してウシ血清アルブミンを添加することで起こる一過的な細胞内への Ca^{2+} の流入を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(4) 腸管上皮細胞を用いた解析

腸管上皮細胞におけるCNNM4の役割を明らかにするため、*Cnnm4*遺伝子欠損マウスの大腸より回収した腸管上皮細胞のオルガノイド培養を行った。マウス大腸をEDTAで処理した後、激しくピペティングすることで、腸組織より腸管上皮幹細胞を含むクリプト構造を単離した。それらクリプトをマトリゲルで包埋し、Wnt3aなどのニッチ因子を含む培地中で三次元培養することで、腸管上皮オルガノイドを得た。同一のオルガノイドを培養開始時より定期的に観察することで、オルガノイドの成長速度および形態の変化を検討した。

また腸管上皮の増殖に関わるTRPV1チャネルの機能を調べるため、オルガノイドを蛍光

Ca²⁺指示薬 Fura-2 で標識し、TRPV1 アゴニストのカプサイシンで刺激したときの細胞内 Ca²⁺濃度の変化を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

4. 研究成果

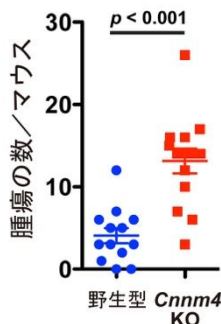
(1) CNNM4 は腫瘍の悪性を妨げている。

家族性大腸腺腫症モデルマウスである *Apc* 遺伝子変異マウスでは、主として小腸にポリープが多数形成される。そこで *Cnnm4* 遺伝子欠損マウスとの交配により作出した *Apc/Cnnm4* 遺伝子複合変異マウスにおいて小腸に形成される腫瘍の数や大きさ、筋層への浸潤の有無を調べた。*Apc/Cnnm4* 遺伝子複合変異マウスでは、*Apc* 遺伝子変異マウスと比較して腫瘍の数や大きさに顕著な違いはなかった。しかし、筋層に浸潤する腫瘍の割合が顕著に増加しており、CNNM4 が腫瘍の悪性を抑制していることがわかった。

また *Apc/Cnnm4* 遺伝子複合変異マウスに形成される腫瘍に含まれるマグネシウムの量を測定したところ、*Apc* 遺伝子変異マウスの腫瘍と比較して増加していた。CNNM4 は腸管上皮細胞において Mg²⁺の細胞外への排出を担っていることから、腸管上皮由来のがん細胞において *Cnnm4* 遺伝子の欠損により細胞内 Mg²⁺量が上昇したことが、がんの悪性化につながった可能性がある。

(2) CNNM4 は大腸での発がんを妨げている。*Apc* 遺伝子変異マウスを用いた上述の研究では小腸に形成された腫瘍を解析したが、ヒトでは小腸での腫瘍形成はまれである。CNNM4 は大腸でより強く発現することから、マウス大腸に腫瘍が形成される AOM/DSS モデルを用いて、大腸での発がんに対する *Cnnm4* 遺伝子欠損の影響を調べた。AOM/DSS 処理を行った *Cnnm4* 遺伝子欠損マウスでは、大腸に形成される腫瘍の数が野生型マウスの3倍に増加しており、CNNM4 が大腸での発がんを抑制していることがわかった(図1)。また *Apc/Cnnm4* 複合変異マウスの小腸で見られたのと同様に、より多くの腫瘍で上皮組織外への浸潤が認められた。

図1 AOM/DSSモデルを用いた大腸での発がん

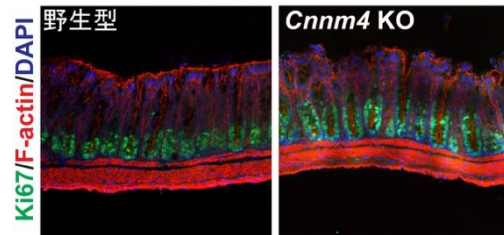


CNNM4 が大腸での発がんを抑制していたことから、*Cnnm4* 遺伝子の欠損が腸管上皮細胞に与える影響を検討した。大腸腸管上皮ではクリプト

構造の底部に存在する腸管上皮幹細胞および前駆細胞のみが増殖しており、それらの細胞から腸管上皮を構成する全ての分化細胞が生み出される。大腸腸管上皮における細胞

の増殖を検討するため、細胞増殖マーカー Ki67 の発現を免疫染色で調べたところ、*Cnnm4* 遺伝子欠損マウスでは、Ki67 陽性の細胞の数が野生型マウスの二倍に増加しており、腸管上皮細胞が過剰に増殖していることがわかった(図2)。しかしその一方で、*Cnnm4* 遺伝子欠損マウスでは ChromograninA 陽性の腸管内分泌細胞や PAS 染色陽性の杯細胞の数が減少していた。このように、*Cnnm4* 遺伝子欠損マウスでは増殖能をもつ細胞の数が増える一方で、分化した細胞の数が減少してい

図2 大腸腸管上皮における細胞の増殖



ことがわかった。

腸管上皮細胞における CNNM4 の役割を明らかにするため、*Cnnm4* 遺伝子欠損マウスの大腸よりクリプトを単離し、腸管上皮細胞のオルガノイド培養を行った。腸管上皮オルガノイドでは、腸管上皮組織と同様に幹細胞や前駆細胞が増殖することで、そのサイズが大きくなる。*Cnnm4* 遺伝子欠損マウス由来のクリプトから得られた大腸オルガノイドは、野生型マウスのそれと比較してより早く成長したことから、*Cnnm4* 遺伝子の欠損により腸管上皮細胞の増殖が亢進することが *in vitro* の実験系でも確認された。またクリプトをトリプシン処理にて単一の細胞に分離し、オルガノイド培養を行ったところ、*Cnnm4* 遺伝子欠損マウス由来のクリプトからは、コントロールと比較してより多くのオルガノイドが形成された。以上の結果から、*Cnnm4* 遺伝子欠損マウスの大腸腸管上皮では、オルガノイドを形成する能力をもつ増殖性の幹細胞がより多く含まれていると考えられる。

CNNM4 は細胞の内側から外側へと Mg²⁺を排出する分子であり、*Cnnm4* 遺伝子欠損マウスより回収した大腸腸管上皮細胞の細胞内 Mg²⁺濃度を測定したところ、野生型マウスの細胞と比較して上昇していた。したがって細胞内 Mg²⁺量の調節が腸管上皮細胞の増殖や幹細胞性に影響を与えている可能性が考えられた。

(3) CNNM4 は精子において細胞内への Ca²⁺流入に必要である。

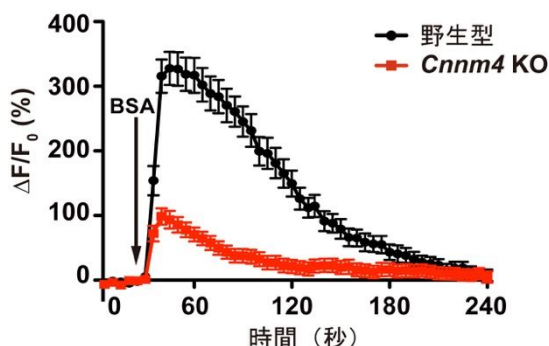
細胞内 Mg²⁺量を調節することの意義には未だ不明な点が多いが、*Cnnm4* 遺伝子欠損マウス精子の解析を進める過程で、腸管上皮細胞における CNNM4 の役割を考えるうえで重要な結果が得られた。

Cnnm4 遺伝子欠損マウスの雄を野生型の雌マウスと交配させたところ、ほとんど仔が生まれなかった。そこで *Cnnm4* 遺伝子欠損マウ

スの精子を用いて体外授精を行ったところ、全く受精が起こらなかった。*Cnnm4* 遺伝子欠損マウスでは精子の数や形態に大きな違いはなかったが、受精能獲得と呼ばれる精子の成熟課程において鞭毛運動の質的な変化(超活性化)が起こらないことがわかった。*Cnnm4* 遺伝子欠損マウスでは超活性化が起こらないために、卵を覆う透明帯を通過できずに雄性不妊となると考えられる。

超活性化には精子特異的に発現する Ca^{2+} チャネル CatSper を介した精子内への Ca^{2+} の流入が必要である。蛍光 Ca^{2+} プロブを用いたイメージングを行ったところ、*Cnnm4* 遺伝子欠損マウスの精子では BSA の添加により惹起される CatSper を介した細胞内への Ca^{2+} 流入が抑制されていた(図3)。*Cnnm4* 遺伝子欠損マウスの精子では、細胞内 Mg 量がコントロールと比較して増加していたが、 Mg^{2+} を除去した培地中でインキュベートすると超活性化が部分的に回復した。以上の結果から CNNM4 により細胞内 Mg^{2+} 濃度が一定に保たれることが、CatSper による Ca^{2+} の流入およびその下流で起こる超活性化に必要であると考えられる。

図3 精子頭部における Ca^{2+} 濃度の変化



(4) CNNM4 は腸管上皮細胞において細胞内への Ca^{2+} 流入に必要である。

腸管上皮細胞の増殖は、 Ca^{2+} チャネルとして働く TRPV1 により負に制御されており、*Trpv1* 遺伝子欠損マウスの大腸腸管上皮では、細胞の過剰な増殖が認められ、また腸管での発がんが亢進することが報告されている。これらの表現型が *Cnnm4* 遺伝子欠損マウスのそれと酷似していることから、CNNM4 が TRPV1 による Ca^{2+} の流入に及ぼす影響を調べた。腸管上皮オルガノイドを TRPV1 アゴニストのカプサイシンで刺激すると、TRPV1 依存的に細胞内に Ca^{2+} が流入することが知られていたため、蛍光プロブを用いた Ca^{2+} イメージングにより TRPV1 のチャネル活性を調べた。野生型マウス由来の大腸オルガノイドでは、カプサイシンの添加により一過的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がみられたが、*Cnnm4* 遺伝子欠損マウス由来のオルガノイドでは、 Ca^{2+} 流入が抑制されており、CNNM4 が TRPV1 を介した Ca^{2+} 流入に必要であることがわかった。

したがって、CNNM4 は精子の場合と同様に

腸管上皮細胞においても細胞内への Ca^{2+} 流入を制御しており、そのことを介して腸管上皮細胞においては過剰な細胞の増殖を妨げている可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Funato Y, Yamazaki D, Miki H, Renal function of cyclin M2 Mg^{2+} transporter maintains blood pressure, Journal of Hypertension, 査読有, 35 巻, 2017 年, 585-592, DOI:10.1097/HJH.0000000000001211

Ishii T, Funato Y, Hashizume O, Hirata Y, Yamazaki D, Nishiwaki K, Kono N, Arai H, Miki H, Mg^{2+} extrusion from intestinal epithelia by CNNM proteins is essential for oogenesis via AMPK-TORC1 signaling in *Caenorhabditis elegans*, PLoS Genetics, 査読有, 12 巻, 2016 年, e1006276, DOI:10.1371/journal.pgen.1006276

Yamazaki D, Miyata H, Funato Y, Fujihara Y, Ikawa M, Miki H, Complementary role of CNNM2 in sperm motility and Ca^{2+} influx during capacitation, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, 474 巻, 2016 年, 441-446, DOI:10.1016/j.bbrc.2016.05.001

Yamazaki D, Miyata H, Funato Y, Fujihara Y, Ikawa M, Miki H, The Mg^{2+} transporter CNNM4 regulates sperm Ca^{2+} homeostasis and it is essential for reproduction, Journal of Cell Science, 査読有, 巻, 2016 年, 1940-1949, DOI:10.1242/jcs.182220

Funato Y, Yamazaki D, Mizukami S, Du L, Kikuchi K, Miki H, Membrane protein CNNM4-dependent Mg^{2+} efflux suppresses tumor progression, The Journal of Clinical Investigation, 査読有, 124 巻, 2014 年, 5398-5410, DOI:10.1172/JCI76614

〔学会発表〕(計 3 件)

山崎大輔、長谷川綾郁、船戸洋佑、三木裕明、 Mg^{2+} トランスポーター CNNM4 は大腸での発がんを抑制する, ConBio2017, 2017 年, 神戸ポートアイランド

山崎大輔、宮田治彦、船戸洋佑、藤原祥高、伊川正人、三木裕明、受精能獲得には CNNMs による細胞内 Mg^{2+} 濃度の調節が重要である, 日本分子生物学会年会, 2016 年, パシフィック横浜

Yamazaki D, Miyata H, Funato Y, Fujihara Y, Ikawa M, Miki H, Role of CNNM4 in Ca^{2+} influx through CatSper channel during sperm capacitation, BMB2015, 2015 年, 神戸ポートアイランド

〔図書〕(計 1 件)

山崎大輔、三木裕明、羊土社、レドックス疾患学, 2018 年, 183-188

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山崎 大輔 (YAMAZAKI, Daisuke)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号：50422415