

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19034

研究課題名（和文）マグネシウム再吸収による血圧調節のメカニズム

研究課題名（英文）The mechanism of blood pressure regulation associated with magnesium reabsorption

研究代表者

橋爪 脩 (Hashizume, Osamu)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員（常勤）

研究者番号：50755692

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：マグネシウムと血圧調節の関係は示唆されているものの、そのメカニズムは明らかになっていない。本研究では腎臓特異的なTRPM6ノックアウトマウスの解析から、腎臓の遠位尿細管でのマグネシウム再吸収に共役した血圧調節機能の存在を明らかにした。また、培養細胞での解析からTRPM6の発現量は細胞内のマグネシウムレベルにより調節されていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血圧調節においてナトリウムやカリウムの重要性は広く知られているところであるが、生体内に豊富に存在し様々な生命活動に必要なマグネシウムとの関わりには、疫学的調査に基づくマグネシウムの摂取量と血圧の間での負の相関関係の示唆に留まり、そのメカニズムはよくわかっていなかった。本研究により腎臓遠位尿細管でのマグネシウム再吸収に共役した血圧調節機構の存在が明らかになったことは、高血圧発症メカニズムの全貌を理解する上で重要な発見であるといえ、新たな治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Although the relationship between magnesium and blood pressure homeostasis has been suggested, the mechanism is not clear. In this study, analysis of kidney-specific TRPM6 knockout mice revealed the existence of a blood pressure regulation mechanism coupled to magnesium reabsorption in the renal distal tubule. In addition, analysis in cultured cells revealed that the expression level of TRPM6 was regulated by intracellular magnesium level.

研究分野：細胞生物学

キーワード：マグネシウム 腎臓 血圧 レニン CNNM2 TRPM6

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マグネシウムは生体に必須の元素である。細胞レベルでは様々な酵素反応に必要であり、個体レベルでは欠乏すればいれんや不整脈、過剰に蓄積すれば徐脈や低血圧を引き起こすため、生体内のマグネシウム量は厳密に制御されている必要がある。生体内のマグネシウムレベルは、腸での吸収や腎臓での再吸収により主に調節されており、どちらの臓器でも体の外から内への上皮細胞を通過する Mg^{2+} 輸送が重要である。上皮細胞の頂端膜に存在する陽イオン透過性チャネルである transient receptor potential-melastatin subfamily (TRPM)6 や TRPM7 が上皮細胞への Mg^{2+} 取り込みに重要であることがわかっており、実際に遺伝子改変マウスでは血液中のマグネシウム濃度が低下することが報告されている。マグネシウム吸収で上皮細胞内へ取り込まれたマグネシウムは側基底膜側から体内へ排出される必要があり、所属研究室ではこの Mg^{2+} 排出を行うトランスポーターが cyclin M (CNNM) であることを明らかにしている。腸では CNNM4、腎臓の遠位尿細管では CNNM2 が上皮細胞での Mg^{2+} 排出に重要であることをそれぞれの遺伝子のノックアウトマウスを作製、解析することで明らかにしている。

これまでに疫学的な調査からマグネシウムの摂取量と血圧の間には負の相関関係があることが示唆されている。ナトリウムやカリウムによる血圧調節メカニズムは広く受け入れられているが、マグネシウムによる血圧調節のメカニズムはよくわかっていない。また、ゲノムワイド関連解析から CNNM2 が高血圧と高い関わりがあることが示唆されている。所属研究室で作製された CNNM2 のヘテロノックアウトマウスや CNNM4 のノックアウトマウスではどちらも血中マグネシウム量の低下が確認されており、CNNM2 のヘテロノックアウトマウスで顕著な血圧低下が確認された。さらに腎臓特異的な CNNM2 ノックアウトマウスを作製し血圧を測定した場合でも同様に顕著な血圧低下が観察されたことから、CNNM2 が血圧調節に関与していることがわかってきている。一方で CNNM4 ノックアウトマウスでは逆に血圧が上昇していることがわかった。いずれのマウスにおいても血液中のマグネシウム量は野生型と比較して同程度に低下しており、これらの結果から血中のマグネシウム量よりもむしろ腎臓でのマグネシウム再吸収に共益した血圧調節機構が存在する可能性が示唆された。

そこで CNNM2 ノックアウトマウスの腎臓で遺伝子発現をマイクロアレイにより網羅的に解析したところ、興味深いことに CNNM2 と同じく遠位尿細管に強く発現しマグネシウム再吸収に関わる Mg^{2+} 透過性チャネル TRPM6 の遺伝子発現レベルが低下していることがわかった。

2. 研究の目的

血圧調節へのマグネシウムの関与は示唆されているものの、マグネシウムがどのように血圧調節に関わっているのか、そのメカニズムは解明されていない。本研究ではこれまでの研究結果により示唆された腎臓でのマグネシウム再吸収に共役した血圧調節機能の存在とそのメカニズムを解明するために、培養細胞を用いた解析や新たに TRPM6 ノックアウトマウスを作製、解析することで TRPM6 の関与を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

CNNM2 ノックアウトマウスでの TRPM6 の mRNA レベルの低下がどのように引き起こされているのか調べるために、腎臓遠位尿細管由来 MDCT 細胞を用いて CNNM ファミリー遺伝子のノックダウンを行い TRPM6 の発現変化を調べた。同時に Mg^{2+} レベルの変化の影響を調べるために細胞内 Mg^{2+} レベルの測定や培養環境中の Mg^{2+} 量を変化させた際の TRPM6 発現への影響を調べた。腎臓で TRPM6 がどのように血圧調節に関わっているか個体レベルで調べるために、腎臓特異的なプロモーター下で Cre を発現させた腎臓特異的 TRPM6 ノックアウトマウスを作出し、マグネシウム恒常性の変化や血圧測定を行った。

4. 研究成果

(1) CNNM2 欠損による TRPM6 発現低下

CNNM2 を欠損したマウス腎臓のマイクロアレイ解析から TRPM6 の発現低下がわかった。この結果の再現性を確認するために、CNNM2 ヘテロノックアウトマウスおよび腎臓特異的な CNNM2 ノックアウトマウスの腎臓での TRPM6 の mRNA レベルを qRT-PCR 法により測定した。その結果、どちらのマウスの腎臓においても有意な TRPM6 の mRNA レベルの低下が確認された。双方のマウスとも顕著に血圧が低下することから TRPM6 の発現低下の血圧への関与が示唆された。そこで腎臓特異的 CNNM2 ノックアウトマウスを用いて腎臓での TRPM6 のタンパク質レベルの確認も行った。ウェスタンブロット解析から TRPM6 のタンパク質発現量の有意な低下が確認された。さらに、腎臓の組織切片での免疫染色解析でも TRPM6 のシグナルが顕著に低下していることがわかった。これらから CNNM2 の TRPM6 発現への寄与が明らかになった。

(2) マグネシウムレベルに依存した TRPM6 の発現制御

CNNM2 ノックアウトマウスでの TRPM6 発現低下が何によって引き起こされているのか調べるために、腎臓遠位尿細管由来細胞株 MDCT を用いた解析を行った。前述したように CNNM は細胞内の

Mg²⁺を排出するトランスポーターであるため、*TRPM6* 発現への細胞内の Mg²⁺レベルの変化の関与を調べた。MDCT 細胞に対し腎臓で強く発現している *CNNM2* のノックダウンを行い細胞内の Mg²⁺レベルを調べたところ、コントロール siRNA を導入した細胞と比べて有意な Mg²⁺レベルの上昇が確認できた。この *CNNM2* ノックダウンした MDCT 細胞での *TRPM6* の mRNA レベルを qRT-PCR 法で測定したところ有意に低下していたことから、*CNNM2* ノックアウトマウスでの状況が MDCT 細胞でも再現できたと考えられる。さらに *CNNM2* に加えて *CNNM4* もノックダウンしたところ細胞内 Mg²⁺レベルはより上昇し、*TRPM6* の mRNA レベルは *CNNM2* 単独でのノックダウンより低下したことから、*TRPM6* の mRNA 発現量は細胞内の Mg²⁺レベルと負の相関関係を示すことが示唆された。この相関関係をより明確にするために培地中の Mg²⁺量を段階的に減少させると、*TRPM6* の mRNA レベルは細胞外液中の Mg²⁺減少に応じて増加することが確認された。この結果から *TRPM6* は細胞内の Mg²⁺レベルの増減に応じて発現量が制御されていることがわかった。*CNNM2* および *CNNM4* ノックアウトマウスでは両者ともに血液中のマグネシウムレベルは低下しているのにも関わらず、*CNNM2* ノックアウトマウスでは血圧が低下しており、*CNNM4* ノックアウトマウスでは逆に血圧が上昇していたのも、腎臓遠位尿細管の上皮細胞内での Mg²⁺レベルの影響と考えることができる。つまり *CNNM4* ノックアウトマウスでは腸でのマグネシウム吸収低下による血液中のマグネシウム量の低下に応じて腎臓遠位尿細管の細胞内の Mg²⁺レベルも低下していると考えられる。一方で *CNNM2* のノックアウトマウスでは腎臓遠位尿細管の細胞内から体内への Mg²⁺排出が低下した結果、遠位尿細管の細胞内で Mg²⁺が蓄積していると考えられる。このため、遠位尿細管の細胞内の Mg²⁺レベルは *CNNM2* と *CNNM4* のノックアウトマウスで真逆に変化しており、その結果として *TRPM6* の発現量も *CNNM2* ノックアウトマウスでは減少、*CNNM4* ノックアウトマウスでは増加した結果、それぞれ血圧の低下、上昇を示したと考えられる。

(3) *TRPM6* 腎臓特異的ノックアウトマウスでの血圧低下

TRPM6 発現低下と血圧との関係を調べるために *TRPM6* のノックアウトマウスの作製を行った。全身で *TRPM6* のヘテロ欠損マウス同士の交配からはホモ欠損マウスは得られず、すでに報告のある通り胚性致死になることが確認された。そこで腎臓特異的に *TRPM6* をノックアウトするために *Trpm6*^{f/f}; *Six2-Cre* マウスを作製した。このマウスではコントロールである *Trpm6*^{f/+}; *Six2-Cre* マウスと比べて産子数に有意な違いはなく、また血液中のマグネシウムレベルを ICP-MS で調べたところ有意に減少していることが確認できた。そこでテレメトリー法による血圧測定を行ったところ有意な血圧低下が明らかになった。この結果から腎臓の遠位尿細管におけるマグネシウム再吸収に共役した血圧調節機構が存在することが明らかになった。

(4) *TRPM6* ノックアウトによる日周性の血圧変化への影響

通常マウスは飼育環境の明暗周期（昼夜）に合わせて血圧が変動することが知られている。ところが興味深いことに腎臓特異的な *TRPM6* ノックアウトマウスでは野生型マウスでは血圧が上昇する夜間（活動期）でも血圧の上昇がほとんど起きていないことがわかった。この血圧の日周性変動の低下がどのように起きているのか、研究期間を延長し調べた。夜間はマウスにとっては活動期であるため、まずマウスの活動量を調べたが腎臓特異的 *TRPM6* ノックアウトマウスとコントロールマウスの間で有意な違いは認められなかった。摂食量や飲水量でも有意な違いはなく血圧の日周性変化の低下は活動量の減少によるものではないと考えられた。そこで活動期の血圧上昇に重要な役割を果たしていることが知られるレニンに着目した。明期と暗期でそれぞれ血液を回収し血中へのレニンの分泌量を調べたところ、コントロールマウスでは暗期で増加してくるレニン量が腎臓特異的 *TRPM6* ノックアウトマウスでは上昇していないことがわかった。レニン阻害剤であるアリスキレン投与を行うと、腎臓特異的 *TRPM6* ノックアウトマウスと同じように活動期である夜間の血圧上昇が低下していた。腎臓でのレニン分泌を刺激する交感神経の除神経術を行ったマウスでも同じように活動期での血圧上昇が低下していた。これらの実験結果から *TRPM6* ノックアウトによる日周性の血圧変化もレニン分泌を介したものである可能性が示唆された。

(5) 結論

本研究により *CNNM2* の欠損が *TRPM6* の発現低下を引き起こすことが明らかになった。さらに、培養細胞を用いた実験から細胞内の Mg²⁺の過剰蓄積が *TRPM6* の発現低下の原因であることがわかった。これまでにマグネシウムの摂取量と *TRPM6* の発現量の間には負の相関関係があることは知られていたが、今回の解析により *TRPM6* の発現変化には細胞内の Mg²⁺レベルが重要であることが明らかになった。*TRPM6* や *CNNM2* のノックアウトマウスの解析から腎臓でのマグネシウム再吸収に共役した血圧調節機構の存在を明らかにすることができた。高血圧は患者数が多く、古くから研究されている症状であるものの発症メカニズムが不明な患者や、血圧のコントロールができていない患者が一定割合いると言われている。このような状況に対して本研究の成果が高血圧発症のメカニズムの理解を深める上で重要な知見となりうると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hashizume Osamu, Funato Yosuke, Yamazaki Daisuke, Miki Hiroaki	4. 巻 33
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 Antioxidants & Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 20 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: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 Tani Haruna, Ohnishi Sakiko, Shitara Hiroshi, Mito Takayuki, Yamaguchi Midori, Yonekawa Hiromichi, Hashizume Osamu, Ishikawa Kaori, Nakada Kazuto, Hayashi Jun-Ichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Mice deficient in the Shmt2 gene have mitochondrial respiration defects and are embryonic lethal.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI:10.1038/s41598-017-18828-3	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 Hayashi JI, Hashizume O, Ishikawa K, Shimizu A.	4. 巻 38
2. 論文標題 Mutations in mitochondrial DNA regulate mitochondrial diseases and metastasis but do not regulate aging.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Current Opinion in Genetics & Development	6. 最初と最後の頁 63-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI:10.1016/j.gde.2016.03.004	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 Ishii T, Funato Y, Hashizume O, Yamazaki D, Hirata Y, Nishiwaki K, Kono N, Arai H, Miki H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Mg ²⁺ Extrusion from Intestinal Epithelia by CNNM Proteins Is Essential for Gonadogenesis via AMPK-TORC1 Signaling in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLoS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1006276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI:10.1371/journal.pgen.1006276	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 Suzuki T et al. (Hashizume Oは41名中4番目の著者)	4. 巻 27
2. 論文標題 Mitochondrial Acid 5 Binds Mitochondria and Ameliorates Renal Tubular and Cardiac Myocyte Damage.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY	6. 最初と最後の頁 1925-1932
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI:10.1681/ASN.2015060623.	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

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
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋爪脩、船戸洋佑、三木裕明
2. 発表標題 過剰なマグネシウムが引き起こすミトコンドリアでのATPとROSの過剰産生
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋爪脩、船戸洋佑、三木裕明
2. 発表標題 過剰なマグネシウムが引き起こすミトコンドリアでの活性酸素種とATPの過剰産生
3. 学会等名 第18回 日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Osamu Hashizume, Yosuke Funato, Hiroaki Miki
2. 発表標題 Overproduction of ATP and Reactive Oxygen Species in Mitochondria by Excessive Magnesium
3. 学会等名 The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋爪脩、船戸洋佑、三木裕明
2. 発表標題 細胞内Mg ²⁺ の過剰蓄積が活性酸素種 (ROS) レベル上昇と線虫の寿命短縮を引き起こす
3. 学会等名 新学術領域 酸素生物学・ダイニングコード合同若手会議 (2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋爪脩、船戸洋佑、三木裕明
2. 発表標題 CNNM変異体のMg ²⁺ 恒常性破綻が引き起こす各種異常とそのメカニズム
3. 学会等名 関西地区線虫勉強会 (2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋爪脩、船戸洋佑、三木裕明
2. 発表標題 Mg ²⁺ トランスポーターCNNMは線虫でROSレベルと寿命を調節する
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017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>

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
--	---------------------------	-----------------------	----