

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09112

研究課題名(和文) 膠芽腫におけるTRPチャネル活性化機構の解明と新規治療薬の開拓

研究課題名(英文) Mechanisms of TRP channel activation and its downstream signaling as potential therapeutic targets in glioblastoma

研究代表者

井上 華 (Inoue, Hana)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：20390700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫の細胞増殖や遊走を促進するTRPM7の活性は、細胞内Mgによって制御されている。本研究ではTRPM7の細胞内Mg感受性が、TRPM7分子内の2つのドメインの相互作用によって調節されていることを新規に見出した。膠芽腫においてはこの相互作用に異常が生じていると考え、2つのドメインの間に存在するリン酸化候補アミノ酸の変異体を作製し、Serine1107変異でMg感受性が変化していることが明らかとなった。またTRPM7活性化の下流シグナルをRNAseqにより解析し、脂質代謝関連遺伝子群が増加していることを新規に見出した。これらの遺伝子発現変化を介し膠芽腫の増殖・遊走が促進されていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：TRPM7はイオンチャネルとキナーゼ活性を併せ持つ、非常にユニークなイオンチャネルであるが、現在までのところこの二つの機能ドメインが一つの分子内に存在する生理学的意義は不明である。本研究はその一つの解としてキナーゼドメインがイオンチャネルの細胞内Mg感受性を調節していることを明らかにした。この調節にはキナーゼ活性は必要ではなく、構造的相互作用を介していた。

社会的意義：TRPM7が、増殖・遊走・浸潤を促進することが知られる悪性腫瘍細胞は膠芽腫にとどまらない。すなわち本研究で明らかとなった活性調節メカニズムは、膠芽腫のみならず、他の悪性腫瘍細胞でも同様と考えられる。

研究成果の概要(英文)：TRPM7 channel activity, which promotes cell proliferation and migration in glioblastoma, is regulated by intracellular Mg. In this study, we newly found that the intracellular Mg sensitivity of TRPM7 is regulated by the interaction between two domains; TRPM7 channel domain and the kinase domain. We hypothesized that dysregulation of this interaction promote proliferation and migration in glioblastoma. We generated mutants of candidate phosphorylated amino acids existing between the two domains, and found that the Serine1107 mutation altered Mg sensitivity. We also analyzed the downstream signals of TRPM7 activation by RNAseq and found that genes related to lipid metabolism were upregulated. These findings suggest that glioblastoma proliferation and migration are promoted via these upregulation.

研究分野：生理学

キーワード：TRPM7 膠芽腫 マグネシウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は、最も悪性度の高い原発性脳腫瘍である。手術による摘出後、放射線治療と DNA アルキル化薬を用いた化学療法の併用が標準的な治療となっているが、増殖能や浸潤能が極めて高いため、5 年生存率はわずか 10% である (脳腫瘍診療ガイドライン 2019 版、成人脳腫瘍編改訂 2 版)。Transient receptor potential (TRP) チャネルの一つである TRPM7 は、腫瘍細胞の増殖・遊走を促進することが知られ、治療ターゲットとして注目されている (Guilbert et al., *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009; Yee Pharmaceuticals, 2017)。TRPM7 チャネルは細胞内 Mg^{2+} によって抑制されており、 Mg^{2+} 濃度が低下すると脱抑制して Mg^{2+} を流入させる。本研究では膠芽腫をはじめとする腫瘍細胞では、この調節機構が破綻していると考えられた。

2. 研究の目的

これまで膠芽腫において TRPM7 が増殖・遊走を促進することが示されてきたが、その TRPM7 活性化機構については不明である。本研究では、電気生理学的手法を用いて TRPM7 チャネル活性を測定することにより、腫瘍細胞の TRPM7 の活性調節機構を解明する。膠芽腫における TRPM7 の活性化機構が解明できれば、活性化機構に焦点を当てた腫瘍特異的 TRPM7 作用薬開拓の学術基盤が形成されると考えらる。

3. 研究の方法

(1) ヒト TRPM7 変異体細胞株の樹立

変異導入部位として、イオンチャネルドメインとキナーゼドメインの間に存在するリン酸化標的候補アミノ酸 (serine1107, serine1269, threonine1482) を選定した。野生型 human TRPM7 (hTRPM7, Kazusa Genome Technologies) を発現ベクターを用いて、inverse PCR によって phosphomimetic mutant (glutamate および aspartate 置換) および phosphorylation-deficient mutant (alanine 置換) を作製し、培養細胞に発現させた。

(2) ホールセルパッチクランプ法

hTRPM7 を発現した細胞からホールセルパッチクランプ法を用いて TRPM7 電流を測定した。細胞外液 (mM): 135 NaCl, 5 KCl, 1 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 1.2 NaH_2PO_4 , 10 HEPES, 2 glucose, and 27 mannitol (pH 7.4 adjusted with NaOH, 315 mOsmol/kgH₂O)、細胞内液 (mM): 25 CsCl, 110 CsOH, 110 glutamate, 0.2 EGTA, 10 EDTA, and 5 HEPES (pH 7.3 adjusted with CsOH, 290 mOsmol/kgH₂O) を用いた。細胞内 Mg 濃度は $MgSO_4$ を添加し任意の値になるように調整した。

(3) トランスクリプトーム解析

TRPM7 活性化薬である naltriben (20 μ M) 存在下/非存在下で 24 時間培養し、total RNA を精製した。RNA シークエンス (Illumina NovaSeq6000) を行い、遺伝子発現変動を解析した。

4. 研究成果

(1) 野生型 human TRPM7-WT における細胞内 Mg^{2+} 感受性制御の分子機構の解明

本研究では TRPM7 キナーゼドメインを欠損した TRPM7 電流の細胞内 Mg^{2+} 感受性が、キナーゼドメインとの共発現によって大きく高濃度側にシフトすることをホールセルパッチクランプ法を用いて明らかにした (Inoue et al., *J Gen Physiol.* 2021)。キナーゼ活性中心の点変異は、TRPM7 電流の細胞内 Mg^{2+} 感受性に影響しないことから、チャネルドメインとキナーゼドメインの相互作用にはキナーゼ活性は不要であることが分かった。一方でキナーゼドメインの C 末端に存在する zinc-binding motif の変異は TRPM7 電流のキナーゼドメインによる制御を完全に抑制した。TRPM7 電流は酸化ストレスによって細胞内 Mg^{2+} 依存性に抑制されるが、これは zinc-binding motif 内のシステイン残基の酸化によるキナーゼドメインの構造が変化し、チャネルドメインとの相互作用が阻害されたためと考えられた (Inoue et al., *J Gen Physiol.* 2021)。

(2) リン酸化変異体 hTRPM7 の細胞内 Mg^{2+} 依存性の解析

膠芽腫細胞では TRPM7 が何らかの修飾を受け活性が亢進していると考えられる。そこで、TRPM7 のチャネル活性に影響する可能性のあるリン酸化部位の変異体を用いて、その細胞内 Mg^{2+} 感受性をホールセルパッチクランプ法により検討した。Serine1269 および threonine1482 の phosphomimetic mutants は hTRPM7-WT と同様の細胞内 Mg^{2+} 依存性を示したことから、これらのアミノ酸の過剰リン酸化が膠芽腫における TRPM7 活性亢進に寄与している可能性は低いと考えられた。一方で serine1107 の変異は TRPM7 電流の細胞内 Mg 依存性を低濃度側にシフトさせた。すなわち serine1107 のリン酸化は TRPM7 電流を増加させている可能性が示唆された。しかしながら、この変化は phosphomimetic mutant だけでなく、塩基性アミノ酸への置換によっても起こることが明らかとなった。また、これまでに行われた TRPM7 リン酸化部位の網羅的解析においても serine1107 リン酸化は検出されていないことから (Kim et al., *BBRC.* 2012)、TRPM7 活性亢進に寄与している可能性は低いと考えられた。

(3) プロスタグランジン E2 受容体刺激による TRPM7 発現量の解析

プロスタグランジン E2 (PGE2) は膠芽腫細胞において TRPM7 の活性化を介して増殖と遊走を

促進することが報告されている (Tian et al., J Cell Mol Med. 2018)。そこで PGE2 受容体のアゴニストによる TRPM7 発現量の変化を検討した。24 時間の PGE2 受容体刺激は TRPM7 の発現量に影響しなかった。PGE2 による電流増加は PGE2 受容体サブタイプ 3 (EP3) によるものであり、EP3 は PKA の活性を減少させるため、serine1269 は脱リン酸化されると考えられる。そこで serine1269 の phosphorylation-deficient mutant (alanine 置換) を作製し、細胞内 Mg 感受性を検討したが、TRPM7-wt との違いは見られなかった。

(4) トランスクリプトーム解析による TRPM7 下流シグナルの解析

TRPM7 の活性化が膠芽腫を含む様々な腫瘍細胞で増殖・遊走を促進することは良く知られているが、その機構についてはよく分かっていない。本研究では RNA シークエンスによるトランスクリプトーム解析を行い、TRPM7 活性化によって発現量が変動する遺伝子を抽出した。TRPM7 活性化薬 naltriben の投与は、脂質代謝酵素の遺伝子群を大きく変化させることが明らかとなった。この変化が、膠芽腫の増殖・遊走にどのように寄与するかは未だ不明であり、今後検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hana Inoue, Takashi Murayama, Takuya Kobayashi, Masato Konishi, and Utako Yokoyama	4. 巻 153
2. 論文標題 The zinc-binding motif of TRPM7 acts as an oxidative stress sensor to regulate its channel activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1085/jgp.202012708	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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長内未来, 中村 隆, 廣見太郎, 井上 華, 横山詩子
2. 発表標題 腹部大動脈瘤におけるEP4シグナルとtoll-like receptorシグナルによる炎症増幅機構
3. 学会等名 第32回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村 隆, 小嶋朋之, 齋藤純一, 日高祐子, 井上 華, 宮城悦子, 石川義弘, 横山詩子
2. 発表標題 低酸素下周期的加圧培養によるヒト血管平滑筋細胞由来人工血管の開発
3. 学会等名 第61回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Okabe Y., Murakoshi N., Ito Y., Miyoshi C., Funato H., Ishii K., Inoue H., Murayama T., Kurebayashi N., Xu D., Aonuma K., Wakana S., Yokoyama U., Sakurai T., Ieda M., Yanagisawa M.
2. 発表標題 Phenotype-Driven Forward Genetics Identifies a Novel Mouse Model of Inherited Arrhythmia with Spontaneous Sudden Cardiac Death
3. 学会等名 AHA Scientific Sessions 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Inoue H., Tashiro., Yokoyama U.
2. 発表標題 Prostaglandin E2 receptor 4-mediated TRPV4 upregulation may be involved in RANTES production in abdominal aortic aneurysm
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 井上 華、村山 尚、小林琢也、小西真人、横山詩子
2. 発表標題 TRPM7チャンネル-キナーゼ相互作用による活性制御と酸化ストレスによる調節
3. 学会等名 TRP研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Inoue H., Nakamura T., Obikane H., Nagao T., Yokoyama U.
2. 発表標題 Role of TRPM7 in the pathophysiology of aortic dissection
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Inoue H., Murayama T., Kobayashi T., Konishi M., Yokoyama U.
2. 発表標題 ドメイン間相互作用を介した酸化ストレスによるTRPM7チャンネル活性の調節機構
3. 学会等名 生理研研究会「構造情報を基盤とした膜機能分子の生理機能理解に向けて」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Inoue H., Murayama T., Kobayashi T., Konishi M., Yokoyama U.
2. 発表標題 Oxidative stress regulates TRPM7, a calcium influx pathway in adipocytes
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 圧力印加方法及び圧力印加装置	発明者 横山詩子、中村隆、 井上華、伊藤定義、 酒井啓	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-1304	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 顕微鏡観察ステージ及び顕微鏡装置	発明者 横山詩子、井上華、 中村隆、伊藤定義、 酒井啓	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-1305	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

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
研究 分 担 者	谷藤 章太 (Shota Tanifuji) (50529245)	東京医科大学・医学部・助教 (32645)	

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