

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：82648

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23249012

研究課題名(和文) 温度感受性TRPM2チャネルの活性制御機構と免疫応答への関与の解析

研究課題名(英文) Analysis of regulation mechanisms of thermosensitive TRP channels and their involvement in immune responses

研究代表者

富永 真琴 (Tominaga, Makoto)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：90260041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス腹腔の肥満細胞の温度感受性TRPM2チャネルが消化管の機能を調節していることが分かった。また、過酸化水素によってTRPM2の熱活性化温度閾値が低下(感作)して機能増強につながるということが明らかになり、酸化されるTRPM2のメチオニン残基を同定した。この増強機構はマウス腹腔マクロファージのサイトカインの産生や微少な温度上昇による貪食能の増強に関与することが分かった。さらに、このTRPM2の感作機構がマウス膵臓細胞からのグルコース依存性のインスリン分泌にも関与することが判明した。

研究成果の概要(英文)：Thermosensitive TRPM2 channels expressed in mouse mucosal mast cells were found to participate in antigen-induced extracellular Ca²⁺ influx and subsequent degranulation. In addition, hydrogen peroxide was found to lower the temperature threshold for TRPM2 activation through methionine oxidation, indicating that temperature threshold for TRPM2 activation is regulated by redox signals that enable channel activity at physiological body temperatures. Loss of TRPM2 attenuated zymosan-evoked macrophage functions, including cytokine release and fever-enhanced phagocytic activity. The hydrogen peroxide-induced TRPM2-sensitization mechanism through oxidation was also found to work in mouse pancreatic β cells where glucose-induced oscillation of intracellular Ca²⁺ concentrations and insulin release was TRPM2- and redox status-dependent.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：生理学 神経科学

1. 研究開始当初の背景

私達は、氷点下から体温近くまでの温度変化の中で生活しており、それらの温度を感知しながらそれに適応している。この温度感知に関して、感覚神経等に発現して温度によって活性化する温度センサーTRP チャンネルがクローニングされ、現在では哺乳類において9つの温度感受性 TRP チャンネルが知られており、特異的な活性化温度閾値を有する。カプサイシン受容体 TRPV1(43度以上) TRPV2(52度以上) TRPV3(30-35度以上) TRPV4(30-35度以上) TRPM3(36度以上) TRPM4、TRPM5(18-36度)メントール受容体 TRPM8(28度以下) TRPA1(17度以下)である。申請者は既知の TRP チャンネルの温度感受性をスクリーニングし、涼冷刺激受容体 TRPM8に最も相同性の高い TRPM2 が温度感受性を持つことを見出し、TRPM2 が約36度の温度で活性化する Ca^{2+} 透過性の高い非選択性陽イオンであることを明らかにした(EMBO J. 2006)。

TRPM2 は熱単独でも活性化するが、リガンド(β NAD⁺, ADP-ribose (ADPR))による活性化電流を著名に増大させることが判明した。さらに、cyclic ADP-ribose が TRPM2 の新たなリガンドとして機能し、体温近傍でのみ TRPM2 活性化能を有することが分かった。他の多くの温度感受性 TRP チャンネルと異なり、TRPM2 は感覚神経には発現していない。TRPM2 は脳を含め多くの組織に発現していることが報告されており、膵臓でも発現している。これらの事実は、TRPM2 の活性化温度閾値が深部体温付近であることに合致する。膵島での発現を調べたところ、インスリンと発現が完全に重なり、逆に α 細胞のマーカーであるグルカゴンとは共発現していなかった。また、ラット膵島から温度依存的にインスリンが放出され、そのインスリン放出が TRPM2 特異的な siRNA 処理、知られている TRPM2 阻害剤で有意に減少することを観察した。このことは、TRPM2 が体温環境下において、リガンド(グルコースの取込から細胞内で ADPR, cyclic ADP-ribose (cADPR)等が産生される)によって活性化して Ca^{2+} 流入からインスリン放出がもたらされるものと考えられる。この TRPM2 の関与する機構は、これまで膵臓 β 細胞で中心的な役割を果たすと考えられてきた ATP 感受性 K^{+} チャンネル非依存的である。そして、TRPM2 欠損マウスの個体レベルでの解析、膵島からのインスリン分泌解析、単離膵臓 β 細胞の解析によって、TRPM2 が細胞レベルのみならず、個体レベルで膵臓からのグルコース依存性インスリン分布に関わることを明らかにした (Diabetes 2011)。

近年、免疫機能と体温の関係が注目されており、「体温免疫力」なる言葉も語られる。体温上昇は免疫能力を高めると考えられ、低体温では易感性的となるという。しかし、その科学的根拠は明らかではない。一方、LPS を投与されて熱発したマウスでは、サイクロオキシゲナーゼ阻害薬を投与した方が死亡率が高いことが知られている。これは、発熱

が積極的な体温上昇であり、発熱によって免疫力が高まる可能性を示唆している。しかし、そのメカニズムは明らかではない。免疫細胞機能は細胞内 Ca^{2+} 上昇がスイッチとなって働くことが知られており、温度感受性 TRP チャンネルは高い Ca^{2+} 透過性を有する。これらの事実は、免疫細胞に発現する温度感受性 TRP チャンネルが体温上昇を感知して活性化して免疫応答を引き起こす、という仮説を生み出す。事実、マウス B、T リンパ球での TRP チャンネル遺伝子の網羅的発現解析によって、数多くの温度感受性 TRP チャンネルがリンパ球に発現することを確認した(Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006)。

2. 研究の目的

これまで全く明らかにされていない体温上昇による免疫機能の増強の分子メカニズムを特にマクロファージに焦点をあてて明らかにすることを目的とする。具体的には、体温近傍の温度で活性化して免疫細胞に強く発現する温度感受性 TRPM2 チャンネルの過酸化水素処理後の温度刺激への感作の分子メカニズムを明らかにする。そして、TRPM2 が強く発現するマウス腹腔マクロファージに着目して、その貪食能・サイトカイン産生・放出能等が温度依存的であり、TRPM2 依存的であることを野生型マウス・TRPM2 欠損マウスマクロファージを用いて、*in vitro*, *in vivo* で解析する。

3. 研究の方法

- (1) TRPM2 の消化管粘膜下肥満細胞での活性と消化管機能、特に、消化管アレルギーとの関連を明らかにする。
- (2) 炎症時に発生する過酸化水素の TRPM2 への作用をカルシウムイメージング法、パッチクランプ法で解析する。
- (3) 過酸化水素による TRPM2 活性化温度閾値の変化を Arrhenius plot を用いて解析する。
- (4) 過酸化水素による TRPM2 の作用(酸化)に関与するアミノ酸を点変異体解析で明らかにする。
- (5) マウス腹腔マクロファージにおける TRPM2 の機能を野生型マウスと TRPM2 欠損マウスから得たマクロファージの比較検討によって明らかにする。
- (6) 野生型マウスと TRPM2 欠損マウスから得た腹腔マクロファージのサイトカイン産生能、貪食能を解析する。
- (7) マウス膵臓 β 細胞における過酸化水素による TRPM2 感作をカルシウムイメージング法によって解析する。
- (8) マウス膵島からのグルコース依存性のインスリン産生能に温度依存性があるかどうかを解析する。さらに、その温度依存的インスリン産生を野生型膵島・TRPM2 欠損膵島で比較検討する。加えて、温度依存的、TRPM2 依存的なグルコースによるインスリン放出への過酸化水素の関与を還元剤を用いて検

討する。

4. 研究成果

マウス肥満細胞での TRPM2 機能

(1) マウス粘膜下肥満細胞での温度感受性 TRP チャネルの遺伝子発現をスクリーニングして、TRPM2 遺伝子に強い発現を見いだした。(2) パッチクランプ法による解析で、マウス粘膜下肥満細胞での直線性の電流・電圧関係を示す、温度によって活性化して既知の TRPM2 阻害剤で抑制される電流を観察した。その電流は TRPM2 欠損粘膜下肥満細胞では観察されなかったことから、TRPM2 による電流だと結論した。(3) マウス粘膜下肥満細胞での化学物質依存的脱顆粒が既知の TRPM2 阻害剤で抑制され、TRPM2 欠損肥満細胞で有意に小さいことが分かった。消化管アレルギーモデルにおける下痢が TRPM2 阻害剤で著しく抑制されることが分かった。以上の結果から、マウス粘膜下肥満細胞において TRPM2 活性化によるカルシウム流入が肥満細胞の脱顆粒に関与し、消化管機能を制御することが明らかになった。

マウスマクロファージにおける過酸化水素による TRPM2 の感作と免疫機能

(1) mTRPM2 を発現させた HEK293T 細胞で、過酸化水素処理によって熱による細胞内カルシウムイオン濃度上昇が著しく増大し、それは過酸化水素の濃度依存的、暴露時間依存的であった。(2) 過酸化水素処理依存的な TRPM2 電流の増大は全細胞型パッチクランプ法でも観察された。(3) 過酸化水素処置後の熱応答の増大は TRPM2 の感作によるものと考えてカルシウムイメージング法で活性化温度閾値を解析したところ、無刺激の時には約 47 度であった活性化温度閾値が 100 μ M 1 分の過酸化水素処置によって約 42 度まで低下し、3 mM 1 分の過酸化水素処置によって体温レベルの約 35 度まで低下した。この過酸化水素による TRPM2 の熱による活性化温度閾値の低下は、過酸化水素の濃度に依存するのみならず、低濃度の過酸化水素の場合、暴露時間に依存した。(4) 過酸化水素による TRPM2 の熱による活性化温度閾値の低下は全細胞型パッチクランプ法による解析でも確認された。また、細胞膜だけのインサイドアウトパッチ法による単一チャネル電流解析でも過酸化水素の効果が観察されたことから細胞内因子の関与を否定した。(5) この過酸化水素による TRPM2 の感作はアミノ酸の酸化によって起こっていると推定し、より強くメチオニンに酸化する chloramine-T で処置したところ、過酸化水素と同じような応答の増大がカルシウムイメージング法、全細胞型パッチクランプ法の両方で観察された。一方、よりシステインを酸化する DTNB で処置しても応答の増大は観察されなかったことから、過酸化水素によって TRPM2 のメチオニンが酸化されているものと推定した。そこ

で、この過酸化水素による応答増大がマウス TRPM2、ヒト TRPM2 の両方で起こっていることから、共通するメチオニン 21 個を一つずつアラニンに置換した点変異体を作成してカルシウムイメージング法で解析したところ、214 番目のメチオニンをアラニンに置換した点変異体のみで過酸化水素による TRPM2 の熱応答の増大が起こらなかったことから、過酸化水素は TRPM2 アミノ末端 214 番目のメチオニンを酸化して感作を引き起こしているものと結論した。(6) 野生型マウスと TRPM2 欠損マウスから調整した腹腔マクロファージでの過酸化水素による影響をカルシウムイメージング法および全細胞型パッチクランプ法で解析したところ、野生型腹腔マクロファージでは過酸化水素処置で熱応答の増大が観察されたが、TRPM2 欠損腹腔マクロファージでは全く観察されなかった。よって、過酸化水素による腹腔マクロファージでの熱応答の増大は TRPM2 を介したものと結論した。(7) 野生型腹腔マクロファージと TRPM2 欠損腹腔マクロファージでサイトカニン産生能を比較検討したところ、G-CSF, CXCL2, IL-1 α の産生が TRPM2 欠損腹腔マクロファージで有意に小さいことが分かった。(8) カルシウムイメージング法で過酸化水素存在時の野生型腹腔マクロファージでの温度依存性細胞内カルシウム濃度変化を観察したところ、約 1.5 度の小さな温度上昇で細胞内カルシウム濃度上昇が起こることが分かり、その温度変化で野生型腹腔マクロファージではザイモザン貪食が有意に増大したが、TRPM2 欠損腹腔マクロファージでは変化なかった。以上の結果から、マウス腹腔マクロファージでは、TRPM2 が過酸化水素で酸化されて活性化温度閾値が低下して機能増強(感作)し、それが腹腔マクロファージ機能の増大をもたらしているものと考えられた。これは、体温が上昇したときに免疫能が高まることの分子メカニズムの一つと考えられた。

マウス膵臓 β 細胞での過酸化水素によるグルコース依存性インスリン分布の増強と TRPM2

TRPM2 の過酸化水素による感作メカニズムがより普遍的なメカニズムであることを証明するためにマウス膵臓で検討を行った。膵臓は還元酵素の機能が低く過酸化水素の影響をより受けやすいことが知られている。また、グルコースは膵臓での過酸化水素産生をもたらすことが報告されている。(1) 単離膵臓 β 細胞で過酸化水素処置によって腹腔マクロファージと同じように熱応答の増大が観察され、それは TRPM2 欠損膵臓 β 細胞では見られなかった。(2) マウス膵島からのグルコース依存的なインスリンの分泌を 33 度、37 度、40 度で観察したところ、野生型マウスでは温度上昇依存的にインスリン分泌の増大が観察されたが、TRPM2 欠損膵島では観察されなかった。また、その野生型マウス

での温度依存的なグルコースによる膵島からのインスリン分泌の増大は還元剤依存的であった。これらのことから、TRPM2 の過酸化水素による機能増強は広く見られる現象であり、膵臓でのグルコース依存的なインスリン分泌に強く関わっていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Kashio M, Tominaga M. Redox signal-mediated enhancement of the temperature sensitivity of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) elevated glucose-induced insulin secretion from pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 290(19):12435-12442, 2015. doi: 10.1074/jbc.M115.649913 (査読有り)

Oda S, Uchida K, Wang X, Lee J, Shimada Y, Tominaga M, Kadowaki M. TRPM2 contributes to antigen-stimulated Ca²⁺ influx in mucosal mast cells. *Pflüger Archiv. Eur. J. Physiol.* 465: 1023-1030, 2013. doi: 10.1007/s00424-013-1219-y (査読有り)

Kashio M, Sokabe T, Shintaku K, Uematsu T, Fukuta N, Kobayashi N, Mori Y, Tominaga M. Redox signal-mediated sensitization of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109(17):6745-6750, 2012. doi: 10.1073/pnas.1114193109 (査読有り)

[学会発表](計4件)

加塩麻紀子、富永真琴. Redox signal-mediated sensitization of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) to temperatures affects insulin secretion from the pancreatic β -cells. 第91回日本生理学会大会、平成26年3月17日、鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

加塩麻紀子、曾我部隆彰、森泰生、富永真琴. 過酸化水素による TRPM2 機能制御と生理機能. 第90回日本生理学会大会、平成25年3月27日、タワーホール船堀(東京都)

加塩麻紀子、富永真琴. レドックスシグナルによる TRPM2 感作機構とマクロファージ機能への寄与. 第59回日本中部生理学会、平成24年11月16日、岡崎カンファレンスセンター(愛知県・岡崎市)

加塩麻紀子、曾我部隆彰、森泰生、富永真琴. レドックスシグナルを介した TRPM2 感作の分子機構とマクロファージ機能への寄与. 第89回日本生理学会大会、平成24年3月29日、松本市総合体育館(長野県・松本市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/cs/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

富永 真琴 (Tominaga, Makoto)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号: 90260041

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし