TRPM2 チャネルによる活性酸素シグナル増幅と慢性炎症の関連

山本伸一郎^{1), 2)}, 清水 俊一³⁾, 森 泰生¹⁾

要約: Transient receptor potential channel (TRP チャネル) の melastatin (M) ファミリーに属する TRPM2 はカルシウムイオン (Ca^{2+}) 透過性のカチオンチャネルであり, 単球/マクロファージや好中球など免疫系細胞において最も豊富に発現が認められている. また, TRPM2 は過酸化水素などによる酸化的ストレスによって活性化される特徴を有しているが, 詳細な機構には不明な点が多い. 筆者らは, 当初培養細胞を用いた実験で過酸化水素刺激による TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入が細胞死を引き起こすことを初めて明らかにした. しかし, TRPM2 に対する特異的な阻害薬や knock out (KO) マウスがこれまで存在しなかったことから, 生体内において TRPM2 がどのような生理的役割を担っているかについては明らかにされていなかった. 最近, 筆者らは単球/マクロファージにおいて過酸化水素刺激によるケモカイン産生誘導に TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入が重要な役割を果たしていることを明らかにした. さらに, *in vivo* における TRPM2 の生理的役割を明らかにするために TRPM2 KO マウスを作製し, 炎症性疾患の発症や進展における TRPM2 の役割を検証した. その結果, デキストラン硫酸ナトリウムを用いた炎症モデルマウスにおいて, TRPM2 依存的な単球/マクロファージからのケモカイン産生が炎症部位への好中球の浸潤を惹起し, 炎症の増悪を引き起こしていることを明らかにした. 本稿では, 我々が明らかにした単球/マクロファージにおけるケモカイン産生誘導および炎症における TRPM2 の関与の詳細を述べ, 炎症性疾患における新規創薬ターゲット分子としての可能性を有する TRPM2 の重要性について議論し, 筆者らが

得ている新しい知見を加えて詳細が不明である酸化的ストレスによる TRPM2 の活性化について再考する.

はじめに

「炎症」は創傷や感染に対する生体応答であり, 損傷部位に体液, タンパク質, 炎症性の細胞群を送り込み, 障害性の物質を取り除くとともに, 治癒・回復を促進させるという自然免疫としての意義を有する. また, 炎症反応は臓器傷害に伴い必ず惹起されるため, 様々な疾病に共通する機序であるとも認識されている. 炎症部位では免疫系細胞の集積がみられ, 様々な細胞から産生されたサイトカインが炎症時のネットワークを形成する炎症性情報伝達物質として機能している. 特に「ケモカイン」は免疫系細胞の炎症部位への遊走・浸潤に重要である. ケモカインは4つのサブファミリーが存在し, CXC ファミリーに属する interleukin-8 (CXCL8) や macrophage inflammatory protein-2 (CXCL2) は好中球に対して強く遊走を引き起こす(1). また, 好中球の炎症部位への遊走・浸潤には単球/マクロファージから産生・遊離される CXCL8 が重要であることが知られている. 炎症部位においては, 異物除去に働く活性酸素種も様々な細胞から産生され, その持続により炎症組織に強い傷害が生じる. しかし, 従来考えられてきた細胞構成要素に対する非特異的な酸化的破壊反応に加え, 近年, 活性酸素種は酸化還元感受性転写因子 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ などを活性化し, 炎症性サイトカインの産生を引き起こすシグナル伝達物質として注目されている(2). 一方, 活性酸素種と同様に免疫系細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇はサイトカ

キーワード: TRPM2, 酸化的ストレス, 単球/マクロファージ, ケモカイン, 炎症

¹⁾ 京都大学大学院 工学研究科 合成・生物化学専攻 分子生物化学分野 (〒615-8510 京都市西京区京都大学桂 A4 棟 218 号室) E-mail: mori@sbchem.kyoto-u.ac.jp 原稿受領日: 2009 年 5 月 30 日, 依頼原稿

²⁾ 京都大学大学院 薬学研究科 生体分子認識学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29) E-mail: yamashin@pharm.kyoto-u.ac.jp

³⁾ 昭和大学 薬学部 病態生理学教室 (〒142-8555 東京都品川区旗の台 1-5-8) E-mail: shun@pharm.showa-u.ac.jp

Title: Involvement of TRPM2 channel in amplification of reactive oxygen species-induced signaling and chronic inflammation.

Author: Shinichiro Yamamoto, Shunichi Shimizu, Yasuo Mori

イン産生や遊走など様々な免疫応答を引き起こし、その生理的重要性が認識されている。特に、Tリンパ球における $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はカルシニューリン/NFAT 経路を介して interleukin-2 産生誘導を引き起こすことはよく知られている。また、単球においても $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は CXCL8 産生誘導を引き起こす(3)。さらに過酸化水素などの活性酸素種によっても単球において Erk/NF κ B 経路を介して CXCL8 産生誘導が引き起こされることが明らかにされている(4)。しかし、単球において活性酸素種や Ca^{2+} といった重要な細胞シグナル伝達物質がどのように協調して、CXCL8 産生誘導を制御しているかという詳細な機構は明らかになっていない。

Ca^{2+} 透過性のカチオンチャネルである TRPM2 は ADP リボース (ADPR) などといった細胞内メッセンジャーによって活性化される(5)。筆者らは過酸化水素などの酸化ストレスによっても TRPM2 が活性化されることを明らかにした(6)。その後の研究により酸化ストレスによる TRPM2 の活性化機構において、活性酸素種などによって核およびミトコンドリアから産生・遊離した ADPR が TRPM2 の活性化に関与することが示されている(7, 8)が、その詳細には不明な点が存在する。TRPM2 を発現した培養細胞において過酸化水素による TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入は細胞死を引き起こすことを筆者らは明らかにしているが(6)、生体内において TRPM2 がどのような生理的役割を担っているのかについては明らかにされていない。そこで筆者らは TRPM2 の生理的意義を明らかにするために、TRPM2 発現を有する免疫系細胞、特に単球/マクロファージにおけるケモカイン産生誘導に着目し検討を行った(9)。本稿では、最近筆者らが明らかにした単球/マクロファージにおけるケモカイン産生誘導および炎症における TRPM2 の関与について詳述する。また、まだ不明な点が多い過酸化水素による TRPM2 の活性化についても筆者らが得ている新しい知見を加え議論する。

1. 過酸化水素による TRPM2 の活性化機構

TRPM2 はカルボキシル末端に pyrophosphatase に広く保存されている Nudix モチーフを有する(弱ながらも pyrophosphatase 活性を有する) Ca^{2+} 透過性の非選択性カチオンチャネルである。筆者らは、過酸化水素などの活性酸素種による TRPM2 の活性化は、酸化ストレスにより産生された NAD^+ が TRPM2 の Nudix モチーフに作用することにより引き起こされることを見出した(6)。また、 NAD^+ の代謝物質である

ADP リボースを細胞内に導入すると、それが TRPM2 の Nudix モチーフに作用して活性化を引き起こす(5)。その後の研究によって、 NAD^+ による TRPM2 の活性化は NAD^+ が ADP リボースに変換されることで引き起こされていることが考えられるようになってきた。

TRPM2 の活性化に関わる ADP リボースは、活性酸素種による酸化ストレスによりミトコンドリアから産生・遊離されることが示されている(7)。また、ADP リボースのもう一つの産生源として核が知られている。核内には酵素 poly (ADPR) polymerase-1 (PARP-1) が存在し、酸化ストレスを含む様々な侵害刺激による DNA の損傷の修復に重要な役割を担っている。損傷された DNA に PARP-1 が結合し、 NAD^+ を基質として nicotinamide と ADP リボースに代謝する。産生された ADP リボースは様々な核タンパク質にポリマー化され、DNA 修復機構が活性化される。そして poly (ADPR) glycohydrolase (PARG) により重合化された poly (ADP リボース) が代謝され、遊離 ADP リボースが産生される。過酸化水素による TRPM2 の活性化は PARP を薬理学的および分子生物学的に阻害することによって抑制される(10, 11)。さらに、ADP リボースによる TRPM2 の活性化は PARP を阻害しても影響を受けないことから、過酸化水素による TRPM2 の活性化において ADP リボースが TRPM2 の Nudix モチーフに作用する前段階である ADP リボース産生に、PARP-1/PARG 経路が関与すると考えられている。

TRPM2 にはいくつかのスプライシングバリエントが発見されている。そのひとつにポア領域を含む第二膜貫通領域以降を欠損したバリエント (TRPM2-S (short)) が存在する(12)。TRPM2-S は全長型の TRPM2 と相互作用するが、全長型の TRPM2 は TRPM2-S と相互作用することで酸化ストレスによる活性化を示さなくなる。よって TRPM2-S は酸化ストレスによる全長型の TRPM2 活性化に対してドミナントネガティブ体として機能していると考えられている。さらに、カルボキシル末端の 1292 番から 1325 番のアミノ酸を欠いたバリエントの存在も明らかにされている(13)。このバリエントは Nudix モチーフの一部を欠損しており、興味深いことに、ADP リボースによっては活性化されないが、高濃度ではあるが過酸化水素により活性を示す。よって過酸化水素による TRPM2 の活性化においては ADP リボースの産生を介さない独立した活性化様式も存在する可能性が示唆されている。

2. TRPM2 のリン酸化による活性制御

ところで, 様々な細胞において TRPM2 を活性化しうる ADP リボースの EC_{50} は $50 \mu M$ 前後であることが明らかにされている。しかし, 過酸化水素刺激によって産生される ADP リボース濃度では, TRPM2 の活性化を引き起こすためには不十分であり, どのようにして酸化ストレスの際に TRPM2 が活性化されているのかという疑問が生じる。詳細な機構は明らかにされていないが, TRPM2 は過酸化水素刺激によりリン酸化されることが示されている(14)。また熱感知チャネルでありカプサイシン受容体である TRPV1 はリン酸化されることで, カプサイシンに対する感受性が高まることが知られている(15)。そこで筆者らは不十分な細胞内 ADP リボース濃度上昇を補うような機構として TRPM2 のリン酸化が ADP リボースに対する感受性を高めるような機構が存在するのではないかと考えた。そして筆者らは TRPM2 の過酸化水素によるリン酸化に関与するキナーゼとしてチロシンキナーゼである Janus kinase (Jak) ファミリーを見出した(未発表データ)。Jak の阻害薬を処置することにより, 過酸化水素による TRPM2 の活性化の用量反応曲線を高濃度側に変化させた。そこで, リン酸化されるチロシン残基の同定を行うために, チロシン残基にそれぞれ変異を有する TRPM2 変異体を作製し, 過酸化水素による TRPM2 変異体の活性化について検討した。その結果, 264 番目のチロシン残基に変異を有する TRPM2 において, Jak 阻害薬処置と同様に過酸化水素による活性化の用量反応曲線を高濃度側に変化させた。この Jak による TRPM2 のリン酸化と ADP リボースに対する感受性についての関係については不明であるが, TRPM2 の過酸化水素による活性化の感受性に Jak ファミリーが関与するようである。また筆者らは Erk 経路の阻害薬 U0126 を処置することにより過酸化水素による TRPM2 の活性化を促進し, Erk 経路が TRPM2 の活性化に抑制的に働いていることを示唆する結果も得ている(未発表データ)。Erk はセリン/スレオニンキナーゼであり, チロシンキナーゼである Jak とは違う様式で TRPM2 の過酸化水素による活性化に関与していることが考えられる。今後は過酸化水素による TRPM2 の活性化において関与が指摘されている ADP リボース産生経路に加え, 過酸化水素刺激により並列に活性化される Jak および Erk など様々な経路にも着目し, どのように TRPM2 が活性制御されているかを検討する必要がある。

3. 過酸化水素による CXCL8 産生誘導への TRPM2 の関与

筆者らは TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入によって引き起こされる適応的な細胞応答として, 先述したように単球/マクロファージにおける過酸化水素による CXCL8 産生誘導に着目し検討を進めてきた。まずヒト単球細胞株 U937 を用いて, 過酸化水素刺激後の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇について観察した。過酸化水素刺激により細胞外からの Ca^{2+} 流入による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が引き起こされた。この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は TRPM2 に対する siRNA を処置することにより抑制されたことから, U937 における過酸化水素による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入によって引き起こされていることが明らかになった。過酸化水素による CXCL8 産生誘導について検討したところ, これまで報告されている様に過酸化水素による CXCL8 産生誘導を確認することが出来た。この CXCL8 産生誘導は細胞外液中の Ca^{2+} を除去, および TRPM2 に対する siRNA を処置することにより抑制されたことから, U937 における過酸化水素による CXCL8 産生誘導に TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入が関与することが明らかになった。また, 阻害薬を用いた薬理学的手法により, この CXCL8 産生誘導には転写因子 NF κ B およびシグナル伝達経路として Erk が関与していることを確認できた。そこで, CXCL8 産生誘導に関与するシグナル伝達経路の詳細について検討を行った。NF κ B の活性化を RelA の核内移行を指標とし検討を行ったところ, 過酸化水素により RelA の核内移行が認められ, その核内移行は Erk および TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入によって制御されることが分かった。そこで, 過酸化水素による Erk の活性化について検討を行った。細胞外液中の Ca^{2+} を除去したとき, 過酸化水素刺激により Ras 非依存的な弱い Erk の活性化が認められた。細胞外液 Ca^{2+} 存在下では過酸化水素刺激により Ras を介した強い Erk の活性化が引き起こされた。この Erk 活性化の増幅は, Ca^{2+} 依存性チロシンキナーゼ Pyk2 が TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入を感知し, Ras の活性化を介して引き起こされることが明らかになった。そして, この増幅された Erk の活性化が RelA の核内移行を惹起し, CXCL8 産生誘導を引き起こすことが明らかとなり(図 1), 単球の CXCL8 産生誘導における Ca^{2+} と過酸化水素とを結びつける分子実体として, TRPM2 が明らかになった。

図1 過酸化水素による CXCL8 産生誘導における TRPM2 を介した Ca^{2+} シグナルカスケードの関与

4. TRPM2 依存的なケモカイン産生による炎症性疾患の増悪

U937 で明らかになった TRPM2 の役割を *in vivo* で評価すべく TRPM2 KO マウスを作製し、検討を進めた。Wild type (WT) マウスの末梢血から単離した単球における過酸化水素による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇および ADP リボースによる電流の増大は、TRPM2 KO 単球において消失していた。マウスにはヒト CXCL8 に相当する機能上のホモログとしてマウス CXCL2 が知られており、CXCL8 と同様に好中球に強い遊走作用を有す。そこで単球における過酸化水素による CXCL2 産生誘導を観察した。WT 単球において過酸化水素刺激による CXCL2 産生誘導が認められたが、TRPM2 KO 単球においてその産生誘導が抑制された。従ってマウスの単球における過酸化水素による CXCL2 産生誘導に TRPM2 が関与することが明らかになった。また、この CXCL2 の産生量の差が実際に好中球の遊走に影響

を及ぼすことが *in vitro* 遊走アッセイにより明らかになった。先述したように炎症部位では様々な細胞から活性酸素種が産生されている。そのような病態生理条件下で単球、および炎症組織に浸潤したマクロファージの TRPM2 が活性化され、ケモカイン産生誘導が引き起こされることが考えられる。そこで飲料水にデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sulfate sodium : DSS) を 2.5% 含有させ、潰瘍性大腸炎を惹起した炎症マウスモデルを採用し、詳細な検討を行った。DSS 処置 8 日後、WT マウスの単球および大腸において強い CXCL2 産生が認められたが、TRPM2 KO マウスにおいて抑制された。さらにこの DSS 処置後に認められた CXCL2 産生量の違いが炎症部位である大腸への好中球の浸潤に影響を及ぼしているのかについて観察した。興味深いことに、マクロファージの浸潤は WT および TRPM2 KO マウスともに同程度認められたが、好中球の浸潤は TRPM2 KO マウスにおいて著しく抑制された。また CXCL2 を含む種々ケモカインによる好中球の遊走能は WT と TRPM2 KO 間で違いが認められなかったことから、マクロファージにおける TRPM2 依存的な CXCL2 産生誘導が炎症部位への好中球の浸潤を引き起こしていることが考えられた。そこで骨髓由来マクロファージを用いたレスキュー実験を試みた。DSS 処置した TRPM2 KO マウスに WT および TRPM2 KO マウス骨髓由来マクロファージを尾静脈から移植し、その後の大腸への好中球の浸潤を観察した (図 2A)。その結果 (図 2B, C) (9), WT マウス骨髓由来マクロファージを尾静脈から移植したマウスにおいて大腸への好中球の浸潤増加が認められたことから、マクロファージにおける TRPM2 依存的な CXCL2 産生誘導が炎症部位への好中球の浸潤に重要な役割を担っていることが明らかになった。潰瘍性大腸炎において大腸における好中球の集積は病態を悪化

図2 骨髓由来マクロファージを用いたレスキュー実験

A. レスキュー実験プロトコル。7日間 DSS 処置した TRPM2 KO マウスに WT および TRPM2 KO マウスから調製した骨髓由来マクロファージをそれぞれ尾静脈注射にて投与した。そして 24 時間後に大腸における好中球の浸潤を比較した。B. WT および TRPM2 KO 骨髓由来マクロファージを投与した TRPM2 KO マウスの大腸における好中球の浸潤を抗 Gr-1 抗体を用いて免疫組織染色法にて観察。EP は上皮組織。バーは 100 μm。C. 200 × 200 μm² あたりの Gr-1 陽性細胞の細胞数を算出。

図3 単球/マクロファージにおける TRPM2 依存的な CXCL2 産生誘導による好中球の浸潤と病態の悪化

炎症部位で産生された活性酸素種により単球/マクロファージにおいて TRPM2 依存的な CXCL2 産生誘導が引き起こされる。CXCL2 は好中球の遊走を引き起こし、骨髓から炎症部位への動員を惹起する。集積した好中球は潰瘍の形成など病態の悪化を引き起こす。

させる要因である。DSS 処置後の大腸における病理的診断において、WT マウスの大腸では広い範囲で潰瘍形成が認められたが、TRPM2 KO において強く抑制された。以上のことから本研究によって、TRPM2 が単球/マクロファージにおけるケモカイン産生を調節し、好中球を炎症部位へ集積させ、潰瘍形成など炎症を悪化させるメディエーターとして機能することが示され (図3), TRPM2 が炎症性疾患の新規創薬の分子ターゲットとなりうる可能性を提示することが出来た。

5. 展望

酸化ストレスが亢進する炎症時、単球/マクロファージにおける TRPM2 が CXCL2 産生誘導に関与することを明らかにした。これら以外にも、筆者らはバクテリア由来のケモアトラクタントである fMLP による好中球の遊走が TRPM2 KO 好中球において低下していることや、DSS 処置後の大腸における IL-12 および interferon- γ 産生誘導が TRPM2 KO マウスにおいて低下していることも見出している。今後はこれらの現象にどのようにして TRPM2 が関与しているか詳細な機構を解明し、免疫系全体を協調させるであろう TRPM2 の生理的役割をさらに明らかにすることが重要である。そして炎症性疾患の新規治療薬のターゲット分子として TRPM2 の阻害薬を開発するためにも、TRPM2 の活性化機構の詳細を明らかにする必要がある。

文 献

- 1) Luster AD. N Engl J Med. 1998;338:436-445.
- 2) Droge W. Physiol Rev. 2002;82:47-95.
- 3) Wilson L, et al. FEBS Lett. 1993;325:295-298.
- 4) Josse C, et al. Biochem J. 2001;360:321-333.
- 5) Perraud AL, et al. Nature. 2001;411:595-599.
- 6) Hara Y, et al. Mol Cell. 2002;9:163-173.
- 7) Perraud AL, et al. J Biol Chem. 2005;280:6138-6148.
- 8) Fonfria E, et al. Br J Pharmacol. 2004;143:186-192.
- 9) Yamamoto S, et al. Nat Med. 2008;14:738-747.
- 10) Fonfria E, et al. Br J Pharmacol. 2004;143:186-192.
- 11) Buelow B, et al. J Biol Chem. 2008;283:24571-24583.
- 12) Zhang W, et al. J Biol Chem. 2003;278:16222-16229.
- 13) Wehage E, et al. J Biol Chem. 2002;277:23150-23156.
- 14) Zhang W, et al. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;292:1746-1758.
- 15) Bhawe G, et al. Neuron. 2002;35:721-731.

著者プロフィール

山本伸一郎 (やまもと しんいちろう)

京都大学大学院 薬学研究科 生体分子認識学分野, 助教, 博士 (工学)。

◇2007 年京都大学大学院工学研究科博士課程 修了, 同研究科ポスドクを経て, '09 年 4 月から現職。

◇研究テーマ: カルシウムシグナリング。◇趣味: 大相撲観戦または実際に取組む (無気力相撲厳禁)。

清水 俊一 (しみず しゅんいち)

昭和大学 薬学部 病態生理学教室, 准教授, 博士 (薬学)。

◇1987 年昭和大学大学院薬学研究科修士課程 修了, 昭和大学薬学部 助手, シンシナティ大学医学部 客員研究員 (海外留学), 岡崎国立共同研究所 生理学研究所 (国内留学), 昭和大学薬学部 講師を経て, '99 年より現職。◇研究テーマ: イオンチャネルと疾患, NO 代謝と疾患。◇趣味: 海釣り。

森 泰生 (もり やすお)

京都大学大学院 工学研究科 合成・生物化学専攻 分子生物化学分野, 教授, 博士 (医学)。

◇1989 年京都大学大学院医学研究科博士課程 修了, 京都大学医学部 助手, シンシナティ大学医学部 客員助教授, 同 助教授, 岡崎国立共同研究所 生理学研究所 助教授, 同研究所 統合バイオサイエンスセンター 教授を経て, '03 年より現職。◇研究テーマ: カルシウムチャネル。◇趣味: クラシックバレエ。