



活性酸素感受性Ca²⁺透過性チャネルTRPM2 の活性化による炎症反応の増幅

1. はじめに

炎症反応は微生物感染や臓器傷害などにより惹起され、生体防御反応としての役割を担っているが、過剰な炎症反応は臓器傷害を増悪させることが知られている。また、炎症反応には、活性酸素やサイトカインネットワークが深く関わっていると考えられている。活性酸素による直接的な細胞毒性は古くから研究され、DNA、脂質およびタンパク質などの生体成分を酸化修飾し、組織や細胞を傷害することが明らかにされている。しかし、活性酸素は直接的な細胞毒性だけでなく、免疫・炎症性細胞を活性化させ炎症反応を増幅することにより臓器傷害を増悪させることも明らかにされてきている。炎症反応は、様々な疾患に共通の基盤であることから、炎症反応の増幅機構を明らかにすることは、難治性炎症性疾患の治療戦略を考案する上で重要である。

Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) は、TRP-melastatin サブファミリーに分類されるCa²⁺透過性のカチオンチャネルであり、活性酸素により活性化される性質を有している^{1,2)}。免疫・炎症性細胞における細胞質Ca²⁺濃度の上昇は、これら細胞の炎症部位への動員や炎症性サイトカインの分泌など様々な細胞応答に関わっている。筆者らは、これまで不明であった炎症反応の増幅機構にTRPM2活性化が関わっていると推定し検討を進めた結果、単球/マクロファージのTRPM2活性化がケモカインの産生を促進し、好中球の動員を促進することにより炎症反応の増幅に関わっていることを見出した³⁾。また、最近ヒト単球において、lipopolysaccharide (LPS) により誘導されるサイトカイン産生にTRPM2が中心的な役割を担っていることも報告されている⁴⁾。本稿では、TRPM2の活性

化機構および炎症反応における役割について最新の知見をまじえて紹介する。

2. TRPM2 チャネルについて

哺乳類の transient receptor potential (TRP) タンパク質は、*Drosophila melanogaster* の光受容応答において必須の役割を持つCa²⁺透過性チャネルである *Drosophila* TRP のホモログである。これまでに哺乳類のTRPチャネルは28種類同定されており、遺伝子の相同性から六つのサブファミリー (canonical (C), vanilloid (V), melastatin (M), polycystic kidney disease (P), mucolipin (ML), ankyrin (A)) に分類されている。近年、TRPタンパク質の機能解析が進められ、TRPチャネルは分子種に依存して温度、機械刺激、浸透圧、痛み、フェロモン、酸・塩基、カプサイシンやメントールなどの刺激性化学物質、Gqタンパク質共役型受容体シグナルなど様々な刺激で活性化されることが明らかにされている。このように、TRPチャネルは細胞内外の環境変化を感知し、細胞内シグナルに変換する、いわゆる“センサー”であると考えられている。これらの中で、Melastatin サブファミリーに属するTRPM2は、レドックス感受性のCa²⁺透過性カチオンチャネルであることが明らかにされている。Human embryonic kidney (HEK) 細胞における発現実験系では、おおよそ数十μM程度の過酸化水素(H₂O₂)添加により活性化され、Ca²⁺やNa⁺を細胞内に流入させる¹⁾。また、生体内では脳や膵島β細胞、および単球/マクロファージや好中球などの免疫細胞に豊富に発現している。

3. TRPM2 チャネルの活性化および活性化調節機構

TRPM2は細胞内にADP-ribose (ADPR)を導入することにより活性化される⁵⁾。TRPM2はC末端側にADPR pyrophosphatase ファミリーに広く保存されているNudixモチーフを有している(図1)。詳細な機序は明らかになっていないが、ADPRはNudixモチーフに作用することによりTRPM2を活性化すると考えられている。一方、筆者らは活性酸素種の一つであるH₂O₂を細胞外から添加することによりTRPM2が活性化されることをはじめて明らかにした¹⁾。その後の研究で、細胞内で産生されるヒドロキシラジカルを消去すると、H₂O₂によるTRPM2活性化が消失することから、H₂O₂によるTRPM2活性化は細胞内で生じたヒドロキシラジカルを介していると考えられる⁶⁾。細胞内においてADPRは、H₂O₂刺激によって核およびミトコンドリアから産生されることが示されている。ミトコンド

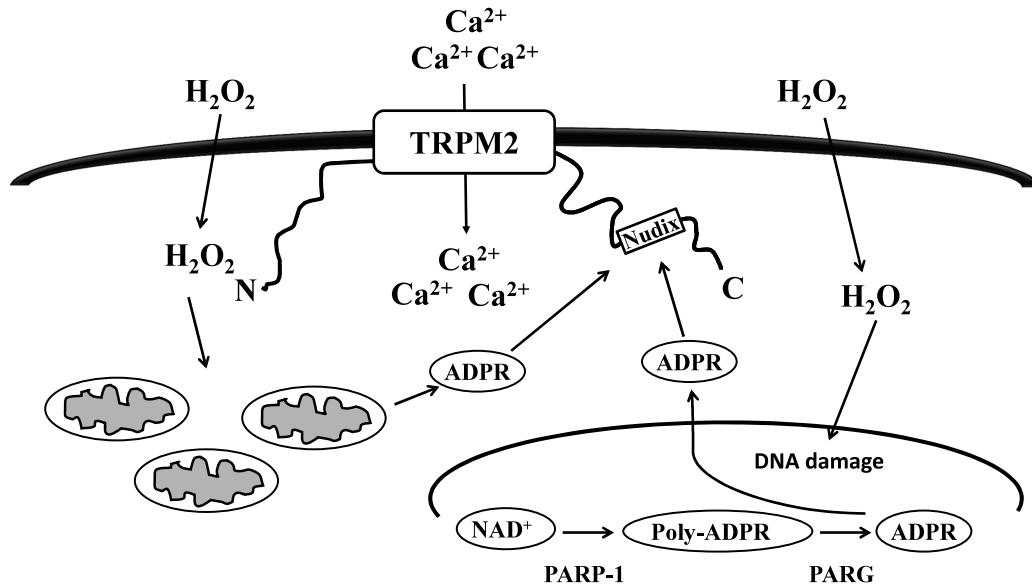


図1 過酸化水素刺激による TRPM2 の活性化シグナリング

過酸化水素は、ミトコンドリア及び核内で ADPR 産生を促進する。産生された ADPR は、TRPM2 の C 末端側に存在する Nudix モチーフに作用することにより TRPM2 を活性化し、細胞内に Ca^{2+} を流入させる。ミトコンドリア内における ADPR 産生は、 NAD^+ -glycohydrolase や PARP-1 を介しているようであるが、詳細は明らかでない。一方、核内では、DNA の損傷に伴い PARP-1 及び PARG の作用を経て ADPR が産生される。

リアにおける ADPR 産生は、 NAD^+ を nicotinamide と ADPR に代謝する poly(ADPR) polymerase-1 (PARP-1) や NAD^+ -glycohydrolase を介しているようであるが^{7,8)}、詳細は明らかでない。一方、核における ADPR 産生機構はよく研究されている⁹⁾。核内の DNA が損傷を受けると PARP-1 が活性化され、 NAD^+ を代謝して nicotinamide と ADPR が産生され、さらに ADPR を様々な核タンパク質にポリマー化させる。この核タンパク質のポリ ADPR 化は、DNA の修復に寄与していると考えられている。ポリマー化された ADPR は、続いて poly(ADPR) glycohydrolase (PARG) により代謝され、遊離 ADPR が産生される。 H_2O_2 による TRPM2 の活性化は PARP を薬理的あるいは分子生物学的に阻害することによって抑制されることから^{10,11)}、 H_2O_2 による TRPM2 の活性化に PARP-1/PARG 経路が関与することが示されている(図1)。一方、TRPM2 には Nudix モチーフの一部を欠損したバリエントが存在しており、このバリエントは ADPR では活性化されないが、 H_2O_2 により活性化されることが示されている¹²⁾。従って、 H_2O_2 による TRPM2 の活性化に ADPR の産生を介さない独立した様式が存在する可能性もある。事実、 H_2O_2 が直接的に TRPM2 を活性化するとの報告もある¹³⁾。このように、

ADPR が TRPM2 を活性化することは間違いなが、 H_2O_2 による TRPM2 の活性化機構には不明な点が多い。

近年、TRPM2 活性化の抑制因子として、adenosine monophosphate (AMP) が報告された²⁾。TRPM2 の C 末端側に存在する Nudix モチーフは、弱いながら pyrophosphatase 活性を有しており、ADPR から AMP を産生する。この Nudix モチーフによる AMP 産生は、TRPM2 の活性調節において過剰な機能を抑制するためのネガティブフィードバック機構として機能している可能性があり興味深い。

4. TRPM2 活性化を介したケモカインの産生亢進

炎症部位では、炎症・免疫細胞の集積が見られ、好中球など様々な細胞から活性酸素が産生される。産生された活性酸素はリン酸化カスケードや転写因子などを活性化し、炎症性サイトカインやケモカインの産生などの細胞応答を引き起こす。炎症部位への好中球の遊走には、単球/マクロファージ由来のケモカイン IL-8 (CXCL8) が重要であり、CXCL8 の産生には活性酸素刺激による Ca^{2+} シグナルが重要である¹⁴⁾。しかし、単球において、活性酸素刺激による Ca^{2+} 流入経路や活性酸素と流入した Ca^{2+} がどのように協調して CXCL8 産生誘導を制御しているのかという詳

細な機構は明らかになっていなかった。筆者らは、単球や好中球などに豊富に発現が認められていた TRPM2 に着目し、単球での CXCL8 産生における TRPM2 の関与を検討した³⁾。

ヒト単球細胞株 U937 において、H₂O₂ は TRPM2 を介した細胞内への Ca²⁺ 流入を引き起こし、CXCL8 産生を誘導した。CXCL8 産生は、細胞外液中の Ca²⁺ の除去および TRPM2 siRNA の処置により抑制されたことから、TRPM2 を介した細胞内への Ca²⁺ 流入が、H₂O₂ による CXCL8 産生に関与することが明らかになった。この CXCL8 産生誘導には転写因子 NFκB 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した。また Erk の活性化は、TRPM2 を介した Ca²⁺ 流入による Ca²⁺ 依存性チロシンキナーゼ Pyk2 の活性化と、それに伴う Ras の活性化により増強された。さらに、活性化 Erk が RelA の核内移行を惹起し、CXCL8 産生誘導を引き起こしていることも明らかにした。

U937 で明らかにした TRPM2 の役割をネイティブ細胞で評価すべく、TRPM2 遺伝子欠損 (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 H₂O₂ による細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇および ADPR による電流の増大は、TRPM2 KO 単球において消失していた。マウスにおいて、ヒト CXCL8 の機能上のホモログとして知られている CXCL2 の産生誘導については、WT 単球において H₂O₂ 刺激による CXCL2 産生誘導が認められたが、TRPM2 KO 単球においてはその産生誘導が抑制された。以上の結果から、酸化ストレスにより活性化した TRPM2 が単球におけるケモカイン産生に関与していることが明らかとなった。

最近、ヒト末梢血由来単球を LPS で処置すると TRPM2 発現が上昇し、ADPR 刺激による TRPM2 活性も上昇することが報告された⁴⁾。この報告では、さらに単球細胞株である THP-1 細胞を用いて、LPS 刺激によるサイトカイン産生に TRPM2 が関わっていることを示している。単球系細胞における TRPM2 活性化は、様々な原因による炎症応答に関与しているようである。

5. 炎症性疾患における TRPM2 の役割

筆者らは、当初培養細胞を用いた実験で H₂O₂ 刺激による TRPM2 を介した Ca²⁺ 流入は細胞死を引き起こすことを明らかにした¹⁾。さらに、その後前述したように、TRPM2 が単球におけるケモカイン産生の促進に関与していることを見出した³⁾。しかし、TRPM2 選択的阻害剤や TRPM2

KO マウスが存在しなかったことから、生体内において TRPM2 がどのような役割を担っているのか明らかにされていなかった。そこで、筆者らは炎症性疾患における TRPM2 の役割を明らかにするために、TRPM2 KO マウスを用いて病態モデルを作製し検討を進めた。

潰瘍性大腸炎は難治性の炎症性腸疾患であり、炎症局所にはリンパ球と共に単球や顆粒球など白血球の浸潤が認められ、これら白血球はサイトカインネットワークを形成し粘膜傷害を進展させる¹⁵⁾。また、大腸炎の炎症局所には活性酸素が増加し、特にその活動期には好中球から大量の活性酸素が産生される。そこで、デキストラン硫酸 (DSS) 誘発大腸炎モデルを作製し WT マウスと KO マウスで比較した。2.5% DSS 水溶液をマウスに 8 日間連日自由摂水させた後、大腸の組織学的変化を観察したところ、WT マウスの大腸では広い範囲に潰瘍形成が認められたのに対して、KO マウスでは強く抑制されていた。この結果から、TRPM2 が潰瘍性大腸炎の増悪因子であることが明らかとなった。そこで、TRPM2 がどのような機構で大腸炎を増悪させるのか検討を進めた。大腸炎を誘発させると WT マウスの大腸では CXCL2 含量の著しい増加が認められたが、TRPM2 KO マウスにおいては抑制されていた。そこで、大腸への炎症性細胞の浸潤について検討した結果、単球/マクロファージの大腸へ浸潤は 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ていた。また、CXCL2 を含む種々の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。さらに、DSS を負荷した TRPM2 KO マウスに WT の骨髄由来単球を尾静脈から移植すると、大腸への好中球の浸潤が増加したことから、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。以上のことから、単球/マクロファージにおける TRPM2 活性化は、ケモカイン産生を増加し、好中球を炎症部位へ集積させ、潰瘍形成を促進させていることが明らかとなった。

最近、筆者らは好中球を中心とする急性炎症反応が関与する心臓の虚血再灌流傷害が TRPM2 KO マウスで抑制されることを見出している (未発表)。この現象には、好中球の TRPM2 活性化による心臓への好中球の浸潤促進が関与しているようである。しかし、好中球の TRPM2 は、500 μM 以上の高濃度の H₂O₂ を添加しないと活性化されない。これらのことから、TRPM2 の活性化には H₂O₂ による活性化を容易にするような機構や H₂O₂ 以外の活性化

物質の存在も予想される。

6. おわりに

筆者らは、TRPM2 活性化が単球/マクロファージにおけるケモカインの産生促進に関わっていること、さらにマウス潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいて、TRPM2 活性化が炎症反応の増幅を介して病態を悪化させることを明らかにした。しかしながら、TRPM2 の活性化機構には不明な点が多く残されている。今後、TRPM2 の活性化機構や様々な病態モデルにおける TRPM2 の役割について解析を進めることにより生体内における TRPM2 の役割がさらに明らかになっていくであろう。

謝辞

本研究は、京都大学大学院工学研究科・森泰生教授との共同研究により行なったものである。また、ここに示した多くの研究は、京都大学大学院薬学研究科・山本伸一郎博士、昭和大学薬学部・石井正和博士をはじめとする多くのメンバーにより行なわれたものである。この場を借りて、あらためて感謝する。

- Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudo, J., Shimizu, N., Kurose, H., Okada, Y., Imoto, K., & Mori, Y. (2002) *Mol. Cell*, 9, 163-173.
- Tóth, B. & Csanády, L. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 30091-30102.
- Yamamoto, S., Shimizu, S., Kiyonaka, S., Takahashi, N., Wajima, T., Hara, Y., Negoro, T., Hiroi, T., Kiuchi, Y., Okada, T., Kaneko, S., Lange, I., Fleig, A., Penner, R., Nishi, M., Take-shima, H., & Mori, Y. (2008) *Nat. Med.*, 14, 738-747.
- Wehrhahn, J., Kraft, R., Harteneck, C., & Hauschildt, S. (2010) *J. Immunol.*, 184, 2386-2393.
- Perraud, A.L., Fleig, A., Dunn, C.A., Baqley, L.A., Launay, P., Schmitz, C., Strokes, A.J., Zhu, Q., Bessman, M.J., Penner, R., Kinet, J.P., & Scharenberg, A.M. (2001) *Nature*, 411, 595-599.
- Ishii, M., Shimizu, S., Hara, Y., Hagiwara, T., Miyazaki, A., Mori, Y., & Kiuchi, Y. (2006) *Cell Calcium*, 39, 487-494.
- Perraud, A.L., Takanishi, C.L., Shen, B., Kang, S., Smith, M. K., Schmitz, C., Knowles, H.M., Ferraris, D., Li, W., Zhang, J., Stoddard, B.L., & Scharenberg, A.M. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 6138-6148.
- Zhang, J., Ziegler, M., Schneider, R., Klocker, H., Auer, B., & Schweiger, M. (1995) *FEBS Lett.*, 377, 530-534.
- Peralta-Leal, A., Rodriguez-Vargas, J.M., Aguilar-Quesada, R., Rodriguez, M.I., Linares, J.L., de Almodóvar, M.R., & Oliver, F.J. (2009) *Free Radic. Biol. Med.*, 47, 13-26.
- Fonfria, E., Marshall, I.C., Benham, C.D., Boyfield, I., Brown, J.D., Hill, K., Hughes, J.P., Skaper, S.D., & McNulty, S.

(2004) *Br. J. Pharmacol.*, 143, 186-192.

- Buelow, B., Song, Y., & Scharenberg, A.M. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 24571-24583.
- Zhang, W., Chu, X., Tong, Q., Cheung, J.Y., Conrad, K., Masker, K., & Miller, B.A. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 16222-16229.
- Kolisek, M., Beck, A., Fleig, A., & Penner, R. (2005) *Mol. Cell*, 18, 61-69.
- Josse, C., Boelaert, J.R., Best-Belpomme, M., & Piette, J. (2001) *Biochem. J.*, 360, 321-333.
- Whittem, C.G., Williams, A.D., Williams, C.S. (2010) *J. Vis. Exp.*, pii: 1652. doi: 10.3791/1652.

清水 俊一

(昭和大学薬学部病態生理学教室)

Aggravation of inflammatory response through oxidative stress-sensitive Ca^{2+} -permeable channel TRPM2 activation
Shunichi Shimizu (Department of Pathophysiology, Showa University School of Pharmacy, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan)

セマフォリンによる免疫制御

はじめに

セマフォリン (semaphorin) は、船や列車の水先案内人が振る“手旗信号”にその名の由来を認め、従来、神経軸索の伸長方向を決定する神経ガイダンス因子の代表的な分子として知られてきた。ところが、近年、器官形成、血管形成、癌の進展など神経系以外への関与も明らかになり、セマフォリンの多彩な機能が注目されている。さらに、ここ数年の我々の研究により、免疫系で機能する一群のセマフォリン分子群の存在が明らかになり、免疫系で機能するセマフォリンは“免疫セマフォリン”と呼ばれている¹⁾。

免疫系におけるセマフォリンの主要な機能は、免疫細胞の相互作用におけるいわば副刺激分子様の機能と、免疫細胞の移動制御機能である。本稿では、セマフォリンとその受容体、細胞間相互作用において機能するセマフォリン、免疫細胞の移動を制御するセマフォリンについて最新の知見を交えて紹介する。

1. セマフォリンとセマフォリン受容体

セマフォリンの歴史は、1992年に後根神経節細胞の成長円錐の退縮活性を有する分子をニワトリの脳から単離