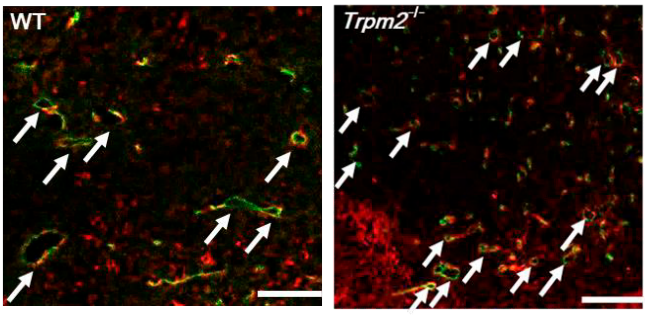
55　マクロファージの機能分化を司るTRPM2チャネロソーム	森　泰生

【目的】マクロファージ（Mϕ）は多彩な生理的役割を担うために、異なる機能的特徴を備えた複数種類のMϕに分極することが知られているが、その機構は未解明である。また、Mϕの分類は様々な基準によりなされ、特定の種類のMϕの生物学的意義の解明には、分類基準の分子的基盤の確立が枢要である。一方、transient receptor potential（TRP）タンパク質ファミリーは、環境や細胞内状態の変化を感知し活性化開口する Ca^{2+}透過型陽イオンチャネル群を形成する。特に、TRPM2 と TRPM7 は正統的な機能である陽イオン透過から独立した酵素活性ドメインを有する「Chan-zyme」である。我々は、redox センサー或いは体温付近の温度センサーとして働く TRPM2 チャネルに注目し、TRPM2 が酸化ストレスや温度上昇という生体内外の環境因子により活性化し、炎症応答を促進することを明らかにしてきた。本研究では、炎症性細胞応答を調節するシグナル分子の複合体「TRPM2 チャネロソーム」の解明を目的に、STAT3-TRPM2 相互作用を中心にしたチャネロソームによる Mϕの機能分極の分子基盤と炎症応答等の調節機構を探究した。

【方法】TRPM2 チャネロソームが司る Mϕの M1／M2 型機能分化の解明を目指し、4 項目の実験を遂行した。第一に、STAT3 と TRPM2 を中心にしたチャネロソーム内タンパク質間相互作用を解析した。第二に、TRPM2 チャネロソームの STAT3 等の構成タンパク質が TRPM2 チャネル活性に及ぼす影響、タンパク質の修飾反応を介した TRPM2 チャネロソーム分解と活性減弱の機序を、質量分析、蛍光タンパク質融合化した TRPM2、STAT3 等の顕微観察、各種阻害剤を組み合わせ解析した。第三に、TRPM2 チャネロソームによるシグナル経路、M1 及び M2 型関連遺伝子の転写の調節の解析を解析した。第四に、個体レベルで TRPM2 チャネロソームが M1 及び M2 への Mϕ分化をどう調節するか、*TRPM2* KO マウスを用いて担癌モデルにおける TAM Mϕのがん転移能の亢進に着目して解析を進めた。

【結果】STAT3 と TRPM2 との会合は、活性酸素種 H_2O_2により惹起される TRPM2 を介した Ca^{2+}流入と JAK キナーゼによる TRPM2 と STAT3 のリン酸化により増強されることを見出した。また、組換え発現系とMϕ内在発現系において、STAT3α と TRPM2 との間の会合が両タンパク質のレベルをプロテアソームやリソソームを介さず減少させ、H_2O_2及び ADP ribose により惹起される TRPM2 活性を減弱させることを確認した。本分解機序は H_2O_2により惹起される TRPM2 を介した Ca^{2+}流入が劇的に進行させ、STAT3α の核移行を阻害することも分かった。さらに、*TRPM2*KO マウスにマウスメラノーマ細胞を用いた担癌を施し、担癌組織内の血管の新生・発達を観察したところ、野生型マウスより多数の新生血管が見られるが、それらはペリサイトが接着しない未成熟状態に留まることが観察された。また、血管成長因子（VEGF）の Tumor-associated Mϕ（TAM）からの産生は *TRPM2*KO マウスにおいて有意に高く（つまり高い M2 性を示す）、これは過剰な VEGF が血管の分化を阻害する知見と一致していた。このように、TRPM2 発現が優位になると、Ca^{2+}流入を介して M1 性を亢進しながら STAT3 レベルの減弱により M2 性を抑制する一方、STAT3 発現が優位になると M2 性を亢進しながら TRPM2 の発現（Ca^{2+}流入）の減弱（や欠損）により M1 性を抑制するという、我々が発想提起した Mϕの機能分化（M1 vs M2）に関する分子機構を支持する結果が得られた。

TRPM2 KO マウスにおける担癌組織内メラノーマ細胞の血管発達は未成熟に留まる



55. マクロファージの機能分化を司る TRPM2 チャネロソーム

森　泰生

京都大学 大学院工学研究科 生物化学講座 分子生物化学分野

Key words：マクロファージ，TRP チャネル，タンパク質間相互作用，活性酸素，Ca^{2+}シグナル

緒　言

マクロファージ（Mϕ）は多彩な生理的役割を担うために、異なる機能的特徴を備えた複数種類の Mϕに分極することが知られているが、その機構は未解明である。また、Mϕの分類は起源（骨髄由来の浸潤型 vs 組織常在型）、役割（異物除去の M1 型 vs 組織修復の M2 型）、病態（癌抑制 vs 促進 tumor-associated Mϕ＝TAM）等、様々な基準によりなされ、特定の種類の Mϕの生物学的意義の解明には、分類基準の分子的基盤の確立が枢要である。

transient receptor potential（TRP）」タンパク質ファミリー（哺乳類は 28 種類）は、環境や細胞内状態の変化を感知し活性化開口する Ca^{2+}透過型陽イオンチャネル群を形成する。TRP は共通の構造的特徴として N 及び C 末端の大きな細胞質側ドメインを有する。特に、TRPM2 と TRPM7 はチャネル活性とは独立に C 末端ドメインが酵素活性を示すことから、Chanzyme（Channel＋enzyme）と呼ばれている。また、我々を含む複数グループの先駆的研究は、TRP チャネルが複合体形成の安定化や細胞内局在化により細胞シグナルの増幅や抑制を担うことを示している。即ち、チャネルタンパク質の正統的な機能であるイオン透過とは異なる TRP の機能が明されつつある［1, 2］。我々は、redox センサー［3］或いは体温付近の温度センサー［4］として働く TRPM2 チャネルに注目し、Mϕにおける TRPM2 が Ca^{2+}流入→Pyk2→RAS→MAP キナーゼ／NF-κB を介して好中球のケモカイン CXCL2 や CXCL8 の産生を誘導し、炎症応答を亢進することを *TRPM2*KO マウスに dextran sufate sodium 誘発性炎症性腸疾患モデルを適用し明らかにした［5］。また、TRPM2 は好中球の遊走自体においても重要な役割を担う［6］。このように、TRPM2 は酸化ストレスや温度上昇という生体内外の環境因子により活性化し、炎症応答を促進する重要因子として注目されている。

最近我々は、炎症性細胞応答を調節するシグナル分子の複合体「TRPM2 チャネロソーム」の解明を目的に、酵母 2-hybrid スクリーニングを行い、Mϕの M2 型機能を促進する転写因子 STAT3 が、TRPM2 への会合により複合体を形成し、互いの発現・活性レベルを H_2O_2依存的に減じることを見出した（未発表データ）。本知見は、Mϕの機能分化（M1 vs M2）に関する以下の興味深い分子機構を示唆する。つまり、Mϕにおける TRPM2 発現が優位になると、Ca^{2+}流入を介して M1 性が亢進するだけでなく、STAT3 発現の減弱により M2 性が抑制される。一方、STAT3 発現優位では M2 性が亢進するだけでなく、TRPM2 の発現（Ca^{2+}流入）の減弱により M1 性が抑制されると考えられる。以上の発想に基づき、STAT3-TRPM2 相互作用を中心にしたチャネロソームによる Mϕの機能分極の分子基盤と炎症応答等の調節機構の解明を目指した。

方　法

TRPM2 チャネロソームが司る Mϕの M1/M2 型機能分化の解明を目指し、4 項目の実験を遂行した。

1. STAT3-TRPM2 相互作用を中心にしたチャネロソームの分子構成の同定

予備的データがある酵母 2-hybrid スクリーニングにより、新規 TRPM2 結合タンパク質の同定を継続するとともに、TRPM2 と STAT3 相互作用部位を決定した。

2. TRPM2 チャネロソームの機能、細胞内動態、分解過程の解析

STAT3 等、チャネルソーム構成タンパク質が TRPM2 チャネル活性に及ぼす影響を、電気生理学的に検討した。また、タンパク質の修飾反応を介した分解と活性減弱の機序を、質量分析及び蛍光タンパク質融合化した TRPM2、

STAT3 等の顕微観察、各種阻害剤の効果検討を組み合わせ解明した。他タンパク質との連関に関しては、STAT の活性調節に深くかかわる JAK キナーゼ（リン酸化により核移行を制御）、SOCS（supressor of cytokine signaling）等、或いは TRPM2 活性化因子 ADP Ribose の産生酵素である PARG/PARP 系にも注目した。

3. TRPM2 チャネロソームによるシグナル経路、M1 及び M2 型関連遺伝子の転写の調節の解析

まず、M1 型或いは M2 型に機能分化させた培養マウス Mφに、1. の結果よりデザインした会合を損なうコンストラクトを発現させ、その活性化転写因子と遺伝子転写プロファイルに対する効果（特に M1、M2 Mφのマーカー）を解析した。また、Ca^{2+}測光法により Ca^{2+}シグナルの細胞内動態も解析し、関与するシグナル因子の同定も阻害剤、siRNA 等の遺伝子転写への効果に基づき検討した。さらに、ミトコンドリアのエネルギー状態が TRPM2 活性、動態を調節することも考慮し、エネルギー蓄積を蛍光性熱センサー［7］を用いて解析した。

4. 個体レベルでの TRPM2 チャネロソームによる Mφ機能分化と炎症応答等の調節

解明した機構が M1 及び M2 への Mφ分化をどう調節するか、既に我々が作製済みの *TRPM2* KO マウスを用いて検討した。ここでは、担癌モデルにおける TAM Mφのがん転移能の亢進、癌幹細胞の保持の解析も進めた。

結果および考察

まず、酵母 2-hybrid 法を用いた TRPM2 の組換え部分体の結合評価により、TRPM2 の N 末端領域（ヒト TRPM2 のアミノ酸残基 214～315）を介して STAT3 と TRPM2 とが会合することがわかった。細胞運命（生存・増殖と死）の方向付けに関与する STAT3 の splicing variant［8］に注目し、完全な転写活性化領域を有する STAT3α と当領域を部分欠失した STAT3β と TRPM2 との会合強度を同じ手法により比較したところ、STAT3β が STAT3α より強く TRPM2 に会合した。STAT3 と TRPM2 との会合は、活性酸素種 H_2O_2により惹起される TRPM2 を介した Ca^{2+}流入と JAK キナーゼによる TRPM2 と STAT3 のリン酸化により増強されることも見出した。また、Ca^{2+}測光法及びパッチクランプ法を用いた電流測定により、STAT3 会合が TRPM2 を介した Ca^{2+}流入に与える影響を解析したところ、本会合は H_2O_2及び ADP ribose により惹起される TRPM2 活性を減弱させることが分かった。

組換え発現系と Mφ内在発現系において、STAT3α と TRPM2 との間の会合が両タンパク質のレベルを減少させ（図 1）、それを H_2O_2により惹起される TRPM2 を介した Ca^{2+}流入が劇的に進行させることが分かった。また、その分解機序を検討したところ、プロテアソームやリソソームを介するものでないことが分かった。さらに、IL-10 誘導性の STAT3α の核移行を TRPM2 との会合が阻害することを見出した。

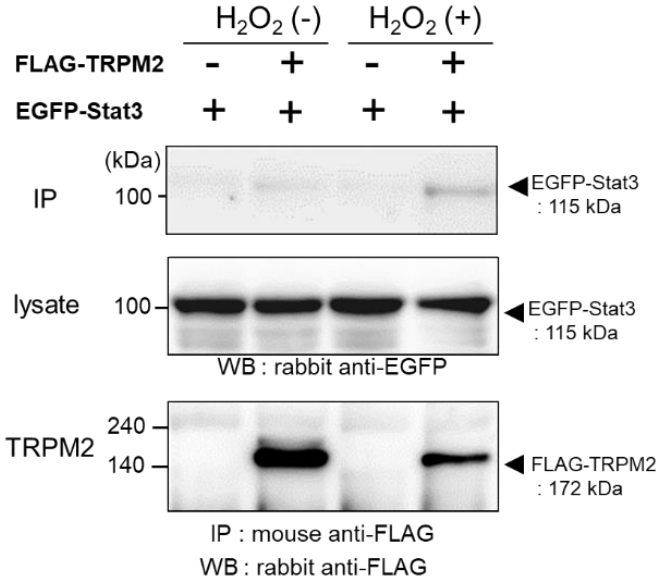


図 1. TRPM2-STAT3 相互作用によるタンパク質分解の亢進
TRPM2-STAT3 を HEK293 細胞に強制発現させ、共免疫沈降とタンパク質発現量を検討した。

癌組織における癌細胞悪性化等との関係や、M2 性を有することが知られる TAM に着目し、*TRPM2* KO マウスにマウスメラノーマ細胞を用いた担癌を施し、担癌組織内の血管の新生・発達を観察した。面白いことに、野生型マウスに比較するとより多数の新生血管が見られるが、それらのほとんどがペリサイトが接着しないまま未成熟に留まることが観察された。また、血管成長因子（VEGF）の TAM からの産生は *TRPM2* KO マウスにおいて優位に高く（つまり高い M2 性を示す）、これは過剰な VEGF が血管の分化を阻害する知見と一致していた。さらに、*TRPM2*KO マウスおけるこの表現型は、VEGF を吸収できる可溶性 VEGF 受容体コンストラクトにより抑制された。

このように、我々が発想提起した Mϕ の機能分化（M1 vs M2）に関する分子機構（図 2）、つまり、TRPM2 発現が優位になると、Ca^{2+}流入を介して M1 性を亢進するだけでなく STAT3 レベルの減弱により M2 性を抑制する、その一方で、（TRPM2 発現が欠損するなどして）STAT3 発現が優位になると M2 性を亢進するだけでなく、TRPM2 の発現（Ca^{2+}流入）を減弱（や欠損）することにより M1 性を抑制するという考えを支持する結果が得られた。

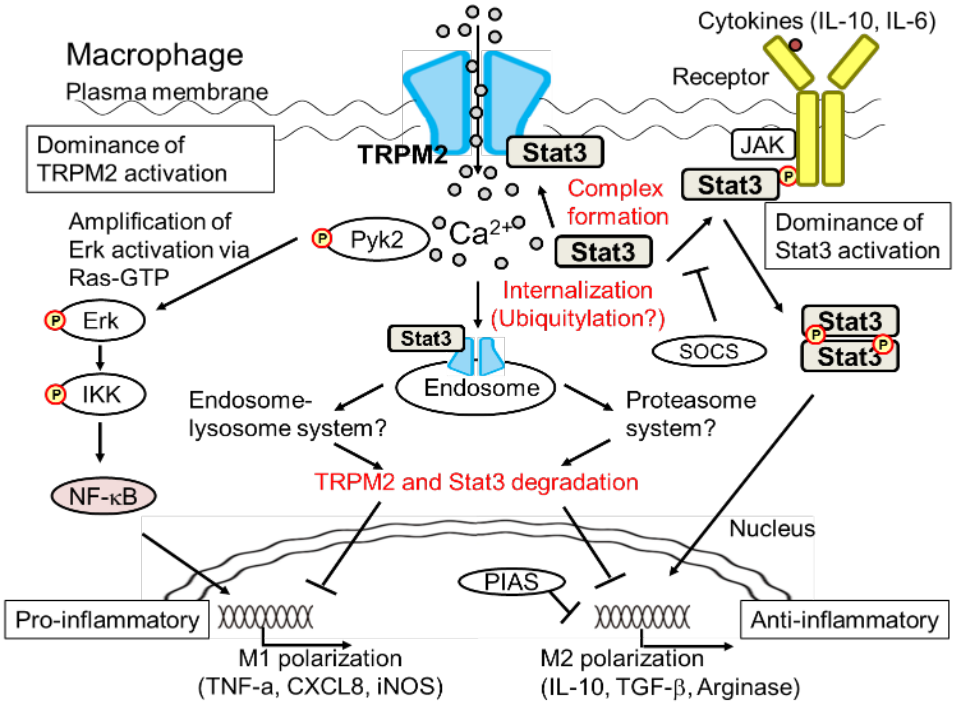


図 2. TRPM2 チャネロソームによる Mϕ 分化調節

Mϕ の機能的分極を調節する TRPM2-STAT3 チャネルソーム機構をまとめてある。即ち、定常状態では TRPM2 タンパク質と STAT3 タンパク質が会合することにより、両タンパク質の発現レベルが会合を介した分解を介して低く保たれ、Mϕ の機能的分極は抑制されている。しかし、TRPM2 タンパク質の発現が亢進すると、H_2O_2による Ca^{2+}流入が増加し、それを介して炎症応答が高まる（M1 性が亢進する）とともに、STAT3 の分解の亢進によるさらなる減弱が起こり Mϕ の M2 性が強く抑制される。即ち、M1 型の Mϕ へと分極することになる。ところが、TRPM2 発現が欠損するなどして STAT3 発現が優位になると創傷治癒応答が高まる（M2 性を亢進する）とともに、TRPM2 の分解の亢進によるさらなる減弱が起こり Mϕ の M1 性が抑制される。即ち、M2 型の Mϕ へと分極することになる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、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研究室の高橋重成准教授、植田誉志史研究員である。

文 献

1) Nishida M, Sugimoto K, Hara Y, Mori E, Morii T, Kurosaki T, Mori Y. Amplification of receptor signalling by Ca^{2+} entry-mediated translocation and activation of PLCg2 in B lymphocytes. EMBO J. 2003 Sep 15;22(18):4677-88. doi: 10.1093/emboj/cdg457.

2) Genova T, Grolez GP, Camillo C, Bernardini M, Bokhobza A, Richard E, Scianna M, Lemonnier L, Valdembri D, Munaron L, Philips MR, Mattot V, Serini G, Prevarskaya N, Gkika D, Pla AF. TRPM8 inhibits endothelial cell migration via a non-channel function by trapping the small GTPase Rap1. J Cell Biol. 2017 Jul 3;216(7):2107-2130. doi: 10.1083/jcb.201506024. Epub 2017 May 26.

3) Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y. LTRPC2 Ca^{2+}-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. Mol Cell. 2002 Jan;9(1):163-73. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00438-5.

4) Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, Tominaga M. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. EMBO J. 2006 May 3;25(9):1804-15. doi: 10.1038/sj.emboj.7601083. Epub 2006 Apr 6.

5) 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, Takeshima H, Mori Y. TRPM2-mediated Ca^{2+} influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. Nat Med. 2008 Jul;14(7):738-47. doi: 10.1038/nm1758. Epub 2008 Jun 8.

6) Hiroi T, Wajima T, Negoro T, Ishii M, Nakano Y, Kiuchi Y, Mori Y, Shimizu S. Neutrophil TRPM2 channels are implicated in the exacerbation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. Cardiovasc Res. 2013 Feb 1;97(2):271-81. doi: 10.1093/cvr/cvs332. Epub 2012 Nov 5.

7) Kiyonaka S, Kajimoto T, Sakaguchi R, Shinmi D, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Imamura H, Yoshizaki T, Hamachi I, Morii T, Mori Y. Genetically encoded fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells. Nat Methods. 2013 Dec;10(12):1232-8. doi: 10.1038/nmeth.2690. Epub 2013 Oct 13.

8) Caldenhoven E, van Dijk TB, Solari R, Armstrong J, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, de Groot RP. STAT3b, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. J Biol Chem. 1996 May 31;271(22):13221-7. doi: 10.1074/jbc.271.22.13221.