

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	渡邊 成樹
学位論文題目			
Trpm7 protein contributes to intercellular junction formation in mouse urothelium (Trpm7 蛋白のマウス尿路上皮細胞間結合の形成への関与)			
共著者名			
鈴木 喜郎 内田 邦敏 宮崎 直幸 村田 和義 松本 成史 柿崎 秀宏 富永 真琴			
The Journal of Biological Chemistry Published online: 26 October 2015 2015 Dec 11;290(50):29882-92.			
研究目的			
<p>Transient receptor potential (TRP) チャネルはその細胞外環境を刺激として受容し、細胞内へ伝える役割をもつ。TRPM7 (transient receptor potential melastatin 7) もその一つであり、分子内にキナーゼドメインを持つ点でユニークな非選択性陽イオンチャネルである。膀胱を含めた様々な組織で発現し、そのMg²⁺感受性から、細胞内Mg²⁺の恒常性維持に重要な分子と考えられている (引用1)。またTRPM7は培養細胞の実験で、癌細胞の移動、細胞外基質との局所的な接着(focal adhesion)および細胞間結合(接着結合: adherens junction)の形成との関与が報告されている(引用2,3)。</p> <p>TRPM7は膀胱上皮にて機能的発現が報告されている。膀胱上皮は高浸透圧であり、pHも5-8と変化する、生体にとって侵害的である尿から膀胱壁を防御する役割を担っていると報告されている。この膀胱上皮でのTrpm7の生理的な役割はいまだ不明であり、本研究の目的は膀胱上皮におけるin vivoでのTrpm7の生理的な役割を明らかにすることである。</p>			

材 料 ・ 方 法

尿路上皮特異的 Trpm7 knock-out マウス

Trpm7-floxed マウスは既報のごとく作製された(参考 1)。胎生早期に全身の Trpm7 を破綻させると胎生致死となるのでコンディショナル Trpm7KO マウスを獲得するために Cre-loxP システムを使用した。enhancedGFP-Cre-ERT2(GCE) を含む Upk3a-GCE マウスと交配した。獲得されたマウスは人工エストロゲン(タモキシフェン)を投与時のみ、尿路上皮にのみ Trpm7 がノックアウトする、コンディショナル尿路上皮特異的 KO マウス(Trpm7KO マウス)であることを確認した。

マウス尿路上皮初代培養細胞の作製

既報に準じて作製(参考 2)。パッチクランプレコーディングでは播種 3-8 時間に使用し、それ以外の実験では 72 時間後に使用した。

パッチクランプ

TRPM7 は 2 価の陽イオンにて不活性化するため、TRPM7 の機能的発現を確認するための外液は CaCl_2 1mM、 MgCl_2 0mM とした。TRPM7 の酸感受性を観察するために pH4 の外液を用いた。

排尿行動実験

排尿行動を観察するために改良した代謝ケージにマウスを個別に飼育した。代謝ケージの床をメッシュ状にしてその下に電子天秤をおき、リアルタイムに排尿量を測定した(参考 3)。

透過型電子顕微鏡

メスのマウスの膀胱頂部から麻酔下にカテーテルを挿入し、膀胱を虚脱させた状態で灌流固定(2%グルタルアルデヒド+2%パラホルムアルデヒド)を施行した。前固定には灌流固定と同じ液を使用した。後固定は2%四酸化オスミウムを用いた(参考4)。70nm超薄切片を作製し、電子染色は酢酸ウランを使用した。

成 績

我々は尿路上皮における Trpm7 の機能的な意義について検討するために、まず尿路上皮特異的 Trpm7KO マウスを作製した。RT-PCR にて膀胱に Trpm7 mRNA が発現していることがわかった。免疫組織染色にて Trpm7 蛋白は膀胱平滑筋にも発現しているが、発現レベルは尿路上皮より低かった。尿路上皮内では被蓋細胞層で強く発現が認められ、中間・基底細胞層ではその発現は弱かった。一方タモキシフェン投与後の Trpm7KO マウス膀胱組織では、尿路上皮における Trpm7 蛋白の発現が有意に減少していた。

次に尿路上皮の初代培養細胞を作製した。初代培養細胞にて RT-PCR をしたところ、Trpm7 と Upk3a の発現が確認でき、タモキシフェン処理により Trpm7 蛋白発現が減少したことが確認でき

た。次に Trpm7KO マウス尿路上皮細胞での機能的発現の低下を検討するために、ホールセルパッチクランプ法を用いて、作製した尿路上皮初代培養細胞の膜電流を測定した。測定開始後から漸増する外向きの電流が観察され、この電流は細胞外液にマグネシウム 10mM を付加すると速やかに抑制された。Trpm7 に特徴的な Mg-inhibitable current とよく似た性質をもつ電流と思われた。タモキシフェン処理後の Trpm7KO マウス尿路上皮初代培養細胞ではこの電流のサイズが有意に小さかった。これらの結果から、尿路上皮初代培養細胞に Trpm7 は機能的に発現していることが確認でき、作製した Trpm7KO マウスではタモキシフェン処理により Trpm7 が機能的にも低下していることが示唆される結果が得られた。また Trpm7 由来の電流には酸感受性があることが報告されているが、尿路上皮初代培養細胞に対し、細胞外液を pH4 にしたところマグネシウムに抑制される内向きの電流が観察された。この電流はタモキシフェン処理 Trpm7KO マウスの細胞では有意にサイズが小さかった。尿路上皮初代培養細胞の酸感受性の電流の一部が Trpm7 由来であることが示唆される結果となった。

今回の主な目的である、Trpm7 の膀胱における生理的役割を検討するために排尿行動を観察した。代謝ケージを用いて無抑制下で観察したところ、タモキシフェン処理をした Trpm7KO マウス (Upk3a-Cre; Trpm7^{fl/fl} マウス) はコントロール群(タモキシフェン処理をした Trpm7^{fl/fl} マウス)と比較し、平均 1 回排尿量が有意に少なかった。1 回平均排尿量が有意に少なかった理由について、膀胱上皮細胞の Trpm7 が欠損することで膀胱のバリア機構に問題が起き、尿が膀胱組織内に浸透し炎症が起きたと推測した。そこで全膀胱にて HE 染色を施行したところ、タモキシフェン処理したコントロール群と比較し、同様の処理をした Trpm7KO マウスでは上皮下に部分的にだが、明らかな浮腫を認めた。

この浮腫が炎症によって惹起されたかどうかを検討するために、炎症に関与するサイトカインについて定量的 PCR を施行した。Tnfa と Il1b の mRNA 発現が Trpm7KO マウスにて有意に増えており、Trpm7KO マウス膀胱上皮下に炎症が起きていることを示唆する結果だった。

最後に膀胱上皮の微細構造を検討するため、透過型電子顕微鏡を施行した。

被蓋細胞間隙、特にアドヘレンスジャンクションが Trpm7KO マウスにて有意に広く、細胞間結合形成が未熟なことが示唆された。この結果は Trpm7 が細胞間結合の形成に関与することを示唆する結果だった。

考 案

今回の検討で我々は Trpm7 が尿路上皮の、特に最表層である被蓋細胞に多く発現を認めた。内在性 Trpm7 が酸による電流発生に関与していることを認めた。被蓋細胞の Trpm7 を欠損させたときに未熟な細胞間結合を認め、上皮下に炎症を認めた。また Trpm7KO マウスでは排尿行動において 1 回排尿量が有意に減少していた。これについては細胞間結合が未熟なため、尿路上皮のバリア機構が不十分であり、尿路上皮の透過性が亢進した結果、膀胱組織に炎症が惹起され、膀胱炎のような状態となったと推測している。

結 論

本研究によりTrpm7は尿路上皮被蓋細胞間接着結合の形成に関与することが示唆され、生体内における上皮Trpm7の役割を初めて明確に示すことができた。




引 用 文 献

1. Ryazanova, L. V., Rondon, L. J., Zierler, S., Hu, Z., Galli, J., Yamaguchi, T. P., Mazur, A., Fleig, A., and Ryazanov, A. G. (2010) TRPM7 is essential for Mg(2+) homeostasis in mammals. *Nat Commun* **1**, 109.
2. Su, L. T., Agapito, M. A., Li, M., Simonson, W. T., Huttenlocher, A., Habas, R., Yue, L., and Runnels, L. W. (2006) TRPM7 regulates cell adhesion by controlling the calcium-dependent protease calpain. *J Biol Chem* **281**, 11260-11270
3. Middelbeek, J., Kuipers, A. J., Henneman, L., Visser, D., Eidhof, I., van Horsen, R., Wieringa, B., Canisius, S. V., Zwart, W., Wessels, L. F., Sweep, F. C., Bult, P., Span, P. N., van Leeuwen, F. N., and Jalink, K. (2012) TRPM7 is required for breast tumor cell metastasis. *Cancer Res* **72**, 4250-4261

参 考 论 文

1. Jin, J., Desai, B. N., Navarro, B., Donovan, A., Andrews, N. C., and Clapham, D. E. (2008) Deletion of *Trpm7* disrupts embryonic development and thymopoiesis without altering Mg²⁺ homeostasis. *Science* **322**, 756-760
2. Mochizuki, T., Sokabe, T., Araki, I., Fujishita, K., Shibasaki, K., Uchida, K., Naruse, K., Koizumi, S., Takeda, M., and Tominaga, M. (2009) The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. *J Biol Chem* **284**, 21257-21264
3. Wood, R. Eichel, L. Messing, E. M. Schwarz, E. (2001) Automated noninvasive measurement of cyclophosphamide-induced changes in murine voiding frequency and volume. *J Urol* **165**, 653-659
4. Beppu, K., Sasaki, T., Tanaka, K. F., Yamanaka, A., Fukazawa, Y., Shigemoto, R., and Matsui, K. (2014) Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron* **81**, 314-320

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	渡邊 成樹
		審査委員長	高井 章 
		審査委員	山本 明美 
		審査委員	柿崎 秀宏 
<p style="font-size: 1.2em; margin: 0;">学 位 論 文 題 目</p> <p style="font-size: 1.1em; margin: 10px 0 0 0;">Trpm7 protein contributes to intracellular junction formation in mouse urothelium</p> <p style="font-size: 0.9em; margin: 10px 0 0 40px;">「Trpm7 蛋白のマウス尿路上皮細胞間結合の形成への関与」</p> <p style="font-size: 0.9em; margin: 10px 0 0 40px;"><i>Journal of Biological Chemistry</i> 290: 29882-29892 (2015) に掲載済</p>			
<p>【背景・目的】</p> <p>Trpm7 (transient receptor potential melastatin7)は分子内にキナーゼドメインをもち、また Mg^{2+} と H^+ により開口が抑制される性質を示すユニークな非選択性陽イオンチャネルである。膀胱上皮を含む様々な組織に発現しているが、その生理的機能についてはこれまでほとんどわかっていない。そこで、膀胱上皮における <i>in vivo</i> での Trpm7 の役割を明らかにすることを目的として実験を行った。</p> <p>【方法】</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Cre-loxP システムを用い、tamoxifen を投与したときにのみ尿路上皮特異的に Trpm7 がノックアウト(KO)される conditional KO マウスを作成し、実験に供した。 ● 単離上皮細胞における電流の観察は全細胞パッチクランプ法によった。 ● 排尿行動を観察のため、床をメッシュ状にした代謝ケージにマウスを個別に飼育し、床の下に設置した尿受けに溜る尿を電子天秤でリアルタイムに秤量した。 ● HE 染色した切片を用い、膀胱組織像を光学顕微鏡で観察した。灌流固定した膀胱頭頂部切片において、細胞接着の状態を透過型電子顕微鏡をもちいて観察した。 			

【主な結果】

1. Conditional Trpm7 KO マウスの膀胱上皮細胞では、tamoxifen 投与前には野生型と同等であった Trpm7 の発現が、tamoxifen 処理により著明に減弱していることを、RT-PCR と免疫組織染色により確認した。
2. Tamoxifen 処理後の conditional Trpm7 KO マウスから単離した膀胱上皮細胞における全細胞パッチクランプ法による実験では、Trpm7 の特徴である反転電位が 0 mV 付近にあり、細胞外の Mg^{2+} と H^+ により抑制される電流が顕著に減弱していた。
3. Tamoxifen 処理した conditional Trpm7 KO マウスでは、コントロール動物(tamoxifen 処理した非 KO マウス)に比べ、一回排尿量が有意に減少していた。
4. Tamoxifen 処理した conditional Trpm7 KO マウスでは、HE 染色した膀胱上皮切片における光学顕微鏡観察において、皮下浮腫像を認めた。同部位について定量性 PCR により、炎症性サイトカイン TNF- α および IL1 β の発現が高まっていることを確認した。
5. 透過型電子顕微鏡像において、tamoxifen 処理した conditional Trpm7 KO マウスでは、膀胱上皮細胞間隙、特に、adherens junction が有意に広がっていることが観察され、Trpm7 が細胞間結合の形成に関与することが示唆された。

【評価】

本論文は、Trpm7 が膀胱上皮細胞の細胞間結合の形成に関与することを、膀胱上皮細胞特異的 conditional KO マウスを用いた *in vivo* 実験により明らかにした。分子メカニズムの詳細は不明ながら、生体内における上皮 Trpm7 の役割を初めて *in vivo* で示した意義は大きい。

論文提出者は、3名の審査員による個別の口頭試問において、本論文の内容とその重要性について明確に説明し、また、関連領域についての試問でも適切な回答を与えた。それにより、本人がこの領域において十分な知識と経験を有することを確認できた。

以上より、本審査委員会は、本論文が学位授与に値するものと判定した。