

氏名	よねざわ きりこ 米澤 貴理子		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1755 号		
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 14 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	TRPM7-mediated spontaneous $Ca^{2+}$ entry regulates the proliferation and differentiation of human leukaemia cell line K562 (TRPM7 を介した細胞内カルシウム流入はヒト白血病細胞株 K562 細胞の増殖と分化を制御する)		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	井上 隆司
	(副査) 福岡大学	教授	岩本 隆宏
	福岡大学	教授	廣松 賢治
	福岡大学	講師	遠藤 日富美

## 内容の要旨

### 【目的】

カルシウムイオン ( $Ca^{2+}$ ) は筋収縮、神経伝達物質放出、発生・分化、免疫といった種々の生理機能を調節する普遍的な細胞内メディエーターである。細胞内への  $Ca^{2+}$  流入を維持するために細胞膜には種々の  $Ca^{2+}$  流入経路が形成されている。その経路の 1 つに TRP (Transient Receptor Potential) チャネルがある。そのサブファミリーの 1 つである TRPM7 は恒常的に活性化し持続的な  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  の流入チャネルとして働いている。TRPM7 は、ほとんど全てのタイプの細胞に発現しており、生存・増殖・分化・細胞死など、生体の恒常性維持に関わる長期的な細胞応答に深く関与していることが知られている。一方、K562 細胞はヒト由来の慢性骨髄性白血病細胞株で、種々の受容体刺激や薬剤刺激によって赤芽球や巨核球系の細胞へ分化することが知られている。この性質を利用して血球の増殖異常や分化異常の研究に広く用いられてきた。一般に細胞外刺激の多くは細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の増加を介して細胞機能を調節するが、K562 細胞の増殖・分化過程において、 $Ca^{2+}$  が果たす役割についてはほとんど情報が無い。そこで本研究では、TRPM7 を介した細胞内  $Ca^{2+}$  流入が K562 細胞の増殖と分化にどのような影響及ぼすのかについて詳細に検討した。

### 【対象と方法】

各種 mRNA の発現をコンベンショナル RT-PCR 法及びリアルタイム PCR 法で、タンパク質の発現をウェスタンブロット及び免疫染色法を用いて確認した。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度は Fura-

2 を用いた蛍光イメージングで測定し、膜電流はナスタチン穿孔型の全細胞パッチクランプ法を用いて測定した。細胞増殖は自動セルカウンターシステムを用いて評価した。細胞内ヘモグロビン濃度は比色定量法を用いて測定した。

### 【結果】

コンベンショナル RT-PCR 法及びリアルタイム PCR 法を用いた全ての TRP ファミリーメンバーの mRNA 発現解析の結果から、K562 細胞には TRPM7 及び TRPV2 が優位に発現していることが判明した。更に共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫蛍光法によって、TRPM7 蛋白質は細胞膜に局在していることが分かった。次に、細胞膜の TRPM7 蛋白質が  $\text{Ca}^{2+}$  流入チャネルとして機能しているか否か調べるため、カルシウムイメージング法で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) を測定した。細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  を除去すると、静止状態（無刺激時）の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  レベルが有意に減少した。同様に、陽イオンチャネルの一般的阻害薬 SK&F96365、2-APB、RR、 $\text{Gd}^{3+}$  を投与すると、濃度依存的な  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  減少が観察された。静止状態の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が TRPM7 を介した持続的  $\text{Ca}^{2+}$  流入によって維持されているかを確定するため、パッチクランプ法による電流測定を行った。ナスタチン穿孔法下に静止電位付近での膜電流を記録すると、K562 細胞では自発的に細胞内へ陽イオンを流入させる内向き電流 ( $I_{\text{spont}}$ ) が流れており、 $\text{Ca}^{2+}$  に対して高い透過性を有することが分かった。更に  $I_{\text{spont}}$  の振幅は TRPM7 選択的阻害薬 FTY720 や siRNA 処置による TRPM7 発現のノックダウンで著しく減少した。次に、TRPM7 活性が機能的に K562 細胞の増殖と赤血球分化を制御しているか否かについて検討した。TRPM7 チャネル機能を阻害する処置（すなわち細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の除去）、TRPM7 阻害薬、TRPM7 の siRNA によるノックダウンは全て K562 細胞の増殖を抑制した。同様に、いずれの処置も分化誘導物質であるヘミンによるヘモグロビンの生合成を抑制し、K562 の赤血球分化時に誘導され、胎児ヘモグロビンの構成物質である  $\gamma$ -グロビンの合成も抑制した。最後に、以前の研究で ERK の活性化が K562 の分化・増殖において重要な役割を担っているとの報告があったため、その関与についても検討した。ヘミン処置後 3 時間では、リン酸化型（活性化型）ERK の蛋白量は一旦減少したが、3 日後には再び増加した。この結果は、以前に報告されている実験結果と良く一致した。これに対し、TRPM7 をノックダウンした細胞では、リン酸化型 ERK はヘミン処置の有無と関係なく、一貫して減少していることが分かった。

### 【結論】

K562 細胞の分化と増殖には持続的  $\text{Ca}^{2+}$  流入（すなわち一定のレベルの  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ）が必須であり、その主要な経路として TRPM7 チャネルが重要であることが強く示唆された。また、ヘミンによる赤血球分化誘導では、分化の初期・後期のいずれにおいても TRPM7 を介した一定の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  レベルの維持が必要であることが示唆された。そしてこれにより、赤血球分化へ必要なシグナルである ERK の活性が保たれていると考えられた。

## 審査の結果の要旨

TRPM7 は生体内で普遍的に発現しており、細胞容積調節や接着、成長といった生命活動の根幹に関わる機能の維持や発現に必須のCaチャネル分子であると考えられている。また、悪性腫瘍や炎症性疾患への関わりも報告されている。我々は、網膜芽細胞腫を用いた先行研究で TRPM7 が細胞増殖周期の重要な制御因子であることを明らかにした。一方、骨髄系の腫瘍細胞である K562 細胞は異常増殖と分化過程のモデル細胞としてよく用いられているが、その増殖と分化の明確な機序には不明な点が多く残されている。以上の背景を踏まえて、本研究では、TRPM7 が細胞の異常増殖と分化の重要な調節分子として働いているとの仮説を立て検討を行った。その結果、K562 細胞の増殖能の維持と赤血球分化の誘導には、この細胞において恒常的に活性化されている TRPM7 チャネルが持続的  $\text{Ca}^{2+}$  流入の経路として働き、一定の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  レベルを維持していることが必須であることが強く示唆された。そして増殖、分化いずれの過程においても TRPM7 による ERK 活性化の維持が重要であると考えられた。

### 1. 斬新さ

本研究は、K562 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の維持に TRPM7 を介した持続的  $\text{Ca}^{2+}$  流入が必要不可欠であること、また、それがこの細胞の増殖能の維持や赤血球分化の重要な制御因子として働いていることを初めて明らかにした点が斬新である。

### 2. 重要性

ストレス応答性 Ca 分子群 TRP 蛋白質スーパーファミリーの中でユニークな性質を持つ TRPM7 分子が、erythroid 系細胞の異常増殖や分化に不可欠な役割を果たしていることを初めて明らかにした点、またそれを分子標的とした新たな治療戦略の展開が可能になった点が、本研究の重要な点である。

### 3. 研究方法の正確性

本研究の遂行に当たって、異なる方法論による多角的な検証を行っており、その結論の妥当性は極めて高い。また、用いた研究手法やプロトコールについても、詳細まで正確に記述されており、今後の研究における再現性が担保されている。

### 4. 表現の明瞭性

国際的に評価のある英文雑誌のピアレビューを経て、論文全体の構成や表現は高い明瞭性を保証されている。

## 5. 主な質疑応答

- 1) Q. TRPM7 チャンネルには Mg 透過性があるが、Mg の関与の可能性に関する検討はおこなったか？  
A. メディウムからの Mg 除去や細胞内 Mg 濃度測定など、予備的な検討を幾つか行ったが、細胞が死滅したり、細胞内 Mg<sup>2+</sup>濃度変化に関しては、用いた蛍光色素の感度が不十分で安定した結果が得られなかった。よって十分な検討が行えなかった。
- 2) Q. siRNA で TRPM7 をノックダウンした細胞に対して、培養液に Mg や Ca を添加してレスキューする実験は行ったか？  
A. 行っていない。
- 3) Q. TRPM7 を介して Na<sup>+</sup>が流入することで細胞膜の脱分極がおこると別のイオンチャンネルが開いて間接的に Ca 流入を引き起こしている可能性はないか？  
A. もし電位依存性 Ca チャンネルのようなものが存在すれば、起こりえると思われる。
- 4) Q. カルシウムイメージングの結果で無処置と TRPM7 ノックダウン細胞の細胞内カルシウム濃度の絶対値は測定したか？  
A. 今回は Fura2 の Ratio のみ結果とした。
- 5) Q. 赤血球の分化マーカーのトランスフェリンやグリコホリン A で評価したか？  
A. 今回はグロビンやヘモグロビンを直接の指標としたため、行っていない。
- 6) Q. TRPM7 ノックアウトマウスで血球系の分化異常を検討した研究結果はあるか？  
A. 現段階では報告がなく、今回の我々の研究が最初のものである。
- 7) Q. TRPM7 は造血系とリンパ球系どちらにも重要と考えられるが、どのように考察するか？  
A. 造血系全般において重要であると考えられる。
- 8) Q. K562 細胞で亢進しているチロシンキナーゼ活性が TRPM7 の活性を引き起こしている可能性はないか？  
A. 現時点ではデータがない。逆に TRPM7 がもつセリン・スレオニンキナーゼ活性がそれを regulate する可能性は否定できない。
- 9) Q. TRPM7 が K562 細胞で他の細胞と比較して発現があがっているのか？  
A. 発現量を比較した論文はなく、現段階では不明である。
- 10) Q. マウスなど他の Myeloid 系の細胞で発現量が変化するという報告はないか？  
A. 調べた限りではなかった。
- 11) Q. 分化に TRPM7 のキナーゼ活性が関与している可能性は？  
A. ERK の再活性化に関与している可能性はあるかもしれないと考えている。
- 12) Q. TRPM7 を発現していない HEK 細胞とかにキナーゼ活性をはずしたチャンネル分子などを導入して検討してもおもしろいのではないか？  
A. そう思う。
- 13) Q. TRPM7 をノックダウンすると細胞増殖が抑えられているが、アポトーシスを抑制している可能性はないか？

A. Fas ligand で起こすアポトーシスは、TRPM7 ノックダウン処置によって抑制されるという報告がある。

14) Q. コンベンショナル PCR とリアルタイム PCR の違いは？

A. コンベンショナル PCR は定性検査でリアルタイム PCR は定量検査である。

15) Q. ヘアピン RNA と miRNA の違いは？

A. ヘアピン RNA は 2 本鎖で miRNA は 1 本鎖である。

16) Q. K562 細胞の培養に使用したメディウムは？

A. RPMI 培地を用いた。

17) Q. 細胞増殖実験の時に Mg 濃度を変えたか？

A. 特に Mg に変更は加えていない。

18) Q. 細胞増殖実験で TRPM7 ノックダウン細胞の死細胞数はどうだったか？

A. ノックダウンから日数が経つと死細胞数が増えていた。

19) Q. ヘミンで分化誘導した時の TRPM7 の活性の変化は？

A. 膜電流に変化はなかったので活性の変化はなかったと考えている。

本論文は、TRPM7 を介した持続的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  流入が細胞の増殖と分化の調節に必須であることを初めて示した論文である。また申請者は、審査会において審査員の質問に対しほぼ適切に答えた。よって学位論文に値すると評価された。