

氏 名 加塩 麻紀子

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1443 号

学位授与の日付 平成 23 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Molecular basis of the TRPM2 sensitization to heat and  
its involvement in the macrophage function

論文審査委員 主 査 教授 久保 義弘  
教授 富永 真琴  
教授 深田 正紀  
教授 小島 至 群馬大学

Thermoregulation is the ability of organisms to keep their body temperatures within a certain range ( $\sim 37^{\circ}\text{C}$ ) in spite of large variations in environmental temperatures. Owing to the system, the body is maintained at relatively constant temperatures, even though there is some difference between the body core and surface. Nine thermosensitive transient receptor potential (TRP) channels (thermo-TRPs) are known to detect ambient temperature and are believed to be involved in thermoregulation. The author investigated the regulatory mechanism and physiological role of TRP melastatin 2 (TRPM2) at the body temperature, which is sensitive to warm temperatures ( $>35^{\circ}\text{C}$ ).

TRPM2 is a nonselective,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cation channel, and is expressed in various organs such as the brain, pancreas, spleen, kidney and a wide range of immunocytes, such as lymphocytes, neutrophils, and monocytes/macrophages. TRPM2 plays important roles in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in these tissues and cells, and contributes to cellular functions that include insulin release, cytokine production, cell motility, and cell death. The primary activator of TRPM2 is adenosine diphosphate ribose (ADPR). ADPR belongs to the family of adenine-containing second messengers along with cyclic adenosine diphosphate ribose (cADPR) and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP), and is involved in the regulation of cellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. In the presence of ADPR or cADPR at low concentrations, heat-stimulation activates TRPM2 and evokes substantial currents. Therefore, TRPM2 is considered as a thermo-TRP. The temperature threshold for TRPM2 activation is around  $35^{\circ}\text{C}$  and the channel function of TRPM2 could be regulated by these second messengers at the relatively constant temperatures of the body.

TRPM2 is also activated by hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and involved in cell death caused by oxidative stress, even though the activation mechanism remains to be clarified. The author found the novel activation mechanism of TRPM2 induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on TRPM2 could not be fitted to a simple dose-response relationship observed in the reaction of typical agonists and their receptors, and was dependent on both concentration and duration of  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treatment. The alteration in the temperature sensitivity of TRPM2 was mediated by a reduction in the temperature threshold for TRPM2 activation, enabling channel activation and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  elevation at the physiological body temperature. The phenomenon is termed “sensitization” to heat.

Sensitization of TRPM2 was induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  independent of the production of the endogenous agonist, ADPR, and likely via oxidation of methionine residues. Although most previous studies suggested that ADPR release from intracellular organelles (such as the nucleus and mitochondria) has a primary role in the TRPM2 activation by  $\text{H}_2\text{O}_2$ , the present study found that  $\text{H}_2\text{O}_2$  could sensitize TRPM2 channel independently of ADPR. Therefore, endogenous TRPM2 channels *in vivo* could be modulated by redox signals in parallel with adenine-containing second messengers at physiological body temperature.

Cellular “redox” signals such as reactive oxygen species (ROS) (including  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and

reactive nitrogen species (RNS) play important roles in a wide range of physiological functions, and are also considered as significant signaling molecules. Especially in the immune system,  $H_2O_2$  produced by NADPH oxidase (Nox) is crucial for microorganism removal, and defects in Nox activity cause persistent infections. In addition to its microbicidal function inside the phagosome, membrane-diffusible  $H_2O_2$  could also play roles in cell signaling outside the phagosome. In an inflammatory environment,  $H_2O_2$  is produced by activated macrophages and its concentration may reach 10 - 100  $\mu M$ . Therefore, ROS generated in response to infections could be sufficient to sensitize TRPM2, which would contribute to cellular functions at physiological body temperature.

Sensitization of the heat-evoked response was also observed in wild-type (Wt) but not in TRPM2-deficient macrophages, indicating possible involvement of TRPM2 sensitization in macrophage functions. A wide range of immune responses are highly dependent on cytosolic  $Ca^{2+}$  elevation. In addition, ROS production is enhanced by cytosolic  $Ca^{2+}$ . Therefore, ROS-mediated elevation of cytosolic  $Ca^{2+}$  and  $Ca^{2+}$ -dependent ROS production may interact and amplify each other, playing central roles in innate immune responses. Indeed, zymosan-induced cytokine release was affected in TRPM2-deficient macrophages. In addition, elevated temperatures (fever) were found to enhance phagocytic activity of Wt macrophages, but not TRPM2-deficient macrophages, implying that the ROS-TRPM2 activation pathway plays a critical role in macrophage functions. This novel activation mechanism of TRPM2, sensitization to temperature, might provide new approaches to immune research.

TRP チャネルファミリーメンバーの TRPM2 は、Ca<sup>2+</sup>透過性を有し、脳、膵臓、脾臓、腎臓、そして種々の免疫系の細胞において発現しており、adenosine diphosphate ribose (ADPR) により活性化されること、細胞内 Ca<sup>2+</sup>により活性化が促進されること、低濃度の ADPR 存在下で、体温程度の温かい温度で活性化されることが、よく知られている。また、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によっても活性化されることが近年報告された。

出願者、加塩麻紀子氏は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による TRPM2 チャネル活性化の分子機構と、温度上昇による活性化との連関、そして、免疫系のマクロファージ細胞における機能的意義の解明を目的として本研究を行った。

まず、加塩氏は、TRPM2 を発現させた HEK293T 細胞の TRPM2 チャネルの活性化を Ca<sup>2+</sup>イメージングにより観察する実験を行った。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の投与により、TRPM2 の温度刺激に対する感受性が著明に高まったが、この感作効果は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の濃度と投与時間の両方に依存したことから、化学修飾等によるものと考えられた。さらに、薬理学実験により、この感作効果が Met 残基の酸化によることが示され、また、点変異体を用いた結果から、複数の Met 残基が関与していることが示唆された。この結果と呼応して、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の投与濃度の上昇につれて、温度閾値が段々と低下することが観察された。

次に、加塩氏は、この現象の生理的意義を明らかにするために、TRPM2 が発現している野生型マウス、および TRPM2 遺伝子破壊 (KO) マウス由来の腹腔内マクロファージを対象とした解析を行った。マクロファージは、貪食した異物を分解するために、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を産生する。野生型由来のマクロファージのみで、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による温度感受性細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇の感作効果が観察された。さらに、KO マウスでは、野生型に比して、マクロファージの貪食活動や、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇によりトリガーされる G-CSF 等のサイトカインの分泌が低下していることが観察された。

加塩氏の示した以上の結果を統合すると、腹腔内マクロファージにおいて、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>により TRPM2 チャネルの活性が感作されその活動が活発となること、その結果、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇し、食作用、サイトカイン放出等の免疫活動が高まること、さらに特筆すべきこととして、この現象が、炎症に伴う熱発等の体温上昇に伴い高まること、が明らかになった。

これらの知見は、免疫応答における TRPM2 の生理的役割を明らかにしたもので、さらに、本研究は熱発による免疫応答の高まりの分子機構の解明に直結する強いインパクトを有するため、その科学的価値は極めて高く評価できる。以上の理由から、審査委員会は、全員一致で、本論文が学位論文として相応しいものであると判断した。