

氏 名 Deveci, Aykut

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2375 号

学位授与の日付 2022 年 9 月 28 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 Functional interaction between TRPM2 and IKCa1 ion  
channels in mouse microglia

論文審査委員 主 査 西田 基宏  
生理科学専攻 教授  
富永 真琴  
生理科学専攻 教授  
和氣 弘明  
生理科学専攻 教授  
今泉 祐治  
名古屋市立大学 理事

(Form 3)

## Summary of Doctoral Thesis

Name in full Deveci, Aykut

Title: Functional interaction between TRPM2 and  $IK_{Ca1}$  ion channels in mouse microglia

### Summary

TRPM2 is a nonselective, calcium ( $Ca^{2+}$ )-permeable cation channel and is expressed in various organs such as the brain, pancreas, spleen, kidney and a wide range of immunocytes, including lymphocytes, neutrophils and monocytes/macrophages. TRPM2 plays important roles in  $Ca^{2+}$  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) and the activation induces a  $Ca^{2+}$  influx into the interior of the cells.

The  $Ca^{2+}$  influx induced by TRPM2 may activate other  $Ca^{2+}$ -dependent channels. The intermediate conductance  $Ca^{2+}$ -activated potassium channel ( $IK_{Ca1}$  /  $KCa3.1$  /  $SK4$ ) is of particular interest. The  $Ca^{2+}$  affinity for the  $IK_{Ca1}$  channel is provided by calmodulin (CaM) via lobes present on the protein. Once CaM is activated by  $Ca^{2+}$  binding, the  $IK_{Ca1}$  channel is opened, allowing potassium ( $K^+$ ) efflux from the intracellular compartment to the extracellular medium.  $K^+$  movement is accompanied by chloride ( $Cl^-$ ) efflux and water loss that promotes different physiological processes such as proliferation, migration, cell volume changes, cytokine production and inflammation.

To initiate this study, I used HEK293T cells in order to assess if TRPM2 and  $IK_{Ca1}$  channels collaborated. I used different pharmacological tools as ADPR and TRAM-34

(a specific inhibitor of  $IK_{Ca1}$  channels) to discriminate between the channels. After confirming that these channels constituted a network and confirming their physical interaction by examining the  $E_{rev}$  value shift, I noticed that they cause cell volume changes. Based on those results, I extended the experiments to mouse primary microglia because both of the channels are expressed in this cell. The literature confirmed that microglia express both TRPM2 and  $IK_{Ca1}$  channels. After assessing the purity of the microglia that I isolated from new-born (days 1 – 3) mice, I demonstrated that the TRPM2 /  $IK_{Ca1}$  channel network functioned in mouse primary microglia based on the  $E_{rev}$  value shift. I demonstrated that this network could also take part in cell volume changes in mouse primary microglia. Based upon that information, I hypothesized that cell volume changes could be linked to cell migration. In that regard, understanding how microglia proliferate and migrate could suggest improved strategies for treatments of CNS-linked diseases.

It is known that microglia adopt different states in response to the changes in their microenvironment, i.e., an active state and a resting state. The different states of microglia could be associated with the intensity and duration of the pathological environment. When microglia are subjected to homeostatic disturbances, for example neuroinflammation or injury, these cells become activated. The activated state is phenotypically characterized by the retraction of ramifications, swelling of the soma, and an overall amoeboid appearance. This phenotype confers motility to microglia and allows them to move by following the chemotactic gradient towards the site of injury. Migration of microglia can be described as a repeated and coordinated cycle of protrusion of the front and retraction of the tail portion. Here, I demonstrated that cell volume changes are correlated with microglial migration, meaning that the TRPM2 /  $IK_{Ca1}$  network is implicated in the motility of mouse primary microglia. I describe for the first time that inhibiting the  $IK_{Ca1}$  channel decreases the motility of mouse primary microglia *in vitro*.

Next, I investigated whether the TRPM2 / IK<sub>Ca1</sub> network was implicated in cytokine production. Microglia are mainly involved in CNS homeostasis by monitoring changes in their microenvironment (resting state) or by adopting protective features, such as initiating their own inflammatory response (activated state). I found that the TRPM2 / IK<sub>Ca1</sub> network was essential for IL-1 $\beta$  production. Taken together, these results deepen our understanding of microglia phenotypes and function.

This novel TRPM2 / IK<sub>Ca1</sub> ion channel network might provide new approaches to neurologic and physiological research and lead to new tools for the prevention or cure of CNS-linked diseases.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏 名 Deveci, Aykut

Title  
論文題目 Functional interaction between TRPM2 and IK<sub>Ca</sub>1 ion channels in mouse microglia

本論文は、温度やレドックス状態といった環境変化を感知し開口活性化する Ca<sup>2+</sup>透過型チャンネル TRPM2 と、細胞の容積調節を担う Ca<sup>2+</sup>活性化 K<sup>+</sup>チャンネル (IK<sub>Ca</sub>1) が機能的に共役し、ミクログリアの遊走やサイトカイン産生に関わることを示した研究である。

脳のマクローファージとも呼ばれるミクログリアは、IK<sub>Ca</sub>1 チャンネル活性化による K<sup>+</sup>放出を介して細胞容積を膨潤させ、それに伴って自身を遊走させる。しかし、IK<sub>Ca</sub>1 チャンネル活性化を制御する Ca<sup>2+</sup>供給源については不明であった。出願者は、脳組織やマクローファージに多く発現する TRPM2 に着目し、TRPM2 チャンネルと IK<sub>Ca</sub>1 チャンネルとの機能的共役を電気生理学的・薬理学的手法を用いて実証した。

最初に、ヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞株に TRPM2 と IK<sub>Ca</sub>1 を共発現させ、ホールセルパッチクランプで得られる各チャンネルの逆転電位 (E<sub>rev</sub>) を指標に TRPM2 と IK<sub>Ca</sub>1 との機能的共役を調べた。TRPM2 活性化剤を電極内から処置すると、TRPM2 由来の E<sub>rev</sub> が IK<sub>Ca</sub>1 チャンネルの E<sub>rev</sub> にシフトし、このシフトは IK<sub>Ca</sub>1 阻害剤を処置することで抑制された。また、IK<sub>Ca</sub>1 活性化依存的に TRPM2/IK<sub>Ca</sub>1 共発現 HEK293T の細胞容積が減少することも確認された。

次に、新生児の野生型および TRPM2 欠損マウスのミクログリアを単離し、初代培養系を用いて TRPM2- IK<sub>Ca</sub>1 機能共役を評価した。パッチ電極内液に Ca<sup>2+</sup>がない状態では TRPM2 活性化剤を処置しても IK<sub>Ca</sub>1 活性化が十分に誘導されなかったが、電極内液に Ca<sup>2+</sup>を添加することで、TRPM2 活性化剤による内因性 IK<sub>Ca</sub>1 電流の活性化が観察され、ここでの E<sub>rev</sub> のシフトもまた、IK<sub>Ca</sub>1 阻害剤を処置することで抑制された。初代培養ミクログリアもまた、TRPM2 活性化剤処置により IK<sub>Ca</sub>1 活性化依存的に細胞容積が減少することがわかった。TRPM2- IK<sub>Ca</sub>1 機能共役による細胞容積の減少は、ミクログリア遊走時にみられる突起伸長に伴う細胞体の退縮であると考え、次にミクログリアの運動能を評価した。通常培養条件下 (37°C) でみられる運動能は熱刺激 (40°C) によって増加し、これらは TRPM2 欠損または IK<sub>Ca</sub>1 阻害剤処置によって強く抑制された。TRPM2 欠損ミクログリアにおいても熱刺激により運動能が増加し、この増加は IK<sub>Ca</sub>1 阻害剤処置によって抑制されることが確認された。さらに、リポ多糖処置により活性化させたミクログリアから産生される interleukin-1β (IL-1β) も、TRPM2 欠損により部分的に、IK<sub>Ca</sub>1 阻害剤処置により完全に抑制されることが明らかとなり、TRPM2- IK<sub>Ca</sub>1 機能共役の関与が示された。

本研究成果は、TRPM2 と IK<sub>Ca</sub>1 が機能的に共役し、ミクログリアの遊走、サイトカイン産生を制御することを見出した意義深い研究である。以上の理由により、審査委員会は、本論文が学位の授与に値すると判断した。