

■受領No.1341

オーダーメイド医療を志向した薬剤性低 Mg^{2+} 血症感受性遺伝多型の機能解析

代表研究者

五十里 彰

岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室 教授



1. 研究目的

医療現場では分子標的治療薬とコンパニオン診断を組み合わせるにより、個別化医療の推進が期待されている。一般的に個別化医療は治療効果の向上だけでなく、副作用の低減にも有用である。抗がん剤の抗上皮成長因子受容体 (EGFR) 抗体の効果予測因子としてKRAS遺伝子の変異の有無が測定され、高い治療効果が得られるようになったが、20%もの高頻度で低 Mg^{2+} 血症の副作用が出現する。また、胃潰瘍の第一選択薬であるプロトンポンプ阻害剤 (PPI)、高血圧の治療に使用される利尿剤、臓器移植や膠原病の治療に使用される免疫抑制剤の投与により、低 Mg^{2+} 血症の出現が国内外で多数報告されている。低 Mg^{2+} 血症は致死性の不整脈や高カリウム血症とともに慢性腎臓病を引き起こすため、適切な処置が必要である。しかし、現在の低 Mg^{2+} 血症の治療では、原因薬剤の投与の中止や減量が必要とされ、原疾患の治療効果が低減する可能性が高い。さらに、血中 Mg^{2+} 濃度の正常化に数週間の時間を要する場合もあり、薬物治療の長期中断が大きな問題になっている。このように、 Mg^{2+} 代謝の異常は薬物治療の大きな障害になっているにも関わらず、有効な予防・治療法は未開発である。その原因として、薬剤性低 Mg^{2+} 血症の発症機序が未解明であることや低 Mg^{2+} 血症の予測が困難であることが考えられる。これまでに我々は、薬剤性低 Mg^{2+} 血症にTRPM6 Mg^{2+} チャンネルの発現低下が関与すること

を報告してきたが、その改善作用を有する化合物はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、低 Mg^{2+} 血症の回避に向けたオーダーメイド医療を実現するため、低 Mg^{2+} 血症誘発薬剤によるTRPM6の発現低下を抑制する化合物を探索した。

2. 研究内容

2.1 TRPM6 発現に対する抗がん剤の効果

腎臓の糸球体でろ過された Mg^{2+} のうち、5~10%が遠位尿細管から再吸収される。遠位尿細管の管腔側に発現する TRPM6 と、血管側に発現するACDP2を介して、 Mg^{2+} が経細胞的に輸送されると考えられている。これまでに我々は、ラット腎尿細管由来 NRK-52E 細胞に TRPM6 Mg^{2+} チャンネルが発現し、その発現が抗がん剤のエルロチニブ処理によって低下することを報告した。糖尿病治療薬のロシグリタゾンが TRPM6 の発現低下を改善することを見出したので、その作用機序を検討した。

2.2 抗がん剤による TRPM6 の発現低下に対するロシグリタゾンの改善効果

NRK-52E細胞からRNAを抽出後、リアルタイムPCR法でmRNA量を解析した。エルロチニブ存在下、ロシグリタゾンの処理によってTRPM6 mRNA量が有意に増加したが、ACDP2やTRPM6のホモログであるTRPM7の発現量は変化しなかった (図1)。ロシグリタゾンは peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) のアゴニストとして作用することが報告されているた

め、PPAR γ アンタゴニストであるGW-9662の効果を検討したところ、TRPM6の発現増加が有意に阻害された。次に、PPAR γ のリン酸化と核移行に対するロシグリタゾンの効果を検討した。ロシグリタゾン未処理細胞で、PPAR γ は主に細胞質に分布していた (図2)。ロシグリタゾン処理により、PPAR γ のリン酸化量と核内の分布量が増加した。この効果は、GW-9662の共処理によって阻害された。以上の結果から、ロシグリタゾンはPPAR γ のリン酸化と核移行を介して、TRPM6の発現を増加させることが示唆された。

2.3 抗がん剤による TRPM6 発現低下に対するロシグリタゾンの改善効果

PPAR γ はretinoid X receptor (RXR) と二量体を形成するため、蛍光免疫染色法でRXRの局在を調べたところ、ロシグリタゾンやGW-9662の処理によって局在は変化せず、核内に分布した。そのため、RXRに内因性基質が結合しており、ロシグリタゾンによるTRPM6の発現増加にRXRの局在変化は関与しないことが示唆された。一方、ロシグリタゾンによるTRPM6の発現増加はRXRアンタゴニストであるHX-531の処理で阻害されたため、PPAR γ が作用する際にRXRが活性化状態で存在する必要があると示唆された。これまでに我々は、TRPM6の発現量がERK1/2、c-Fos、c-Junといった細胞内シグナル伝達因子によって調節されることを報告している。これらのリン酸化に対するロシグリタゾンの効果を検討したが、いずれもリン酸化量は有意に変化しなかった。そのため、ロシグリタゾンは既知のシグナル伝達経路に関与せず、PPAR γ に選択的に作用することが示唆された。

2.4 Mg²⁺輸送に対するロシグリタゾンの効果

Mg²⁺感受性蛍光指示薬のKMG-20を用いて、細胞内へのMg²⁺流入に対するロシグリタゾンの効果を検討した。Mg²⁺不含溶液に1 mM MgCl₂を

添加すると、時間依存的に細胞内遊離Mg²⁺濃度が増加した。ロシグリタゾンの前処理によってMg²⁺濃度の変化量が増大し、この効果はGW-9662の共処理によって阻害された。これらの結果は、リアルタイムPCRの結果と一致する。ロシグリタゾンによって増加したTRPM6は細胞膜に分布し、Mg²⁺チャンネルとして機能することが示唆された。

2.5 TRPM6の転写活性に対するロシグリタゾンの効果

TRPM6のプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクターを用いて、TRPM6の転写活性に対するロシグリタゾンの効果を検討した。ロシグリタゾンの処理によってTRPM6のプロモーター活性が増大し、この効果はGW-9662の共処理によって阻害された (図3)。PPAR γ の結合が予測されるプロモーター領域に変異を導入したところ、ロシグリタゾンによるプロモーター活性の増加が阻害された。また、クロマチン免疫沈降法において、ロシグリタゾンによってTRPM6のプロモーター領域とPPAR γ の結合量が増加し、この効果がGW-9662の共処理によって阻害された。

以上の結果から、糖尿病治療薬として使用されるロシグリタゾンは、Mg²⁺再吸収の促進作用を有することが示唆された (図4)。薬剤性低Mg²⁺血症の副作用のリスクが高い患者には、事前にMg²⁺製剤やMg²⁺吸収促進剤を投与することにより、原疾患の治療効果が向上することが期待される。

3. 発表 (研究成果の発表)

1. 高階 優衣、眞鍋 綾、遠藤 智史、松永 俊之、長谷川 元、五十里 彰：MAPキナーゼ経路の活性化を介したクエン酸ナトリウムによるTRPM6マグネシウムチャンネルの発現増加、日本薬学会第139年会、千葉、2019年3月22日
2. 丸中 歌菜、松永 俊之、遠藤 智史、古田 巧、長谷川 元、五十里 彰：家族性低マグネシウム

血症におけるクロードイン-16の細胞内蓄積と治療戦略、第65回中部日本生理学会、愛知、2018年11月16日

3. 高階 優衣、眞鍋 綾、遠藤 智史、松永 俊之、長谷川 元、五十里 彰：腎尿細管上皮細胞におけるTRPM6マグネシウムチャネルの発現に対するクエン酸ナトリウムの効果、第82回日本生化学会中部支部例会、岐阜、2018年5月19日
4. Takashina, Y., Manabe, A., Tabuchi, Y., Ikari, A., Cyanidin increases the expression of Mg²⁺ transport carriers mediated by the activation of PPAR α in colonic epithelial MCE301 cells. *Nutrients*, 11, 3, 641 (2019)
5. Manabe, A., Furukawa, C., Hasegawa, H., Matsunaga, T., Endo, S., Ikari, A., Upregulation of transient receptor potential melastatin 6

channel expression by rosiglitazone and all-trans-retinoic acid in erlotinib-treated renal tubular epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 234, 6, 8951-8962 (2019)

6. Takashina, Y., Manabe, A., Hasegawa, H., Matsunaga, T., Endo, S., Ikari, A., Sodium citrate increases expression and flux of Mg²⁺ transport carriers mediated by activation of MEK/ERK/c-Fos pathway in renal tubular epithelial cells. *Nutrients*, 10, 10, 1345 (2018)

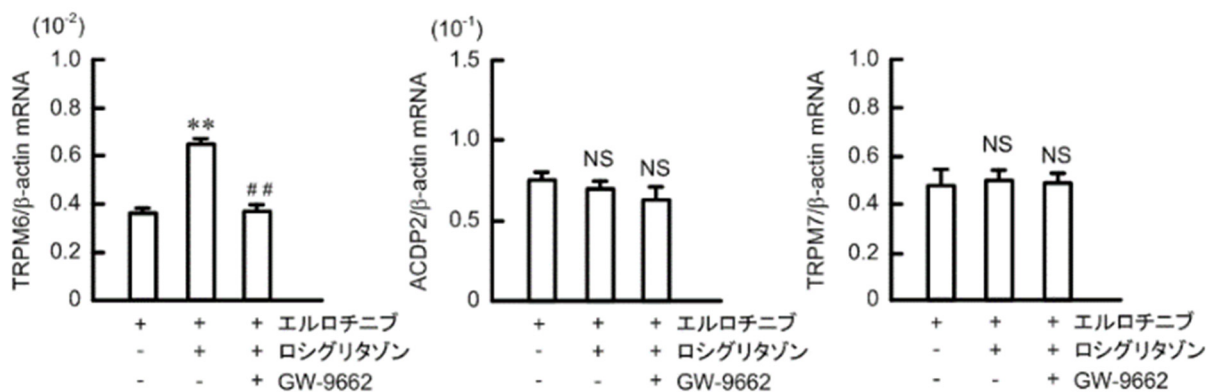


図1 Mg²⁺ チャネルの発現に対するロシグリタゾンの効果

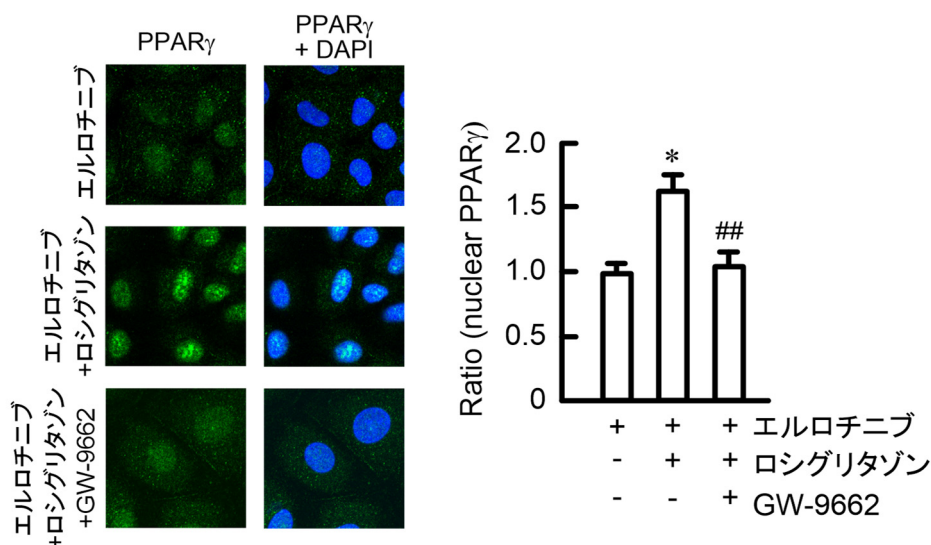


図2 PPAR γ の細胞局在に対するロシグリタゾンの効果

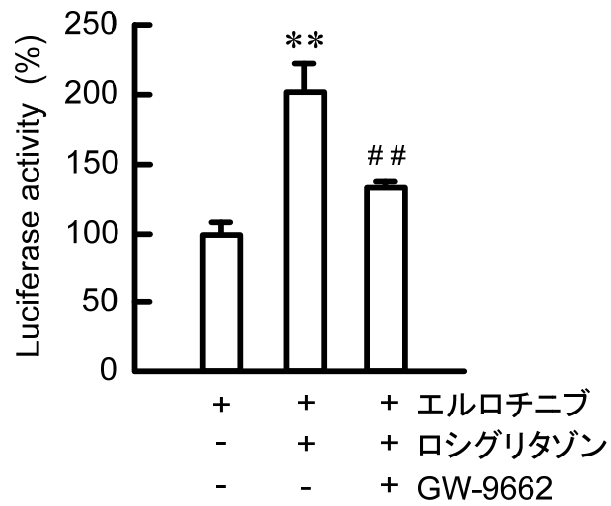


図 3 TRPM6 の転写活性に対するロシグリタゾンの効果

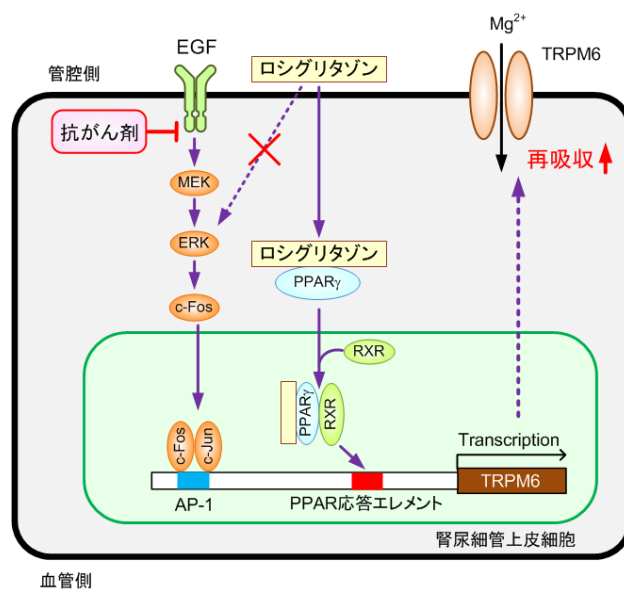


図 4 ロシグリタゾンによる TRPM6 発現と Mg^{2+} 再吸収の増加機構