The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	TRPM5 Negatively Regulates Calcium-Dependent Responses in Lipopolysaccharide-Stimulated B Lymphocytes
Author(s)	坂口, 大起
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/77611
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	坂口　大起
論文題名 Title	TRPM5 Negatively Regulates Calcium-Dependent Responses in Lipopolysaccharide-Stimulated B Lymphocytes （TRPM5はBリンパ球においてリポ多糖刺激で誘導されるCa^{2+}応答を制御する）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

Bリンパ球の主たる機能としては抗原特異的な抗体産生がよく知られるところであるが、リポ多糖（LPS）刺激に反応してインターロイキン6（IL-6）をはじめとする炎症性サイトカインを産生し急性炎症にも関与することが報告されている。リンパ球におけるサイトカイン産生の分子機序はTリンパ球の方で解析が進んでおり、Tリンパ球ではCa^{2+}応答依存的にサイトカイン産生が誘導され、さらにそのCa^{2+}応答はCa^{2+}反応性一価陽イオンチャネル（Ca^{2+}-activated monovalent cation (CAM) channel）のひとつTRPM4による負の制御を受けている。Bリンパ球においてもCa^{2+}応答は誘導され、さらにCAMチャネルのひとつTRPM5が発現していることも知られているが、その機能は明らかにされていない。我々はBリンパ球におけるTRPM5の機能的役割を探るべく、Ca^{2+}応答やそれに関連するサイトカイン産生をはじめとしたBリンパ球機能との関連性を評価した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

まずマウス脾臓Bリンパ球を採取してLPS刺激を加え、フローサイトメトリーを用いて細胞内Ca^{2+}濃度および膜電位の変化を評価したところ、ともに有意な上昇を認めた。TRPM5欠損マウスを作製し、同様に脾臓Bリンパ球にLPS刺激を加えると、野生型に比し膜電位の上昇は抑制された一方で細胞内Ca^{2+}濃度上昇は亢進し、その傾向はNa^{+}を含まない培養液中では消去されたことから、Bリンパ球のTRPM5はLPS刺激に伴うCa^{2+}応答に反応してNa^{+}流入依存的に脱分極を誘導し、Ca^{2+}応答を負に制御していることが示唆された。

Bリンパ球においてCAMチャネルとしての機能発現が示されたTRPM5のBリンパ球機能との関連性を評価すべく、次に野生型とTRPM5欠損マウスとで脾臓Bリンパ球の増殖能を、トリチウム標識チミジンを用いて比較した。TRPM5欠損細胞ではLPS刺激に対する増殖反応が亢進しており、中でもLPSを含むTリンパ球非依存的抗原の認識を主に担うとされる辺縁帯Bリンパ球において特に顕著な亢進が認められた。TRPM5欠損に伴うCa^{2+}応答の亢進が辺縁帯Bリンパ球における遺伝子発現プロファイルに変化をもたらしている可能性を考え、次にRNAシークエンシングによってLPS刺激下における辺縁帯Bリンパ球の遺伝子発現を網羅的に解析した。野生型の辺縁帯Bリンパ球において、LPS刺激によって最も発現が上昇する分子としてはIL-6が見出され、さらにその発現はTRPM5欠損細胞で有意に亢進していた。Upstream regulator解析から、IL-6の発現に関与する既知の転写因子の中でTRPM5欠損によって最も機能が亢進するものとしてRelAが見出され、ウェスタンブロッティングによってその核内移行の亢進を、さらにクロマチン免疫沈降によってIL-6遺伝子プロモーター領域への結合亢進も確認することができた。これらの結果からBリンパ球においてTRPM5は、LPS刺激により誘導されるCa^{2+}応答の抑制を介して、RelA 活性化とそれに続くIL-6産生ならびに増殖反応を負に制御していることが示唆された。

次にBリンパ球由来のIL-6産生ならびにTRPM5によるその制御機構と急性炎症との関連性を評価すべく、TRPM5欠損マウスに虫垂結紮穿刺およびLPS静注を施してエンドトキシンショックを誘導したところ、野生型に比して血中IL-6濃度および死亡率の有意な上昇を示した。さらにこの差は辺縁帯Bリンパ球除去によって消失したことから、TRPM5を介した辺縁帯Bリンパ球由来のIL-6産生の抑制は全身性の急性炎症の制御に寄与することが示唆された。

〔総　括(Conclusion)〕

TRPM5はBリンパ球においてLPS刺激により誘導されるCa^{2+}応答に対し抑制的に作用し、敗血症に伴う急性の全身炎症反応の制御にも寄与していると考えられる。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名） 坂 口 大 起			
論文審査担当者		（職）	氏 名
	主 査	大阪大学教授	坂田泰史
	副 査	大阪大学教授	三浦 高
	副 査	大阪大学教授	茂呂和世

論文審査の結果の要旨

Bリンパ球では蛋白抗原やリポ多糖（LPS）による刺激を介してカルシウム応答が生じ、サイトカイン産生などが誘導されることが知られているが、そのフィードバック制御機構に関しては不明であった。

本研究では、LPS刺激を受けたBリンパ球ではカルシウム応答に反応して、カルシウム反応性一価陽イオンチャネルのTRPM5がナトリウム流入依存的に脱分極を誘導し、カルシウム応答ならびに炎症性サイトカインであるインターロイキン6（IL-6）の産生を負に制御していることが明らかとなった。さらにこのTRPM5によるBリンパ球のIL-6分泌抑制機構が、エンドトキシンショックに伴う全身性の急性炎症の制御にも重要であることが示された。

ヒトにおいても重症細菌感染症に合併する敗血症性ショックなどで、このBリンパ球のTRPM5活性に対する介入が新たな治療ストラテジーとなることが期待されることから、本論文の成果は学位の授与に値すると考える。