

## TRPM6 を標的とした新たな低マグネシウム血症治療法の開発

五十里 彰<sup>1</sup>, 長谷川 元<sup>2</sup>, 伊藤 善規<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 岐阜薬科大学薬学部, <sup>2</sup> 埼玉医科大学医学部, <sup>3</sup> 岐阜大学医学部

**概要** 生体にとってマグネシウムはエネルギーを利用する酵素の補助因子として不可欠なミネラルであり, マグネシウム不足は高血圧や糖尿病などの疾患に関与する。上皮成長因子受容体を標的としたゲフィチニブやエルロチニブといった抗癌剤が非小細胞肺癌の治療に使用されるようになり, 従来の殺細胞性抗癌剤にみられる副作用が少なく, 癌の治療効果が向上した。しかし, 低マグネシウム血症の副作用の出現により, 抗癌剤の投与が中止され, 期待された効果が得られないことがある。また, 消化性潰瘍や逆流性食道炎の治療に使用されるプロトンポンプ阻害剤, 高血圧の治療に使用される利尿剤を含め多くの薬剤が低マグネシウム血症を引き起こすことが報告されている。マグネシウム代謝の異常は致死的な症状を引き起こすにも関わらず, 有効な治療法は見つかっていない。近年我々は, 腎臓の遠位尿細管に分布する TRPM6 チャンネルが, 薬剤性低マグネシウム血症に関与することを報告した。本研究では, 抗癌剤による低マグネシウム血症の発症機序を解明し, TRPM6 を標的とした低マグネシウム血症治療薬の候補となる化合物を探索した。

ラット腎尿細管由来の NRK-52E 細胞を EGFR 阻害剤のエルロチニブ存在下で TNF- $\alpha$  処理すると, TRPM6 発現量が濃度依存的に増加した。TRPM6 の発現は ERK によって調節されるが, TNF- $\alpha$  は ERK のリン酸化量を変化させなかった。一方, TNF- $\alpha$  は NF- $\kappa$ B のリン酸化量を増加させた。NF- $\kappa$ B 阻害剤の BAY 11-7082 や PDTC を共処理すると, TNF- $\alpha$  による TRPM6 発現の増加が阻害された。ビオチン化法により細胞膜上の TRPM6 の分布量を調べたところ, TNF- $\alpha$  処理によって増加し, この効果は NF- $\kappa$ B 阻害剤の共処理によって阻害された。転写調節に対する効果を検証するため, TRPM6 のレポーターアッセイを行った。-1,140/-1,131 と -940/-931 の領域に NF- $\kappa$ B の結合が予測されたため, それぞれ変異を導入したところ, TNF- $\alpha$  によるレポーター活性の増加が -940/-931 領域の変異体で阻害された。この部位に TNF- $\alpha$  が結合することが示唆されたため, クロマチン免疫沈降を行った。核抽出物を抗 NF- $\kappa$ B 抗体で免疫沈降したところ, TNF- $\alpha$  処理細胞でプロモーター領域が増幅されたが, NF- $\kappa$ B 阻害剤共処理細胞では増幅されなかった。最後に細胞内へのマグネシウム流入に対する TNF- $\alpha$  と阻害剤の効果を検討した。TNF- $\alpha$  処理細胞では, 非処理細胞に比べて有意にマグネシウム濃度が増加し, この効果は NF- $\kappa$ B 阻害剤の共処理によって阻害された。

以上の結果から, TNF- $\alpha$  は NF- $\kappa$ B の活性化を介して, 抗癌剤で引き起こされる低マグネシウム血症の副作用を予防・改善することが示唆された。

### 1. 研究目的

生体にとってマグネシウムはエネルギーを利用する酵素の補助因子として不可欠なミネラルであり, 腸管からの吸収と腎尿細管からの再吸収によって体内のマグネシウム含量は厳密に調節される。抗癌剤, 利尿剤, 免疫抑制剤などの薬剤の使用により, 低マグネシウム血症の副作用が引き起こされることがあるが, その機序は不明な点が多

い。上皮成長因子受容体を標的としたゲフィチニブやエルロチニブといった抗癌剤が非小細胞肺癌の治療に使用されるようになり, 癌の薬物治療効果が向上した。しかし, 低マグネシウム血症の副作用の出現によって薬剤の投与が中止され, 期待された効果が得られないことがある。また, 低マグネシウム血症からの回復には, 薬剤の投与を中止してから 4~6 週間という長い時間を要する<sup>(1)</sup>。そのた

め、低マグネシウム血症の予防法及び効果的な治療法の開発が期待されている。

二次性低カルシウム血症を伴う低マグネシウム血症の患者で、transient receptor potential melastatin 6 (TRPM6) マグネシウムチャネルの遺伝子変異が報告された<sup>(2,3)</sup>。腎臓において TRPM6 は遠位尿細管の管腔側膜に局在していることから<sup>(4)</sup>、管腔から細胞内へのマグネシウム輸送を担うことが示唆された。血液中のマグネシウムイオンは、糸球体でろ過後、大部分が尿細管から再吸収される。遠位尿細管におけるマグネシウム再吸収量は糸球体ろ過量の5%程度と少ないが、体内のマグネシウム含量を微調整するために TRPM6 は重要な役割を果たすと考えられる。

TRPM6 過剰発現細胞を用いて、チャネル機能や細胞内局在の調節機構が解析されてきた<sup>(2,5,6)</sup>。一方、TRPM6 mRNA の発現調節機構は大部分が不明であった。孤発性常染色体劣性低マグネシウム血症の患者で EGF 遺伝子の変異が同定された<sup>(7)</sup>。また、TRPM6 の機能が低下していたため、EGF が TRPM6 の機能や発現調節に関与することが示唆された。EGF 受容体(EGFR)の活性化により、extracellular signal-regulated kinase 1 and 2(ERK1/2)や phosphatidylinositol 3-kinase などの細胞内シグナル伝達因子が活性化する。これまでに我々は、EGF が MEK/ERK/c-Fos 経路の活性化を介して、TRPM6 発現を増加させることを報告した<sup>(8,9)</sup>。

本研究において、EGFR チロシンキナーゼに作用する抗癌剤が MEK/ERK/c-Fos 経路を阻害し、TRPM6 発現を低下させることを見出した。そこで、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の存在下で TRPM6 発現を増加させる因子を探索し、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ を同定した。TNF- $\alpha$ は EGFR チロシンキナーゼ阻害剤による低マグネシウム血症を改善することが期待できるため、その作用機序を検討した。

## 2. 研究方法

### 2.1 細胞培養とトランスフェクション

ラット尿細管由来 NRK-52E 細胞(IFO50480)とヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞(RCB1637)を DMEM 培地(5% FCS 含)で培養し、3~4 日毎にトリプシン溶液を用いて継代した。実験に使用する前日に、FCS 不含の DMEM 培地に置換した。TRPM6/pcDNA5TO ベクターは、A.-L.

Perraud 博士(National Jewish Medical and Research Center, 米国)に分与していただいた。Lipofectamine 2000 を用いて、常法によりベクターをトランスフェクションした。

### 2.2 細胞抽出画分、核画分、膜画分の調製

細胞を PBS で 2 回洗浄後、セルスクレーパーで掻き集めマイクロチューブに移し、5,000 rpm, 4°C で 2 分間遠心した。上清を除去し、lysis buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% SDS) で懸濁し、20 秒間のソニケーションにより細胞膜を破壊した。引き続き 8,000 rpm で 5 分間遠心して得られた上清画分を細胞抽出画分として使用した。また、NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents(サーモフィッシュヤーサイエンティフィック)を用いて、核画分と細胞質画分を調製した。ビオチン化アッセイでは、以前に報告した方法<sup>(10)</sup>で細胞膜表面のタンパク質をビオチン標識した。

### 2.3 SDS-PAGE とウエスタンブロット

7.5%, 10%, 15% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。ゲルから PVDF 膜へタンパク質を転写後、一次抗体および二次抗体を反応させた。ブロッキングには 2% スキムミルクを使用した。ただし、リン酸化抗体を使用する場合は、2% ウシ血清アルブミンでブロッキングした。バンドの検出には、EzWestLumi plus 試薬および C-DiGit Blot Scanner(LI-COR Biotechnology, 米国)を使用した。

### 2.4 RT-PCR

細胞を PBS で 2 回洗浄後、ISOGEN II で溶解して回収した。遠心操作により、total RNA を抽出して水に溶解した。RNA 濃度を測定後、ReverTraAce qPCR RT Kit(東洋紡ライフサイエンス)を用いて逆転写反応を行った。その後、Table 1 に示すプライマーを使用して、リアルタイム PCR を行った。反応条件は、初期変性(98°C, 2 分)、変性(98°C, 10 秒)とアニーリング/伸長反応(60°C, 35 秒)を 45 サイクルとした。 $\beta$ -アクチンを内在性コントロールとして、比較 Ct 法により標的遺伝子の相対的な発現量比を算出した。

### 2.5 蛍光免疫染色

細胞をカバーガラス上に培養し、細胞膜を蛍光標識するため lectin from *Triticum vulgare*/WGA-FITC でインキュベートした。その後、メタノールで固定し、4%ブロックエースでブロッキングした。一次抗体として抗 TRPM6 抗体、二次抗体として Alexa Fluor 546 抗ウサギ IgG 抗体とインキュ

**Table 1.** プライマーの配列

Rat TRPM6 (rTRPM6)	Sense	5'-CTTCTTGGGATACCAAATCAG-3'
	Antisense	5'-GAAACTTTTCCTAGTGTAGCTG-3'
Rat TRPM7 (rTRPM7)	Sense	5'-AACCAACACTCTGGAAGAGATCA-3'
	Antisense	5'-TCAGTCAAGTTTTCTCCCACAC-3'
Rat $\beta$ -actin	Sense	5'-CCAACCGTGAAAAGATGACC-3'
	Antisense	5'-CCAGAGGCATACAGGGACAG-3'
Human TRPM6 (hTRPM6)	Sense	5'-AAAGTTCAATTGGAGTTGACAAGA-3'
	Antisense	5'-AAATTATTCCTTTCAATGGCTGA-3'
Human $\beta$ -actin	Sense	5'-CCTGAGGCACTCTTCCAGCCTT-3'
	Antisense	5'-TGCGGATGTCCACGTCACACTTC-3'

バートした。LSM700 共焦点レーザー顕微鏡(カールツァイス, 独国)を用いて, 蛍光観察を行った。

## 2. 6 プロモーターアッセイ

ヒト TRPM6 のプロモーター領域を組み込んだ pGL4.1 ルシフェラーゼベクターを使用した。KOD-plus Mutagenesis kit (東洋紡ライフサイエンス)を用いて,  $\kappa$ B 結合領域の変異体を作製した。Dual-Glo Luciferase assay kit を用いてルシフェラーゼの発光強度を測定し, TRPM6 のプロモーター活性を算出した。

## 2. 7 クロマチン免疫沈降

HEK293 細胞をコンフルエントまで培養し, 薬物処理後, EpiQuik Chromatin Immunoprecipitation kit (Epigentek, 米国)を用いてクロマチン免疫沈降を行った。免疫沈降には, 抗NF- $\kappa$ B 抗体を使用した。得られた沈降物を鋳型とし, プライマー (sense: 5'-CTGTGTGCTTTGTGCCACCTC-3', antisense: 5'-GAAATGGGGTCTCACTATGTTG-3')を用いて PCR を行った。

## 2. 8 細胞内マグネシウム濃度 ( $[Mg^{2+}]_i$ ) の測定

$[Mg^{2+}]_i$  の測定には HBSS (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM HEPES, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, pH 7.4) を使用した。KMG-20-AM を負荷後, 蛍光プレートリーダー (テカン Infinite F200 Pro) を用いて  $[Mg^{2+}]_i$  を経時的に測定し, 測定を始めてから 30 秒後に 1 mM MgCl<sub>2</sub> を添加した。測定開始時の値を 1 とし, 相対値で表す。

## 3. 研究結果

### 3. 1 TRPM6 の発現に対する EGF と TNF- $\alpha$ の効果

NRK-52E 細胞を用いて, TRPM6 の発現をウエスタンブロット法により確認した。EGF 処理により TRPM6 発現量が増加し, この効果は EGFR チロシキナーゼ阻害剤のゲフィチニブ, エルロチニブ, ラパチニブの共処理により阻害された。一方, TRPM6 のホモログである TRPM7 の発現量は, EGF や EGFR チロシキナーゼ阻害剤によって変化しなかった。EGF 以外の TRPM6 発現促進因子を探索したところ, TNF- $\alpha$  が濃度依存的に TRPM6 発現量を増加させることを見出した。50 ng/ml TNF- $\alpha$  による効果は, 100  $\mu$ g/ml EGF による効果と同程度であった。EGF による TRPM6 発現量の増加はエルロチニブの共処理によって阻害されたが, さらに TNF- $\alpha$  を添加することによって TRPM6 発現量が増加した (Fig. 1)。EGF は ERK1/2 のリン酸化量を増加させ, この効果はエルロチニブの共処理によって完全に阻害された (Fig. 2)。エルロチニブ存在下, TNF- $\alpha$  は ERK1/2 量を増加させなかった。一方, EGF は NF- $\kappa$ B のリン酸化量を変化させなかった。また, TNF- $\alpha$  はエルロチニブ存在下でも NF- $\kappa$ B のリン酸化量を増加させ, この効果は NF- $\kappa$ B 阻害剤の BAY 11-7082 や PDTC の共処理によって阻害された。EGF, エルロチニブ, TNF- $\alpha$  処理により, ERK1/2 と NF- $\kappa$ B の発現量は変化しなかった。以上の結果より, TNF- $\alpha$  は EGF と異なり, NF- $\kappa$ B の活性化を介して TRPM6 発現量を増加させることが示唆された。

### 3. 2 TRPM6 の細胞膜局在に対する TNF- $\alpha$ の効果

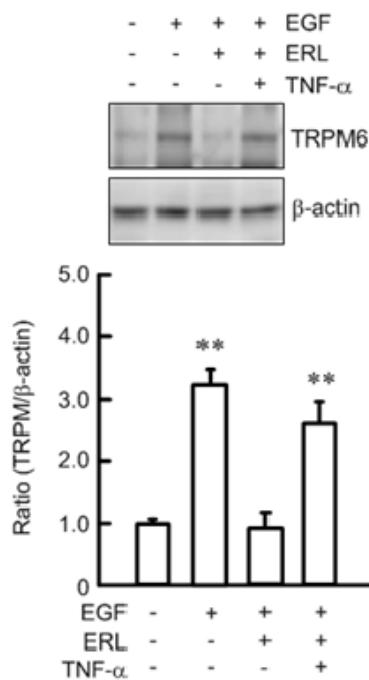
TNF- $\alpha$  による TRPM6 発現量の増加は, BAY 11-7082 や PDTC の共処理によって阻害された。この結果は

NF- $\kappa$ Bのリン酸化に対する結果と一致する。ビオチン化法により細胞膜表面の TRPM6 分布量を調べたところ、TRPM6 は TNF- $\alpha$ によって増加し、この効果は BAY 11-7082 や PDTC の共処理によって阻害された (Fig. 3)。蛍光免疫染色法において、細胞膜を WGA-FITC で染色して TRPM6 の分布を調べたところ、TNF- $\alpha$ によって TRPM6 と WGA-FITC の重なりが増加した。

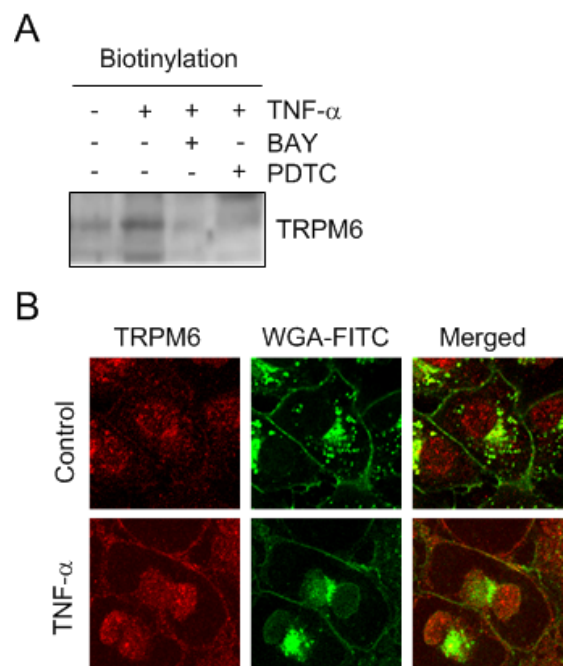
### 3. 3 TRPM6 レポーター活性に対する TNF- $\alpha$ の効果

EGF はヒト TRPM6 レポーター活性を増加させ、この効

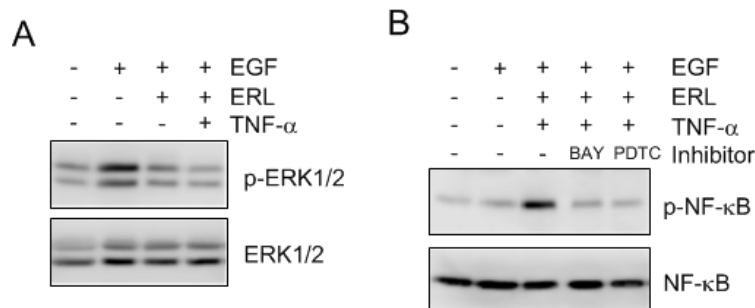
果はエルロチニブの共処理によって阻害された。EGF とエルロチニブの存在下、TNF- $\alpha$ は TRPM6 レポーター活性を増加させ、この効果は BAY 11-7082 や PDTC の共処理によって阻害された。TRANSFAC データベースを用いて NF- $\kappa$ B の結合部位を推測したところ、2 箇所の候補部位が同定された。各部位に変異を導入してレポーター活性を調べたところ、開始コドンよりも遠位側の変異体では TNF- $\alpha$ による活性化が観察されたが、近位側の変異体では TNF- $\alpha$ の効果が消失した。以上の結果から、TNF- $\alpha$ に



**Fig. 1.** Increase in TRPM6 expression by TNF- $\alpha$  in the presence of erlotinib. NRK-52E cells were incubated with 100 ng/ml EGF, 10  $\mu$ M erlotinib (ERL) and 50 ng/ml TNF- $\alpha$  for 24 h. Cell extracts were immunoblotted with anti-TRPM6 or  $\beta$ -actin antibody



**Fig. 3.** Effect of TNF- $\alpha$  on the membrane localization of TRPM6. (A) The cell surface-biotinylated proteins were immunoblotted with anti-TRPM6 antibody. (B) The cells were stained with anti-TRPM6 antibody and WGA-FITC.



**Fig. 2.** Effect of TNF- $\alpha$  on phosphorylation of ERK1/2 and NF- $\kappa$ B. NRK-52E cells were incubated with 100 ng/ml EGF, 10  $\mu$ M erlotinib (ERL), 50  $\mu$ M BAY 11-7082, 50  $\mu$ M PDTC and 50 ng/ml TNF- $\alpha$  for 30 min. Cell extracts were immunoblotted with anti-p-ERK1/2, ERK1/2, p-NF- $\kappa$ B, or NF- $\kappa$ B antibody.

よって核に移行したNF- $\kappa$ Bは開始コドンに近い方の $\kappa$ B結合モチーフに結合し、TRPM6の転写活性を増大させることが示唆された。

### 3.4 NF- $\kappa$ BのTRPM6転写調節領域への結合

HEK293細胞において、NRK-52E細胞と同様にTNF- $\alpha$ によってTRPM6発現量が増加し、この効果はBAY 11-7082やPDTCの共処理によって阻害された。TRPM6の転写調節におけるNF- $\kappa$ Bの関与を明確にするため、クロマチン免疫沈降を行った。抗NF- $\kappa$ B抗体で免疫沈降を行い、TRPM6プロモーター領域のPCRを行ったところ、TNF- $\alpha$ 処理細胞でバンドが確認されたが、BAY 11-7082やPDTCの共処理細胞ではバンドが検出されなかった。免疫沈降の処理をせず、inputとして用いたサンプルではすべてにおいてバンドが検出された。以上の結果より、TRPM6プロモーター領域へのNF- $\kappa$ Bの結合が、TNF- $\alpha$ によって増加することが明らかになった。

### 3.5 TNF- $\alpha$ によるMg<sup>2+</sup>流入の増加

TRPM6の発現量と細胞内へのマグネシウム流入との関係を解明するため、[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の変化量を測定した。細胞外に1 mM MgCl<sub>2</sub>を添加すると、時間依存的に[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が上昇し、1~2分後にプラトーに達した(Fig. 4)。[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の変化量はEGF処理により増加し、エルロチニブ共処理によりコントロールレベルまで減少した。また、エルロチニブ存在下、[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の変化量はTNF- $\alpha$ 処理により増加し、この効果はBAY 11-7082やPDTCの共処理によって阻害された。以上の結果から、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤によるTRPM6発現量と細胞内へのマグネシウム流入の低下は、TNF- $\alpha$ によって回復することが示唆された。

## 4. 考察

癌による死亡者数を臓器別に比較すると、肺癌が最も多い。非小細胞肺癌患者の遺伝子解析により、180カ所以上のEGFR遺伝子の変異が報告されている。エクソン19欠失体やL858R点変異体が80~90%を占め、これらの変異体はEGFRチロシンキナーゼ阻害剤に対する感受性が高い。EGFRチロシンキナーゼ阻害剤はチロシンキナーゼドメインのATP結合サイトに非可逆的に結合し、細胞増殖や浸潤などを阻害する。また、パニツムマブやセツキシマブといった抗EGFR抗体は、EGFと競合してEGFRの細胞外ドメインに結合し、その働きを阻害する。これらの

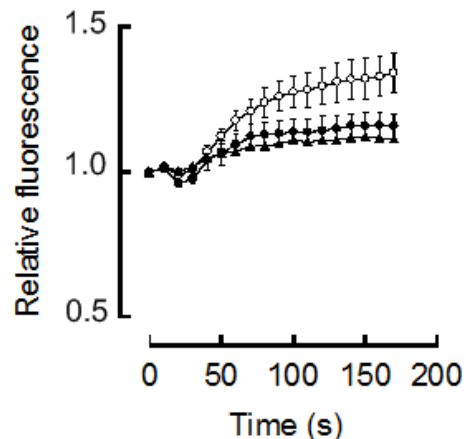


Fig. 4. Suppression of TNF- $\alpha$ -induced [Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation by NF- $\kappa$ B inhibitors. NRK-52E cells were incubated in the absence (○) and presence of BAY 11-7082 (●) or PDTC (▲) for 24 h. [Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was measured using mag-fura-2.

分子標的治療薬の使用によって薬物治療効果が向上したが、低マグネシウム血症の副作用が治療の妨げになることがある。重症の場合、致死性の不整脈や突然死が起こることがあるため、低マグネシウム血症を適切に処置する必要がある。

大腸癌患者における24時間蓄尿法によるマグネシウム排泄試験で、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤を投与した患者では腎マグネシウム再吸収量が低下することが報告された<sup>(11)</sup>。本研究により、尿細管上皮細胞におけるTRPM6発現量がEGFによって増加し、その効果がEGFRチロシンキナーゼ阻害剤の共処理によって阻害されることが明らかになった。EGFRチロシンキナーゼによって引き起こされる低マグネシウム血症に、TRPM6の発現低下が関与することが示唆された。TRPM6発現を増加させる因子を探索し、新たにTNF- $\alpha$ を見出すことができた。TNF- $\alpha$ はEGFRチロシンキナーゼ阻害剤のエルロチニブ存在下で、NF- $\kappa$ Bの活性化を介してTRPM6発現を増加させた。これまでにTNF- $\alpha$ やNF- $\kappa$ BがTRPM6の発現調節に関わることは報告されておらず、新規の発現調節機構の解明に成功した。

NF- $\kappa$ Bのp65とp50はダイマーを形成し、制御タンパク質のI $\kappa$ Bと結合した状態で細胞質に存在する。刺激によってp65サブユニットがリン酸化されるとI $\kappa$ Bが分解され、p65/p50ヘテロダイマーは核内へ移行する。EGFはERK1/2のリン酸化量を増加させたが、TNF- $\alpha$ では変化し

なかった。一方、TNF- $\alpha$ はNF- $\kappa$ Bのリン酸化量を増加させたが、EGFでは変化しなかった。以上のことから、EGFによるERK1/2シグナル伝達経路とTNF- $\alpha$ によるNF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路は独立しており、クロストークしないことが示唆された。

TNF受容体(TNFR)は細胞外領域にシステインリッチなドメインの繰返し構造を、細胞内領域にデスドメインというアポトーシス誘導に関わる構造を有する。TNFRは2種類に分けられ、TNFR1が大部分の細胞に存在するのに対し、TNFR2は主に免疫細胞に発現する。健康人の腎組織で、TNFR1はTRPM6と同じ遠位尿細管の上皮細胞に発現する。TNF- $\alpha$ は糖尿病ラットから単離された遠位尿細管細胞でNa<sup>+</sup>輸送を増加させる<sup>(12)</sup>。また、炎症モデルマウスの遠位尿細管細胞で、Toll-like receptorの発現を増加させる。これらの知見より、TNF- $\alpha$ は遠位尿細管で生理的及び病態生理的機能を有することが示唆される。

TRPM6の細胞膜表面への移行とチャネル活性がEGFによって調節されることが報告されている<sup>(13)</sup>。EGFはSrcとその下流に存在するRac1の活性化を介して、TRPM6のエキソサイトーシスを促進すると考えられる。我々の結果により、EGFの作用を阻害した条件下で、TNF- $\alpha$ がTRPM6の膜発現とMg<sup>2+</sup>流入を増加させることが明らかになった。TNF- $\alpha$ は尿細管細胞でSrcを活性化することが報告されている<sup>(14)</sup>。以上のことから、TNF- $\alpha$ はTRPM6の転写活性だけでなく、細胞膜へのトラフィッキングの調節にも関与することが示唆される。

## 5. 今後の課題

本研究において、TNF- $\alpha$ がNF- $\kappa$ Bの活性化を介して腎尿細管上皮細胞におけるTRPM6の発現量を増加させることを見出した。EGFはEGFR/MEK/ERK/c-Fos経路の活性化を介してTRPM6発現量を増加させるため、TNF- $\alpha$ による調節機構と異なることが明らかになった。そのため、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤による低マグネシウム血症がTNF- $\alpha$ の投与によって改善することが示唆される。しかし、TNF- $\alpha$ やNF- $\kappa$ Bは癌細胞の増殖や炎症惹起に関与するため、薬剤性低マグネシウム血症の治療薬としての利用が困難であることが推測される。そのため、TRPM6が発現する遠位尿細管に限局的に作用する薬剤の開発や、NF- $\kappa$ B以外の新たなTRPM6発現調節機構の解明が必

要である。また、管腔から細胞内へのマグネシウム輸送を担うTRPM6の発現に対する抗癌剤の効果が明らかになったが、細胞内から血管へのマグネシウム輸送を担うタンパク質に対する効果は不明である。今後、経細胞的なマグネシウム再吸収を促進する新たな調節因子を同定し、動物実験を経てヒトへの臨床応用に向けた研究に取り組む必要がある。

## 6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただいた公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Costa, A., Tejpar, S., Prenen, H., and Van Cutsem, E. *Target. Oncol.* **6**, 227-233 (2011)
- 2) Schlingmann, K. P., Weber, S., Peters, M., Niemann Nejsum, L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., Syrou, M., Nielsen, S., Sassen, M., Waldegger, S., Seyberth, H. W., and Konrad, M. *Nat. Genet.* **31**, 166-170 (2002)
- 3) Walder, R. Y., Landau, D., Meyer, P., Shalev, H., Tsolia, M., Borochowitz, Z., Boettger, M. B., Beck, G. E., Englehardt, R. K., Carmi, R., and Sheffield, V. C. *Nat. Genet.* **31**, 171-174 (2002)
- 4) Voets, T., Nilius, B., Hoefs, S., van der Kemp, A. W., Droogmans, G., Bindels, R. J., and Hoenderop, J. G. *J. Biol. Chem.* **279**, 19-25 (2004)
- 5) Groenestege, W. M., Hoenderop, J. G., van den Heuvel, L., Knoers, N., and Bindels, R. J. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1035-1043 (2006)
- 6) Blanchard, M. G., Kittikuluth, W., Nair, A. V., de Baaij, J. H., Latta, F., Genzen, J. R., Kohan, D. E., Bindels, R. J., and Hoenderop, J. G. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 804-813 (2016)
- 7) Groenestege, W. M., Thebault, S., van der Wijst, J., van den Berg, D., Janssen, R., Tejpar, S., van den Heuvel, L. P., van Cutsem, E., Hoenderop, J. G., Knoers, N. V., and Bindels, R. J. *J. Clin. Invest.* **117**, 2260-2267 (2007)
- 8) Ikari, A., Okude, C., Sawada, H., Yamazaki, Y., Sugatani,

- J., and Miwa, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 1129-1133 (2008)
- 9) Ikari, A., Sanada, A., Okude, C., Sawada, H., Yamazaki, Y., Sugatani, J., and Miwa, M. *J. Cell. Physiol.* **222**, 481-487 (2010)
- 10) Ikari, A., Takiguchi, A., Atomi, K., and Sugatani, J. *J. Cell. Physiol.* **226**, 2448-2456 (2011)
- 11) Tejpar, S., Piessevaux, H., Claes, K., Piront, P., Hoenderop, J. G., Verslype, C., and Van Cutsem, E. *Lancet Oncol.* **8**, 387-394 (2007)
- 12) DiPetrillo, K., Coutermarsh, B., and Gesek, F. A. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **284**, F113-121 (2003)
- 13) Thebault, S., Alexander, R. T., Tiel Groenestege, W. M., Hoenderop, J. G., and Bindels, R. J. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 78-85 (2009)
- 14) Kakiashvili, E., Dan, Q., Vandermeer, M., Zhang, Y., Waheed, F., Pham, M., and Szaszi, K. *J. Biol. Chem.* **286**, 9268-9279 (2011)

## Development of Novel TRPM6-Targeted Therapy for Hypomagnesemia

Akira Ikari<sup>1</sup>, Hajime Hasegawa<sup>2</sup>, Yoshinori Ito<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Gifu Pharmaceutical University, <sup>2</sup> Saitama Medical University, <sup>3</sup> Gifu University Hospital

### Summary

Magnesium is an essential cofactor for over 300 enzymes involved in metabolism and energy production. The magnesium balance of whole body is regulated by the kidney which adapts magnesium excretion based on net magnesium absorption from the intestine.  $Mg^{2+}$  filtrated by glomeruli is reabsorbed by transcellular and paracellular pathways in renal tubular epithelial cells. Transient receptor potential melastatin 6 (TRPM6) channel is expressed in the apical membrane of distal convoluted tubules and transport  $Mg^{2+}$  from the lumen into cells. We recently reported that TRPM6 expression is up-regulated by epidermal growth factor (EGF) in renal epithelial NRK-52E cells. Anti-EGF receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) such as erlotinib and gefitinib may be predicted to cause a side effect of hypomagnesemia mediated by the decrease in TRPM6 expression. In the present study, we searched for molecule that increases TRPM6 expression in the presence of EGFR TKIs.

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) increased TRPM6 expression in the presence of erlotinib. EGF increased the levels of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (p-ERK1/2), which were inhibited by erlotinib. In contrast, TNF- $\alpha$  did not change p-ERK1/2 levels, but it increased the phosphorylation and nuclear localization of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), which were blocked by the NF- $\kappa$ B inhibitors, BAY 11-7082 and pyrrolidinedithiocarbamate ammonium. Similarly, reporter activity of human *TRPM6* gene promoter was increased by TNF- $\alpha$ , which was blocked by NF- $\kappa$ B inhibitors and a mutation of  $\kappa$ B-binding site in the promoter. A chromatin immunoprecipitation assay revealed that NF- $\kappa$ B binds to the  $\kappa$ B-binding site of *TRPM6* gene promoter after treatment with TNF- $\alpha$ . In the presence of erlotinib, TNF- $\alpha$  increased  $Mg^{2+}$  influx, which was blocked by NF- $\kappa$ B inhibitors. These results suggest that TNF- $\alpha$  reverses the reduction in  $Mg^{2+}$  reabsorption caused by anti-EGFR TKIs mediated by the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway.