

平成30年 5月31日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10019

研究課題名(和文)がん浸潤・転移におけるメカノトランスダクション-TRPV2チャネルによる制御機構

研究課題名(英文)The regulation of focal mechanical stress on the localization of TRPV2 was investigated in the fibrosarcoma cells.

研究代表者

長澤 雅裕 (Nagasawa, Masahiro)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：50343083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：機械刺激によりTRPV2チャネルが機械刺激の局所に集積することを新規に見いだした。このことは「細胞膜上に固定されているカルシウムチャネルが、機械刺激にともなって開口しCa<sup>2+</sup>の流入が生じる」とする従来のモデルとは全く異なる機構であり、チャネル分子自体が機械刺激で細胞表面にトランスロケーションするという、『新規の細胞内カルシウム調節によるメカノトランスダクション制御機構である』。さらにこのTRPV2トランスロケーションがGd<sup>3+</sup>により抑制されること。ビンキュリンの持続的活性化にはTRPV2のトランスロケーションが重要であり、機械刺激でのアクチンのリモデリングに関与していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The effect of focal mechanical stress on the localization of TRPV2 was investigated in HT1080 cells. When focal mechanical stress was applied, subplasma membrane Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>s</sub>) was increased beneath the pipette, which propagated throughout the cell. The increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>s</sub> was blocked by knocking down TRPV2. The focal mechanical stress induced vinculin conformation change was blocked by knocking down TRPV2. Elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>s</sub> was not observed by the application of Gd<sup>3+</sup> and mechanical stress induced accumulation of TRPV2-GFP beneath the pipette was not observed.

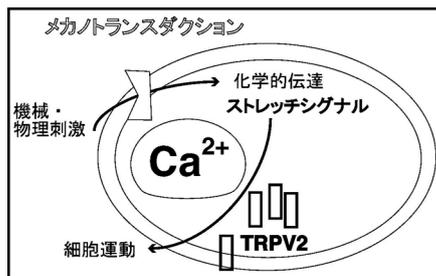
研究分野：細胞生物学

キーワード：機械受容 TRPV2チャネル トランスロケーション ビンキュリン メカノセンサー

### 1. 研究開始当初の背景

生体内の組織・細胞には常に機械・物理的刺激が負荷されている。そして、組織・細胞がこの力学的な環境変化を受容して細胞機能を調節する機構は、細胞増殖・分化・老化・再生・転写調節・高次の組織形成ばかりでなく、炎症・動脈硬化・創傷治癒・がん転移などの病理学的な過程にも重要である。しかし、細胞が物理・機械的刺激を受容伝達するメカノトランスダクション機構は解明されておらず、がん細胞・組織がどのように物理的・力学的環境変化を受容しているのか不明である。がん細胞での機械受容チャネルによる細胞内カルシウム制御機構の解明により、がん転移・浸潤におけるメカノトランスダクション機構を明らかにし、それに基づく治療戦略の基礎の確立を目指す。

生体内では伸展(ストレッチ)・ずり力(シアーストレス)などの機械的刺激は絶え間なく働いている。循環系・骨格系・呼吸器系では、特に恒常的に作用する物理的・機械刺激に対応する調節機構は重要である。機械刺激により血管内皮細胞の再配置・増殖が促進されて、血管の形状が最適化される。組織・細胞に負荷される機械的・物理的な力学的シグナルは、リン酸化・たんぱく質の構造変化・エネルギー産生・転写調節などの多岐の化学的シグナル伝達に変換される。このようなメカニカルストレスによる細胞内シグナル伝達で細胞機能が調節されている。そして、機械刺激・物理刺激における細胞運動・細胞接着の制御機構では、負荷された力学的シグナルが化学的シグナル伝達に変換されて、さらに細胞膜の伸展・退縮などの細胞運動の原動力になる物理的・機械的な変化に再変換(メカノトランスダクション)されることが重要である。また、このメカノトランスダクション機構のあるものでは、機械受容カルシウム(Ca<sup>2+</sup>)チャネルがメカノセンサー分子として機能して、それによる細胞内Ca<sup>2+</sup>変化が化学的シグナル伝達を調節して、細胞運動・接着分子群を時



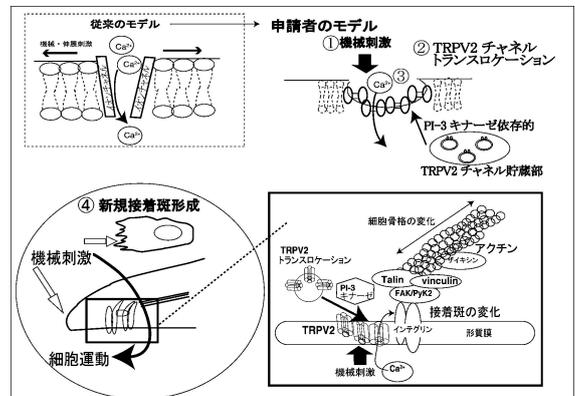
空間的に調節・制御すると考えられている。しかし、そのメカノトランスダクションを構成する分子実体は十分に明らかにされていない。がんの転移・浸潤機構においても、がん細胞への機械・物理的刺激→細胞内の生化学的シグナル伝達→細胞骨格・接着調節機構への物理的な出力伝達機構があり、その調節機構の破綻が転移・浸潤機構に関与していると考えられる。メカノトランスダクションは、組織形成・再生・転写調節・細胞遊走などの生理学的な過程ばかりでなく、炎症・動脈硬化・創傷治癒・がん転移などの病理学的な過程においても極めて重要な機構である。

我々はがん肉腫細胞をモデルとして、機械刺激によ

りCa<sup>2+</sup>透過性TRPV2チャネルが機械刺激の局所に集積(トランスロケーション)することを見いだした。このことは、従来の「細胞膜上に固定されているCa<sup>2+</sup>チャネルが、機械刺激に伴って開口しCa<sup>2+</sup>の流入が生じる」とするモデルとは全く異なる機構である。チャネル分子自体が、機械刺激で細胞表面にトランスロケーションするという、『新規の細胞内Ca<sup>2+</sup>調節によるメカノトランスダクション制御機構である』。がん細胞において機械刺激を負荷する、①。TRPV2がストレッチ刺激を受けた部位にトランスロケーションする、②。その刺激部位を起点として細胞全体に波及するTRPV2依存性のCa<sup>2+</sup>濃度勾配が形成される、③。このCa<sup>2+</sup>上昇により細胞接着斑の構造・機能調節が起きて、細胞運動の原動力が生じる、④。また、機械刺激の局所では、PI-3キナーゼなど活性化がおきる、という一連の反応が起きる。この反応を明らかにすることは、がん浸潤・転移におけるメカノトランスダクション機構の解明につながる。

### 2. 研究の目的

がんの転移は細胞のがん化にとまって細胞運動・

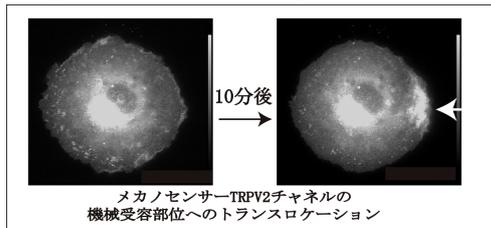


細胞接着能が変化して、がん細胞が組織内を移動し、結合組織をくぐり抜けリンパ管や血管に侵入する。さらに循環系に入り、他の組織に潜り込み、転移・増殖する。がんの浸潤・転移は細胞運動・接着制御の破綻の結果として起こるが、がん細胞が全く新規の特殊な機序で運動能を亢進・暴走しているわけではない。胎児期の形態形成や創傷治癒に見られる生理学的な過程と同様な機序・機構で浸潤・転移している。がん細胞における細胞運動・接着の機構の解析は、発生、組織形成、細胞の遊走などの生理学的な過程や炎症、動脈硬化、創傷治癒などの病理学的な過程などにおける細胞運動・細胞接着機構の解明にもつながる。以前より細胞内のカルシウム(Ca<sup>2+</sup>)は、細胞接着・運動、細胞骨格、細胞増殖などに重要であることが知られていた。しかし、細胞接着・運動の伸展において細胞内Ca<sup>2+</sup>がどのように制御されているのか、さらに、がん細胞の浸潤・転移での細胞伸展においてCa<sup>2+</sup>動態がどのように脱制御されているかは不明である。本研究ではがん細胞におけるTRPV2チャネルの制御機構、とくにがんの浸潤・転移における細胞伸展刺激に伴う細胞内Ca<sup>2+</sup>変化の意義とストレッチシグナル伝達機構を明らかにしたいと考えている。

### 3. 研究の方法

細胞膜直下の細胞内カルシウム(Ca<sup>2+</sup>)が計測可能な高感度Ca<sup>2+</sup>FRETプローブを利用して、機械受容Ca<sup>2+</sup>

チャンネルである TRPV2 による、がん細胞内  $Ca^{2+}$  調節とメカノトランスダクション機構を解析する。細胞骨格、細胞骨格制御分子、細胞接着構成分子の可視化



や細胞伸展が計測可能プローブなどを利用して、メカのセンサー分子群を同定してメカノトランスダクション機構を明らかにする。さらに、TRPV2 が発現・機能しているがん細胞株を用い、TRPV2 発現量を遺伝子工学的に制御した亜株を作製して *in vivo* の転移モデルを作製する。また、新規の機械受容  $Ca^{2+}$  チャンネルを探索して、TRPV2 によるメカノトランスダクションとの相違性を検討し、がん転移・浸潤におけるメカノトランスダクション機構を解明する。ヒトがん(肉腫)細胞に高感度  $Ca^{2+}$  FRET プローブを発現させ、機械刺激を負荷した際には機械刺激に伴い細胞内  $Ca^{2+}$  が上昇し、また、機械刺激が負荷されている間は断続的に  $Ca^{2+}$  上昇が繰り返して生じる。さらに、この時の機械刺激部位に TRPV2 分子が集積(トランスロケーション)する(上図)。

### (1) がん細胞のメカノトランスダクション解析・メカノセンサー分子の探索

外界の物理的・力学的な変化を受容し細胞内で生化学的シグナルに変換する機構(メカノトランスダクション)は、細胞膜と細胞骨格間で機能する分子群(メカノセンサー)で構成されている。申請者はこれまでの予備検討から、①TRPV2 チャンネルが細胞膜の機械刺激部位にトランスロケーションするメカノセンサーの一つであること。さらに、②メカノセンサーとして機能するザイキシンも、機械刺激により刺激部位に集積すること。また、③細胞接着斑構成分子のビンキュリンの立体構造変化を可視化するプローブで、機械刺激を負荷すると断続的に生じる細胞内  $Ca^{2+}$  上昇に続いて、ビンキュリンの立体構造変化が生じることなどを見いだした。このように、機械受容  $Ca^{2+}$  チャンネルである TRPV2 による  $Ca^{2+}$  上昇により接着斑の構造変化が生じる機序がある。しかし、どのようなメカノセンサー分子が機能し、どのようにしてシグナルが伝達され、最終的に細胞運動につながるかの詳細は不明である。そこで、細胞骨格・接着斑構成分子・細胞伸展関連分子などを可視化するプローブを作製してそれらの動態を明らかにし、メカノトランスダクション機構の全容を明らかにする。また、さまざまな阻害剤でメカノセンサー分子間のシグナルの流れを明らかにする。

### (2) さまざまな物理刺激・化学刺激におけるメカノトランスダクション機構との関連性

機械刺激以外の物理・化学刺激にがん細胞がどのように反応して、細胞内  $Ca^{2+}$  が変化するかは不明である。申請者はこれまで TRPV2 チャンネルが機械刺激だけでなく、増殖因子刺激・ケモカイン刺激でもトランスロケーションして活性化することを報告してきた。さらに TRPV2 は  $52^{\circ}C$  の温度刺激でも活性化されると報告されている。そこで、細胞に浸透圧刺

激、圧刺激などの物理刺激、酸・アルカリなどの化学刺激、一酸化窒素、過酸化水素などのガス刺激、温度刺激(細胞外の温度を  $25^{\circ}C$  から  $60^{\circ}C$ )などを負荷して、TRPV2 チャンネルの局在変化、細胞内  $Ca^{2+}$  変化、その際のメカノセンサー分子群の変化を検討する。このような検討により、さまざまな物理・化学刺激におけるメカノセンサー分子群の役割を評価する。

### (3) がん細胞浸潤・転移でメカノトランスダクションに関与する分子群の検討

1) PKCとの関連性: プロテインキナーゼC群は、がんの浸潤・転移・増殖に強く関連する。我々の細胞伸展刺激による物理的刺激にPKCの活性化の関与を検討する。

2) PLC との関連性についての検討

### (4) 動物実験での検討

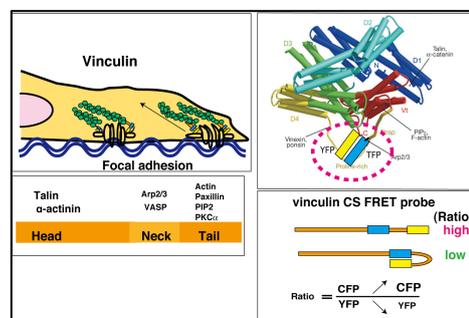
#### TRPV2ノック・アウトマウスの作成

TRPV2-floxマウスとCMV-creマウスを交配して全身でTRPV2マウスが欠損したマウスを作成する。

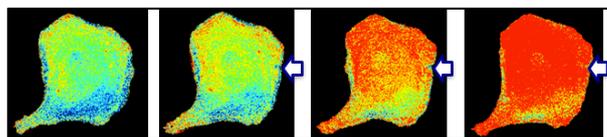
### 4. 研究成果

#### (1) ビンキュリン活性化プローブ作成・TRPV2 機械受容シグナルの関連性の検討

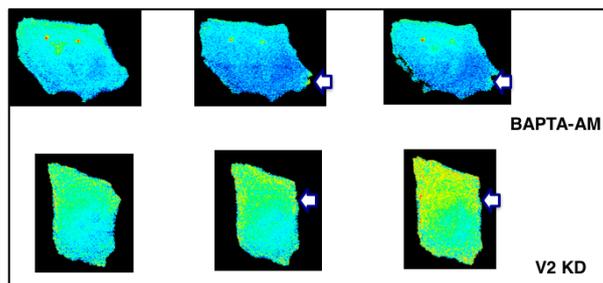
細胞接着斑の構造変化をモニターするために我々は vinculin に着眼して検討した。Vinculin は接着斑にあるアクチンと結合するタンパクです。さらに図の左のようなタンパク質と結合することが解っている。また細胞接着を構造的にサポートする他に細胞内シグナリングに関わる分子群とともに機能する。そこで我々は図の右のように vinculin の 2 カ所に蛍光蛋白質を付加したプローブを作製して機械刺激による vinculin の構造・機能変化のモニタープローブを作製した。



機械刺激を付加すると機械受容部位から徐々に細胞内に波及する Vinculin の構造変化がおきた。

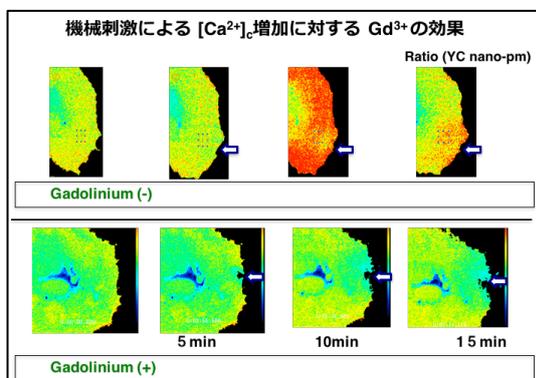


さらに細胞内のカルシウムの上昇を BAPTA-AM で抑制したり、TRPV2 を knock down すると Vinculin の構造変化が起きないことがわかった。

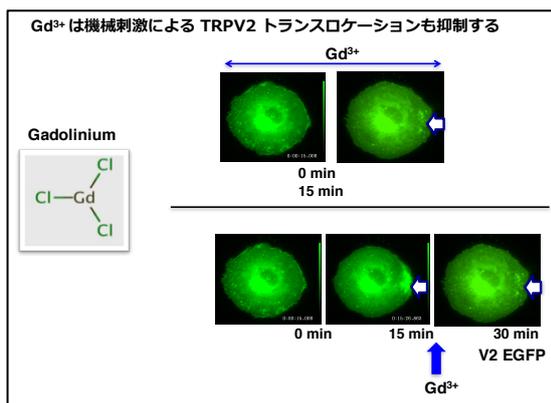


## (2) Gd<sup>3+</sup>による効果

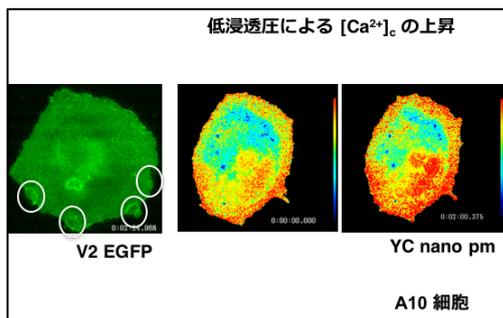
ガドリニウムは機械受容カルシウムチャネルの阻害剤であることが知られている。しかし、その機序は明らかにされていない。またTRPV2のチャネル活性化もガドリニウムでブロックされると報告されている。そこで我々のような機械刺激を付加した際におけるTRPV2とガドリニウムによる機械刺激における影響を検討した。ガドリニウム存在下で機械刺激を加えるとカルシウムの上昇は認められなくなります。



HT-1080細胞にFRETプローブの高感度カルシウムセンサープローブのYC-nano-PMを発現させて、機械刺激を加えると上段のようにカルシウムの上昇が認められます。しかし、Gd<sup>3+</sup>100uM 添加して機械刺激を加えると、図の下段のように機械刺激に伴うカルシウムの上昇は生じません。我々はTRPV2チャネルのカルシウム流入の活性化には、チャネルのトランスロケーションによる調節機構が重要であると考えています。そこで次にTRPV2の局在変化について検討しました。ガドリニウム存在下で機械刺激を加えるとカルシウムの上昇は認められないが、さらに、次にガドリニウム添加に伴うV2の局在変化を検討しました。機械刺激に伴いV2は、刺激部位にトランスロケーションします。そのような状態になった時にガドリニウムを加えますと集積したV2が消失していくのがわかります。



## (3) 浸透圧の効果



血管平滑筋細胞の A10に低浸透圧刺激を付加させた際のカルシウム変化を検討では、低浸透圧刺激を加えると 細胞辺縁, 中心部などにある特定の局所的部位にV2の細胞膜の局在変化と一過性のカルシウム上昇を認めることがわかった。この部位に低浸透刺激として 物理的・機械的な刺激が付加されたものと考えられます。

## (4) PKC 活性化・PLC の活性化

PH-EGFP, C1-C2 (PKC α)-EGFP, C1 (PKC δ)-EGFP で機械刺激による PLC 及び PKC の活性化をモニターすると機械刺激により一過性の活性化を認めた。この活性化は TRPV2 をノックダウンしても PKC の活性化は完全には消失しなかった。

(5) TRPV2 ノックアウトマウスを作成して共同実験を進行中である。

## (6) まとめ

がん肉腫細胞をモデルとして、機械刺激により Ca<sup>2+</sup>透過性 TRPV2 チャネルが機械刺激の局所に集積し、細胞内へカルシウムシグナルを伝達する。このことは「細胞膜上に固定されているカルシウムチャネルが、機械刺激にともなって開口して Ca<sup>2+</sup>の流入が生じる」とする従来のモデルとは全く異なる機構である。チャネル分子自体が機械刺激で細胞表面にトランスロケーションするという、『新規の細胞内カルシウム調節によるメカノトランスダクション制御機構である』。がん細胞において機械刺激を負荷する、

(1) TRPV2 が伸展刺激を受けた部位に集まる、(2) その刺激・集積部位を起点として細胞全体に波及する TRPV2 依存性のカルシウムの細胞内の濃度勾配が形成される、(3) このカルシウム上昇により細胞接着斑の構造・機能が調節されて、細胞運動の原動力が生じる、(4) また、Gd<sup>3+</sup>には TRPV2 チャネルのトランスロケーションを抑制する。というなど新規の機械受容シグナルがあることを見いだした。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

① Nagasawa M, Kojima I.

Translocation of TRPV2 channel induced by focal administration of mechanical stress.

Physiol Rep, e12296 2015.

DOI:10.14814/phy2.12296. 査読あり

② Nakagawa Y, Nagasawa M, Medina J, Kojima I.

Glucose Evokes Rapid Ca<sup>2+</sup> and Cyclic AMP Signals by Activating the Cell-Surface Glucose-Sensing Receptor in Pancreatic β-Cells.

PLoS One. e0144053 2015.

DOI:10.1371/journal.pone.0144053. 査読あり

③ Otsu Y, Nakagawa Y, Nagasawa M, Takeda S,

Arakawa H, Kojima I.

Diverse signaling systems activated by the sweet taste-sensing receptor in human GLP-1-secreting cells. Mol Cell Endocrinol, 394, 70-79, 2015.

DOI:10.1016/j.mce.2014.07.004. 査読あり

④ Medina J, Nakagawa Y, Nagasawa M, Fernandez A,

Sakaguchi K, Kitaguchi T, Kojima I. Positive Allosteric Modulation of the Calcium-sensing Receptor by Physiological Concentrations of Glucose. J Biol Chem 291 23126-23135, 2016.

DOI:10.1074/jbc.M116.729863 査読あり

⑤ Sugio S, Nagasawa M, Kojima I, Ishizaki Y, Shibasaki K. Transient receptor potential vanilloid 2 activation by focal mechanical stimulation requires interaction with the actin cytoskeleton and enhances growth cone motility. FASEB J. 31 1368-1381, 2017. 査読あり

DOI:10.1096/fj.201600686RR

⑥ Masubuchi Y, Nakagawa Y, Medina J, Nagasawa M, Kojima I, Rasenick MM, Inagaki T, Shibata H T1R3 Homomeric Sweet Taste Receptor Regulates Adipogenesis Through G $\alpha$ s-Mediated Microtubules Disassembly and Rho Activation in 3T3-L1 Cells Plos one. e0176841 2017.

DOI:10.1371/journal.pone.0176841. 査読あり

[学会発表] (計1件)

①小島至、ヨハン・メディナ、中川祐子、濱野邦久、長澤雅裕

膵 $\beta$ 細胞に発現するグルコース感受容体  
生理学研究所 研究会 「生体シグナルダイナミクス」  
平成 27 年9 月3 日～9 月4 日

愛知県、岡崎市、国立生理研研究所

[図書] (計1件)

①Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels Volume1 PartII The TRPV Subfamily TRPV2 247-272 Editors:

Nilius, Bernd, Flockerzi, Veit (Eds.)

Kojima I, Nagasawa M,

DOI:10.1007/978-3-642-54215-2

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

長澤 雅裕 (Nagasawa, Masahiro)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号 50343083