

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20790247
研究課題名（和文） 新規がん細胞遊走調節因子TRPV2チャンネルを標的とした転移阻止法の確立

研究課題名（英文） Establishment and characterization of novel tumor cell migration factor, TRPV2 channel

研究代表者

中川 祐子 (NAKAGAWA YUKO)
群馬大学・生体調節研究所・助教
研究者番号：90422500

研究成果の概要（和文）：我々はTRPV2が正常細胞のみならず、メラノーマを始めとする様々な悪性腫瘍細胞に高発現していることを見いだした。メラノーマは転移を起こしやすい癌細胞の代表である。そこで我々はメラノーマを実験モデルとし、癌細胞の転移におけるTRPV2の病態生理学的意義を明らかにするとともに、TRPV2を癌細胞の転移を阻止する分子標的とするための研究を行った。

第一にメラノーマにおけるTRPV2チャンネルの発現、調節機構を明らかにし、細胞遊走における意義を明らかにした。具体的にはyeast two-hybrid法によりTRPV2と相互作用する蛋白を単離した。これにより得られた候補蛋白MAEAは赤血球の脱核の際赤血球とマクロファージをつなぐために関与する因子であった。*in vitro*でTRPV2とMAEAが相互作用することを証明した。

第二にTRPV2チャンネルの有効な抑制法を確立し、それを用いて*in vitro*での遊走、さらには*in vivo*での転移を阻止する方法の確立を行った。予備実験としてTRPV2の阻害薬であるルテニウムレッドによりメラノーマ細胞の遊走能が低下することを確認した。次にドミナントネガティブ型TRPV2をメラノーマ細胞に導入し、遊走能の検討を行った。ドミナントネガティブ型TRPV2は正常型TRPV2と同様に細胞膜に局在した。しかし、wound healing assayにより両者に優位差は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：The present study was conducted to characterize the regulation and function of TRPV2 channel in highly malignant tumor cell. The expression of TRPV2 was not only detected in the normal cell, but also in the tumor cell. We then determined localization of TRPV2 using metastatic B16 melanoma murine cells transfected with TRPV2-EGFP. In serum-free condition, most of the TRPV2 signal was located in the cytoplasm. Treatment with serum induced translocation of some of the TRPV2-EGFP to the plasma membrane. Serum-induced translocation was blocked by transfection of short-form TRPV2 (s-TRPV2) lacking a pore-forming region and the sixth transmembrane domain. These data conformed to that of macrophage TtT/M87 cell. To determine the function of migration for the TRPV2, we performed the wound healing assay. The ruthenium red, TRPV family inhibitor, blocked the migration of B6 cell. However s-TRPV2 couldn't inhibit the cell migration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：がん、Ca²⁺透過性チャネル

1. 研究開始当初の背景

がんはここ数十年にわたり常に本邦における死亡原因の上位を占めてきたが、今後超高齢化社会の到来によりがんの罹患率はさらに上昇すると予想される。したがって有効な治療法の確立は医学的のみならず社会医学的にも重要な課題となる。がんの病態において重要なポイントの一つに転移がある。原発巣の病変に加え、転移による病巣拡大と臓器障害がしばしば直接の死因になるからである。そのため転移を阻止・予防することはがんの治療戦略において極めて重要である。

これまで申請者らは細胞周期を制御するCa²⁺透過性チャネルの研究を行いインスリン様増殖因子(IGF-I)により活性化されるCa²⁺透過性チャネルTRPV2をクローニングした(*Nature Cell Biol.*, **1**: 165-170, 1999)。TRPV2はIGF-Iによって小胞体から細胞膜へと移行する。その後の研究によりTRPV2は増殖だけでなく細胞遊走も調節することが明らかになった。例えば非刺激時のマクロファージにおいてTRPV2チャネルは主に細胞内プールに存在するが、走化因子fMLPによって細胞膜のポドゾームと呼ばれる特殊なドメインに移行する。ポドゾームは接着斑の特殊化したもので接着・遊走に重要な構造である。興味深いことに遺伝子導入により強制的に

TRPV2チャネルを高発現させることにより、遊走能が上昇する。逆にTRPV2チャネルの発現を抑制することにより、遊走能は低下する(*J. Cell Physiol.*, **210**: 692-702, 2007)。走化因子fMLPの添加によりTRPV2がポドゾームに集積しそこで細胞内Ca²⁺濃度の顕著な上昇が観察されるが、これが遊走の原動力になっていると考えられる。

最近申請者はTRPV2チャネルが正常細胞のみならず、メラノーマを始めとする様々な悪性腫瘍細胞に高発現していることを見いだした。またTRPV2チャネルは正常細胞に比べ悪性腫瘍細胞において細胞膜に強く集積する特徴をもつ。メラノーマは転移を起こしやすいがん細胞の代表である。そこで申請者はメラノーマ細胞を実験モデルとし、がん細胞の転移におけるTRPV2の病態生理学的意義を明らかにするとともに、TRPV2チャネルを分子標的としたがん細胞の転移阻止法を確立するための研究を進めている。メラノーマにおいてもTRPV2チャネルは血清および肝細胞増殖因子HGFにより細胞内プールから細胞膜への移行が促進される。またTRPV2チャネルはマクロファージでの挙動と同様、特殊な接着斑である浸潤仮足に集積する(図1)。さらにメラノーマ細胞にTRPV2チャネル阻害剤であるルテニウムレッド(RR)を添加するこ

とにより遊走が抑制される。これらの結果はマクロファージでの知見と一致する。

本研究ではがん細胞の浸潤、転移における TRPV2 チャンネルの病態生理学的意義を明らかにし、その制御法を確立する。

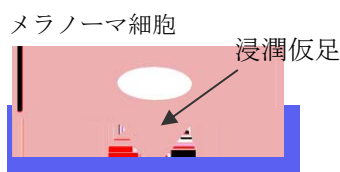


図 1. 浸潤仮足の模式図

浸潤仮足では細胞外マトリクス (ECM) への接着と離脱が活発に行われるため、浸潤仮足を有する細胞では細胞運動が亢進される。

2. 研究の目的

第一にメラノーマ細胞における TRPV2 チャンネルの制御機構を明らかにする。第二に得られた知見を基に *in vitro* での遊走、さらには *in vivo* での転移を阻止する方法を見出し、TRPV2 チャンネルを分子標的としたがん細胞の転移および浸潤の治療法を確立する。以下の2つのポイントに絞り解析を行う。

(1) TRPV2 チャンネルの形質膜局在のメカニズムの解明

TRPV2 はチャンネルでありながら、HGF によって細胞膜へ移行しインテグレートされるというユニークな調節を受ける (図 2)。本研究ではこの TRPV2 の形質膜局在の調節機構や細胞遊走へと続くシグナル伝達系を明らかにする。既に予備検討で Rac1 の関与が判明しているため、Rac1 の下流のシグナルについて検討する。

TRPV2 チャンネルが局在する浸潤仮足には、アクチンやインテグリンおよびそれらの調節因子など様々な蛋白が集積する。申請者は最近 TRPV2 と相互作用する蛋白を明らかにする目的で、酵母 two-hybrid system により細胞接着に関与する膜蛋白を一つ同定した。今後

この蛋白が TRPV2 チャンネルの形質膜への局在および細胞遊走に関与するかを検討する。

control +HGF

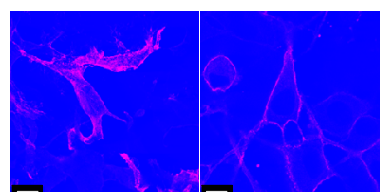


図 2. HGF によって TRPV2 は細胞膜へ移行する
左, DMEM で培養した細胞での TRPV2-GFP 蛍光像; 右, DMEM+10 ng/ml HGF で培養した細胞での TRPV2-GFP 蛍光像。

(2) がん細胞遊走、浸潤・転移における TRPV2 の役割の解明と制御法の確立

既に薬理的な検討やドミナントネガティブ型変異 TRPV2 (dnTRPV2) の導入によりメラノーマ細胞の遊走に TRPV2 チャンネルが関与していることを明らかにしている。そこで、①さらに特異性の高いチャンネル拮抗剤を化合物ライブラリーよりスクリーニングする、②TRPV2 の細胞膜移行を調節するシグナル分子の抑制で遊走が制御できるかを検討するとともに、③そのシグナル抑制薬の遊走に対する効果を検討する。また現在、TRPV2 チャンネルを高発現および発現抑制したメラノーマ細胞を用いて *in vivo* での転移能の変化を検討中である。本研究で明らかになる TRPV2 の制御機構に関する知見を応用して、がん細胞の転移を効率よくコントロールする方法の確立を目指す。

3. 研究の方法

1. TRPV2 チャンネルの活性化制御のメカニズムの解明

TRPV2 チャンネルの C 末端側の細胞質ドメインを bait とし酵母 two-hybrid スクリーニングを行い、TRPV2 チャンネルと相互作用する分子の一つとして膜蛋白を単離した。免疫沈殿法により両者が結合

することを確かめた。TRPV2 チャンネルは以下の3つのステップで制御されていると考えられる。①細胞膜への輸送、②細胞膜へのインテグレート、③ チャンネルの開閉。このうちのどのステップにこの膜蛋白が関与するか明らかにする。

①の検討のために、メラノーマ細胞に蛍光タグを付加した TRPV2 チャンネルと膜蛋白を共発現させ、その局在部位を観察する。また、それぞれのノックダウン細胞を使用し、形質膜局在において両蛋白は相互作用するか否か検討する。

②の検討のために、TRPV2 および膜蛋白の細胞外部位にタグを付加したコンストラクトを導入し、①と同様に蛍光を観察する。図3に TRPV2 での結果を示す。TRPV2 は血清および HGF によって形質膜にインテグレートされることが分かっている。

③の検討のために、蛋白質をノックダウンまた高発現させたメラノーマ細胞にCa²⁺インジケータである細胞膜型カメレオンを導入し、HGF処理後の細胞膜直下のCa²⁺濃度をモニターする。先述のようにHGFはTRPV2 を介した細胞膜直下のCa²⁺濃度上昇を引き起こす。

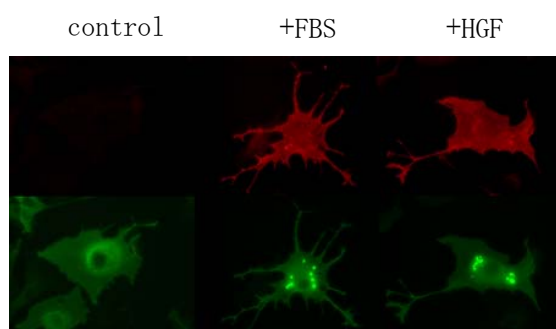


図3. 血清および HGF によって TRPV2 は細胞膜へインテグレートする

左, DMEM で培養した細胞; 中央, DMEM+10% FBS で培養した細胞; 右, DMEM+10 ng/ml HGF で培養した細胞. 上, TRPV2 の細胞外ドメインに付加したタグに対する免疫蛍光染色像 (形質膜の透過処理を行っていないため、形質膜にインテグレートしている時のみ蛍光を検出できる); 下; TRPV2-GFP 蛍光像.

さらに TRPV2 チャンネルを制御するシグナル伝達機構を明らかにする目的で以下の研究を行う。申請者らは以前ドミナントネガティブ Rac1 (dnRac1) を導入した細胞において TRPV2 チャンネルの形質膜への局在が著しく低下することを示した。この結果より TRPV2-Rac1 の相互作用が考えられるが、そのメカニズムは不明である。これまでの知見より TRPV2 が Rac1 の直接のターゲットとなりうる可能性は低い。そこで Rac1 のシグナルが上述の膜蛋白を介して TRPV2 に伝達されるか否か検証する。具体的な方法として dnRac1 発現細胞で膜蛋白を高発現させることにより TRPV2 チャンネルの局在が正常になるか解析を行う。

4. 研究成果

我々は、マクロファージに発現する TRPV2 チャンネルが増殖因子により細胞膜へトランスロケーションして活性化される事を報告した。今回、転移を起こしやすい癌細胞の代表であるメラノーマに発現する TRPV2 について解析した。本実験ではメラノーマを実験モデルとし、癌細胞の転移における TRPV2 の病態生理学的意義を明らかにするとともに、TRPV2 を癌細胞の転移を阻止する分子標的とするための研究を行った。

第一にメラノーマにおける TRPV2 チャンネルの発現、調節機構を明らかにし、細胞遊走における意義を明らかにした。具体的には yeast two-hybrid 法により TRPV2 と相互作用する蛋白を単離した。これにより得られた候補蛋白 MAEA は赤血球の脱核の際赤血球とマクロファージとをつなぐために関与する因子であった。in vitro で TRPV2 と MAEA が相互作用することを証明した。

第二に TRPV2 チャンネルの有効な抑制法を確立し、それを用いて *in vitro* での遊走、さらには *in vivo* での転移を阻止する方法の確立を行った。予備実験として TRPV2 の阻害薬であるルテニウムレッドによりメラノーマ細胞の遊走能が低下することを確認した。次にドミナントネガティブ型 TRPV2 をメラノーマ細胞に導入し、遊走能の検討を行った。ドミナントネガティブ型 TRPV2 は正常型 TRPV2 と同様に細胞膜に局在した。しかし、wound healing assay により両者に優位差は見られなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ①. Yuko Nakagawa, Itaru Kojima. (他 8 名, 1 番目). Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. PLoS One. 査読有り 4: 2009. e5106.

[学会発表] (計 1 件) 中

- ①. 中川祐子、原朱美、長澤雅裕、最上秀夫、小島至。膵β細胞における甘味感受体T1R2+T1R3の機能解析、第82回日本内分泌学会学術総会、2009. 4. 24, 群馬県民会館(群馬県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/organization/organization5>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 祐子 (NAKAGAWA YUKO)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：90422500

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：