

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16338

研究課題名（和文）がん細胞の分子標的薬に対する抵抗性とカルシウムシグナルの関連

研究課題名（英文）Drug resistance and calcium signaling in cancer cell line

研究代表者

開 勇人（Hiraki, Hayato）

岩手医科大学・医歯薬総合研究所・助教

研究者番号：50847358

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞が抗がん剤による刺激を受容した際に数秒から数分間に生じる細胞内Ca²⁺濃度の変動、Ca²⁺シグナルに着目した。Gefitinibなどの分子標的薬はCa²⁺シグナルを誘導しなかった。一方、5-フルオロウラシルはCa²⁺シグナルを誘導することや、薬剤耐性株では親株と比較してCa²⁺の排出速度が速いことを見出した。Ca²⁺ポンプの発現が高いことが考えられたため、siRNAでPMCAファミリーのCa²⁺ポンプの発現量をノックダウンすると薬剤耐性株のCa²⁺シグナルが親株と近似したことから、PMCAファミリーのCa²⁺ポンプが薬剤耐性株の特異なCa²⁺の排出速度を規定していたことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ca²⁺シグナルは生物に広く保存される基本的な生命現象である。一方で、がん細胞におけるCa²⁺シグナル、特に抗がん剤誘導性のCa²⁺シグナルはほとんど着目されてこなかった。本研究では、5-フルオロウラシル抵抗性胃癌細胞株において、特徴的なCa²⁺シグナルが誘導される発見を足掛かりに、薬剤抵抗性株の特徴を規定する因子としてPMCAファミリーCa²⁺ポンプを同定した。一般に薬剤抵抗性の再発がんは難治性である。治療標的の候補の探索はもちろん、薬剤抵抗性獲得メカニズムの一端を明らかにすることは、未治療のがん細胞が薬剤抵抗性を獲得しないよう阻害する手段を検討することにつながる。

研究成果の概要（英文）：Ca²⁺ signal acts as a second messenger in living organism. In this study, we focused on the Ca²⁺ signal in cancer cells, especially on anti-cancer drug resistance. Ca²⁺ signals were observed under a laser scanning confocal microscope. We found that 5-Fluorouracil (5-FU) induced Ca²⁺ uptake, and the efflux speed was more quickly in 5-FU tolerant cell line than that of parental cell. siRNA which targeted PMCA family slightly reduced the protein expression level of the Ca²⁺ pump but changed the Ca²⁺ signal from 5-FU tolerant type to parental type in MKN45 5-FU tolerant cell line. In addition, there was weak correlation between the expression level of PMCA and 5-FU resistance in gastric cancer cell lines. These results suggested that PMCA family Ca²⁺ pumps may be contributed to the early 5-FU response in gastric cancer cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：カルシウムシグナル 薬剤耐性 がん細胞株

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんゲノム医療においては、次世代シーケンサーを用いたがん遺伝子パネル検査の結果が分子標的薬の投薬根拠とされている。一方で、分子標的薬のターゲットとなっている *AKT1* や *BRAF* などの Actionable 変異が発見されても、対応する治療標的分子のリン酸化タンパク量は増加していなかった。したがって、投薬根拠の妥当性は、ゲノムだけではなく、mRNA・タンパクまでのシグナル伝達を包括的に判断すべきである。がんシグナル研究の主流は、p53 に代表されるがん抑制に働くタンパクや、キナーゼを軸としたものである^[3,4]。がん細胞において、Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)ファミリーCa²⁺チャネルの増加による慢性的なCa²⁺濃度上昇や^[5,6]、p53 が小胞体とミトコンドリア間の接触ドメインに局在しCa²⁺シグナルを調節し細胞死を誘導するとの報告があり^[7,8]、がんとCa²⁺の関与が示唆されている。Ca²⁺は生物に広く保存されているセカンドメッセンジャーであるため、がん細胞においても特異なCa²⁺シグナルが関与している可能性が高い。一方で、種々のリン酸化反応や遺伝子発現の調節における、Ca²⁺シグナルに関する報告は限られている。そこで、以下の方法で、新たながんシグナルの要素としてCa²⁺シグナルを評価する。

2. 研究の目的

投薬を行うと、がん細胞は薬剤抵抗性を示すことがある。一般に、薬剤抵抗性を持つがんは難治性である。これは分子標的薬の投薬でも同様と考えられる。抗がん剤処理により、がん細胞ではそれに抵抗するために、種々のリン酸化反応やタンパクの発現制御を行うことが報告されている^[9,10]。そのプロセスの最初期段階である、薬剤の受容から遺伝子発現制御に至る経路は不明なことが多い。そこで本研究では、下記の目的を設定した。

セカンドメッセンジャーとして遺伝子発現の調節を考えると考えられるCa²⁺シグナルのプロファイリング

Ca²⁺シグナルに関連し、薬剤抵抗性がんにおける分子標的薬のターゲットとなりうるタンパクの探索と同定

3. 研究の方法

試料として8種類の胃がん細胞株を用いた。この中には2セットの薬剤耐性株とその親株が含まれており、薬剤抵抗性の獲得前後のモデルとして使用できることができる。

分子標的薬を含む抗がん剤が誘導するCa²⁺シグナルのプロファイリング。

共焦点レーザー顕微鏡とCa²⁺インジケータであるCaTM-2 AMを用いて、胃がん細胞株の生きた状態でのCa²⁺シグナルを経時的に観察する。抗がん剤を観察開始30秒の時点で滴下し、その際に誘導されるCa²⁺シグナルの濃度を5秒おきに計測した。

RNA-seqによる、異なる強さの薬剤抵抗性を示す胃がん細胞株における遺伝子発現量の解析

MKN1、MKN45、MKN45/5FU、MKN74、MKN74/5FU、IWT1、GCIY、GSSの細胞株を用いて、5-FUに暴露する前後の遺伝子発現の変化についてRNA-seqで解析した。特に薬剤抵抗性の高い細胞株で共通して発現量が高い遺伝子を、薬剤抵抗性に寄与する候補遺伝子群として同定した。

siRNAを用いて、薬剤耐性株の候補遺伝子の発現をノックダウンし、その際のCa²⁺シグナルや薬剤抵抗性などの表現型を評価。

薬剤耐性株とその親株のゲノム的な変化はほとんど見られない。したがって、薬剤耐性は遺伝子発現のレベルでの変化であることが考えられる。上記のステップで同定してきた候補遺伝子の発現をsiRNAでノックダウンすることによって、親株の表現型に回帰するか評価することで、薬剤抵抗性に関わる遺伝子であることの裏付けをする。

4. 研究成果

分子標的薬を含む抗がん剤に対する薬剤抵抗性の獲得メカニズム初期応答としてのCa²⁺シグナルの観察を行った。その結果、低濃度で使用することが想定される薬剤、特にGefitinibなどの分子標的薬ではCa²⁺シグナルの誘導が確認されなかった。一方、5-FUは特徴的なCa²⁺シグナルを誘導した。また、5-FU耐性株ではその親株と比較してCa²⁺の流入・排出速度が速い傾向が認められた。

RNA-seq の結果から、薬剤耐性株では、カルシウムチャネル・ポンプの発現が高いことが示唆された。一方、ウエスタンブロッティングの結果からは、タンパク発現レベルの違いはわずかであることが考えられた。そこで、siRNA を使用して標的のカルシウムポンプの発現量をノックダウンし実際の Ca^{2+} シグナルを観察した結果、薬剤耐性株の Ca^{2+} シグナルが親株と近似することを確認した。すなわち PMCA ファミリーの Ca^{2+} ポンプが薬剤耐性株における特異な細胞内カルシウムの排出速度を規定していたことが示唆された。

Ca^{2+} シグナルの大きさを LaCl_3 や Ruthenium red などのカルシウムチャネルブロッカーを用いて人為的に調整すると、 Ca^{2+} チャネルやポンプの発現量が Ca^{2+} シグナルの大きさ(濃度 * 時間)と相関する傾向が見られた。5-FU は Ca^{2+} シグナルを誘導するので、すなわち 5-FU 濃度依存的に Ca^{2+} チャネルやポンプの発現量が調整される。この現象を確認したのは胃がん細胞株 MKN45 と MKN45/5FU のセットのみであることから、今後、5-FU による PMCA ファミリーカルシウムポンプ発現量の上昇と薬剤耐性に関連が見られるか、多くの細胞株を用いて実験することで、普遍性のある現象であるか今後検証する。

参考文献

- [1] Greenblatt *et al.* (1994) *Cancer Res.*, 54: 4855-4878.
- [2] Vivanco and Sawyers. (2002) *Nat. Rev. Cancer*, 2: 489-501.
- [3] Giorgi *et al.* (2015) *Oncotarget* 6: 1435-1445.
- [4] Giorgi *et al.* (2015) *PNAS* 112:177-1784.
- [5] Pigozzi *et al.* (2006) *Cell Calcium*, 39:401-415.
- [6] Hiani *et al.* (2009) *Arch. Biochem. Biophys.*, 486: 58-63.
- [7] Giorgi *et al.* (2015) *Oncotarget* 6: 1435-1445.
- [8] Giorgi *et al.* (2015) *PNAS* 112:177-1784.
- [9] Kume *et al.* (2015) *J. Proteome Res.* 15: 205-215.
- [10] Kume and Nishizuka. (2017) *Anal. Chem.* 89: 8626-8631.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 開 勇人、西塚 哲
2. 発表標題 薬剤抵抗性胃癌細胞株における5-フルオロウラシル誘導性カルシウムシグナルの急激な減少
3. 学会等名 日本生理学会 第百回記念大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------