

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月20日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590247

研究課題名（和文） T型Caチャンネル遺伝子methylationによる機能修飾とがん細胞における役割

研究課題名（英文） Functional modification of T-type Ca²⁺ channel gene by methylation and its role in tumor cells.

研究代表者

大久保 つや子 (Ohkubo Tsuyako)

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40099065

研究成果の概要（和文）：電位依存性Caチャンネルの中で、T型は静止膜電位付近でカルシウム流入を引き起こすことができるユニークなチャンネル特性を持ち、細胞増殖制御や遺伝子発現など様々な生理作用に関与すると言われている。本研究では、T型Caチャンネルが癌の進展にどのような働きをするかについての検討をヒト乳癌由来細胞を用いて行った。その結果、T型Caチャンネルのアイソフォームの1つであるCav3.1は、癌の増殖抑制に働き、また、細胞死（アポトーシス）を誘導することがわかった。別のアイソフォームCav3.2にはこれらの作用は見られなかった。これらのことから、Cav3.1チャンネルは癌抑制因子の1つとして働くことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：T-type voltage-gated Ca²⁺ channels have unique electrophysiological properties, which have been assumed to be suitable for physiological action such as controlling the proliferation of various tumor cells. A study of T-type voltage-gated Ca²⁺ channels on tumor development was carried on MCF-7 (Human breast adenocarcinoma) cells. Cav3.1, an isoform of T-type channels, inhibited cell proliferation and induced apoptosis, while a different isoform, Cav3.2, had no effect. These suggest that the Cav3.1 channel may act as a tumor suppressor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：電位依存性カルシウムチャンネル、細胞増殖、細胞死、癌、腫瘍

1. 研究開始当初の背景

DNAメチル化は遺伝子発現の抑制(silencing)や突然変異の原因として知られる。CpG配列の多いプロモーター領域でのメチル化が発癌時に多く出現することから、メチル化による発現抑制を受けた遺伝子群に

よってコードされた様々な蛋白の欠損によって癌に特異的な環境を成立させると考えられている。様々な癌細胞に発現するT型CaチャンネルCACNA1G遺伝子もその発現調節を受けるものの一つであると報告されているが、その生理的な意味はまだわかっていない。ま

た、翻訳領域においても非常に CG 含量の多い CACNA1G 遺伝子には、この領域においてもメチル化による変異や、選択的スプライシングへの影響が予想され、glyoma 細胞において変異型の発現も報告されている。従来、細胞の Ca 動員機構の一つとして様々な生理機能に関わると考えられてきた Ca チャンネルであるが、前述した発現調節の意味も含めて、癌におけるこのチャンネルの役割はよくわかっていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、この T 型 Ca チャンネルの癌の増殖、細胞周期、アポトーシスなどにおける病態生理学的機能を、様々な手法を用いた検討によって明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

細胞培養：

ヒト乳癌由来細胞株 MCF-7 及び自然不死化ヒト乳腺上皮細胞株 MCF-10F を用い、10% FBS 添加 MEM 培養液中で 37 度、5% CO₂ の条件で培養を行った。

遺伝子ノックダウン及びチャンネルブロッカーによる実験：

Cav3.1 と Cav3.2 特異的な siRNA を導入して行った。ノックダウン効率は、リアルタイム PCR によって確認した。また、Cav3.1 に選択性が高いチャンネルブロッカー ProTx-I を用いた。

細胞増殖アッセイ (MTT 法)：

テトラゾリウム塩 (MTT) の還元に伴うホルマザン色素 (青色) の呈色反応を利用してマイクロプレートリーダーで 450nm の吸光度を測定した。

免疫細胞染色：

一次抗体として、抗 Cav3.1 抗体、抗 Cav3.2 抗体、及び抗 annexin-V 抗体 (アポトーシスマーカー) を用いた。また、別のアポトーシス検出として TUNEL アッセイを用いた。

アポトーシスアッセイ：

APOPercentage™ apoptosis assay kit (Bicolor Ltd.) を用いた。アポトーシス陽性細胞は画像処理により定量化した。

マイクロアレイ解析：

「G0stat」解析 Web ソフトを用いて、Cav3.1 と Cav3.2 の遺伝子ノックダウンによって変動した遺伝子群の解析を行った。

4. 研究成果

細胞増殖への影響：

Cav3.1 遺伝子 siRNA によるノックダウンによって、MCF-7 細胞の増殖は有意に促進された (図 1 a)。一方、Cav3.2 遺伝子ノックダウンでは、このような効果が見られなかった (図 1 b)。更に、Cav3.1 に選択性が高いチャンネル阻害薬 ProTx-I によっても、遺伝子ノックダウン実験の場合と同様に MCF-7 細胞の増殖は有意に促進された (図 1 c)。

更に、クローニングした遺伝子を MCF-7 細胞に導入して Cav3.1 チャンネルを強制発現させると、遺伝子ノックダウンの場合とは、逆に細胞増殖が有意に抑制された (図 2 a)。Cav3.2 チャンネルを強制発現しても、ノックダウン実験から予想された通りに、このような変化は観察されなかった (図 2 b)。これらのことから、Cav3.1 チャンネル選択的に増殖促進が起きていること、また、この増殖促進はカルシウム流入を介していることが示唆され

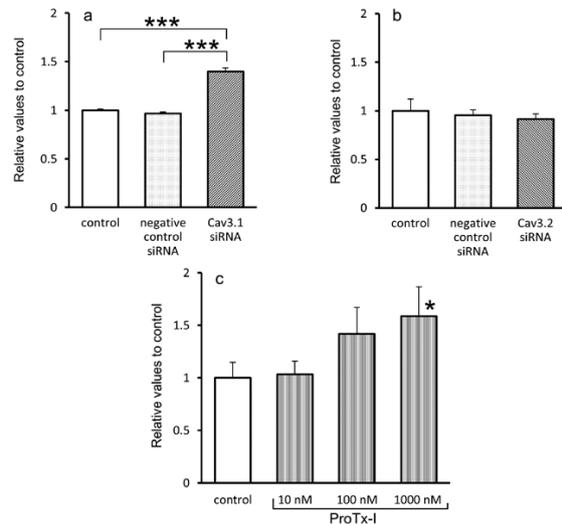


図 1 MCF-7 細胞増殖における Cav3.1 及び Cav3.2 特異的な siRNA とチャンネルブロッカーの影響

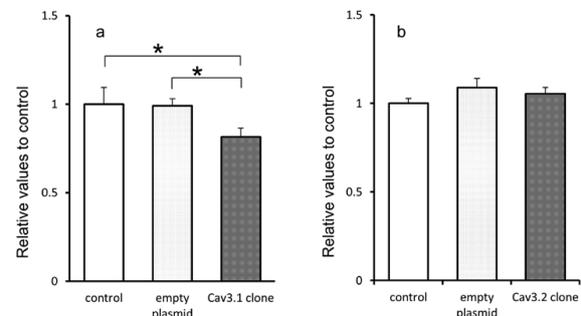


図 2 細胞増殖における Cav3.1 及び Cav3.2 チャンネルの強制発現による影響

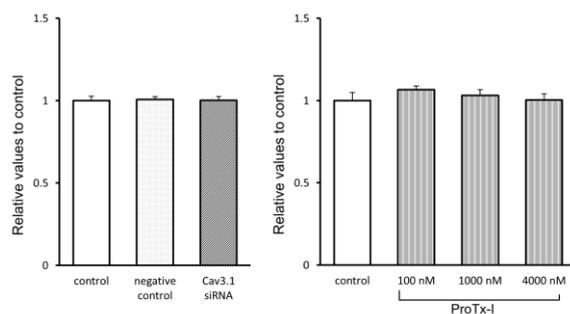


図 3 MCF-10 細胞増殖における Cav3.1 特異的な siRNA とチャンネルブロッカーの影響

た。

一方、非腫瘍性 MCF-10F 細胞では、Cav3.1 遺伝子ノックダウン、および ProTx-I による増殖への影響は MCF-7 細胞の場合とは明らかに異なり、有意な変化が見られなかった (図 3)。腫瘍細胞と正常細胞間では、Cav3.1 チャンネルからのカルシウム流入に由来する生理作用に違いがあることが示唆された。

免疫染色による T 型 Ca チャンネルの発現の観察：

免疫染色法を用いて MCF-7 細胞における Cav3.1 チャンネルの局在を調べた。細胞表面が水疱状の細胞質突起を示し、核が濃染され、またアポトーシスマーカー Annexin-V や TUNEL 法の陽性細胞として特定されるアポトーシス細胞の細胞膜に Cav3.1 が特異的に発現していた。一方、Cav3.2 チャンネルは大多数の MCF-7 細胞の膜に発現しており、アポトーシスや Cav3.1 の発現との関連性を認めなかった。

Cav3.1 チャンネルによって誘導されるアポトーシス：

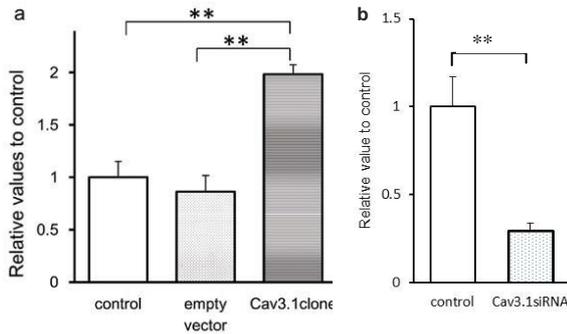


図 4 Cav3.1 チャンネルの強制発現によるアポトーシス細胞の増加 (左図) と遺伝子ノックダウンによる減少 (右図)

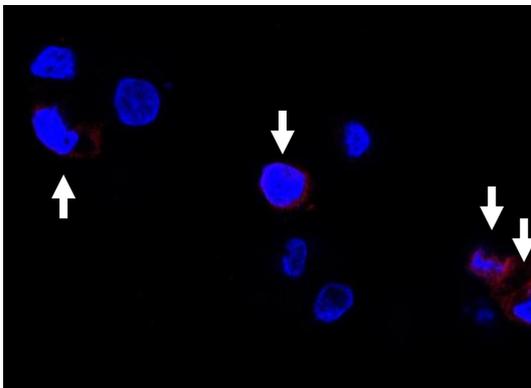


図 5 赤色蛍光で標識した Cav3.1 チャンネルが膜発現する細胞はアポトーシスの特徴を示す。青色蛍光は、核を示す。

Cav3.1 チャンネルがアポトーシスと関連していることが推定されたので、Cav3.1 を強制発現させ、アポトーシスアッセイにて定量的に測定した。その結果、空ベクターのみを発現させたものと比較して、有意にアポトーシス細胞が増加した (図 4 a)。また、Cav3.1 遺伝子 siRNA によるノックダウンは、アポトーシスを有意に減少させた (図 4 b)。また、Cav3.1 チャンネルの N 端に赤色蛍光タンパクを付加した Cav3.1-RFP を強制発現すると、アポトーシスアッセイで観察された結果に一致して、赤色蛍光を膜発現している細胞においては例外なく強い核の濃染や凝集が起きていた (図 5)。空ベクターによる細胞質での赤色蛍光を発現する細胞においては観察されなかった。これらのことは、Cav3.1 チャンネルが MCF-7 細胞においてアポトーシスを誘導することを示唆している。非腫瘍性 MCF-10F 細胞では、この現象は観察されなかった。

細胞増殖抑制とアポトーシスの細胞内経路：

乳癌治療薬であり、遺伝子毒性を示すシクロホスファミドは、MCF-7 細胞においてアポトーシスを誘導すると同時に Cav3.1 チャンネル発現を増加させた。シクロホスファミドによるアポトーシスは Cav3.1 遺伝子 siRNA によって抑制された。シクロホスファミドは、

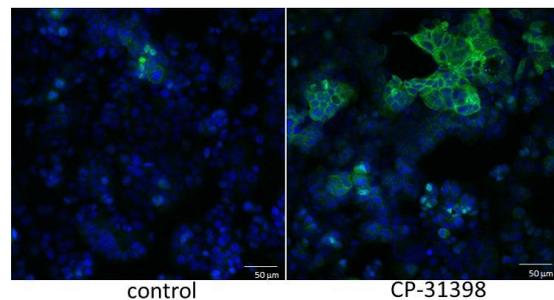
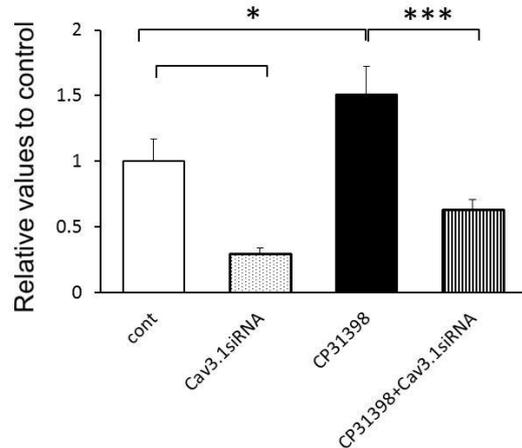


図 6 CP-31398 によるアポトーシス増加 (上図) と Cav3.1 チャンネル (緑色蛍光) の発現の増加 (下図)

p53 経路を介してアポトーシスに至ることが報告されていることから、次に、p53 経路との関連を調べた。p53 安定化剤 CP-31398 はアポトーシス誘導剤としても使用されるが、これにより MCF-7 細胞のアポトーシスが增加し、更に、この CP-31398 誘導アポトーシスは Cav3.1 の siRNA によって抑制された (図 6 上)。また、CP-31398 はこれと一致して、Cav3.1 チャネル発現を増加させた (図 6 下) ことから、p53 によるアポトーシス誘導に際して Cav3.1 が関与していることが示唆された。また、データベース検索によると、Cav3.1 遺伝子上流には、p53 レスポンスエレメントが存在するので、Cav3.1 チャネル発現には p53 が関与する可能性がある。

脱メチル化薬による影響

DNA メチル化阻害剤の一つで、細胞毒性が低いとされている zebularine によって、Cav3.1 チャネルの発現が増加することを、免疫染色によって観察した。MCF-7 細胞においては、Cav3.1 チャネルがメチル化による発現抑制を受けている可能性がある。

遺伝子ノックダウンによって変動する遺伝子群のマイクロアレイによる解析

Cav3.1 遺伝子及び Cav3.2 遺伝子のそれぞれの siRNA によるノックダウン後、変動する遺伝子群を解析ソフト G0stat により解析した。Cav3.1 ノックダウンによって、p53 安定化に働く *siah1*、p53 誘導アポトーシスに関与する XPD や、p53 リン酸化・活性化を誘導する GADD34 など p53 関連の遺伝子が幾つか有意に減少していた (Table1)。一方、Cav3.2 による変動遺伝子群の構成は、Cav3.1 によるものとはかなり異なっており、Table1 に示した遺伝子群の有意な変動は無かった。これらのうち、*siah-1* に着目して、Cav3.1 との二重免疫染色を行うと、アポトーシス細胞に両者は一致して発現していた。このことから、Cav3.1 による Ca²⁺流入からアポトーシス促進へと働く経路において *siah1* が関与していることが示唆された。

まとめ

電気生理学的に非常に似た特徴を持つとされ、同様に Ca²⁺流入機構としての役割を果たしている T 型 Ca チャネルアイソフォーム Cav3.1 と Cav3.2 チャネルの癌の病態生理学的機能に果たす役割を比較検討した。Cav3.1 チャネルは MCF-7 腫瘍細胞において増殖抑制に働くが、Cav3.2 チャネルにはこの生理作用は観察されなかった。細胞内 Ca²⁺濃度変化に関する様式の違いなど、おそらく Cav3.2 チャネルとは異なる機序を介して Cav3.1 が癌の増殖に関与していると考えられた。また、非腫瘍性 MCF-10F 細胞では、Cav3.1 による増

Table 1. Cell cycle-related genes changed by Ca_v3.1 knockdown.

Gene symbol	Description	Z-score for Ca _v 3.1	Z-score for Ca _v 3.2
ERCC2	Xeroderma pigmento sum group D (XPD)	-3.4980806	-0.1718786
SIAH1	Seven in absentia homolog 1	-6.0084969	0.3178764
GADD34	Growth arrest and DNA damage-inducible protein	-3.6228875	-0.4750755
STRADB	E20-related kinase adaptor β	3.9179519	1.5596587
MIS12	MIND kinetochore complex component	4.6366151	-0.5762074
SYCP1	Synaptonemal complex protein 1	3.1491646	0.5514925
CCND2	Cyclin D2	3.5136368	-0.046792
XRN1	5'-3' exonuclease 1	2.7172767	-0.246792

殖抑制は観察されず、腫瘍細胞と正常細胞間では、Cav3.1 チャネルの生理作用に違いがあることが示唆された。更に、Cav3.1 チャネルとアポトーシスとの関連が示唆されたので、免疫染色やアポトーシスアッセイ等で詳細に検討した結果、Cav3.1 は MCF-7 腫瘍細胞においてアポトーシス促進に働くことが示唆された。

細胞内伝達経路を調べた結果、Cav3.1 は

p53 による発現調節を受けると共に、siah1 の発現調節を介して p53 安定化に寄与し、アポトーシス促進に働くことが示唆された。また MCF-7 細胞ではメチル化による発現停止が起きていることなど、Cav3.1 が癌抑制遺伝子として働く可能性を裏付ける結果であった。Cav3.1 の発現増加を誘導する薬物の開拓は癌治療の新たな可能性につながると考えられる。

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 2 件)

- ① Ohkubo T, Yamazaki J: T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is involved in anti-proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. International Journal of Oncology, 査読有, 2012: 41(1): 267-275.
Doi: 10.3892/ijo.2012.1422
- ② Ohkubo T, Yamazaki J, Kitamura K: Tarantula toxin ProTx-I differentiates between human T-type voltage-gated Ca²⁺ Channels Cav3.1 and Cav3.2. Journal of pharmacological sciences, 査読有, 2010:112(4): 452-458.
doi:10.1254/jphs.09356FP

[学会発表] (計 5 件)

- ① 大久保つや子、他 2 名: 「Cav3.1 カルシウムチャンネルを介したアポトーシス機序」日本薬理学会第 85 回年会. (2012. 3. 15). 京都
- ② 大久保つや子、他 2 名: 「MCF-7 乳癌由来細胞において T 型 Ca²⁺チャンネル Cav3.1 はアポトーシス促進に関与する」日本薬理学会第 64 回西南部会. (2011. 11. 20). 福岡
- ③ 大久保つや子、他 1 名: 「T 型カルシウムチャンネル Cav3.1 の MCF-7 細胞増殖抑制の機序」日本薬理学会第 84 回年会. (2011. 3. 23). 東京
- ④ 大久保つや子、他 2 名: 「T 型カルシウムチャンネルによるヒト乳ガン由来 MCF-7 細胞増殖の制御」日本薬理学会第 83 回年会. (2010. 3. 18). 東京
- ⑤ 大久保つや子、他 2 名: 「ヒト乳ガン由来 MCF-7 細胞の増殖制御における T 型 Ca²⁺チャンネルの関与」日本薬理学会第 62 回西南部会. (2009. 11. 27). 松山

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大久保 つや子 (Ohkubo Tsuyako)
福岡歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 21590247

(2) 研究分担者

無し ()
研究者番号:

(3) 連携研究者

無し ()
研究者番号: