

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 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591627

研究課題名（和文）がん細胞接着・細胞運動を制御する TRPV2 チャンネルのトラフィッキング機構

研究課題名（英文） The role of TRPV2 channel trafficking in cancer cell adhesion and motility

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

研究成果の概要（和文）：

TRPV2チャンネルが、さまざまながん細胞で発現していることを認めた。そこで、まずヒトの肉腫細胞株でTRPV2の機能検討をした。EGFなどの増殖因子刺激によりTRPV2が形質膜にトランスロケーションして、持続的なカルシウム上昇を認めた。さらに、EGF刺激によるカルシウム上昇は、TRPV2のノックダウンやTRPチャンネル阻害剤により抑制された。また、PI-3 キナーゼ依存的にTRPV2がトランスロケーションした。TRPV2は、細胞膜の細胞運動先端であるフィロポディア・ラメリポディア部位に局在し、その局在が増殖因子刺激によりダイナミックに変化するのを見いだした。さらに、細胞接着を制御する分子との検討では、TRPV2とβインテグリン、ビンキュリン、パキシリン等の細胞接着の構造と機能を制御するタンパク質と共局在することがわかった。そこで、接着斑における分子・およびその機能を可視化するプローブを作製して検討した。接着斑におけるビンキュリンのコンフォーメーション変化とビンキュリンの伸展感受センサーを作製・利用して検討すると、ビンキュリンのコンフォーメーション変化とTRPV2の局在の変化、さらにTRPV2による細胞内カルシウムがダイナミックに変化するのを見いだした。TRPV2により調節される細胞内カルシウムは、その細胞接着部における接着斑の崩壊に重要な機能を有することが示唆された。TRPV2のトラフィッキング機構は、細胞運動における細胞膜のリサイクリング機構と関連性が強いことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

TRPV2 channel was expressed in various cancer cells. In the present study, human fibrosarcoma cell lines was selected as a model system. Stimulation by EGF induced translocation of TRPV2 to the plasma membrane by a phosphatidylinositol (PI) 3-kinase-dependent mechanism. Moreover, an application of EGF caused a sustained increase of cytoplasmic calcium. Knock down of TRPV2 or TRP inhibitors blocked the changes in free calcium concentration. TRPV2 was localized at the filopodia or lamellipodia in the cells. TRPV2 also colocalized with focal adhesion structures, such as β-integrin, paxillin, and vinculin. To further analyze these localization of TRPV2, vinculin conformation sensor FRET probe or vinculin tension sensor FRET probe was used. The vinculin conformation changes and calcium changes were observed around the front of the migrating cells. TRPV2 trafficking is related with the recycling of the plasma membrane.

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	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：カルシウムチャネル、癌細胞、細胞運動

1. 研究開始当初の背景

細胞接着・細胞運動は癌細胞の浸潤・転移ばかりでなく、発生における形態形成、神経系の神経突起の伸長、免疫細胞の抗原認識・異物排除・炎症部位への集積などのさまざまな重要な生体反応に関わっている。以前より、細胞内のカルシウム ( $Ca^{2+}$ ) は細胞接着・運動、細胞骨格、細胞増殖の調節に重要であることが知られている。しかし、細胞接着・運動において細胞内  $Ca^{2+}$  動態がどのように制御されているか、さらに、癌細胞の浸潤・転移において細胞内  $Ca^{2+}$  動態がどのように制御または脱制御されているかは不明である。申請者のグループは、世界で初めて増殖因子刺激で細胞膜にトランスロケーションする  $Ca^{2+}$  透過性チャネル (TRPV2) を同定し報告した (Nature Cell Biol. 1:165, 1999)。これは  $Ca^{2+}$  透過性イオンチャネルが、細胞内トラフィックにより調節されることを初めて明らかにしたものである。またさらに申請者は、TRPV2 チャネルがマクロファージの細胞接着・運動に重要であることを論文として報告した (J Cell Physiol. 210: 692, 2007)。ケモカイン、血清、増殖因子刺激などにより、TRPV2 チャネルが活性化されて持続的な細胞内  $Ca^{2+}$  上昇が生じる。この  $Ca^{2+}$  流入に際しては、チャネル分子がホスファチジルイノシトール 3 (PI3)-キナーゼ依存的に細胞表面にトランスロケーションして、インテグリン、フォーカルアドヒージョンキナーゼなどの細胞の接着斑構成分子群と共局在し、複合体を形成して  $Ca^{2+}$  チャネルとして機能すること、そしてこのチャネル機能を阻害すると細胞運動が抑制されることを報告した。

インテグリンを介しての細胞外マトリックスの接着様式には、フォーカル・コンプレックス、それが成熟したフォーカル・アドヒージョンがあるが、さらにフォーカル・コンプレックス/アドヒージョンが集族した特殊な接着構造としてポドソーム (接着斑がクラスター化した構造で、癌細胞では浸潤仮足：インベドポディアと呼ばれる) があることも知られている。これらの接着斑は、細胞接着・運動のシグナルのプラットフォームとして機能して、さまざまな分子群により制御されていると考えられている。最近我々は、このシグナルのプラットフォームであるポドソームに TRPV2 が、GPCR 刺激によりトランスロケーションして分単位でポドソームの形態をダイナミックに調節するばかりでなく、この特殊な接着構造のポドソームにおいて、TRPV2 が局所的な細胞内カルシウム上昇をもたらし、細胞接着斑を崩壊させる。この繰り返しによりポドソームのターン・オーバーが制御されて細胞運動が制御されていることを見いだした。

2. 研究の目的

細胞接着・運動に際して  $Ca^{2+}$  チャネル分子自体が細胞膜表面の接着斑に動員され、接着斑のさまざまな分子群と複合体を構成して接着・運動を制御する。さらに、それに伴う細胞内カルシウム上昇により、接着斑を構成する分子複合体は壊され、チャネル自身は細胞内にインターナリゼーションされ機能を失う。接着斑のターン・オーバーをカルシウムチャネル分子自身が積極的に制御する全く新

規の調節機構が存在するものと考えられる。細胞接着・運動の制御には、秒単位から分単位のダイナミックな接着の変化が重要である。細胞内のカルシウムシグナルが、接着・運動を制御していることは以前から知られていた。しかし、カルシウムシグナルを生み出す分子実体が不明のため詳細は不明のままであった。申請者は、細胞運動能が高いメラノーマ細胞株や線維肉腫細胞株に TRPV2 が高発現していること。その TRPV2 チャンネルの機能を阻害すると細胞運動が抑制されることを見いだしている。さらに海外の研究グループにより、TRPV6 が前立腺癌のホルモン非依存性の増殖、被膜外浸潤、細胞増殖などの悪性度と相関して前立腺癌の予後因子となりうるということが報告されている (J Bio Chem 2001, Oncogene 2003 など)。しかし、これまで細胞の接着・浸潤におけるカルシウムチャンネルの制御機構の解析はまったくなされておらず、癌細胞の転移・浸潤におけるカルシウムチャンネルの病態生理学的意義も不明のままである。申請者は TRPV2 チャンネルの調節機構の解析から、カルシウムによる細胞骨格・接着調節因子の制御機構を明らかにしたいと考えている。

### 3. 研究の方法

I TRPV2 チャンネル分子強制発現系とノックダウン細胞系の樹立: TRPV2 の細胞外ドメインにタグを付加したもの、また蛍光蛋白と癒合せたコンストラクトを作製して、TRPV2 の細胞内局在をリアルタイムに可視化するのに成功している。さらにアデノ、レトロ、レンチウイルスベクターによるマウス・ラット・ヒト TRPV2 の発現コンストラクトを作製した。さらに、ヒト・マウス・ラット TRPV2 siRNA を作製して、内因性の TRPV2 の発現・機能を阻害したノックダウン癌細胞株を樹立する。

II 上記の TRPV2 高発現細胞株・異所性発現細胞株・ノックダウン細胞株の検討:

1) 細胞運動能の評価 白血病細胞株、メラノーマ細胞株、神経内分泌細胞株、ヒト線維肉腫細胞株、血管内皮細胞株などの一般的に細胞運動が評価されているモデル細胞にも、TRPV2 チャンネルが発現している。そこで、市販されている浸潤アッセイ・を利用して、細胞・接着・運動・遊走能を評価する。

2) カルシウムチャンネルの活性化の検討 さまざまな刺激によるチャンネル分子の動態と細胞内

Ca<sup>2+</sup>動態の変化をCa<sup>2+</sup>感受性蛍光色素・蛍光蛋白プローブ(Fura-2、カメレオン)で可視化する。さらに、TRPV2 チャンネル高発現に伴う細胞骨格、オルガネラの形態、接着分子群の局在の変化を検討する。

III 細胞の collective migration (集団遊走) と単細胞の遊走の相違の解明 器官形成などの形態形成時に生じる細胞遊走の特徴は、個々の細胞がバラバラになって遊走するのではなく、集団で遊走することが重要である (collective migration)。細胞間接着を制御する機構と細胞-基質の接着するシグナルにはクロストークがある。そこで、TRPV2 チャンネル分子と細胞間接着を制御する分子群との関連性を検討する。

1) ホスファチジルイノシトール3 (PI3) - キナーゼ、phosphatase and tensin homolog (PTEN) は癌細胞浸潤・転移、増殖に強く関連することが知られている。そこで細胞内における PIP<sub>2</sub>、PIP<sub>3</sub> を Grp1-PH domain GFP, Akt-PH domain GFP で可視化 (PHドメインで PIP<sub>2</sub>、PIP<sub>3</sub> につき機能する蛍光分子) して、TRPV2 チャンネル分子との細胞内局在、細胞内 Ca<sup>2+</sup> との関連性を検討する。

2) 低分子量G蛋白質との関連: 低分子量G蛋白 (Rho, Rac, Cdc42, Rap1) 活性促進変異体・抑制変異体を利用して細胞運動に伴うフィロポディア、ラメリポディアなどの細胞の形態変化とチャンネルの局在、細胞接着斑の構造変化、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動態を蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡、エバネッセント顕微鏡で検討する。

3) 細胞骨格 (アクチン・チューブリン・ミオシン) とそれらを制御する分子群との関連 アクチン制御蛋白には、カルシウムで直接調節されているゲルソリンやカルシウムカルモジュリン依存性酵素により調節されているミオシン軽鎖キナーゼなどがある。そこでアクチン重合阻害剤、チューブリン重合阻害剤、非筋肉型ミオシン II 阻害剤を利用して TRPV2 チャンネルとの局在・機能との関連性を検討する。

IV ノックアウトマウスの作製: マウス TRPV2 のゲノムをもとに Cre-lox システムを利用してシステミック・ノックアウトマウス、コンディショナル・ノックアウトマウスの作製する。

### 4. 研究成果

1) さまざまながん細胞株における TRPV2 の発現を PCR でスクリーニングした。

表 1 の四角で囲んだ細胞株に TRPV2 の発現を認めた。

Cells Lines and TRPV2			
Breast Ca	MCF-7 ZR75 MDA-MB231	Colon Ca	Wi Dr
		Glioma	U851
Ovarian Ca	OVCAR-3 SK-OV	Lung Ca	A-549
Pancreatic Ca	ASPC-1 MIA PaCa2	Melanoma	G-361 B16
Leukemia	THP-1 Raji K-562	Hepaloma	Hep G2
Fibrosarcoma	HT1080	AR 42J Min6 INS-1 PC12	

表 1

2) 上記細胞株でさらに検討すると HT-1080 細胞株で TRPV2 の発現量が多いことが判明した。そこで、TRPV2 抗体で免疫染色を行なった(図 1)。細胞表面、さらに細胞内にも TRPV2 が局在することがわかった。

#### Expression of the TRPV Channels In HT1080 Cells

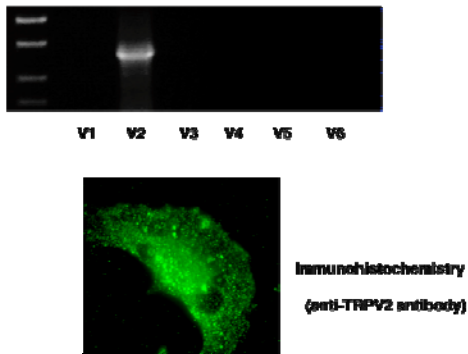


図 1

3) TRPV2 の細胞外ドメインに myc 抗体で認識できる部位を挿入して、細胞表面にのみ存在する TRPV2 を検討した(図 2)。TRPV2 は、ラメリポディアに局在し、接着斑構造に局在することがわかった。

#### TRPV2-oz.myc-EGFP Expressing HT1080 Cells

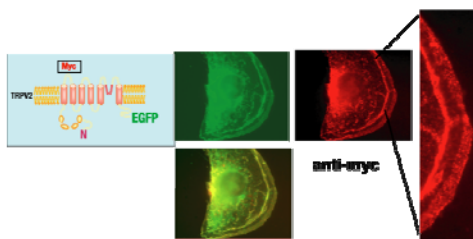


図 2

4) TRPV2-strawberry を HT-1080 細胞に発現させ、EGF で刺激すると TRPV2 チャンネルのトランスロケーションを認めた。(図 3)

#### Localization of TRPV2 in HT1080 Cells

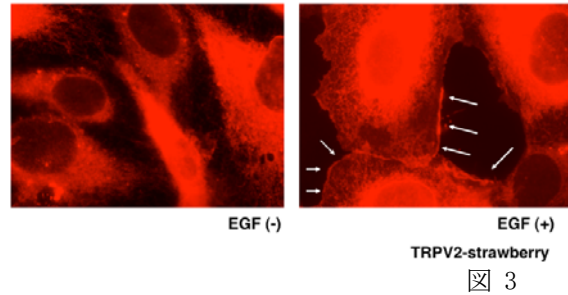


図 3

5) カルシウムの変化を fura-2 で検討すると EGF 刺激により細胞外からのカルシウム流入を認めた。(図 4)

#### Effect of EGF on $[Ca^{2+}]_e$ In HT1080 Cell

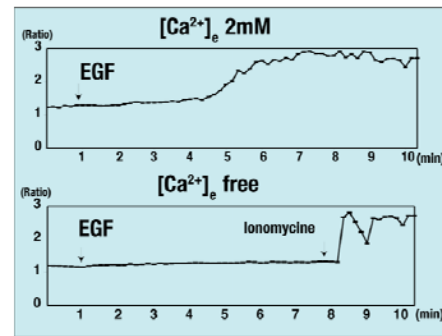
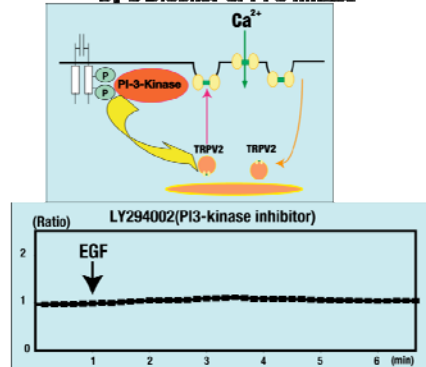


図 4

6) EGF 刺激によるカルシウム上昇は PI 3 キナーゼ阻害剤により抑制された(図 5)。

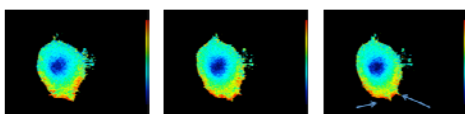
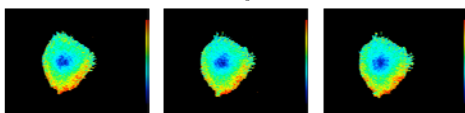
#### Inhibition of EGF-induced Calcium Entry by a Blocker of PI 3-kinase



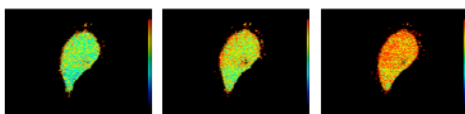
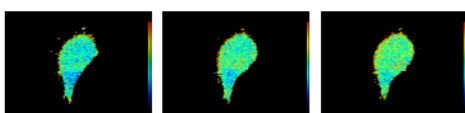
(図 5)

7) EGF 刺激により細胞運動が生じ、細胞運動先端においてカルシウムの上昇を認めた。この部位では vinculin のコンフォーメーション変化が生じている。TRPV2 によるカルシウム上昇により、細胞接着構造がダイナミックに変化していると考えている。さらに、詳細な検討が必要である。

Effect of EGF on  $[Ca^{2+}]_i$  in Cell movement



EGF induced vinculin conformation change



## 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 5 件)

- 1) Hisanaga E, Nagasawa M, Ueki K, Kulkarni RN, Mori M, Kojima I : Regulation of Calcium-Permeable TRPV2 Channel by Insulin in Pancreatic beta-Cells. Diabetes 58:174-184, 2009 査読有
- 2) Furuta A, Tanaka M, Omata W, Nagasawa M, Kojima I, Shibata H: Microtubule Disruption with BAPTA and Dimethyl BAPTA by a Calcium Chelation-Independent Mechanism in 3T3-L1 Adipocytes. Endocrine J 56: 235-243, 2009 査読有
- 3) Nakagawa Y, Nagasawa M, Yamada S, Hara A, Mogami H, Nikolaev VO, Lohse MJ, Shigemura N, Ninomiya Y, Kojima I : Sweet Taste Receptor Expressed in Pancreatic beta-Cells Activates the Calcium and Cyclic AMP Signaling Systems and Stimulates Insulin Secretion. 査読有 PLOS One 4 e5106, 2010
- 4) Nagasawa M and Kojima I: Translocation of calcium-permeable TRPV2 channel to the podosome: Its role in the regulation of podosome assembly. Cell Calcium 51:186-193, 2012 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) 膵内分泌細胞の分化における TRPV2 チャンネルの役割  
小島至、山田聡子、小寺力、中川祐子、長澤雅裕  
第7回 TRP チャンネル研究会  
平成23年6月2日(木)~3日(金)  
岡崎カンファレンスセンター
- 2) 長澤 雅裕, 小島 至、  
細胞接着・細胞運動とTRPV2機能制御  
第6回 TRP チャンネル研究会  
平成22年6月3日(木)~4日(金)  
岡崎カンファレンスセンター
- 3) 長澤雅裕、中川祐子、小島 至  
がん細胞の遊走とTRPV2機能  
第5回 TRP 研究会  
岡崎カンファレンスセンター  
平成21年6月4日(木)~6月5日(金)

## 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