

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 31 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790204

研究課題名（和文） 癌細胞ナトリウムポンプのトラフィック異常が関与する新規病態生理機構

研究課題名（英文） Novel pathophysiological mechanisms involving the aberrant trafficking of sodium pump in human cancer cells

研究代表者

藤井 拓人 (FUJII TAKUTO)

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・助教

研究者番号：50567980

研究成果の概要（和文）：様々な癌細胞に異常発現するナトリウムポンプ $\alpha 3$ アイソフォーム ($\alpha 3\text{NaK}$) は、通常ナトリウムポンプが存在する原形質膜ではなく、 rab10 の存在する小胞に局在していた。ヒトおよびマウス癌細胞を用いた *in vitro* 実験および *in vivo* 実験の結果、細胞内小胞に分布する $\alpha 3\text{NaK}$ は、癌細胞の生存および成長に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 3$ -isoform ($\alpha 3\text{NaK}$) is abnormally expressed in various types of human cancer cells. $\alpha 3\text{NaK}$ is not localized in plasma membrane, but in intracellular vesicles in which rab10 is present. *In vitro* and *in vivo* studies using human and mouse cancer cells showed that $\alpha 3\text{NaK}$ may be involved in the mechanisms of cancer cell survival and growth.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2011 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 生理学一般

キーワード：癌・ナトリウムポンプ・トラフィック異常・原形質膜・小胞

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、当大学倫理委員会の承認のもと医学部第二外科よりヒト消化器癌組織の提供を受け、ヒト肝細胞癌において、ナトリウムポンプ (Na^+, K^+ -ATPase) の $\alpha 3$ -isoform ($\alpha 3\text{NaK}$) が異常高発現し、癌組織ではナトリウムポンプ活性が有意に増加していることを見出した。 $\alpha 3\text{NaK}$ は神経細胞に高発現するナトリウムポンプで、神経細胞では他の Na^+, K^+ -ATPase と同様に原形質膜に局在する。しかし興味深いことに、癌細胞における

$\alpha 3\text{NaK}$ は、原形質膜ではなく、細胞質内に局在していた。他方、癌細胞において Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 1$ -isoform ($\alpha 1\text{NaK}$) は、 $\alpha 3\text{NaK}$ とは異なり原形質膜に局在していた。さらに、ヒト組織アレイを用いた解析において、 $\alpha 3\text{NaK}$ は肝細胞癌のみならず胃癌、大腸癌、乳癌など種々の癌の細胞質内に異常発現していることがわかった。従って、癌細胞において $\alpha 3\text{NaK}$ は共通の病態生理機能を持つ可能性が考えられた。このような細胞内局在型ナトリウムポンプの生理機能や原形質

膜へのトラフィッキング異常については、国内外のどの研究グループからも報告はなかった。癌細胞における $\alpha 3\text{NaK}$ の機能は、正常細胞の原形質膜でのナトリウムポンプの機能とは全く異なるものと予想された。

2. 研究の目的

本研究では、(1) $\alpha 3\text{NaK}$ の小胞体から原形質膜へのトラフィッキング機構、(2) 原形質膜における $\alpha 3\text{NaK}$ の生理機能、(3) $\alpha 3\text{NaK}$ の小胞体での生理機能、(4) $\alpha 3\text{NaK}$ の機能関連タンパク質の同定および複合体機能、(5) 癌細胞における $\alpha 3\text{NaK}$ の病態生理的意義を明らかにすることで、小胞体 - 原形質膜間トラフィッキング異常が関与するナトリウムポンプの新しい病態生理機構の全容解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝細胞癌組織における $\alpha 3\text{NaK}$ のポンプ活性は、 $\alpha 3\text{NaK}$ が ATP を加水分解する際に生じる無機リン酸量を定量することで評価した。ヒト組織については、当大学倫理委員会の承認のもと当大学附属病院でインフォームドコンセントの得られた患者の手術切除標本を用いた。

(2) ヒト大腸癌由来 HT-29 細胞、ヒト胃癌由来 MKN45 細胞およびヒト肝細胞癌由来 HepG2 細胞において、抗 $\alpha 3\text{NaK}$ 抗体と各種オルガネラマーカーおよび分泌小胞マーカーを用いた免疫細胞共染色、抗 $\alpha 3\text{NaK}$ 抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析、Percol/ショ糖密度勾配遠心により分離した膜分画サンプルのウェスタンブロットにより、 $\alpha 3\text{NaK}$ の詳細な細胞内局在部位について検討した。

(3) HT-29 細胞に $\alpha 3\text{NaK}$ の siRNA をスクレオフェクションし、 $\alpha 3\text{NaK}$ を一過性にノックダウンした。また、マウス大腸癌由来 colon38 細胞に、ヒト肝細胞癌組織よりクローニングしたヒト $\alpha 3\text{NaK}$ をトランスフェクションし、一過性に発現させた。両細胞系において、 $\alpha 3\text{NaK}$ の発現量はウェスタンブロットおよび免疫細胞染色により検討し、 $\alpha 3\text{NaK}$ の発現変化による細胞生存率（ミトコンドリア活性）の変化は、MTT アッセイにより検討した。

(4) $\alpha 3\text{NaK}$ を一過性に発現させた colon38 細胞および空ベクターを導入した細胞を、C57BL6N マウスの腹部皮下組織に移植した。移植後 5 日目および 10 日目にマウスを安楽死させ腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定し、 $\alpha 3\text{NaK}$ の発現有無による腫瘍成長率の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト肝細胞癌組織を用いて癌細胞における $\alpha 3\text{NaK}$ の異常発現とナトリウムポンプ活性との相関関係について検討した。11 症例のヒト肝細胞癌組織および近傍の非癌組織について、ナトリウムポンプの各アイソフォームの癌組織における発現量変化率と癌組織におけるナトリウムポンプ活性変化率の相関関係を調べたところ、癌組織における $\alpha 3\text{NaK}$ の発現増加率とポンプ活性上昇率との間に有意な相関が見られた (図 1)。また、癌組織において上昇するナトリウムポンプ活性の Na^+ 親和性は、 $\alpha 3\text{NaK}$ の Na^+ 親和性と一致した。以上より、肝細胞癌組織におけるナトリウムポンプの活性上昇は $\alpha 3\text{NaK}$ の発現増加に起因することが示唆された。またこの結果は、原形質膜ではなく細胞内において $\alpha 3\text{NaK}$ がポンプ機能を有しており、機能するために必要なナトリウムポンプ複合体を形成していることを示唆している。

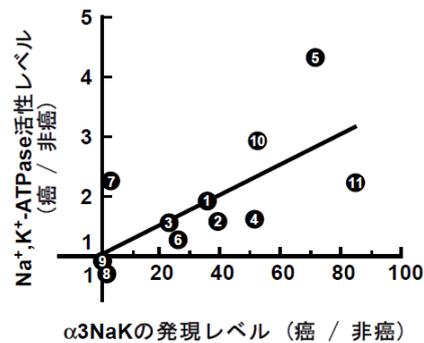


図1 癌組織における $\alpha 3\text{NaK}$ の発現レベルと Na^+, K^+ -ATPase 活性との相関

(2) Percol/ショ糖密度勾配遠心により、HT-29 細胞の細胞内小器官を分離し、ウェスタンブロットを行った。 $\alpha 3\text{NaK}$ の分布パターンは、 $\alpha 1\text{NaK}$ および原形質膜マーカーの flotillin-2 の分布パターンとは明らかに異なっていた。次に、HT-29 細胞、MKN45 細胞、HepG2 細胞において、各種オルガネラマーカーおよび分泌小胞マーカーとの免疫共染色を行い、細胞内における $\alpha 3\text{NaK}$ の局在部位について検討したところ、 $\alpha 3\text{NaK}$ の一部は、小胞体に局在していたが、大部分は rab10 の局在と一致していた。また、高圧凍結技法を用いた免疫電子顕微鏡解析により、HT-29 細胞において $\alpha 3\text{NaK}$ は、原形質膜直下に存在する直径 50 nm 以下の小さい小胞に分布している可能性が示唆された。これらの結果より、 $\alpha 3\text{NaK}$ は、小胞体から原形質膜ではなく、原形質膜直下に存在する rab10 含有小胞にトラフィッキングされていることが示唆された。

(3) HT-29細胞に $\alpha 3\text{NaK}$ のsiRNAを導入し、 $\alpha 3\text{NaK}$ を一過性にノックダウンした。ウェスタンブロットを行なったところ、 $\alpha 3\text{NaK}$ ノックダウン細胞において、 $\alpha 3\text{NaK}$ の発現量は約40%に低下していた。この細胞系を用いて、MTTアッセイを行ったところ、 $\alpha 3\text{NaK}$ のsiRNAを導入したノックダウン細胞(図2; $\alpha 3\text{NaK}$ -siRNA)では、コントロールsiRNAを導入した細胞(図2; NC-siRNA)に比べて、ミトコンドリア活性が有意に低下した(図2A)。次に、内因的な $\alpha 3\text{NaK}$ を発現していないcolon38細胞に $\alpha 3\text{NaK}$ を過剰発現させた。過剰発現した $\alpha 3\text{NaK}$ は、ヒト癌細胞の場合と同様に細胞内に分布しており、 $\text{rab}10$ と分布が一致したことから、分泌小胞に局在していることが示唆された。この細胞系を用いて、MTTアッセイを行なったところ、 $\alpha 3\text{NaK}$ の過剰発現細胞(図2; $\alpha 3\text{NaK}$)では空ベクターを導入した未発現細胞(図2; mock)に比べて、有意にミトコンドリア活性が上昇した(図2B)。

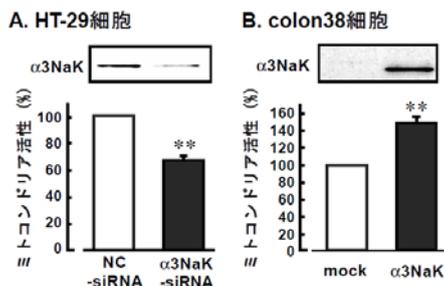


図2 $\alpha 3\text{NaK}$ の発現変化による癌細胞のミトコンドリア活性の変化

(4) 癌細胞における $\alpha 3\text{NaK}$ の生理機能を *in vivo* 実験において検討した。colon38細胞をC57BL/6Nマウスの腹部皮下組織に移植した。 $\alpha 3\text{NaK}$ の過剰発現細胞を移植したマウスは、空ベクターを導入した未発現細胞を移植したマウスに比べて、移植後5日目および10日目の腫瘍重量が有意に増加しており、腫瘍成長率の亢進が見られた。

以上の研究成果より、癌細胞の $\text{rab}10$ 含有小胞に局在する $\alpha 3\text{NaK}$ は、癌細胞の生存および成長メカニズムに関与している可能性が示唆された。癌細胞の細胞内小胞における $\alpha 3\text{NaK}$ の機能については国内外どのグループからも報告されておらず、本研究成果が初めてであると考えられる。また、原形質膜におけるポンプ機能とは異なるナトリウムポンプの新たな生理機能の発見に繋がる可能性があり、学術的な重要性は高い。現在、本研究成果をまとめた論文を投稿準備中である。

今後、癌細胞の小胞に存在する $\alpha 3\text{NaK}$ を

特異的に阻害する薬物のスクリーニングを行い、その抗癌作用を評価することで、 $\alpha 3\text{NaK}$ を標的とする新たな癌制御法の開発に繋がる研究が展開できるものと期待される。

また、本研究課題の遂行過程において以下の成果も得た。

(5) 原形質膜における Na^+, K^+ -ATPaseの活性調節に K^+/Cl^- 共輸送体3aのN末端領域が重要な役割を担っていることを見出した。

(6) HepG2細胞の原形質膜では、ナトリウムポンプの阻害剤ウアバインに非感受性のecto-ATPase活性が、感受性の Na^+, K^+ -ATPase活性より高く存在すること、その活性がクルクミンにより阻害されることを見出した。

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6件)

① Fujii T., Minagawa T., Shimizu T., Takeguchi N., Sakai H., Inhibition of ecto-ATPase activity by curcumin in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *J. Physiol. Sci.*, 2012, 62:53-58. 査読有

② Fujii T., Fujita K., Takeguchi N., Sakai H., Function of K^+/Cl^- cotransporters in the acid secretory mechanism of gastric parietal cells., *Biol. Pharm. Bull.*, 2011, 34: 810-812. 査読有

③ Shimizu T., Higuchi T., Fujii T., Nilius B., Sakai H., Bimodal effect of alkalization on the polycystin transient receptor potential channel, PKD2L1. *Pflugers Arch.*, 2011, 461:507-513. 査読有

④ Fujii T., Fujita K., Shimizu T., Takeguchi N., Sakai H., The NH_2 -terminus of K^+/Cl^- cotransporter 3a is essential for up-regulation of Na^+, K^+ -ATPase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, 399: 683-687. 査読有

⑤ Shibuya K., Fukuoka J., Fujii T., Shimoda E., Shimizu T., Sakai H., Tsukada K., Increase in ouabain-sensitive K^+ -ATPase activity in hepatocellular carcinoma by overexpression of Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 3$ -isoform. *Eur. J. Pharmacol.*, 2010, 638: 42-46. 査読有

〔学会発表〕(計 28 件)

①藤井拓人、船山佳佑、清水貴浩、本領智、竹口紀晃、酒井秀紀：ウアバインによる容積感受性外向き整流性 Cl⁻チャネルの活性化はヒト大腸癌細胞のバイアビリティを低下させる。第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 30 日、長野県松本市。

②藤井拓人、船山佳佑、清水貴浩、本領智、竹口紀晃、酒井秀紀：低濃度ウアバインによる容積感受性 Cl⁻チャネルの活性化と非アポトーシス性細胞死。第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2011 年 11 月 25 日、岡山県岡山市。

③藤井拓人、船山佳佑、清水貴浩、本領智、竹口紀晃、酒井秀紀：ウアバインによるヒト大腸癌細胞のバイアビリティ低下と容積感受性 Cl⁻チャネルの活性化。第 58 回中部日本生理学会大会、2011 年 11 月 2 日、福井県福井市。

④Fuji T., Shibuya K., Shimoda E., Shimizu T., Tsukada K., Takeguchi N., and Sakai H.: Over expression of neural-type sodium pump contributes to elevation of sodium pump activity in hepatocellular carcinoma. International joint meeting of cellular and molecular physiology in epithelia, 2011. 7. 31, Tokyo.

⑤藤井拓人、皆川拓磨、清水貴浩、竹口紀晃、酒井秀紀：血中 ATP 分解酵素に対するクルクミンの効果。第 12 回 Pharmaco-Hematology Symposium、2011 年 6 月 18 日、富山県富山市。

⑥藤井拓人、皆川拓磨、清水貴浩、竹口紀晃、酒井秀紀：肝がん細胞における ecto-nucleotidase および P2X 受容体に対するクルクミンの効果。日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 30 日、静岡県静岡市。

⑦下田恵理、藤井拓人、渋谷和人、清水貴浩、塚田一博、竹口紀晃、酒井秀紀：肝細胞がんにおける Na⁺,K⁺-ATPase α3 アイソフォームの活性増大。第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2010 年 11 月 30 日、富山県富山市。

⑧藤井拓人、皆川拓磨、清水貴浩、竹口紀晃、酒井秀紀：肝細胞における ecto-ATPase 活性に対するクルクミンの効果。第 57 回中部日本生理学会、2010 年 10 月 16 日、愛知県豊明市。

⑨藤井拓人、渋谷和人、下田恵理、清水貴浩、竹口紀晃、塚田一博、酒井秀紀：ヒト肝細胞におけるウアバイン非感受性 Na⁺-ATPase 活性の特性。第 87 回日本生理学会大会、2010 年 5 月 19 日、岩手県盛岡市。

〔図書〕(計 1 件)

酒井秀紀、藤井拓人：胃酸分泌細胞のトランスポートソーム。「トランスポートソームの世界—膜輸送研究の源流から未来へ」、金井好克、竹島 浩、森 泰生、久保義弘編、京都廣川書店、343 頁-350 頁、2011 年。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phaphyl/index-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 拓人 (FUJII TAKUTO)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：50567980