

令和元年5月29日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08920

研究課題名(和文)放射線治療によるがん細胞の高転移能獲得におけるTRPV1チャネルの役割の解明

研究課題名(英文)A study in a role of TRPV1 channel in cancer malignancy induced by radiotherapy

研究代表者

月本 光俊(Mitsutoshi, Tsukimoto)

東京理科大学・薬学部薬学科・准教授

研究者番号：70434040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：放射線照射されたがん細胞では転移能が亢進するが、そのメカニズムは明らかでない。本研究では、放射線治療時のがん細胞の高転移能獲得を防止する薬剤の治療標的を明らかにするため、線照射によるがん細胞の転移能亢進メカニズムの解明を行なった。その結果、がん細胞の細胞膜に発現するイオンチャネルや受容体(TRPV1チャネルなど)が放射線による細胞遊走能亢進に重要な役割を担っていることを明らかにした。今後は、これらの治療標的分子を阻害した場合の放射線治療効果への影響も検討し、最適な治療標的を明らかにしていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療は、QOLの高い有効ながん治療法であるが、治療期間の後半では、残存したがん細胞が加速再増殖による治療抵抗性や高転移能などの高悪性度プロファイルを獲得することがある。再発や転移を防止し、がんを根治させるためには、この高悪性度プロファイル獲得メカニズムを解明し、その鍵となる分子の阻害薬を創出することが望まれる。本研究により、TRPV1チャネルなど複数の分子が放射線治療時のがん細胞の転移能亢進を抑制する新薬開発のための新たな治療標的となる可能性が提示され、今後のがん治療の奏効率向上への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Though ionizing irradiation enhances cancer cell malignancy, its mechanism is unclear. In this study, to reveal the therapeutic target suppressing irradiation-induced malignancy of cancer cells, we investigated the mechanism of irradiation-induced migration of cancer cells. We here revealed that ion channels or receptors expressed in cell membrane such as TRPV1 channels play an important role in radiation-induced migration of cancer cells. In future study, we will further investigate appropriate target in cancer radiotherapy.

研究分野：薬学、放射線生物学

キーワード：放射線治療 転移 TRPV1チャネル 細胞遊走

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 放射線治療について

放射線治療は、外科的手術に比べ、患者 QOL が高い治療法として認知され、また手術困難ながんにて有効な治療法である。しかし、治療期間の後半では、残存したがん細胞が加速再増殖などの治療抵抗性や高転移性などの悪性度の高い形質を獲得してしまい、再発や転移の原因となり、奏効率の低下を引き起こすことがある。故に奏効率の向上と根治のためには、この高悪性度プロファイル獲得の防止が重要であるが、放射線照射後に生じるがん細胞の機能変化については不明な点が多く、有効な対策を取ることができていない。

電離放射線(線、線、線等)は、高エネルギーの粒子や電磁波であり、高速で直線的に飛び、その飛跡周囲の水分子を電離させヒドロキシラジカルを生成させる。細胞内では、粒子との衝突やラジカルによって飛跡上の DNA 鎖が大きな障害(DNA 鎖切断)を受ける。障害の程度が修復能力を超えている場合には、分裂能損失や細胞死が生じる。この放射線による細胞障害作用を利用したものが放射線治療である。しかし、放射線治療では、正常細胞に障害の少ない線量で複数回照射するため、一度に全てのがん細胞を殺滅することは難しく、一部のがん細胞は障害を修復し生き残る。この残存がん細胞は、治療抵抗性や高転移性などの高悪性度プロファイルを獲得することがある。放射線照射がん細胞の転移能亢進はよく知られているが、そのメカニズムには未だ不明な点が多い。

### (2) 上皮間葉転換について

最近、放射線照射がん細胞の転移能亢進の一因として、放射線照射後に生じる上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)が注目されている。EMT 後は、上皮細胞特有の敷石状の細胞集団に細胞間隙が認められ、紡錘状となり、仮足が形成される。この際、運動能の低い上皮細胞の接着分子発現パターンが運動能の高い間葉系細胞の発現パターンへと変化し、細胞骨格が再構成(アクチンストレスファイバー形成)される。これらの結果、EMT を起こした上皮系がん細胞は高い運動能を獲得するので、EMT は原発巣の上皮系がん細胞が血管内やリンパ管内へ移行し、血中循環がん細胞となって遠隔転移するための重要なメカニズムと考えられている。

### (3) TRPV1 チャンネルについて

Transient Receptor Potential Vanilloid type 1 (TRPV1) チャンネルは、熱(43 以上)、酸化ストレス、カプサイシン等によって活性化する  $Ca^{2+}$  透過性の非選択性陽イオンチャンネルである。TRPV1 チャンネルは、痛み受容体としてもよく知られており、鎮痛薬の標的としての可能性から多くの研究がされてきている。しかし、電離放射線による生物影響での TRPV1 チャンネルの役割は近年まで明らかにされていなかった。我々は、これまで放射線生物影響に関して多くの研究を行ってきており、近年、放射線 DNA 損傷の修復を促進する新規分子機序として TRPV1 チャンネルの関与を世界に先駆けて報告した。しかし、放射線生物影響における TRPV1 チャンネルの役割については不明な点が多い。

一方、TRPV1 チャンネルは、樹状細胞や単球などの免疫細胞、脳アストロサイト、表皮ケラチノサイトのような運動性の高い細胞において、細胞遊走メカニズムに関与することが報告されている。そのため、TRPV1 チャンネル活性化は、放射線照射細胞での EMT による細胞運動能亢進メカニズムに関与する可能性がある。しかし、これまでに放射線照射がん細胞の転移能亢進において TRPV1 チャンネルの関与を示唆する報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究では、放射線治療の奏効率向上を目指し、放射線照射細胞で誘導されるがん細胞の運動能亢進メカニズムを TRPV1 チャンネルに着目して解析し、がん細胞の高転移能獲得メカニズムの一因を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 線照射がん細胞の EMT における TRPV1 チャンネルの関与の解明

ヒト肺がん A549 細胞に線( $^{137}Cs$ 線源: 0.80 Gy/min)を照射し、細胞運動能変化の解析系を確立し、それらに対する TRPV1 チャンネル活性化薬・阻害薬、TRPV1 ノックダウンの影響を検討した。なお、TRPV1 活性化薬として capsaicin、TRPV1 チャンネル阻害薬として capsazepine、AMG9810、SB366791、BCTC を用いて検討し、また、siRNA 遺伝子導入により TRPV1 チャンネルのノックダウンを行った。

線照射後の細胞形態変化の観察

照射後の上皮系細胞から間葉系細胞への細胞形態変化(仮足形成等)を観察した。

線照射による運動能(遊走能)変化の解析

線照射後の細胞遊走能の解析は、wound-healing assay および Transwell 培養チャンパーにより行った。

#### 線照射による細胞障害度の解析

放射線細胞障害と細胞機能変化との関連を解析するため、線照射線量の違いによる分裂能保持細胞数をコロニー形成法によって測定し、分裂能損失細胞の割合(細胞障害度)を測定した。

#### 線照射後の細胞骨格変化の解析

照射後のアクチンストレスファイバー形成をローダミン・ファロイジンによる蛍光染色法によって解析し、細胞骨格変化を解析した。

#### 線誘発 EMT 誘導における TGF- $\beta$ 1 シグナルと TRPV1 チャンネルとの関連性の検討

線照射後の TGF- $\beta$ 1 mRNA の発現量変化について、real time RT-PCR 法にて測定した。また、TGFR 阻害薬等を用いて細胞運動能亢進における TGF シグナルの関与を検討した。

### (2) マウスがん転移モデルを用いた放射線誘発転移能亢進への TRPV1 チャンネル関与の検討

マウス悪性黒色腫 B16 細胞において線照射による運動能亢進と TRPV1 チャンネル阻害薬による抑制効果を *in vitro* 実験で検討した。

*in vivo* 転移モデル確立のため、B16 細胞を C57BL/6 マウスに尾静脈内注入(同種同系移植)し、約 2 週間後に肺を摘出、肺に生着した B16 細胞由来の黒色コロニー数を計測した。

線照射細胞と非照射細胞を尾静脈内注入し、照射有無による肺生着数の変化を検討した。

TRPV1 チャンネル阻害薬を細胞に前処置し、線照射後、尾静脈内注入により移植し、TRPV1 阻害薬による照射細胞の肺生着数変化を解析した。

### (3) TRPV1 チャンネル以外のチャンネル・受容体の役割の検討

TRPV1 チャンネル以外の TRP チャンネルの関与について明らかにするため、TRPV4 チャンネルや TRPM8 チャンネル等の阻害薬を処置し、細胞遊走能および細胞骨格形成の変化を検討した。さらに、TRPV4 チャンネル阻害薬処置による効果を *in vivo* モデルでも検証した。

また、その他の関連性のある受容体の役割についても検討した。まず、TRPV1 チャンネルとカンナビノイド受容体は関連性が高いため、カンナビノイド受容体の各サブタイプの阻害薬および刺激薬を処置し、細胞遊走能および細胞骨格形成の変化を検討した。さらに、カンナビノイド受容体とアデノシン受容体は関連性が高いため、アデノシン受容体の各サブタイプの阻害薬および刺激薬を処置し、細胞遊走能および細胞骨格形成の変化を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 線照射がん細胞の EMT における TRPV1 チャンネルの関与の解明

A549 細胞に線を照射し、核内 DNA 損傷を H2AX focus 形成の蛍光免疫染色法により、細胞生存率の変化をコロニー形成法により解析した結果、線量依存的な DNA 損傷増加と細胞生存率減少が認められ、2 Gy 照射では 20%程度の細胞障害が認められた。また、細胞へ線(2 Gy)照射後、紡錘状への細胞形態変化が観察された。細胞骨格の形成をローダミン・ファロイジン染色により蛍光顕微鏡観察を行った結果、照射 24-48 時間後にアクチンストレスファイバーの形成が認められた。また、Transwell チャンバーアッセイにより細胞遊走能を検討した結果、2 Gy をピークに細胞遊走能の亢進が認められた。これらの結果から、照射 A549 細胞において細胞形態変化、細胞骨格変化、細胞遊走能の亢進といった EMT 様の変化が認められた。

そこで、照射細胞の EMT 様の変化に対する TRPV1 チャンネル阻害薬の効果を検討した。capsazepine、AMG9810、SB366791、BCTC を前処置し、線照射した結果、細胞遊走能亢進および細胞骨格変化が抑制された。一方、TRPV1 チャンネル活性化薬 capsaicin の処置により細胞遊走能亢進と細胞骨格変化が認められた。さらに TRPV1 チャンネルの関与を明らかにするため、siRNA による TRPV1 チャンネルのノックダウンを行った結果、線照射誘発細胞遊走能亢進と細胞骨格変化が減弱した。これらの結果から線照射 A549 細胞での細胞骨格変化および細胞遊走能の亢進に TRPV1 チャンネルの関与が明らかとなった。

また、TGF- $\beta$ 1 シグナルとの関連性について検討を行った。A549 細胞では、TGF- $\beta$ 1 処置により細胞遊走能亢進や細胞骨格形成が生じ、線照射による細胞遊走能亢進や細胞骨格形成は TGFR 阻害薬により抑制され、TGF- $\beta$ 1 シグナルの関与が示された。また、線照射後、約 18 時間で TGF- $\beta$ 1 mRNA の発現上昇が認められた。しかし、TRPV1 チャンネルと TGF- $\beta$ 1 シグナルは、互いに独立して放射線による細胞遊走能亢進メカニズムに関与していることが示唆された。

### (2) マウスがん転移モデルを用いた放射線誘発転移能亢進への TRPV1 チャンネル関与の検討

*in vitro* において、TRPV1 チャンネル阻害薬が放射線による肺がん細胞の細胞遊走能亢進を抑制できることが明らかになったため、その抑制効果を動物体内においても検証するため、マウス肺転移モデルを用いた放射線誘発転移能亢進への TRPV1 チャンネル阻害薬の効果について検討を行った。

まず、B16 悪性黒色腫を用い、線(1 Gy)照射し、48 時間培養した B16 細胞をマウスに経尾静脈移植し、2 週間後に肺を摘出し、肺に生着した B16 細胞による黒色のコロニー数を計数

した。その結果、線照射細胞では、肺生着（転移）コロニー数が増加し、照射により細胞の転移能が増加していることが示された。そこで、TRPV1 チャンネル阻害薬 BCTC を線照射前に B16 細胞に処置し、48 時間後に経尾静脈移植した。その結果、肺生着（転移）コロニー数は、照射細胞よりも顕著に減少し、TRPV1 チャンネル阻害薬によって転移能獲得が抑制されていることが明らかとなった。これらの結果から、TRPV1 チャンネル阻害薬による細胞遊走能獲得防止効果が示され、放射線による転移能獲得に TRPV1 チャンネルが関与していることが *in vivo* においても示された。

### (3) TRPV1 チャンネル以外のチャンネル・受容体の役割の検討

さらに TRPV1 チャンネルに加えて、他の TRP チャンネルの転移能獲得への関与についても同様に検討した。その結果、TRPV4 チャンネル阻害薬や TRPM8 チャンネル阻害薬によっても A549 細胞における細胞遊走能亢進や細胞骨格形成が抑制され、新たに TRPV4 チャンネルや TRPM8 チャンネルの関与を明らかにした。この TRPV4 チャンネル阻害薬の処置により、照射 B16 細胞の転移能獲得 (*in vivo* モデル) も抑制された。また、TRPV1 チャンネルと関連性の強いカンナビノイド受容体の役割についても検討した結果、カンナビノイド受容体の刺激薬により細胞遊走能亢進や細胞骨格形成を抑制できる可能性が示唆された。さらに、カンナビノイド受容体と関連性の強いアデノシン受容体の役割についても検討した結果、アデノシン受容体阻害薬の処置により、細胞遊走能亢進や細胞骨格形成が抑制できることが示され、アデノシン受容体の関与も明らかにした。

これらの結果から、がん細胞の放射線照射により、TRPV1, TRPV4, TRPM8 チャンネル、TGF-受容体、アデノシン受容体といった複数の細胞膜発現受容体が活性化され、がん細胞の転移能が亢進していることが明らかとなった。

### (4) まとめ

以上、本研究により、放射線治療時のがん細胞の転移能亢進を抑制する新薬開発のための新たな治療標的として TRPV1 チャンネルが明らかになった。さらに、本研究過程において、TRPV1 チャンネルの関与について検討していくなかで、予期せず、TRPV4 チャンネルや TRPM8 チャンネル、アデノシン受容体といった分子も新たに放射線による転移能亢進に関与することを明らかにすることができた。これらの阻害薬を放射線治療時に用いることにより、残存がん細胞の転移能獲得（亢進）を防止し、がん治療の奏効率を向上させ、がん医療を向上させることが期待できる。今後は、これらの治療標的を阻害した場合の放射線治療効果への影響も考慮し、最適な治療標的を明らかにしていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

### 〔学会発表〕(計 10 件)

鷲谷くるみ(代表)、佐々木理恵、中西勇人、高井英里奈、篠原佑璃亜、西野圭祐、田沼靖一、小島周二、日本光俊「線照射によるがん細胞転移能獲得における TRP チャンネルの関与」日本薬学会 第 139 年会 (2019 年)

坂本美咲(代表)、北原大輔、西野圭祐、日本光俊「カンナビノイド受容体刺激薬による放射線誘発高悪性度プロファイル獲得防止効果」日本薬学会 第 139 年会 (2019 年)

鷲谷くるみ(代表)、佐々木理恵、中西勇人、高井英里奈、篠原佑璃亜、西野圭祐、田沼靖一、小島周二、日本光俊「線照射によるがん細胞転移能獲得における TRP チャンネルの関与」日本放射線影響学会第 61 回大会 (2018 年)

鷲谷くるみ(代表)、佐々木理恵、中西勇人、高井英里奈、篠原佑璃亜、西野圭祐、田沼靖一、小島周二、日本光俊「線照射によるがん細胞転移能獲得における TRP チャンネルの関与」第 62 回日本薬学会関東支部大会 (2018 年)

佐々木理恵、中西勇人、高井英里奈、篠原佑璃亜、西野圭祐、田沼靖一、小島周二、日本光俊(代表)「線照射誘導性がん細胞転移能亢進に対する TRPV1 チャンネル阻害薬の抑制効果」日本薬学会第 138 年会 (2018 年)

椎名佳奈美(代表)、北畠和己、日本光俊「線照射によるがん細胞遊走能亢進におけるアデノシン受容体の関与」日本薬学会第 138 年会 (2018 年)

椎名佳奈美(代表)、中西勇人、佐々木理恵、高井英里奈、西野圭祐、田沼靖一、小島周二、日本光俊「放射線照射による肺がん細胞遊走能亢進の新規メカニズム」第 61 回日本薬学会関東支部大会 (2017 年)

中西勇人(代表)、佐々木理恵、高井英里奈、西野圭祐、小島周二、田沼靖一、日本光俊「線照射によるがん細胞運動能亢進における TRPV1 チャンネルの関与」日本薬学会第 137 年会 (2017 年)

日本光俊(代表)、佐々木理恵、高井英里奈、中西勇人、西野圭祐、田沼靖一、小島周二「線による肺がん細胞の遊走能亢進における TRPV1 チャンネルの関与」日本放射線影響学会第 59 回大会 (2016 年)

中西勇人(代表)、佐々木理恵、高井英里奈、西野圭祐、田沼靖一、小島周二、日本光俊「線照射によるがん細胞運動能亢進における TRPV1 チャンネルの関与」第 60 回日本薬学会関東支部大会 (2016 年)

〔その他〕  
ホームページ等

[https://www.tus.ac.jp/fac\\_grad/p/intro.php?4d1d](https://www.tus.ac.jp/fac_grad/p/intro.php?4d1d)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。