

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06851

研究課題名(和文)がん細胞特異的ATP放出機序の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of ATP-release in Cancer Cells

研究代表者

古家 喜四夫(Kishio, Furuya)

名古屋大学・総合保健体育科学センター・研究員

研究者番号：40132740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは放出ATPのリアルタイムイメージング法を用い、低張刺激によって未分化の細胞株特異的に散漫的持続的なATP放出を見出し、それが容量調節性Cl⁻チャネル(VRAC)の阻害剤であるDCPIB、VRACの必須サブユニットであるLRRC8Aのノックダウン(KD)によって抑制されたことから、VRACの関与を明らかにした。このATP放出は炎症性物質Sphingosine-1-Phosphate (S1P)によって細胞容積変化を伴わずに活性化され、またTGF β 処理で増強され、がん微小環境で機能していることを示唆した。ヌードマウスに乳がん細胞株を移植したところVRAC-KDはがん組織の成長を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは自らの周りに生存を維持するための微小環境を構築しており、そこにはATPが高濃度で存在する。このATPの一つの大きな役割は分解によりアデノシンを生成、高濃度に維持することにより、がんに対する免疫攻撃を抑制することである。しかしがん微小環境においてATPが高濃度に維持されるメカニズムは分かっていなかった。本研究はがん細胞特異的なATP放出機序としてVRACの関与を示した。またヌードマウスのxenograftモデルを用い実際VRACががん組織の成長に必要なことを明らかにした。このATPシグナリング系はがん抑制の免疫系と関連しており免疫治療の効き方を左右する1つのシーズとして提唱できる。

研究成果の概要(英文)：The high interstitial ATP concentration in the tumor microenvironment (TME) is a major source of adenosine, which acts as a strong immune suppressor. However, the source of ATP release has not been elucidated. We measured ATP release during hypotonic stress using a real-time ATP imaging system in breast cell lines. We found a distinctive pattern of ATP release only in undifferentiated cells. This pattern of ATP release was suppressed by DCPIB, an inhibitor of volume-regulated anion channel (VRAC), and by the knockdown of LRRC8A, the essential molecular entity of VRAC, using shRNA. In addition, this ATP release was activated by S1P (sphingosine-1-phosphate, an inflammatory mediator in TME). In the nude mouse xenograft model, knockdown of VRAC suppressed tumorigenesis in subcutaneously implanted breast cancer cells. These results indicate that abundantly expressed VRAC is a conduit of ATP release in undifferentiated cells including cancer cells and progress tumorigenesis in vivo.

研究分野：細胞生理学、生物物理学、メカノバイオロジー

キーワード：ATP放出 ルミネッセンスイメージング がん微小環境 乳がん細胞 S1P VRAC LRRC8 xenograft

1. 研究開始当初の背景

ATP は細胞間シグナル分子として生体のいたるところで多様な受容体を介して多彩な生理作用に関わっている[1,2]。ATP の放出は細胞の伸展や膨張、シェアストレスなど各種のメカニカルストレスと深くかかわっておりメカノセンシング機序として働いているがその詳細はまだ明らかではない[2]。放出された ATP は細胞外の分解酵素によってすみやかに **ADP** **AMP** アデノシンと分解され、正常な組織においてはほとんど 0 に保たれている。しかし炎症サイトやがん組織では明らかに高い濃度の ATP が維持されている[3]。またこれらの部位では細胞外の ATP 分解酵素である **CD39** や **CD73** が多く発現しその働きでアデノシンも高濃度に生成され維持されている[4]。アデノシンの働きも多彩であるが、最近がんにおいてはがん細胞に対する免疫攻撃を抑制しその生存を維持することが主要な働きであることが分かってきた[5,6]。そのため **CD39** や **CD73**、あるいは **A2A** アデノシン受容体はがん治療のターゲット分子となっている[7]。このようにがん微小環境においては ATP とアデノシンはたくさん放出されたくさん分解されるという動的な状態で高濃度に保たれていると考えられるが、その大本である ATP の持続的な放出がどのような機序で起こっているかはまったく分かっていない。このがん特異的な放出機序が明らかになれば治療のターゲットにもなりえる。細胞からの ATP 放出の機序は開口放出、アニオンチャンネル、ヘミチャンネル、トランスポーター、その他のチャンネル(**TRP**,**CALHM1**,**P2X7**)などが現在考えられ、いろいろな組織や細胞においてそれらの関与が明らかにされつつあるが[8]、メカノ刺激をはじめ各種刺激に対する応答の機序やシグナリング全体像はまだ分からない状況にある。

2. 研究の目的

われわれは **Luciferin-Luciferase** による ATP のバイオルミネッセンスを超高感度カメラによって顕微鏡下でリアルタイムにイメージングする手法を確立し、細胞レベルでの ATP 放出の動態を観察することに成功したが[9]、それによってルミノメータによるバルクな測定では見分けられなかった増殖細胞特異的な ATP 放出のパターンを見出した(図 1)[10]。初代培養の分化した乳腺細胞では、いくつかの細胞から非常に強い短時間の一過性の放出が間欠的に見られるのに対し(図 1A、"Transient-sharp")、株化した未分化の乳腺細胞ではどの細胞からとは同定できない弱いゆっくりした ATP 上昇が細胞コロニーのまわりに起こる(図 1B、"Diffuse")。このように時間的空間的パターンはまったく異なるがトータルの ATP 放出量としては同じように 6-7 分にピークを持ちゆっくりと減少し、Diffuse 型の方が多くの

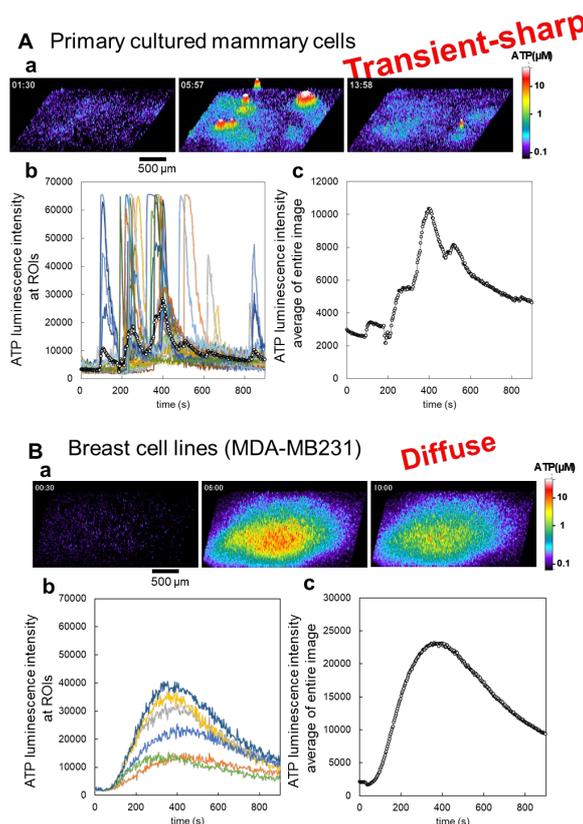


図 1 初代培養乳腺細胞(A)と株化乳腺細胞(B)は低張刺激(30%)によって異なった機序の ATP 放出を引き起こす[10]。

ATP を放出していることがわかる(図 1、Ac と Bc)。この **Diffuse** 型の ATP 放出パターンは細胞容積感受性塩素イオンチャンネル(**VRAC** あるいは **VSOR**)の阻害剤である **DCPIB** によって完全に阻害されたが **Transient-sharp** 型の方は抑えられず時には増強が見られた。このことからわれわれはがん細胞における持続的な ATP 放出には **VRAC** の活性化が関与しているという仮説を立てた。本研究の目的はそれを明らかにすることである。

3 . 研究の方法

細胞は初代培養の授乳期マウス乳腺上皮、ヒト乳腺細胞株の **MDA-MB231**、**MCF7**、**MCF10A** 細胞を用い、**collagen-gel** 上で **1-4** 日間、**37°C**、**5%CO₂** 下で培養。ATP リアルタイムイメージングは **Luciferin-Luciferase** 溶液を細胞外に入れ、私たちの開発したルミネッセンスリアルタイムイメージング顕微鏡で観察した[9]。 **LRRC8A** のノックダウンは **shRNA** を **retro virus** を用いて各細胞株に導入し恒常発現細胞株をクローニングした。 **xenograft** 実験は **VRAC** ノックダウン細胞(**MDA-MB231**)とコントロールの細胞を **4** 週齢ヌードマウスの背面の左右にそれぞれ接種し **4-5** 週がん組織の成長を観察した。

4 . 研究成果

(1) 初代培養で見られた Transient-sharp 型と株化細胞で見られた Diffuse 型の ATP 放出は相互に転換する。

Diffuse 型の ATP 放出パターンを示す株化乳腺細胞を **cholera toxin** で **overnight** から **1** 日処理すると初代培養で見られるような **Transient-sharp** 型の ATP 放出が見られるようになる(図 2)。逆に **TGF** で処理すると **Diffuse** 型の ATP 放出が増強し、また初代培養乳腺細胞では **Diffuse** 型 ATP 放出を起こすようになる。**Cholera toxin** は炎症やがん形成を抑え、種々の細胞で細胞分化を誘導することが知られている[12, 13]。一方 **TGF** は発がんを誘起したり、細胞分化やがん成

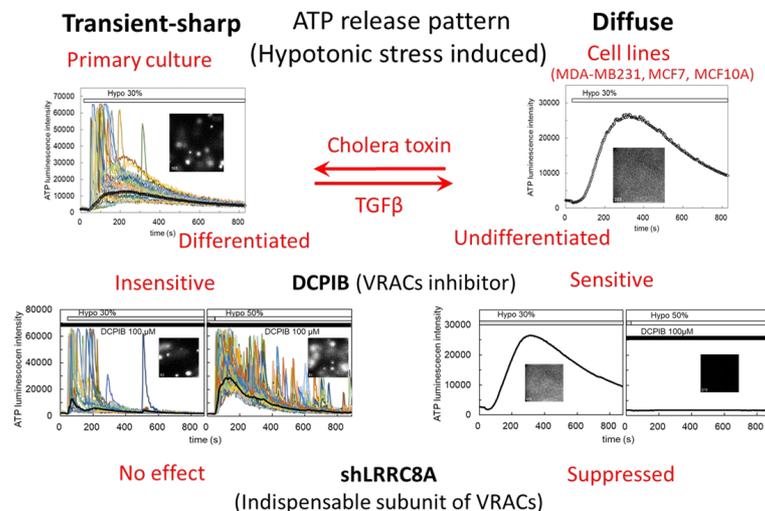


図 2 低張刺激によって誘起される 2 つの ATP 放出パターン **Diffuse** と **Transient-sharp** は細胞の状態に応じて互いに変換する。**Cholera toxin** 処理によって **Transient-sharp** 型になり **TGF** 処理によって **Diffuse** 型になることからそれぞれ「分化型」と「未分化型」と考えられる。**Diffuse** な未分化型は **VRAC** の阻害剤である **DCPIB** および **LRRC8A** のノックダウンによって抑制され **VRAC** が関与していることが分かったが、**Transient-sharp** の分化型の方の経路は今のところ不明である[11]。

長の過程で **epithelial- to-mesenchymal transition (EMT)**を誘起するが知られている[14, 15]。

これらのことから **Diffuse** 型の ATP 放出はがん細胞を含む未分化の細胞、**Transient-sharp** 型は分化した正常細胞で見られると推測される。

(2) VRAC をノックダウンすると Diffuse 型の ATP 放出が抑えられる。

Diffuse 型の ATP 放出は **VRAC** の阻害剤である **DCPIB** で抑えられることから **VRAC** の関与が示唆された。**VRAC** の必須サブユニットである **LRRC8A** の **shRNA** を発現する細胞株を作り **VRAC** をノックダウンすると **Diffuse** 型の ATP 放出は抑制された(図 3a)。

VRAC は **LRRC8A,B,C,D,E** の 5 つのサブユニットで構成されている。リアルタイム **PCR** の結果、用いた乳腺株細胞ではすべてのサブユニットが発現しているが特に **A,C,D** が多く発現していた。**Diffuse** 型の **ATP** 放出を増強する **TGF** 処理すると **LRRC8A** と **C** が増加しており、**ATP** 放出経路形成には **LRRC8A** と **C** が必須であると考えられる。

これらのことは **VRAC** ががん細胞のような未分化細胞における **ATP** 放出経路として働いていることを示している。

(3) VRAC を介した ATP 放出は S1P によって volume 変化を伴わずに活性化される。

低張刺激によって未分化の細胞株特異的に **VRAC** を介した散漫的持続的な **ATP** 放出が誘起されることを明らかにしたが、この **ATP** 放出は低張刺激だけではなく炎症性物質 **Sphingosine-1-Phosphate (S1P)** で細胞容積変化を伴わずに活性化され、**LRRC8A** のノックダウン細胞では抑制されることが分かった(図 3b)。**S1P** はがん微小環境には多く存在しており、乳がん細胞にはその受容体が多く発現していること

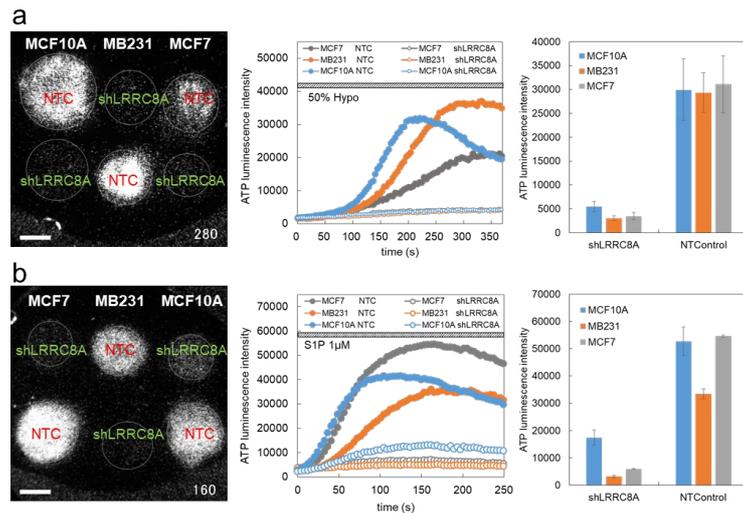


図 3 用いた 3 種すべての株化乳腺細胞 (MCF7, MDA-MB231, MCF10A) において **VRAC** をノックダウン(**shLRRC8A**)すると低張刺激 (a)および **S1P** (b)による **diffuse** な **ATP** 放出は抑えられた。[11]

などからがん微小環境の **ATP** 放出に **S1P** が重要な働きをしていることが示唆される。**G** 蛋白共役型である **S1P** 受容体には 5 つのサブタイプが存在するが阻害剤と **PCR** 実験により **S1P1** と **S1P2** の関与が示された。

(4) VRAC のノックダウンは腫瘍の成長を抑制する。

この機序が実際がん組織の微小環境において働いているのかを明らかにするため、ヌードマウスに種々のがん細胞株を移植しその増殖の変化を見る **Xenograft** モデル系を構築した。その結果、**VRAC** ノックダウン乳がん細胞はそのコントロール細胞に比べ明らかにがん組織の成長が抑制されていた(図 4)。細胞自身の増殖能はノックダウン細胞でも変わらなかった。以上のことから **VRAC** はがん組織において **ATP** を放出し **ATP** 環境を作ることによりがん組織の成長をサポートしていると考えられる。

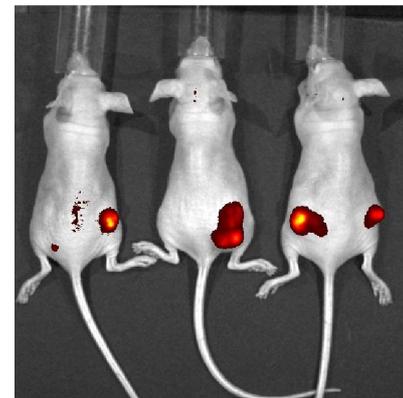


図 4 ヌードマウスの背面の左右に **VRAC** をノックダウンしたヒト乳がん細胞(左側)とそのコントロールの細胞(右側)を 10^6 個づつ接種し、その成長の時間経過を観察した。接種後 18 日目の 3 匹の例。細胞(MDA-MB231)には **GFP** を発現させておりその蛍光を **In vivo** イメージング装置 (**IVIS**)で観察。

以上のことを模式図(図 5)にまとめた。がん微小環境に豊富に存在する ATP は **CD39**、**CD73** の働きで分解され豊富な **adenosine** 環境を作っており、その **adenosine** はがんに対する免疫攻撃を抑制する。この豊富な ATP を微小環境において維持するためには死んでいく細胞ではなく絶えず ATP を放出する機構が必要でありその 1 つとして私たちは **VRAC** を提唱する。

VRAC の活性化は低浸透圧を含む様々ながん微小環境中の揺らぎだけではなく、微小環境中に豊富に存在する **S1P** や **TGF** が関わっていると考えられる。**CD73** や **CD39** の ATP 分解系はすでにがん治療のターゲットとして考えられているが ATP 放出系も十分新しいターゲットと考えられる。特にこの系は近年進歩の著しい免疫治療の効率に関わっており、有効なターゲットになると考えている。

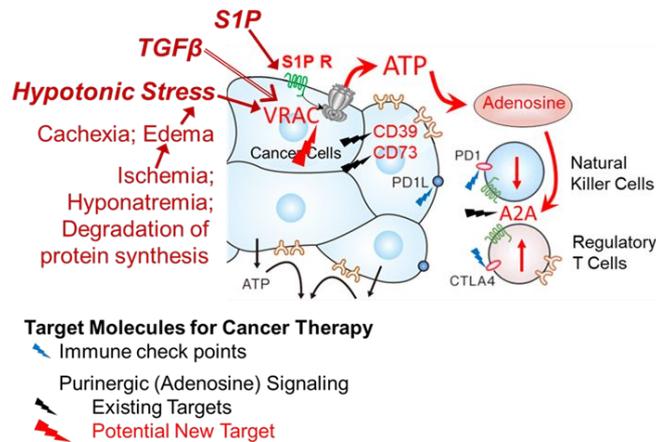


図 5 がん微小環境における ATP 放出の機序と役割。**VRAC** を介した ATP 放出はゆっくり散漫的ではあるが長く続き十分な量があり、がん細胞周りの間質で高濃度の ATP 維持に寄与する。**VRAC** の活性化は低浸透圧を含む様々な間質液の揺らぎだけではなく、微小環境に豊富に存在する **S1P** や **TGF** が関わっていると考えられる[11]。

<文献>

[1]日経サイエンス 2010 年 3 月号:74

[2] 古家喜四夫 (2015) 細胞外シグナルのメカノバイオロジー: ATP シグナリング. In: 「メカノバイオロジー」(曾我部正博 編) 化学同人 pp85-100

[3] Pellegatti P et al. PLoS ONE 3:e2599,2008 [4] Cancer Res 57:2602, 1997

[5] 古家喜四夫 (2017) ATP シグナリングと疾患. In 別冊・医学のあゆみ「メカノバイオロジーからメカノメディシンへ」(曾我部正博 編) 医歯薬出版 pp59-65

[6] Nature Rev Cancer 13:842, 2013 [7] Am J Transl Res 26:129, 2014 [8] Purin Signal 8:359, 2012

[9] Furuya K, et al. (2014) Real-time Luminescence Imaging of Cellular ATP Release. Methods, 66: 330–344 (<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.08.007>)

[10] Furuya K, et al. (2021) Hypo-osmotic Stress Induces ATP Release via Volume-regulated Anion Channels in Undifferentiated Mammary Cells. bioRxiv April 26, 2021 (<https://doi.org/10.1101/2021.04.25.441329>)

[11] Furuya K, et al. (2021) Sphingosine-1-Phosphate Induces ATP Release via Volume-Regulated Anion Channels in Breast Cell Lines. Life 11 851 (<https://doi.org/10.3390/life11080851>)

[12] Carcinogenesis 2015, 36, 280–290 (<https://doi.org/10.1093/carcin/bgu325>) [13] Indian J Med Res 2011, 133, 179–187 [14] Cold Spring Harb Perspect Biol 2011, 3, a003277 (<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003277>) [15] J Cell Biochem 2016, 117, 1279–1287 ([https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)82259-5](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)82259-5))

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Furuya K, Takahashi Y, Hirata H, Kobayashi T, Sokabe M	4. 巻 72 (suppl 1)
2. 論文標題 Sphingosine-1-Phosphate Induces ATP Release via Volume-Regulated Anion Channels in Breast Cell Lines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Physiol Sci	6. 最初と最後の頁 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12576-022-00851-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Demir Tuna, Takada Hiroya, Furuya Kishio, Sokabe Masahiro, Ogawa Rei	4. 巻 10
2. 論文標題 Role of Skin Stretch on Local Vascular Permeability in Murine and Cell Culture Models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open	6. 最初と最後の頁 e4084 ~ e4084
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/GOX.0000000000004084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furuya K, Hirata H, Kobayashi T, Sokabe M	4. 巻 11
2. 論文標題 Sphingosine-1-Phosphate Induces ATP Release via Volume-Regulated Anion Channels in Breast Cell Lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life11080851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furuya K, Takahashi Y, Hirata H, Kobayashi T, Samsonov M, Sokabe M	4. 巻 April 26
2. 論文標題 Hypo-osmotic Stress Induces ATP Release via Volume-regulated Anion Channels in Undifferentiated Mammary Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.04.25.441329	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Grygorczyk R, Boudreault F, Ponomarchuk O, Tan JJ, Furuya K, Goldgewicht J, Kenfack FD, Yu F	4. 巻 11
2. 論文標題 Lytic Release of Cellular ATP: Physiological Relevance and Therapeutic Applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life11070700	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Furuya K, Tan J, Grygorczyk R, Sokabe M	4. 巻 70
2. 論文標題 Inflation of ex-vivo Rat Lung in Negative Pressure Chamber Induced ATP Release in Alveoli and Surrounding Blood Capillary	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Physiol Sci	6. 最初と最後の頁 S169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Grygorczyk Ryszard, Boudreault Francis, Tan Ju Jing, Ponomarchuk Olga, Sokabe Masahiro, Furuya Kishio	4. 巻 83
2. 論文標題 Mechanosensitive ATP release in the lungs: New insights from real-time luminescence imaging studies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Topics in Membranes	6. 最初と最後の頁 45 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.ctm.2019.02.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Asano Shuichi, Ito Satoru, Morosawa Mika, Furuya Kishio, Naruse Keiji, Sokabe Masahiro, Yamaguchi Etsuro, Hasegawa Yoshinori	4. 巻 16
2. 論文標題 Cyclic stretch enhances reorientation and differentiation of 3-D culture model of human airway smooth muscle	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 32 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2018.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 古家 喜四夫, 高橋 優子, 平田 宏聡, 小林 剛, 曾我部 正博
2. 発表標題 フィンゴシン-1-フォスフェートは未分化乳腺上皮株細胞において容積感受性アニオンチャンネルを介したATP放出を引き起こす
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古家 喜四夫, 高橋 優子, 平田 宏聡, 小林 剛, 曾我部 正博
2. 発表標題 容量感受性陰イオンチャンネル(VRAC)を介した未分化乳腺上皮細胞におけるATP放出
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tan J, Furuya K, Boudreault F, Brochiero E, Grygorczyk R
2. 発表標題 Mechanisms of Inflation-Induced ATP Release in Ex Vivo Rat Lungs: A Bioluminescence Imaging Study
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference (ATS) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古家喜四夫、Ju Jing Tan, Ryszard Grygorczyk、曾我部正博
2. 発表標題 陰圧チャンパーを用いたラット摘出肺の膨張刺激は肺腺胞内および周りの毛細血管にATP放出を引き起こす
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Furuya K, Takahashi Y, Sokabe M
2. 発表標題 Hypotonic Stress Induces ATP Release via Volume-regulated Anion Channels in Breast Cell Lines
3. 学会等名 9th FAOPS and The 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Furuya K, Takahashi Y, Sokabe M
2. 発表標題 Hypotonic Stress Induced-ATP Release is via Volume-regulated Anion Channels in Undifferentiated Breast Cell Lines
3. 学会等名 Asian Biophysics Association Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018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