

平成 22 年 3 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591472
 研究課題名（和文）癌細胞の転移、浸潤を制御するカルシウム透過性 TRPV チャネルの解析
 研究課題名（英文）The role of calcium permeable TRPV channels in cancer cells metastasis and invasion.
 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：

TRPV チャネルファミリーは、さまざまな癌細胞株に発現している。そのなかで TRPV2 は、増殖因子刺激・GPCR 刺激で細胞表面にトランスロケーションし、細胞内の持続的カルシウム上昇を起こす。このチャンネルは、細胞の接着斑にあり、癌細胞の細胞運動・浸潤を制御していると考えられる。そこで、さらに TRPV2 チャネルの癌細胞における制御機構を解析することにより、癌の新規の応用治療の可能性が示唆される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
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：カルシウムチャンネル、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、発生過程における形態形成、神経系形成の神経突起の伸長、免疫細胞の抗原認識・異物排除などのさまざまな重要な生体反応に関わっている。以前から、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+} 透過性チャンネル (TRPV2) を同定し報告した (Nature Cell Biol. 1:165, 1999)。これは Ca^{2+} 透過性イオンチャンネルが、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。さらに申請者は、TRPV2 チャンネルが腫瘍関連マクロファージの細胞接着・運動に重要

であることを報告した (J Cell Physiol 2006)。ケモカイン、血清、増殖因子刺激などにより、TRPV2 チャンネルが活性化されて持続的な細胞内Ca²⁺上昇が生じる。このCa²⁺流入に際しては、チャン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、フォカリアドヒージョン・キナーゼなどの細胞の接着斑の制御・構成分子群と共局在すること。そして、このチャン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。このことは、細胞接着・運動に際してCa²⁺チャンネル分子自体が細胞膜表面に新規にインテグレートし、そのチャンネルの活性化により細胞内のCa²⁺流入を調節することを示唆する。細胞接着・骨格を制御する新規のCa²⁺流入によるシグナル調節機構と考えられる。また申請者は、細胞運動能が高いメラノーマ細胞や線維肉腫細胞にTRPV2 が高発現していること。TRPV2 チャンネル以外のTRPV チャンネルファミリーのサブタイプが、乳癌、肝臓癌、膵臓癌、脳腫瘍、大腸癌、肺癌などのさまざまな癌細胞株に発現していることも見いだしている。このような事実は、TRPV チャンネルファミリーが癌細胞の病態生理に重要な役割をはたしていることが推測される。さらに海外の臨床でのヒト癌組織におけるTRPV チャンネルの病理組織学的検討で、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関連して前立腺癌の予後因子となりうることが報告されている (J Bio Chem 2001, Oncogene2003 など)。

2. 研究の目的

癌細胞におけるカルシウム (Ca²⁺) 透過性チャンネル分子TRPVの制御とそれにより調節される細胞接着・運動の解析を行い、細胞内Ca²⁺シグナルによる癌細胞浸潤・転移の調節機構の解明を目指す。Ca²⁺は細胞骨格・

細胞運動の制御に深く関係するが、Ca²⁺流入を制御するチャンネルの本態と細胞内Ca²⁺動態、さらに、Ca²⁺による細胞骨格・接着の制御機構などは十分に明らかではない。そのため、癌細胞の浸潤・転移におけるCa²⁺チャンネルの制御機構は不明のままである。TRPV チャンネルを端緒として、癌細胞におけるCa²⁺チャンネルの病態生理学的意義の解明につながると考えられる。最近TRPV2というCa²⁺透過性チャンネルが癌細胞遊走を制御することを見いだした。そこで癌細胞におけるTRPV2 チャンネルの制御機構を明らかにし、このチャンネルによる細胞内Ca²⁺動態の変化、さらにCa²⁺による細胞骨格・細胞運動の制御機構を明らかにする。神経系などの興奮性細胞では、Ca²⁺は電位依存性Ca²⁺チャンネルから流入する。しかし癌細胞などの非興奮性細胞におけるCa²⁺流入を調節するチャンネル分子実体はこれまで不明であり、最近なりその実体としてTRP チャンネル分子が注目を浴びるようになった。またTRPチャンネルはスーパーファミリーを形成し、その中のTRPVはV1 からV6 まで6種類あることが報告されている。TRPV2 以外のTRPVチャンネルが癌細胞に発現して、Ca²⁺チャンネルとして病態生理的な機能を有するものと考えられる。そこで、このTRPVファミリーの癌細胞における制御とそれにより調節される細胞接着・運動の解析を行い、癌細胞におけるTRPV の細胞内動態の詳細を明らかにし、それを介する細胞内Ca²⁺動態の変化、さらに細胞骨格・細胞運動の制御機構を明らかにし、浸潤・転移の分子機構に新たな知見を得たい。癌細胞におけるCa²⁺透過性

チャンネルTRPV ファミリーの制御機構を明らかにすることにより、癌細胞浸潤・転移を制御する新規アプローチが可能になることが期待される。TRPVチャンネルを標的とした新たな治療戦略を確立していきたい。

3. 研究の方法

I TRPV チャンネルファミリー (V1-V6 まである) 発現の検討: 乳癌、肝臓癌、膵臓癌、子宮癌、卵巣癌、肺癌、大腸癌、メラノーマ、白血病などのさまざま癌細胞株における TRPV チャンネルファミリーの発現をRT-PCRで検討する。

II クローニングしたTRPV1-6 をベクターに組み込んで、線維芽細胞、線維肉腫細胞、メラノーマ細胞、マクロファージ等に導入して、TRPV チャンネルファミリーの高発現安定細胞株、異所性発現細胞株を作製する。

III 上記のTRPV チャンネルファミリー高発現細胞株・異所性発現細胞株の検討:

1) 細胞増殖、細胞周期の検討 細胞接着は細胞の増殖シグナルに重要であることが知られている。細胞増殖能を測定する。

2) 細胞運動能の評価 マクロファージのケモタクシスにTRPV2 が重要であることを見出している。さらに、白血病細胞株、メラノーマ細胞株、神経内分泌細胞株、乳癌細胞株、線維肉腫細胞株、血管内皮細胞株などの一般的な細胞運動の評価されるモデル細胞に、TRPV チャンネルファミリーが発現している。そこで、市販されている浸潤アッセイ・血管新生アッセイキットを利用して、TRPV ファミリー高発現細胞株・異所性発現細胞株の細胞運動・遊走能を評価する。

3) 細胞接着能の評価 インテグリンのサブタイプの評価や細胞外基質を添加して評価する。細胞接着能を検討する。

4) 細胞内Ca²⁺の変化の検討 物理的、化学的刺激によるチャンネル分子の動態と細胞内Ca²⁺動態の変化を蛍光指示薬とFRET 等を用いて測定する。さらに、TRPV チャンネル高発現に伴う細胞骨格、オルガネラの形態変化、接着分子群の変化を光学顕微鏡や電子顕微鏡を利用して検討する。

IV 細胞運動、接着、細胞骨格に関する分子群との関連性の検討: 細胞接着分子、細胞骨格、細胞内オルガネラを可視化するために、多種類の蛍光プローブを作製した。増殖因子、ケモカイン刺激による、チャンネル分子の局在、細胞内Ca²⁺の動態、接着分子群、細胞形態の変化を検討する。とくに以下の癌細胞浸潤・転移に関係する分子群を重点的に検討する。

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、増殖を制御する。そこで細胞内におけるPIP₂, PIP₃ を Grp1-PH domainGFP, Akt-PH domain GFP を用いて可視化し(PH ドメインでPIP₂, PIP₃ につく)、TRPV チャンネル分子との細胞内局在、細胞内Ca²⁺との関連性を検討する。さらに、RNAiでPI3-キナーゼやPTEN をノック・ダウンやPI3-キナーゼの阻害剤を用いて検討する。

2) 低分子量G 蛋白質との関連: 低分子G 蛋白活性促進変異体・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、細胞接着斑の変化、細胞内Ca²⁺動態をFRET、共焦点顕微鏡、エバネッセント顕微鏡等で検討する。

3) ゲルズリン、IQGAP1、FAK(focal adhesion kinase) 、Pyk2 などの接着斑制御分子は、細胞内Ca²⁺でチロシンリン酸化されて活性化される。そこで、TRPV チャンネルファミリーを過剰発現させた細胞と親細胞株におけるこ

れら蛋白のリン酸化の程度を生化学的に検討する。また同様にして低分子G 蛋白質の活性化の程度を生化学的に評価する。

V チャネル機能抑制・阻害細胞株の樹立と解析：TRPV チャネルは4量体を形成して、チャネル機能を発揮する。そのために、チャネルの機能部位のアミノ酸を欠失させた変異体は、チャネル機能抑制変異体としてそのもの単独で機能しうる。そこで、すべてのTRPV ファミリーのチャネル機能抑制変異体をつくり、さまざまな癌細胞に発現しているTRPV チャネル機能を阻害する。さらに、RNAiベクターを利用してチャネルの発現をノック・ダウンした細胞を作製する。このようなチャネル機能阻害・抑制細胞株の性質をチャネル蛋白の高発現細胞・異所性発現細胞株と同様な方法で評価して比較することにより、チャネル分子によるgain and loss of functions を系統的に解析する。

VI チャネル制御蛋白の探索：TRPV チャネル機能や局在を制御する蛋白を酵母Two-hybrid 法で検索する。TRPV2 が機能する際には、細胞接着斑に局在することから細胞骨格のリモデリングに関係する蛋白や細胞接着機能に関連するものを主に検討する。

4. 研究成果

1) 癌細胞株における TRPV ファミリーの発現を RT-PCR 法で検討したところ、TRPV1 はほとんどすべての癌細胞に発現しているのを確認した。さらに、乳癌細胞株には TRPV3, 4, 6、メラノーマ細胞株には TRPV2, 4、白血病細胞株には TRPV2 が、さらにヒトの癌細胞肉腫細胞には TRPV 2 が強く発現していることがわかった。

2) さまざまな癌細胞株に、TRPV ファミリーを高発現・異所性に発現させて検討した。そのなかで、ヒトの癌細胞肉腫細胞で TRPV 2 が EGF、HGF、などの増殖因子により TRPV 2 がト

ランスロケーションして、持続的なカルシウム上昇を生じることが明きあらかになった。

3) ヒトの癌細胞肉腫細胞では、細胞運動にともないフィリポディア・ラメリポディアが形成される、この部位でPI-3 キナーゼが活性化していることが報告されている。そこで、PI-3 キナーゼの活性化の指標として Akt の PH ドメインや Grp1 の PH ドメインに GFP を付加したプローブと TRPV2-Strawberry を発現させて TRPV 2 の局在を可視化して検討すると PI3 キナーゼの活性化と TRPV2 との局在が、細胞運動部で共局在することがわかった。

4) 細胞接着分子との検討では、TRPV2 と β インテグリンがよく共局在することがわかった。インテグリンは、細胞表面のみに発現するばかりでなく、リサイクリングにより細胞内にも発現があることが知られている。

TRPV2 も同様にリサイクリングにより、効率よく細胞運動において、リサイクリングにより調節されている可能性が考えられる。

5) wound healing アッセイで、TRPV2 の発現を RNAi で阻害したり、ルテニニウム・レッドで TRPV ファミリーに機能を阻害すると癌細胞の細胞運動が抑制されるのがわかった。

6) 癌細胞の浸潤に関連する特殊な細胞膜の構造であるインベドポディアにTRPV2 が集積して局在することがわかった。さらに、この部位でCa²⁺がどのような刺激に対して変化するか検討している。

7) yeast two-hybrid 法で TRV2 に結合する新規の蛋白質を見いだした。さらに、検討をしている。

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)

[学会発表] (計 2 件)

1) 長澤 雅裕、小島 至、中川 祐子

TRPV2 による細胞骨格・細胞運動の制御

第4 回 TRP チャネル研究会

平成20 年6 月5 日～6 日

岡崎カンファレンスセンター

2) 長澤雅裕、中川祐子、小島 至

マクロファージにおけるTRPV2チャネルの生理的機能

平成19年度生理学研究所研究会 細胞機能を制御するシグナリング機構の普遍性と特異性

岡崎カンファレンスセンター

平成19年10月4日(木) - 10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