

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：31201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23923

研究課題名(和文) 癌細胞Ca²⁺シグナルに関連した薬剤抵抗性と治療標的分子の同定

研究課題名(英文) Identifying a novel drug target related to calcium signaling in anti-cancer drug resistant cells

研究代表者

開 勇人(Hiraki, Hayato)

岩手医科大学・医歯薬総合研究所・助教

研究者番号：50847358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤抵抗性を持つ再発がんは一般に難治性である。がん細胞において、Ca²⁺チャネルが変化することが知られており、がん細胞内のCa²⁺濃度は正常細胞とは異なる。セカンドメッセンジャーとして働くCa²⁺シグナルにも、その影響が及ぶ可能性があった。本研究では、抗がん剤処理によって誘導されるCa²⁺シグナルのライブイメージングを行い、薬剤抵抗性をもつがん細胞におけるCa²⁺シグナルの特徴を捉えた。さらに、その原因遺伝子の候補を絞り込みのためにRNA-seqによって得られたデータを解析した。その結果、Ca²⁺ポンプの1つを候補として同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行がんの治療後再発は、がん関連死として最も多い。中でも薬剤抵抗性を持つ再発がんは難治性であり、この課題の解決には社会的意義がある。Ca²⁺シグナルは種々のリン酸化反応や遺伝子発現の調節におけるセカンドメッセンジャーとして働き、広く生物に保存されている。一方、がんにおけるCa²⁺シグナルの研究は少ない。本研究は、新しい着眼点からがん細胞における薬剤抵抗性獲得メカニズムの解明に取り組んだ点に学術的な新規性がある。成果として、薬剤抵抗性の獲得との関連が示唆されるCa²⁺ポンプを同定した。さらなる研究によって、新たな分子標的とすることや、薬剤抵抗性を示すマーカーとして利用できる可能性を示す。

研究成果の概要(英文)：Understanding the mechanism of anti-cancer drug resistance is important processes to reduce cancer deaths. In this study, we characterized the drug resistant cancer cell viewed from the Ca²⁺ signaling which is a second messenger of living organisms. The Ca²⁺ signals were observed under a laser scanning confocal microscope, and we found that the drug resistant cell could efflux the cytosolic Ca²⁺ more quickly than the parental cell. In addition, RNA-seq analysis suggested that a Ca²⁺ pump may be involved in the drug resistance. To confirm the candidate Ca²⁺ pumps as a novel drug target of drug-resistant cancer cells, further experiments are needed.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：カルシウムシグナル 薬剤抵抗性 がん細胞株 カルシウムチャネル カルシウムポンプ

1. 研究開始当初の背景

がんゲノム医療においては、次世代シーケンサーを用いたがん遺伝子パネル検査の結果が分子標的薬の投薬根拠とされている。TP53 遺伝子に変異が認められる場合、変異による安定化に起因すると考えられるタンパク量の増加傾向がある。一方で、分子標的薬のターゲットとなっている AKT1 や BRAF などの Actionable 変異が発見されても、対応する治療標的分子のリン酸化タンパク量は増加していなかった。したがって、投薬根拠の妥当性は、ゲノムだけではなく、mRNA・タンパクまでのシグナル伝達を包括的に判断すべきである。がんシグナル研究の主流は、p53 に代表される転写因子や、キナーゼを軸としたものである[1,2]。他の経路として、Ca²⁺シグナルが考えられる。がん細胞においては、慢性的な Ca²⁺濃度上昇が報告されており、これは Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)ファミリーCa²⁺チャネルの増加によって引き起こされている[3,4]。このように、がんと Ca²⁺の関連は示唆されている一方で、種々のリン酸化反応や遺伝子発現の調節におけるセカンドメッセンジャーとしての Ca²⁺シグナルに関する報告は限られている。例えば、がん細胞に抗がん剤を処理すると特定の遺伝子発現が誘導されるが、このプロセスにおいて Ca²⁺シグナルが用いられる可能性には触れられてこなかった。

2. 研究の目的

上記のように、Ca²⁺シグナルと、がんの薬剤抵抗性の関連については知見がほとんどない。したがって、以下の項目を本研究における目的と設定した。

薬剤抵抗性上昇に関わる Ca²⁺シグナルを明らかにする

薬剤抵抗性がんにおける Ca²⁺シグナル関連の新規治療標的となりうる分子の探索・同定する

3. 研究の方法

試料として胃がん細胞株を用いた。当研究室で保有する胃がん細胞株パネルには、薬剤抵抗性を持つがん細胞とその親株のセットがあり、薬剤抵抗性の獲得前後のモデルとして有用である。

CaTM-2 AM は Ca²⁺プローブの蛍光試薬であり、遺伝子組み換えをせずに簡便に試料の Ca²⁺濃度変化の観察が可能である。抗がん剤を培養液に添加し経時的に蛍光画像を取得した。サンプルを 37℃、5% CO₂ の条件で保持するために、共焦点レーザー顕微鏡に専用の CO₂ チャンバーを接続し、安定的に経時観察を行った。

各種の抗がん剤を加えた際に起こる遺伝子発現を網羅的に調べた RNA-seq のデータを機能に着目して解析した。薬剤抵抗性の獲得に関わると考えられた候補の遺伝子について、複数の胃がん細胞株における薬剤抵抗性と候補遺伝子の発現の相関関係を調べた。さらに、抗がん剤誘導性の Ca²⁺シグナルを人為的に増幅する・減少させる処理を複数の Ca²⁺チャネル阻害剤を用いて行い、Ca²⁺シグナルの役割について推定した。

4. 研究成果

複数の抗がん剤を用いて、胃がん細胞株において Ca²⁺シグナルが誘導されるか評価した。過去の報告には、Ca²⁺シグナルの人工的な誘導をするために乳がん細胞株や前立腺がん細胞株を試料とし、ATP や Bombesin などの薬剤が用いるものが散見されるが[5,6]、胃がん細胞株を用いたものや、抗がん剤による Ca²⁺シグナル誘導の報告はほとんどない。本研究では、シスプラチン・5-FU・ドセタキセル等の抗がん剤を用いたところ、5-FU のみが胃がん細胞株において Ca²⁺シグナルが誘導されるのを確認した。さらに、Ca²⁺シグナルの詳細な解析によって、薬剤抵抗性をもつがん細胞において Ca²⁺シグ

ナルの波形に特徴があることが明らかとなった。具体的には、薬剤抵抗性を持つ細胞株において、Ca²⁺濃度の減少速度が親株と比較して有意に速かった。Ca²⁺シグナルはCa²⁺チャネルとCa²⁺ポンプによる流入と流出のバランスによって形作られている[7]。したがって、薬剤抵抗性株ではCa²⁺チャネルが少なく・あるいはCa²⁺ポンプが多く発現していることが考えられたが、Ca²⁺の流入速度に違いが認められなかったため、Ca²⁺ポンプのタンパク発現量のみが増加していることが予想された。

5-FU 処理によるCa²⁺ポンプの発現量変化をRNA-seqで調べると、複数のCa²⁺ポンプが薬剤抵抗株における特異なCa²⁺シグナルの形成に関与する可能性が示された。次に、5-FU 処理によって誘導されるCa²⁺シグナルを人為的にコントロールし、遺伝子発現にどのような影響が生じるかreal-time PCRでRNA発現量を調べた。すると、薬剤抵抗性を持たないがん細胞株においては、複数のCa²⁺ポンプにおいてCa²⁺シグナルの大きさに応じて遺伝子発現が高くなることが示唆された。一方、薬剤抵抗性がん細胞株ではその傾向が見られなかった。これは、薬剤抵抗性株においては、Ca²⁺ポンプの発現量がCa²⁺シグナルに関わらず高い水準であったことが原因であると考えられた。これらのCa²⁺ポンプのRNA発現量と5-FUの薬剤抵抗性の相関を、当研究室で保有する胃癌細胞株パネルを用いて調べた。その結果、特定のCa²⁺ポンプの発現量が高いほど、5-FUへの抵抗性を示す傾向が見られた。今後、この候補遺伝子の発現をノックダウンした際のCa²⁺シグナルや薬剤抵抗性を評価し、薬剤抵抗性に関与するCa²⁺ポンプとして同定する。

参考文献

- [1] Greenblatt et al. (1994) *Cancer Res.*, 54: 4855-4878.
- [2] Vivanco and Sawyers. (2002) *Nat. Rev. Cancer*, 2: 489-501.
- [3] Pigozzi et al. (2006) *Cell Calcium*, 39:401-415.
- [4] Hiani et al. (2009) *Arch. Biochem. Biophys.*, 486: 58-63.
- [5] So et al. (2022) *Cell Calcium*, 104: 102569
- [6] Wasilenko et al. (1997) *Prostate*, 30: 167-173.
- [7] Keener, J. and Sneyd, J. (1998) *Mathematical Physiology*. New York: Springer-Verlag.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------