

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06437

研究課題名(和文) がんスフェロイドのアポトーシス誘導に關与するヒアルロン酸 - TRPチャンネル制御系

研究課題名(英文) Hyaluronan-TRP channel regulation in the induction of apoptosis in cancer spheroids

研究代表者

山崎 純 (YAMAZAKI, Jun)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：50230397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：正常細胞は細胞外基質との接着を失ったときに細胞死を起こす。がん細胞による抵抗性にはヒアルロン酸(HA)の役割が示唆されている。他方で、HAがTRPV1チャンネル活性を抑制することが報告されたことから、乳がん細胞の悪性形質の獲得においてTRPチャンネル活性に対する内因性HAの関与が考えられた。本研究ではがんスフェロイドからの浸潤を模倣するモデル系を作成した。HA添加がTRPV1による遊走能低下を抑制すること、内因性HAが恒常的にTRPV1の作用を抑えている可能性が示唆された。以上の結果により、がん細胞の遊走・浸潤抑制においてTRPV1とHA経路の相互作用が薬物標的になる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞の遊走能や浸潤能を高める因子としてのヒアルロン酸(HA)やCa²⁺透過性を持つTRPチャンネルの役割が示唆されている中で、がん細胞塊からの遊走や浸潤におけるTRPチャンネルとHA経路のクロストークを明らかにすることは新しい抗がんメカニズムを提示することに繋がる。がんスフェロイドの形成とそこからの規則的な細胞浸潤に焦点を当てた方法は、HAなどの細胞外基質を保持しながら細胞集団としての浸潤能を評価するモデルを提供するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Normal cells die when they are detached from the extracellular matrix. Hyaluronan (HA) is proposed to give cancer cells the resistance to the detachment-induced cell death. On the other hand, as HA is reported to inhibit the TRPV1 channel activity, it was supposed that HA regulates the TRPV1 channel activity during acquisition of malignancy in breast cancer. Therefore, we produced an in vitro model which mimics cancer spheroids invading into tissues. The results showed that addition of HA attenuates the TRPV1-mediated inhibition of cell migration and that endogenous HA constitutively suppresses the action of TRPV1. Interaction between TRPV1 and HA pathways could be a drug target to inhibit migration and invasion of cancer cells.

研究分野：イオンチャンネル薬理学

キーワード：TRPチャンネル ヒアルロン酸 がんスフェロイド アポトーシス 細胞浸潤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) イヌの乳腺腫瘍の半数は悪性とされ、再発や転移を引き起こしやすく予後不良である症例が多い。正常細胞は細胞外基質 (ECM) との接着を失ったときにアポトーシスになるが (アノキス)、それに抵抗性を持つことはがん細胞が転移能をもつ理由の一つである。上皮間葉転換 (EMT) が個々のがん細胞の転移に重要であることが知られているが、近年、細胞集団としてがん細胞が浸潤する現象が報告されてきた (Friedl *et al.*, 2012)。また、遊走能や浸潤能を高める因子として ECM としてのヒアルロン酸 (HA) の役割が示唆されている。これは、HA シグナリングが集団的浸潤や転移を阻害する新たな治療ターゲットに繋がることを示唆している。

(2) 申請者らはがん細胞におけるイオン輸送の病態生理学的意義についてこれまで研究成果を報告してきた。多くのイオンチャネルががん細胞の浸潤や転移に関与する。特にヒトでは Ca^{2+} 透過性を持つ TRPV1 チャネルはトリプルネガティブタイプに最も強く発現し、その活性化薬のカプサイシンがアポトーシスを起こすと報告されている。興味深いことに近年神経細胞において HA が TRPV1 チャネル活性を抑制することが報告された (Caires *et al.*, 2015)。そこで、乳腺腫瘍の悪性形質の獲得において TRP チャネル活性に対する内因性 HA の関与の可能性が想起された。

2. 研究の目的

乳がん細胞が集団を形成して組織へ浸潤する現象を調べるモデル系を作成し、

- (1) がんスフェロイドの形成とアポトーシス耐性能や浸潤能の獲得における HA と TRP チャネルの相互作用の関与を明らかにする。
- (2) TRP 関連薬物の投与によって、がんスフェロイド形成を抑制して、アポトーシス感受性を付与できるか、あるいは浸潤能を抑制できるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) poly-HEMA (poly(2-hydroxyethyl methacrylate)) 処置プレートあるいは非接着性プレート並びに通常の培養プレートで培養した乳がん細胞 (MCF-7, MDA-MB-231, AZACB) から cDNA を調製して、TRPV ファミリーのうちで発現が変動するイオンチャネルを RT-PCR によって検索した。イヌ乳がん細胞から TRPV1 mRNA 全長を PCR クローニングして、哺乳細胞発現ベクターを作成した。

(2) TRPV1 チャネル、HA 合成酵素、CD44 (HA 受容体) の発現量を調べるために、qRT-PCR、免疫細胞染色や Western ブロット法を実施した。HA 遊離能の評価には ELISA 法を用いた。

(3) TRPV1 強制発現 HEK293 細胞あるいは AZACB 細胞に Ca 指示薬 Fura-2 を負荷した。本研究事業によって導入されたシステム一式を用いて、細胞内 Ca イメージング法によって、イオンチャネル刺激薬による細胞内 Ca^{2+} の増加に対する HA (高分子量 $\approx 1670\text{kDa}$ 、低分子量 $\approx 15\text{kDa}$) の影響を調べた。

(4) poly-HEMA 処置培養プレートあるいは非接着性プレートにおいて、乳がんスフェロイド形成能 (大きさの分布、成長度) を評価した。各種薬物によりスフェロイド形成能の変化を調べた。

(5) 細胞生存率の評価のために WST-8 アッセイを、接着培養における細胞の移動能の評価のためにスクラッチアッセイや Boyden Chamber アッセイを実施した。乳がんスフェロイドからの細胞遊走能を調べるために、ゼラチンを塗布した 96 穴プレートにスフェロイドを静置して、そ

の周囲へ遊走する接着細胞の面積を測定した。

(6) 3次元浸潤モデルの作成

- ① 乳がん細胞をラット線維芽細胞包埋コラーゲンゲルの上面に播種して細胞集団が浸潤するプロセスを再現するモデル (当初のモデル) では、中性ホルマリンで固定後にパラフィンに包埋・薄切してから、HE 染色で表面からの細胞の浸潤距離を調べた。同一標本で時間経過を調べることができないうえに、薄切標本のために浸潤細胞が集合体を作る態様が不明瞭であった。
- ② コラーゲンゲル中に埋め込んだ乳がんスフェロイドから細胞集団が浸潤するプロセスを再現するモデル (スフェロイドを活用したモデル) を作成した。光学顕微鏡によって経時的に浸潤細胞や集合体の形成について調べることが可能になった。

4. 研究成果

(1) スフェロイド形成と TRPV1

ヒト乳癌細胞株 MCF-7 を poly-HEMA 塗布した培養ディッシュ上で 4 日間培養してスフェロイドを形成させた。スフェロイドは接着培養した細胞と比べて、ヒアルロン酸 (HA) 合成酵素やその受容体 (CD44) の mRNA 発現量が高い傾向にあった。さらに、ELISA によって遊離 HA 量がスフェロイド培養条件下で増加することが示された。浮遊条件下であっても接着条件下であっても、4-MU による HA 遊離量の低下に伴って TRPV1 発現は有意に高値を示した。

poly-HEMA 塗布培養ディッシュ上のスフェロイド径を計測した (図 1)。HA 合成阻害薬 4-methylumbelliferone (4-MU) 1 mM 処置によって 120 μm 以上の直径のスフェロイド数の減少が認められたが、TRPV1 刺激薬 capsaicin 1 μM 処置は直径の分布には影響を与えなかった。

スフェロイド形成の時間経過を調べるために、非接着性 U 字型ウェル (96 穴) に 4×10^3 個の細胞を播種して 1 つずつスフェロイドを形成させた。3 日から 9 日にかけては集塊が成長したが完全な球形にはならず、いびつな構造を示した。Capsaicin や TRPV1 選択的阻害薬 AMG9810 (AMG) によっては集塊の大きさには影響を与えなかった。4-MU による HA 合成阻害によって集塊は成長せず、9 日には周辺部の破砕が確認された。この場合にも capsaicin や AMG による影響は認められなかった。

細胞生存率を調べるために WST-8 アッセイを実施した。処置 0 日目 (播種後 4 日目) では浮遊条件 (Spheroid) は接着条件下 (Plate Culture) に比べて著しく生存率が低下していたが、薬物処置 3 日後の生存率はいずれの場合においても 0 日目よりも増加していた (図 2)。4-MU 処置によって接着条件下 (Plate Culture) では約半数まで低下するが、浮遊条件下 (Spheroid) では 0 日目よりも細胞が減少することが明らかになった。また、capsaicin や AMG による大きな差異は認められなかった。

MDA-MB-231 は悪性度が高いヒト乳癌細胞株であり、TRPV1 チャネルが多く発現していると報告されている。WST-8 アッセイにより 4-MU による細胞生存の抑制が認められた。TRPV1

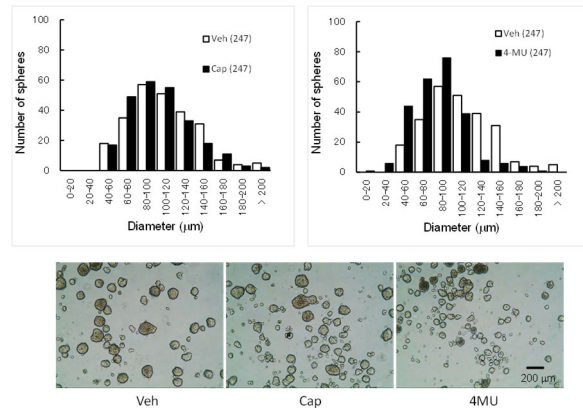


図1 スフェロイド直径の分布 Capsaicin 1 μM , 4-MU 1 mM

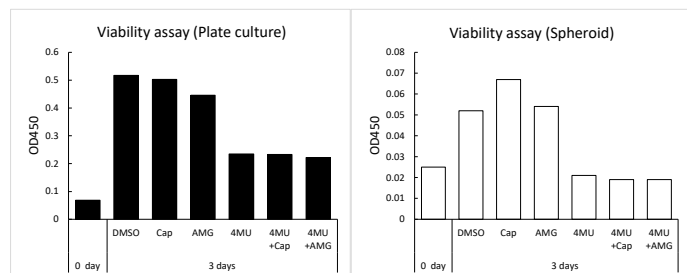


図2 MCF-7 細胞生存率 (WST-8アッセイ)

の効果については、4-MU 処置と無処置において刺激薬と阻害薬ともに影響を与えなかった。

MDA-MB-231 は MCF-7 とは異なり、非接着性 U 字型ウェルに細胞を播種して 4 日以上経過しても密着した細胞塊を形成しないため Geltrex を培地に混合することによって 8 日間かけて集塊の形成を促進させた。Capsaicin や TRPV1 選択的阻害薬 AMG の投与は集塊の大きさには影響を与えず、4-MU による HA 合成阻害によって集塊は成長しなかった (図 3)。

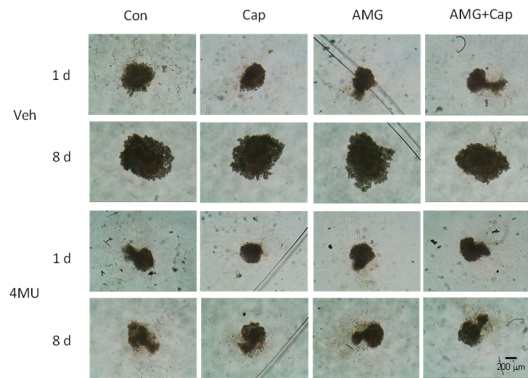


図3 MDA-MB-231の集塊形成

以前より申請者の所属する研究室ではイヌ乳腺腫瘍細胞 AZACB において 4-MU が細胞死を惹き起こすことを報告してきた。細胞生存に対して capsaicin は影響を与えなかったが、4-MU 処置は著しく抑制した。非接着性 U 字型ウェルに 4×10^3 個の AZACB 細胞を播種してスフェロイドを形成させると、8 日間にかけていびつな集塊が形成された。4-MU による HA 合成阻害によって集塊は成長しなかった。MCF-7 細胞や MDA-MB-231 細胞と同様に、capsaicin や AMG による影響は認められなかった。

以上の結果から、MCF-7 細胞のスフェロイド形成は HA 合成を伴うが、HA 合成系を阻害すると細胞死誘導ならびにスフェロイド形成阻害を惹き起こすことが明らかになった。その他の細胞においても HA の存在がスフェロイド形成に重要であることが示唆された。また、各種乳がんには TRPV1 の発現は見られるが、スフェロイド形成に対して影響を及ぼさないことが明らかになった。

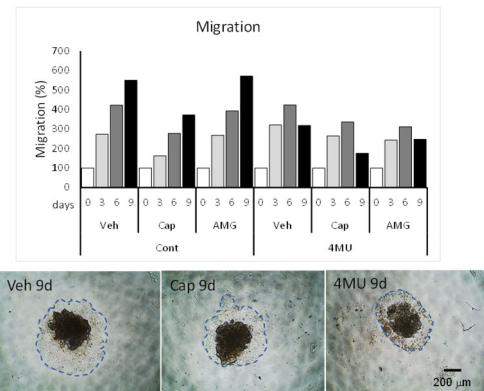


図4 MCF-7 スフェロイドからの細胞遊走

(2) 乳がん細胞の遊走・浸潤と TRPV1 チャンネル発現

MCF-7 スフェロイドを形成させて、4 日後にゼラチン塗布 U 字型ウェルに静置しなおすと、その辺縁から細胞が遊走し接着細胞が増殖し始めた。元のスフェロイドの占める面積を基準として、周囲の接着細胞面積の時間経過を計測した。静置してから 3~9 日後にかけて遊走細胞が増加するが、capsaicin 処置下では遊走が抑制される傾向にあった (図 4)。4-MU 処置では 6 日目以降に抑制に転じ、死細胞の増加が認められた。

Boyden Chamber アッセイによる AZACB の遊走能の実験 (6 時間) では、capsaicin が有意に細胞遊走を抑制したが、4-MU 処置単独では影響を与えなかった。外来性 HA (高分子量と低分子量) の添加

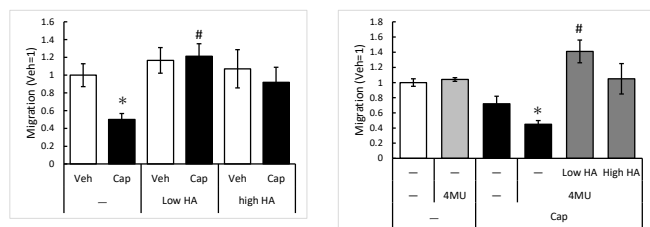


図5 AZACB の遊走に対する capsaicin と HA、4MU の効果
* vehicle との比較、# capsaicin 単独との比較、 $P < 0.05$ (n=4)

によって capsaicin による細胞遊走の抑制から回復するが、4-MU 処置によってさらに抑制が亢進すること、その 4-MU による亢進を HA が回復させることが明らかになった (図 5)。

乳がん細胞をラット線維芽細胞包埋コラーゲンゲルの上面に播種して細胞集団が浸潤するプロセスを再現するモデル (当初モデル) を作成した。MCF-7 細胞はほとんどゲル内への浸潤が認められなかった ($3 \mu\text{m}$ 以下) が、MDA-MB-231 細胞は $15.5 \mu\text{m}$ (中央値) ゲル内へ浸潤した。この現象は 4-MU によって強く抑制された。このモデルを用いての解析は、経時的に細胞

の動きを追うことができない上に、集団的移動に関する情報には乏しかった。

別の方法として、MDA-MB-231 あるいは AZACB スフェロイドを形成させてから 4 日後にコラーゲンゲルに包埋すると、その周囲から細胞がゲルに向かって 3 次的に浸潤し始めることが明らかになった。細胞は列を形成して放射状に外側へ向かった。このような細胞浸潤は MCF-7 ス

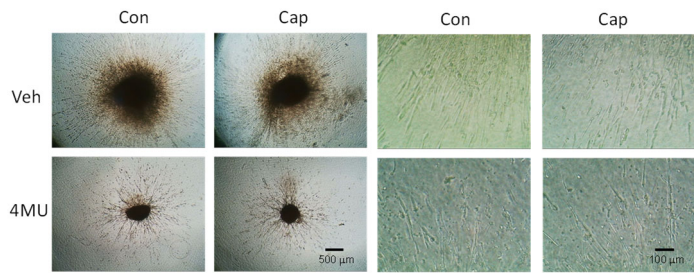


図6 AZACB スフェロイドからの細胞浸潤
コラーゲンゲル内に包埋7日後

フェロイドには認められなかった。MDA-MB-231 あるいは AZACB スフェロイドからのコラーゲンゲル中への細胞の移動を光学顕微鏡下にて経時的に判定できた。興味深いことに、6~7 日後の細胞の配列を観察すると 4-MU による HA 合成抑制によってスフェア形成は抑制され規則的な放射状の配列が失われることが明らかになった (図 6)。しかしながら、スフェロイドからの浸潤に対する capsaicin や AMG による影響は認められなかった。

以上の結果は、HA 添加が TRPV1 による遊走能低下を抑制することと、内因性 HA が恒常的に TRPV1 の作用を抑えている可能性が示唆された。他方、がん細胞集団の浸潤能を調べる新たな方法として、コラーゲンゲルに包埋したスフェロイドからの浸潤を経時的に測定するモデルを作成できることが明らかになった。しかしながら、長期間の観察においてはスフェロイドの細胞死によって細胞浸潤における TRPV1 と HA との相互作用がマスクされる可能性があった。

(3) TRPV1 チャンネル活性と HA との関連

細胞内 Ca イメージングによって TRPV1 活性に対する HA の効果の検討を行った。AZACB 細胞および TRPV1 強制発現 HEK293 細胞において、高分子と低分子 HA は capsaicin による細胞内 Ca^{2+} 増加作用を有意に抑制することが明らかになった (図 7)。この結果は AZACB 細胞の遊走・浸潤における TRPV1 と HA の関係性に一致するものであった。

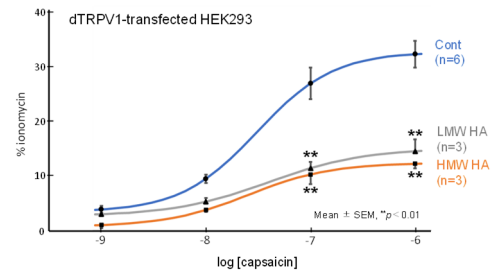


図7 イス TRPV1 強制発現 HEK293 細胞の capsaicin 誘発電流に対する HA (LMW 低分子量、HMW 高分子量) の効果

当初、HA が TRPV1 チャンネル活性を抑制したという報告から、HA は TRPV1 チャンネルの阻害によって細胞内 Ca^{2+} 濃度減少を介して、アポトーシスを抑える方向に働いている可能性を推測した。本研究の結果、がん細胞の生存やスフェロイドの維持に対して HA 経路が強力に働いていることが示されたが、がん細胞の遊走・浸潤においては TRPV1 による抑制が内因性 HA によって抑制されていることが示唆された。以上により、TRPV1 活性化薬 (capsaicin) と HA 合成阻害薬 (4-MU) の併用によって効果的な浸潤抑制効果が得られる可能性があり、今後はがんスフェロイドからの新たな浸潤モデルで検討していく必要がある。

<引用文献>

- Friedl P., Locker J., Sahai E., Segall J.E. Classifying collective cancer cell invasion. Nat Cell Biol. 2012; 14(8): 777-783.
- Caires R., Luis E., Taberner F.J., et al. Hyaluronan modulates TRPV1 channel opening, reducing peripheral nociceptor activity and pain. Nat Commun. 2015; 6: 8095.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uchida K., Kita T., Hatta M., Itoh S.G., Okumura H., Tominaga M., Yamazaki J.	4. 巻 7 (1)
2. 論文標題 Involvement of pore helix in voltage-dependent inactivation of TRPM5 channel.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e06102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2021.e06102	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 Nakano R., Kitanaka T., Namba S., Kitanaka N., Suwabe Y., Konno T., Yamazaki J., Nakayama T., Sugiya H	4. 巻 11
2. 論文標題 Non-transcriptional and translational function of canonical NF- κ B signaling in activating ERK1/2 in IL-1 β -induced COX-2 expression in synovial fibroblasts.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front. Immunol.	6. 最初と最後の頁 579266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.579266	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口卓哉、柳川日向子、松岡彩那、内田邦敏、山崎 純
2. 発表標題 イヌTRPM8とTRPA1のメントールに対する反応性の違い
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安藤 楓、山口卓哉、山崎 純
2. 発表標題 イヌTRPV1変異体が生むチャネル機能の多様性
3. 学会等名 第5回日本獣医薬理学・毒性学会春季研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山玲奈、山口卓哉、山崎 純
2. 発表標題 マウスクッパー細胞亜集団におけるTRPチャンネル遺伝子の発現解析
3. 学会等名 第5回日本獣医薬理学・毒性学会春季研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上田直斗、山口卓哉、山崎 純
2. 発表標題 イヌ末梢血単核球に発現するTRPM2の正常解析
3. 学会等名 第5回日本獣医薬理学・毒性学会春季研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加口侑樹、星野雄飛、福山由衣、山口卓哉、山崎 純
2. 発表標題 ヒアルロン酸を介したMCF-7細胞のアポトーシスからの回避におけるTRPV1の関与
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口卓哉、松岡彩那、内田邦敏、山崎 純
2. 発表標題 TRPA1 の menthol に対する反応性はイヌとマウスで異なる
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎 純、伊地知秀太、吉田瑠奈、木本裕理、井上雄太、渡邊萌、山田茉里奈、齋藤光芳
2. 発表標題 ヒアルロン酸合成酵素阻害薬によるイヌ乳腺腫瘍細胞のスフェロイド形成抑制とアポトーシス誘導
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本大学生物資源科学部獣医学科 研究室・教員 獣医薬理学研究室 https://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~vethome/laboratory/index.html
--

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
研究分担者	岡村 和彦 (OKAMURA Kazuhiko) (00224056)	福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授 (37114)	
研究分担者	内田 邦敏 (UCHIDA Kunitoshi) (20581135)	静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授 (23803)	

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
---------	---------