

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590124

研究課題名(和文) TRPM2チャンネル欠損マウスにおける固形癌の成長抑制とその機構

研究課題名(英文) Attenuation of tumor growth in TRPM2 knockout mice and its mechanism

研究代表者

清水 俊一 (Shimizu, Shunichi)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60196516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、悪性腫瘍の成長におけるTRPM2チャンネルの関与を明らかにすることを目的とした。肺癌細胞を移植したところ、TRPM2欠損(KO)マウスで腫瘍の成長が抑制された。腫瘍の成長要因である腫瘍内の血管新生、マクロファージ数及び血管新生促進因子の含量は、いずれもTRPM2 KOマウスで増加していた。また、TRPM2発現はマクロファージに認められ、H2O2刺激により活性化された。以上の結果より、マクロファージに存在するTRPM2活性化が腫瘍の成長に促進的に関わっており、TRPM2阻害剤を開発すれば新たな抗がん剤を開発できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This study examined whether TRPM2 channels contribute to tumor growth. The tumor growth by injection s.c. with lung cancer cells was suppressed in TRPM2 knockout (KO) mice. Angiogenesis, number of macrophages and angiogenesis-stimulating cytokines, all of which are stimulating factors for tumor growth, were increased in the tumor of TRPM2 KO mice. Moreover, TRPM2 expression was observed in macrophages, and the channels were activated by H2O2. These findings suggest that TRPM2 channels in macrophages contribute to tumor growth, and may be a candidate as target molecule for new anti-cancer drug.

研究分野：病態学

キーワード：TRPM2 固形がん カルシウムイオン サイトカイン 血管新生 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

TRPM2 は、細胞の形質膜に存在し、活性化酸素や腫瘍壊死因子 (TNF- α) により活性化され、Ca²⁺ を細胞内に輸送するイオンチャネルである。TRPM2 の発現は、単球/マクロファージ、顆粒球、B リンパ球などの炎症・免疫細胞に広く認められている (1)。TRPM2 の活性化機構には不明な点が多いが、TRPM2 は酸化ストレスにより細胞内で NAD⁺ より poly(ADP-ribose) polymerase 経路を介して産生された ADP-ribose が TRPM2 の C 末端側に存在する Mut-T モチーフに結合することにより活性化されると考えられている。TRPM2 の生理的役割について、我々は培養細胞を用いた実験で、TRPM2 の活性化は大量の Ca²⁺ を細胞内に導入することにより活性化による細胞死を媒介することを見出した (1)。その後、単球/マクロファージにおける TRPM2 はサイトカン・ケモカインの分泌に関わっていること、さらに TRPM2 欠損マウスを用いて、TRPM2 が炎症反応を増幅し大腸炎を増悪することを明らかにした (2)。固形がんの成長にも、腫瘍に集積するマクロファージやそこから分泌されるサイトカインが重要であることは知られているが、固形がんの成長における TRPM2 の役割を解析した報告はなかった。

参考文献

- 1) Y. Hara, M. Wakamori, M. Ishii, E. Maeno, M. Nishida, T. Yoshida, H. Yamada, S. Shimizu, E. Mori, J. Kudo, N. Shimizu, H. Kurose, Y. Okada, K. Imoto, and Y. Mori. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol. Cell*, **9**, 163-173, 2002.
- 2) S. Yamamoto, S. Shimizu, S. Kiyonaka, N. Takahashi, T. Wajima, Y. Hara, T. Negoro, T. Hiroi, Y. Kiuchi, T. Okada, S. Kaneko, I. Lange, A. Fleig, R. Penner, M. Nishi, H. Takeshima, Y. Mori. TRPM2-mediated Ca²⁺ influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat. Med.*, **14**, 738-747, 2008.

2. 研究の目的

我々は、これまでに酸化ストレスにより活性化され細胞内に Ca²⁺ を輸送する TRPM2 チャネルが、大腸炎 (1)、心臓の虚血再灌流障害、関節炎など様々な炎症性疾患の増悪に関わっていることを見出してきた。これらの発見は、TRPM2 が上記疾患治療薬を開発するためのターゲット分子になり得る可能性を強く示している。一方、TRPM2 は広く炎症・免疫細胞に分布していることから、TRPM2 阻害剤は固形がんの増殖を促進してしまう可能性がある。本研究は、TRPM2 欠損

マウスを用いて固形がんの成長における TRPM2 チャネルの影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験動物：実験には野生型 (WT) マウス (C57BL/6J) 及び TRPM2 欠損 (KO) マウスを自家繁殖し、雄性マウス (7~9 週齢、体重 20~30 g) を使用した。尚、本研究で用いたすべての実験プロトコールは、昭和大学動物実験倫理委員会及び横浜薬科大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

腫瘍細胞：実験には、肺がん細胞である Mouse Lewis Lung Carcinoma (LLC) 細胞を培養して用いた。

LLC 細胞のマウスへの移植：LLC 細胞を Trypsin 処理により回収した。その細胞を PBS 溶液で懸濁 (1 \times 10⁵ cells/100 μ L) し、マウスの背部皮下に接種した。

腫瘍形成の評価

腫瘍体積は、長径 \times 短径² \times 0.5 の式から算出した。

腫瘍内血管新生の測定：マウスから腫瘍を摘出し、ホルマリン固定後パラフィン切片を作製した。この切片を血管内皮細胞のマーカーである CD31 を抗 CD31 抗体による免疫染色することにより測定した。

腫瘍からのマクロファージの分離：摘出した腫瘍をキューブ状に切り、Type Collagenase で処置した。これを 70 μ m の Cell Strainer に通し、回収した細胞を無処理ディッシュで 30 分間インキュベーションしたのち、非接着細胞を除去し、残った細胞をマクロファージとした。

サイトカインの測定：摘出した腫瘍をホモジナイズし、遠心後の上清を試料とし、各 ELISA キットを用いて測定した。

Ca²⁺ 応答の測定：腫瘍より分離したマクロファージに Ca²⁺ 蛍光指示薬である fura-2 を取り込ませ、蛍光顕微測光システムで測定した。

4. 研究成果

WT 及び TRPM2 KO マウスの背部に LLC 細胞を移植し、腫瘍形成に及ぼす TRPM2 の影響を検討した (図 1)。LLC 細胞移植 2 週間後にマウスの外観から腫瘍形成を観察したところ、WT、KO マウスともに腫瘍形成が認められ、その大きさは WT マウスに比べて KO マウスでは小さかった (図 1A)。そこで、腫瘍重量を測定したところ、WT マウスと比較して、KO マウスでは低下していた (図 1B)。さらに、腫瘍成長の経時変化を明らかにするため、LLC 細胞を移植後、2 日おきに 22 日

まで腫瘍体積を測定した(図1C)。その結果、WTとKOマウスともに10日目から腫瘍形成が認められ、その後WTマウスでは、急激に腫瘍が増大した。これに対してKOマウスでは、腫瘍体積の増大がゆるやかであった。以上の結果から、TRPM2チャンネルは腫瘍の成長に促進的に関わっていることが明らかとなった。

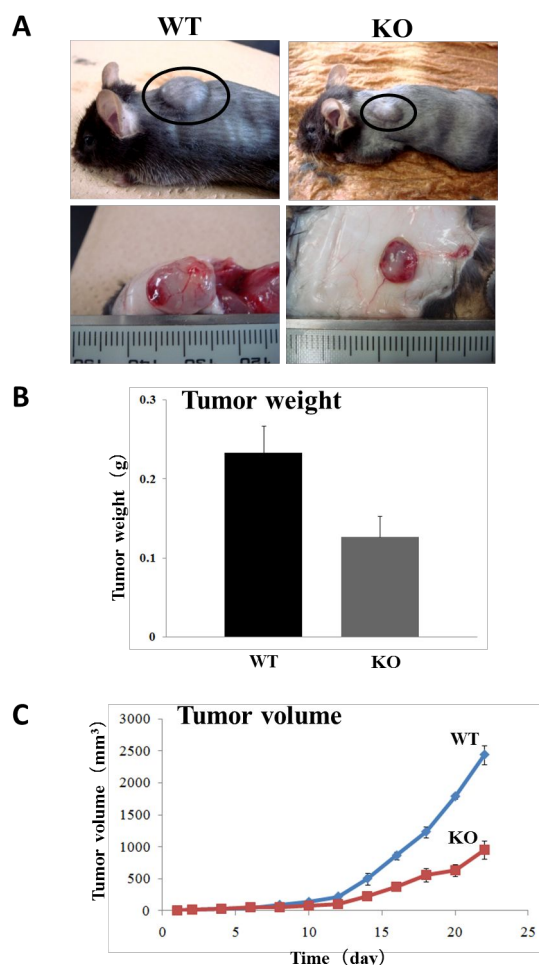


図1 . TRPM2 KO マウスにおける腫瘍成長の抑制

WTマウスとKOマウスにLLC細胞を移植し腫瘍形成を比較検討した。A: LLC細胞を移植後14日目に腫瘍像を撮影した。B: LLC細胞を移植後14日目に腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定した。C: LLC細胞を移植してから22日後まで腫瘍体積を測定した。結果は8例の平均値±標準誤差で示している。

腫瘍の成長には腫瘍組織内への酸素や養分の運搬を行うために血管新生が必須である。そこで摘出した腫瘍の切片を作成し、HE染色したところ、WTとKOマウスともに腫瘍の外縁に管腔様構造が観察された。そこで、血管内皮細胞の糖タンパク質であるCD31に対する免疫組織染色を行ったところ、管腔壁は陽性であったことより、血管腔であることが認められた。また、その数はWTマウスに

比べてKOマウスで減少していた。さらに、腫瘍細胞周囲に毛細血管様構造が観察され、これらもWTマウスに比べてKOマウスで少なかった。このように、KOマウスで腫瘍内の血管新生が抑制されていたことより、TRPM2は血管新生に促進的に働くことにより腫瘍の成長を促進すると考えられた。

腫瘍内の血管新生は、腫瘍細胞や腫瘍内に集積したマクロファージ(腫瘍関連マクロファージ、M2マクロファージ)から産生されるvascular endothelial growth factor (VEGF)、epidermal growth factor (EGF)及びtransforming growth factor- β (TGF- β)などにより促進される。そこで、形成された腫瘍におけるそれらサイトカイン含量を測定した(図2)。その結果、VEGF含量(図2A)及びEGF含量(図2B)がKOマウスで低下していた。一方、TGF- β 含量にWTとKOマウスで差は認められなかった(図2C)。

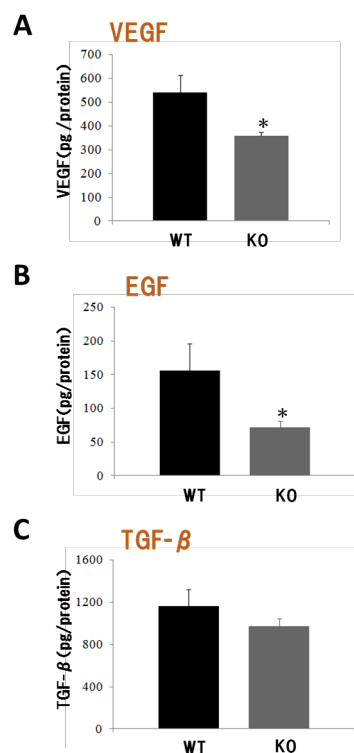


図2 . 腫瘍内のサイトカイン含量

WTマウスとKOマウスで形成された腫瘍を摘出し、サイトカイン含量を測定した。A: VEGF含量 B: EGF含量 C: TGF- β 。結果は8例の平均値±標準誤差で示している。

次に、どの細胞に発現しているTRPM2が腫瘍成長の促進に関わっているのか明らかにするために、LLC細胞と腫瘍から分離したマクロファージにおけるTRPM2 mRNA発現を測定した(図3)。その結果、マクロファージにTRPM2 mRNAの発現が認められ、一方、LLC細胞には認められなかった(図3)。

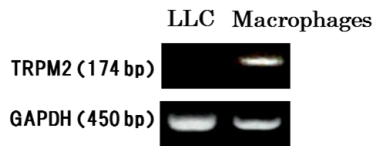


図3 . マクロファージにおける TRPM2 mRNA 発現と腫瘍内のマクロファージ数

LLC 細胞と腫瘍から分離したマクロファージの TRPM2 mRNA 発現を RT-PCR 法により測定した。

腫瘍から分離したマクロファージに TRPM2 発現が認められたことから、本当にこのマクロファージにおける TRPM2 が機能しているかどうか検討を進めた。過酸化水素 (H_2O_2) は、TRPM2 の活性化物質として知られている。そこで、 H_2O_2 (10、50、100 及び 250 μM) を添加して、マクロファージの Ca^{2+} 応答を測定した。その結果、WT マウスの腫瘍から分離したマクロファージでは、50 μM から弱い細胞内 Ca^{2+} 上昇が認められ、250 μM で強い上昇を認めた。一方、KO マウスの腫瘍から分離したマクロファージでは Ca^{2+} 上昇は認められなかった。このように、腫瘍に集積したマクロファージには機能的な TRPM2 の発現が認められるが、活性化には高濃度の H_2O_2 が必要であった。次に、 H_2O_2 刺激により TRPM2 チャンネル活性化を介してサイトカイン分泌が促進されるか検討を進めたが、 H_2O_2 を添加すると細胞死が誘導されてしまい、サイトカイン分泌を測定することができなかった。

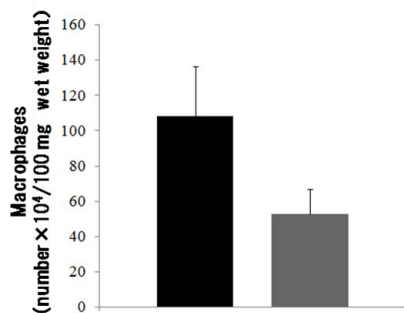


図4 . 腫瘍に集積したマクロファージ数

形成された腫瘍からマクロファージを分離し、その細胞数を測定した。結果は8例の平均値 \pm 標準誤差で示している。

さらに腫瘍に集積したマクロファージの存在量を WT マウスと KO マウスで比較した。その結果、マクロファージの存在量は KO マウスで低下傾向であった。(図4)。

本研究により、予想に反して TRPM2 欠損マウスでは腫瘍の成長が促進されず、逆に抑制されることが明らかとなった。この発見は、TRPM2 チャンネルが腫瘍の成長に促進的に関わっていることを示している。TRPM2 阻害剤を開発した場合、炎症性疾患だけでなく、癌の治療にも応用できる可能性を示している。

TRPM2 チャンネルは、腫瘍に集積したマクロファージに発現しており、マクロファージにおける TRPM2 チャンネルの活性化が腫瘍の成長に関わっていると考えられる。腫瘍内のマクロファージ数は TRPM2 KO マウスで低下していた。腫瘍関連マクロファージは、VEGF などを分泌することにより血管新生を促進し、腫瘍成長を促進すると考えられている。従って、TRPM2 KO マウスでは、マクロファージ数の低下が血管新生の低下に関連し、腫瘍の成長が抑制された可能性がある。また、腫瘍へのマクロファージの集積に、マクロファージの TRPM2 活性化を介した機構が関与している可能性もある。本研究では、機構の詳細までは明らかにできなかったが、これは今後の課題である。

5 . 研究組織

(1) 研究代表者

清水 俊一 (SHIMIZU, Shunichi)
 横浜薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号：60196516

(2) 研究分担者

石井 正和 (ISHII, Masakazu)
 昭和大学・薬学部・准教授
 研究者番号：30307061

根来 孝治 (NEGORO, Takaharu)
 昭和大学・薬学部・講師
 研究者番号：70218270