

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591865

研究課題名(和文) 伸展刺激によるがん転移-浸潤制御機構の解明：TRPV2のストレッチシグナル伝達

研究課題名(英文) The effect of focal mechanical stress on the localization of TRPV2 was investigated in the fibrosarcoma cells.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：機械刺激によりTRPV2チャネルが機械刺激の局所に集積することを新規に見いだした。このことは「細胞膜上に固定されているカルシウムチャネルが、機械刺激にともなって開口しCa²⁺の流入が生じる」とする従来のモデルとは全く異なる機構であり、チャネル分子自体が機械刺激で細胞表面にトランスロケーションするという、『新規の細胞内カルシウム調節によるメカノトランスダクション制御機構である』。がん細胞において機械刺激を負荷する、(1)TRPV2が伸展刺激を受けた部位に集まる、(2)その刺激・集積部位を起点として細胞全体に波及するTRPV2依存性のカルシウムの細胞内の濃度勾配が形成されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The effect of focal mechanical stress on the localization of TRPV2 was investigated in HT1080 cells. Mechanical stress was applied by adding negative pressure using a glass pipette. When focal mechanical stress was applied, subplasma membrane Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_s) was increased beneath the pipette, which propagated throughout the cell. The increase in [Ca²⁺]_s was blocked by knocking down TRPV2. Elevation of [Ca²⁺]_s was not observed by removal of extracellular Ca²⁺, by an addition of a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor. In cells expressing GFP-TRPV2 and RFP-Akt, administration of focal mechanical stress induced accumulation of GFP-TRPV2 beneath the pipette. RFP-Akt was also accumulated to the same site. When GFP-TRPV1, 3, V4, V5, V6 was transfected ectopically in HT1080 cells, only GFP-TRPV4 was accumulated beneath the pipette in response to the focal mechanical stress. These results indicate that TRPV2 translocates to the site receiving a focal mechanical stress and increases [Ca²⁺]_s.

研究分野：細胞生物学

キーワード：TRPV2 トランスロケーション 機械受容カルシウムチャネル

1. 研究開始当初の背景

細胞接着・運動における細胞骨格系の制御機構を調節する分子群の解析により接着・運動で発生する駆動力のメカニズムが徐々に明らかになってきた。駆動力により細胞が伸展刺激を感受して細胞内カルシウムの上昇が起こるが、その動態・調節機構は不明である。また、この駆動力による細胞伸展で生じる細胞内カルシウムの制御は、がん細胞の転移・浸潤には重要である。伸展刺激で生じるカルシウムシグナルの時間・空間的な動態と調節機構の解明は、がん細胞の転移・浸潤の制御におけるカルシウムシグナルの意義を明確にする。我々のグループは、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カルシウム透過性チャネル TRPV2 を同定して報告した (Nature Cell Biol. 1:165, 1999)。これはカルシウム透過性イオンチャネルが、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、TRPV2 チャ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も報告してきた (J Cell Physiol. 210: 692, 2007)。ケモカイン、血清、増殖因子刺激などにより、TRPV2 チャネルが活性化されて持続的な細胞内カルシウム上昇が生じる。このカルシウム流入に際しては、チャネル分子がホスファチジルイノシトール 3 (PI 3)-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、フォカルアドヒージョンキナーゼなどの細胞の接着斑を構成する分子群と共局在し、接着斑において複合体を形成してカルシウムチャネルとして機能すると考えられる。また、このチャネル機能を阻害すると細胞運動が抑制されると考えられる。

2. 研究の目的

細胞運動・接着は、生体の発生、組織形成・再生、細胞遊走などの生理学的な過程での役割ばかりでなく、炎症、動脈硬化、創傷治癒、がん転移などの病理学的過程においても極めて重要な働きをしている。がんの転移は、細胞のがん化にもなって細胞運動・細胞接着能が変化してがん細胞が組織内を移動し、結合組織をくぐり抜けリンパ管や血管に浸潤する。さらに循環系によって伝搬し他の組織に潜り込み、転移・増殖する。がんの浸潤・転移は細胞運動・接着制御の破綻の結果として起こるが、がん細胞が全く新規の特殊な機序で運動能を充進しているわけではない。胎児期の形態形成や創傷治癒に見られる生理的な過程と同様な機序・機構で浸潤・転移している。がん細胞における細胞運動・接着の機構の解析は、発生、組織形成、細胞の遊走などの生理的な過程や炎症、動脈硬化、創傷治癒などの病理学的な過程などにおける細胞運動・細胞接着機構の解明にもつながる。以前より細胞内のカルシウム (Ca²⁺) は、細胞接着・運動、細胞骨格、細胞増殖などに重要であることが知られていた。しかし、細胞接着・運動の伸展において細胞内 Ca²⁺ がどのように制御されているのか、さらに、がん細胞の浸潤・転移での細胞伸展において Ca²⁺ 動態がどのように脱制御されているかは不明である。本研究ではがん細胞における TRPV2 チャネルの制御機構、とくにがんの浸潤・転移における細胞伸展刺激に伴う細胞内 Ca²⁺ 変化の意義とストレッチシグナル伝達機構を明らかにしたいと考えている。

3. 研究の方法

(1) TRPV2 チャネルの可視化: TRPV2 に蛍光蛋白を

癒合させた TRPV2 分子コンストラクトを利用して、TRPV2 の細胞膜・細胞内局在・トランスロケーションにおける TRPV2 チャネル分子の細胞内の動態をリアルタイムで計測する。TRPV2 は 6 回膜貫通型チャネルたんぱく質である。そこで、TRPV2 の細胞外ドメインに myc-タグやその他の特殊なタグを付加した TRPV2 分子を作製して、細胞がインタクトのまま細胞膜にトランスロケーションした TRPV2 チャネル分子を特異的に検出する。また、接着斑を構成する分子、インテグリン、ピンキュリン、パキシリン、FAK、サイキシン等の分子群に蛍光たんぱくを付加し可視化して接着構造との相関性を検討する。

(2) TRPV2-siRNA ベクターの作製: 内因性の TRPV2 の発現・機能を阻害する TRPV2 ノックダウン・ベクターを作製する。それらを利用して機械刺激における細胞内 Ca²⁺ 変化をモニターする。

(3) 伸展センサーの作製: ピンキュリンは細胞接着の主要分子であり、アクチン、テイリン、カテニン、PIP₂ などの分子と相互作用して、細胞運動・接着変化に伴い構造変化を起こす。そこで、ピンキュリン分子に蛍光ラベルして細胞運動・接着によるピンキュリン立体構造変化を可視化するプローブを作製する (ピンキュリン・コンフォメーションプローブ)。さらに、クモの糸の伸展を感受する特殊なたんぱく構造をピンキュリンに挿入した細胞伸展プローブ (ピンキュリン・テンションセンサープローブ) も作製する。ピンキュリン・コンフォメーションプローブとピンキュリン・テンションセンサープローブを用いて細胞にかかる伸展を時間的・空間的に可視化することを可能にする。

(4) 高感度カルシウムプローブの作製: カルシウム感受性 FRET プローブの構造を改変した高感度カルシウムプローブ (カメレオン・ナノ) とさらにそれに改変を加えて細胞膜に局在するような修飾を付加したプローブを作製する。これにより、細胞膜直下の微小なカルシウム変化をモニターする系を確立する。これと上述した伸展センサーを併用して、細胞のどの程度の伸展刺激が加わると、どこでどのようなカルシウムシグナルが産生されるかを解析する。さらに、さまざまな刺激薬・阻害薬を利用してこのカルシウムシグナル産生機構の分子メカニズム、とくに TRPV2 の動態と関連させ、伸展刺激による TRPV2 チャネルの制御機構、それらとカルシウムシグナル産生の動態を総合的に解析し、TRPV2 によるストレッチシグナル制御の全容を明らかにする。

(5) PI3 - キナーゼとの関連性: 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、増殖に強く関連することが知られている。そこで細胞内における PIP₂, PIP₃ を Grp1-PH domain GFP, Akt-PH domain GFP で可視化 (PH ドメインで PIP₂, PIP₃ につき機能する蛍光分子) して、TRPV2 チャ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。

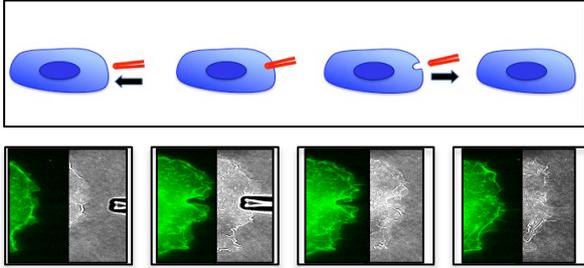
(6) 低分子量 G 蛋白質との関連: 低分子量 G 蛋白 (Rho, Rac, Cdc42, Rap1) 活性促進変異体・抑制変異体を利用して細胞運動に伴うフィロポディア、ラメリポディアなどの細胞の形態変化とチャネルの局在、細胞接着斑の構造変化、細胞内 Ca²⁺ 動態を蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡、エバネッセント顕微鏡で検討する。

(7) 細胞骨格による制御: アクチン重合阻害剤、チューブリン重合阻害剤、非筋肉型ミオシン II 阻害剤を利用して細胞伸展における細胞骨格による制御を検討する。

4. 研究成果

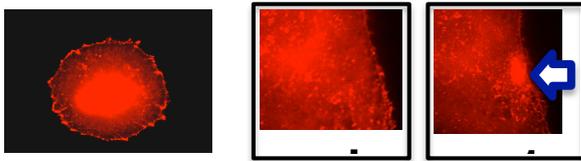
(1) 機械刺激の方法の確立

HT1080 細胞機械刺激を付加したさいの模式図と細胞膜を蛍光で可視化して、ガラス管で機械刺激したものをしめす。ガラス管が細胞に接触して細胞偏縁部に機械刺激が加わるとそれにより細胞表面に凹みが生じ、機械刺激が付加されたことがわかります。その後ガラス管を細胞から離すとその凹みは消失して、もとの細胞形態にもどる。このように我々の付加した機械刺激は可逆的である。



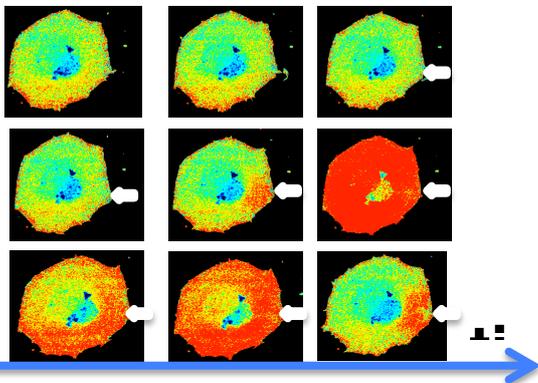
(2) 機械刺激で集積する zyxin の局在の検討

上記の機械刺激が細胞に実際に加わっているのかどうかを確認するために、メカノセンサーと機能することが知られている Zyxin を用いて確認検討した。Zyxin はアクチンに結合する蛋白群の一つで、機械刺激部に集積することが報告されている。上記の方法で細胞に機械刺激を加えると矢印でしめすように刺激部位に zyxin が集積を認めた。これにより細胞に機械刺激が付加されていることを確認した。

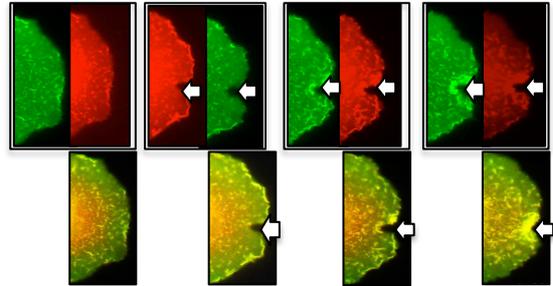


(3) 機械刺激の細胞内カルシウム上昇の局在・変化 (高感度カルシウムセンサーでの検討)

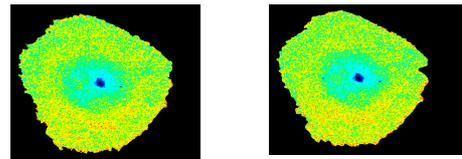
高感度 FRET プローブの YC-Nano Pm を作製した。これを発現させて機械刺激を付加したさいのカルシウムの経時変化を示す。機械刺激が付加されるとその付加部位を起点としてカルシウムの上昇を認めた。さらに細胞全体に及ぶカルシウムウェーブが観察された。このように機械刺激部を起点として細胞内にカルシウムシグナルが波及するのを認めた。さらにこのようなカルシウム上昇は機械刺激を付している間は断続的に繰り返して生じることを認めた。



(4) TRPV2 の局在・PI3 kinase が活性化の検討
TRPV2 チャネルと Akt-PH の機械刺激部位への集積 (PI-3 キナーゼの活性化) との相関を検討した。緑の蛍光が V2、赤の蛍光が PH-Akt ドメイン、下段にはそのマージ像である。左から 2 番目のように、機械刺激により細胞の辺縁が凹む、その後その部分に PH-Akt が集積するのを認めた。つまり機械刺激により PI3 kinase が活性化された。その時に緑色の蛍光でラベルした V2 の局在を見ると、機械刺激部に一致して集積した。下段マージ像で V2 の集積と PH-Akt の集積とがマージされるのを認めた。

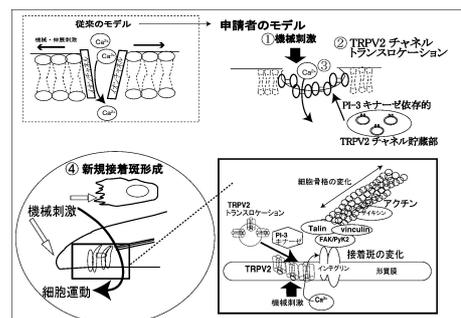


(5) TRPV2 ノックダウンと細胞外カルシウムの上昇に先ほどのような機械刺激によるカルシウム上昇は、TRPV2 の機能を knock down して発現を阻害したり、また、細胞外のカルシウムを除くと消失した。このことは、機械刺激によるカルシウム上昇がこの細胞で内在性に機能している TRPV2 に依存するものであることがわかった



(6) まとめ

がん肉腫細胞をモデルとして、機械刺激により Ca²⁺ 透過性 TRPV2 チャネルが機械刺激の局所に集積し、細胞内へカルシウムシグナルを伝達する。このことは「細胞膜上に固定されているカルシウムチャネルが、機械刺激にともなって開口して Ca²⁺ の流入が生じる」とする従来のモデルとは全く異なる機構である。チャネル分子自体が機械刺激で細胞表面にトランスロケーションするという、『新規の細胞内カルシウム調節によるメカノトランスダクション制御機構である』。がん細胞において機械刺激を負荷する、(1) TRPV2 が伸展刺激を受けた部位に集まる、(2) その刺激・集積部位を起点として細胞全体に波及する TRPV2 依存性のカルシウムの濃度勾配が形成される、(3) このカルシウム上昇により細胞接着斑の構造・機能が調節されて、細胞運動の原動力が生じる、(4) また、機械刺激の局所では PI-3 キナーゼの活性化が生じる、という一連の機械受容反応が起きることを新規に見いだした。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

① Nagasawa M, Kojima I.
Translocation of TRPV2 channel induced by focal administration of mechanical stress.

Physiol Rep, e12296 2015.

DOI:10.14814/phy2.12296 査読あり

② Nakagawa Y, Nagasawa M, Medina J, Kojima I.
Glucose Evokes Rapid Ca²⁺ and Cyclic AMP Signals by Activating the Cell-Surface Glucose-Sensing Receptor in Pancreatic β -Cells.

PLoS One. 2015 Dec 2;10(12):e0144053.

DOI:10.1371/journal.pone.0144053. 査読あり

② Otsu Y, Nakagawa Y, Nagasawa M, Takeda S, Arakawa H, Kojima I.

Diverse signaling systems activated by the sweet taste-sensing receptor in human GLP-1-secreting cells. Mol Cell Endocrinol, 394, 70-79, 2015, DOI:10.1016/j.mce.2014.07.004. 査読あり

③ Kubo N, Saito R, Hamano K, Nagasawa M, Aoki F, Takei I, Umezawa K, Kuwano H, Kojima I.

Conophylline suppresses hepatic stellate cells and attenuates thioacetamide-induced liver fibrosis in rats.

Liver Int, 34, 1057-1067, 2014,

DOI: 10.1111/liv.12328. 査読あり

④ Kojima I, Nakagawa Y, Ohtsu Y, Medina A, Nagasawa M.

Sweet Taste-Sensing Receptors Expressed in Pancreatic β -Cells: Sweet Molecules Act as Biased Agonists

Endocrinology and Metabolism. 1, 12-19, 2014,

DOI: 10.3803/EnM.2014.29.1.12. 査読あり

[学会発表] (計5件)

① 小島至、中川祐子、濱野邦久、長澤雅裕
グルコース感知受容体 T1R3 による代謝促進機構
生理学研究所、
平成 26 年 9 月 18 日～9 月 19 日
愛知県、岡崎市

② 長澤雅裕、小島至
TRPV2 は機械受容チャネルか？
第 10 回 TRP 研究会
平成 26 年 6 月 5 日～6 月 6 日
生理学研究所、岡崎カンファレンスセンター、
愛知県、岡崎市

③ 小島至、中川祐子、大津義晃、濱野邦久、長澤雅裕
膵 β 細胞甘味受容体によるグルコース代謝の制御
平成 25 年 9 月 26 日～9 月 27 日
生理学研究所、愛知県、岡崎市

④ 長澤雅裕、小島至
機械受容チャネル TRPV2 の制御機構
第 9 回 TRP チャネル研究会
TRP チャネル研究を通じて見えてきた新たな生理学への光
平成 25 年 6 月 13 日 (木) ～14 日 (金)
生理学研究所、岡崎カンファレンスセンター、愛知県、岡崎市

⑤ 長澤雅裕、小島至
がん細胞に発現する TRPV 2 : 機械刺激に対する応答

第 8 回 TRP チャネル研究会

平成 24 年 6 月 14 日～平成 24 年 6 月 15 日

生理学研究所、岡崎カンファレンスセンター、愛知県、岡崎市

[図書] (計1件)

① Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels Handbook of Experimental Pharmacology Volume I 247-272

Editors: Nilius, Bernd, Flockerzi, Veit (Eds.)

Kojima I, Nagasawa M,

DOI:10.1007/978-3-642-54215-2

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