

イオンチャネルの変異が発がんに与える影響の解析

京都大学白眉センター
高橋 重成

本研究は、細胞応答に普遍的に重要であるとされているCa²⁺シグナル/Ca²⁺チャネルについて、その重要性にも関わらず癌分野においてほとんど全くと言って良い程研究が進められていない状況を打破するため、研究助成者らが以前見つけた酸化ストレスセンサーとして機能するTRPA1チャネルに着目して研究を行い、「がんCa²⁺チャネル」という新たな研究領域の確立を目指したものである。

細胞内Ca²⁺は細胞応答において非常に重要な役割を担っており、通常、細胞内のCa²⁺濃度は100 nMと低く保たれている一方で、細胞外は 2 mMと約1万倍近くの濃度差があることが知られている。ここで一たびCa²⁺チャネルが活性化・開口すると、細胞外から細胞内へとCa²⁺が流入し、細胞増殖や分化など非常に多彩な細胞応答を引き起こす。しかし、このような重要であるにもかかわらず、がん分野においてCa²⁺チャネルはほとんど研究の対象とされていない。例えば“Ca²⁺ channel cancer”というキーワードでPubmedにて検索すると288報しかないにもかかわらず、同じ膜たんぱくである受容体、中でもgrowth factor receptor に限定するだけでも4万6千報と、大きな違いがあることがわかる（2018年当時の検索結果）。

研究助成者のそもそものバックグラウンドは神経科学であり、生体内外のストレスセンサーとして機能するTRPチャネルに注目し、生体が如何にしてストレスを感知しているのか研究を行ってきた。過去約15年間の成果により、研究助成者らはTRPチャネルファミリーメンバーのいくつかは、酸化ストレスを感知するセンサーとして機能し、細胞内にCa²⁺を流入させることを明らかにしている（図1）。

酸化ストレスというのはがん細胞の生存を考えるうえで欠くこ

とはできない重要な因子であり、基本的ながん細胞というのは、代謝の変動やがん微小環境などの影響から、正常細胞に比べて高いレベルの酸化ストレスにさらされている。そのため、強固な酸化ストレス防御機構を有することが、がん細胞の生存にとって「必須」であることが近年明らかにされてきた。ここで良く知られた酸化ストレス防御機構として挙げられるのが、ROS-neutralizing program、即ち活性酸素種を除去する系であり、抗酸化に関わる遺伝子群の発現が亢進していることが知られている。ここで、もし、酸化ストレス感受性 TRP チャネルががん腫瘍細胞に発現していたら、Ca²⁺シグナルを介して何らかの影響を及ぼしているのではないかと。このような単純な疑問から本研究はスタートした。

まず、TRPチャネル全てについて、がん患者由来の腫瘍におけるmRNAの発現解析を行った結果、酸化ストレス感受性TRPA1チャネルの発現が様々ながん種において最も高く亢進されていることが判明し

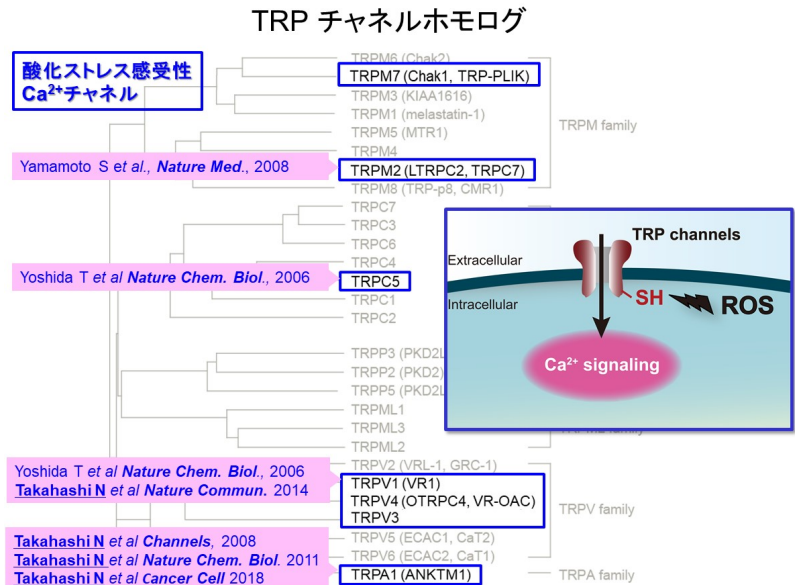


図1. 酸化感受性 TRP チャネル

た。実際にタンパク質レベルにおいてもTRPA1は乳がんおよび肺癌患者腫瘍において発現が亢進していることを免疫組織化学染色により確認できた。

次なる展開として、がん患者腫瘍で見ついているTRPA1変異およそ80種類の機能解析、およびそれががん酸化ストレス耐性にどのような影響を及ぼすのか評価した。まず定常状態での活性化を評価したところ、顕著なconstitutive active form 即ち、恒常活性化を示すような変異は認められなかった。しかし、面白いことに活性酸素種の1種である過酸化水素 (H_2O_2) 刺激に対するチャネル活性化が大幅に増加している変異Xを見出した。そこで、内因的に H_2O_2 が出ている系でも評価を行った。研究助成者らのグループは過去に、乳腺上皮細胞をマトリゲル存在下で3次元培養すると、内側の細胞集団では高いレベルの活性酸素種が産生されていることを見出している (Schafer et al *Nature* 2009)。このような系において、TRPA1および変異体Xを過剰発現させた乳腺上皮細胞にて細胞内 Ca^{2+} レベルおよび過酸化水素のレベルを評価した結果、TRPA1および変異体Xは H_2O_2 の産生に影響を及ぼさなかった一方、TRPA1の発現によりスフェロイド内部細胞の Ca^{2+} レベルが上がるのがわかり、なおかつ変異Xにより更なる Ca^{2+} 濃度の増大が生じることが明らかになった。以上より、変異体Xは内因性 H_2O_2 に対する感受性も亢進していることが明らかになった。

つづいて、どうして変異体Xは H_2O_2 の感受性が高まっているのか検討を行った。研究助成者らは過去に、 H_2O_2 による TRPA1の活性化には特定のシステイン残基が H_2O_2 により酸化されることが重要であることを見出している (Takahashi et al *Nature Chem Biol* 2011)。ここで、変異Xがタンパク立体構造上どこにいるのか見たところ、興味深いことに H_2O_2 に重要なシステイン残基近傍に存在することがわかった。一般的にシステインの反応性はSの求核性を上げると進行しやすい観点から考えると、変異Xになることによりシステイン残基の求核性が上がっていることが予想される。実際、本システイン残基のpKaは変異Xにより下がる、即ち H^+ を放出しやすくなることがわかった。

つづいて、変異体Xががん細胞の生存にどのような影響を及ぼすのか評価した。乳腺上皮細胞を3次元培養した際、スフェロイド内部細胞は H_2O_2 によりアポトーシスを起こすことが知られているが、変異体Xを過剰発現させると、細胞内 H_2O_2 の量は変わらないにもかかわらず、強力にアポトーシスを抑制することがわかった。また変異体Xは足場非依存性増殖を強力に亢進し、ここで認められた効果は抗酸化剤であるtroloxを処置することにより排除された。つまり、変異体XはTRPA1が担う酸化ストレス耐性を亢進している可能性が示された。

次に、変異体Xはシグナル伝達経路にどのような影響を及ぼしているのか検討するべく、逆相タンパク質アレイ (RPPA) を行うことにより、主要なシグナル伝達経路においてタンパク質のリン酸化状態を網羅的に評価した。また、得られた結果はwestern blotting により個別の評価を行った。その結果、変異XはTRPA1を介した Ca^{2+} 流入を増大させることにより、 Ca^{2+} 感受性キナーゼであるPYK2の更なる活性化、およびその下流のシグナルを増強し、最終的に抗アポトーシス因子であるMCL1の発現を更に亢進させることで、酸化ストレス耐性を増強していることがわかった (図2)。

このようにがん細胞は、従来から知られている活性酸素種を消去する系のみならず、TRPA1を発現、また時にはそこに変異を加えることによりTRPA1の機能を増強させることで、抗アポトーシス経路を活性化させており、厳しい酸化ストレス下でも生き延びるような選択圧がかかっていることが予想された (図3)。

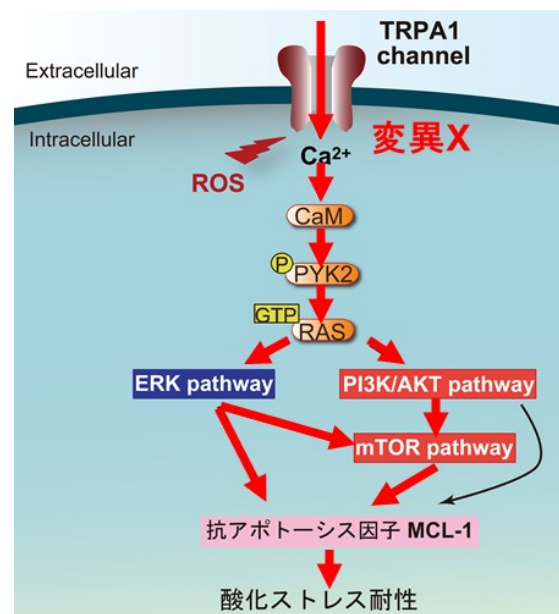


図2. TRPA1 による抗アポトーシス経路の誘導機構

また時にはそこに変異を加えることによりTRPA1の機能を増強させることで、抗アポトーシス経路を活性化させており、厳しい酸化ストレス下でも生き延びるような選択圧がかかっていることが予想された (図3)。

ここで、活性酸素種はアポトーシス経路だけではなく、アポトーシス非依存的細胞死も誘導することが知られているが、アポトーシス非依存的細胞死をがん細胞がどのように回避しているのかは長年不明であった。研究助成者はこのアポトーシス非依存的細胞死の本質が脂質過酸化により誘導される細胞死、ferroptosisだという

ことを見出した。がん細胞ではferroptosisを回避するために、脂質過酸化の制御因子であるGPX4など様々な経路を動かすことによりH₂O₂によるアポトーシス非依存的細胞死を抑制していることを明らかにした (Takahashi et al *Mol Cell* 2020)。このように、がん細胞は選択圧により厳しい酸化ストレスの下でも生き延びる力、即ち強固な酸化ストレス防御機構が備わっていると考えらる。

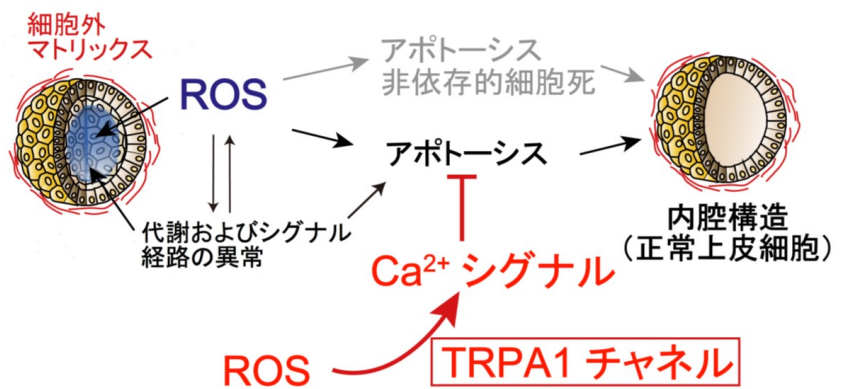


図 3. TRPA1 を介したがん酸化ストレス耐性機構のモデル