

主論文の要旨

**Potential role of transient receptor potential (TRP)  
channels in bladder cancer cells**

〔 膀胱癌細胞における一過性受容器電位(TRP)チャネルの役割 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態外科学講座 泌尿器科学分野

(指導：後藤 百万 教授)

水野 秀紀

## 【緒言】

TRP チャンネルは、Ca<sup>2+</sup>透過性を持つ非選択性陽イオンチャンネルであり、温度、化学物質、機械刺激応答に関与するなど、感覚生理学において重要な役割を担っている。最近の研究では、特定の TRP チャンネルが、増殖、分化、細胞死、腫瘍形成の調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。メラノーマでは TRPM1、前立腺癌では TRPV6 および TRPM8 の発現変化が報告されている。しかしながら、癌細胞におけるこれら TRP チャンネルの生理学的役割についてはまだはっきり解明されていない。

Everaerts らは、マウス膀胱上皮細胞における TRPV4, TRPV2, TRPM7 の機能的発現について報告している。低浸透圧センサーと考えられている TRPV4 は、膀胱上皮の伸展を感知し、ATP シグナルへ変換することによって蓄尿時の排尿反射経路に関与することが示唆されている。また、膀胱癌組織において、TRPV2 の発現が顕著に増加していることが報告された。さらにヒト膀胱癌由来培養細胞(T24)において、TRPV2 の活性化が細胞死を引き起こすことが報告された。しかし、正常細胞と膀胱癌における TRP チャンネルの機能的発現の違いについてはまだ完全には解明されていない。

今回、私は、マウス正常膀胱上皮細胞とマウス膀胱癌細胞株である MBT-2 細胞における TRP チャンネルの発現を比較することによって、TRP チャンネルの生理学的役割を明らかにすることを試みた。特に、TRP チャンネルと、癌細胞増殖に重要な因子のひとつである細胞内 Ca<sup>2+</sup>の調節機構との関係に主眼を置いた。

## 【方法】

動物は、8週令 雄性 C3H/HeN マウスを用い、膀胱上皮細胞を準備した。C3H/HeN マウス膀胱癌由来の膀胱癌細胞株 MBT-2 細胞とヒト低分化膀胱癌細胞株 T24 細胞を用いた。

TRP チャンネルの4つのサブファミリー(TRPV, TRPM, TRPC, TRPA)の22遺伝子について、その発現量を RT-PCR、リアルタイム PCR を用いて解析した。さらに、抗 TRPV2 抗体、抗 TRPV4 抗体を用い免疫細胞染色を行った。各々の細胞において TRPV2 および TRPV4 のアゴニストを用いて、Ca<sup>2+</sup> イメージングを行い、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を観察した。また、MBT-2 細胞を用いて細胞増殖分析を行った。

数値は平均±標準誤差で表し、統計解析は Student's t-test を用いた。p < 0.05 を有意とした。

## 【結果】

マウス膀胱上皮細胞および MBT-2 細胞において TRPV2, TRPV4, TRPM7 の mRNA の発現を認めた (Figure 1A)。TRPV2, TRPM7 mRNA の発現が MBT-2 細胞で有意に増加し、TRPV4 mRNA の発現は MBT-2 細胞で有意に減少していた (Figure 1A, B)。

マウス膀胱上皮細胞、MBT-2 細胞の形態 (Figure 1C, D)、抗 TRPV2 抗体を用いた免疫活性 (Figure 1E, F)、および TRPV4 様の免疫活性 (Figure 1G, H) を示す。これらの発現の違いは mRNA の発現の違いと一致していた (Figure 1A, B)。

TRPV2 アゴニストである 2-Aminoethoxydiphenyl borate(2-APB) や lysophosphatidylcholine(LPC)は、膀胱上皮細胞よりも MBT-2 細胞における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を有意に上昇させた(Figure 2A-D, G)。TRPV4 のアゴニストである GSK1016790A (GSK)による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は、膀胱上皮細胞と比較し、MBT-2 細胞ではより少なかった(Figure 2E-G)。これらの結果は、mRNA、蛋白レベルの両方において TRPV2, TRPV4 の発現と一致していた(Figure 1)。

T24 細胞において、TRPV2, TRPV4, TRPM7 の mRNA の発現を認め(Figure 3A)、TRPV2 様および TRPV4 様免疫活性が認められ(Figure 3B, C)、mRNA の発現と一致していた。LPC により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は著明に上昇したが(Figure 3D)、GSK ではより小さな上昇にとどまった(Figure 3E)。LPC による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ フリーの条件下では  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は軽微であった(Figure 3F)。以上から、LPC による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は、TRPV2 を介した  $\text{Ca}^{2+}$ 流入によることが示唆された。

TRPM7 過剰発現では MBT-2 細胞増殖を抑制した( $p = 0.02$ ,  $n = 6$ , Figure 4A)。しかし、TRPV2 過剰発現では細胞増殖に変化を認めなかった。MBT-2 細胞における内因性 TRPV2 の強発現が原因と考えられた( $p = 0.527$ ,  $n = 6$ , Figure 4A)。実際、dominant negative TRPV2 過剰発現させると、MBT-2 細胞増殖が有意に亢進した( $p < 0.001$ ,  $n = 6$ , Figure 4A)。さらに、TRPV2 アゴニストは MBT-2 細胞増殖を抑制した( $p < 0.005$ ,  $n = 6$ , Figure 4B)。以上の結果から、TRPV2 と TRPM7 は MBT-2 細胞増殖において抑制的に機能していることが示唆された。

dominant-negative TRPV2 導入により細胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性が低下することが示唆された(Figure 5)。

## 【考察】

今回、TRPV2 が膀胱癌の細胞増殖において抑制的に作用し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 恒常性の維持に重要な役割を担っていることが示唆された。

ヒト膀胱癌では、TRPV2 発現の増加が報告されており、膀胱癌における TRPV2 の機能的関与が示唆されている。TRPV2 は  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性の高いチャネルであり、細胞膜への機械伸展刺激により活性化される。今回の研究で認められた定常状態の癌細胞における TRPV2 の活性化については、細胞膜の伸展を伴う急速な細胞増殖、遊走により活性化される、あるいは、TRPV2 作用物質が癌細胞の細胞膜伸展によって放出されると推測される。他の報告でも、癌細胞の遊走時において TRPV2 が定常状態で活性化され得ることが示されている。恐らく、TRPV2 の活性化は  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を引き起こすことによって細胞の過度な増殖や遊走を抑制し、細胞に過度の機械刺激がかかることを回避しているのであろう。山田らは、TRPV2 の活性化が膀胱癌細胞において細胞死を引き起こし、TRPV2 は膀胱癌細胞増殖において抑制的に働くことを報告した。TRPV2 を介した過度の  $\text{Ca}^{2+}$ 流入が、細胞死を引き起こす  $\text{Ca}^{2+}$ 過負荷となる可能性もある。

TRPM7 が乳癌や胃癌等の癌細胞の増殖に関与していることが報告されているが、

今回初めて C3H/HeN マウスの膀胱上皮細胞と比較して MBT-2 細胞において TRPM7 の発現が有意に増加していることを明らかにした。TRPM7 はまた、機械伸展刺激によって活性化され得ることが報告されてきたことから、膀胱癌細胞において TRPV2 と同じような役割を担っていることが示唆される。今後、膀胱上皮細胞における TRPM7 の機能について解明していく必要がある。

C3H/HeN マウスの膀胱上皮には TRPV4 が正常に発現している一方で、MBT-2 細胞では TRPV4 がほとんど発現していなかった。TRPV4 が ATP を介して排尿反射経路に関与し、TRPV4 欠失マウスにおいて膀胱蓄尿時の感覚が低下することが報告されている。TRPV4 は、膀胱上皮と比べると、膀胱癌細胞においては重要ではないのかもしれない。さらに、ATP 放出は大量の細胞エネルギー消費を必要とするため、MBT-2 細胞はこれを回避するために TRPV4-ATP 系の活性を低下させていると推測される。

#### 【結語】

MBT-2 マウス膀胱癌細胞において、TRPV2 および TRPM7 の発現が正常膀胱上皮と比べ増加していることを明らかにした。TRPV2 は MBT-2 細胞増殖を抑制していることが明らかになった。また TRPV2 は T24 ヒト膀胱癌細胞においても高発現、高活性が観察され、癌における細胞内  $Ca^{2+}$  調節において重要な役割を担っていることが示唆された。

膀胱上皮細胞の局所治療により TRPV2 活性を制御することで膀胱癌の増殖を抑えることができる可能性が示唆された。