学位論文審査結果の報告書

氏　　名　　深海　和樹

生年月日　　(昭和)・平成　61年　9月　7日

本籍（国籍）　　日　本

学位の種類　　博　　士　（薬科学）

学位記番号　　第 138 号

学位授与の条件　　学位規程第５条該当
（博士の学位）

論文題目　　神経前駆モデル細胞の神経様分化及び前立腺癌細胞の神経内分泌様分化における$Ca_v3.2$T型Ca^{2+}チャネルの挙動と役割に関する研究

学位論文受理日　　平成　29　年　1　月　12　日

学位論文審査終了日　　平成　29　年　2　月　9　日

審査委員

（主　査）　川畑　篤史　印

（副主査）　西田　升三　印

（副主査）　中山　隆志　印

（副　査）　印

（副　査）　印

論 文 内 容 の 要 旨

電位依存性 Ca^{2+}チャネルは、活性化される膜電位の違いにより低電位活性化型（T 型）と高電位活性化型（L、N、P/Q、R 型）に分類される。さらに T 型 Ca^{2+}チャネルには、$Ca_v3.1$、$Ca_v3.2$ 及び $Ca_v3.3$ の 3 種類のアイソフォームが存在し、静止膜電位からわずかに脱分極することで活性化される性質から、主に神経興奮、ホルモンや神経伝達物質の分泌、筋収縮、細胞の増殖や分化等の調節に寄与することが示されている。T 型 Ca^{2+}チャネルの 3 つのアイソフォームのうち、特に $Ca_v3.2$ はその発現や機能変化と疾患との関連性を指摘する報告が数多く存在する。興味深いことに、川畑らのグループは、$Ca_v3.2$ のチャネル機能が、第 3 の生体内ガスメッセンジャーとして注目されている硫化水素（H_2S）により増強されることを見出している。さらに同グループは、内因性に産生される H_2S による $Ca_v3.2$ の機能増強が、体性痛、神経損傷や抗癌剤による神経障害性疼痛及び内臓痛の発症に寄与すること、H_2S ドナーが $Ca_v3.2$ を高発現する神経前駆細胞の神経分化を誘起することを報告している。ある種の癌細胞は $Ca_v3.2$ を含む T 型 Ca^{2+}チャネルや H_2S 合成酵素を発現していることがそれぞれ異なるグループによって明らかにされており、癌の発症や予後にも $H_2S/Ca_v3.2$ 系が何らかの影響を及ぼしていることが考えられる。$Ca_v3.2$ のチャネル機能は、Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II（CaMKII）や protein kinase A（PKA）等によるリン酸化調節の他に、アスパラギン（N）結合型糖鎖修飾によっても調節を受けることが知られている。2 型糖尿病モデルマウスにおいては、N 型糖鎖修飾の亢進よって $Ca_v3.2$ の発現及び機能が増強され、ニューロパチーの発症に寄与する可能性が示唆されている。一方、$Ca_v3.2$ のタンパク発現量は転写促進因子の 1 つである early growth response 1（Egr-1）により促進的に、抑制因子である repressor element-1 (RE-1) silencing transcription factor（REST）により抑制的に制御されることが明らかとなっている。そこで、本研究では、H_2S 及び N 型糖鎖修飾によるチャネル機能調節や Egr-1 及び REST によるチャネル発現調節に焦点をあて、神経前駆細胞の神経様分化及び前立腺癌細胞の神経内分泌様分化における $Ca_v3.2$ T 型 Ca^{2+}チャネルの挙動と役割について検討を行った。

第 1 章では、$Ca_v3.2$ を自然に高発現している神経前駆 NG108-15 細胞において、H_2S による $Ca_v3.2$ 活性化を介した神経分化における細胞内シグナルについて検討した。川畑らのグループは、NG108-15 細胞を H_2S ドナーである NaHS で処置すると、神経分化の指標である神経突起伸長や高電位活性化型（high-voltage-activated、HVA）Ca^{2+}チャネル電流（HVA-currents）の増加が誘起されることを報告している。そこで、第 1 章では、NG108-15 細胞における NaHS 誘起神経突起伸長や HVA-currents の増加が、Src 型チロシンキナーゼ阻害薬 PP2 の前処置により抑制されること、また、NaHS は Src のリン酸化レベルを増加させることを示した。この NaHS 誘起 Src リン酸化は細胞内 Ca^{2+}キレーターBAPTA/AM、T 型 Ca^{2+}チャネル阻害薬 mibefradil 及び T 型 Ca^{2+}チャネルの 3 つのアイソフォームのうち $Ca_v3.2$ を選択的に阻害する ascorbic acid によって抑制された。同様に、NaHS 誘起神経突起伸長も BAPTA/AM、mibefradil 及び ascorbic acid により抑制されることが報告されている。これらの結果から、NG108-15 細胞の H_2S により誘起される神経様分化には、$Ca_v3.2$ T 型 Ca^{2+}チャネルの活性化を介した細胞内 Ca^{2+}濃度上昇に続く Src リン酸化が関与していることが示唆された。

第 2 章では、前立腺癌細胞の神経内分泌様分化に伴う $H_2S/Ca_v3.2$ 系の挙動と役割について検討した。大部分の前立腺癌はアンドロゲン依存性に増殖する性質を有する為、薬物療法もしくは外科的処置により血中のアンドロゲン量を減少させる、あるいは、アンドロゲン受容体遮断薬を用いるホルモン療法が非常に有効とされている。しかし、一定期間の治療継続により、ほとんどの患者において前立腺癌がホルモン療法に対して抵抗性を示すようになり、癌増殖が再燃する。そのホルモン療法抵抗性を獲得するメカニズムの一つとして、前立腺癌細胞が神経内分泌様に分化することが挙げられる。神経内分泌様に分化した前立腺癌細胞自身は増殖活性が低く、アンドロゲン受容体を欠損しているため、従来のホルモン療法ではこの細胞の機能を抑制することはできない。一方、神経内分泌様分化前立腺癌細胞は、増殖性ニューロペプチド等の細胞増殖因子を産生、分泌することで周囲の癌細胞の増殖を促進する結果、腫瘍全体がホルモン療法に抵抗性を示すようなる。興味深いことに、ヒト前立腺癌 LNCaP 細胞は、培地中アンドロゲン除去、炎症性サイトカインの 1 つである interleukin-6 (IL-6) 刺激あるいは細胞内 cyclic AMP（cAMP）量を増加させる薬物により神経内分泌様に分化し、それに伴い $Ca_v3.2$ T 型 Ca^{2+}チャネルを高発現するようになる。また、細胞膜透過性 cAMP アナログである dibutyryl cAMP（db-cAMP）処置により神経内分泌様分化した LNCaP 細胞では、$Ca_v3.2$ は Ca^{2+}依存的な分泌反応に関与する。一方、ホルモン療法抵抗性の前立腺癌細胞には H_2S 合成酵素である cystathionine-γ-lyase（CSE）あるいは cystathionine-β-synthase（CBS）も発現していることから、前立腺癌において H_2S が何らかの病態生理学的役割を担っている可能性がある。そこで、第 2 章では、db-cAMP 誘起神経内分泌様分化 LNCaP 細胞の分泌機能調節における内因性 $H_2S/Ca_v3.2$ T 型 Ca^{2+}チャネルの役割に焦点をあて、さらに神経内分泌様分化 LNCaP 細

胞の $Ca_v3.2$ のタンパク発現増加における転写促進因子 Egr-1 及び転写抑制因子 REST の発現変化についても検討を行った。その結果、db-cAMP 処置により神経内分泌様分化した LNCaP 細胞でみられる T 型 Ca^{2+}チャネル電流（T-currents）は、H_2S ドナーである NaHS や Na_2S 処置により増大し、この効果は T 型 Ca^{2+}チャネル阻害薬によって抑制された。また、LNCaP 細胞では神経内分泌様分化に伴い、H_2S 合成酵素である CSE のタンパク発現が増加していた。次に Ca^{2+}依存的に分泌される prostatic acid phosphatase（PAP）分泌量を指標として、神経内分泌様分化 LNCaP 細胞の分泌反応における $H_2S/Ca_v3.2$ 系の関与を検討したところ、神経内分泌様分化した LNCaP 細胞では基礎的 PAP 分泌が亢進しており、この分泌反応は CSE 阻害薬及び T 型 Ca^{2+}チャネル阻害薬により抑制された。これにより、ヒト前立腺癌 LNCaP 細胞は、db-cAMP 処置による神経内分泌様分化に伴って $Ca_v3.2$ T 型 Ca2+チャネル及び H_2S 合成酵素 CSE の発現が増加する結果、CSE 依存的に産生される内因性 H_2S が、autocrine/paracrine 的に $Ca_v3.2$ のチャネル機能を増強することで分泌反応を促進している事が示唆された。また、db-cAMP 処置した LNCaP 細胞では、$Ca_v3.2$ の転写促進因子 Egr-1 の発現増加と転写抑制因子 REST の発現低下が確認され、さらに $Ca_v3.2$ の発現増加は Egr-1 のノックダウンによって抑制された。このことより、db-cAMP 誘起神経内分泌様分化 LNCaP 細胞における $Ca_v3.2$ の過剰発現には、Egr-1 の発現増加と REST の発現低下が関与することが示唆された。

第 3 章では、db-cAMP 誘起神経内分泌様分化 LNCaP 細胞に発現する $Ca_v3.2$ チャネル機能に及ぼすアスパラギン結合型（N 型）糖鎖修飾の影響について検討を行った。糖尿病を合併する前立腺癌患者は、糖尿病を併発しない患者と比べ、早期にホルモン療法に対して抵抗性を獲得し、予後が不良であるとの臨床報告がある。一方、$Ca_v3.2$ 過剰発現細胞を高グルコース培地下で培養することで、$Ca_v3.2$ の N 型糖鎖修飾が亢進し、チャネル機能や膜発現が促進されることが報告されていることから、糖尿病を併発する前立腺癌患者の予後悪化に N 糖鎖修飾による $Ca_v3.2$ の機能増強が関与することが考えられる。そこで、$Ca_v3.2$ チャネル機能に及ぼす N 型糖鎖修飾の影響を明らかにするため、高グルコース培地（24.9 mM、450 mg/dL）もしくは低グルコース培地（5.6 mM、100 mg/dL）下で神経内分泌様分化させた LNCaP 細胞の T-currents と $Ca_v3.2$ タンパク発現量の変化を比較した。その結果、低グルコースに比べて高グルコース負荷は神経内分泌様分化 LNCaP 細胞に発現する T-currents 及び $Ca_v3.2$ のタンパク発現量を有意に増加させた。また、N 型糖鎖の生合成阻害薬である tunicamycin や細胞外の N 型糖鎖を切断する脱 N グリコシル化酵素 PNGase F は、高グルコース条件下でのみ T-currents を有意に抑制した。これらの結果から、高グルコース条件下の神経内分泌様分化 LNCaP 細胞では、$Ca_v3.2$ の N 型糖鎖修飾が亢進されることで $Ca_v3.2$ のチャネル機能が増強されていると考えられる。神経内分泌様分化前立腺癌の $Ca_v3.2$ は増殖因子の分泌を促進させることでホルモン療法抵抗性に寄与することから、今回の知見は、糖尿病と前立腺癌を併発する患者における予後不良の原因を解明する上で重要な示唆を与えるものと考えられる。

今回の検討により、神経前駆細胞に発現する $Ca_v3.2$ T 型 Ca^{2+}チャネルは H_2S により機能増強され、Ca^{2+}流入を介して Src 型チロシンキナーゼ依存的に神経様分化を誘導することが明らかになった。この成果は、$H_2S/Ca_v3.2$ 系が疼痛の誘発だけではなく、神経分化や神経損傷後の軸索再生に寄与する可能性を示唆するものであり、神経系における $H_2S/Ca_v3.2$ 系の役割を理解する上で新たな発見となった。また、神経内分泌様分化前立腺癌細胞の $Ca_v3.2$ は、分化に伴って発現増加した CSE により産生される内因性 H_2S や高グルコース負荷による N 型糖鎖修飾の亢進によりチャネル機能が増強されることが明らかとなった。神経内分泌様分化前立腺癌に発現する $Ca_v3.2$ は、増殖因子等の分泌促進を介して、前立腺癌のホルモン療法抵抗性獲得に寄与することが考えられている。そのため、本研究により得られた知見は、ホルモン療法抵抗性獲得メカニズムの一部を明らかにする重要な成果であり、有効な治療法のないホルモン療法抵抗性前立腺癌に対する新規治療薬の開発にも将来寄与しうるものである。

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

第3の生体内ガスメッセンジャーである硫化水素（H_2S）は、$Ca_v3.2$ T型 Ca^{2+}チャネルの機能を増強し、体性痛、神経損傷や抗癌剤による神経障害性疼痛及び内臓痛の発症に寄与する。また、H_2S は $Ca_v3.2$ を高発現する神経前駆細胞の神経分化を誘起する。一方、癌の発症や予後にも $H_2S/Ca_v3.2$ 系が何らかの影響を及ぼす可能性が指摘されている。$Ca_v3.2$ のチャネル機能は、アスパラギン（N）結合型糖鎖修飾によって調節を受けており、2型糖尿病モデルマウスにおいては、N型糖鎖修飾の亢進よって $Ca_v3.2$ の発現及び機能が増強され、ニューロパチーの発症に寄与する可能性が示唆されている。また、$Ca_v3.2$ のタンパク発現量は転写促進因子の1つである early growth response 1（Egr-1）により促進的に、抑制因子である repressor element-1 (RE-1) silencing transcription factor（REST）により抑制的に制御されることが明らかにされている。本博士学位論文は、これらの最新知見に基づき、H_2S 及びN型糖鎖修飾によるチャネル機能調節や Egr-1 及び REST によるチャネル発現調節に焦点をあて、神経前駆細胞の神経様分化及び前立腺癌細胞の神経内分泌様分化における $Ca_v3.2$ T型 Ca^{2+}チャネルの挙動と役割について検討した研究成果をまとめたものである。

第1章では、$Ca_v3.2$ を自然に高発現している神経前駆 NG108-15 細胞において、H_2S による $Ca_v3.2$ 活性化を介した神経分化における細胞内シグナルについて検討している。その結果、NG108-15 細胞における NaHS 誘起神経突起伸長や HVA-currents の増加が、Src 型チロシンキナーゼ阻害薬 PP2 の前処置により抑制されること、また、NaHS は Src のリン酸化レベルを増加させることが示された。この NaHS 誘起 Src リン酸化は細胞内 Ca^{2+}キレーターBAPTA/AM、T型 Ca^{2+}チャネル阻害薬 mibefradil 及び T型 Ca^{2+}チャネルの3つのアイソフォームのうち $Ca_v3.2$ を選択的に阻害する ascorbic acid によって抑制された。これらの結果から、NG108-15 細胞の H_2S により誘起される神経様分化には、$Ca_v3.2$ T型 Ca^{2+}チャネルの活性化を介した細胞内 Ca^{2+}濃度上昇に続く Src リン酸化が関与する可能性を示唆している。

第2章では、db-cAMP 誘起神経内分泌様分化 LNCaP 細胞の分泌機能調節における内因性 $H_2S/Ca_v3.2$ T型 Ca^{2+}チャネルの役割に焦点をあて、さらに神経内分泌様分化 LNCaP 細胞の $Ca_v3.2$ のタンパク発現増加における転写促進因子 Egr-1 及び転写抑制因子 REST の発現変化についても検討を行っている。その結果、db-cAMP 処置により神経内分泌様分化した LNCaP 細胞でみられる T 型 Ca^{2+}チャネル電流（T-currents）は、H_2S ドナーである NaHS や Na_2S 処置により増大し、この効果は T型 Ca^{2+}チャネル阻害薬によって抑制されることが示された。また、LNCaP 細胞では神経内分泌様分化に伴い、H_2S 合成酵素である CSE のタンパク発現が増加していた。次に Ca^{2+}依存的に分泌される prostatic acid phosphatase（PAP）分泌量を指標として、神経内分泌様分化 LNCaP 細胞の分泌反応における $H_2S/Ca_v3.2$ 系の関与を検討したところ、神経内分泌様分化した LNCaP 細胞では基礎的 PAP 分泌が亢進しており、この分泌反応は CSE 阻害薬及び T型 Ca^{2+}チャネル阻害薬により抑制された。これらの知見に基づき、ヒト前立腺癌 LNCaP 細胞は、db-cAMP 処置による神経内分泌様分化に伴って $Ca_v3.2$ T型 Ca2+チャネル及び H_2S 合成酵素 CSE の発現が増加する結果、CSE 依存的に産生される内因性 H_2S が、autocrine/paracrine 的に $Ca_v3.2$ のチャネル機能を増強することで分泌反応を促進している可能性を示唆している。また、db-cAMP 処置した LNCaP 細胞では、$Ca_v3.2$ の転写促進因子 Egr-1 の発現増加と転写抑制因子 REST の発現低下が確認され、さらに $Ca_v3.2$ の発現増加は Egr-1 のノックダウンによって抑制されことから、db-cAMP 誘起神経内分泌様分化 LNCaP 細胞における $Ca_v3.2$ の過剰発現には、Egr-1 の発現増加と REST の発現低下が関与する可能性を指摘している。

第3章では、db-cAMP 誘起神経内分泌様分化 LNCaP 細胞に発現する $Ca_v3.2$ チャネル機能に及ぼすアスパラギン結合型（N型）糖鎖修飾の影響について検討を行っている。まず、高グルコース培地（24.9 mM、450 mg/dL）もしくは低グルコース培地（5.6 mM、100 mg/dL）下で神経内分泌様分化させた LNCaP 細胞の T-currents と $Ca_v3.2$ タンパク発現量の変化を比較した結果、低グルコースに比べて高グルコース負荷は神経内分泌様分化 LNCaP 細胞に発現する T-currents 及び $Ca_v3.2$ のタンパク発現量を有意に増加させるとの知見を得ている。また、N型糖鎖の生合成阻害薬である tunicamycin や細胞外の N型糖鎖を切断する脱 N グリコシル化酵素 PNGase F は、高グルコース条件下でのみ T-currents を有意に抑制することを見出した。これらのことより、高グルコース条件下の神経内分泌様分化 LNCaP 細胞では、$Ca_v3.2$ の N型糖鎖修飾が亢進されることで $Ca_v3.2$ のチャネル機能が増強される可能性を示唆している。これらの結果は、糖尿病と前立腺癌を併発する患者における予後不良の原因を解明する上で重要な新知見である。

本研究によって、神経前駆細胞に発現する $Ca_v3.2$ T型 Ca^{2+}チャネルは H_2S により機能増強され、Ca^{2+}流入を介して Src 型チロシンキナーゼ依存的に神経様分化を誘導することが明らかにされた。また、神経内分泌様分化前立腺癌細胞の $Ca_v3.2$ は、分化に伴って発現増加した CSE により産生される内因性 H_2S や高グルコース負荷による N型糖鎖修飾の亢進によりチャネル機能が増強されることが示され、前立腺癌のホルモン療法抵抗性獲得メカニズムの一部を明らかにするための手がかりが得られた。本研究で

得られた成果は、生体内における H_2S と $Ca_v3.2$ T 型 Ca^{2+}チャネルの役割と両者の相互関係の理解する上で極めて重要な知見であり、当該分野の研究の発展に大きく寄与するものと考えられる。以上、本論文は、博士学位論文として十分な内容を含んでいるものと高く評価できる。