

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19748

研究課題名（和文）神経伝達物質を起点とした癌根治療法の創出

研究課題名（英文）Identification of novel targets and concepts for cancer therapy

研究代表者

照沼 美穂（Terunuma, Miho）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50615739

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：がん抑制効果が期待されるAMPKと抑制性神経伝達を担うGABAB受容体のクロストークによる新しい抗がん剤の開発を目指すために研究を行った。その結果、口腔がん細胞に発現するGABAB受容体は脳細胞に発現するものとは異なり、その活性化による抗癌作用は確認できなかった。しかし、AMPKの活性化は単独で強力に抗癌作用を発揮した。今後その下流シグナルを標的とした、より特異的な分子の同定が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、他の組織のがんで報告されていたGABAB受容体の活性化によるがん抑制効果が口腔がんでは発揮されないことが明らかとなった。一方、AMPKやその下流分子の活性化が効果的な癌抑制効果を生み出すことも明らかとなり、今後これらを標的とした研究が、新規抗がん剤の開発などに繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We examined the anticancer effect of cellular energy sensor AMPK and inhibitory neurotransmitter receptor GABAB receptor and their functional crosstalk in oral cancer cells. We found that the structure of GABAB receptors are different from that of neuronal GABAB receptors and their activation did not induce anti-cancer effect. On the other hand, AMPK activation strongly suppressed the cancer proliferation. Therefore, in oral cancer, AMPK downstream signaling maybe a good target for novel drug development.

研究分野：神経化学、生化学

キーワード：AMPK 口腔癌 扁平上皮癌 GABA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞のエネルギーセンサーとして知られる AMP キナーゼ (AMPK) は、がん細胞では活性や発現が抑制されているが、薬剤などで活性を上昇させるとがん細胞の増殖が停滞することが判明している。このため、がんの予防や治療の標的としての AMPK 研究が進んでいる。一方、脳内の抑制性神経伝達物質である γ アミノ酪酸 (GABA) が作用する GABA_B 受容体が、近年、神経細胞のみならず様々ながん細胞にも発現していることが続々と報告されてきた。加えて、がん細胞に発現する GABA_B 受容体の活性化には、AMPK と同様に腫瘍の成長や進行を抑制する作用があることも報告されていた。

研究代表者は、脳の GABA_B 受容体の機能調節メカニズムを明らかにする研究から、AMPK が GABA_B 受容体の結合分子の一つであり、GABA_B 受容体をリン酸化して受容体の発現や活性を調節すること、GABA_B 受容体のシグナリングも AMPK を活性化すること、の二つを見出していた。これらの知見から、がん細胞内においても AMPK と GABA_B 受容体がクロストークしていて、両者の抗がん作用において重要な役割を担っている可能性が強く示唆された。がん細胞で観察される AMPK 活性の減少や分解による発現の減少は、がん細胞の成長や浸潤の速度を格段に早める。そのため、効果的に AMPK の活性を上昇させたり、分解を阻止したりするメカニズムの発見こそが、がん細胞撃退の鍵となる。AMPK と GABA_B 受容体、それぞれのシグナリングに抗がん効果があるとの報告から、研究代表者の得た神経科学研究での知見が、がん根治のための最良の抗がん剤開発に貢献すると考え、詳細に検証することにした。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者、研究分担者、連携研究者それぞれの専門におけるこれまでの実績を活用し、新規治療薬のターゲットとしての GABA_B 受容体の癌細胞における発現意義を解明し、GABA_B 受容体と AMPK の分子間クロストークの詳細なメカニズムを明らかにすることにより、今までにない、新しい視点からの抗がん剤の提唱を目指す。また、これらの分子が深く関わる腫瘍細胞を同定することで、これらの分子を発現する癌細胞と発現しない癌細胞等、サブタイプ特異的な治療提唱への新しい展開を目指す。

3. 研究の方法

この研究目的を達成するために、GABA_B 受容体と AMPK の発現が既に報告されているヒト膵管癌細胞株・乳癌細胞株と、研究分担者が保有しており AMPK の発現が確認されているヒト口腔扁平上皮癌 9 種を網羅的に解析し、GABA_B 受容体の発現の有無や、AMPK との結合やシグナルのクロストークの有無など、癌細胞株の特徴ごとの仕分けを試行する。これにより、将来的に癌細胞のサブタイプ別に治療が提案できるように明確化する。

本申請は、二力年での実施を計画する。研究期間内には、次の 8 点を明らかにする。

- (1) 癌細胞株における GABA_B 受容体と AMPK の発現や局在
- (2) GABA_B 受容体の抗がん効果の再検討
- (3) 癌細胞株での既知の GABA_B 受容体結合分子の存在の有無
- (4) GABA_B 受容体と AMPK の相互間活性化シグナルの有無
- (5) 癌細胞株での AMPK の発現や活性の減少における GABA_B 受容体の役割
- (6) GABA_B 受容体の抗がん効果に関わる新規シグナル分子の同定と既知のシグナル分子との関連
- (7) AMPK と GABA_B 受容体を介した抗がん作用の分子経路
- (8) ヒトのがん組織を用いた、本研究による同定シグナル分子の検証

4. 研究成果

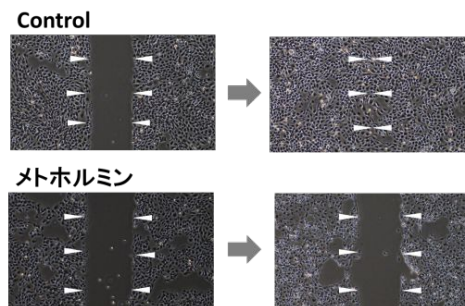
AMPK の発現が確認されているヒト口腔扁平上皮癌細胞株 4 種の GABA_B 受容体の発現や局在を調べたところ、どれも発現が確認された。しかしながら、神経細胞の GABA_B 受容体とは異なる分子量を有しており、また細胞分画法による解析から、核内での発現が顕著に見られた。そこでこれらの癌細胞株に GABA_B 受容体のアゴニストであるバクロフェンを投与して細胞の増殖と形態の変化を確認したところ、無刺激のものと比較してあまり変化が見られなかった。加えて、膵管がん細胞株では GABA_B 受容体の発現とバクロフェンによる細胞増殖抑制が観察された。これらの結果は、GABA_B 受容体の抗癌効果は細胞種特異的であることが示唆された。

一方、細胞のエネルギーセンサーとして知られる AMPK の活性化剤として知られる 2 型糖尿病治療薬メトホルミンは、口腔癌細胞株の増殖を有意に抑制した。生細胞を比色定量する MTS アッセイにおいても、メトホルミンが口腔癌細胞株の増殖を抑制していることが確認できた。また、細胞の遊走能を経時的に解析するスクラッチアッセイを行ったところ、メトホルミンは細胞遊走を抑制していることがわかった (図 A)。この時の細胞の形態を観察したところ、

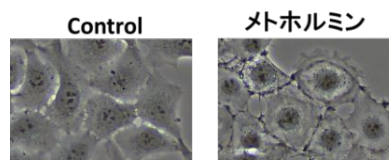
著しい形態変化が観察された(図B)。細胞間結合タンパク質の発現をウェスタンブロッティング法で検討したところ、密着結合タンパク質であるオクルディンの発現がメトホルミンによって有意に上昇した一方、接着結合タンパク質の発現に差は見られなかった。この結果は、密着結合の増強が細胞の増殖能や遊走能を抑制していると考えられた。

メトホルミンは AMPK を活性化することが知られていることから、口腔癌細胞株においても同様に活性化の上昇が観察されるかを、ウェスタンブロッティング法で検討したところ、24 時間刺激で有意に上昇することがわかった。そこで、AMPK の特異的な活性化剤である AICAR を用いて、AMPK の活性化のみで上記の変化が観察されるかを検討した。その結果、AICAR は細胞増殖と遊走は抑制したが、形態の変化は示さなかった。この結果は、メトホルミンによる口腔癌細胞株の形態変化は AMPK を介していないことを示唆している。

現在、AMPK の下流シグナリングが口腔癌特異的な新規がん治療戦略の開発の標的となると考え、研究を行っていると同時に、口腔癌細胞株の形態変化と悪性化についての検討を行っている。



A. Ca9-22細胞のスクラッチアッセイ



B. Ca9-22細胞の形態変化

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

(1) Soda M, Saitoh I, Murakami T, Inada E, Iwase Y, Noguchi H, Shibasaki S, Kurosawa M, Sawami T, Terunuma M, Kubota N, Terao Y, Ohshima H, Hayasaki H, Sato M. Repeated human deciduous tooth-derived dental pulp cell reprogramming factor transfection yields multipotent intermediate cells with enhanced iPS cell formation capability. *Sci Rep.* 2019 Feb 6;9(1):1490. doi: 10.1038/s41598-018-37291-2.

(2) Terunuma M. Diversity of structure and function of GABAB receptors: a complexity of GABAB-mediated signaling. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2018;94(10):390-411. doi: 10.2183/pjab.94.026.

(3) Newman EL, Terunuma M, Wang TL, Hewage N, Bicakci MB, Moss SJ, DeBold JF, Miczek KA. A Role for Prefrontal Cortical NMDA Receptors in Murine Alcohol-Heightened Aggression. *Neuropsychopharmacology.* 2018 May;43(6):1224-1234. doi: 10.1038/npp.2017.253.

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 伊藤元貴, 高木律男, 照沼美穂: 糖尿病治療薬メトホルミンは口腔扁平上皮癌細胞の遊走と増殖を阻害する. 平成 31 年度新潟歯学会第 52 回総会, 新潟県新潟市, 2019 年 4 月 13 日.

(2) Genki Ito, Ritsuo Takagi, Miho Terunuma: Metformin, an anti-diabetic agent inhibits oral cancer cell proliferation and migration. *International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment*, Phuket, Thailand, Feb 2019.

(3) Miho Terunuma, Stephen Moss: Neuroprotective role of GABA_B receptors against hypoxia. *GABA_B receptor conference*, Cagliari, Italy, May 2018.

(4) Miho Terunuma: Identification of novel molecule which involves in glutamine synthetase-mediated ammonium metabolism. 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会, 兵庫県神戸市, 2017 年 12 月 6-9 日.

(5) 照沼美穂: 抑制性神経伝達物質の新たな機能. 歯科基礎医学会, 長野県塩尻市, 2017 年 10 月 16-18 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

https://researchmap.jp/miho_terunuma/

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：三上 剛和

ローマ字氏名：Yoshikazu Mikami

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：准教授

研究者番号（8桁）：80434075

研究分担者氏名：山崎 学

ローマ字氏名：Manabu Yamazaki

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：助教

研究者番号（8桁）：10547516

(2)研究協力者

研究協力者氏名：天谷 吉宏

ローマ字氏名：Yoshihiro Amaya

研究協力者氏名：原田 史子

ローマ字氏名：Fumiko Harada

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。