

平成21年5月22日現在

研究種目：若手研究 B
 研究期間：2007 度～2008 年度
 課題番号：19790097
 研究課題名（和文）低酸素誘導性 P2X₇ 受容体発現ベクターによる悪性化がん細胞特異的がん治療法の開発
 研究課題名（英文）Development of cancer therapy by hypoxia-inducible P2X₇ receptor-expression vector
 研究代表者
 月本 光俊 (TSUKIMOTO MITSUTOSHI)
 東京理科大学薬学部薬学科 助教
 研究者番号：70434040

研究成果の概要：

本研究は、P2X₇受容体を利用した新規がん遺伝子治療法の確立を目標としていた。そこで、P2X₇受容体発現量の違いによるがん増殖・転移への影響を検討した。その結果、P2X₇受容体の異常な発現増加はがん増殖を促進し、発現低下は癌転移を促進することを明らかにした。以上より、P2X₇受容体を利用した新規がん遺伝子治療法の確立は難しいものの、P2X₇受容体発現量の違いは、個々のがんの特性を知るための新規バイオマーカーとして利用することが期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,200,000	0	1,200,000
20年度	2,000,000	600,000	
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000		

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ゲノム創薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 目標

本研究は、悪性化がん細胞を選択的に殺滅する副作用の少ない新規遺伝子治療法の確立のため、低酸素応答性転写因子により P2X₇受容体（細胞外ATP依存性細胞死を誘導）を悪性がん細胞特異的に発現させ、高悪性化がん細胞を選択的に殺滅する新規遺伝子発現治療法の確立を目標としている。

(2) 必要性

現在のがん化学療法や放射線療法は非特異的に細胞障害を惹起するため、正常細胞へのダメージが大きく、重篤な副作用が治療を受ける患者の QOL を大きく損なう。また、低酸素・低栄養・代謝産物（ATP など）蓄積という悪条件下において腫瘍は悪性化し、抗がん剤耐性、放射線抵抗性、転移・浸潤能を獲得する結果、治療の断念、もしくは術後の再発につながる。そのため、悪性化がん細胞選択的な治療法の確立が求められている。

(3) 新規治療法の開発

低酸素応答配列の下流にP2X₇受容体遺伝子を組み込んだベクター (HREx9-P2X₇ベクター)を開発し、低酸素条件下の悪性化がん細胞に選択的にP2X₇受容体を発現させ、腫瘍中心部において壊死細胞より放出された高濃度ATPにより細胞死を誘導する新規抗がん遺伝子治療法を開発する。

(3) 本研究の独創性と意義

申請者が考案するHREx9-P2X₇ベクターの特徴は、①低酸素領域でのみP2X₇受容体発現が誘導される ②細胞周囲に多量のATPが存在する条件でのみP2X₇受容体を介した細胞死は誘導される という二段階調節により悪性化がん細胞に選択性が高く、副作用を最小限に抑えられる点である。申請者は、世界で初めてP2X₇受容体をごん治療に応用し、患者のQOLに配慮した新規遺伝子治療法を確立することにより、今後本格化するごんの治遺伝子治療に新しい方向性を示すことができると考えている。

2. 研究の目的

本研究は、悪性化がん細胞を選択的に殺滅する副作用の少ない新規遺伝子治療法の確立のため、低酸素応答性転写因子によりP2X₇受容体 (細胞外ATP依存性細胞死を誘導)を悪性がん細胞特異的に発現させ、高悪性化がん細胞を選択的に殺滅する新規遺伝子発現治療法の確立を目標としている。

本研究では、まず、基礎検討事項としてP2X₇受容体のがんにおける発現量変化の生理的影響とその有用性について検討をおこなった。そのため、19年度では、P2X₇受容体発現量増加によるがん増殖への影響について検討し、20年度では、P2X₇受容体発現低下によるがん増殖への影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) P2X₇受容体安定発現株およびP2X₇受容体ノックダウン細胞株の樹立

リポフェクション法によりP2X₇受容体発現ベクターあるいはP2X₇受容体shRNAをB16細胞に遺伝子導入し安定発現株を作成した。

(2) 遺伝子導入B16細胞におけるP2X₇受容体発

現の解析

- ① 上記で得られた遺伝子導入細胞においてP2X₇受容体の発現をウェスタンブロット法により検討した。
- ② ATP刺激後15分後のアポトーシス様細胞縮小を解析し、ATP刺激6時間後の細胞死誘導活性を乳酸脱水素酵素の漏出を指標に解析した。
- (3) P2X₇受容体安定発現がん細胞およびP2X₇受容体ノックダウンがん細胞のマウスへの移植とがん増殖の変化の解析

P2X₇受容体安定発現がん細胞および非発現がん細胞をC57BL/6マウスの後肢に移植あるいは尾静脈から移植する。その後、1ヶ月間がん組織の大きさを計測、あるいは肺への生着を測定した。

4. 研究成果

19年度は、がん細胞におけるP2X₇受容体過剰発現による抗がん作用について検討した。まずB16メラノーマにマウスP2X₇受容体高発現細胞株 (P2X₇^{high}) を作製した (図1)。

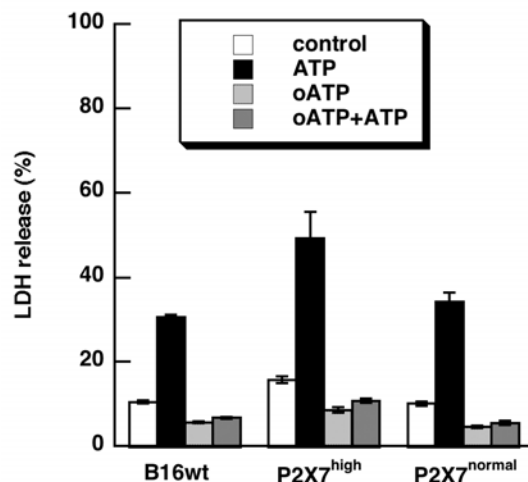


図1 P2X₇受容体高発現細胞の樹立

野生株 (WT)、高発現株(P2X₇^{high})および通常量発現株(P2X₇^{normal})をC57BL/6マウスの後肢に移植し、1ヶ月間観察した。その結果、野生株、通常量発現株に比べて高発現株において著しいがん組織の成長が認められた (図2)。この成長促進はP2X₇受容体阻害薬をマウスに投与することによって阻害できた (図

3)。

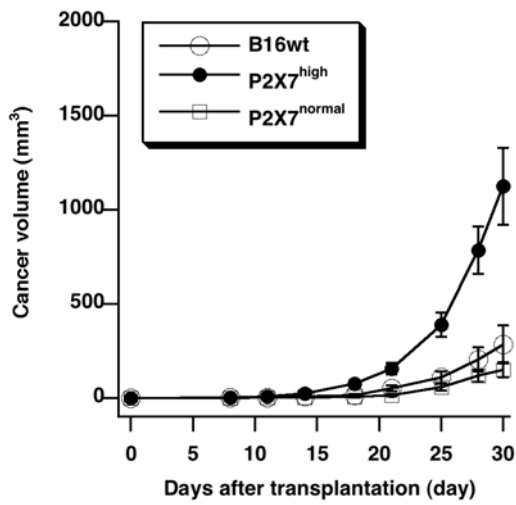


図2 P2X₇受容体高発現細胞によるがん成長促進効果

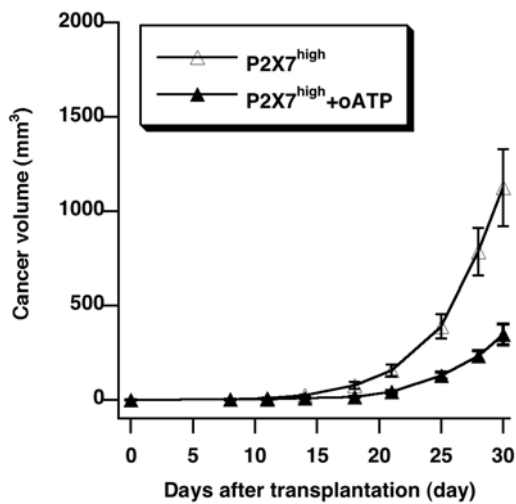


図3 P2X₇受容体阻害薬によるがん成長抑制効果

以上の結果より、P2X₇受容体発現は、がんの成長促進に関与していることが明らかになった。今後、P2X₇受容体を用いた遺伝子治療を考える際には、P2X₇受容体発現を上げるのではなく、P2X₇受容体の活性を下げる必要がある。そのため、HREベクターに発現させる遺伝子は、P2X₇受容体に対するsiRNAに変更し、がん細胞特異的にP2X₇受容体をノックダウンできるベクターにより抗がん作用を検討していきたいと考え、20年度の研究を開始した。

20年度は、P2X₇受容体をノックダウンしたメラノーマ株を作成し、がん成長・転移能への影響を検討した。B16メラノーマにP2X₇受容体に対するshRNAを遺伝子導入した。各細胞株のP2X₇受容体活性の測定は、小孔形成、細胞死誘導を指標とした。数十種のクローンの中からP2X₇受容体の発現が恒常的に低い細胞株を選択した (P2X₇-KD)。

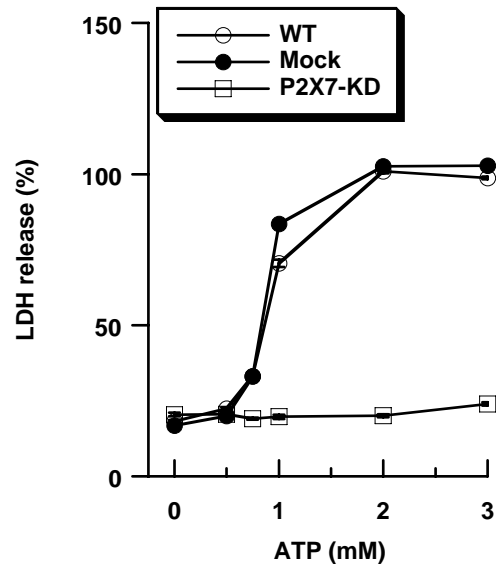


図4 P2X₇受容体低発現株の樹立

P2X₇-KDをマウスの後肢に移植し、1ヶ月間腫瘍の成長を測定した。その結果、わずかにその増殖能が増加していることが明らかになった。しかし、移植しない状態でのin vitroでの増殖能には変化がなかった。一方、尾静脈よりP2X₇-KDを移植した結果、肺への生着が著しく増加することが示唆された。

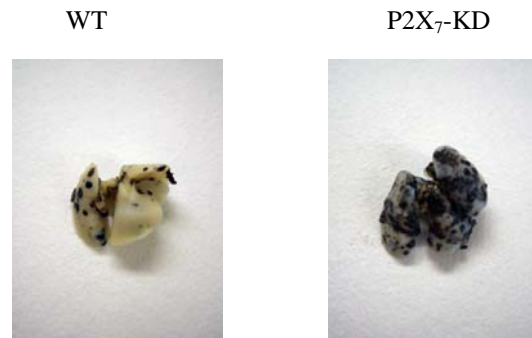


図5 P2X₇受容体発現低下による肺への転移促進

以上の結果より、予想に反し、P2X₇受容体の発現低下はがん増殖は抑制せず、むしろ癌の転移生着能増加を引き起こすことが示された。

まとめ

最近では、P2X₇受容体の発現量は、癌種によって異なることが明らかになり、発現増加しているがんや発現低下しているがんともに報告されてきている。2年間の研究成果をまとめると、P2X₇受容体の発現量の多いがんでは、がん増殖能が高く、一方、P2X₇受容体の発現が低いがんでは特に転移・生着能が高くなっていることが示唆された。当初の目的の遺伝子治療法の確立は当面難しいことが示唆されたが、一方でP2X₇受容体のがん細胞での役割を初めてin vivoレベルで明らかにすることができた。今後、P2X₇受容体の発現量の違いは、がん細胞の性質（成長力、転移力）を予測するがん治療バイオマーカーとして本研究成果は重要な知見となると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

国内

大島康宏、月本光俊、竹之内敬人、佐藤充、木谷裕、原田均、小島周二

P2X₇受容体はがん増殖能にどのように関与するか?

第 129 年会 日本薬学会

平成 21 年 3 月 28 日

京都府 (京都市)

国外

月本光俊、大島康宏、原田均、竹之内敬人、佐藤充、鈴木明菜、木谷裕、小島周二

Over-expression of P2X₇ receptor enhances tumor growth *in vivo*, but not *in vitro*

International Symposium of Nucleosides and Nucleotides Purine 2008

平成 20 年 6 月 29 日

—平成 20 年 7 月 2 日

デンマーク

(コペンハーゲン)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

月本光俊 (TSUKIMOTO MITSUTOSHI)

研究者番号 : 70434040