

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08185

研究課題名（和文）アデノシン受容体阻害薬のがん細胞選択的な放射線治療促進効果の解明

研究課題名（英文）Cancer-specific enhancement of radio-therapeutic effect by adenosine receptor antagonist

研究代表者

月本 光俊 (Tsukimoto, Mitsutoshi)

東京理科大学・薬学部薬学科・教授

研究者番号：70434040

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：放射線治療は有効ながん治療法の一つであるが、奏効率向上のためにはがん細胞の放射線抵抗性や転移能獲得を改善することが重要である。本研究では、アデノシンA2B受容体のがん細胞の放射線抵抗性や転移能獲得に関与することを解明し、さらにA2B受容体阻害薬をがん移植マウスに投与すると、放射線による腫瘍成長抑制効果を増強できることを明らかにした。本研究により、A2B受容体阻害薬により放射線治療を向上できる可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、がんの放射線治療の向上を目指した研究です。放射線治療は有効ながん治療法の一つですが、放射線抵抗性の高いがん細胞は残存し、残存したがん細胞は再発や転移を誘発し奏効率を低下させる可能性があります。そのため奏効率の向上のためには、放射線で確実にがん細胞を殺すことが重要です。本研究では、アデノシンA2B受容体阻害薬ががん細胞の放射線抵抗性を改善し、A2B受容体阻害薬を放射線照射時に併用することでより多くのがん細胞を殺すことができることを明らかにしました。本研究結果は今後のがん治療の向上に役立つと考えられます。

研究成果の概要（英文）：To improve radiotherapy against cancer, it is important to improve radio-resistance and malignancy of cancer cells. In this study, we found that adenosine A2B receptor is involved in radio-resistance in cancer cells. Further, we also found that the treatment of cancer-bearing mouse with A2B receptor antagonist enhanced therapeutic effect by radiation. In conclusion, we suggest that A2B receptor antagonist would improve radiotherapy.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線治療 がん治療 アデノシン受容体 放射線増感剤 がん転移

1. 研究開始当初の背景

(1) 放射線治療の現状と課題

放射線治療は、外科的手術に比べ、患者 QOL が高い治療法として認知され、また手術困難ながんで特に有効な治療法である。放射線による細胞障害作用を利用したものが放射線治療であるが、放射線治療では正常細胞に障害の少ない(回復可能な)線量で複数回照射するため、一度に全てのがん細胞を殺滅することは難しく、一部のがん細胞は障害を修復し生き残る。この残存がん細胞は、治療抵抗性や高転移性などの高悪性度プロファイルを獲得する。その結果、治療期間の後半では、残存したがん細胞が加速再増殖などの治療抵抗性や高転移性などの悪性度の高い形質を獲得してしまい、再発や転移の原因となり、奏効率の低下を引き起こす。故に奏効率の向上と根治のためには、がん細胞選択的に放射線細胞障害作用を増強させること(放射線増感効果)、そして、残存したがん細胞の高悪性度プロファイル(高転移能)獲得を防止することが重要である。

これまでがん細胞の放射線抵抗性を改善し、細胞障害効果を増強する放射線増感剤に関して多くの研究がなされてきているが、副作用の問題等から臨床で用いることができていない。特に、がん細胞特異的に放射線増感効果を上げることは難しい。また、放射線照射後に生じる転移能亢進などのがん細胞の機能変化については不明な点が多いため、現状、有効な対策を取ることができていない。これらの状況から、本邦の臨床では、放射線治療時の併用薬はない。

(2) 放射線細胞応答におけるプリン受容体の役割

これまでに申請者は、世界に先駆けて、放射線照射によって細胞から ATP などのヌクレオチドが放出され、自己および周囲の細胞の表面に発現するプリン受容体を活性化させることが放射線細胞応答に重要な役割を担うことを明らかにしてきた[引用文献 1]。この新規メカニズムのがん治療への応用を目指し、プリン受容体の 1 つである P2X7 受容体の阻害薬が放射線 DNA 損傷修復を減弱させ、放射線細胞障害を増強させること、さらに担がんマウスにおいて放射線治療効果を促進させることを報告した[引用文献 2]。

一方、プリン受容体の 1 つであるアデノシン受容体 (P1 受容体) は、細胞外アデノシンをリガンドとし、A1, A2A, A2B, A3 受容体のサブタイプが存在する G タンパク質共役型受容体 (図 1 参照) であるが、放射線細胞応答における役割は明らかでない。

そこで本研究では、新たにアデノシン受容体に着目することで、放射線増感効果と転移能獲得防止効果により放射線治療を向上させる革新的治療薬が開発できるのではないかと考えた。

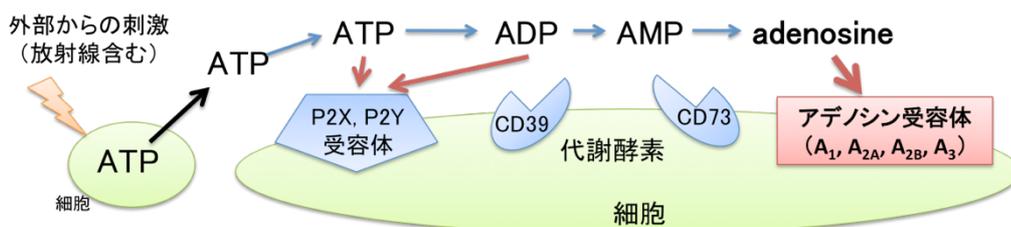


図1 細胞外アデノシンとアデノシン受容体

様々な刺激によりATPは細胞外へ放出され、細胞表面の代謝酵素(CD39、CD73)により脱リン酸化され、アデノシンとなり、アデノシン受容体(A1、A2A、A2BおよびA3受容体)を活性化させる。

2. 研究の目的

本研究では、放射線治療の奏効率向上を目指し、放射線による細胞障害作用をがん細胞選択的に増強させ、かつ、残存がん細胞の転移能獲得を防止できる新規薬剤の開発を目的とする(図 2 参照)。申請者は、新規治療標的としてがん細胞に高発現するアデノシン受容体に着目し、がん特異的な放射線治療効果の向上と治療後のがん転移抑制を実現するこれまでにない薬の開発を目指す。

アデノシン受容体の生理機能については、主に薬理学、生理学、神経科学、免疫学の分野で研究が盛んであるが、放射線生物影響におけるアデノシン受容体の役割についてはほとんど分かっていない。そこで、本研究では、放射線生物学領域ではまだ注目されていないアデノシン受容体に着目し、アデノシン受容体が放射線照射されたがん細胞での DNA 損傷修復や細胞運動能を制御する重要な新規治療標的であることを世界に先駆けて解明し、放射線治療の向上に貢献する新規薬剤の開発を目指す。

放射線照射技術は近年著しく向上し、正確にがん組織に照射することが可能になってきている。しかし、低酸素領域等の放射線抵抗性がん細胞に障害を与えるためには、照射線量の増加が必要になるが、照射線量の増加は周囲の正常組織での炎症や繊維化を引き起こし、患者 QOL を低下させる。そのため、がん特異的に放射線抵抗性を改善し、放射線増感効果をえられる薬剤があれば、患者 QOL を維持しつつ、効率よくがん細胞を殺滅することが可能となる。現在、そのような薬剤は無いが、申請者が着目しているアデノシン受容体阻害薬は、放射線抵抗性や転移能獲得といったがん細胞の高悪性度プロファイルをがん選択的に改善する画期的な薬剤となる可能性を秘めている。

また、放射線治療後のがんの寛解には腫瘍免疫の寄与が必須であるが、申請者らは、以前に、A2B 受容体阻害薬が制御性 T 細胞分化を抑制し、腫瘍免疫を促進させることで、がん成長を抑制することも報告している[引用文献 3, 4]。そのため、A2B 受容体阻害薬は、放射線治療効果を増強するとともに、腫瘍免疫も増強することでがん治療効果を大きく向上させることが期待できる。

そこで、本研究では、アデノシン受容体を標的とし、放射線治療を効果的に向上させる初めての薬剤として研究を進め、将来的には、様々ながん種での放射線治療に応用できるグローバルスタンダードとし、化学療法、免疫療法との併用効果についても検討することで世界中のがん患者を救える薬剤の開発を目指す。

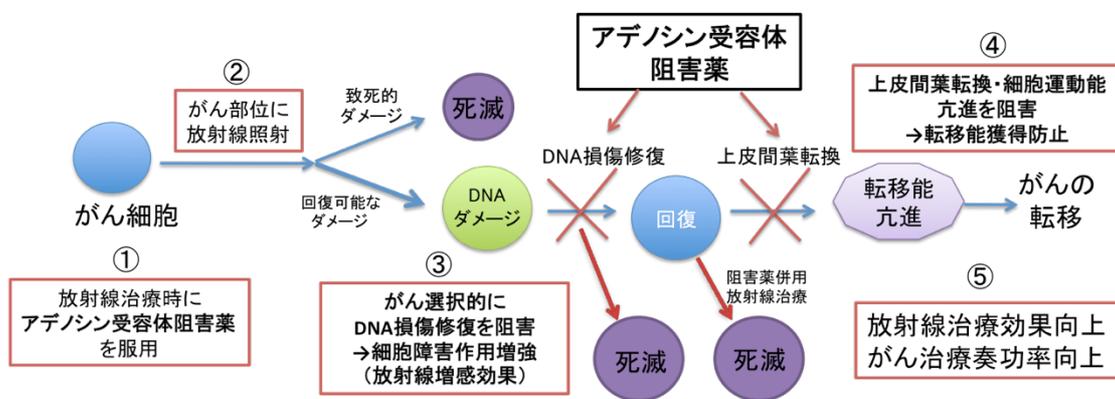


図2 アデノシン受容体阻害薬による放射線治療効果の向上(細胞障害作用増強と転移能獲得阻止)

3. 研究の方法

まず肺がん細胞におけるアデノシン受容体の役割を解明後、悪性黒色腫、神経膠芽腫に対しても応用し、アデノシン受容体阻害薬による放射線治療促進効果を明らかにした。放射線照射は、 γ 線照射装置 (^{137}Cs 線源 0.75 Gy/min) を用いた。

(1) 肺がん細胞の放射線抵抗性におけるアデノシン A2B 受容体の関与の解明

ヒト非小細胞肺がん細胞 A549、ヒト小細胞肺がん NCI-H446、ヒト未分化肺がん細胞 Calu-6、ヒト正常気道上皮細胞 Beas-2b を用い、DNA 損傷修復は ATM 活性化による γ H2AX focus 形成と 53BP1 集積を蛍光免疫染色法により、細胞増殖能変化はコロニー形成法により、上皮成長因子受容体 (EGFR) 活性化は Western blotting 法により、EGFR 核移行は蛍光免疫染色法により解析し、アデノシン受容体の関与は、アデノシン受容体阻害薬および siRNA による A2B 受容体のノックダウンにより解析した。

(2) 悪性黒色腫に対するアデノシン A2B 受容体阻害薬の放射線増感効果の解明

マウス悪性黒色腫 B16 細胞を用い、A2B 受容体阻害薬による DNA 損傷修復抑制効果と放射線細胞障害増強作用を蛍光免疫染色法 (γ H2AX focus 形成と 53BP1 集積) およびコロニー形成法で検討し、さらに B16 細胞を C57BL/6 マウスに移植した担がんマウスに A2B 受容体阻害薬投与と γ 線照射を行い、腫瘍成長の違いを解析することで A2B 受容体阻害薬による放射線治療促進効果を解析した。

(3) 神経膠芽腫の放射線抵抗性および細胞運動能獲得への A2B 受容体の関与の解明

ヒト神経膠芽腫 A172 細胞を用い、放射線抵抗性および細胞運動能獲得への A2B 受容体およびアデノシン生成酵素 CD73 の関与を検討した。DNA 損傷修復能は蛍光免疫染色法により、細胞増殖能は MTT assay により解析した。また細胞骨格形成を Rhodamine phalloidin 染色により、細胞遊走能は Transwell[®] assay により解析した。

(4) 気道上皮細胞の放射線細胞障害に対するヌクレオチド・ヌクレオシドの作用の解明

気道上皮細胞 Beas-2b に様々なヌクレオチド・ヌクレオチドを処置し、放射線細胞障害および DNA 損傷修復への影響をコロニー形成法および蛍光免疫染色法により検討した。細胞内シグナル変化については Western blotting 法により解析した。

4. 研究成果

(1) 肺がん細胞の放射線抵抗性におけるアデノシン A2B 受容体の関与の解明

肺がん細胞において γ 線照射およびアデノシン処置により EGFR の核移行が認められた。これらの EGFR 核移行はアデノシン受容体阻害薬により抑制され、特に A2B 受容体阻害薬により強く抑制された。A2B 受容体は気道上皮細胞に比べ肺がん細胞で発現が高く、A2B 受容体阻害薬による EGFR 核移行抑制効果は気道上皮細胞では認められず、肺がん細胞においてのみ認められ、肺がん細胞での EGFR 核移行は A2B 受容体ノックダウンによっても抑制された。また src や EGFR の活性化も A2B 受容体の阻害薬およびノックダウンにより抑制された。さらに A2B 受容体の阻害薬およびノックダウンは、肺がん細胞においてのみ DNA 損傷修復を抑制し、放射線細胞障害を増強した。これらの結果より、アデノシン A2B 受容体が EGFR 活性化（核移行）と DNA 損傷修復に関与し、肺がん細胞特異的な放射線抵抗性の一因となっていることを明らかにした。

なお、本研究成果は論文 1 に掲載済みである。

(2) 悪性黒色腫に対するアデノシン A2B 受容体阻害薬の放射線増感効果の解明

肺がん細胞と同様、アデノシン A2B 受容体の阻害薬およびノックダウンは、放射線抵抗性の高い悪性黒色腫においても DNA 損傷修復を抑制し、放射線細胞障害を増強した。さらに悪性黒色腫を移植した担がんマウスを用い、 γ 線照射と A2B 受容体阻害薬との併用効果を検討したところ、 γ 線照射と A2B 受容体阻害薬投与を併用することで腫瘍成長をより強く抑制できることを明らかにした。これらの結果から、A2B 受容体阻害薬による放射線増感効果を *in vitro* および *in vivo* において解明した。

なお、本研究成果は論文 2 に掲載済みである。

(3) 神経膠芽腫の放射線抵抗性および細胞運動能獲得への A2B 受容体の関与の解明

さらに神経膠芽腫において放射線細胞応答における A2B 受容体の役割を検討した結果、A2B 受容体の阻害薬およびノックダウンによって DNA 損傷修復が抑制され、放射線細胞障害が増強した。さらに細胞外アデノシン生成酵素 CD73 の阻害薬およびノックダウンによっても同様の現象が認められた。これらの結果より、神経膠芽腫の放射線抵抗性にも細胞外アデノシンによる A2B 受容体活性化が関与することを明らかにした。

また γ 線照射によって神経膠芽腫は細胞骨格が形成され、細胞遊走能が亢進した。これらの現象は A2B 受容体および CD73 のノックダウンにより抑制されたことから、放射線照射による細胞骨格形成および細胞遊走能獲得に細胞外アデノシンによる A2B 受容体活性化が関与することを明らかにした。

なお、本研究成果は論文 3 に掲載済みである。

(4) 気道上皮細胞の放射線細胞障害に対するヌクレオチド・ヌクレオシドの作用の解明

気道上皮細胞に様々なヌクレオチド・ヌクレオチドを添加し、 γ 線照射後の DNA 損傷修復および細胞障害度の変化を検討した結果、ATP や ADP は DNA 損傷修復を促進させ、放射線細胞障害を減弱させることを明らかにした。ATP の効果は P2X7 受容体活性化を介しており、ADP の効果は P2Y12 受容体活性化を介していることを明らかにした。さらに ATP や ADP による効果の分子メカニズムとして、MKP1/3 の発現抑制を介した ERK1/2 活性化促進が寄与することを明らかにした。これらの結果から ATP や ADP は P2 受容体活性化を介して気道上皮細胞の放射線障害を軽減できることを明らかにした。

なお、本研究成果は論文 4 に掲載済みである。

(5) まとめ

本研究では、肺がん細胞、悪性黒色腫、神経膠芽腫細胞の放射線抵抗性に A2B 受容体が関与し、担がんマウスに A2B 受容体阻害薬を投与し放射線照射することで放射線治療効果が増強されること、また神経膠芽腫細胞の放射線による細胞運動能亢進に A2B 受容体が関与することを明らかにした。このようにがん細胞の放射線抵抗性や高悪性度プロファイルの獲得に A2B 受容体が関与することを一連の研究により解明した（図 3A 参照）。一方、正常気道上皮細胞では、ATP や ADP を処置することにより、P2X7 受容体や P2Y12 受容体活性化を介して放射線細胞障害を減弱できることを明らかにした（図 3B 参照）。なお、この正常細胞での P2 受容体と介した放射線障害減弱効果については、当初予期していなかったものであるが、本研究の過程で新たに解明された研究成果である。

本研究は、放射線抵抗性や遊走能獲得における細胞外アデノシンとアデノシン A2B 受容体の役割を初めて明らかにしたものであり、学術的に大変重要な研究成果である。また本研究

成果より、放射線治療時に A2B 受容体阻害薬を併用することで放射線抵抗性および高悪性度プロファイルの獲得を防止し、放射線治療の奏功率向上に繋がることが期待される。今後、さらに、がん細胞選択的な放射線増感効果と正常細胞での放射線防護効果を実現する新たな放射線治療戦略の確立も目指していく予定である。

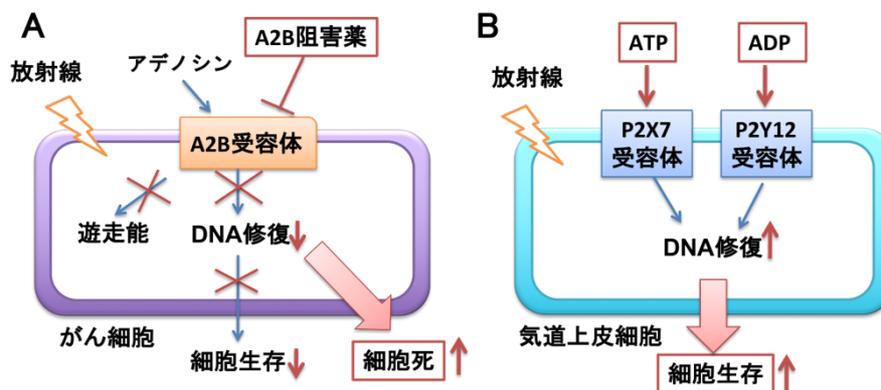


図3 本研究で解明された放射線細胞応答におけるプリン受容体の役割

(A) がん細胞でのA2B受容体阻害薬による放射線細胞障害作用の増強

(B) 気道上皮細胞でのATP・ADPによるP2X7/P2Y12受容体を介した放射線細胞障害の軽減

引用文献

1. M. Tsukimoto, Purinergic signaling is a novel mechanism of the cellular response to ionizing radiation. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 38(7) (2015) 1-9 (総説)
2. K. Tanamachi, K. Nishino, N. Mori, T. Suzuki, SI. Tanuma, R. Abe, M. Tsukimoto Radiosensitizing effect of P2X7 receptor antagonist on melanoma *in vitro* and *in vivo*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 40(6) (2017) 878-887
3. H. Nakatsukasa, M. Tsukimoto, H. Harada, S. Kojima, Adenosine A(2B) receptor antagonist suppresses differentiation to regulatory T cells without suppressing activation of T cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 409(1) (2011) 114-119
4. W. Kaji, S. Tanaka, M. Tsukimoto, S. Kojima, Adenosine A_{2B} receptor antagonist PSB603 suppresses tumor growth and metastasis by inhibiting induction of regulatory T cells, *The Journal of Toxicological Sciences* 39(2) (2014) 191-8

論文 (掲載済)

1. K. Kitabatake, E. Yoshida, T. Kaji, M. Tsukimoto*, Involvement of adenosine A2B receptor in radiation-induced translocation of epidermal growth factor receptor and DNA damage response leading to radioresistance in human lung cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta—General subject* 864(1) (2020) 129457
2. Y. Tanaka, K. Kitabatake, R. Abe, M. Tsukimoto*, Involvement of A2B receptor in DNA damage response and radiosensitizing effect of A2B receptor antagonists on mouse B16 melanoma. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 43(3) (2020) 516-25
3. K. Kitabatake, T. Kaji, M. Tsukimoto*, Involvement of CD73 and A2B receptor in radiation-induced DNA damage response and cell migration in human glioblastoma A172 cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 44(2) (2021) 197-210
4. K. Kitabatake, T. Kaji, M. Tsukimoto*, ATP and ADP enhance DNA damage repair in γ -irradiated BEAS-2B human bronchial epithelial cells through activation of P2X7 and P2Y12 receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology* 407 (2020) 115240

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kitabatake Kazuki, Kaji Toshiyuki, Tsukimoto Mitsutoshi	4. 巻 407
2. 論文標題 ATP and ADP enhance DNA damage repair in γ -irradiated BEAS-2B human bronchial epithelial cells through activation of P2X7 and P2Y12 receptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 115240 ~ 115240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.taap.2020.115240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kitabatake Kazuki, Kaji Toshiyuki, Tsukimoto Mitsutoshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Involvement of CD73 and A2B Receptor in Radiation-Induced DNA Damage Response and Cell Migration in Human Glioblastoma A172 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 197 ~ 210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00654	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kitabatake Kazuki, Yoshida Eiko, Kaji Toshiyuki, Tsukimoto Mitsutoshi	4. 巻 1864
2. 論文標題 Involvement of adenosine A2B receptor in radiation-induced translocation of epidermal growth factor receptor and DNA damage response leading to radioresistance in human lung cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129457 ~ 129457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2019.129457	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Yuta, Kitabatake Kazuki, Abe Ryo, Tsukimoto Mitsutoshi	4. 巻 43
2. 論文標題 Involvement of A2B Receptor in DNA Damage Response and Radiosensitizing Effect of A2B Receptor Antagonists on Mouse B16 Melanoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 516 ~ 525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00976	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 關紘夢、北嶋和己、月本光俊
2. 発表標題 ヒト神経膠芽腫細胞における放射線抵抗性と運動能亢進へのプリン受容体の役割
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北嶋和己、鍛冶利幸、月本光俊
2. 発表標題 神経膠芽腫細胞における 線照射誘導DNA損傷応答へのCD73とA2B受容体の関与
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北嶋和己、鍛冶利幸、月本光俊
2. 発表標題 神経膠芽腫細胞におけるCD73-A2B 受容体を介した放射線抵抗性と放射線誘導の細胞遊走
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北嶋 和己, 鍛冶 利幸, 月本 光俊
2. 発表標題 神経膠芽腫における 線誘導の DNA 損傷応答および細胞遊走亢進への細胞外アデノシンとアデノシン受容体の関与
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北畠 和己、田中 悠太、吉田 映子、鍛冶 利幸、月本 光俊
2. 発表標題 肺がん細胞および悪性黒色腫の放射線抵抗性へのアデノシンA2B受容体の関与
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北畠 和己、鍛冶 利幸、月本 光俊
2. 発表標題 プリン受容体活性化による気道上皮細胞の放射線ダメージ修復促進効果
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野澤 壮平、椎名 佳奈美、北畠 和己、月本 光俊
2. 発表標題 線照射による肺がん細胞の遊走能亢進における細胞外アデノシン生成酵素CD73およびアデノシン受容体の役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中悠太、北畠和己、月本光俊
2. 発表標題 マウス悪性黒色腫の放射線抵抗性におけるアデノシンA2B受容体の関与
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北畠和己、鍛冶利幸、月本光俊
2. 発表標題 プリンヌクレオチドによる放射線防護効果
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北畠和己、鍛冶利幸、月本光俊
2. 発表標題 プリンヌクレオチドによる放射線防護効果
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

月本研究室 研究内容 https://www.tus.ac.jp/fac_grad/p/intro.php?4d1d

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------