

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659748

研究課題名(和文) 抗癌剤の5-HT3受容体サブユニットへの直接作用の解析

研究課題名(英文) Effect of anticancer drugs on 5-HT3 receptor subunits

研究代表者

島田 昌一 (SHIMADA, Shoichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20216063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：がんの化学療法の副作用として悪心・嘔吐が存在する。クロム親和性細胞のセロトニンが迷走神経の5-HT3受容体を刺激し嘔吐中枢が活性化するためである。我々は、抗癌剤の中に5-HT3受容体に直接作用するものを複数見つけた。特にトポテカン は、5-HT3A受容体に対しては抑制的に働くが、逆に5-HT3AB受容体に対しては反応を増強させた。さらに、5-HT3B受容体にはY129Sの遺伝子多型が存在するが、この多型によってトポテカンに対する5-HT3受容体の感受性も変化することが分かった。これらの結果は副作用の少ない抗癌剤の開発や、副作用の個人差にヒトの遺伝的背景が関与する可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)： The 5-hydroxytryptamine (serotonin) type 3 (5-HT3) receptor belongs to the superfamily of Cys-loop ligand-gated ion channels, and can be either homopentameric (5-HT3A) or heteropentameric (5-HT3AB) receptor. We showed that the anticancer drug, topotecan, bidirectionally modulates the 5-HT3 receptor using a voltage clamp technique. Topotecan inhibited 5-HT-gated current through homomeric 5-HT3A receptors. On the other hand, additional expression of the 5-HT3B subunit changed the response to topotecan from an inhibitory to a potentiatory one. Furthermore, the effect was reduced in the receptors containing the 5-HT3B (Y129S) polymorphic variant. These findings could explain individual differences in the sensitivity to topotecan-induced nausea and vomiting.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、耳鼻咽喉科学

キーワード：化学療法 5-HT3受容体 抗がん剤 セロトニン

1. 研究開始当初の背景

頭頸部腫瘍において、化学療法・放射線治療同時併用療法、導入化学療法、治療後の維持化学療法など、様々な状況で抗がん剤が用いられるが、副作用として激しい嘔吐を引き起こすことが問題になる。抗がん剤が嘔吐を引き起こすメカニズムとして、抗がん剤の投与が腸クロム親和性細胞よりセロトニンの分泌を促し、迷走神経の 5-HT3 受容体が活性化することによって、最終的に嘔吐中枢を刺激する。しかし抗がん剤の種類により、催嘔吐作用の度合いも異なるがその詳しいメカニズムはわかっていない。5-HT3 受容体のアンタゴニストのオンダンセトロンやグラニセトロンは制吐剤として使用されているが、我々は最近、抗がん剤の中に、直接 5-HT3 受容体の応答を増強するタイプや抑制するタイプのものが存在することを見いだした。

2. 研究の目的

(1) 抗がん剤が 5-HT3 受容体のそれぞれのサブユニットに与える影響

我々の予備実験で 5-HT3 受容体はサブユニット構成によって抗がん剤の感受性が大きく変化するものが存在することを見いだした。そこで本研究では 5-HT3 受容体サブユニットの構成の違いによる抗がん剤の影響を明らかにする事を目的とする。

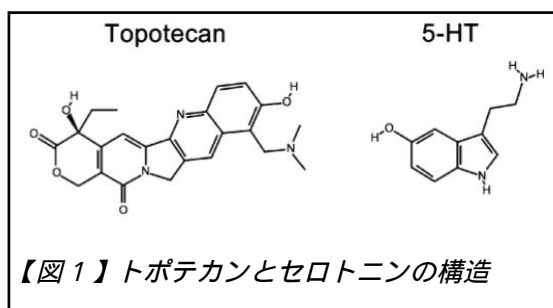
(2) 5-HT3 受容体遺伝子多型と抗がん剤の 5-HT3 受容体に対する感受性の違い

抗がん剤による悪心・嘔吐の副作用には個人差があるが、一方 5-HT3 受容体には遺伝子多型が存在するので、この遺伝子多型による 5-HT3 受容体の cSNP と抗癌剤の感受性の違いについて明らかにする。

3. 研究の方法

ヒトの 5-HT3A 受容体と 5-HT3B 受容体の cDNA から、5' 端にキャッピングを行った cRNA を in vitro transcription により作成する。この cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に微量注入し、1, 2 日後に 2 電極膜電位固定法により、電気生理学的に 5-HT3 受容体の特性を解析した。トポテカンとセロトニンの構造を図 1 に示す。

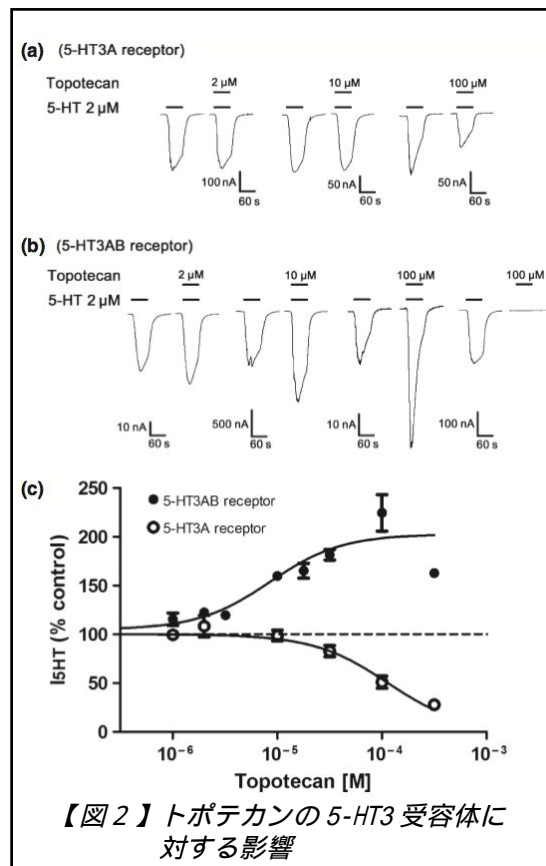
また、5-HT3B 受容体の cDNA から、Y129S の変異クローンを site-direct mutagenesis 法で作成した。



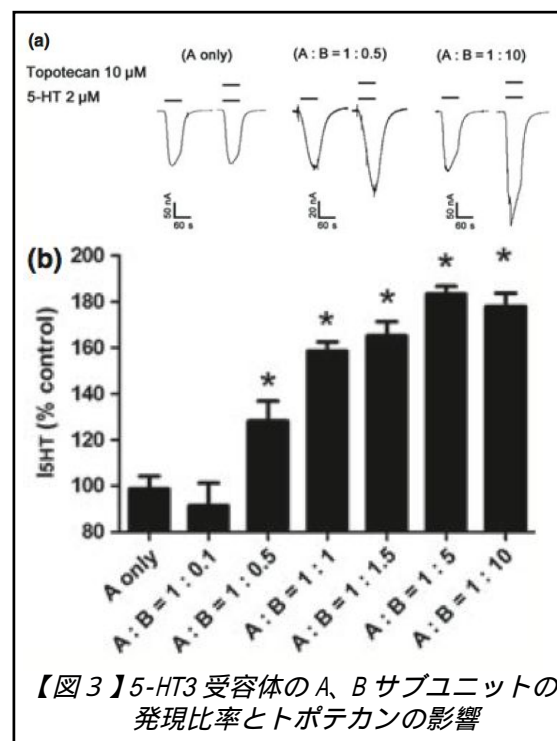
4. 研究成果

5-HT3 受容体受容体には主に 5-HT3A と

5-HT3B の 2 つのサブユニットが存在し、5 量体を構築することによって、セロトニンで開口する陽イオンチャネルを形成している。



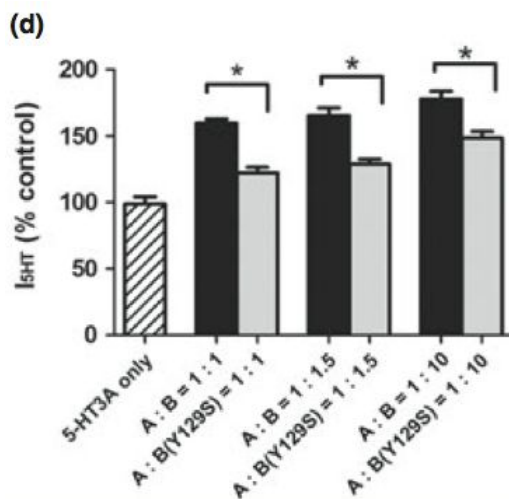
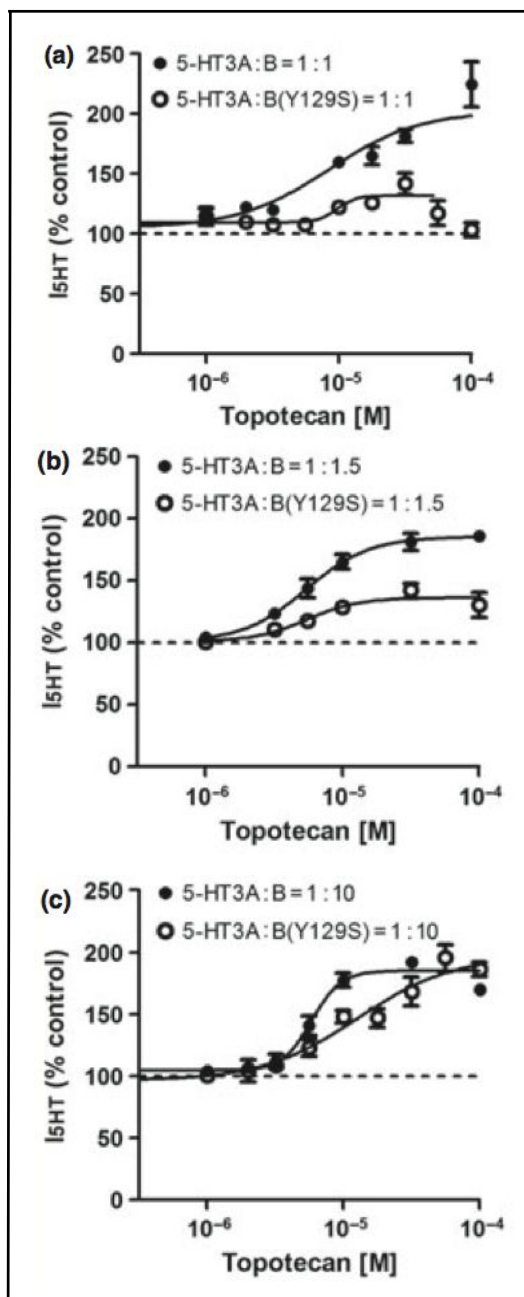
抗がん剤のトポテカン単独では、5-HT3 受容体を活性化しないが、2 μM のセロトニンが引き起こす 5-HT3A ホモマーの受容体のイオンチャネル電流をトポテカンは濃度依存的に抑制した (図 2 a)。



一方、5-HT3AB のヘテロマーの受容体に対しては、2 μ M のセロトニンが惹起する電流をトポテカンに逆に濃度依存的に増強した (図 2 b)。このようなトポテカンの 5-HT3 受容体のホモマーとヘテロマーに対する真逆の効果を図 2 c に示す。

5-HT3A ホモマー受容体に対するトポテカンの IC₅₀ は 114.1 μ M (pIC₅₀ = 3.9 \pm 0.1) であった。一方、5-HT3AB のヘテロマー受容体に対するトポテカンの EC₅₀ は 8.5 μ M (pEC₅₀ = 5.1 \pm 0.1) であった。

また、5-HT3AB のヘテロマー受容体電流に対するトポテカンの増強効果は 5-HT3A サブユニットと 5-HT3B サブユニットの発現比率に依存することが分かった。図 3 a, b は、5-HT3A サブユニットと 5-HT3B サブユニットの cRNA を異なる比率であるアフリカツメガエル卵母細胞に注入後、セロトニン 2 μ M によって惹起される電流に対するトポテカン



【図 4】5-HT3B 受容体 Y129S の変異によるトポテカン感受性の変化

の効果を解析したものだが、5-HT3B サブユニットの発現比率が増加するに従って、トポテカンの増強効果も上昇し、A サブユニットと B サブユニットの比率が 1:1.5 に達したときにほぼプラトーとなった (図 3 b)。

Subunit combination	EC ₅₀ (μ M)	pEC ₅₀ (μ M)	I _{max} (%)	Hill-coefficient
5-HT3A : B = 1 : 1	8.5	5.1 \pm 0.1	202.7 \pm 9.5	1.3 \pm 0.4
5-HT3A : B(Y129S) = 1 : 1	9.7	5.0 \pm 0.1	132.0 \pm 4.6	6.0 \pm 16.6
5-HT3A : B = 1 : 1.5	5.4	5.3 \pm 0.1	185.4 \pm 5.5	1.9 \pm 0.6
5-HT3A : B(Y129S) = 1 : 1.5	5.5	5.3 \pm 0.1	136.3 \pm 4.4	2.3 \pm 1.5
5-HT3A : B = 1 : 10	5.9	5.2 \pm 0.03	185.4 \pm 3.3	1.9 \pm 0.6
5-HT3A : B(Y129S) = 1 : 10	12.8	4.9 \pm 0.1	197.8 \pm 11.9	2.3 \pm 1.5

【表 1】5-HT3A 受容体と 5-HT3B 受容体の発現比率、5-HT3A 受容体と 5-HT3B(Y129S)受容体の発現比率とトポテカンの 5-HT3 受容体電流増強効果との関係

ヒト 5-HT3B 受容体には 1 2 9 番目のチロシン残基がセリン残基に変異する Y129S の遺伝子多型が存在する。トポテカンの Y129S に対する影響を調べるために、図 4 の様に、5-HT3B 受容体の Y129S の変異を作成し、アフリカツメガエル卵母細胞発現系で解析した。図 4 a は 5-HT3A 受容体と 5-HT3B 受容体の cRNA を 1 : 1 の比率でアフリカツメガエル卵母細胞に注入した。図 4 b は 1:1.5 の比率で、図 4 c は 1:10 の比率で cRNA を注入した。いずれの比率で注入した場合でも、5-HT3AB 受容体にみられるトポテカンによる応答増強作用は、5-HT3B サブユニットを Y129S に変えると、減弱した (図 4 d、表 1)。

本研究で、抗がん剤のトポテカンが 5-HT3 受容体の構成サブユニット依存的に、受容体のチャネル電流を増強したり、抑制したりすることが明らかにした。以前に tracazolol が GABAA 受容体に対して、サブユニットが存在するかないかで、増強的に作用したり、抑制的に作用することが報告されているが、この様に 1 つの受容体に対して阻害と増強

効果の両方向性に作用する薬剤が存在することは非常に希であり、そのメカニズムは興味深いので今後の解析が必要である。

5-HT3B 受容体には、Y129S の遺伝子多型が存在するが、129 番目のアミノ酸残基がセリンの患者はチロシンの患者に比べて、抗うつ薬のパロキセチンによる吐き気の副作用がより少ないことが報告されている。本研究では、5-HT3B 受容体の Y129S の変異で、トポテカンの 5-HT3 受容体の増強作用が減弱したことから、トポテカンの抗がん剤としての副作用の悪心や嘔吐に対する感受性の個人差にも Y129S の遺伝子多型が関与している可能性が考えられた。

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)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Takimoto Y, Ishida Y, Nakamura Y, Kamakura T, Yamada T, Kondo M, Kitahara T, Uno A, Imai T, Horii A, Okazaki S, Nishiike S, Inohara H, Shimada S. 5-HT(3) receptor expression in the mouse vestibular ganglion. Brain Res. 2014,1557:74-82.

Kondo M, Nakamura Y, Ishida Y, Yamada T, Shimada S. The 5-HT3A receptor is essential for fear extinction. Learn Mem. 2014,21(1):1-4.

Nakamura Y, Ishida Y, Yamada T, Kondo M, Shimada S. Subunit-dependent inhibition and potentiation of 5-HT3 receptor by the anticancer drug, topotecan. J Neurochem. 2013,125(1):7-15.

〔学会発表〕(計 4 件)

中村雪子、石田雄介、近藤 誠、島田昌一
抗癌剤による 5-HT3 受容体への直接作用第
119 回日本解剖学会総会全国学術集会 2014
年 03 月 27 日～29 日栃木

Yukiko Nakamura, Yusuke Ishida, Makoto Kondo, Shoichi Shimada. Direct modification of 5-HT3 receptor by anti-cancer drugs. 第 56 回日本神経科学学会大会 2013 年 06 月 20 日～23 日京都

中村雪子、石田雄介、山田貴博、近藤誠、島田昌一
抗癌剤トポテカンによるセロトニン 3 受容体のサブユニットに依存した応答調節 第 118 回日本解剖学会総会 2013 年 03 月 28 日～30 日 香川県高松市かがわ国際会議場

Y. Nakamura, Y. Ishida, T. Yamada, M. Kondo, S. Shimada, Subunit-dependent inhibition and potentiation of 5-HT3

receptor by the anticancer drug, topotecan. The 11th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry / 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry 2012 年 09 月 29 日～10 月 2 日 Kobe, Japan

〔図書〕
該当無し

〔産業財産権〕
該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 昌一 (SHIMADA, Shoichi)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20216063

(2) 研究分担者

石田 雄介 (ISHIDA, Yusuke)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30381809

中村 雪子 (NAKAMURA, Yukiko)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90548083

山田 貴博 (YAMADA, Takahiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40601597