

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870874

研究課題名(和文)膵臓がんにおけるATPシグナリングの網羅的解析による新規分子標的の探索

研究課題名(英文)Exploration of ATP signaling molecules involved in progression of pancreatic cancer

研究代表者

高井 英里奈(Takai, Erina)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：90723891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外ATPを介した情報伝達はP2受容体の活性化を介して幅広い生理機能に關与している。様々ながん細胞においてもATPシグナリング分子の発現が認められ、がん悪性化との關連があると考えられているが、その詳細は不明であった。本研究では、難治がんである膵臓がんを対象に、がん悪性化におけるATPシグナリングの重要性について検討を行い、がん転移にP2受容体サブタイプのひとつであるP2X7受容体などが關与する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Extracellular nucleotides, such as ATP, play roles in various physiological and pathological processes through activation of P2 receptors. Although many cancer cells express ATP signaling molecules, their involvement in cancer progression has not been fully understood. In this study, we investigated importance of ATP signaling in pancreatic cancer progression and proposed that ATP signaling molecules including P2X7 could play a role in metastasis of pancreatic cancer.

研究分野：腫瘍学

キーワード：膵臓がん ATPシグナリング 転移

1. 研究開始当初の背景

生体内エネルギー供与体として広く知られるアデノシン 3 リン酸 (adenosine triphosphate; ATP) は、様々な刺激に応じて ATP 含有小胞の開口放出や陰イオンチャネルなどを介して細胞から放出され、細胞外 ATP は細胞膜上に発現する P2 受容体 (イオンチャネル型 P2X1-7 および G タンパク共役型 P2Y1-14) の活性化を介して細胞増殖や分化など様々な生理作用を発現することが知られている (ATP シグナリング)。がん微小環境中にも ATP が大量に放出されることが報告されており、細胞外 ATP によるシグナル伝達ががん細胞の増殖や転移に関与している可能性が示唆されている。

研究代表者はこれまでに、多くのがんで転移に重要なサイトカインとして知られる TGF- β 1 による肺がん細胞の転移能亢進において、がん細胞自身からの ATP 開口放出と P2X7 受容体の活性化が関与することを明らかにしている。さらに研究代表者は肺がん細胞では正常細胞と比較して P2X7 受容体の発現が高く、特に転移能の高い細胞においてはその発現が亢進していること、また転移能の高いがん細胞からは恒常的に ATP が放出されていることを見出した。これらの知見より、がんの転移においては P2X7 受容体を介したシグナル経路が重要であり、転移能獲得に伴う P2X7 受容体の発現上昇など、がん悪性化過程で ATP シグナリング関連分子の発現量が増加している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では多くの患者で転移が認められ予後が極めて不良ながん種として知られる膵臓がんを対象に、がんの悪性化、特に転移における ATP シグナリングの重要性を明らかにし、新規治療標的や予後予測に有益なバイオマーカーとなり得る分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では主に以下の方法を用いて検討を行なった。

(1) 各種ヒト膵臓がん細胞株における ATP シグナリング関連遺伝子発現解析

各種ヒト膵臓がん細胞株から total RNA を抽出し、cDNA を作製した。それらを用い、P2 受容体サブタイプ (P2X1-7, P2Y1,2,4,6, 11-14) および細胞からの ATP 放出に関わる分子 (vesicular nucleotide transporter; SLC17A9, パネキシン/コネキシン, CFTR, VDAC-1)、細胞外 ATP 分解酵素 (CD39, CD73, ALP) に特異的なプライマーを用いて、それぞれの mRNA 発現レベルをデジタル PCR および realtime RT-PCR を用いて解析した。

(2) 膵臓がん細胞の転移能評価

細胞の運動性については、創傷治癒の原理による migration assay と transwell を用いた方法で検討を行なった。創傷治癒の原理による migration assay においては、細胞ダメージによる ATP 放出を最小限に抑えるため、従来のスクラッチで創傷を作製する方法ではなく、culture insert を用いた。

また、細胞の浸潤能についてもマトリゲルを用いて transwell での検討を行なった。

(3) アクチン細胞骨格の観察

細胞運動には細胞骨格が直接的に関与することから、蛍光染色法により膵臓がん細胞株の細胞骨格の観察を行なった。ローダミン標識ファロイジンを用いて F-アクチンを染色して共焦点顕微鏡で観察を行い、細胞骨格の様子と細胞の形態を検討した。

(4) 膵臓がん組織における P2X7 受容体タンパク発現レベルの評価

免疫組織化学染色により、膵臓がん組織検体を対象として P2X7 受容体タンパクの検出を行い、その発現レベルの評価を行なった。

4. 研究成果

ヒト膵臓がん細胞株を用いて、膵臓がんにおける ATP シグナリング関連分子発現プロファイルの検討を行った。まず主要なヒト膵臓がん細胞株における全 P2 受容体サブタイプ、ATP 放出関連分子および細胞外 ATP 分解酵素の mRNA 発現レベルをデジタル PCR および real-time RT-PCR を用いて検討したところ、細胞株により各分子の発現量に大きな差が認められた。各分子の発現パターンは様々であり、これは各細胞株における遺伝子変異や細胞の分化度の違いによるものである可能性が考えられた。さらに、研究代表者による報告を含め、これまでに様々ながん細胞においてがん促進的な働きが報告されている P2X7 受容体についてより詳細に検討した結果、細胞株によって P2X7 受容体アイソフォーム（スプライスバリエント）の発現パターンにも違いが認められた。

また、がん細胞の転移能を評価するため、創傷治癒の原理による migration assay や transwell を用いた migration assay および invasion assay、さらにローダミンファロイジン蛍光染色によるアクチン細胞骨格の観察を行い、がん転移に対する P2X7 受容体阻害の影響を検討した。また、多数の症例の手術検体および生検材料を対象に、免疫組織化学染色を用いて膵臓がん組織における P2X7 受容体タンパク発現レベルの評価を行い、臨床像と照らし合わせることで、膵臓がん悪性化における P2X7 受容体の関与について検討を行なった。

これらの検討から、一部の膵臓がんにおいては、P2X7 受容体の活性化などを介した ATP シグナリングが転移にも関与している可能性が示唆された。

研究代表者のグループによる肺がん細胞を用いた報告を含め、これまでもいくつかのがん種においてがん進展における P2X7 受容体の関与などが示唆されているが、特に予

後不良ながんのひとつとして知られる膵臓がんにおいても、転移などのがん悪性化に ATP シグナリングが重要な役割を担っている可能性が考えられる。

また細胞外 ATP はがん間質に存在する細胞にも作用し、がん微小環境形成にも重要な役割を果たしている可能性があるが、この点についてもこれまでほとんど明らかとされていない。がん転移に重要であるがん間質細胞における ATP シグナリングの役割などについても解析を進めることで、がんにおける ATP シグナリングの関与の全体像を捉え、新たながん治療法の開発に繋がる知見が数多く得られると考えている。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Akihiro Ohmoto, Shinichi Yachida, Emi Kubo, Erina Takai, Masami Suzuki, Kazuaki Shimada, Takuji Okusaka, Chigusa Morizane
Clinicopathologic Features and Germline Sequence Variants in Young Patients (≤40 Years Old) With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*. in press. 査読有 DOI: 10.1097/MPA.0000000000000574
2. Erina Takai, Yasushi Totoki, Hiromi Nakamura, Chigusa Morizane, Satoshi Nara, Natsuko Hama, Masami Suzuki, Eisaku Furukawa, Mamoru Kato, Hideyuki Hayashi, Takashi Kohno, Hideki Ueno, Kazuaki Shimada, Takuji Okusaka, Hitoshi Nakagama, Tatsuhiko Shibata, Shinichi Yachida
Clinical utility of circulating tumor

DNA for molecular assessment in pancreatic cancer.

Scientific Reports. 5:18425. 2015. 査読有 DOI: 10.1038/srep18425

3. Erina Takai, Shinichi Yachida

Genomic alterations in pancreatic cancer and their relevance to therapy.

World Journal of Gastrointestinal Oncology. 7(10): 250-258. 2015. 査読有 DOI: 10.4251/wjgo.v7.i10.250

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nccri.ncc.go.jp/s009/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高井 英里奈 (TAKAI, Erina)

国立がん研究センター研究所・特任研究員

研究者番号：90723891

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし