

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20985

研究課題名（和文）血小板活性化因子受容体PAFRを介した抗癌剤に対する新規効果増強療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel efficacy-enhancing therapy for anticancer drugs via platelet activating factor receptor PAFR

研究代表者

小山 知芳 (Koyama, Tomoyoshi)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10741811

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞の外分泌因子の一つである、血小板活性化因子（PAF:Platelet activating factor）は癌の進展に重要な役割を果たすとされているが、詳細な研究は未だ報告されていない。本研究ではPAFとそのレセプターであるPAF受容体（PAFR:PAF receptor）のオート・クライン作用による癌の悪性循環のメカニズムを解明することを目的とした。口腔扁平上皮癌由来細胞株およびヒト口腔粘膜上皮角化細胞におけるPAFRの発現状態を確認した。さらにPAFR発現抑制株、およびPAFR阻害剤であるGinkgolide Bの併用においてCDDP感受性が増大することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌におけるCDDP感受性の調節にPAFRの関与が示唆された。さらにPAFR阻害剤であるGinkgolide Bの併用において、p-ERKおよびp-Aktの発現が抑制され化学療法抵抗性を克服し、CDDP治療の鍵となる可能性が考えられた。化学療法において、特にCDDPの副作用は大きな課題となっており、PAFRの阻害剤であるGinkgolide BがCDDP感受性を高めより低用量のCDDPで同等の効果をj得ることができれば、化学療法に有利に働くと考えられた。本研究にて今後Ginkgolide BがCDDP併用療法の新規治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Platelet activating factor (PAF), which is one of the exocrine factors of cells, is reported to affect an important role in the progression of cancer, however detailed studies have not yet been reported. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of the malignant cycle in cancer caused by the autocrine action of PAF and the PAF receptor (PAFR). We confirmed the expression status of PAFR in oral squamous cell carcinoma-derived cell lines and human oral mucosal epithelial keratinocytes. Furthermore, we found that CDDP sensitivity was increased when using PAFR expression suppressed strains and the PAFR inhibitor Ginkgolide B in combination.

研究分野：口腔癌

キーワード：OSCC PAFR Ginkgolide B

1 . 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌 , 以下 OSCC は頭頸部領域で見られる主要な癌の一つであり , 全癌の 3 % 約を占めている . OSCC 患者に対する化学療法は効果的な治療ではあるが , 抗癌剤に対する耐性の出現は治療効果を大きく阻害させることがわかっている . シスプラチン (CDDP) は広範囲の癌に使用されるプラチナ系抗癌剤であるが , 重篤な副作用と頻発する化学療法抵抗性のためにその臨床応用はしばしば制限され , 治療において問題となっている . 従って , CDDP の化学療法抵抗性獲得の分子メカニズムを理解することは , OSCC 患者の治療成績を向上させるために重要であり不可欠であると考えた .

2 . 研究の目的

PAF (Platelet Activating Factor) は好中球 , 内皮細胞 , 血小板 , マクロファージ , 単球など様々な細胞で合成される強力な炎症性リン脂質メディエーターであり , 血管新生 , 血栓症 , 発癌 , 転移などに関与している . また , PAFR (Platelet Activating Factor Receptor) は 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体であり , 白血球 , 血小板 , マクロファージ , 内皮細胞などさまざまな哺乳類の細胞膜に発現している . PAF は , 様々な種類の細胞で合成され , PAFR に非常に高い親和性で結合し , 細胞内シグナル伝達経路が活性化される . これにより PAFR を持つ細胞の生化学的メカニズムと機能的反応が開始され , 炎症プロセスが開始または増幅されるが , この PAF によって誘発される炎症過程は , 様々な癌の発生と進行に強く関与しているとの報告がある . また , 当講座では先行研究において , 口腔がんにおける PAF と PAFR の高発現を確認している .

近年 , 一部の抗癌剤において PAFR の発現が重要な役割を果たしているとの報告もあり , 癌微小環境における役割が目目されてきているがその詳細なメカニズムは未だに不明である . 本研究では , OSCC において PAFR の機能を介した CDDP 感受性を制御するメカニズムを解明することを目的とした .

3 . 研究の方法

(1) OSCC における PAFR の発現状況と CDDP 感受性

7 種の OSCC 細胞で PAFR 発現量を mRNA レベルおよびタンパク質レベルで定量化した . また , CDDP で 48 時間処理した後の細胞生存率を MTS assay にて評価し , それぞれの OSCC 細胞における IC50 の数値を算出した .

(2) PAFR 発現抑制株の作製

siRNA のトランスフェクションにより , PAFR 発現抑制株を作製し , PAFR 発現量を mRNA レベルおよびタンパク質レベルで定量化した .

(3) PAFR 発現抑制株における CDDP 感受性の変化

作製した PAFR 発現抑制株を用いて , CDDP 感受性の変化を細胞増殖試験 , フローサイトメトリーによるアポトーシス測定にて解析し , PAF/PAFR シグナル伝達経路の変化を immunoblotting 解析にて確認した .

(4) PAFR を選択的に阻害薬の検索

PAFR を選択的に阻害する薬を Ingenuity Pathway Analysis , 以下 IPA , にて検索した .

(5) PAFR を選択的に阻害薬 Ginkgolide B (GB) 投与株における CDDP 感受性の変化の確認

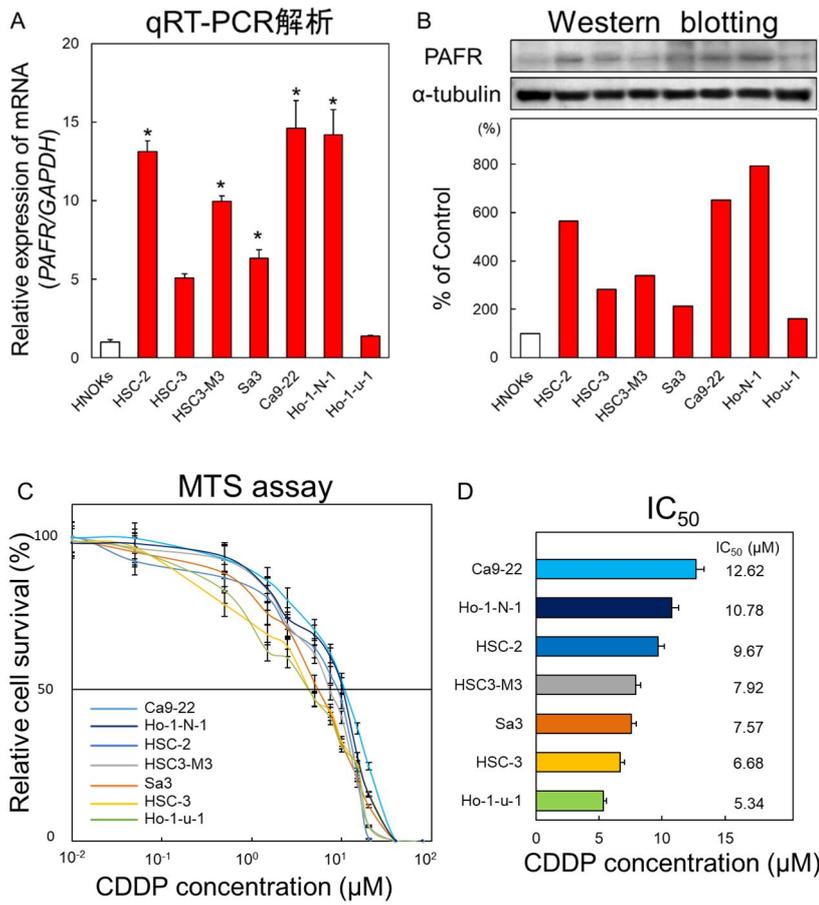
PAFR を選択的に阻害薬 Ginkgolide B (GB) 投与株における CDDP 感受性の変化について , 細胞増殖試験 , フローサイトメトリーによるアポトーシス測定にて解析し , PAF/PAFR シグナル伝達経路の変化を immunoblotting 解析にて確認した .

4 . 研究成果

(1) OSCC における PAFR の発現状況と CDDP 感受性

7 種の OSCC 細胞における PAFR mRNA レベルの発現量をリアルタイム PCR 法で定量化し , 6 つの OSCC 細胞株が , HNOKs と比較して有意に増加していた (図 1 A) . また , PAFR タンパク質発現を Western blotting にて解析し , OSCC 由来細胞株において Ca9-22 と Ho-1-N-1 で特に PAFR の発現亢進を認めたことを確認した (図 1 B) . OSCC における CDDP 感受性には , 7 種の OSCC 由来細胞株を CDDP で 48 時間処理した後の細胞生存率を MTS assay にて評価し OSCC 由来細胞株において Ca9-22 と Ho-1-N-1 の 2 株が最も CDDP 感受性が低かった (図 1 C , D) . すなわち , OSCC 細胞において PAFR の発現量が高いほど CDDP に対する感受性が低下するとが示唆された .

図 1

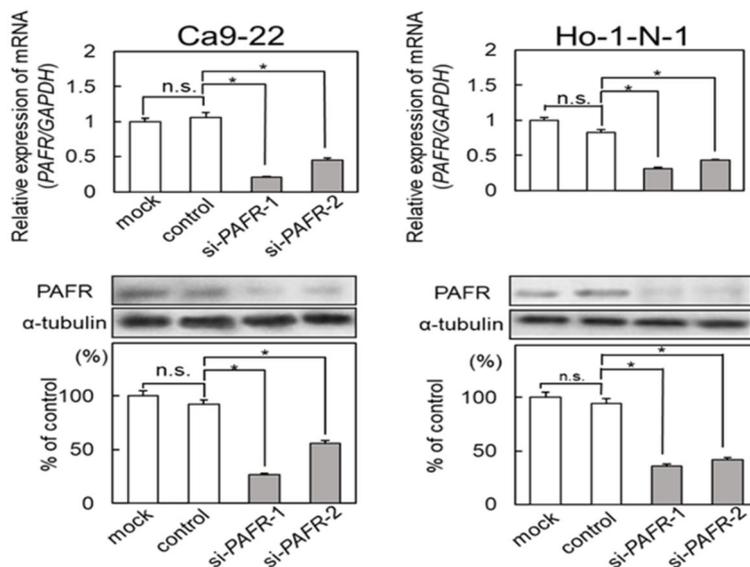


これらの結果ふまえて，Ca9-22 細胞と Ho-1-N-1 細胞の 2 株を選出し，この後の実験を行った．

(2) PAFR 発現抑制株の作製

Ca9-22 細胞および Ho-1-N-1 細胞に対して，siRNA を用いて PAFR 発現抑制株を作製した．両細胞株において mRNA およびタンパク質レベルで PAFR の発現減弱を認め導入を確認した (図 2)．

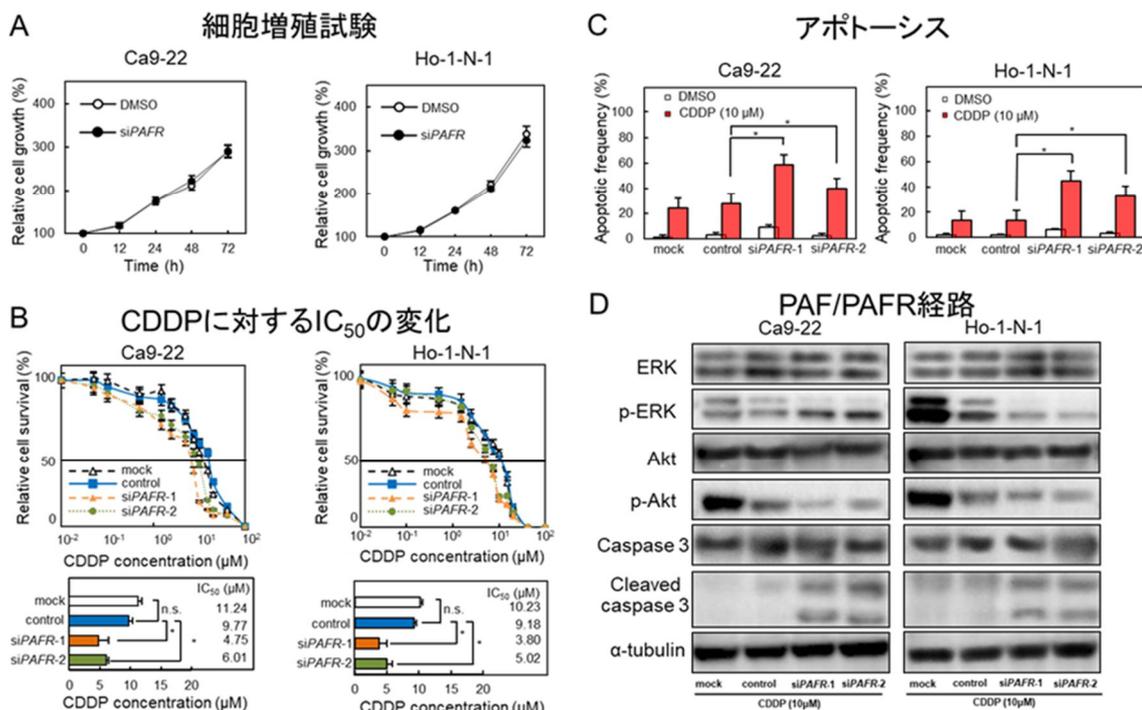
図 2



(3) PAFR 発現抑制株における CDDP 感受性の変化

si-PAFR 導入後の細胞増殖は、コントロールとの間に有意差は認めなかった (図 3 A)ため、PAFR 発現抑制は細胞増殖に影響を与えてないと考えた。次に、CDDP に対する IC₅₀ の変化について、MTS assay を行ったところ control と比較して si-PAFR 導入後の細胞において CDDP に対する IC₅₀ の減少を認めた (図 3 B)。さらに、フローサイトメトリーを行い早期アポトーシスの割合について解析し、control と比較して si-PAFR 導入後の細胞にてアポトーシスを起こした細胞の割合が高くなっていった (図 3 C)。また、PAF/PAFR シグナル伝達経路についてイムノプロットを行ったところ、si-PAFR 導入後の細胞にて ERK と Akt のリン酸化の減少およびアポトーシスマーカーである cleaved caspase 3 の増加を認めた (図 3 D)。これらの結果から、PAFR の発現を抑制し、OSCC 細胞における CDDP 感受性が高められると考えられた。

図 3



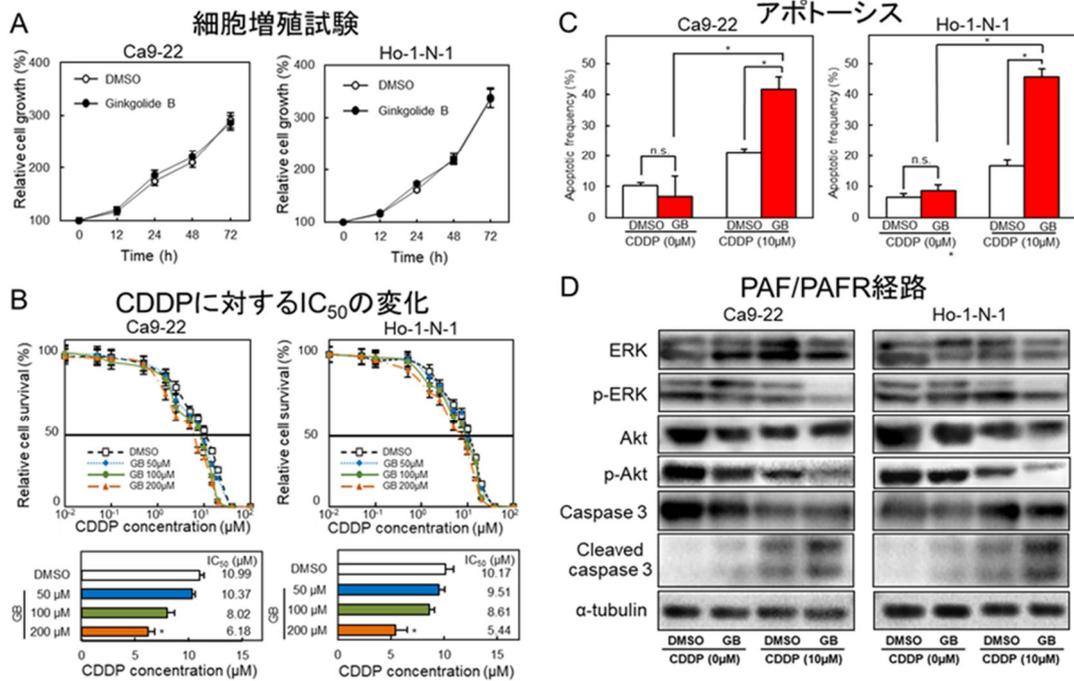
(4) PAFR を選択的に阻害薬の検索

IPA 検索にて PAFR の阻害剤である Ginkgolide B (以下 GB) を同定した。GB はイチヨウの葉や根の苦み成分として単離された天然成分で、現在までのところ、GB に直接起因する重篤な副作用は報告されていない。

(5) PAFR を選択的阻害薬 Ginkgolide B (GB) 投与株における CDDP 感受性の変化の確認

GB 投与後の細胞増殖について細胞増殖試験を行ったところ、control と GB 添加後の細胞において細胞増殖に有意な差は認めなかった(図 4 A)ことから、GB 単独では細胞増殖に影響を与えないと考えた。次に、CDDP に対する IC₅₀ の変化について MTS アッセイを行い、CDDP 単独投与した細胞株と比較して CDDP と GB を併用した細胞株において、CDDP に対する IC₅₀ の減少を濃度依存的に認めた(図 4 B)。さらに、フローサイトメトリーを行い早期アポトーシスの割合について解析したところ、CDDP 単独の細胞株と比較して CDDP と GB を併用した細胞株においてアポトーシスの割合が上昇した(図 4 C)。また、PAF/PAFR シグナル伝達経路についてイムノプロットを行ったところ、CDDP と GB を併用した細胞株にて ERK と Akt のリン酸化の減少およびアポトーシスマーカーである cleaved caspase 3 の増加を認めた(図 4 D)。

図4



まとめ

本研究では、OSCCにおいてPAFRの発現量とCDDP感受性の間に相関関係が認められた。PAFRを抑制すると、OSCCのCDDP感受性が高まること認められた。また、PAFRの選択的阻害剤であるGBを同定し、GBとCDDPを併用することでGBがPAFRのシグナル伝達経路であるERKやAktのリン酸化を抑え、OSCCにおけるCDDP感受性の増加が認められた。以上の結果から、PAFR阻害作用をもつGBとCDDPを併用すると、OSCC細胞におけるCDDP感受性が高められると考えられた。CDDPの副作用の克服は癌治療において大きな課題となっている。GBがCDDPに対する感受性を高めることで、より低用量のCDDPで同等の効果が得られれば、副作用の発現を抑制できると考えられた。GBがOSCC患者に対するCDDPとの併用療法の新規治療薬となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------