

令和元年5月28日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17237

研究課題名(和文) アデノシン受容体を起点とする癌進展カスケード制御による新規治療方法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel cancer treatment to regulate the cancer progressive cascade starting from adenosine receptor

研究代表者

皆川 康之(MINAKAWA, Yasuyuki)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：30639787

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)：アデノシンA2b受容体(ADORA2B)は口腔癌由来細胞株、口腔癌臨床検体において発現増強しており、臨床指標との相関およびADORA2B発現抑制株を用いた機能解析により、癌の増殖に影響することが明らかとなった。ADORA2Bから続くAKT/ERK-HIF-1経路を介して、HIF-1標的遺伝子群を調整することで口腔癌の進展調節を行うと考えられた。TheophyllineをADORA2Bの阻害薬として同定し、ADORA2Bを起点とするカスケード抑制による、癌細胞の嫌気性代謝の抑制、細胞死への誘導により口腔癌の進展を制御する可能性が示唆された。本研究結果は、今後の臨床応用に貢献するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アデノシンA2b受容体(ADORA2B)はAKT/ERK-HIF-1経路を介して、HIF-1標的遺伝子群を調整することで口腔癌の進展調節を行うと考えられた。ADORA2Bの阻害薬として同定したTheophyllineはADORA2Bを起点とするカスケード抑制による、癌細胞の嫌気性代謝の抑制、細胞死への誘導により口腔癌の進展を制御する可能性が示唆された。以上よりADORA2Bは口腔扁平上皮癌の新たなバイオマーカーとなりうると考えられた。また、ADORA2B阻害薬として同定したTheophyllineは新たな分子標的治療薬となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Adenosine A2b receptor (ADORA2B) is up-regulated in the OSCC derived cell lines and clinical samples and it is cleared that ADORA2B strongly effects the tumoral growth by the analyses of the correlation with the clinical indicator and functional analyses used shRNA transfection models. ADORA2B promotes the OSCC progression by regulating the HIF-1 target genes via AKT/ERK-HIF1 signaling pathway started from ADORA2B. We identified the Theophylline is the ADORA2B directly inhibitor, inhibits ADORA2B signaling cascade, as a results, Theophylline depressed OSCC development by controlling hypoxia metabolism and cell death. This study may contribute to the future clinical applications.

研究分野：医歯薬学 歯学・外科系歯学

キーワード：アデノシン受容体 ADORA2B 口腔癌 HIF-1 Theophylline

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アデノシンはほとんどの細胞が産生するプリン代謝物であり、さまざまな細胞の生理活性に深く関与する重要なヌクレオシドである。アデノシンは A1、A2a、A2b、A3 の 4 つの細胞膜受容体を介して細胞内へシグナルを伝達するが、これらの受容体は G タンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) ファミリーに属し、リガンド結合により細胞外のシグナルを細胞内の G タンパク質に伝達し、様々な細胞内セカンドメッセンジャーシステムを調整する。アデノシンが癌の増殖や進展を促進することがいくつかの癌種で知られていることから、アデノシンとその受容体からのカスケードの異常が癌細胞の活性化に深く関与していると考えられる。アデノシンは、酸素要求性が高く、酸素分圧が低い組織中で顕著に蓄積し、その生理活性を發揮する。低酸素状態で培養した大腸癌細胞でアデノシン受容体の発現亢進がみられ、アデノシンが hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) を介して癌細胞の増殖に寄与することも報告されている。これらの研究結果は口腔癌などの固形癌においてしばしばみられる低酸素領域でのアデノシンによる癌の進展への寄与を強く示唆するものであり、アデノシンの作用により低酸素状態では複数のカスケードが活性化され、血管新生や細胞増殖などの調整を行い腫瘍の発生や進行に関与していると考えられる。

我々は、ヒト全遺伝子搭載マイクロアレイを用いて口腔癌組織における遺伝子発現について解析を行ってきた結果、既に先行研究としてアデノシン受容体の中でアデノシン A2b 受容体 (adenosine A2b receptor; ADORA2B) が最も口腔癌において過剰発現していることを明らかにした。このことは口腔癌における ADORA2B を介するカスケードの重要性を示すことから、ADORA2B を起点としたカスケードを解明してそれを制御することは癌の進展を抑制することに繋がると考えられる。さらには各分子に対する拮抗薬の効果を検証することで、分子標的薬やがん免疫制御なども含む新たな治療戦略の開発へと発展することが期待される。

2. 研究の目的

本研究では既に同定した ADORA2B について、口腔癌における ADORA2B の発現状態やその臨床的・分子生物学的意義について明らかにすることを目的とする。さらには ADORA2B が作用するシグナル伝達経路について明らかにし、ADORA2B 制御により口腔癌の進展を抑制する治療法の開発について検討する。

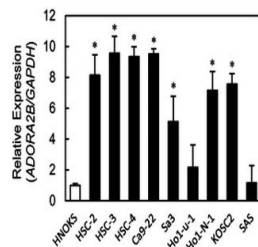
3. 研究の方法

- (1) . 多くの口腔癌由来細胞株に関して、real time PCR 法で mRNA レベルにおいて ADORA2B が過剰発現していることを確認する。
- (2) . 多くの口腔癌由来細胞株に関して、western blotting 法でタンパクレベルにおいて ADORA2B が過剰発現していることを確認する。
- (3) . 多くの臨床サンプルに関して、免疫組織学的染色法でタンパクレベルにおいて ADORA2B が過剰発現していることを確認する。
- (4) . 臨床諸指標と ADORA2B の発現状態との関係を検討し、ADORA2B の過剰発現が臨床的にどのような意義を持つのか (増殖、浸潤、転移、予後など) を明らかにする。
- (5) . 培養細胞に ADORA2B の shRNA を導入し、遺伝子発現を抑制した形質細胞を作製する。
- (6) . 形質転換細胞を用いて、機能解析 (増殖能、遊走能、浸潤能) を行う。
- (7) . 口腔癌細胞株を低酸素状態にて培養し、低酸素状態における ADORA2B の発現を RT-qPCR、蛍光免疫染色法を用いて検証する。
- (8) . ADORA2B と嫌気性環境関連遺伝子である HIF-1 α との関係、およびそれらのシグナル伝達経路およびターゲット遺伝子を明らかにする。
- (9) . 口腔癌細胞株を低酸素状態にて培養し、HIF-1 α の核内移行を western blotting 法を用いて確認し、ADORA2B が HIF1 α 関連遺伝子群におよぼす影響を明らかにする。
- (10) . パスウェイ解析および文献検索から、ADORA2B およびそれぞれのカスケードの選択的拮抗薬の候補薬剤を同定し、薬剤添加による口腔癌細胞株の機能解析を行う。

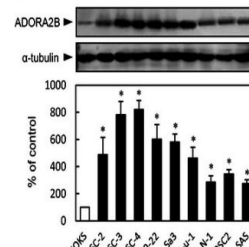
4. 研究成果

(1) . 多くの口腔癌由来細胞株に関して、mRNA、において ADORA2B が過剰発現していることを確認する。

9種の口腔癌由来細胞株において ADORA2B の mRNA、タンパクレベルでの有意な発現亢進を認めた。(図 1, 2)



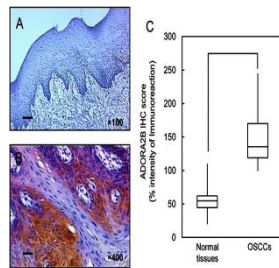
(図 1: ADORA2B mRNA の発現状況)



(図 2: ADORA2B タンパク発現状況)

(2). 多くの臨床サンプルに関して、免疫組織学的染色法でタンパクレベルにおいて ADORA2B が過剰発現していることを確認する。

臨床サンプルにおける ADORA2B の発現状態について、免疫組織化学染色法を用いて解析したところ、正常組織部に比較して腫瘍部において有意な発現亢進を認めた。(図3)



(図3: A 正常口腔粘膜上皮染色像, B 癌組織染色像, C ADORA2B の IHC スコア)

(3). 臨床諸指標と ADORA2B の発現状態との関係を検討し、ADORA2B の過剰発現が臨床的にどのような意義を持つのか(増殖、浸潤、転移、予後など)を明らかにする。

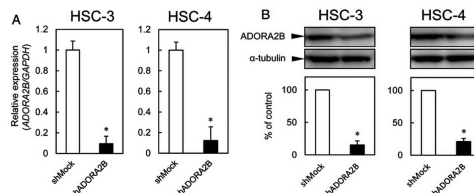
臨床諸指標と ADORA2B の発現状態との関係を検討したところ、腫瘍径と有意な相関関係を認めた。(表1)

Clinical classification	Total	Results of Immunostaining		p-value
		No. patients (N)	ADORA2B positive	
Age at surgery (years)				
<60	27	7 (26)	10 (74)	0.95
≥60 <70	26	6 (53)	18 (69)	
≥70	47	13 (28)	34 (72)	
Gender				
Male	64	23 (33)	43 (67)	0.24
Female	36	7 (19)	29 (81)	
T-Primary tumor				
T1	8	3 (38)	5 (63)	0.02*
T2	60	22 (37)	38 (63)	
T3	15	2 (13)	13 (87)	
T4	17	1 (6)	16 (94)	0.01*
T3 + T4	32	29 (91)	31 (97)	
T3 + T4	32	3 (10)	29 (90)	
N-Regional lymph node				
N (negative)	158	14 (24)	44 (76)	0.39
N (positive)	42	14 (33)	28 (67)	
Stage				
I	7	3 (43)	4 (57)	0.54
II	38	11 (29)	27 (71)	
III	17	4 (24)	13 (76)	
IV	38	10 (26)	28 (74)	
Histopathologic type				
Well	64	15 (23)	49 (77)	0.25
Moderately	31	11 (35)	20 (65)	
Poorly	15	2 (6)	13 (88)	
Tumor site				
Oral cavity	35	11 (31)	24 (69)	0.84
Tongue	50	12 (24)	38 (76)	
Buccal mucosa	9	2 (22)	7 (78)	
Oral floor	6	3 (50)	3 (50)	

(表1: ADORA2B の発現と臨床指標の相関)

(4). 培養細胞に ADORA2B の shRNA を導入し、遺伝子発現を抑制した形質細胞を作製する。

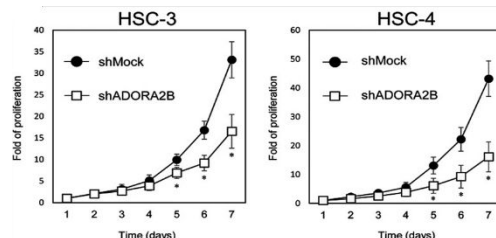
2種の口腔癌由来細胞株に ADORA2B の shRNA を導入し、ADORA2B の発現抑制を mRNA、タンパクレベルで確認した。(図4)



(図4: A 形質転換細胞株における ADORA2B の mRNA 発現状況, B 形質転換細胞株における ADORA2B のタンパク発現状況)

(5). 形質転換細胞を用いて、機能解析(増殖能、遊走能、浸潤能)を行う。

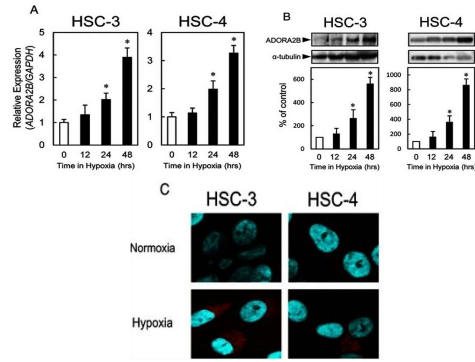
細胞増殖能試験において、shMock と比較して shADORA2b では有意な細胞増殖能の低下を認めた。(図5)



(図5: 形質転換細胞株における増殖能試験)

(6). 口腔癌細胞株を低酸素状態にて培養し、低酸素状態における ADORA2B の発現を RT-qPCR 法、Western blots 法、蛍光免疫染色法を用いて検証する。

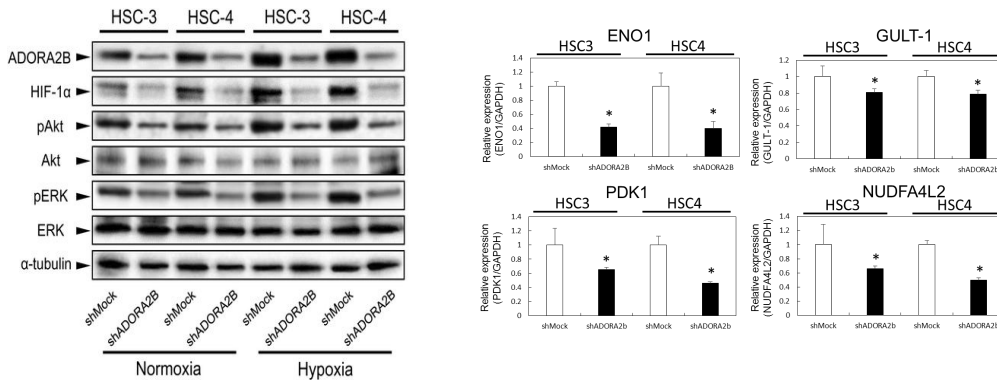
口腔癌細胞株を低酸素培養したところ、時間依存的な ADORA2B の発現増強を認めた。(図6)



(図6: A, B, C 低酸素培養下における ADORA2B の発現状況 (RT-qPCR, Western blots, 蛍光免疫染色))

(7). ADORA2B と嫌気性環境関連遺伝子である HIF-1 α との関係、およびそれらのシグナル伝達経路およびターゲット遺伝子を明らかにする。

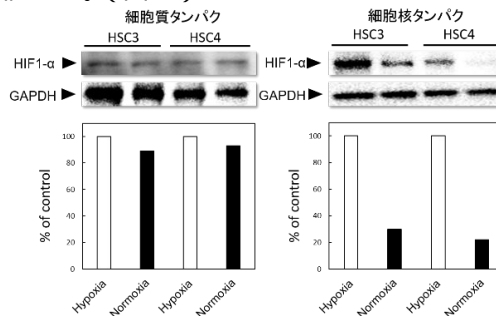
ADORA2B は GPCR-AKT/ERK-HIF1 α 経路によって HIF-1 α と関連し、低酸素培養下においてより強く HIF1 α を調節することが明らかとなった。



(図7: ADORA2B を起点としたシグナル伝達経路 (Western blots))

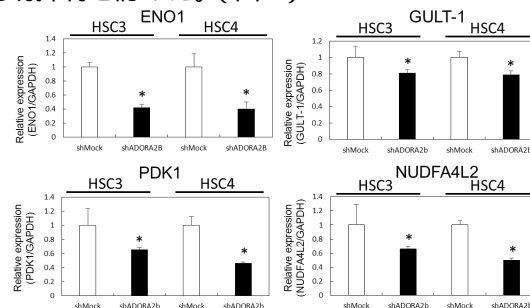
(8). 口腔癌細胞株を低酸素状態にて培養し、HIF-1 α の核内移行を western blotting 法を用いて確認し、ADORA2B が HIF1 α 関連遺伝子群におよぼす影響を明らかにする。

低酸素培養下において細胞質タンパクに有意な差を認めなかったが、核タンパクにおける HIF1 α の発現亢進を認めた。(図8)



(図8: 低酸素培養下における細胞質、細胞核分画における HIF-1 α のタンパク発現状況)

shMock と比較して shADORA2b において HIF-1 α 標的遺伝子群 (ENO1, GLUT-1, PDK-1, NUDFA4L2) の有意な発現抑制を認めた。(図9)

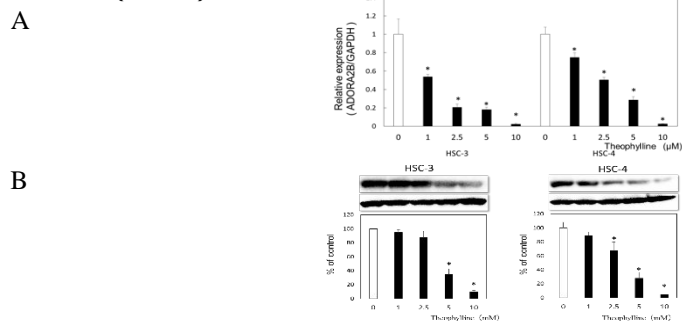


(図9: ADORA2B 発現抑制細胞株における HIF1 α 標的遺伝子群の mRNA 発現状況)

(9). パスウェイ解析および文献検索から、ADORA2B およびそれぞれのカスケードの選択的拮抗薬の候補薬剤を同定し、薬剤添加による口腔癌細胞株の機能解析を行う。

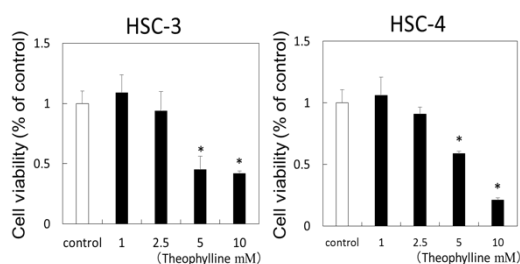
ADORA2B の拮抗薬として Theophyllin を同定した。

Theophylline 作用下の 2 種の癌細胞において ADORA2b の mRNA、タンパクレベルでの発現抑制を認めた。(図 10)



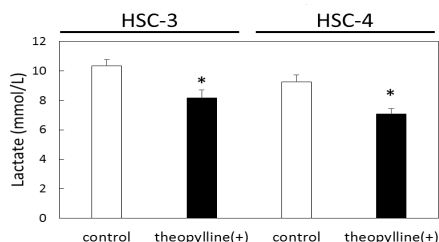
(図 10 : A, B Theophylline 作用時の ADORA2B の発現状況(RT-qPCR,Western blots))

Theophylline 作用下の癌細胞において有意な細胞生存率の低下を認めた。(図 11)



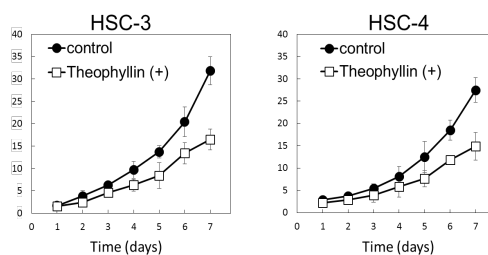
(図 11 : 各濃度の Theophylline 作用下における MTS assay)

Theophylline 作用下の癌細胞において嫌気性代謝産物である乳酸の有意な抑制を認めた。(図 12)



(図 12 : Theophylline 作用下における Lactate を ELIZA にて定量)

Theophylline 作用下の癌細胞において有意な細胞増殖能の抑制を認めた。(図 13)



(図 13 : Theophylline 作用下における proliferation assay)

(10). まとめ

本研究ではアデノシン受容体の中で、口腔癌におけるマイクロアレイ解析において最も発現増強を認めた ADORA2B に着目した。

ADORA2B は口腔癌由来細胞株、臨床検体において発現増強しており、その発現は腫瘍径との相関関係を認めた。ADORA2B の発現を抑制した形質転換細胞株を樹立し機能解析を行ったところ、有意な癌細胞の増殖能の低下を認めた。低酸素培養下において ADORA2B は時間依存的な発現の亢進を認め、GPCR-AKT/ERK-HIF1 α 経路によって HIF1 α を調整することを明らかにした。さらに、ADORA2B は HIF1 α 核内移行後の標的遺伝子群 (ENO1, GLUT-1, PDK-1, NUDFA4L2) の発現を制御することで、癌細胞の嫌気性代謝、細胞生存に関与すると考えられた。

ADORA2B の直接的な阻害薬として Theophylline を同定した。Theophylline は濃度依存的に

ADORA2B の発現を抑制することで、ADORA2B を起点としたシグナル伝達経路を阻害し、その結果として癌細胞の嫌気性代謝の抑制、細胞死への誘導により口腔癌の進展を制御する可能性が示唆された。本研究結果は、今後の臨床応用の可能性に有益なデータになると考えられる。

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〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者 : なし

(2)研究協力者 : なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。