

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22607

研究課題名(和文) PAR2制御による癌内交感神経を標的とした新規癌治療法の開発

研究課題名(英文) Novel Cancer Therapy Targeting Intracancer Sympathetic Nerves through PAR2 Regulation

研究代表者

梶 健二郎 (kaji, kenjiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任研究員

研究者番号：60884252

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)：本研究はプロテアーゼ活性化型受容体2(PAR-2)のシグナルが癌細胞から放出されるエクソソーム内のmiR-34aの減少を介して、癌組織内への神経浸潤を促進するか検討することを目的とした。まず、PAR-2を発現するマウス肺癌細胞株LLCを用いた実験において、PAR-2の活性化は癌細胞内およびエクソソーム内のmiR-34aの減少に関わっていた。さらに、LLC移植マウスモデルにおいて、PAR-2阻害剤の投与は有意に腫瘍内への神経浸潤を抑制した。以上のことから、LLCにおいてPAR-2はmiR-34aの減少に関わっており、その変化が癌内への神経浸潤を促進している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マウスのみならず犬の癌においても同様にPAR-2がmiR-34aを介して癌内への神経浸潤に関与している可能性を見出した。これまでにヒト医療において癌内への神経浸潤が予後の悪化と相関していることは明らかとなっていたが、神経浸潤の詳しいメカニズムおよび癌内神経を標的とした治療の効果は依然として不明である。犬は癌の形成や免疫機構がヒトと類似しており癌自然発症動物モデルと考えられるため、犬でのPAR-2と癌内交感神経浸潤の関係性を明らかにした本研究の結果は獣医療だけではなくヒト医療へと外挿できる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate whether protease-activated receptor 2 (PAR-2) signaling promotes neural invasion into cancer tissues via reduction of miR-34a in exosomes released from cancer cells. First, in experiments using LLC, a mouse lung cancer cell line expressing PAR-2, activation of PAR-2 was associated with a decrease in miR-34a in cancer cells and exosomes. Furthermore, in a mouse model of LLC transplantation, treatment with a PAR-2 inhibitor significantly suppressed neural invasion into the tumor. These findings suggest that PAR-2 is involved in the reduction of miR-34a in LLC, and that this change may promote neural invasion into the tumor.

研究分野：獣医学

キーワード：PAR-2 癌内神経 miR-34a エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌の増大や転移には癌細胞だけではなく、癌微小環境を構成する血管内皮細胞や線維芽細胞の構造的・機能的变化が必須である。近年、ヒト乳癌の微小環境に交感神経が存在しており、その活性化が癌の増大や転移を促進することが明らかとなった(Kamiya ら, Nat Neurosci, 2019)。さらに、実験的にマウスの癌内交感神経を除去することで癌の進行を抑制することが示されたことから、新たな癌治療標的として癌内交感神経が注目されている。癌微小環境に存在する交感神経の由来は感覚神経であり、癌細胞が放出するエクソソームに含まれる microRNA の一種である miR-34a の減少が感覚神経を交感神経に分化転換させることが報告された(Amit ら, Nature, 2020)。従って、microRNA を制御することで癌内交感神経の浸潤を抑制できると考えられるが、microRNA を標的とした治療薬の実現には未だ多くの時間を要するため、さらに上流シグナルを同定することが早期の臨床応用に繋がると考えた。Protease-activated receptor 2(PAR2) はプロテアーゼにより活性化する G タンパク質共役型受容体である。これまでにヒト結腸癌に発現する PAR2 の活性化が miR-34a の発現減少することが示唆されており(Ma ら, PLoS One, 2013)、PAR2 の活性化が癌内交感神経の増加に寄与する可能性が考えられるが、科学的根拠は存在しない。従って、本研究の学術的「問い」は「癌細胞の PAR2 活性化は miR-34a の発現変化を介して癌微小環境の神経を増加させるか？」である。

2. 研究の目的

本研究は犬およびマウスの癌細胞における PAR2 の活性化が癌微小環境への神経浸潤に与える影響を解明し、神経浸潤抑制を機序とした新たな癌治療薬の創薬基盤の構築を目的とする。具体的には(1) PAR2 が犬およびマウス癌細胞株の miR-34a 産生に与える影響、(2) PAR2 の抑制が癌組織における神経浸潤の増減に与える影響、(3) 犬の癌組織における PAR2 発現と神経密度が症例の予後に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PAR2 発現細胞であるマウス肺がん細胞(LLC)および犬乳腺癌細胞(CIP)に PAR2 アゴニストを処置し、癌細胞および培養上清のエクソソームに含まれる miR-34a 発現量をリアルタイム PCR を用いて測定した。また(2) LLC を移植した担癌モデルマウスに PAR2 アンタゴニストを投与し、癌の増大および癌内の神経浸潤を比較定量した。さらに(3) 2018 年から 2020 年までに東京大学動物医療センターに来院し、犬乳腺癌と診断された 18 症例より採取した癌組織における PAR2 発現と神経浸潤を免疫染色により検討した。

4. 研究成果

(1) LLC に PAR2 アゴニストを処置し、24 時間後に LLC および LLC 培養上清より分離したエクソソーム中の RNA を抽出し、リアルタイム PCR により miR-34a の発現量変化を測定した。その結果、コントロール群と比較して、PAR2 アゴニスト添加群では LLC 中の miR-34a 発現は有意に減少していた。また、LLC 由来のエクソソーム中の miR-34a は有意差は認められなかったが減少する傾向が認められた。一方、CIP においても CIP 中の miR-34a は PAR2 アゴニスト添加により有意に減少したが、エクソソーム中の miR-34a は減少する傾向のみ認められた。(図.1)

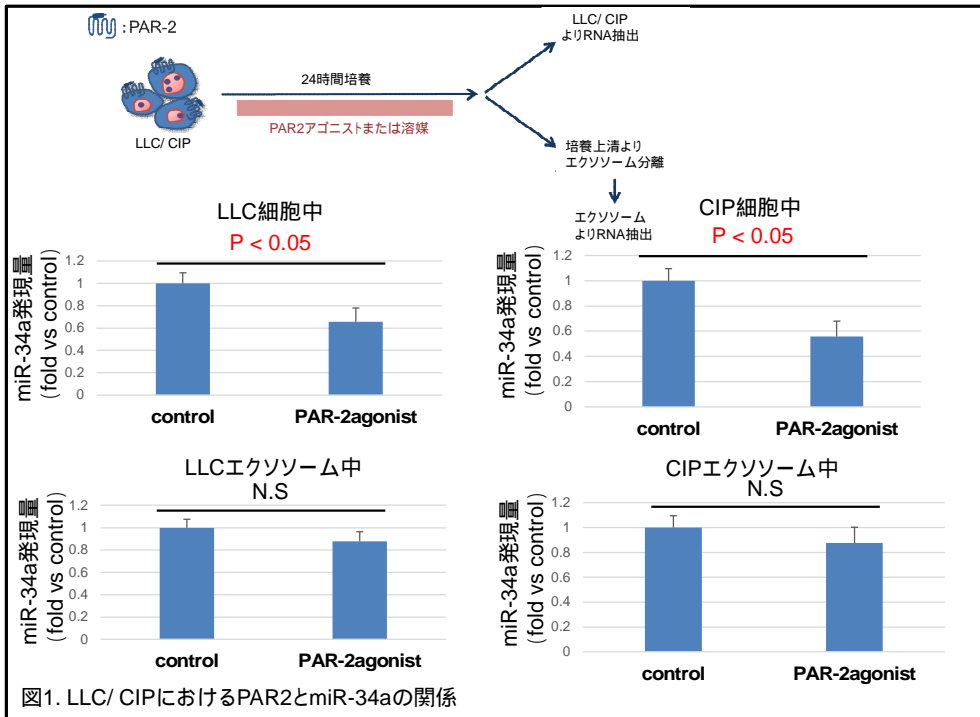


図1. LLC/ CIPにおけるPAR2とmiR-34aの関係

(2) LLCをC57B/6に皮下移植し、PAR2アンタゴニスト(10mg/kg BID i.p.)または溶媒を投与した際の2週間後の腫瘍径を測定したところ、PAR2アンタゴニスト投与群では有意に溶媒群と比較して腫瘍の増大が抑制されていた。(図.2)

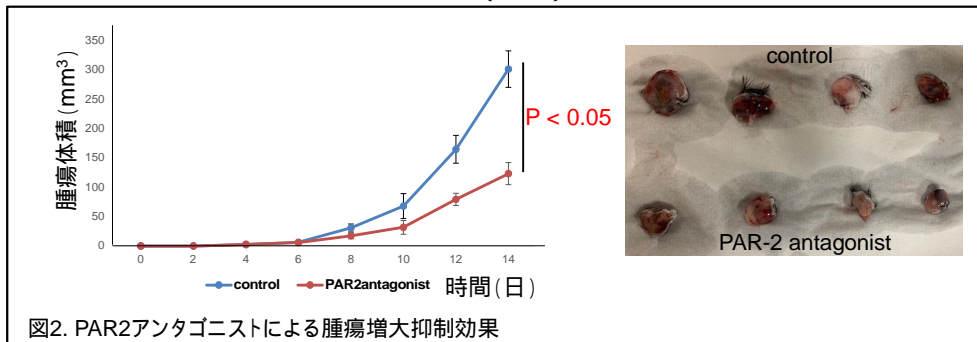


図2. PAR2アンタゴニストによる腫瘍増大抑制効果

また、採材した腫瘍組織に対して神経系マーカーである Neurofilament 抗体を用いて免疫染色を実施し、腫瘍組織内への神経浸潤を評価した。その結果、PAR2アンタゴニスト投与群では、コントロール群と比較して有意に Neurofilament 陽性領域が減少していた。(図.3)

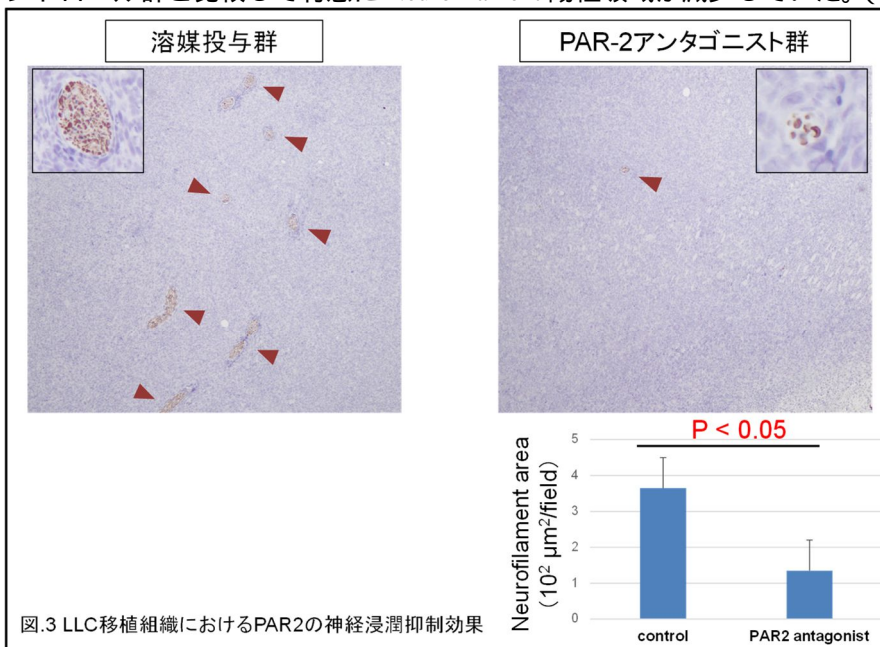


図3 LLC移植組織におけるPAR2の神経浸潤抑制効果

さらにこの浸潤神経が交感神経であるか確認するために、交感神経マーカーである Tyrosine

Hydroxylase 抗体を用いて免疫染色を実施したところ、LLC 細胞の非特異的陽性が認められたが、浸潤神経自体は陰性であった。(図.4)

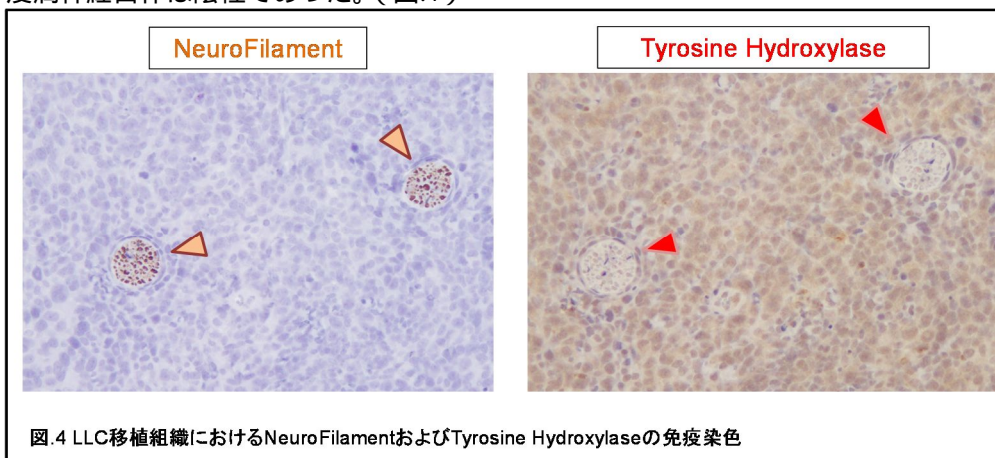


図.4 LLC移植組織におけるNeuroFilamentおよびTyrosine Hydroxylaseの免疫染色

犬乳腺癌症例 18 例より採材した腫瘍組織に対し、NeuroFilaemt 抗体を用いて組織内への神経浸潤を評価したところ、8 症例で腫瘍組織内にフィラメント状および束状の神経の浸潤が認められた。さらに、それらの症例に対し PAR2 抗体で免疫染色を実施したところ、腫瘍細胞における PAR2 高発現症例では有意に神経浸潤が認められることが明らかとなった。(図.5)

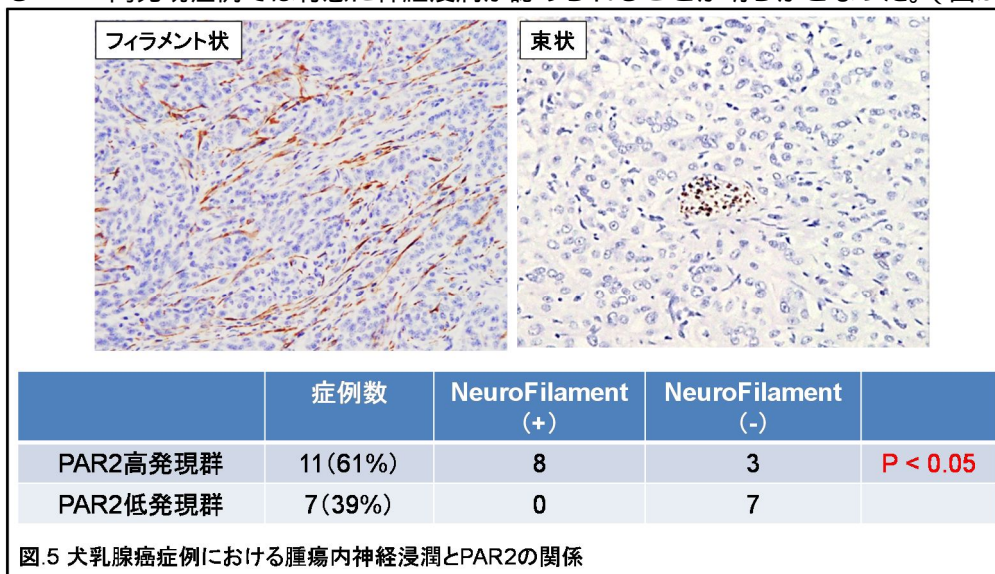


図.5 犬乳腺癌症例における腫瘍内神経浸潤とPAR2の関係

また、腫瘍組織内への神経浸潤と予後との関係をカプランマイヤー法で評価したところ、神経浸潤の認められた症例では有意に生存率が低いことも明らかとなった。また、神経浸潤が認められた症例では遠隔転移(リンパ節含む)が認められる傾向があったが、有意差は認められなかった。(図.6)

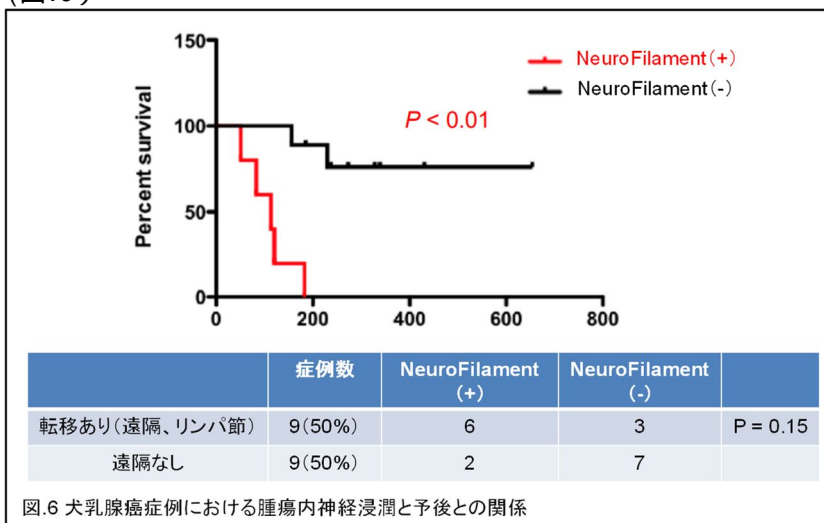
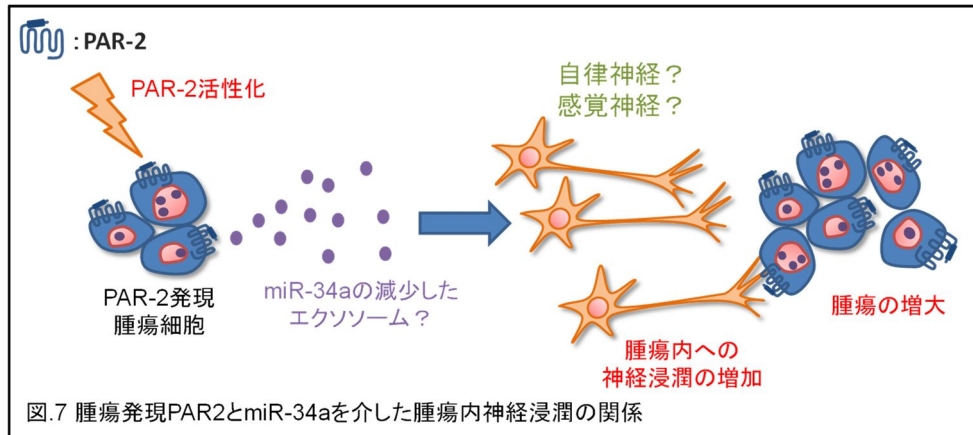


図.6 犬乳腺癌症例における腫瘍内神経浸潤と予後との関係

以上の結果から、下図に示すような腫瘍発現 PAR2 と miR-34a を介した腫瘍内神経浸潤のメカニ

ズムの一端が明らかとなった。(図.7) 本研究は検証実験を進めたのちに海外学術雑誌へ投稿予定である。



本研究では、PAR-2 刺激により腫瘍細胞中の miR-34a の減少は有意に認められたが、エクソソーム内の miR-34a は減少する傾向は認められたものの有意な差は認められなかった。そのため、エクソソームを介さずに、腫瘍内の miR-34a 減少が直接的に神経浸潤に関与している可能性も示唆された。また、本研究では腫瘍内に浸潤している神経の種類の設定には至らなかった。今後は交感神経だけではなく副交感神経や感覚神経の可能性も含め検討していく必要がある。これまでに犬の腫瘍内神経浸潤の研究はほとんど行われていなが、本研究では犬乳腺癌に神経が浸潤していること、またその浸潤が予後の悪化に関与していることを明らかにした。この結果から、犬乳腺癌においても腫瘍内神経が予後予測の指標となる可能性が示唆されたとともに、腫瘍内神経が新たな治療標的となる可能性が考えられる。

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〕

〔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
---------	---------