

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591155

研究課題名(和文) G蛋白質共役受容体アレイを用いた新規肺癌標的分子の探索

研究課題名(英文) Exploration of novel molecular targets for lung cancer using GPCR array

研究代表者

横内 浩 (Yokouchi, Hiroshi)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60399946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：DNAマイクロアレイによって、当院で切除した非小細胞肺癌患者124例の腫瘍組織と正常組織間で発現差の大きいserotonin 2B receptor (HTR2B)を同定した。HTR2Bは女性、腺癌、非喫煙者で有意に発現が高かった。免疫染色にて腫瘍におけるHTR2Bの蛋白発現を検討した結果、腫瘍先進部で発現が高く、HTR2Bの増殖、浸潤能が示唆された。またHTR2Bをレンチウイルスにて遺伝子導入したA549細胞(肺腺癌細胞株)を得た。今後HTR2Bを刺激することで、細胞レベルにおけるHTR2Bの機能を検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：We identified serotonin 2B receptor (HTR2B) by DNA microarray using 124 pairs of surgically resected tumors and adjacent normal tissues from patients with non-small-cell lung cancer at our hospital. HTR2B was significantly expressed in female, adenocarcinoma, and non-smokers. In immunohistochemistry, HTR2B was predominantly expressed in invasive front within the tumor, suggesting that the molecule might have a critical role in proliferation and invasion of the tumor. Next, we obtained A549 cell (lung adenocarcinoma cell line) transfected with HTR2B by lentiviral vector. Using this cell line, we have a plan to perform functional analysis of HTR2B in vitro.

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：分子細胞呼吸器学

キーワード：HTR2B GPCR 非小細胞肺癌

1. 研究開始当初の背景

近年、原発性肺癌の組織型は多種多様であることが明らかとなっており、我々も一部の組織型に対する臨床的特徴について自施設を含む多施設データを集積して解析を進めてきた。一方で進行肺癌に対して様々な細胞障害性化学療法が開発され、我々は小細胞癌、非小細胞癌双方において新たな併用療法の知見を明らかにしてきた。近年進行肺癌に対する治療戦略に分子標的治療が加わった。その抗腫瘍機構の多くはチロシンキナーゼ受容体 (RTK) および下流シグナル分子に関連する。特に上皮成長因子受容体 (EGFR) チロシンキナーゼ (TKI) は、遺伝子変異を有する患者群で高い奏効率と無増悪生存期間の延長を示すことが報告されており、我々の施設でも明らかにし、感受性を持たない遺伝子変異も示してきた。また本治療に効果があった患者群の一部に再発後の再治療で臨床効果が認められる集団があることを示した。しかし EGFR-TKI 投与後の耐性機序が明らかになり、さらなる分子標的治療薬の開発が急務となっている。一部の肺癌患者に対して ALK 阻害薬が高い抗腫瘍効果を発揮することが示され、抗 VEGF 抗体が新たに進行肺癌に対する治療戦略の一つに加わっているものの、他の多くの分子標的治療薬は明らかな臨床効果を示していないのが現状である。

7 回膜貫通型受容体である G 蛋白質共役受容体 (G-protein coupled receptor: GPCR) は、これまでに約 2000 種の受容体が報告され、主に正常細胞において細胞外の神経伝達物質やホルモンを受容してそのシグナルを細胞内に伝える役割を有する。一部の GPCR は RTK と同様、癌細胞表面にも発現し、癌幹細胞 (cancer stem cell) 特有の GPCR も同定されたものの、そのシグナル伝達機構を含め腫瘍特異性や機能において未解明な点も多い。GPCR の多くはその下流シグナルにセカンドメッセンジャーである環状アデノシン 3',5'-リン酸 (サイクリック AMP: cAMP) を有する。細胞内の cAMP 濃度が上昇した場合、主に大腸癌ではプログラム細胞死 (アポトーシス) に抵抗性を獲得することが多いが肺癌では知られていない。

我々は一部の肺癌組織型に対する臨床的特徴の解析、進行肺癌に対する新たな治療方法の開発に加え、マウス肺癌に対する免疫学的アプローチによる基礎的な解析を進めてきた。一部の GPCR が腫瘍周囲の炎症反応を誘導しうることや、リンパ球を Th1 と Th2 細胞に分化する際、重要な役割を果たすことが示されており、同受容体群と腫瘍特異的リンパ球との関連が示唆される。

以上より肺癌細胞や肺癌間質細胞の表面における GPCR の発現プロファイルを検討し、

cAMP 以降のシグナル伝達機構や免疫学的機序を解明することは、新たな肺癌分子標的の同定につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、簡便かつ高感度で発現プロファイルが検討可能な GPCR アレイを用いて腫瘍環境における GPCR 発現や、アポトーシスシグナル伝達機構、臨床的意義について解析することを目的とする。

3. 研究の方法

肺癌患者から得られた腫瘍組織および正常組織における GPCR の発現を検討

当院において切除された非小細胞肺癌患者から得られた 3 対の腫瘍組織および正常組織における GPCR の発現差について 2008 年に米国にて上市された Applied Biosystems 社製の 384 ウェルを搭載し、同時定量的 PCR を可能とした GPCR アレイ (Taqman Gene Signature Arrays) にテンプレートとして載せ、腫瘍細胞、正常細胞間の GPCR 発現レベルの差異を比較解析する。

ヒト肺癌細胞株を使用した *in vitro* 実験にて候補 GPCR 分子とアポトーシスに対する役割を検討

上述した方法により同定された腫瘍に高発現の GPCR がオーファン受容体ではないこと、さらに coupling する G 蛋白 (Gs, Gi, Gq など) の種類を IUPHAR database, UCSF database 及び Discover Rx の database を用いて確認する。確認できた候補 GPCR を発現する肺癌細胞株を我々が研究室に所有する非小細胞肺癌株 (A549, EBC-1, RERF-LC-MS, RERF-LC-OK, LC-1sq, LK-2) 及び小細胞肺癌株 (SBC-3, LU65, 87-5, Lu-134-A, Lu-135, MS-1)、さらに我々が樹立した非小細胞肺癌株 (IEEC-1) より cDNA を抽出し、RT-PCR にてスクリーニング探索する。高発現する腫瘍株に対して GPCR 特異的アゴニスト及びアンタゴニストの添加により、まず細胞内 cAMP 濃度を cAMP ELISA kit にて測定する。次に該当する腫瘍細胞株がアポトーシス (抗アポトーシス) を誘導するかを Apoptosis ELISA kit を用いて検討する。

候補 GPCR 分子とアポトーシスシグナル伝達経路を検討

細胞内 cAMP 濃度を上昇される GPCR (Gs-GPCR) が同定された場合は、その下流にある分子 Epac の活性化剤である 8-pCPT-2-O-Me-cAMP (8-Me) の添加、あるいは Protein kinase A (PKA) の活性化剤である 8-(4-Chlorophenylthio) adenosine-3-5-cyclic monophosphate (8-CPT-cAMP)、さらに

Epac の下流である Rap-1 (GGT1) 及び PI3K 阻害剤 (LY294002)、PKA 阻害剤などの使用によって、アポトーシス (抗アポトーシス) を制御するシグナル伝達機構を Apoptosis ELISA kit、ならびに各種シグナル分子のリン酸化及び脱リン酸化を Western blotting にて調べ、明らかにする

Gq-GPCR の場合は、PLC inhibitor (U73122) を用いて同様の検討を行う。また候補 GPCR 分子の重要性を確認するために GPCR 分子や鍵となるシグナル分子を siRNA による細胞内ノックダウンにて検討する。

候補 GPCR 分子の免疫学的意義を肺癌組織にて検証

当院で外科切除を施行された肺癌患者検体を候補 GPCR 分子抗体にて免疫染色を行い、肺癌周囲間質細胞における免疫担当細胞の染色の分布や染色強度を検討する。二重染色法にて染色される細胞が CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、あるいはマクロファージであるか、特異的抗体を用いてそれぞれ検討する。候補 GPCR を強発現する細胞が、CD4 陽性 T 細胞である場合、免疫回避機構の一部を担っている Foxp3 分子との二重染色も試みる。

候補 GPCR 分子の臨床的意義を肺癌組織にて検証

当院で外科切除を施行された肺癌患者検体を候補 GPCR 分子抗体にて免疫染色を行い、肺癌細胞あるいは周囲免疫担当細胞の染色の分布や染色強度を検討し、既に得られている患者の臨床情報に基づき予後曲線を Kaplan-Meier 法にて描出する。候補 GPCR 分子の発現レベルが患者の予後と関連があるかを GPCR 分子の有無別に Logrank test にて統計学的に検討する。また該当する患者に対して行われていた治療別の反応性や、他の臨床情報 (性別、年齢、喫煙指数、組織型、臨床・病理病期) との関連もあわせて検討し、候補 GPCR 分子の関与について多変量解析にて検討を行う。

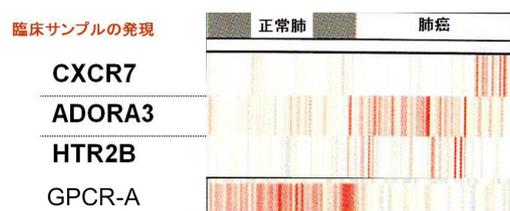
4. 研究成果

本学ゲノム生物学との協力体制ができ、当院にて切除した非小細胞肺癌組織 124 例の腫瘍組織とその正常組織間における GPCR mRNA の発現差を DNA マイクロアレイにて検討することが可能であった。そのため少数例で検討する予定であった GPCR アレイは、候補 GPCR 分子を拾い上げる確率などを考慮して用いないこととなった。

マイクロアレイの結果、発現差の大きい GPCR および関連分子を 4 分子同定した (Figure 1)。そのうち serotonin 2B receptor (HTR2B)、adenosine receptor A3, CXCR7 で

は腫瘍で高発現を示し、肺正常組織での発現は低かった。

Figure 1 (mRNA 発現状況：濃いバンドが高発現を示す。)



また GPCR-A (confidential) 分子は、逆に腫瘍細胞で全く発現がない一方で、正常組織で発現が高かった。既に得ている臨床情報と照合した結果、HTR2B mRNA は女性、腺癌、非喫煙者で有意に発現が高く ($p=0.012$, 0.001 , 0.045)、EGFR 遺伝子変異陽性例で高い傾向を示した ($p=0.086$) (Table 1)。

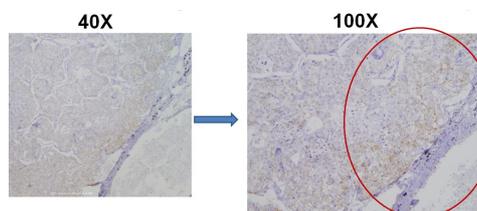
Table 1

	HTR2B 陽性 (n=50)	HTR2B 陰性 (n=74)	P 値
女性	23	18	0.012
腺癌	42	42	0.001
非喫煙者	20	19	0.045
EGFR 遺伝子 変異陽性	23	22	0.086

無再発生存期間には有意差は認めなかった ($p=0.42$, Log-rank test)。

ポリクローナル抗体を用いてパラフィン包埋検体に対して免疫染色を行った結果、発現腫瘍では、腫瘍先進部 (invasive front) で発現が高かった (Figure 2)。

Figure 2 (丸の部分が腫瘍先進部)



また免疫染色による蛋白レベルの発現を検討したところ、85 例までの解析にて腺癌で明らかに発現が高いことが確認されており、順次 mRNA data と同様の発現プロファイルであるか否かを確認中である。

HTR2B を高く発現している肺癌細胞株は commercial base では入手できない。GenScript よりレンチウイルスにより HTR2B

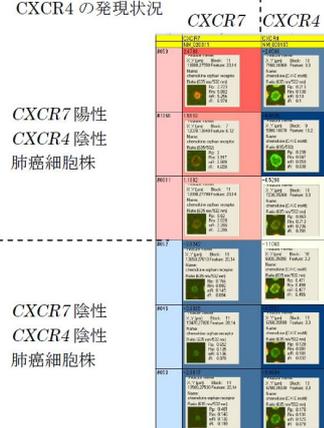
を遺伝子導入し、single cell cloning により得られた安定 A549 細胞（肺腺癌細胞株）を得た。今後 HTR2B の発現をフローサイトメトリーにて確認したのち、HTR2B の ligand を用いて細胞増殖能、浸潤能などを検討する予定である。

ADORA3、GPCR-A についても免疫染色を施行したが、十分に満足のとれる染色が困難であった。抗体濃度などの染色条件によるものと考えられ、今後検討が必要である。

CXCR7 については、CXCR4 と heterodimer を形成し、MAP-ERK pathway を介し、乳癌の転移に関係することが示されている。しかし肺癌研究は端緒についたばかりである。CXCR7 陽性 CXCR4 陰性細胞株、CXCR7 陰性 CXCR4 陰性株 3 つずつを mRNA level で上述のマイクロアレイにて確認することができた (Figure 3)。

Figure 3

DNA マイクロアレイデータに基づく
CXCR7 陽性 / 陰性肺癌細胞株における
CXCR4 の発現状況



このためフローサイトメトリーによる CXCR7 の細胞表面における発現の確認は必要ではあるが、CXCR4 の有無に関係なく CXCR7 の有無単独により細胞の機能解析を行う準備はできたと考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

3rd Symposium Mechanisms and Models of Cancer (La Jolla, USA) 2013 年 8 月
Expression profile of serotonin 2B receptor (HTR2B) in non-small-cell lung cancer. Yokouchi H, Ishida T, Tanino Y, Wang X, Suzuki H, Kobayashi C, Waguri S, Watanabe S, Munakata M.

15th World Conference on Lung Cancer

(Sydney, Australia) 2013 年 10 月
Expression profile of serotonin 2B receptor (HTR2B) in non-small-cell lung cancer. Yokouchi H, Ishida T, Tanino Y, Wang X, Suzuki H, Kobayashi C, Waguri S, Watanabe S, Munakata M.

第 54 回日本肺癌学会総会 (東京)
2013 年 11 月
非小細胞肺癌におけるセロトニン 2B 受容体 (HTR2B) の発現 横内 浩、石田 卓、王新涛、谷野功典、大杉 純、金沢賢也、鈴木弘行、小川千登世、和栗 聡、渡辺慎哉、棟方 充

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横内 浩 (YOKOUCHI, Hiroshi)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：60399946

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：