

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791731

研究課題名（和文） オピオイドのがん細胞増殖ならびに幹細胞分化に及ぼす影響

研究課題名（英文） Effect of opioids on tumor growth and stem cell differentiation

研究代表者

葛巻 直子 (KUZUMAKI NAOKO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：10507669

研究成果の概要（和文）：本研究では、gefitinib 耐性ヒト非小細胞肺癌細胞における gefitinib 耐性獲得時の形質転換の解析とそれに伴った GPCR 発現変動について検討した。その結果、GPCR 発現は大きく変動しており、発現が多い GPCR が圧倒的に多いことが明らかとなった。なかでも、κオピオイド受容体 (KOR) ならびにアデノシン A2a 受容体 (A2aR) が gefitinib の耐性獲得において重要であり、KOR の刺激あるいは A2aR の阻害が、gefitinib 耐性 NSCLC 増殖抑制を示し、がん増悪化抑制を導く可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To determine the expression profile of GPCRs in gefitinib-sensitive (HCC827) and gefitinib-resistant NSCLC cells (H1975, HCC827GR), a GPCR-specific microarray analysis was performed. A heat-map of the microarray revealed considerable differences in the expression of GPCRs between these cells. From the GPCR expression list, we selected some GPCR agonists/antagonist to investigate whether the respective ligands could affect the growth of either H1975 or HCC827GR cells. The present results showed that either stimulation of kappa-opioid receptor (KOR) or inhibition adenosine A2a receptor (A2aR) reduces the growth of gefitinib-resistant NSCLC cells. These findings suggest that, although further *in vivo* studies are still needed, the ability to stimulation of KOR or interfere with A2aR may provide unique opportunities for the prevention of gefitinib-resistant NSCLC growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：麻酔学、オピオイド、がん細胞、GPCR

## 1. 研究開始当初の背景

現在、悪性腫瘍は日本における死因のトップであり、悪性腫瘍患者のなかでも、肺がんは死亡の第一位を占めている。肺がんのなかでも、特に非小細胞肺がんでは、細胞内シグナル伝達の起点となり、細胞増殖、抗アポトーシス、細胞浸潤などを調節する上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) の発現異常が見られ、かつ予後不良因子であることが報告されている。非小細胞肺がんにおいて、EGFR キナーゼドメイン部分の遺伝子変異はEGFR シグナルの恒常的な賦活化を引き起こす。このため、EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺がんでは、gefitinib などのEGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosine kinase inhibitor: TKI) によりEGFR シグナルを抑制することで、高い抗腫瘍効果を示す。しかしながら、EGFR に治療抵抗性の遺伝子変異を有する非小細胞肺がんにおいて、TKI を処置しても治療当初から効果の得られない症例も存在し、さらには奏効例においてもそのほとんどの場合において、耐性を獲得する。近年、EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺がんのTKI 奏効例が後に耐性となった際、急激な病状悪化を来す症例が存在し、臨床で大きな問題となっている。そのような悪化は腫瘍増大再燃 (disease flare) と定義され、このdisease flare が生じた際には肺内転移や中枢神経などの新たな遠隔転移病変の出現が誘導される。

一方、オピオイドが非常に強力な鎮痛作用を持ちあわせることは明白だが、その作用はオピオイドの持つ生理作用の一側面にすぎないことも事実である。また、これまでに、オピオイドに関する研究成果が数

多く報告されているが、疼痛制御機構や鎮痛耐性形成機構の解明に焦点を当てているものが殆どである。さらには、G-タンパク共役型受容体 (GPCR) であるオピオイド受容体の細胞分布ならびに細胞特異性は非常にユニークであり、神経細胞のみならず、様々な細胞の活性化、分裂および分化に寄与していることが想定される。こうした種々の細胞へのオピオイドによる修飾は、オピオイドが繰り出す既存の生理活性とは異なった新たなオピオイドの薬理作用/生理応答を想像させる。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、オピオイドの新たな生理作用を探索する目的で、がん細胞に対するオピオイドの抗腫瘍効果ならびにそのメカニズムについて検討を行う。こうしたアプローチにより、未だ明白でないオピオイドの生理機構が明らかとし、オピオイドについての「適切な理解」ならびに「新たな解釈」を提示することを目指す。さらに、これまでは、がん細胞増殖制御には、EGFR のようなチロシンキナーゼ内蔵型受容体の機能に焦点をあて、研究が進められてきたが、本研究では、オピオイド受容体を含む GPCR の発現変動について網羅的な解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 実験には、gefitinib 感受性非小細胞肺がん患者由来 HCC827 細胞ならびに gefitinib 耐性非小細胞肺がん患者由来 H1975 あるいは本研究にて樹立を行った gefitinib 感受性非小細胞肺がん細胞株である HCC827GR を用い検討を行った。HCC827GR 細胞は、HCC827 細胞に

gefitinib 1  $\mu$ M 処置し 48 時間培養を行った。細胞が 20 % 程度まで消失した時点で、gefitinib を含まない基本培地に切り替え、80 % 程度まで細胞増殖が回復したところで、gefitinib を再度処置するというサイクルを 1.5 ヶ月間繰り返し、最終的に 5  $\mu$ M まで gefitinib の漸増処置を行った。5  $\mu$ M gefitinib を処置しても、全く細胞死の認められない残存する細胞群を株化し、gefitinib 耐性ヒト非小細胞肺癌細胞 (HCC827GR 細胞) とした。

(2) 非小細胞肺癌における遺伝子変異の確認には DNA シークエンス法に従い検討した。

(3) GPCR の発現変動は Taqman array 法に従い検討を行った。

(4) EGFR のチロシンキナーゼ阻害薬である gefitinib 感受性ならびに gefitinib 耐性ヒト非小細胞肺癌細胞の培養を確立した後、 $\kappa$ オピオイド受容体作動薬である U50,488 を処置して、各種受容体作動薬によるがん細胞増殖への影響 (抗腫瘍効果) を MTT assay 法に従い検討した。

#### 4. 研究成果

(1)  $\kappa$ -オピオイド受容体作動薬である U50,488H 処置における非小細胞肺癌の細胞増殖能への影響について検討を行った。その結果、Gefitinib 感受性株である HCC827 細胞において、U50,488H 処置により、細胞生存率の低下が認められた。また、Gefitinib に耐性を示す H1975 細胞において、同様に、用量依存的かつ有意な細胞生存率の低下が認められた。さらに、これらの非小細胞肺癌に対して、正常細胞に影響を及ぼさない用量の U50,488H と Gefitinib を共処置することにより、U50,488H の用量依存的に細胞生存率の低

下が惹起されることが明らかとなった。これらの結果から、 $\kappa$ -オピオイド受容体を介した刺激は、細胞増殖抑制作用を有することが明らかとなった。さらに、Gefitinib との共処置で用いることにより、細胞増殖抑制作用の相乗効果が認められたことから、 $\kappa$ -オピオイド受容体作動薬は、既存の抗がん剤との併用においてさらなる有効性が期待される。さらに著者らは、 $\kappa$ -オピオイド受容体を介した刺激による、非小細胞肺癌の細胞増殖関連分子への影響について検討を行った。その結果、U50,488H の処置により、細胞増殖に特に重要とされている glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ) のリン酸化体の減少が認められた。一般に、GSK3 $\beta$  は wingless-related MMTV integration site (Wnt)- $\beta$ -catenin シグナルや PI3K-Akt シグナルの仲介分子として知られており、下流に存在する様々な増殖関連分子の発現を調節していることが報告されている。これらの結果より、 $\kappa$ -オピオイド受容体を介した刺激は、GSK3 $\beta$  のリン酸化を抑制することにより、GSK3 $\beta$  の活性化を維持することで、がん細胞自身の細胞増殖機構を制御していることが示唆された。(Kuzumaki et al., British journal of Cancer., 2012)

(2) 一方、EGFR と GPCR の相互作用が様々ながん細胞において関与することが報告されており、がんが増悪化する過程の中で GPCR が重要な役割を担うことが想定される。そこで、H1975 細胞における GPCR 発現変動の網羅的解析を行った。その結果、正常ヒト肺繊維芽細胞と H1975 細胞間では、GPCR 発現は大きく変動しており、発現が少ない GPCR よりも発現が多い GPCR が圧倒的に多いこと、さらに、発現が少ない GPCR においては Gi 結合型の割合が約半数を占めていることが明らかとなった。また、gefitinib 感受性ヒ

ト非小細胞肺癌 (HCC827) ならびに gefitinib 耐性ヒト非小細胞肺癌 (HCC827GR, H1975) においても、GPCR の発現変動について検討を行ったところ、 gefitinib 耐性ヒト非小細胞肺癌において、発現が増加した GPCR が数多く認められた。こうした結果を受け、発現変動率の大きかった GPCR を抽出し、標的の GPCR を刺激あるいは阻害することにより、 gefitinib 耐性非小細胞肺癌細胞の細胞増殖能の変化について、検討を行った結果、選択的阻害薬ならびに siRNA を用いて、アデノシン A2a 受容体 (A2aR) を阻害することにより、H1975 ならびに HCC827GR の細胞増殖への影響について検討を行ったところ、有意な抑制が認められた。以上、本研究により、EGFR 阻害薬の耐性獲得過程において、A2aR を始めとするいくつかの GPCR の発現変動が、がんの細胞増殖ならびに増悪化制御機構に一部関与している可能性が示唆された。(Kuzumaki et al., PLOS ONE, 2012)

がん治療領域において、分子標的薬の普及により、各組織あるいは各がん細胞を標的とした特異的な治療が可能になったものの、薬剤耐性がん細胞やがん幹細胞の出現により、がんの難治化および増悪化に難渋しているのが現状である。そのなかで、こうしたオピオイド受容体やアデノシン受容体を介した新しく非常にユニークな知見は、臨床における応用性が高く、新規治療法の確立に大いに役立つことが期待される。

##### 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 17 件)

1. Kuzumaki N, Suzuki A, Narita M, Hosoya T, Nagasawa A, Imai S, Yamamizu K, Morita H, Suzuki T, Okada Y, Okano HJ, Yamashita JK, Okano H, Narita M.: Multiple analyses of G-protein coupled receptor (GPCR) expression in the development of gefitinib-resistance in transforming non-small-cell lung cancer. PLoS One., 7(10):e44368 (2012) doi: 10.1371/journal.pone.0044368.査読有り
2. Kuzumaki N, Suzuki A, Narita M, Hosoya T, Nagasawa A, Imai S, Yamamizu K, Morita H, Nagase H, Okada Y, Okano HJ, Yamashita JK, Okano H, Suzuki T and Narita M.: Effect of kappa-opioid receptor agonist on the growth of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. Br J Cancer., 106(6):1148-52 (2012) doi: 10.1038/bjc.2011.574.査読有り
3. Yamamizu K, Furuta S, Katayama S, Narita M, Kuzumaki N, Imai S, Nagase H, Suzuki T, Narita M, Yamashita JK: The kappa opioid system regulates endothelial cell differentiation and pathfinding in vascular development. Blood. 118(3):775-85. (2011) doi: 10.1182/blood-2010-09-306001.査読有り

[学会発表] (計 7 件)

1. 葛巻直子、長澤阿津実、成田道子、濱田祐輔、岡野栄之、成田年: G-蛋白共役型受容体によるゲフィチニブ耐性ヒト非小細胞肺癌増殖制御の可能性、第 50 回日本癌治療学会学術集会、2012 年 10 月 25 日\*会期 10/25-27 (横浜)
2. 葛巻直子、成田年: Gefitinib 耐性ヒト

非小細胞肺癌細胞の増殖抑制機構における G-protein coupled receptor (GPCR) の役割、第 6 回緩和医療薬学会、2012 年 10 月 6 日\*会期 10/6-7 (神戸)

3. 葛巻直子、長澤阿津実、成田道子、濱田祐輔、岡野栄之、成田年：オピオイドによるゲフィチニブ耐性ヒト非小細胞肺癌細胞の増殖制御、第 32 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、2012 年 9 月 16 日\*会期 9/15-16 (JR 東京総合病院)

[図書] (計 3 件)

1. 葛巻直子、山水康平、濱田祐輔、長澤阿津実、山下 潤、成田 年、オピオイドが示す多彩な生理応答：血管新生やがん細胞増殖に及ぼす役割、ペインクリニック別冊秋号、新興交易、vol. 33: s251-259、2012
2. 葛巻直子 (分担翻訳): トワイクロス先生のがん緩和ケア処方薬-薬効・薬理と薬の使い方、4 中枢神経薬、抗うつ薬 p.160-189、監訳: 武田文和、鈴木勉、医学書院、2012

[産業財産権]

- 出願状況 (0 件)
- 取得状況 (0 件)

[その他]

ホームページ等 特になし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

葛巻 直子 (KUZUMAKI NAOKO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号: 10507669