HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	生体内腫瘍形成における神経ペプチド受容体NK2Rの効果に関する研究［全文の要約］
Author(s)	項, 慧慧
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2384 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13005号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70820
Type	doctoral thesis
File Information	Huihui_Xiang_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文（要約）

生体内腫瘍形成における神経ペプチド受容体 NK2R の効果に関する研究

(Studies on the effects of neuropeptide receptor, NK2R on tumorigenesis in vivo)

２０１８年３月

北　海　道　大　学

項　　慧 慧

大腸がんの発生や悪性化は、遺伝的背景に加え、日々の食生活やストレスなどの生活環境要因、あるいは他の慢性炎症性疾患や突然変異を誘導する物質を含む危険因子の摂取、暴露と関連すると考えられる。近年医学の進歩により、がん患者の生命予後は著しく向上したが、がんは依然として日本人の死亡原因の第一位であり、特に大腸がんは年々増加し続けている。また既存の分子標的薬などの抗がん剤治療や放射線治療などの標準治療に対して不応答の患者や治療後、再発や転移が生じるリスクも存在する。従って、生体内での大腸がんの発生および悪性化の制御機構は、複数かつ複雑に存在していることが考えられ、これまでとは異なる新しい方面からのがん制御研究も必要とされる。

神経ペプチドであるサブスタンスPやニューロキンニンA (NKA)は、神経伝達物質として中枢および末梢神経系に発現し、標的細胞上に発現する受容体 NK1R や NK2R を介して細胞機能を調節する。一般に NK1R や NK2R を介した神経ペプチドシグナルは、生体内において平滑筋の収縮や血管の透過性を制御することが知られている。これまで NK1R については、膠芽腫、肝芽腫、肺がんや大腸がんに発現し、がん細胞の増殖や生存に関与することが報告されている。一方、NK2R を介した神経ペプチドシグナルが、がん細胞の機能調節や生体内での腫瘍形成に関係する詳細な作用メカニズムについては報告が少ない。

そこで本研究において、大腸がん細胞の腫瘍形成や転移における NK2R を介した神経ペプチドシグナルの作用効果について、マウス担がんモデルを構築して検討し、生体内でのがん細胞の悪性化および転移能獲得メカニズムの解明を目的とした。

本研究で、神経ペプチド受容体 NK2R を介した神経ペプチドシグナルの生体内腫瘍形成に及ぼす効果を明らかにするために、はじめにマウス大腸がん CT26 細胞株に NK2R 遺伝子を導入し、NK2R を過剰発現させた細胞株を作出し、BALB/c マウスに移植して腫瘍形成を評価する担がんマウスモデルを構築した。NK2R 過剰発現 CT26 細胞を野生型 BALB/c マウスに皮内移植し、移植 5 日後より腫瘍径を計測して腫瘍形成能を評価した。また GFP を導入した NK2R 過剰発現 CT26 細胞をマウスの脾臓内に移植し、肝臓における転移巣形成能について *in vivo* イメージング法および肝組織を HE 染色することにより評価した。

次に、*in vitro* 実験系において、NK2R 阻害剤存在下で、CT26 細胞を培養し、MTT アッセイ法により、細胞の増殖および生存を評価した。また CT26 細胞を皮内移植するマウスモデルに対して、移植 5 日後より NK2R 阻害剤を局所投与し、腫瘍形成に及ぼす効果を検討した。さらに NK2R 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムにてノックアウトした CT26 細胞株を作出し、マウスに皮内および脾臓内に移植し、腫瘍形成能を評価した。

NK2R の発現制御メカニズムを解明するために、*in vitro* 培養系において、炎症性サイト

カインである IL-6、IL-17、TNF-αや IFN-α、IFN-βおよび IFN-γを使用して CT26 細胞を刺激し、NK2R の遺伝子発現レベルを定量 PCR 法により評価した。また IFN-α/βあるいは IFN-γ で CT26 細胞を刺激し、各種シグナル関連分子のリン酸化状態をウエスタンブロット法により確認した。さらに STAT1 阻害剤の存在下で、CT26 細胞を IFN-α/βあるいは IFN-γ で刺激し、NK2R 遺伝子発現レベルに及ぼす効果を確認した。

合成二本鎖 RNA で自然免疫を賦活する TLR3 リガンド polyI:C を CT26 皮内移植モデルに対して、移植 5 日後より投与した。マウスに形成した腫瘍組織より CD11c 陽性の樹状細胞および CT26 がん細胞について、フローサイトメトリーを活用した細胞単離システムにより回収した。回収した樹状細胞および CT26 がん細胞に発現している各種遺伝子群を定量 PCR 法により解析した。さらに CT26 皮内移植モデルマウスに対して、移植 5 日後より poly I:C と NK2R 阻害剤を併用投与し、腫瘍形成に及ぼす効果を検討した。

最後にヒト臨床応用への可能性を検討するために、ヒト大腸がん DLD-1 細胞株および肝細胞がん HLF 細胞株について、in vitro 実験系にて IFN-α/β、あるいは IFN-γ を用いて刺激し、NK2R の遺伝子発現レベルを定量 PCR 法により確認した。また DLD-1 細胞および HLF 細胞を NK2R 阻害剤存在下で培養し、MTT アッセイ法により、これらの細胞の生存、増殖を評価した。最後に、ヒトがん患者臨床検体を使用し、免疫組織染色法により各種腫瘍組織における NK2R の発現を検証した。

担がんマウスモデルを使用し、神経ペプチド受容体 NK2R を介した神経ペプチドシグナルの腫瘍形成に及ぼす効果を検討した結果、NK2R を過剰発現させた CT26 細胞はコントロール群に比べ、腫瘍形成能が増強した。また大腸がん転移マウスモデルにおいて、NK2R を過剰発現細胞は、転移巣形成が亢進した。

in vitro 培養評価系において、NK2R 阻害剤の添加濃度依存的に CT26 がん細胞の増殖および生存が阻害された。またマウス担がんモデルを使用し、NK2R 阻害剤投与の効果を検証した結果、コントロール群に比べ、NK2R 阻害剤投与群で腫瘍形成が有為に抑制された。さらに NK2R 遺伝子を欠損させることで、CT26 細胞は腫瘍の形成および肝転移巣の形成が明らかに抑制された。

マウス大腸がん CT26 細胞を IFN-α/β、あるいは IFN-γ で刺激することにより、NK2R 遺伝子の発現レベルが有意に上昇した。また、IFN-α/βあるいは IFN-γ の刺激後、転写活性化因子の一つである STAT1 のリン酸化が確認されるとともに、STAT1 阻害剤を添加することで、各刺激による NK2R 遺伝子の発現誘導が著しく抑制された。

担がんマウスモデルの腫瘍組織を解析した結果、腫瘍内に浸潤している樹状細胞において IFN-α/β 遺伝子およびニューロキン二ン A をコードする Tac1 遺伝子発現レベルが poly

I:C 投与群にて高値であった。また、CT26 がん細胞における NK2R 遺伝子発現レベルが poly I:C 投与により増加した。また、polyI:C の投与による抗腫瘍効果が、NK2R 阻害剤の併用によって増強した。

in vitro 培養系にて IFN-α/β あるいは IFN-γ で刺激したヒト大腸がん DLD-1 細胞およびヒト肝がん HLF 細胞の NK2R 遺伝子発現レベルが増加した。また、NK2R 阻害剤の添加濃度依存的に DLD-1 細胞および HLF 細胞の増殖および生存が抑制された。ヒト臨床検体を免疫染色法により精査した結果、大腸がん、肝細胞がんおよび子宮頸がん患者の腫瘍組織において NK2R が発現していることを確認した。

がん細胞の悪性化や転移能の獲得には様々な要因があると考えられる。本研究において、神経ペプチド受容体 NK2R の過剰発現が大腸がん細胞の生体内腫瘍形成および肝転移能を促進することを見出すとともに、NK2R 阻害剤の投与やがん細胞における NK2R 遺伝子の欠損により腫瘍形成および肝転移が抑制されることを見出した。これらの結果より NK2R を介した神経ペプチドシグナルが、生体内でのがん細胞の悪性化、転移能の獲得に関与することが考えられた。

また本研究で IFN-α/β や IFN-γ 刺激により、STAT1 依存的にがん細胞の NK2R が発現誘導されることが明らかとなった。さらに自然免疫アジュバントの一つで合成二本鎖 RNA である poly I:C を投与することで宿主免疫系を活性化させると、樹状細胞の IFN-α/β および Tac1 遺伝子の発現誘導とともに大腸がん細胞自身の NK2R 遺伝子の発現レベルが増強することを見出した。これらの結果から、活性化樹状細胞が神経ペプチドの産生細胞となり、大腸がん細胞の免疫逃避機構に寄与することやウイルス感染に起因するがんの発生とその増悪の過程において神経ペプチドシグナルが関与する可能性も考えられた。

今後、ウイルス感染を伴う慢性炎症や発がん過程における、がん細胞の NK2R を介した神経ペプチドシグナルの下流標的分子の同定とその腫瘍形成・転移能獲得メカニズムを精査することで、より詳細ながんの発症と悪性化に関する作用機序の解明と腫瘍の制御法の確立に繋がり、新しい視点での効果的ながん治療の開発に貢献できるものと考えられた。

本研究で、神経ペプチド受容体 NK2R は、免疫系の活性化で産生される IFN-α/β や IFN-γ の刺激により大腸がん細胞に発現誘導され、生体内での腫瘍形成および転移能獲得に深く関与することが示唆された。