



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
Author(s)	項, 慧慧
Description	配架番号 : 2384
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13005号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13005
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88843
Type	doctoral thesis
File Information	Huihui_Xiang.pdf



学 位 論 文

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)

2 0 1 8 年 3 月

北 海 道 大 学

項 慧 慧

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	6 頁
実験方法	8 頁
実験結果	15 頁
考察	28 頁
総括および結論	31 頁
謝辞	33 頁
引用文献	34 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Huihui Xiang, Yujiro Toyoshima, Naoki Okada, Shuhei Kii, Toshihiro Nagato, Hiroya Kobayashi, Akinobu Taketomi, Hidemitsu Kitamura
Neuropeptide signaling through neurokinin-2 receptor promotes tumorigenesis of cancer cells *in vivo*.
現在、The Journal of Experimental Medicine 誌へ投稿中
2. Yosuke Ohno, Yujiro Toyoshima, Hideaki Yurino, Norikazu Monma, Huihui Xiang, Kentaro Sumida, Shun Kaneumi, Satoshi Terada, Shinichi Hashimoto, Kazuho Ikeo, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi, Hidemitsu Kitamura
Lack of interleukin-6 in the tumor microenvironment augments type-1 immunity and increases the efficacy of cancer immunotherapy.
Cancer Science, 108 • 1959-1966, (2017)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 項 慧慧、ゴウダルジ ホウマヌ、飯笹 久、坂田 健一郎、樋田 泰浩、柳原 五吉、久保 貴紀、中川 宏治、小林 正伸、入村 達郎、浜田 淳一
低酸素刺激によって増強するヒト悪性胸膜中皮腫細胞の運動・浸潤能における HIF1 および MUC1 の役割
第 24 回日本がん転移学会学術集会, 2015 年 7 月 23-24 日・大阪
2. Huihui Xiang, Houman Goudarzi, Hisashi Iizasa, Ken-ichiro Sakata, Yasuhiro Hida, Kazuyoshi Yanagihara, Takanori Kubo, Koji Nakagawa, Masanobu Kobayashi, Tatsuro Irimura and Jun-ichi Hamada
Roles of MUC1 in motility and invasiveness of human malignant pleural mesothelioma cells enhanced under hypoxia
The 74th Annual meeting of the Japanese Cancer Association, 2015 October 8-10 • Nagoya

3. 項 慧慧、豊島 雄二郎、寺田 聖、本間 重紀、川村 秀樹、高橋 典彦、武富 紹信、
小林 博也、北村 秀光
神経ペプチドシグナルによる腫瘍形成促進メカニズム解明と新規がん治療法への
応用
第20回日本がん免疫学会, 2016年7月27-29日・大阪
4. Huihui Xiang, Yujiro Toyoshima, Satoshi Terada, Shigenori Homma, Hideki
Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi, Hiroya Kobayashi, Hidemitsu
Kitamura
Neuropeptide signaling through NK1R and NK2R of cancer cells is required for promotion
of tumorigenesis *in vivo*
The 75th Annual meeting of the Japanese Cancer Association, 2016 October 6-10・
Yokohama
5. Huihui Xiang, Yujiro Toyoshima, Satoshi Terada, Shigenori Homma, Hideki
Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu Taketomi, Hiroya Kobayashi, Hidemitsu
Kitamura
Neuropeptide signaling through NK1R and NK2R is related to inflammation and
tumorigenesis *in vivo*
The 45th Annual meeting of the Japanese Society for Immunology, 2016 December 5-7・
Okinawa
6. Huihui Xiang, Yujiro Toyoshima, Satoshi Terada, Shinichi Hashimoto, Kazuho Ikio,
Hiroya Kobayashi, Shigenori Homma, Hideki Kawamura, Norihiko Takahashi, Akinobu
Taketomi, Hidemitsu Kitamura
Neuropeptide signaling through NK2R is related to tumorigenesis *in vivo*
The 36th Sapporo Cancer International Symposium, 2017 June 22-24・Sapporo

緒 言

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。

興奮性の神経伝達物質でサブスタンス P (SP) やニューロキニン A (NKA)、ニューロキニン B、ヘモキニン-1、エンドキニンなどタキキニン類は中枢神経系や末梢神経系に広く分布している^{1,2}。SP と NKA はタキキニン-1 遺伝子(*TAC1*, *Tacr1*)によってコードされており、これらの物質は神経ペプチドとして良く知られている。また神経ペプチドとして、副交感神経に存在する血管作動性腸管ペプチドやタキキニンと同様に知覚神経 C 線維の末端に存在するカルシトニン遺伝子関連ペプチドが知られている。タキキニンの前駆タンパク質であるプレプロタキキニンは翻訳後のタンパク質分解プロセスによってペプチドに分解される。これらのペプチドは、構造的にも進化的にも保存された共通のカルボキシ末端配列である FXGLM-NH₂ を含むペプチド配列を持つ。一般に、SP や NKA はヒトにおいて、気道収縮や、血管拡張および血管透過性のような生命維持に重要な反応をコントロールすることが知られている (図 1)。

これらの神経ペプチドは、知覚神経系の活性化のみならず、炎症反応においても組織中で産生されることが知られている。また局所の組織損傷に対して神経から分泌される神経ペプチドは、多くの神経性炎症を誘導し、症状を悪化させるとされている。これまでの研究によると、SP は免疫担当細胞の様々な機能を制御することが示され、マスト細胞からの VEGF 分泌や³、NK 細胞の細胞傷害活性⁴、単球および T 細胞からのサイトカイン産生^{5,6}、マクロファージにおけるケモカインあるいはケモカインレセプターの誘導^{7,8}、および樹状細胞の抗原提示⁹などとの関連が報告されている。

SP や NKA などタキキニン類は、G タンパク質結合レセプター (GPCR) である、ニューロキニン-1 レセプター (NK1R)、ニューロキニン-2 レセプター (NK2R)、あるいはニューロキニン-3 レセプター (NK3R) を介して標的細胞の機能を調節し、末梢及び中枢神経系における神経伝達物質として作用する。NK1R および NK2R は、哺乳動物では異なる遺伝子、*TACR1* (*Tacr1*)、および *TACR2* (*Tacr2*) にそれぞれコードされており、細胞のシグナル伝達において重要な役割を果たす。これまでに SP は神経系の

細胞に加え、単球やマクロファージなどの免疫細胞に発現する NK1R に結合することが良く知られている。一方、NKA は NK2R に対して強いアフィニティーがある。最近の報告では、NK2R は神経細胞¹⁰、マウスのマクロファージ¹¹、COPD 患者の肺マクロファージ¹²、慢性膵炎からの組織¹³、および気道平滑筋¹⁴で発現することが確認されている。これまでの研究より、タキキニンおよびその受容体が、神経系や末梢器官系以外にも呼吸、心血管、内分泌および胃腸の活動を制御するいくつかの非神経細胞においても発現していることが明らかになった。このように SP、NKA を含むタキキニンは当初神経伝達物質として考えられていたが、多くの論文で NK1R と NK2R の発現が神経系以外の細胞、内皮細胞や繊維芽細胞、平滑筋細胞、および炎症性細胞で確認されていることから、NK1R や NK2R を介した神経ペプチドシグナルが神経系に加え、その他の組織で機能的に作用している可能性が考えられる。

これまで NK1R については、膠芽腫¹⁵⁻¹⁸、肝芽腫¹⁹、乳がん²⁰、胆道がん²¹、肺がんや大腸がん^{22,23}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。神経内分泌がんにおいて、紅潮、下痢、喘鳴および右心疾患を含む病勢に関連することが報告された。また SP-NK1R シグナル伝達は、重度のストレスまたは外科手術によって引き起こされる神経性炎症によって免疫抑制を誘導するだけでなく、腫瘍形成のための血流および血管新生を制御することで、がんの進行や転移を促進する可能性が示唆された。従って、神経ペプチド受容体を介した神経ペプチドシグナルは、生体内における生理学的機能に加えて、がんの発症や腫瘍の悪性化に関連する病理学的機能を調節する可能性があると考えられる。

最近の論文において、NK2R の遺伝子多形が、大腸がん患者のリンパ節転移の予測に有用であることが示された²³。さらに、臨床研究の報告ではニューロキニン A レベルは、IV 期小腸の神経内分泌腫瘍分化型患者の生存率を予測することが報告された²⁴。これらの知見は、NK2R を介した神経ペプチドのシグナルが慢性炎症や腫瘍形成に関連することが示唆された。しかし、SP-NK1R シグナル伝達カスケードと比較して、NKA-NK2R については、がん細胞の生体内での腫瘍形成および宿主免疫への関与など、胆がん生体での詳細な作用効果については、未だ報告が少ない。

これまで当教室の研究において、NK1R および NK2R がステロイド抵抗性重篤化喘息患者の肺病変組織に発現することを見出すとともに、NK2R 介した神経ペプチドシグナルが、樹状細胞 (DC) 機能を活性化することによって宿主免疫応答を賦活させることを見出した^{25,26}。また IFN- α 、IFN- β 、および IFN- γ などのタイプ-1 サイトカインや自然免疫を活性化する toll-like receptor (TLR) 4 リガンドである lipopolysaccharide (LPS)、および合成二本鎖 RNA で TLR3 リガンドである polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) などによる刺激は、DC の NK1R および NK2R 発現レベルを STAT1 に依存

的に増強することを確認し、これらの結果から免疫細胞においても神経ペプチドシグナルによる制御機構が存在し、慢性炎症や免疫応答に関連することを明らかにした。

そこで本研究において、NK2R を介した神経ペプチドシグナルが、宿主免疫系や、がん細胞の生体内での悪性化に関与するかどうかについて、マウス担がん生体モデルを構築して検証を行なった。その結果、がん細胞における NK2R の過剰発現により、生体内での腫瘍形成と肝転移能が亢進されることを見出した。また NK2R 阻害剤の投与、およびがん細胞の NK2R 遺伝子の欠損により、腫瘍形成と肝転移が抑制されることも確認した。さらに IFN- α/β あるいは IFN- γ の刺激がん細胞の NK2R 遺伝子が STAT1 依存的に発現誘導されることを明らかにした。また本研究で poly I:C の生体内投与によって腫瘍内に浸潤している DC が IFN- α/β のみならず、神経ペプチドをコードするタキキニン-1 遺伝子の発現レベルも増強されることを見出し、活性化した DC が神経ペプチド産生細胞の一つとなること、またがん細胞の NK2R の発現誘導を促進することで、神経ペプチドシグナルを増強させる可能性を見出した。さらにヒト臨床検体を使用した検証で、大腸がん、肝細胞がんおよび子宮頸がんの腫瘍組織において、がん細胞および病変部位に浸潤している細胞に NK2R の発現を認めた。

従って、本研究により NK2R を介した神経ペプチドシグナルの遮断は、慢性炎症性疾患に加え、がんの有望な治療戦略の一つとなり得る可能性が示唆されたと考えている。

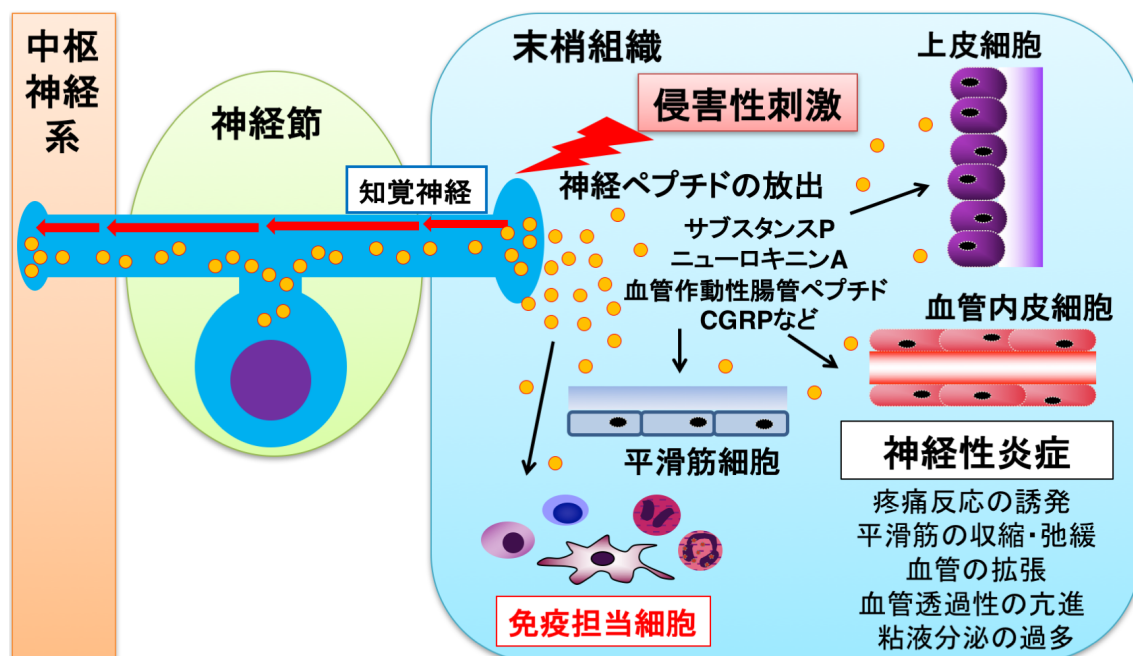


図1. 神経ペプチドによる生体機能の調節

侵害性の刺激により神経系から放出される神経ペプチドは、上皮細胞、血管内皮細胞や平滑筋細胞に作用し、疼痛反応の誘発、平滑筋の収縮・弛緩、血管の拡張、血管透過性の亢進や粘膜分泌の過多など、神経性炎症を誘発する。最近、神経ペプチドが免疫担当細胞にも作用し、細胞機能を制御する働きをもつことが報告されている。

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである。

7AAD	7-Aminoactinomycin D
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
DC	Dendritic cell
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
GFP	green fluorescent protein
GPCR	G protein-coupled receptor
HBV	hepatitis B virus
HCV	hepatitis C virus
HE	hematoxylin and eosin
HPV	human Papillomavirus
IBD	inflammatory bowel disease
IFN- α	interferon-alpha
IFN- β	interferon-beta
IFN- γ	interferon-gamma
IHC	immunohistochemistry
IL-6	interleukin 6
IL-17	interleukin 17
JAK	janus kinase
KO	knockout
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
MMP-2	matrix metalloproteinase-2
MT1-MMP	membrane type 1-matrix metalloproteinase
NK1R	neurokinin-1 receptor
NK2R	neurokinin-2 receptor
NK3R	neurokinin-3 receptor
NKA	neurokinin A

OE	overexpression
poly I:C	polyinosinic-polycytidylic acid
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
SP	substance P
TLR	toll-like receptor
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha

実験方法

実験動物

野生型BALB/cマウスはCharles River Japan (Kanagawa, Japan)より購入した。C57BL/6系統由来*Tacr2*^{-/-}マウスの精子についてKOMP Repository, University of California (Davis, CA, USA)より購入した。野生型BALB/cマウスと8回戻し交配してBALB/c系統由来*Tacr2*^{-/-}マウスを作出した。全てのマウスは、特定病原体不在 (SPF) 環境下で飼育され、6〜8週齢にて実験に使用した。本研究の遂行に伴う動物実験の計画 (14-0062) および遺伝子組み換え実験の研究計画 (2013-015) は、北海道大学の審査を受け承認された後に実施した。また動物実験は全て北海道大学の動物実験に関する規定に従って行った。

インフォームド・コンセント

ヒト臨床検体を用いた研究計画については、北海道大学大学院医学研究院 (14-043)、遺伝子病制御研究所 (14-0004)、旭川医科大学 (15143) の各倫理委員会の承認を得て行った。患者から臨床研究について説明し、文書による同意を得、また個人情報の保護を厳密に行なって実施した。

細胞株

マウス大腸がん CT26 細胞株 (CRL-2638) は、アメリカ Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。ヒト大腸線がん細胞株 DLD-1 (TKG 0379) は Cell Resource Center for Biomedical Research, Institute of Development, Aging and Cancer Tohoku University (Miyagi, Japan) より入手した。ヒト肝がん細胞株 HLF (JCRB0405) は、JCRB Cell Bank (Osaka, Japan) および肝細胞がん Hepa1-6 細胞株 (ATCC-CRL-1830) より入手した北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 I (武富紹信先生) から分与して頂いた。

試薬

フローサイトメトリー用の蛍光色素標識抗マウス CD45 抗体 (30-F11)、APC 標識抗マウス CD11c 抗体 (N418)、抗マウス H-2K^d 抗体 (AF6-88.5) および抗マウス I-A^d 抗体 (AF6-120.1) は、BioLegend (San Diego, CA, USA) あるいは BD Biosciences (San

Diego, CA, USA) より購入した。7AAD は Beckman Coulter (Brea, CA, USA) より購入した。免疫染色 (IHC) 用の抗 NK2R 抗体 (M-48) は Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。NK2R 選択的阻害剤 (GR 159897) は TOCRIS Bioscience (Bristol, UK) より購入した。リコンビナントマウス IFN- α (752802) は BioLegend より、IFN- β (8234-MB) は R&D systems Inc. (Minneapolis, MN, USA) より、IFN- γ (554587) は BD Biosciences より、それぞれ購入した。リコンビナントヒト IFN- α (592702) は BioLegend より、IFN- β (092-06061) は Wako Pure Chemical Industries より、IFN- γ (300-2) は PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ, USA) より、それぞれ購入した。Poly I:C (HMW) は InvivoGen (San Diego, CA, USA) より購入した。STAT1 阻害剤 (Fludarabine) は Selleckchem (Houston, TX, USA) より購入した。

細胞培養

CT26 細胞および DLD-1 細胞は、10% FCS、200 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン、10 mM HEPES、0.05 mmol/L メルカプトエタノールを添加した RPMI-1640 細胞培地 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を使用し、37°C、5% CO₂ 下で培養した。HCT-116 細胞と HLF 細胞は 10% FCS、抗生剤を添加した McCoy's-5A 培地 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) あるいは DMEM 培地 (High Glucose) (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) をそれぞれ使用して培養した。

CT26 細胞における *Tacr2* 遺伝子の過剰発現およびノックアウト細胞株作製

東京大学医科学研究所先端医療研究センターの北村俊雄先生から分与頂いた pMX-IRES-GFP プラスミドを使用し、GFP 導入したマウス CT26 細胞株及び NK2R (*Tacr2*) 遺伝子過剰発現 CT26 細胞を作成した。

マウス NK-2R CRISPR/Cas9 KO (sc-423253) と Control CRISPR/Cas9 KO Plasmids (sc-418922) は Santa Cruz Biotechnology 社より購入した。NK2R (*Tacr2*) 遺伝子ノックアウトおよびコントロール CT26 細胞は、CRISPR / Cas9 KO システムを用いて製造者のプロトコールに従って作出した。

皮内移植担がんマウスモデル

各種 CT26 細胞をそれぞれ 1×10^6 個、野生型 BALB/c マウスに皮内移植した (day 0)。移植 5 日より腫瘍径を計測し、腫瘍形成能を評価した。腫瘍サイズの評価は以下の公

式に従って計算して求めた。体積 (mm^3) = $0.2 \times (\text{高さ} [\text{mm}] \times \text{広さ} [\text{mm}]) \times (\text{長さ} [\text{mm}])$ 。GFP 遺伝子を導入した細胞は、腫瘍組織におけるがん細胞のフローサイトメトリーによる解析に使用された。移植後 5 日より、PBS (-) に溶解した NK2R 阻害剤 ($2.4 \mu\text{g}/\text{マウス}$) あるいは DMSO コントロールを腫瘍局所に 4 日ごとに投与した。治療実験では 移植後 5 日より、poly I:C ($50 \mu\text{g}/\text{マウス}$) および NK2R 阻害剤 ($2.4 \mu\text{g}/\text{マウス}$) を腫瘍局所に 4 日ごとに投与した。いくつかの実験では、腫瘍組織は、マウスから回収した。一部はコラゲナーゼ処置およびホモジナイズの後、全細胞をフローサイトメトリーにて解析を行なった。さらに一部の腫瘍は免疫組織学染色の検体として使用した (図 2)。



図 2. 大腸がん CT26 細胞皮下移植マウスモデルを使用した腫瘍形成の解析・評価

蛍光タンパク色素である GFP および NK2R 遺伝子を導入したマウス大腸がん CT26 細胞株、あるいは NK2R 遺伝子をノックアウトした CT26 細胞株を野生型 BALB/c マウスに皮下移植した。移植 5 日以降、生存率や腫瘍の計測を行うとともに、移植 14 日以降に、腫瘍をマウス生体より回収し、がん細胞あるいは腫瘍内に浸潤している免疫細胞について HE 染色、免疫染色、フローサイトメトリーおよび定量 PCR を行い、腫瘍の形成および腫瘍環境下の免疫状態を解析・評価した。

大腸がん肝転移マウスモデル

GFP 遺伝子を導入した CT26 細胞 (2×10^5 個) を、野生型 BALB/c マウスに脾臓内移植した。移植 14 日後における肝臓組織の転移巣形成について生体イメージングシステム (IVIS Spectrum, Xenogen) により解析・評価した。一部のマウスの肝臓組織は、HE 染色用のサンプルとして用いた (図 3)。

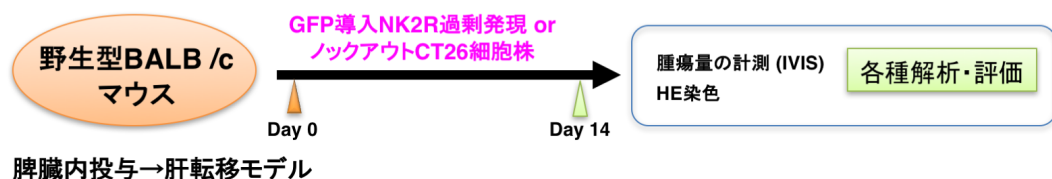


図 3. 大腸がん肝転移マウスモデルを使用した肝転移巣形成能の解析・評価

蛍光タンパク色素である GFP および NK2R 遺伝子を導入したマウス大腸がん CT26 細胞株、あるいは NK2R 遺伝子をノックアウトした CT26 細胞株を野生型 BALB/c マウスに脾臓内移植した。移植 14 日後に、マウスより肝臓を回収し、転移巣を形成した腫瘍を *in vivo* イメージングシステム (IVIS) あるいは HE 染色することにより、解析・評価した。

細胞生存率アッセイ

Cell counting kit-8 (CCK-8) (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan) を用いた細胞増殖試験を行った。対数増殖期にある各種がん細胞を計数し、5000 cells/well となるよう 96 穴マイクロプレートの各ウェルに 100 μ L ずつ播種し、CO₂ インキュベーター内で前培養した。各濃度の NK2R 阻害剤 (0, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM) を 10 μ L ずつ添加し、24 時間あるいは 48 時間培養した。CCK-8 溶液を 5 μ L ずつ添加し、CO₂ インキュベーター内にて 4 時間、呈色反応を行った。反応後、マイクロプレートリーダー (IWAKI, Shizuoka, Japan) を使用し、450 nm の吸光度を測定した。

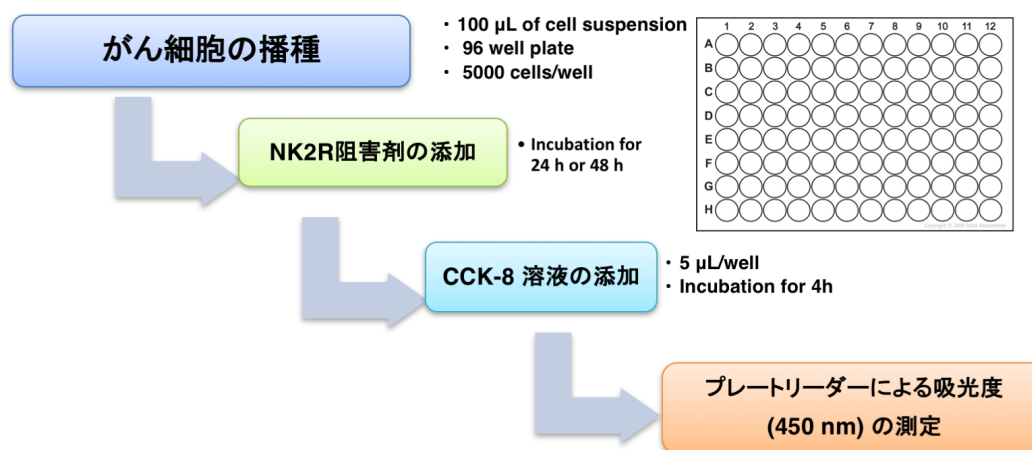


図 4. *in vitro* 培養系によるがん細胞の増殖および生存の解析・評価

各種マウスあるいはヒトがん細胞株 (5000 cells/well) を 96 穴プレートに播種し、NK2R 阻害剤存在下で 24 時間あるいは 48 時間培養した。さらに市販のキット試薬を 4 時間添加し、細胞の生存あるいは増殖について、吸光度 (450nm) をプレートリーダーにて測定し、解析・評価した。

PCR 解析

細胞および組織より全 RNA を ISOGEN RNA extraction kit (Nippon gene, Toyama, Japan) を用いて抽出し、波長 260 nm の吸光度で RNA 濃度を測定した。得られた全 DNA は逆転写 PCR により cDNA を得た。得られた cDNA をテンプレートとし、各遺伝子について、下記に示す特異的プライマーを用いて、サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) により増幅した。マウス NK2R (*Tacr2*) ; (forward:

5'-TGCTGGTGGCTGTAACAGGCAACG-3', reverse:
 5'-TAGAAACATTGTGGGGAGGCGAGAGC-3'), マウス β -actin (*Actb*) ; (forward:
 5'-GTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3', reverse:
 5'-TTTGATGTCACGCACGATTTCC-3')。得られた PCR 産物を 2% アガロースゲルに
 電気泳動を行い、標的遺伝子の増幅について解析システム (AE6920 M-FX, ATTO
 Corporation, Tokyo, Japan) を用いて確認した。

また、マウス NK2R (*Tacr2*)、IFN- α (*Ifna*)、IFN- β (*Ifnb*)、tachykinin-1 (*Tac1*)、 β -actin (*Actb*)
 遺伝子およびヒト NK2R (*TACR2*)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)
 遺伝子の発現レベルの解析を、定量 PCR に実施した。下記特異的プライマーおよびユ
 ニバーサルプローブを用い、CFX 連接定量 PCR 測定システム (BIO-RAD, CA, USA)
 により標的遺伝子の増幅を行った。各遺伝子におけるプライマー配列およびプローブ
 の番号は、以下の通りである。

マウス NK2R (*Tacr2*) ; (forward: 5'-GCAGGTCTACCTGGCACTCT-3', reverse:
 5'-GGAATCCAGAGCGAAACCT-3', Universal probe: #22)、マウス IFN- α (forward:
 5'-TCAAGCCATCCTTGTGCTAA-3', reverse:
 5'-GTCTTTTGATGTGAAGAGGTTCAA-3', Universal probe: #3)、マウス IFN- β ;
 (forward: 5'-CTGGCTTCCATCATGAACAA-3', reverse:
 5'-AGAGGGCTGTGGTGGAGAA-3', Universal probe: #18)、マウス tachykinin-1 (*Tac1*) ;
 (forward: 5'-GGCCAAGGAGAGCAAAGA-3', reverse:
 5'-CGAGGATTTTCATGTTTCGATT-3', Universal probe: #107)、マウス β -actin (*Actb*) ;
 (forward: 5'-AAGGCCAACCGTGAAAAGAT-3', reverse:
 5'-GTGGTACGACCAGAGGCATAC-3', Universal probe: #56)、ヒト NK2R (*TACR2*) ;
 (forward: 5'-AGAGAACGGCAGGGAAGC-3', reverse: 5'-AGCCTCTCTCCAGGCTTTG-3',
 Universal probe: #23)、ヒト glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) ;
 (forward: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3', reverse:
 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3', Universal probe: #60)。各遺伝子の発現はハウスキ
 ーピング遺伝子である β -actin あるいは *GAPDH* を用いて標準化し、 $\Delta\Delta Ct$ 法 ($\Delta Ct =$
 $\Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{reference}}$) により相対的に比較検討した。

ウェスタン・ブロッティング

CT26 細胞を 6 cm ディッシュに播種し、37 度 5% CO₂ 加湿インキュベーターで予備
 培養した後、マウス IFN- α 、IFN- β あるいは IFN- γ (各 50 ng/ml) を添加し、30 分間添加
 反応させた、冷 PBS (-) を用いて 2 回洗浄後、NaF、Na₃VO₄ と Protease Inhibitor Cocktail
 set1 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) を添加した冷 RIPA バッファーを用い

て、氷上でスクレーパーを用い細胞を回収した。15000rpm、15 分間、4 °Cで遠心し、上清を回収し、全細胞可溶性サンプルを得た。抽出したタンパク質は、SDS サンプルバッファー添加し、95 °Cで5 分間加温して変性させた。各タンパクは10 µL ずつ、SDS ポリアクリルアミドゲルを使用し、電気泳動 (SDS-PAGE) した。セミドライトランスブロット装置を用いて PVDF 膜 (Millipore, Billerica, MA) に泳動分離したタンパク質を転写した。ブロッキング後、抗 phospho-JAK1 (J3251, Sigma)、phospho-JAK2 (J33, Sigma)、phospho-STAT1(9167, Cell Signaling)、phospho-MEK1/2 (2338, Cell Signaling)、phospho-ERK1/2 (4370, Cell Signaling)、phospho-p38 MAPK (4511, Cell Signaling)あるいは α -tubulin(clone DM1A, Sigma-Aldrich) 抗体を 4°Cで 12 時間反応させた後、HRP 標識抗マウス IgG (NA9310V, GE Healthcare)や抗マウス/ラット IgG 抗体(NA9340V, and GE Healthcare)にて、室温で1 時間反応させた。タンパク質の PVDF 膜へのブロットは Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Life Sciences, UK)を使用し、測定ならびに評価には LAS4000 mini (GE Healthcare, USA) および Image J software (National Institutes of Health, MD, USA) を使用した。

フローサイトメトリーによる解析と細胞の単離

マウス担がんモデルより腫瘍組織を切除して回収し、さらに細切した後、コラゲナーゼ(1 mg/mL)で処理した。マウスの腫瘍組織から得られた CT26 がん細胞および腫瘍浸潤細胞を含む全細胞を回収した。各種蛍光標識抗体を用いて細胞を染色し、FACSCanto II (BD Biosciences)によるフローサイトメトリーを行なった。得られたデータを FlowJo ソフトウェア(Tree Star, Ashland, OR, USA)を用い解析し、CD45 陽性細胞において CD11c、I-A^dおよび H-2K^dの表面発現レベルを評価した。各サンプルの平均蛍光強度(MFI) 比率は、以下の式 (サンプル Δ MFI(標的マーカーMFI-アイソタイプコントロール MFI/コントロールサンプル Δ MFI $\times$ 100)にて、計算して求めた。

NK2R 阻害剤(0, 10 µM, 100 µM, 1 mM)を各種がん細胞に対して添加し、24 時間あるいは 48 時間培養した後、トリプシンで処理して回収した。得られた細胞について、7AAD を用いて死細胞の染色を行い、FACSCanto II (BD Biosciences) を使用して 7AAD 陽性細胞の割合を求め、細胞の生存を評価した。

マウス担がん生体モデルの腫瘍組織より回収した全細胞について、抗 CD45 抗体および抗 CD11c 抗体および 7AAD を使用して染色し、7AAD 陰性の CD45⁺CD11c⁺細胞および CD45⁺GFP⁺CT26 細胞を、FACSAriaII (BD Biosciences) によって単離した。

免疫組織化学染色 (IHC)

CT26 担がんマウスモデルから得た腫瘍組織について、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液を使用して固定した後、パラフィンを用いて包埋標した。脱パラフィンした後に、HE 染色を行なった。CD11c の発現について、試薬キット(415211, Nichirei Bioscience, Inc., Tokyo, Japan)を使用して抗原を賦活化し、また内因性ペルオキシダーゼは0.3%の過酸化水素を使用して不活化した。洗浄後、一次抗体として抗CD11c抗体(GTX74940; GeneTex)を反応させた。反応後に3回洗浄し、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス/ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Histofine Simple Stain MAXPO、ニチレイ) で反応させた。洗浄後に Mayer のヘマトキシリンで核染色を行った。3,3'-diaminobenzidine-4 HCL を用い、CD11c タンパク質の発現を可視化した。同様に、リン酸化 STAT1 の検出について、抗リン酸化 STAT1 抗体 (9167, Cell Signaling Technology) を使用して実施した。

大腸がん(2例)、肝細胞がん(2例)および子宮頸がん患者(9例)の腫瘍組織をホルマリン固定し、パラフィン包埋し、切片を HE 染色した。スライドを NK2R 抗体(M-48, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)に処理した。洗浄後にヘマトキシリンで核染色を行った。3,3'-diaminobenzidine-4 HCL を用いた蛋白質発現を可視化した最後に、すべての切片を Mayer のヘマトキシリンで対比染色した。

統計学的分析

In vitro の実験系では少なくとも3~5回以上、独立して行なった。マウス生体内モデルの実験は、各群4~10匹マウスずつ、2~3回以上独立して実施した。代表的な結果が図中に示されている。各データ群について平均値およびSDを計算して求めた。多群間での比較について、一元配置分散分析(ANOVA)とDunnettの多重検定を行なった。一部の実験で、二群間の差を評価する場合、Studentの*t*検定を用いて評価した。本研究では $P<0.05$ を有意差ありと判定した。

実験結果

NK2R遺伝子*Tacr2*過剰発現させたマウス大腸がん細胞は、生体内における腫瘍形成および転移巣形成能が亢進する

NK2R を介してニューロペプチドシグナルは生体内腫瘍形成に関与するかどうかを調べるために、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た。NK2R を過剰発現している CT26 細胞およびコントロール細胞をそれぞれ野生型 BALB/c マウスに皮下移植した。NK2R を過剰発現しているマウス大腸がん細胞は、コントロール細胞に比べ、マウス生体内における腫瘍形成能が高いことを見出した (図 5a-c)。

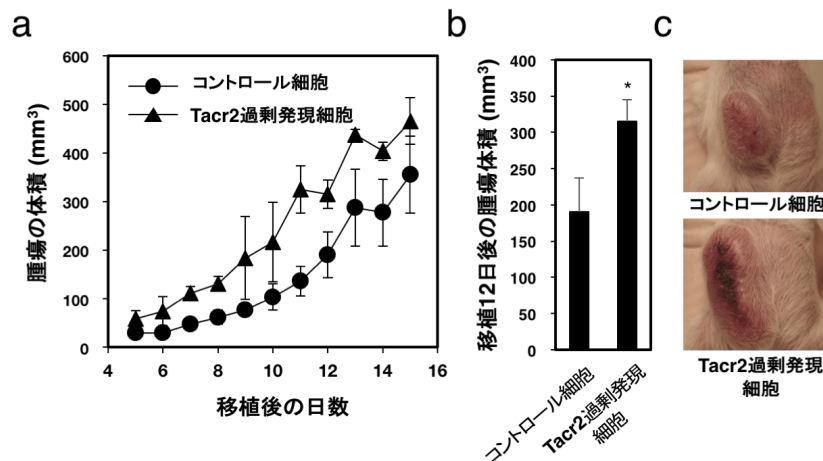


図 5. NK2R 過剰発現マウス大腸がん (CT26) 細胞の生体内における腫瘍形成能

NK2R 遺伝子 (*Tacr2*) を過剰発現している CT26 細胞およびコントロール細胞 (各 1×10^6 個) を、野生型 BALB/c マウスに皮下移植した。(a) 移植 5 日後より 15 日まで腫瘍径を計測し、腫瘍形成能を評価した。(b) 移植後 12 日における腫瘍量の比較。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。(c) 移植後 15 日の代表的な担がんマウスの写真。本検討の結果、神経ペプチド受容体 NK2R を過剰発現しているマウス大腸がん細胞は、コントロール細胞に比べ、生体内における腫瘍形成能が高いことが分かった。

次に、肝臓組織の生体内画像処理システム (IVIS) と HE 染色を使用して NK2R 過剰発現を大腸がん細胞の肝転移に対する効果を評価した。NK2R を過剰発現している GFP 導入 CT26 細胞およびコントロール細胞をそれぞれ野生型マウスに脾臓内移植した。IVIS と HE 染色結果より、*Tacr2* を過剰発現する CT26 細胞は肝転移巣の形成能が高いことを認めた(図 6a-d)。

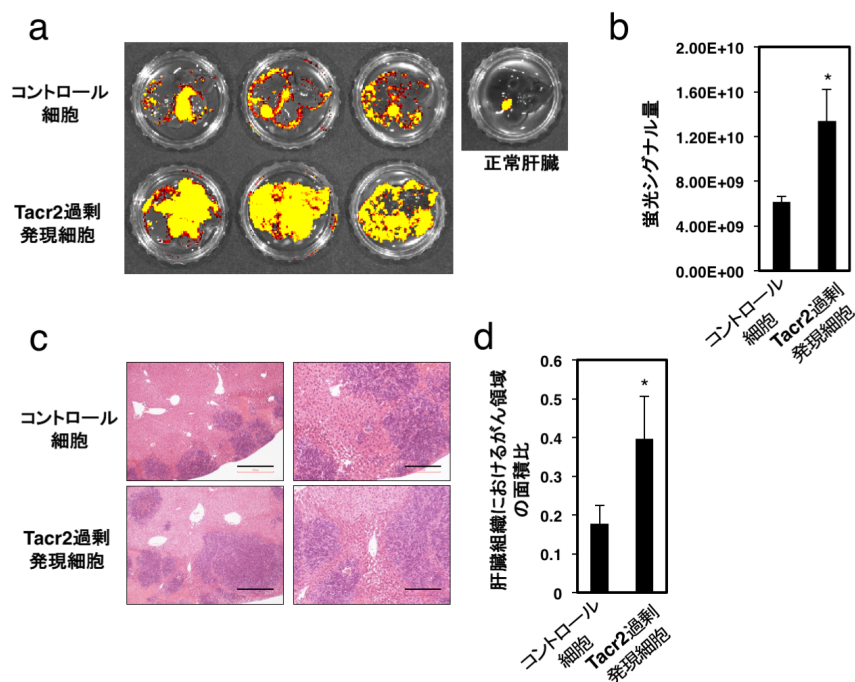


図 6. NK2R 過剰発現マウス大腸がん(CT26)細胞の肝転移巣形成能

NK2R 遺伝子(*Tacr2*)を過剰発現している GFP 導入 CT26 細胞およびコントロール細胞 (各 2×10^5 個) を、野生型 BALB/c マウスに脾臓内移植した。(a) 移植後 14 日における肝臓組織の転移巣形成能について *in vivo* イメージング法によりを評価した。(b) 移植後 14 日における肝臓組織における蛍光シグナル量の比較 (N=3) *は $P < 0.05$ を示す。(c) 移植後 14 日における肝臓組織の HE 染色像。写真内の線は 500 μm (左側)および 200 μm (右側) を示す。(d) 移植後 14 日における肝臓組織に対する腫瘍領域の面積比。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。本検討から、神経ペプチド受容体 NK2R を過剰発現しているマウス大腸がん細胞は肝転移巣形成能が高いことが分かった。

これらのデータから、大腸がん細胞において NK2R を過剰発現は生体内の腫瘍形成および肝転移を促進することが示唆された。

***in vivo* 及び *in vitro* で NK2R を介してニューロペプチドシグナルの遮断は、大腸がん細胞の生存、増殖および腫瘍形成を抑制する**

さらに NK2R による神経ペプチドシグナルが *in vitro* におけるがん細胞の生存及ぼす増殖と *in vivo* の腫瘍形成に効果を調べた。CT26 細胞の形態は、選択的 NK2R 阻害剤の添加によって変化した(図 7 a)。NK2R 阻害剤を添加することにより、7AAD 陽性の CT26 細胞の割合が用量依存的に増加した(図 7b)。24 時間から 48 時間まで 100 μM NK2R 阻害剤が存在下で CT26 細胞の増殖が有意に阻害されることを確認した(図 7 c)。

これらのデータから、このアッセイにおいて、NK2R 阻害剤の IC₅₀ が 226 μ M であると推定した。

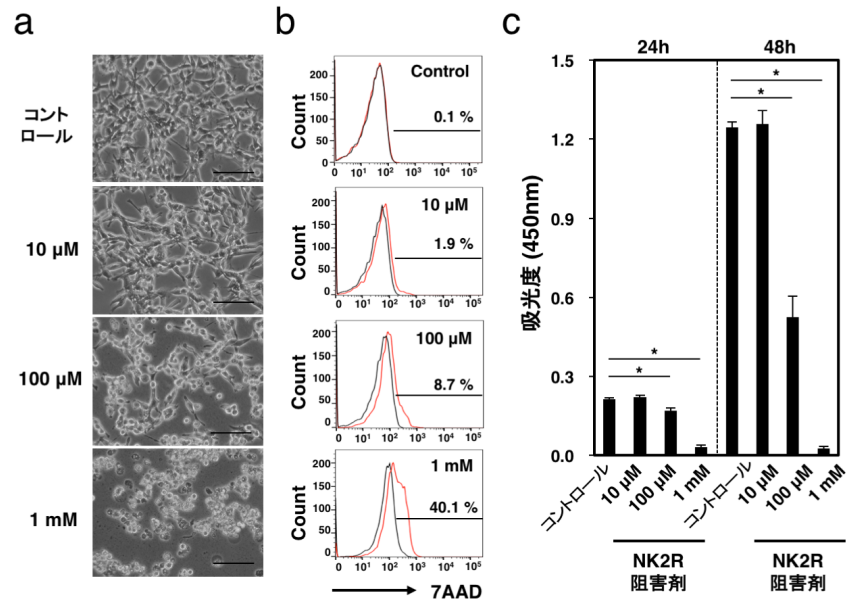


図 7. マウス大腸がん (CT26) 細胞の増殖・生存に及ぼす NK2R 阻害剤の効果
(a) CT26 細胞 (5×10^5 個) を NK2R 阻害剤 (0, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM) で 24 時間処理した際の CT26 細胞の形態写真。写真内の線は 100 μ m を示す。(b) CT26 細胞 (5×10^5 個) を NK2R 阻害剤 (0, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM) で 24 時間処理した際の 7AAD 陽性細胞の割合。(c) CT26 細胞 (2×10^3 個) を NK2R 阻害剤 (0, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM) で 24 時間および 48 時間処理した際の MTT アッセイによる細胞増殖の検討結果。*は Dunnett の多重検定によるコントロールに対する有意差 ($P < 0.05$) を示す。本見当から、マウス大腸がん細胞を NK2R 阻害剤で処理すると、細胞増殖が抑制され細胞死へと至ることが分かった。

さらに、生体内で NK2R 阻害剤が腫瘍形成に効果を調べるために、NK2R 阻害剤を CT26 担がんマウスの腫瘍局所に投与して腫瘍形成に効果を評価した。その結果、コントロールに対して、NK2R 阻害剤投与して皮内移植マウスモデルの腫瘍形成を有意に抑制した(図 8a-c)。

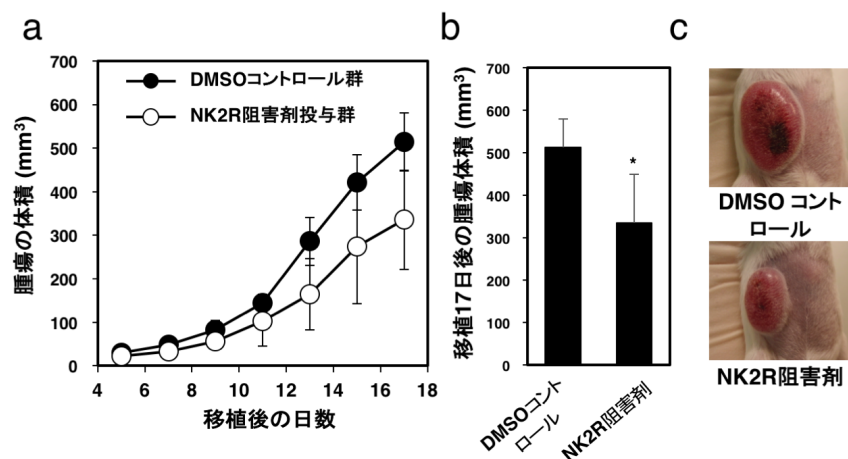


図 8. マウス大腸がん細胞 (CT26) 移植モデルに対する NK2R 阻害剤の投与による腫瘍形成への作用効果

CT26 細胞 (1×10^6 個) を、野生型 BALB/c マウスに皮内移植した。移植後 5 日より、NK2R 阻害剤 (2.4 μg /マウス) を腫瘍局所に 4 日ごとに投与した。(a) 移植 5 日後より 17 日まで腫瘍径を計測し、腫瘍形成能を評価した。(b) 移植後 17 日における腫瘍量の比較。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。(c) 移植後 16 日の代表的な担がんマウスの写真。本検討から、マウス大腸がん細胞移植モデルに対する NK2R 阻害剤の局所投与は、腫瘍形成を抑制することが分かった。

これらのデータから、NK2R を介した神経ペプチドシグナルががん細胞の生存、増殖および腫瘍形成に寄与していることが示唆された。

がん細胞におけるNK2R遺伝子の欠損は宿主ではなく、腫瘍の悪性化に関する

がん細胞におけるNK2R を介した神経ペプチドシグナルの作用効果を検証するために、NK2R 遺伝子 (*Tacr2*) を欠損した CT26 細胞株を作成し、野生型マウスに皮内移植した。コントロールに比較して *Tacr2* KO CT26 群のマウス腫瘍増殖能が有意に低下することを認めた (図 9a-c)。

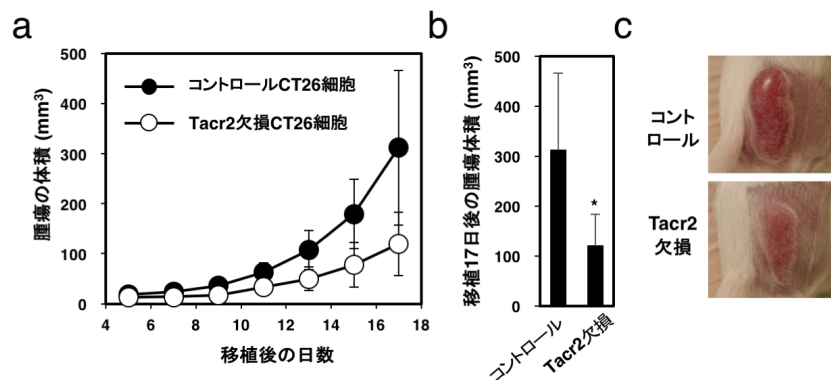


図9. NK2R 欠損マウス大腸がん (CT26) 細胞のマウス移植モデルにおける腫瘍形成能
NK2R 遺伝子 (*Tacr2*) を欠損した CT26 細胞およびコントロール細胞 (1×10^6 個) を、野生型 BALB/c マウスに皮下移植した。(a) 移植 5 日後より 17 日まで腫瘍径を計測し、腫瘍形成能を評価した。(b) 移植後 17 日における腫瘍量の比較。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。(c) 移植後 14 日の代表的な担がんマウスの写真。本検討から、NK2R を欠損した CT26 細胞は、マウス生体内において腫瘍形成能が低下することが分かった。

さらに、大腸がん肝転移マウスモデルにおいて、生体イメージング解析と HE 染色による評価を実施したところ、*Tacr2* 遺伝子の CT26 細胞群は肝転移巣形成能が有為に減少することを認めた(図 10a-c)。これら結果から、NK2R 遺伝子の欠損は腫瘍の転移能及ぼす悪性化に関与することが確認された。

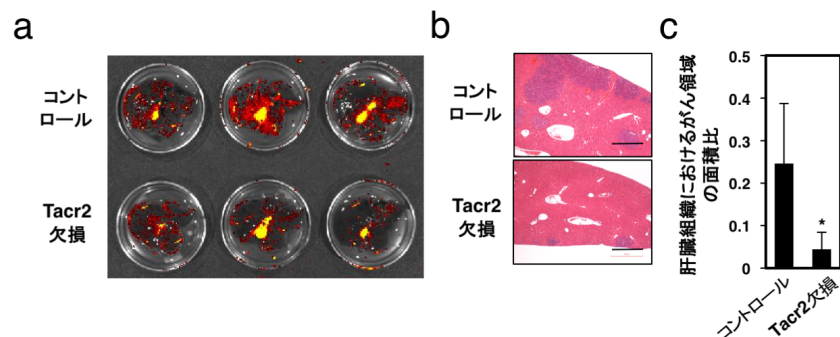


図 10. NK2R 欠損マウス大腸がん (CT26) 細胞のマウス肝転移モデルにおける肝転移巣形成能

NK2R 遺伝子(*Tacr2*)を欠損した GFP 導入 CT26 細胞およびコントロール細胞 (各 2×10^5 個)を、野生型 BALB/c マウスに脾臓内移植した。(a) 移植後 14 日における肝臓組織の転移巣形成能について *in vivo* イメージング法によりを評価した。(b) 移植後 14 日における肝臓組織の HE 染色像。写真内の線は 500 μm を示す。(c) 肝臓組織に対する腫瘍部位の面積比。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。本検討から、NK2R を欠損したマウス大腸がん細胞は、生体内での肝転移巣形成能が低いことが分かった。

ここで、NK2R 遺伝子の欠損の効果について、がん細胞か宿主細胞かどうかを確認するため、*Tacr2* 遺伝子欠損 (*Tacr2*^{-/-}) マウスを用いて、宿主細胞上の NK2R 発現が腫瘍形成の低下に関与しているかどうかを検討した。マウス大腸がん CT26 細胞を野生型 BALB/c (*Tacr2*^{+/+}) マウスおよび NK2R 遺伝子を欠損した *Tacr2*^{-/-} マウスに皮下移植した。野生型 (*Tacr2*^{+/+}) マウスと比べて、*Tacr2*^{-/-} マウスにおいて抑制されなかった(図 11a-c)。

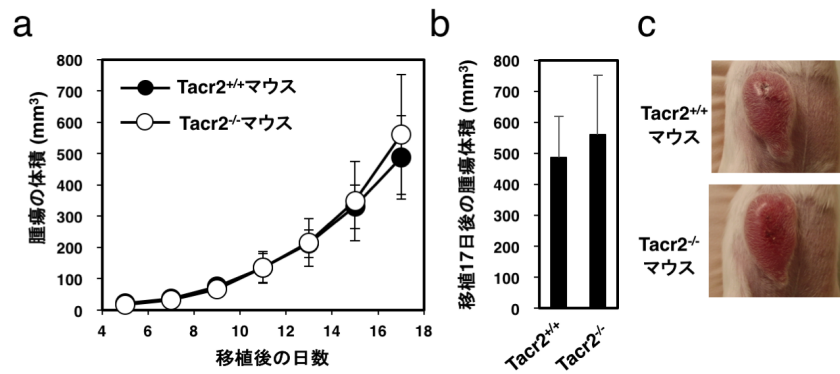


図 11. NK2R 欠損マウスにおけるマウス大腸がん (CT26) 細胞の腫瘍形成能
マウス大腸がん CT26 細胞 (1×10^6 個)を、野生型 BALB/c マウス ($Tacr2^{+/+}$) および NK2R 遺伝子を欠損したマウス ($Tacr2^{-/-}$) に皮内移植した。(a) 移植 5 日後より 17 日まで腫瘍径を計測し、腫瘍形成能を評価した。(b) 移植後 17 日における腫瘍量の比較。(c) 移植後 14 日の代表的な担がんマウスの写真。本検討から、NK2R を欠損したマウスにおいてマウス大腸がん細胞の腫瘍形成能は低下しないことが分かった。

これらのデータから、宿主側の細胞ではなく、がん細胞における NK2R 遺伝子の発現が本担がんモデルにおける腫瘍形成および肝転移の促進に関与していることが示唆された。

IFN- α/β およびIFN- γ は、STAT-1依存的にがん細胞におけるNK2R遺伝子の発現レベルを増強する

以前の研究^{25, 26}で、IFN- α/β 、IFN- γ 、LPS、及び polyI : C を用いた刺激がマウスおよびヒト樹状細胞における NK2R 遺伝子の発現を誘導することを明らかにした。さらに STAT1 阻害剤で処理することで IFN- α 、IFN- β および IFN- γ 刺激で増強した NK2R 遺伝子レベルが著しく抑制されることを確認し、タイプ-1 サイトカインが STAT1 依存的に樹状細胞における NK2R 遺伝子の発現誘導することで神経ペプチドシグナル伝達が増強することを報告した。

そこで本研究で、TNF- α 、IL-6、IL-17 および IFN- γ の各種炎症性サイトカインで刺激した CT26 大腸がん細胞における *Tacr2* 発現レベルを検証することで、がん細胞において NK2R 遺伝子発現を制御する因子を探索した。その結果、TNF- α 、IL-6、および IL-17 ではなく、IFN- γ によって 24 時間刺激した後、CT26 細胞において *Tacr2* 発現レベルが上昇することを見出した(図 12a, b)。

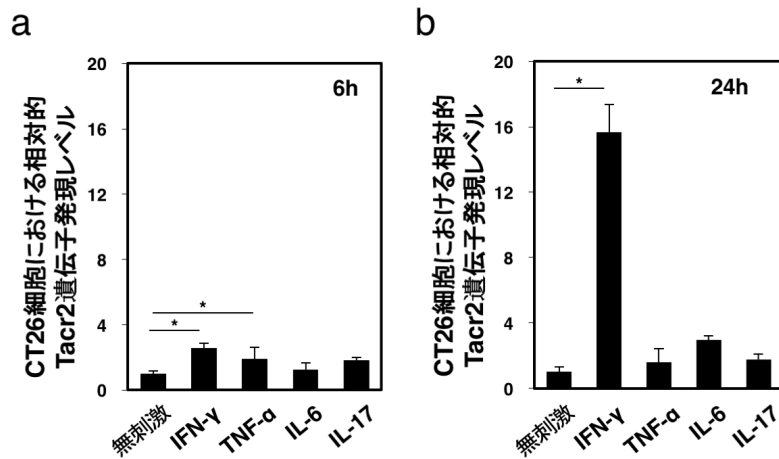


図 12. マウス大腸がん (CT26) 細胞の各種サイトカイン刺激による NK2R 遺伝子発現レベル

CT26 細胞 (5×10^5 個) を IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 および IL-17 (各 50 ng/mL) で 6 時間あるいは 24 時間刺激を行なった。(a) 6 時間の刺激での NK2R 遺伝子 (*Tacr2*) 発現レベル (b) 24 時間の刺激での NK2R 遺伝子発現レベル *は Dunnett の多重検定によるコントロールに対する有意差 ($P < 0.05$) を示す。本検討から、マウス大腸がん細胞を IFN- γ で刺激すると NK2R 遺伝子発現レベルが増強することが分かった。

また、IFN- α および IFN- β による刺激では、IFN- γ 刺激と比較して早い段階で CT26 細胞の *Tacr2* 発現を誘導することも見出した(図 13a-c)。

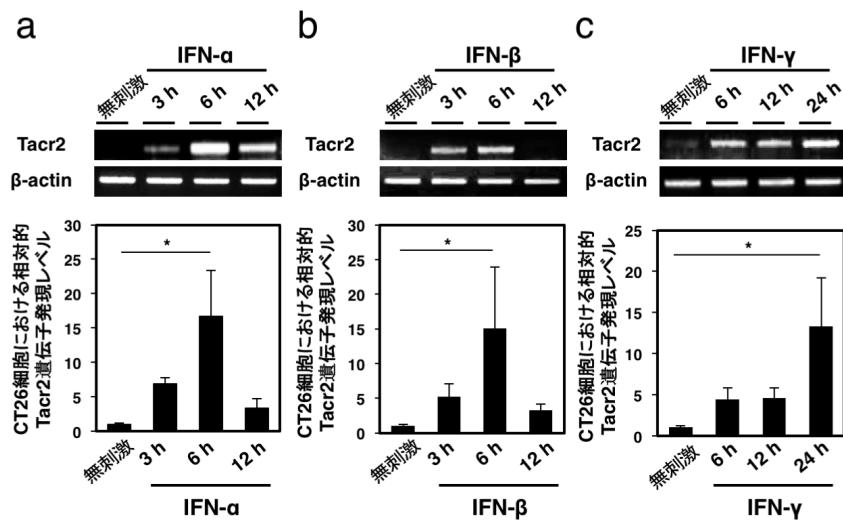


図 13. マウス大腸がん(CT26)細胞の IFN- α 、IFN- β および IFN- γ 刺激による NK2R 遺伝子発現レベル

CT26 細胞(2×10^5 個)を IFN- α および IFN- β (各 50 ng/mL)で 3 時間、6 時間あるいは 12 時間刺激し、IFN- γ (各 50 ng/mL) で 6 時間、12 時間あるいは 24 時間刺激を行なった。(a) IFN- α の刺激での NK2R 遺伝子発現レベル。(b) IFN- β の刺激での NK2R 遺伝子発現レベル。(c) IFN- γ の刺激での NK2R 遺伝子発現レベル。*は Dunnett の多重検定によるコントロールに対する有意差 ($P < 0.05$) を示す。本検討から、マウス大腸がん細胞を

IFN- α/β あるいは IFN- γ で刺激すると NK2R 遺伝子発現レベルが増強することが分かった。

さらに、マウス肝がん Hepa1-6 細胞においも、IFN- α/β および IFN- γ 刺激によって *Tacr2* 遺伝子発現を誘導することを確認した(図 14a-c)。

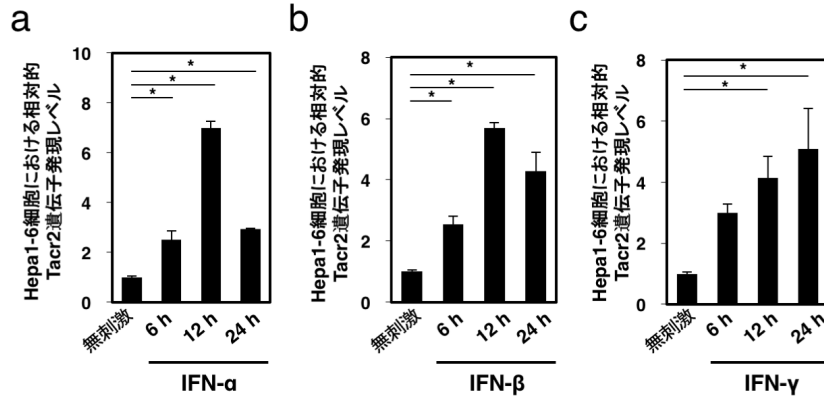


図 14. マウス肝細胞がん (Hepa1-6) 細胞の IFN- α 、IFN- β および IFN- γ 刺激による NK2R 遺伝子発現レベル

マウス肝細胞がん Hepa1-6 細胞(2×10^5 個)を IFN- α および IFN- β (50 ng/mL) で 6 時間、12 時間あるいは 24 時間刺激し、IFN- γ (各 50 ng/mL) で 6 時間、12 時間あるいは 24 時間刺激を行なった。(a) IFN- α の刺激での NK2R 遺伝子(*Tacr2*)発現レベル。(b) IFN- β の刺激で NK2R 遺伝子(*Tacr2*)発現レベル。(c) IFN- γ の刺激での NK2R 遺伝子 (*Tacr2*) 発現レベル。*は Dunnett の多重検定による無刺激群に対する有意差 ($P < 0.05$) を示す。本検討から、マウス肝細胞がん細胞を IFN- α/β あるいは IFN- γ で刺激すると NK2R 遺伝子発現レベルが増強することが分かった。

次に、CT26 がん細胞を IFN- α 、IFN- β あるいは IFN- γ で刺激すると STAT1 のリン酸化が亢進することを確認した(図 15a)。さらに CT26 がん細胞を STAT1 阻害剤存在下で、IFN- α 、IFN- β あるいは IFN- γ で刺激すると、刺激後に発現上昇する NK2R 遺伝子 (*Tacr2*)レベルが著しく抑制されることが確認された(図 15b, c)。

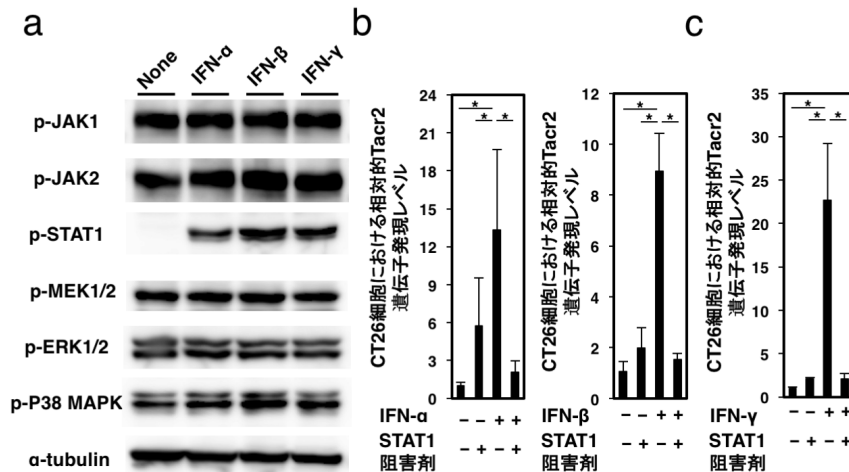


図 15. マウス大腸がん(CT26)細胞の IFN- α 、IFN- β および IFN- γ 刺激による各種シグナル関連分子のリン酸化レベルおよび STAT1 阻害剤存在下での NK2R 遺伝子レベル (a) CT26 細胞 (2×10^6 個)を、IFN- α および IFN- β (50 ng/mL)で 30 分間刺激した際のリン酸化 JAK1、JAK2、STAT1、MEK1/2、ERK1/2、P38 MAPK および α -tubulin タンパク質の発現レベル。(b) STAT1 阻害剤存在下で、IFN- α および IFN- β (各 50 ng/mL) で 6 時間刺激した際の NK2R 遺伝子 (*Tacr2*) 発現レベル。(c) STAT1 阻害剤存在下で、IFN- γ (50 ng/mL)で 24 時間刺激した際の NK2R 遺伝子(*Tacr2*)発現レベル。*は Dunnett の多重検定によるコントロールに対する有意差 ($P < 0.05$) を示す。本検討から、マウス大腸がん細胞を IFN- α/β あるいは IFN- γ で刺激すると STAT1 のリン酸化が亢進し、STAT1 阻害剤で処理すると IFN- α/β あるいは IFN- γ 刺激で増強する NK2R 遺伝子レベルが著しく抑制されることが分かった。

これらの結果から、IFN- α 、IFN- β あるいは IFN- γ は STAT1 の活性化を介して CT26 がん細胞に NK2R 遺伝子を発現誘導することが示唆された。

NK2R阻害剤の投与は、免疫アジュバントの抗腫瘍効果を促進する

合成二本鎖 RNA 類似体である poly I:C は、ウイルス感染を模倣し、エンドソーム TLR3 依存的様式で活性化 DC による IFN- α/β 産生を誘導する自然免疫アジュバントとして知られている。本研究で、CT26 マウス担がんモデルで腫瘍組織における CD11c 陽性樹状細胞の浸潤およびリン酸化 STAT1 の発現を確認した(図 16a)。poly I:C の腫瘍局所への投与は、腫瘍に浸潤している CD11c 陽性樹状細胞の MHC クラス I およびクラス II 分子の表面発現レベルを増強した (図 16b)。

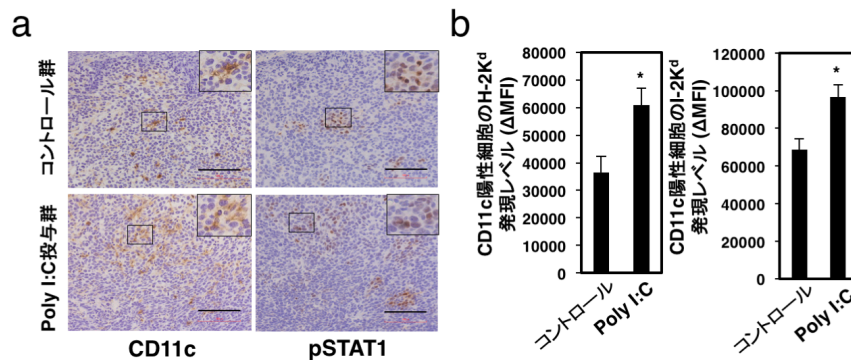


図 16. マウス大腸がん細胞 (CT26) 移植モデルに対する poly I:C の投与による腫瘍内 CD11c 樹状細胞の浸潤、STAT1 の活性化および樹状細胞の成熟化
CT26 細胞 (1×10^6 個) を、野生型 BALB/c マウスに皮下移植した。移植 5 日後より、poly I:C (50 μ g/マウス)を腫瘍局所に 4 日毎に投与した。(a) 移植後 26 日における腫瘍組織の CD11c 陽性細胞およびリン酸化 STAT1 の発現。写真内の線は 100 μ m を示す。(b) 移植後 13 日における腫瘍組織に浸潤している CD11c 陽性樹状細胞の MHC クラス I および MHC クラス II の発現レベル。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。本検討から、マウス大腸がん細胞移植モデルに対する poly I:C の局所投与は、腫瘍に浸潤している CD11c 陽性樹状細胞を成熟化することが分かった。

さらに、本モデルに対する poly I:C の局所投与は、腫瘍に浸潤している CD11c 陽性樹状細胞の IFN- α 、IFN- β 遺伝子およびサブスタンス P やニューロキニン A をコードするタキキニン 1 遺伝子(*Tac1*)、さらに CT26 がん細胞の NK2R 遺伝子の発現レベルを増強することを見出した(図 17a, b)。

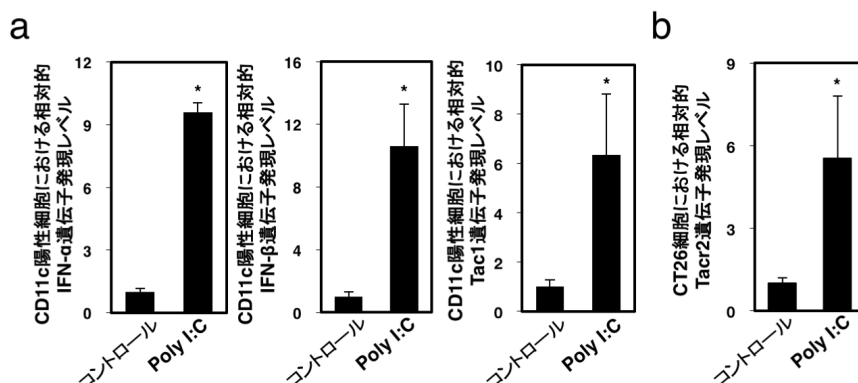


図 17. マウス大腸がん細胞 (CT26) 移植モデルに対する poly I:C の投与による腫瘍内浸潤樹状細胞の IFN- α 、IFN- γ およびタキキニン 1 遺伝子およびがん細胞の NK2R 遺伝子の発現レベル

CT26 細胞 (1×10^6 個)を、野生型 BALB/c マウスに皮内移植した。移植 5 日後より、poly I:C (50 μ g/マウス)を腫瘍局所に 4 日毎に投与した。(a) 移植後 13 日に腫瘍組織に浸潤している CD11c 陽性樹状細胞の IFN- α 、IFN- β およびタキキニン 1 遺伝子 (*Tac1*) 発現レベル。(b) 腫瘍組織の CT26 がん細胞の NK2R 遺伝子 (*Tacr2*) 発現レベル。*は Student の t 検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。本検討から、マウス大腸がん細胞(CT26)移植モデルに対する poly I:C の局所投与は、腫瘍に浸潤している CD11c 陽性樹状細胞の IFN- α 、IFN- β およびタキキニン遺伝子および CT26 がん細胞の NK2R 遺伝子の発現レベルを増強することが分かった。

これら結果から、腫瘍環境下において自然免疫系樹状細胞の活性化によって産生される IFN- α/β を介してがん細胞における NK2R 遺伝子の発現誘導が促されるとともに、樹状細胞が神経ペプチドリガンドの産生細胞の一つとなる可能性が示唆された。

さらに poly I : C を用いたがん治療モデルにおける NK2R を介した神経ペプチドシグナルの作用効果を調べるために、NK2R 阻害剤をマウスの腫瘍部位に併用投与した。その結果、NK2R 阻害剤は、本治療モデルにおいて poly I:C 治療の抗腫瘍効果を亢進した(図 18a-c)。

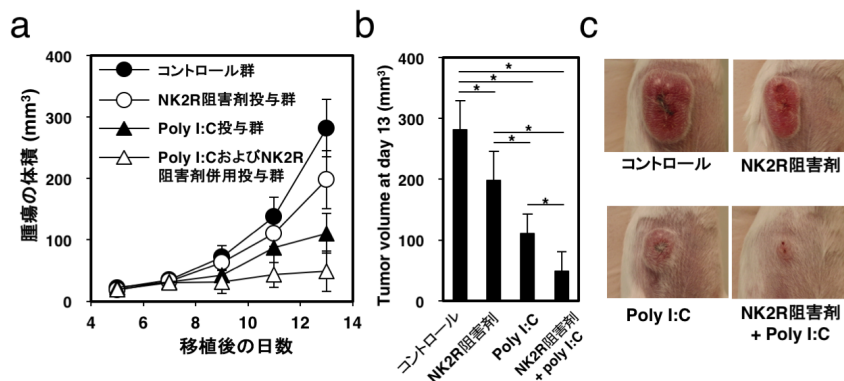


図 18. マウス大腸がん細胞 (CT26) 移植モデルに対する NK2R 阻害剤および poly I:C の投与による抗腫瘍効果

CT26 細胞(1×10^6 個)、野生型 BALB/c マウスに皮内移植した。移植後 5 日より、poly I:C (50 μ g/マウス)および NK2R 阻害剤 (2.4 μ g/マウス)を腫瘍局所に 4 日ごとに投与した。(a) 移植 5 日より 17 日まで腫瘍径を計測し、腫瘍形成能を評価した。(b) 移植後 13 日における腫瘍量の比較。*は Dunnett の検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。(c) 移植後 15 日の代表的な担がんマウスの写真。本検討により、マウス大腸がん細胞移植モデルに対する NK2R 阻害剤の局所投与は、poly I:C 投与による抗腫瘍効果を増強することが分かった。

これらの知見から、免疫アジュバントまたはウイルス感染の投与によって産生された IFN- α/β は、がん細胞における NK2R 発現レベルを増強し、生体内で腫瘍形成を促進することが示唆された。

NK2R は、IFN- α/β 刺激によってヒトがん細胞に誘導されて、がん患者の腫瘍組織に発現される

ヒトがん細胞における NK2R 遺伝子の発現制御機構を調べるために、各種ヒトがん細胞を IFN- α 、IFN- β および IFN- γ で刺激した。大腸腺がん DLD-1 細胞および非分化肝がん HLF 細胞における TACR2 発現レベルは、*in vitro* 培養系にて IFN- α 、IFN- β あるいは IFN- γ 刺激によって有意に増強された(図 19a, b)。

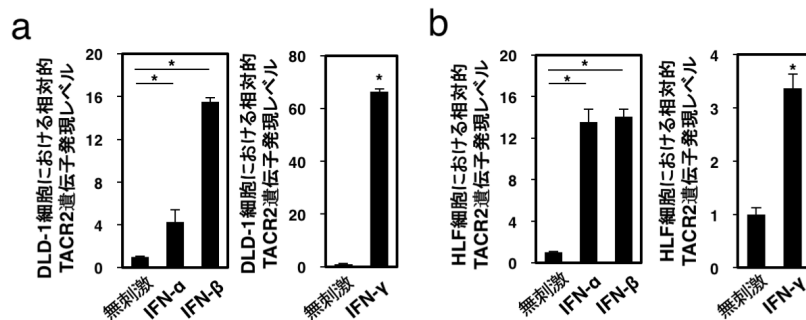


図 19. ヒト大腸がん (DLD-1) 細胞およびヒト肝がん (HLF) 細胞の IFN- α 、IFN- β および IFN- γ 刺激による NK2R 遺伝子発現レベル

DLD-1 細胞および HLF 細胞 (各 2×10^5 個) を IFN- α および IFN- β (各 50 ng/mL) で 6 時間刺激し、IFN- γ (50 ng/mL) で 24 時間刺激を行なった。(a) 各刺激による DLD-1 細胞の NK2R 遺伝子発現レベル。(b) 各刺激による HLF 細胞の NK2R 遺伝子発現レベル。
*は Dunnett の多重検定 (IFN- α/β) あるいは Student の t 検定 (IFN- γ) による無刺激に対する有意差 ($P < 0.05$) を示す。本検討から、ヒト大腸がん細胞およびヒト肝がん細胞を IFN- α 、IFN- β および IFN- γ で刺激すると NK2R 遺伝子発現レベルが増強することが分かった。

さらに NK2R 阻害剤存在下で、DLD-1 および HLF 細胞を培養したところ、24 時間から 48 時間での細胞増殖が用量依存的に有為に抑制された (図 20a, b)。

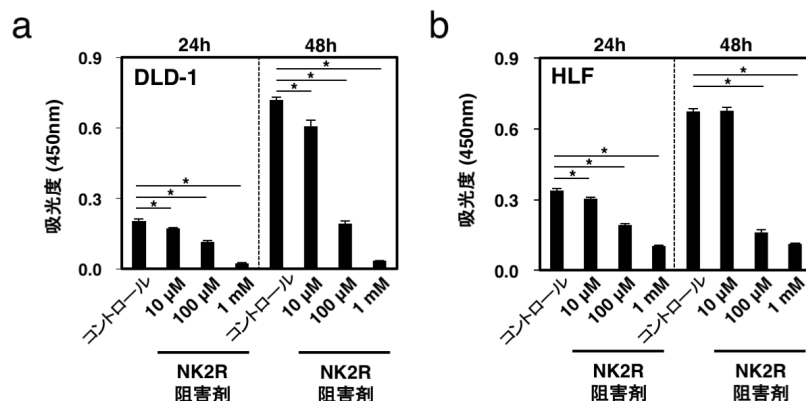


図 20. ヒト大腸がん (DLD-1) 細胞および肝細胞がん (HLF) 細胞の増殖・生存に及ぼす NK2R 阻害剤の効果

(a) DLD-1 細胞 (2×10^3 個) を NK2R 阻害剤 (0, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM) で 24 時間および 48 時間処理した際の MTT アッセイによる細胞増殖の検討結果。(b) HLF 細胞 (2×10^3 個) を NK2R 阻害剤 (0, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM) で 24 時間および 48 時間処理した際の MTT アッセイによる細胞増殖の検討結果。*は Dunnett の多重検定によるコントロールに対する有意差 ($P < 0.05$) を示す。本検討から、ヒト大腸がん細胞および肝細胞がん細胞を NK2R 阻害剤で処理すると増殖が抑制され細胞死へと至ることが分かった。

また大腸がん患者、肝細胞がん患者および子宮頸がん患者の腫瘍組織において、NK2R の発現が認められた(図 21)。

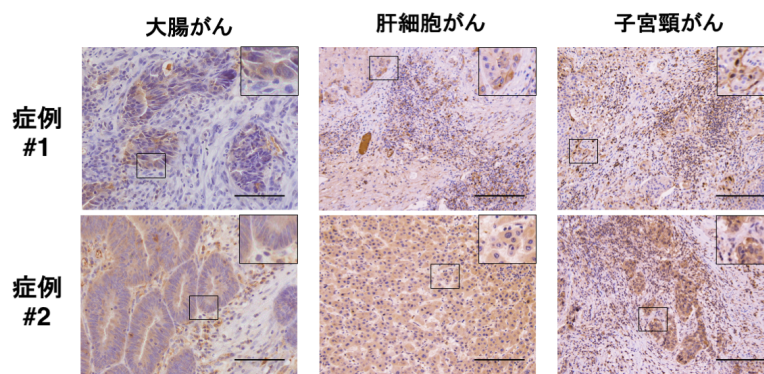


図 21. 大腸がん患者、肝細胞がん患者および子宮頸がん患者の腫瘍組織における NK2R のタンパク発現レベル

大腸がん患者、肝細胞がん患者および子宮頸がん患者の腫瘍組織の NK2R の発現。代表的な 2 例を示す。写真内の線は 100 μm を示す。本検討から、大腸がん患者、肝細胞がん患者および子宮頸がん患者の腫瘍組織において、NK2R の発現が認められることが分かった。

これらのデータから、NK2R を介した神経ペプチドシグナル伝達が、IFN- α/β や IFN- γ などの刺激によって増強され、実際にヒトがんの増殖に関与することが示唆された。

考察

神経伝達物質およびその受容体は、中枢神経系および末梢神経系に分布し、日常の様々な生理機能を調節している。しかし、神経ペプチド NKA およびその受容体 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詳細な作用メカニズムは不明であった。そこで本研究で、マウス担がん生体モデルを構築し、神経ペプチドシグナルとがんの悪性度に関する検証を行なったところ、神経ペプチド NKA の受容体である NK2R 過剰発現させた大腸がん細胞において、生体内腫瘍形成および肝転移が有意に増強することを見出した (図 5, 6)。またがん細胞における NK2R 遺伝子を欠損させることにより、生体内でのがん細胞の腫瘍形成および肝転移を抑制することが可能であることも確認した (図 9, 10)。これらの知見から、NK2R 介した神経ペプチドシグナルは、生体内における腫瘍の形成および転移能の獲得などがん細胞の悪性化に関与することが考えられた。

NK2R は G タンパク質共役型受容体であり、がん細胞におけるシグナル伝達を介して細胞機能の調節に重要な役割を果たす可能性が考えられる。しかしながら、がん細胞の悪性化を制御する NK2R を介した神経ペプチドシグナルの下流シグナル伝達経路および腫瘍悪性のメカニズムについては未だ報告が少ない。これまでの報告で、神経ペプチド SP の受容体である NK1R の阻害が、Pre-B 急性リンパ芽球性白血病細胞における Akt/p53 軸を介したアポトーシス細胞死および G1 停止を誘導することが示された²⁷。また、SP を標的として、がんの細胞死を誘導するとともに、EGFR および Her2 の発現レベルが減少する可能性を示唆する報告がなされた²⁸。さらに、NK1R 介した β -Arrestin1 の制御は、神経膠芽腫細胞増殖と G(2)/M 段階移行での重要な役割があることが示された²⁹。また、NK1R を介したシグナルはがん細胞の MMP-2 と MT1-MMP の活性化を誘導し、神経膠腫細胞の転移能を制御する作用をもつことが示された¹⁷。本研究においても、NK2R 選択的阻害剤存在下でがん細胞の生存や増殖が抑制されること (図 7)、さらに NK2R 阻害剤を担がん生体に対して投与し、NK2R を介した神経ペプチドシグナルを遮断することで、生体内での腫瘍形成が抑制されることを見出した (図 8)。これら結果から NK1R と同様に NK2R も神経ペプチドのシグナル伝達を介したがん細胞の生存や増殖を制御する下流関連因子を誘導し、生体内での腫瘍形成および大腸がん細胞転移を調節することが考えられた。

本研究で、合成二本鎖 RNA である poly I:C を生体内投与し、ウイルス感染あるいは免疫アジュバント療法を模倣したところ、腫瘍に浸潤している DC の活性化 (図 16) および、がん細胞において NK2R 遺伝子の発現が有意に増強することを明らかにした (図 17)。さらに、poly I:C の投与により、腫瘍内 DC より IFN- α/β の産生誘導のみならず、SP や NKA をコードするタキキニン-1 (*Tac1*) 遺伝子の発現レベルを増加させ

ることを見出した (図 17)。これらの知見は、以前に報告した *in vitro* 培養系で LPS や IFN- γ 刺激により DC の *Tac1* 遺伝子発現の誘導と培養上清への NKA リガンド産生レベルの増加を認めた結果と矛盾しない²⁶。従って、慢性炎症やタイプ 1 免疫の賦活による IFN-STAT1 シグナルカスケードを介した DC の活性化により、がん細胞の NK2R 発現を増強させるとともに、さらに NKA リガンドの産生も介して神経ペプチドシグナルが亢進し、生体内での腫瘍形成および転移能獲得を促進させる可能性があると考えられた。実際に poly I:C を使用したマウス担がん治療モデルにおいて、さらに NK2R 阻害剤を併用投与した場合、poly I:C による抗腫瘍効果が増強されることを確認した (図 18)。従って、これらの結果から、免疫細胞の活性化によって誘導される NK2R を介した神経ペプチドシグナルの増強は、がん細胞の宿主免疫系からの逃避機構の獲得メカニズムの一つとして考えられる。

一般に、炎症性腸疾患 (IBD) や、HBV、HCV および HPV などのウイルス感染により引き起こる慢性炎症とその後のがんの発生は関連することから、大腸炎やウイルス感染が誘発となって発生するがんにおいても神経ペプチドシグナルの関与も考えられる。本研究で、ヒト大腸がん細胞や肝がん細胞を IFN- α/β や IFN- γ で刺激すると NK2R 遺伝子が発現増強されること、NK2R 阻害剤存在下での培養によりヒトがん細胞の生存や増殖が抑制されることを確認した (図 19, 20)。さらに、ヒト臨床検体を使用して検証したところ、大腸がんに加えて、肝細胞がんおよび子宮頸がん患者の腫瘍組織におけるがん細胞や病変部位に浸潤している細胞において、NK2R の発現を認めた (図 21)。従って、マウスがん細胞やマウス担がんモデルで見出した、NK2R を介した神経ペプチドシグナル遮断によるがん細胞の腫瘍形成や転移の制御が、ヒトにおいても適応される可能性が高いと考えられる。

これまでの臨床研究において、慢性閉塞性肺疾患と喫煙者の肺胞マクロファージに NK2R 発現が増加することが報告された³⁰。また、NK2R レベルは、慢性膵炎における疼痛の強度、頻度および期間と相関することが示された³¹。さらに、NKA 発現レベルの評価が、ステージ 4 の小腸神経内分泌腫瘍分化型患者の生存率の予測に有用であることが報告された²⁴。本研究により、NK2R の過剰発現により生体内での腫瘍形成および肝転移巣形成能が高いこと、NK2R 遺伝子の欠損により腫瘍形成能が減弱すること、さらに担がん生体の免疫細胞の活性化により DC のタキキニン 1 遺伝子とがん細胞の NK2R 発現の誘導がなされることが示されたことから、がん患者腫瘍組織の NK2R 発現レベルや神経ペプチドリガンドの産生レベルは、宿主の抗腫瘍免疫状態およびがんの悪性度を示す有用なバイオマーカーとしても活用できる可能性を示唆する。最近の第 II 相臨床試験において、下痢を伴う過敏性腸症候群 (IBS) を対象とし、NK2R 阻害剤を投与した結果、女性患者における全体的な症状、腹痛および便パターンが改善されることが報告された³²。また、NK1R および NK2R 阻害剤である DNK333 につ

いて、喘息患者における NKA 誘導性気管支収縮を阻害する効果があることが報告された³³。今後、ヒト臨床検体を蓄積し、各種がん患者を対象とした NK2R や NKA を指標としたバイオマーカー研究を推進することでより精度の高いがん治療の確立が期待できると考えている。

本研究で、担がん生体内における NK2R の過剰発現が大腸がん細胞の腫瘍形成および肝臓転移を促進させることを見出した。NK2R を介した神経ペプチドシグナルの遮断が、担がん生体における、がん細胞の腫瘍形成および転移を抑制することも明らかとした。さらに、NK2R 阻害剤の投与が、免疫アジュバントである poly I:C を用いたがん治療において、さらに抗腫瘍効果を増強させることも確認した。従って、本研究結果より、がん細胞における NK2R を介した神経ペプチドシグナルの制御は、より効果的ながん療法開発のための有望な戦略の一つとなると考える。

総括および結論

① 本研究から得られた新知見

- ・ 神経ペプチドの一つであるニューロキニン A の受容体 NK2R を過剰発現しているマウス大腸がん CT26 細胞は、マウス生体内での腫瘍形成および肝転移能が高い。
- ・ NK2R 阻害剤存在下で培養したマウス大腸がん CT26 細胞の増殖および生存が、添加した阻害剤の濃度依存的に抑制される。
- ・ NK2R 阻害剤を担がんマウスに対して投与することで、CT26 細胞の生体内腫瘍形成能が抑制される。
- ・ NK2R 遺伝子を欠損した CT26 細胞は、マウス生体内における腫瘍形成および肝転移能が低下する。
- ・ マウス大腸がん CT26 細胞および肝細胞がん Hepa1-6 細胞を IFN- α/β あるいは IFN- γ で刺激することで、NK2R 遺伝子の発現レベルが上昇する。
- ・ マウス大腸がん CT26 細胞を IFN- α/β あるいは IFN- γ で刺激すると、転写活性化因子 STAT1 がリン酸化されるとともに、STAT1 阻害剤存在下で、IFN- α/β あるいは IFN- γ 刺激による NK2R 遺伝子発現の誘導が著しく抑制する。
- ・ 自然免疫系を活性化する TLR3 リガンド poly I:C を CT26 皮内移植マウスモデルに投与することで、腫瘍内に浸潤している樹状細胞において IFN- α/β およびニューロキニン A をコードしている *Tac1* 遺伝子が発現上昇するとともに、CT26 がん細胞の NK2R 遺伝子発現が増加する。
- ・ CT26 担がんマウスモデルに対して、poly I:C と NK2R 阻害剤を併用投与することで、poly I:C による抗腫瘍効果が、NK2R 阻害剤の併用投与によってさらに増強される。
- ・ ヒト大腸がん DLD-1 細胞と肝細胞がん HLF 細胞を IFN- α/β あるいは IFN- γ で刺激することで、NK2R 遺伝子の発現レベルが上昇する。
- ・ NK2R 阻害剤存在下で培養したヒト大腸がん DLD-1 細胞と肝細胞がん HLF 細胞は、添加した阻害剤の濃度依存的に、細胞の増殖および生存が抑制される。
- ・ 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。

② 新知見の意義

がん細胞における神経ペプチド受容体 NK2R を介した神経ペプチドシグナルは、生体内において腫瘍形成や肝転移能の獲得に関与することを示唆する。また、宿主免疫系の活性化により産生される IFN- α/β あるいは IFN- γ は、がん細胞の NK2R を発現誘

導するとともに、免疫担当細胞の一つである樹状細胞が神経ペプチドの産生細胞となる可能性を示唆することから、NK2R の発現はがん細胞の免疫逃避機構に関与することや、炎症性腸疾患およびウイルス感染に起因するがんの発生とその悪性化の過程において神経ペプチドシグナルが寄与する可能性も考えられる。

③ 本研究で得られた新知見に基づいた今後の展開

宿主免疫系の活性化によりがん細胞に発現増強される NK2R を介した神経ペプチドシグナル伝達経路を遮断することで、がん細胞の生体内腫瘍形成や転移能獲得を抑制できる可能性が高いと考えている。本研究成果は、新しい視点での効果的ながん治療の開発に貢献し、将来、既存のがん治療や免疫治療に不応答あるいは副作用が発生する可能性のある進行がん患者、および術後再発の可能性のあるがん患者に対して有効な治療戦略となり得ることが期待される。

④ 今後の課題

がん細胞の悪性化を制御する 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が必要である。またウイルス感染を伴う慢性炎症過程や過剰な免疫応答時における NK2R を介した神経ペプチドシグナル依存的ながん細胞の発生、悪性化および転移能獲得メカニズムを明らかにすることで、より精度の高いがんの発症予防や再発防止を含む腫瘍の新規制御法の確立に繋がると考える。

謝辞

本研究の機会を与えていただき、ご指導とご鞭撻をいただきました北海道大学遺伝子病制御研究所免疫機能学分野の北村秀光准教授に深謝いたします。

本研究の遂行において重要でありましたヒト臨床検体を使用した検証、ヒトがん細胞の分与、さらに多くの有意義なご指導をいただきました旭川医科大学医学部病理学講座免疫病理分野の小林博也教授、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅰの武富紹信教授に深く感謝いたします。

本研究を実施するにあたり、数多くのご協力をいただきました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅰの豊島雄二郎先生、岡田尚樹先生、木井修平先生に心より感謝いたします。

また当教室で実験をするにあたり、多くのご助言をいただきました北海道大学遺伝子病制御研究所融合プログラム連携室の瀧本将人准教授に感謝いたします。

最後に、日本に留学する機会を与えていただきました北海道医療大学看護福祉学部看護学科（元北海道大学遺伝子病制御研究所幹細胞生物学分野）の濱田淳一教授に深く感謝いたします。

引用文献

1. Griebel, G. & Holsboer, F. Neuropeptide receptor ligands as drugs for psychiatric diseases: the end of the beginning? *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 462-478 (2012).
2. Suvas, S. Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis. *J. Immunol.* 199, 1543-1552 (2017).
3. Theoharides, T. C., Zhang, B., Kempuraj, D., Tagen, M., Vasiadi, M., Angelidou, A., Alysandratos, K. D., Kalogeromitros, D., Asadi, S., Stavrianeas, N., Peterson, E., Leeman, S., & Conti, P. IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107, 4448-4453 (2010).
4. Monaco-Shawver, L., Schwartz, L., Tuluc, F., Guo, C. J., Lai, J. P., Gunnam, S. M., Kilpatrick, L. E., Banerjee, P. P., Douglas, S. D., & Orange, J.S. Substance P inhibits natural killer cell cytotoxicity through the neurokinin-1 receptor. *J. Leukoc. Biol.* 89, 113-125 (2011).
5. Barros, P. O., Ferreira, T. B., Vieira, M.M., Almeida, C. R., Araújo-Lima, C.F., Silva-Filho, R. G., Hygino, J., Andrade, R. M., Andrade, A. F., & Bento, C. A. Substance P enhances Th17 phenotype in individuals with generalized anxiety disorder: an event resistant to glucocorticoid inhibition. *J. Clin. Immunol.* 31, 51-59 (2011).
6. Blum, A., Setiawan, T., Hang, L., Stoyanoff, K., & Weinstock, J. V. Interleukin-12 (IL-12) and IL-23 induction of substance p synthesis in murine T cells and macrophages is subject to IL-10 and transforming growth factor beta regulation. *Infect. Immun.* 76, 3651-3656 (2008).
7. Sun, J., Ramnath, R. D., Tamizhselvi, R., & Bhatia, M. Role of protein kinase C and phosphoinositide 3-kinase-Akt in substance P-induced proinflammatory pathways in mouse macrophages. *FASEB J.* 23, 997-1010 (2009).

8. Chernova, I., Lai, J.P., Li, H., Schwartz, L., Tuluc, F., Korchak, H. M., Douglas, S. D., & Kilpatrick, L. E. Substance P (SP) enhances CCL5-induced chemotaxis and intracellular signaling in human monocytes, which express the truncated neurokinin-1 receptor (NK1R). *J. Leukoc. Biol.* 85, 154-164 (2009).
9. Pavlovic, S., Liezmann, C., Blois, S. M., Joachim, R., Kruse, J., Romani, N., Klapp, B. F., & Peters, E. M. Substance P is a key mediator of stress-induced protection from allergic sensitization via modified antigen presentation. *J. Immunol.* 186, 848-855 (2011).
10. Sculptoreanu, A., Aura Kullmann, F., & de Groat, W. C. Neurokinin 2 receptor-mediated activation of protein kinase C modulates capsaicin responses in DRG neurons from adult rats. *Eur. J. Neurosci.* 27, 3171-3181 (2008).
11. Sun, J., Ramnath, R. D., Tamizhselvi, R., & Bhatia, M. Neurokinin A engages neurokinin-1 receptor to induce NF-kappaB-dependent gene expression in murine macrophages: implications of ERK1/2 and PI 3-kinase/Akt pathways. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 295, C679-691 (2008).
12. Miotto, D., Boschetto, P., Cavallesco, G., Zeni, E., Querzoli, P., Pedriali, M., Chiarelli, S., Fabbri, L. M., & Mapp, C. E. Increased neurokinin-2 receptor expression in alveolar macrophages of smokers with COPD. *Histopathology.* 51, 128-31 (2007).
13. Michalski, C. W., Shi, X., Reiser, C., Fachinger, P., Zimmermann, A., Büchler, M.W., Di Sebastiano, P., & Friess H. Neurokinin-2 receptor levels correlate with intensity, frequency, and duration of pain in chronic pancreatitis. *Ann. Surg.* 246, 786-793 (2007).
14. Hernandez, J. M., Cox, G., & Janssen, L. J. Involvement of the neurokinin-2 receptor in airway smooth muscle stretch-activated contractions assessed in perfused intact bovine bronchial segments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327, 503-510 (2008).

15. Zhang, Y. X., Li, X. F., Yuan, G. Q., Hu, H., Song, X. Y., Li, J. Y., Miao, X. K., Zhou, T. X., Yang, W. L., Zhang, X. W., Mou, L. Y. & Wang, R. beta-Arrestin 1 has an essential role in neurokinin-1 receptor-mediated glioblastoma cell proliferation and G2/M phase transition. *J. Biol. Chem.* 292, 8933-8947 (2017).
16. Cordier, D., Gerber, A., Kluba, C., Bauman, A., Hutter, G., Mindt, T.L., & Marian, L. Expression of different neurokinin-1 receptor (NK1R) isoforms in glioblastoma multiforme: potential implications for targeted therapy. *Cancer Biother. Radiopharm.* 29, 221-226. (2014).
17. Mou, L., Kang, Y., Zhou, Y., Zeng, Q., Song, H. & Wang, R. Neurokinin-1 receptor directly mediates glioma cell migration by up-regulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J. Biol. Chem.* 288, 306-318 (2013).
18. Palma, C., Nardelli, F., Manzini, S. & Maggi, C. Substance P activates responses correlated with tumour growth in human glioma cell lines bearing tachykinin NK1 receptors. *Br. J. Cancer.* 79, 236-243 (2014).
19. Garnier, A., Ilmer, M., Becker, K., Häberle, B., VON Schweinitz, D., Kappler, R. & Berger, M. Truncated neurokinin-1 receptor is an ubiquitous antitumor target in hepatoblastoma, and its expression is independent of tumor biology and stage. *Oncol. Lett.* 11, 870-878 (2016).
20. Zhou, Y., Zuo, D., Wang, M., Zhang, Y., Yu, M., Yang, J. & Yao, Z. Effect of truncated neurokinin-1 receptor expression changes on the interaction between human breast cancer and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Genes Cells.* 19, 676-691 (2014).
21. Meng, F., DeMorrow, S., Venter, J., Frampton, G., Han, Y., Francis, H., Standeford, H., Avila, S., McDaniel, K., McMillin, M., Afroze, S., Guerrier, M., Quezada, M., Ray, D., Kennedy, L.,

- Hargrove, L., Glaser, S., & Alpini, G. Overexpression of membrane metalloendopeptidase inhibits substance P stimulation of cholangiocarcinoma growth. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 306, G759-768 (2014).
22. Garnier, A., Vykoukal, J., Hubertus, J., Alt, E., VON Schweinitz, D., Kappler, R., Berger, M., & Ilmer, M. Targeting the neurokinin-1 receptor inhibits growth of human colon cancer cells. *Int. J. Oncol.* 47, 151-160. (2015).
23. Fang, W., Fu, C., Chen, X., Mou, X., Liu, F., Qian, J., Zhao, P., Zheng, Y., Zheng, Y. I., Deng, J., Ye, P., Wang, Y. & Zheng, S. Neurokinin-2 receptor polymorphism predicts lymph node metastasis in colorectal cancer patients. *Oncol. Lett.* 9, 2003-2006 (2015).
24. Diebold, A. E., Boudreaux, J. P., Wang, Y. Z., Anthony, L. B., Uhlhorn, A. P., Ryan, P., Mamikunian, P., Mamikunian, G. & Woltering, E. A. Neurokinin A levels predict survival in patients with stage IV well differentiated small bowel neuroendocrine neoplasms. *Surgery.* 152, 1172-1176 (2012).
25. Ohtake, J., Kaneumi, S., Tanino, M., Kishikawa, T., Terada, S., Sumida, K., Masuko, K., Ohno, Y., Kita, T., Iwabuchi, S., Shinohara, T., Tanino, Y., Takemura, T., Tanaka, S., Kobayashi, H. & Kitamura, H. Neuropeptide signaling through neurokinin-1 and neurokinin-2 receptors augments antigen presentation by human dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 136, 1690-1694 (2015).
26. Kitamura, H., Kobayashi, M., Wakita, D. & Nishimura, T. Neuropeptide signaling activates dendritic cell-mediated type 1 immune responses through neurokinin-2 receptor. *J. Immunol.* 188, 4200-4208 (2012).
27. Bayati, S., Bashash, D., Ahmadian, S., Safaroghli-Azar, A., Alimoghaddam, K., Ghavamzadeh, A., & Ghaffari, S.H. Inhibition of tachykinin NK(1) receptor using aprepitant

- induces apoptotic cell death and G1 arrest through Akt/p53 axis in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Eur. J. Pharmacol.* 791, 274-283. (2016)
28. Mayordomo, C., Garcia-Recio, S., Ametller, E., Fernandez-Nogueira, P., Pastor-Arroyo, E. M., Vinyals, L., Casas, I., Gascon, P., & Almendro, V. Targeting of substance P induces cancer cell death and decreases the steady state of EGFR and Her2. *J. Cell Physiol.* 227, 1358-1366 (2012).
 29. Pal, K., Mathur, M., Kumar, P., & DeFea, K. Divergent β -arrestin-dependent signaling events are dependent upon sequences within G-protein-coupled receptor C termini. *J Biol Chem.* 288, 3265-3274. (2013).
 30. Miotto, D., Boschetto, P., Cavallesco, G., Zeni, E., Querzoli, P., Pedriali, M., Chiarelli, S., Fabbri, L. M. & Mapp, C. E. Increased neurokinin-2 receptor expression in alveolar macrophages of smokers with COPD. *Histopathology.* 51, 128-131 (2007).
 31. Michalski, C. W., Shi, X., Reiser, C., Fachinger, P., Zimmermann, A., Buchler, M. W., Di Sebastiano, P. & Friess, H. Neurokinin-2 receptor levels correlate with intensity, frequency, and duration of pain in chronic pancreatitis. *Ann. Surg.* 246, 786-793 (2007).
 32. Tack, J., Schumacher, K., Tonini, G., Scartoni, S., Capriati, A., Maggi, C. A. & the Iris, i. The neurokinin-2 receptor antagonist ibodutant improves overall symptoms, abdominal pain and stool pattern in female patients in a phase II study of diarrhoea-predominant IBS. *Gut.* 66, 1403-1413 (2017).
 33. Joos, G. F., Vincken, W., Louis, R., Schelfhout, V. J., Wang, J. H., Shaw, M. J., Cioppa, G. D. & Pauwels, R. A. Dual tachykinin NK1/NK2 antagonist DNK333 inhibits neurokinin A-induced bronchoconstriction in asthma patients. *Eur. Respir. J.* 23, 76-81 (2004).