

論文内容の要旨

Epigallocatechin gallate stimulated histamine production and downregulated histamine

H1 receptor in oral cancer cell lines expressing histidine decarboxylase

—ヒスチジン脱炭酸酵素を発現する口腔癌細胞株においてエピガロカテキンガレート

(EGCG) はヒスタミン合成を誘導し、ヒスタミン H1 受容体発現を抑制する—

(金将、石河太知、大橋祐生、山田浩之、小笠原正人)

(Journal of Oral Biosciences 令和 4 年掲載予定)

こん まさし
金 将

I. 研究目的

口腔扁平上皮癌は癌治療の進歩にもかかわらずいまだ十分な予後改善がなされていない。近年、乳癌、胆管がんなど多くの腫瘍細胞でヒスタミンの産生が報告されている。ヒスタミンは多彩な作用を有する生体アミンで神経伝達物質、ケミカルメディエーターのほか、細胞増殖、細胞分化にも関与する。ヒスタミンは現在まで報告がある 4 種類の受容体に作用し、多くの組織で発現するものから、組織特異性のあるものがある。肥満細胞のような小胞に蓄えて刺激に応答して遊離するタイプと異なり、腫瘍細胞からのヒスタミン遊離過程には有機カチオントランスポーター (SLC22A3) が関与する。様々な腫瘍で抗ヒスタミン薬が抗腫瘍作用を示すことが報告されている。口腔癌を含む頭頸部癌ではヒスタミン H2 受容体拮抗薬の使用により予後改善が期待できることが示されているが、生化学的な解析はほとんど行われていない。腫瘍周囲環境からの TGF β 1 刺激は癌細胞の上皮—間葉移行 (EMT) を起こし、治療を困難にしている原因の一つになっている。

カテキンは緑茶に含まれる主要な成分の一つで、蛋白レベルでヒスタミン合成酵素を阻害し、また細胞レベルで抗腫瘍効果、抗炎症効果が示されている。さらに、カテキンは緑茶の苦味成分の一つであり、その中でもエピガロカテキンガレート(EGCG)は苦味受容体の TAS2R14 および TAS2R39 に作用し、細胞内には入りにくいため、細胞表面の分子に作用して効果を示すと考えられる。口腔癌でもその抑制効果は報告されているが、その機序は不明な点が多い。本研究の目的は口腔扁平上皮癌のヒスタミン産生能、ヒスタミン受容体の発現、そしてヒスタミントランスポーターの発現について TGF β 1 および EGCG 刺激での効果を生化学的に検討することである。

II. 研究方法

4種類の口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC4, HSC3, HSC2, SAS) を培養し、TGF α 1、EGCG で24時間刺激後、細胞抽出液を準備し、ヒスタミンH1~H4受容体、ヒスタミントランスポーター (SLC22A3)、および、HDCの発現はwestern blot法にて解析した。ヒスタミン濃度はEnzyme-Linked immunoassayにて測定した。EGCG刺激前後の各細胞からtotal RNAを抽出し、DNaseI処理を行った。その後、cDNA合成を行いRT-PCRにてTAS2R14およびTAS2R39の発現を確認した。内部標準としてGAPDHを用いた。2群間の比較はstudent t検定、3群以上の比較は多重解析Tukeyを用いた。

III. 研究成績

4種類の口腔扁平上皮癌細胞株でヒスタミン合成酵素 (HDC) の蛋白レベルでの発現が認められ、細胞培養液中にもヒスタミンが確認された。2種類の細胞株 (HSC4 と SAS) はTGF α 1で発現が誘導された。ヒスタミントランスポーター (SLC22A3) は4種類の細胞でタンパク質の発現が確認され、3種類の細胞株はSLC22A3の有意な増加が認められた。H1受容体からH4受容体は4種類すべての細胞に確認された。H1受容体の発現は2種類の細胞株 (HSC2 と HSC3) においてTGF α 1刺激に対し有意な増加を示した。H2受容体はTGF α 1刺激後、3種類の細胞株で増加が認められた。H3受容体はTGF α 1刺激後、3種類の細胞株で有意な増加を認めた。H4受容体はTGF α 1刺激後、3種類の細胞株で有意な増加を認めた。EGCG刺激後は4種類の細胞でH1受容体の有意な低下が確認された。H2~H4受容体の反応は細胞間で様々な反応を示した。HDCはEGCG刺激で有意に増加し、また、SLC22A3は3種類の細胞株で有意な低下を示した。24時間培養後の培養液中のヒスタミン濃度はEGCG刺激で2~2.5倍の増加を示した。苦味受容体 (TAS2R14) に発現はRT-PCRにて確認できたが、TAS2R39の発現は確認できなかった。TAS2R14蛋白の発現レベルは4種類の細胞間で相違が認められた。また、EGCG刺激後、TAS2R14は3種類の細胞株で有意な増加を示した。

IV. 考察及び結論

本研究では4種類の口腔扁平上皮癌細胞株を用い、ヒスタミン産生能とその関連酵素HDC及びヒスタミントランスポーター (SLC22A3)、そして4種類のヒスタミン受容体の蛋白レベルの発現について、TGF α 1またはEGCG存在下での影響を解析した。解析した口腔扁平上皮癌ではすべてヒスタミン産生能を有し、EGCG投与では培養液中へのヒスタミン遊離増加を確認できたが、一方、ヒスタミンH1受容体は低下を認めた。EGCGは細胞内への取り込みは極めて弱く、細胞外で作用し、その標的分子の候補としてTAS2R14があり、4種類すべての細胞で発現が認められ、TAS2R14を介した作用が想定された。

EGCG はヒスタミン受容体を制御することで抗腫瘍効果が期待できる新たな選択肢と考えられた。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

- 主査 石崎 明 教授 (生化学講座 細胞情報科学分野)
副査 小笠原 正人 教授 (薬理学講座 病態制御学分野)
副査 宮本 郁也 教授 (口腔顎顔面再建学講座 口腔外科学分野)

近年、乳癌や胆管癌などの腫瘍細胞では、ヒスタミンが産生されることが報告されている。また腫瘍細胞からのヒスタミンの放出は、有機カチオン輸送体の一つである solute carrier 22A3 (SLC22A3) を介して行われることが知られている。興味深いことに、頭頸部癌患者へのヒスタミン受容体 histamine receptor (HR) 拮抗薬の投与により予後の改善が認められたとの報告はあるが、その抗腫瘍効果発現のための分子メカニズムの詳細は明らかとされていない。

腫瘍微小環境 tumor microenvironment (TME) に存在する癌関連線維芽細胞 cancer-associated fibroblast (CAF) や免疫細胞から分泌される transforming growth factor-beta (TGF- β) は癌の浸潤・転移に関わる上皮-間葉転換 epithelial-mesenchymal transition (EMT) を誘導して癌の悪性を促進することが知られている。

一方、エピガロカテキンガレート epigallocatechin gallate (EGCG) は緑茶に含まれる主要な成分であり、ヒスタミン合成酵素 histidine decarboxylase (HDC) 阻害効果や増殖抑制などの抗腫瘍効果を有することが知られている。また EGCG は、細胞膜上に存在する TAS2R14 などの苦味受容体を介してその効果を細胞内に伝達するものと考えられている。

本論文では、TGF- β 1 や EGCG が 4 種類 (HSC-2、HSC-3、HSC-4 ならびに SAS) のヒト口腔扁平上皮癌 human oral squamous cell carcinoma (hOSCC) 細胞株におけるヒスタミン産生能や SLC22A3、HR、HDC ならびに TAS2R14 の発現量にどのように影響するかについて、western blot 法、ELISA ならびに RT-PCR 法を用いてタンパク質レベルあるいは mRNA レベルで調査した。その結果、TGF- β 1 は、2 種類の hOSCC 細胞 (HSC-4 ならびに SAS) において HDC の発現を促進し、また 3 種類の hOSCC 細胞 (HSC-2、HSC-4 ならびに SAS) において SLC22A3 の発現を促進した。加えて TGF- β 1 は、2 種類の hOSCC 細胞 (HSC-2 ならびに HSC-3) において H1R の発現を促進し、3 種類の hOSCC 細胞 (HSC-2、HSC-3 ならびに SAS) において H2R の発現を促進した。また TGF- β 1 は、3 種類の hOSCC 細胞 (HSC-2、HSC-4 ならびに SAS) において H3R の発現を促進し、3 種類の hOSCC 細胞 (HSC-3、

HSC-4 ならびに SAS) において H4R の発現を促進した。一方、EGCG は、4 種類の hOSCC 細胞全てにおいて、HDC の発現を促進し、またこれら 4 種類の hOSCC 細胞培養上清中のヒスタミン濃度を増加させた。加えて EGCG は、3 種類の hOSCC 細胞 (HSC-3、HSC-4 ならびに SAS) において SLC22A3 の発現を抑制した。また EGCG は、4 種類の hOSCC 細胞全てにおいて H1R の発現を抑制した。加えて EGCG は、3 種類の hOSCC 細胞 (HSC-3、HSC-4 ならびに SAS) おいて TAS2R14 の発現を促進した。

本研究成果は、ヒスタミンによるオートクリンあるいはパラクリン的な働きが hOSCC 細胞の悪性化の進行に関与する可能性を示唆するものであり、また EGCG の抗腫瘍的臨床応用の可能性を示唆するものとしてたいへん貴重な報告であると評価される。したがって、本論文を学位論文に値するものと判断した。

試験・試問の結果の要旨

最初に本論文の目的と概要について説明がなされた。次いで、研究方法、結果ならびにその考察と臨床的意義、今後の研究の発展性について試問した結果、いずれも適切かつ明瞭な回答が得られた。主査・副査からの質問とそれに対する回答の具体的な内容は、以下の通りである。

問：本研究では、ヒト口腔扁平上皮癌細胞における HDC、SLC22A3、あるいは HR の発現に TGF- β が関わるかどうかを調査したが、TGF- β に着目した理由は何か。

答：TGF- β は口腔癌の上皮-間葉転換 (EMT) を誘導してその浸潤・転移能力を増強すると報告されている。これまでに、ヒト口腔扁平上皮癌細胞で TGF- β 1 がヒスタミンの合成やその放出、HR の発現にどのように関わるのかの報告がなかったことから、今回このような調査を実施した。

問：TGF- β 刺激では、HSC-3 細胞のみで SLC22A3 の発現が減少している (その他の癌細胞では上昇している) が、なぜこのように異なる結果 (逆の結果) となるのか。

答：HSC-4 細胞や SAS 細胞は、TGF- β 刺激により Smad 依存的なシグナル伝達経路の活性化が認められるが、HSC-3 細胞では同刺激によりこの経路の活性化は認められない。したがって、HSC-3 細胞では TGF- β 刺激により Smad 依存的なシグナル伝達経路とは別のシグナルが活性化されている可能性があり、この別のシグナルにより SLC22A3 の発現が抑制されるものと推測される。

問：悪性腫瘍からヒスタミンが産生されていたとのことであるが、口腔扁平苔癬や白板症などの口腔潜在的悪性疾患の病変ではどのような状況なのだろうか。加えて、良性腫瘍などではどのような状況なのだろうか。

答：白板症での報告は確認でないが、口腔扁平苔癬ではヒスタミンの産生が確認されており、またヒスタミン受容体では、とくに H4 受容体の発現が確認されている。一方、良性腫瘍からのヒスタミンの産生については、報告された例がない。

問：EGCG による HDC の発現やヒスタミン産生の促進効果は、これまでに報告のある EGCG の腫瘍の抑制効果とは逆の方向性であるように見えるが、これはなぜか。

答：EGCG は HR や SLC22A3 の発現を広く抑制するので、抗腫瘍効果があるのは間違いないと思われるが、もしかするとその代償性に HDC の発現が上昇しているのかもしれない。

問：カテキン以外に、カフェインやポリフェノールといったものは可能性があるのでしょうか？

答：ポリフェノールでは、はっきりとしたエビデンスのある抗腫瘍効果の報告は確認できないが、カフェインには従来の抗腫瘍薬の効果を高めるとの報告がある。

問：EGCG 臨床的に応用するにはどのような展開を考えているのか？とくに、抗ヒスタミン薬としての EGCG を単純に服用するだけで、抗腫瘍効果が出る可能性があるのか？

答：細胞レベルで示されている抗ヒスタミンの効果は、個体で使用した際には、これまでに十分な効果は示されていない。しかし、最近、口腔扁平上皮癌に対しても免疫チェックポイント阻害薬が使われ始めており、とくにメラノーマの患者への抗ヒスタミン薬と抗 PD-L1 抗体薬との併用により、予後が改善されたとの報告があるので、今後、口腔扁平上皮癌にも同様な併用効果があるのかどうかを明らかとしていきたい。