

[論文内容の要旨]

細胞外pH感知性G蛋白質共役型受容体 TDAG8の癌の進展における機能解析

Studies on TDAG8, an extracellular pH-sensing
G protein-coupled receptor, in cancer progression

指導教官 清水孝雄教授

分子細胞生物学専攻

平成16年(2004年)4月進学

井原 裕一朗

41-47303

Gタンパク質共役型受容体(以下、GPCR)は全受容体数の約80%を占め、酵母、昆虫から人に至るまで普遍的に存在している。チロシンキナーゼ経路などと並んで生体内で重要な経路であり、その多くは疾患の発症や進展にも大きく関与している。GPCRのリガンドは多岐に渡り、カテコールアミンなどのアミン、ペプチドホルモン、プロスタノイド、リゾホスファチジン酸(LPA)といった脂質メディエーターなどがある。細胞膜表面上に存在するGPCRは経口摂取可能な低分子化合物製剤の標的分子となる可能性が高く、創薬上のメリットも大きい。実際GPCRは医薬品の研究対象として非常に重要な存在であり、臨床薬の50%以上は一つ以上のGPCRに作用する低分子のアゴニストかアンタゴニストであ

る。これらの薬剤の売上高も全医薬品売上高のかなりを占めている。加えて、GPCR は発現臓器分布が特異的である場合が少なくないので、このような場合は副作用の少ない効率的な治療標的として期待できると考えられている。このような観点から GPCR のより詳細な生理機能解析は、様々な疾患の原因追及や創薬研究の進展において非常に重要な位置を占めると考えられる。そこで私は本学博士課程で GPCR の生理機能解析を行うことにした。

TDAG8 (T cell death-associated gene 8, GPR65) は T 細胞のアポトーシスの際に発現が上昇する遺伝子として発見された。その後、細胞外 pH の低下に応じて活性化され cAMP を産生し、さらに Rho を活性化してストレスファイバー生成を促進することが当研究室の石井らなどによって明らかにされ、現在では OGR1、GPR4、G2A と共に細胞外 pH 感知性 GPCR ファミリーを形成している。TDAG8 の mRNA はヒトでは脾臓、胸腺、血球などに発現が高い。しかしながらこれらの組織以外にも癌細胞において発現の増加が報告されている。また、遺伝子チップを用いた遺伝子発現プロファイルのデータベースである GNF SymAtlas (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>) によると肺癌細胞やメラノーマなどの腫瘍細胞において高発現している。NCBI GEO Profile も腎癌や神経膠芽種において TDAG8 の発現が上昇していることを示しており、TDAG8 の発現上昇が癌の悪性化に関わっている可能性が示唆される。

悪性腫瘍内部が酸性であることは昔からよく知られている。これは癌細胞の増殖はしばしば血管から離れた部位でも進行することで低酸素状態となり、乳酸などが蓄積するためであると言われている。従って悪性腫瘍内部及びその周辺領域が酸性化することにより TDAG8 が活性化されることが予想される。これらの知見から、私は癌モデルとして一般的なマウスへの癌細胞の尾静脈注射実験及び皮下注射モデルにより、TDAG8 と癌の関連を調べることにした。

マウス癌モデルに適している細胞である C57BL/6J マウス肺癌細胞である Lewis Lung Carcinoma (LLC) 細胞を用いてに遺伝子を導入し、セルソーターシステムを用いて TDAG8 のポリクローナル安定発現細胞株をとって樹立した。この細胞を C57BL/6J マウスに尾静脈注入し、19 日後に肺組織を観察した。コントロール群と比較して TDAG8 安定発現細胞を注入したマウスでは肺における結節は数、大きさ共に増加していた。また肺の湿重量及び乾燥重量にも有意な差が

見られた。更に肺組織のパラフィン切片のヘマトキシリン - エオジン染色により、TDAG8 安定発現細胞を注入したマウスにおいて肺内部の腫瘍形成も促進していることが分かった。さらに致死率も有意に高かった。癌の進行における TDAG8 のより幅広い関与を調べるために、皮下に TDAG8 安定発現細胞を注入したマウスでもコントロール細胞群と比較して腫瘍形成が有意に促進された。

このように LLC 細胞に TDAG8 を過剰発現させると肺への転移及び皮下における腫瘍形成が増悪化した。上で述べたように TDAG8 は細胞外 pH 感知性受容体である。従って腫瘍の形成に伴う周辺環境の酸性化が TDAG8 を活性化し、発現細胞に何らかの影響を与えていると考えられる。そこで LLC 細胞を *in vitro* で酸性刺激し、様々なシグナル解析を行うことにした。

まず、酸性条件での LLC 細胞の増殖能を評価するため、細胞を種々の pH の培地で2日間培養し、細胞数を計測した。中性条件 (pH = 7.4) に比べ、酸性条件 (pH = 6.4) では細胞の増殖はある程度抑制されるものの、TDAG8 安定発現細胞はコントロール細胞よりも有意に増殖能が高かった。また、生細胞と死細胞の割合及びアポトーシスの有無を調べるため、細胞を pH 6.4 で 48 時間培養後 Annexin V と PI で染色し、フローサイトメトリーによる解析を行った。TDAG8 安定発現細胞はコントロール細胞と比べて高い生存率を示したことから、TDAG8 の発現は酸性条件下での増殖及び生存を促進していることが明らかになった。TDAG8 安定発現細胞の酸性条件下における増殖能の維持はチミジン取り込み実験及び MTT アッセイによっても確認された。次に、この酸性条件下における増殖能の維持にどのシグナル経路が関与しているかを調べるために、様々なキナーゼ阻害剤を用いた MTT アッセイを行った。その結果、PKA, MEK1/2 の阻害剤である H89, U0126 で細胞を処理した場合、酸性条件下での TDAG8 安定発現細胞の細胞増殖能の大部分は消失した。一方で、それぞれ PI3K, Akt, mTOR の働きを阻害する LY294002, Akt inhibitor V 及びラパマイシンによる細胞活性抑制効果は TDAG8 安定発現細胞、コントロール細胞共に同程度であったことから、これらのキナーゼは酸性条件下での TDAG8 シグナル経路ではそれほど大きな役割は果たしていないと考えられる。続いてリン酸化 ERK をウエスタンブロット法により観察したところ、コントロール細胞では酸性条件下でリン酸化 ERK レベルの減少が見られたが、TDAG8 発現細胞では中性条件とほぼ同レベルであった。さらに、H89 は酸性条件下でのリン酸化 ERK レベルを劇的に下げることが明らかになった。PKA は Raf アイソフォーム (B-Raf) の有無により ERK シグナ

ル経路を活性化もしくは抑制することが知られている。すなわち、PKA は B-Raf を発現しない細胞では Rap1 を活性化することにより Ras による Raf-1 の活性化を抑制し、結果として ERK のリン酸化を阻害する。一方 B-Raf を発現する細胞では PKA は Rap1 を介して B-Raf を活性化しその結果 ERK のリン酸化が促進される。そこで PCR 法を用いたところ、LLC 細胞は B-Raf を発現していることが分かった。以上の結果から TDAG8 は酸性条件における LLC 細胞の生存・増殖を促進すること、そのシグナルは PKA 及び ERK 依存的であることが示唆された。

癌細胞内のシグナル経路が活性化されることにより、様々な遺伝子の発現が上昇し、悪性を促すことが知られている。そこで、TDAG8 発現及びコントロール LLC 細胞を酸性条件で培養し、定量的 RT-PCR 法によって種々の遺伝子の発現変動を解析した。iNOS, CXCL12, VEGF, MMP9, EREG の mRNA レベルは刺激前後で変化はなかったのに対して、Cox-2, mPGES, MMP2 の mRNA 発現誘導はコントロール細胞と比べて有意に促進された。実際に LLC 細胞投与マウスの肺組織を回収し Cox-2 の mRNA レベルを比較したところ、TDAG8 安定発現細胞投与マウスではコントロール細胞投与マウスと比較して有意に高かった。また、肺組織に含まれる脂質を質量分析計で解析した結果、TDAG8 安定発現細胞投与マウスはコントロール細胞投与マウスと比べて有意に多い PGE₂、PGI₂ を含んでいることも明らかになった。しかしながら、Cox-2 選択的阻害剤 NS398 と PGE₂ を用いた MTT 実験の結果から Cox-2 および PGE₂ は LLC 細胞の酸性条件における増殖促進には直接関与していないと考えられる。

血管新生の促進因子である転写因子 HIF1 α は低酸素下で誘導され、VEGF, アンジオポエチン 2 (Ang-2) などの血管新生因子の発現を促進する。この過程における TDAG8 の関与を調べるため、LLC 細胞を低酸素模倣モデルで用いられるデスフェロキサミン (DFO) 存在下で培養し、定量的 PCR による遺伝子変動解析を行った。しかし、HIF α , VEGF, Ang-2 のいずれもコントロールと比べて有意な には関与していないことが示唆された。

これまで観測された現象が GPCR の過剰発現に伴う非特異的な現象によるものではなく TDAG8 の機能を介していることを示すために、TDAG8 の機能欠損変異体を作製した。これらの変異体安定発現細胞は、酸性刺激に対する cAMP 産生およびチミジン取り込み実験から、pH 感知機能の大部分が損失していた。これらの変異体安定発現 LLC 細胞、コントロール細胞、野生型 TDAG8 安定発

現細胞をマウスに尾静脈注射し、肺の解析を行った。その結果、変異体発現細胞投与群は野生型 TDAG8 安定発現細胞投与群と比較して腫瘍形成が大幅に減少した。

以上の結果から今回の現象は TDAG8 の pH 感知機能に起因するものであること、cAMP の上昇を介して酸性条件での増殖能が保持されることを強く示唆していると考えられる。TDAG8 の生体での機能は従来ほとんど明らかにされておらず、本研究により癌細胞増殖との関連が初めて明らかとされた。