

審査の結果の要旨

氏名 井原 裕一朗

本研究は細胞外 pH 感知性 G 蛋白質共役型受容体 T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) の腫瘍亢進における役割を明らかにするため、TDAG8 安定発現マウス肺ガン細胞 (LLC 細胞) を用いて *in vitro*, *in vivo* の解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. リポフェクション法により遺伝子を導入し、セルソーティングシステムにより精製した TDAG8 安定発現 LLC 細胞はコントロール細胞と比較して細胞外 pH 感知性を示し、酸性刺激に応じて cAMP を産生した。
2. TDAG8 安定発現 LLC 細胞もしくはコントロール細胞を C57BL/6J マウスの尾静脈に注射し、肺における腫瘍形成を観察したところ、コントロール細胞投与マウスと比較して TDAG8 安定発現 LLC 細胞を注射したマウスでは腫瘍形成が著しく亢進された。また、致死率においても有意な差があることが示された。
3. 皮下注射によるモデルにおいても同様に TDAG8 は腫瘍形成を有意に促進した。
4. 酸性条件下での細胞数測定・チミジン取り込み・MTT 実験の結果から、TDAG8 は酸性条件における細胞増殖の維持に寄与していることが明らかになった。
5. キナーゼ阻害剤を用いた MTT 実験から、TDAG8 安定発現 LLC 細胞の酸性条件下での増殖維持は主に PKA および ERK 依存的であることが明らかになった。続いて、リン酸化 ERK レベル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でリン酸化 ERK の減少が見られたのに対して、TDAG8 安定発現細胞では中性条件とほぼ同レベルに維持されていた。また、PKA 阻害剤 H89 を培地に添加することにより、TDAG8 安定発現細胞の酸性条件下でのリン酸化 ERK レベルは劇的に減少したことから、PKA は ERK の上流に位置することが示唆された。PKA は B-Raf 存在細胞では ERK を活性化することが知られている。PCR により LLC 細胞では B-Raf は mRNA レベルで発現していることが明らかになった。
6. TDAG8 安定発現及びコントロール LLC 細胞を酸性条件で培養し、mRNA を回収した後に定量的 PCR 法によって種々の遺伝子の発現変動を解析した。その結果、酸性条件下で TDAG8 安定発現細胞における 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ることが示された。一方で、iNOS, MMP9, EREG, VEGF の発現量は TDAG8 の発現の有無に左右されなかった。続いて TDAG8 安定発現細胞及びコントロール細胞を尾静脈投与し、19 日後に肺から total RNA を精製した。逆転写後に real time PCR 法で Cox-2 と β -actin の発現量を調べたところ、 β -actin には大きな差がなかったのに対して、Cox-2 の発現は TDAG8 安定発現細胞投与マウスの方が有意に多かった。また、同様に肺から脂質を抽出し、質量分析による定量を行ったところ、PGE₂, PGI₂ の含有量は TDAG8 安定発現細胞投与マウスにおいて有意に高かった。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た。

7. 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では、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ことから、今回観測された腫瘍増殖現象は TDAG8 の細胞外 pH 感知性を介して起きたものであると考えられた。

以上、本論文はマウス肺ガン細胞 (LLC 細胞) に過剰発現した TDAG8 は主に PKA, ERK 依存的に腫瘍増殖を促進し、腫瘍形成を亢進することを明らかにした。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、本研究によりガン細胞増殖との関連が初めて明らかとされ、これらの知見は腫瘍増殖メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられるため、学位の授与に値するものと考えられる。