

令和元年6月19日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06873

研究課題名(和文)新しい分子標的としてのPGE2受容体/IGF-1受容体の新規シグナルクロストーク

研究課題名(英文) A novel signaling crosstalk between prostaglandin E2 receptors and IGF-1 receptor as a possible molecular target for antitumor therapy

研究代表者

高橋 徹行 (TAKAHASHI, Tetsuyuki)

武蔵野大学・薬学部・講師

研究者番号：00403692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓がん細胞株BxPC-3を用いてメタボローム解析を実施したところ、EP2/EP4拮抗剤で前処理した後IGF-1刺激を行うことによりIGF-1単独刺激群に比していくつかの代謝経路において顕著な代謝物レベルの変動が認められた。このうち、グルタミン酸代謝経路内のGGCTという変換酵素についての詳細な検討を実施した。

GGCTのノックダウン解析にて、GGCT欠損が細胞増殖速度の低下とG0/G1 arrestの惹起をもたらす事が分かった。一方、GGCTを過剰発現させたところ、予想に反し細胞増殖速度の有意な低下が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりPGE2受容体とIGF-1受容体のシグナルクロストークには細胞内代謝の変動が関与する事が初めて示された。本研究結果はがん細胞増殖における細胞内シグナル伝達と細胞内代謝変動の相互的な影響を強く示唆するものとして意義深いものである。

GGCTは、腫瘍増殖を促進すると考えられていたが、本検討により過剰な発現もむしろ細胞増殖速度の低下をもたらす事が示された。この結果は生理的発現レベルを逸脱させるとその高低に関わらず深刻な細胞毒性が発揮される事例でと考えられ、この点は、本邦をはじめ世界的に行われている分子標的治療(特に核酸医薬)の判定基準を考慮する際の材料となる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Using human pancreatic cancer cells BxPC-3, metabolome analyses were conducted. Compared with IGF-1-treated cells, EP2/EP4 antagonists-pretreated IGF-1-treated cells caused marked increases of metabolites in glutamate-metabolic pathway and coline- metabolic pathway, and apparent decreases of metabolites in pentose-phosphate-metabolic pathway. Of these, gamma-glutamylcyclotransferase (GGCT), which play a role in glutamate-metabolic pathway was further investigated.

Stable knockdown cells derived from BxPC-3 decreased cell growth rate and exhibited G0/G1 arrest. Furthermore, susceptibility to IGF-1-induced growth stimulation was also decreased, whereas effects of EP2/EP4 antagonists on abrogation of IGF-1-induced growth stimulation was diminished. Interestingly, GGCT overexpression in parental BxPC-3 also induced decrease of cell growth rate and ERK activation.

研究分野：細胞生物学、腫瘍学

キーワード：PGE2受容体 がん メタボローム グルタミン酸代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

プロスタグランジンを始めとするエイコサノイドは多岐に渡る生理活性を有し、生体内の恒常性維持に大きな役割を果たしている。その生産量の過剰な増加または減少が多く数の疾病において見られ、がんにおいては多くの場合で生産量の過剰亢進が認められる。エイコサノイドはそれぞれ特異的な膜七回貫通型受容体と結合する事で多様な細胞内シグナル伝達系が活性化または不活性化され、多くのがん組織ではエイコサノイド産生亢進と細胞増殖・生存シグナル活性化は相関する事が知られている。これまでに、申請者はエイコサノイド受容体を介する細胞内シグナル伝達のがんの治療標的になりうるかを検討し、PGE2 受容体のリガンド結合領域を利用した可溶性デコイレセプターが前立腺がん細胞の溶骨性増殖、子宮内膜がん細胞の子宮内増殖、卵巣がん細胞の腹膜播種を PGE2 受容体シグナリング依存性に抑制する事、更に、膵臓がん細胞において PGE2 受容体 EP2/EP4 と Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R)の間で細胞増殖・生存シグナルに関するクロストークが認められ、このクロストークには protein kinase C- $\theta$  (PKC- $\theta$ )及び MAP4K3 活性が中心的な役割を担っている事を報告してきた。この MAP4K3 はアミノ酸による細胞内栄養応答シグナルのセンサー分子として mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路を介した糖・脂質代謝調節に関与する事が示唆されている。近年、Warburg 効果などで説明されるがん細胞でのエネルギー産生系の偏りが細胞増殖・生存、アポトーシス耐性、腫瘍免疫抑制、転移・浸潤などの減少に貢献している事が明らかになってきたが、申請者が明らかにした EP2/EP4 と IGF1R 間のシグナルクロストークにおける MAP4K3 活性の変動ががん細胞中の代謝調節系にどのような影響を与えるかという点は殆ど分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、予備検討によって見出したプロスタグランジン E2 受容体 (EP) と insulin-like growth factor-1 受容体 (IGF1R) 間での新規シグナルクロストークおよびそれに関与する分子ががん分子標的治療に有用であるかを、膵臓がんを始めとした分子標的治療戦略が確立していない種類のがん細胞株、腫瘍モデル、臨床検体を用いた検討を通して明らかにしていく事を目的とする。並行して、上述の予備検討で得られた知見を基に、EP と IGF1R 間のシグナルクロストークによって影響を受ける細胞内代謝を精査する事で、新たながん分子標的治療に有用な分子を抽出し、その有用性の評価を通して新たな標的分子の提示を行う事を旨とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、EP と IGF1R 間のシグナルクロストークおよびそれに関与する分子のがん分子標的治療における有用性を明らかにする事を目的として、培養細胞株や腫瘍モデル、臨床検体を用いた細胞生物学的・実験病理学的解析を展開する。併せて、IGF-1 分泌性膵臓がん細胞由来の腫瘍組織を用いたメタボローム解析を実施し、上記シグナルクロストークによってレベルが変動する細胞内代謝物に関与する分子のがん細胞増殖などにおける意義を明らかにする事を旨として培養細胞株や腫瘍モデルを用いた細胞生物学的・実験病理学的解析を展開する。

### 4. 研究成果

まず、膵臓がん細胞株ならびにヒト膵臓がん組織で認められた PGE2 受容体 EP2/EP4 と IGF-1 受容体のシグナルクロストークの有無を乳がんおよび前立腺がん細胞株を用いて調べたところ、乳がん細胞株 MCF-7 と前立腺がん細胞株 DU-145 においてこのシグナルクロストークの存在を示唆する結果が得られた。また、腎明細胞がん、肝細胞がん、大腸がんの組織マイクロアレイを用いて EP2、EP4、IGF-1R、MAP4K3、PKC- $\theta$  の免疫染色をそれぞれ行ったところ、全てのパラメータで陽性を示した検体はそれぞれ 9.7%、33.9%、35.5%であった。これらの結果より、本シグナルクロストークは膵臓がんでのみ観察されるものではなく、広範な種類のがんにおいて起こり得る可能性が示唆された。

上段で検討したパラメータの MAP4K3 は mammalian target of rapamycin (mTOR) を介した細胞内代謝調節に関与する事が知られていたため、本シグナルクロストークによる IGF-1 誘導性のがん細胞増殖制御に細胞内代謝調節が関与する可能性が考えられた。そこで、膵臓がん細胞株 BxPC-3 を用いてメタボローム解析を実施した。その結果、EP2/EP4 拮抗剤で前処理した後 IGF-1 刺激を行うことにより IGF-1 単独刺激群に比してグルタミン酸代謝経路およびコリン代謝経路の代謝物群の顕著な増加と、ペントース-リン酸経路代謝物群の顕著な減少が認められた。以上の点より、EP2/EP4 と IGF-1 受容体のシグナルクロストークによる IGF-1 誘導性がん細胞増殖制御にはある種の細胞内代謝変動が関与する可能性が示唆された。続いて、上記 3 種の代謝経路の代謝産物の産生および変換に関与する酵素群の mRNA 発現レベルの変動を定量 RT-PCR によって検討した。その結果、グルタミン酸代謝経路内の  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase (GGCT)、4-aminobutylate aminotransferase、succinate-semialdehyde dehydrogenase の 3 分子の発現レベル変動がメタボローム解析の結果と良く相関した。Western blotting によるタンパク発現

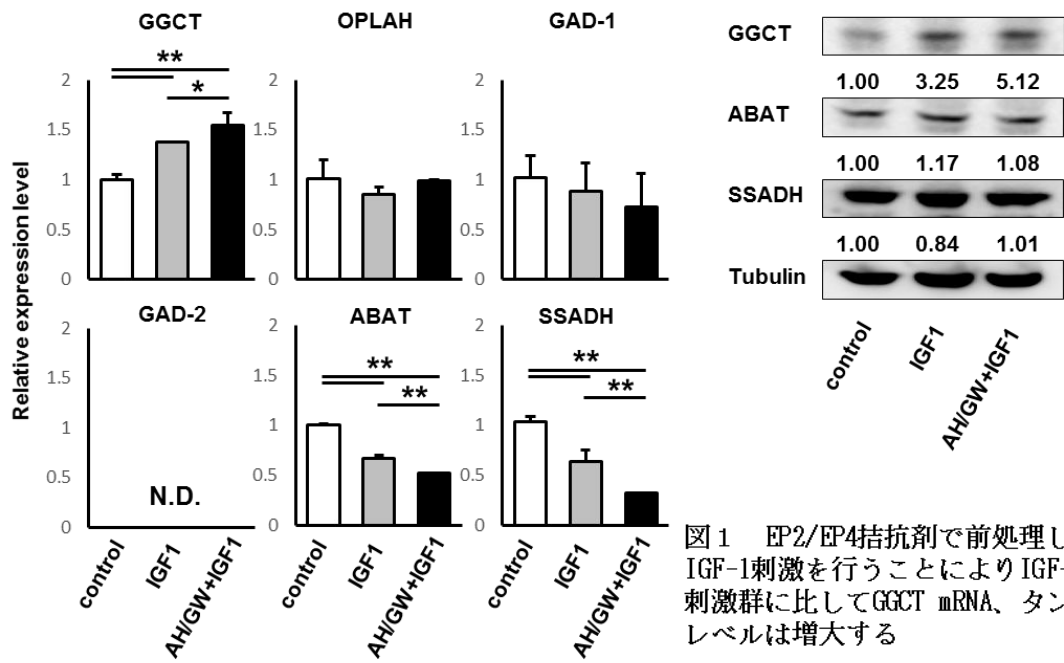


図1 EP2/EP4拮抗剤で前処理した後 IGF-1刺激を行うことにより IGF-1単独刺激群に比してGGCT mRNA、タンパクレベルは増大する

レベルの変動をさらに検討したところ、GGCTのみが定量 RT-PCR の結果と相関していたため、この分子に関するより詳細な検討を行う事とした。

まず、レトロウイルスベクターによる shRNA 発現系を用いた BxPC-3 由来恒常的ノックダウン細胞株の樹立を試み、親株と比して GGCT mRNA、タンパク発現が 90%以上抑制されているノックダウン株の樹立に成功した。このノックダウン株は細胞増殖速度が親株より有意に低く、G0/G1期の細胞数増加と S 期および G2/M 期の細胞数減少、すなわち G0/G1 arrest が引き起こされていた事から、細胞増殖における GGCT の作用には細胞周期制御も関与している事が明らかになった。また IGF-1 による増殖刺激に対する感受性も低下していたが、EP2/EP4 拮抗剤前処理による IGF-1 誘導性増殖刺激反応抑制作用も鈍化させていた。この GGCT ノックダウンによる全ての変動は、変異 GGCT (アミノ酸配列が変化しないように shRNA 標的配列を変異させた GGCT) 再導入する事で全て回復した事から、GGCT ノックダウンによる効果はオフターゲット効果によるものではない事が示された。

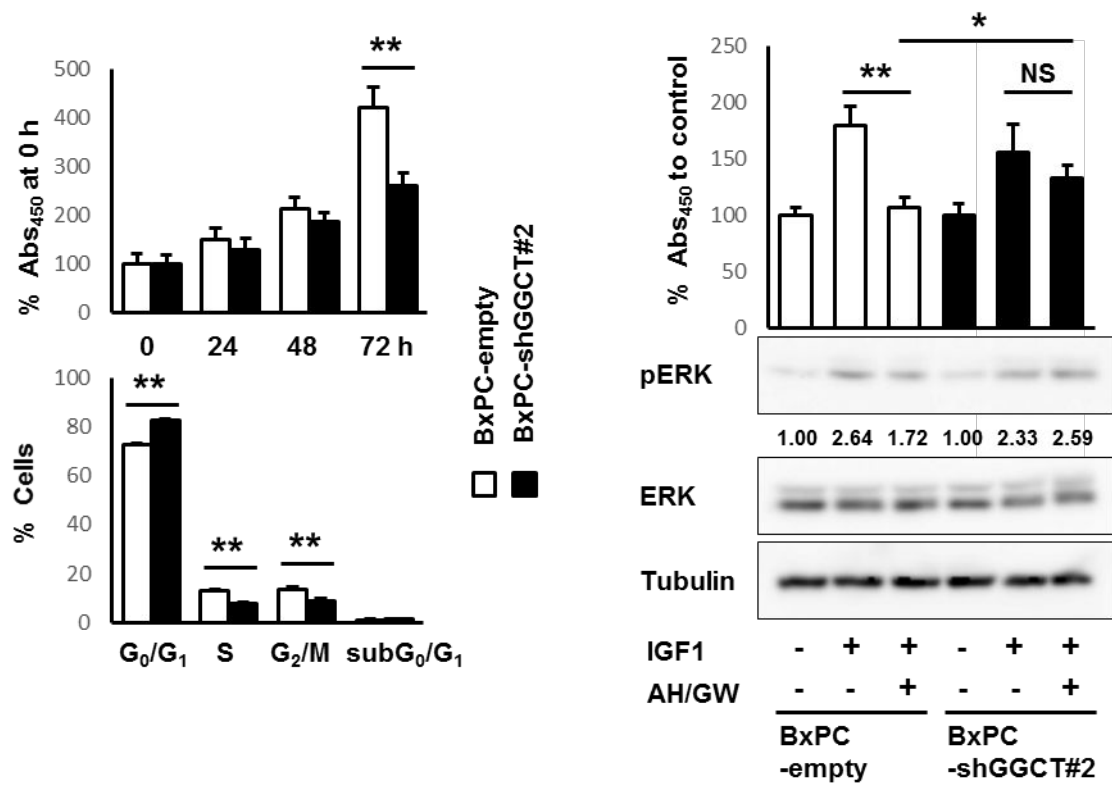


図2 GGCTノックダウンは細胞増殖速度の低下、G0/G1期の細胞数増加とS期およびG2/M期の細胞数減少を引き起こし、IGF-1による増殖刺激に対する感受性も低下させるが、EP2/EP4拮抗剤前処理による IGF-1誘導性増殖刺激反応抑制作用も鈍化させる。

興味深いことに、親株の BxPC-3 に未変異体および変異 GGCT を過剰発現させたところ、いずれの過剰発現でも予想に反し細胞増殖速度の有意な低下と活性化 ERK レベルの低下が認められた。過去の報告では、GGCT は多くの腫瘍組織において過剰発現が認められ、この遺伝子をノックダウンするといくつかの癌細胞株はアポトーシス誘発などを介して細胞増殖が抑制される事から、GGCT は腫瘍増殖に促進的な影響を及ぼす(本研究のノックダウン実験も同様の影響を示唆する結果であった)分子と考えられていたが、この結果はそれとは正反対の作用を示すものである。これは、がん細胞の増殖制御において基底レベルの GGCT 発現量とそれに付随するグルタミン酸代謝経路関連物質が極めて大きな役割を果たし(細胞種ごとにその基底レベルは異なると思われる)この破綻は細胞増殖に重大な影響を及ぼす事を示唆するものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Tetsuyuki Takahashi, Hirona Ichikawa, Yuuki Morimoto, Koichi Tsuneyama, Takao Hijikata. Inhibition of EP2/EP4 prostanoid receptor-mediated signaling suppresses IGF-1-induced proliferation of pancreatic cancer BxPC-3 cells via upregulating gamma-glutamyl cyclotransferase expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press. 査読有

Tetsuyuki Takahashi, Shu Taira, Ulrich Deuschle, Takeshi Nishida, Makoto Fujimoto, Takao Hijikata, Koichi Tsuneyama. Tsumura-Suzuki obese diabetic mice-derived hepatic tumors closely resemble human hepatocellular carcinomas in metabolism-related gene expression and bile acid accumulation. *Hepatol. Int.*, **12**, 254-261, 2018. 査読有  
Syunsuke Watanabe, Tetsuyuki Takahashi, Hirohisa Ogawa, Hisanori Uehara, Takaaki Tsunematsu, Hayato Baba, Yuki Morimoto, Koichi Tsuneyama. Daily coffee intake inhibits pancreatic damage and non-alcoholic steatohepatitis in a mouse model of spontaneous metabolic syndrome, TSOD mice. *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, **15**, 170-177, 2017. 査読有

Tetsuyuki Takahashi, Takeshi Nishida, Hayato Baba, Hideki Hatta, Johji Imura, Mitsuko Sutoh, Syunji Toyohara, Ryoji Hokao, Syunsuke Watanabe, Hirohisa Ogawa, Hisanori Uehara, Koichi Tsuneyama. Histopathological characteristics of glutamine synthetase-positive hepatic tumor lesion in a mouse model of spontaneous metabolic syndrome (TSOD mouse). *Mol. Clin. Oncol.*, **5**, 267-270, 2016. 査読有

Tetsuyuki Takahashi, Hayato Baba, Hideki Hatta, Hirohisa Ogawa, Hisanori Uehara, Yoshiyuki Nishida, Iwao Kataguchi, Koichi Tsuneyama. Oral administration of  $\alpha$ -lipoic acid increases serum levels of ascorbic acid and tocopherol: a pilot hematological study. *Curr. Top. Nutraceutical Res.*, **13**, 161-165, 2015. 査読有

Makoto Sato, Setsuko Todoriki, Tetsuyuki Takahashi, Ezar Hafez, Chie Takasu, Hisanori Uehara, Kohji Yamakage, Takashi Kondo, Kozo Matsumoto, Masakazu Furuta, Keisuke Izumi. Modifications of azoxymethane-induced carcinogenesis and 90-day oral toxicities of 2-tetradecylcyclobutanone as a radiolytic product of stearic acid in F344 rats. *J. Toxicol. Pathol.*, **28**, 99-107, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

木田ほのか、青木寧々、高橋徹行、土方貴雄 乳癌におけるがん免疫の応答性 日本薬学会第 138 年会 平成 30 年 3 月

青木寧々、青木夏美、木田ほのか、上原久典、高橋徹行、土方貴雄 ESR1 発現欠損による乳がん悪性化の分子機序の解析 本薬学会第 138 年会 平成 30 年 3 月

高橋徹行、岡山由紀子、土方貴雄 SV40-miR-S1 の内因性テロメラーゼ発現に対する影響 日本薬学会第 137 年会 平成 29 年 3 月

高橋徹行、常山幸一 長期飼育によって発症する TSOD マウス肝腫瘍の代謝プロファイル解析 第 11 回 TSOD (肥満・糖尿病) マウス研究会情報交換会 平成 29 年 1 月

高橋徹行、上原久典、常山幸一、土方貴雄 プロスタグランジン E2 受容体シグナリング阻害は膵臓がんにおける IGF-1 受容体シグナリングを介した増殖刺激を消失させる 日本薬学会第 136 年会 平成 28 年 3 月

Hisanori Uehara, Tetsuyuki Takahashi, Koichi Tsuneyama. Association between retinol-binding protein 4 expression and clinicopathological findings in colorectal cancer. 日本癌学会第 74 回総会 平成 27 年 10 月

上原久典、高橋徹行 脂肪細胞由来の FABP4 による前立腺癌細胞の骨内増殖促進 第 24 回日本がん転移学会学術集会・総会 平成 27 年 7 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

### (2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。