

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01360

研究課題名(和文)がん幹細胞を生へ導く死細胞からのアラームシグナルとスイッチングマシーナリーの解明

研究課題名(英文)Alarm signal by dead cells activated progressive properties of tumor cells.

研究代表者

岸本 幸治 (KISHIMOTO, Koji)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・講師

研究者番号：50280699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスによる神経膠腫の遊走・浸潤については未解明な点が多く残されている。我々は酸化ストレス下に産生される酸化遊離脂肪酸によって活性化される膜受容体G2Aに着目し、遊走・浸潤に関わる機序について検討を行った。G2Aのリノール酸酸化物による刺激は神経膠腫細胞の上皮間葉転換様の変化を誘導し、遊走・浸潤を増大させたが、これらはG2Aのノックダウンによって顕著に抑制された。G2Aノックダウン細胞の同所・異所移植においても腫瘍形成および転移は対照よりも顕著に抑制され、生存期間の大幅な延長が示された。これらの結果からG2Aの不活性化は神経膠腫細胞の遊走・浸潤を防ぐ治療戦略の一つになる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍細胞の悪性化の一つは浸潤・転移である。酸化ストレスが腫瘍細胞の浸潤・転移を誘導することが示されているが、これまで酸化ストレス環境下でどのような機序が働いているのかについては不明な点が多かった。本研究では酸化遊離脂肪酸(OFFA)受容体のG2A(GPCR)が酸化ストレス下に産生されるOFFAを環境のアラームシグナルとして受容し、腫瘍細胞の浸潤・転移の誘導に関与している可能性を示した。酸化脂質とその受容体が腫瘍の悪性化に寄与していることを明らかにしたことは新規で学術的にも意義が大きい。GPCRの阻害を介してシグナル伝達の上流で悪性化を抑制できる可能性は創薬への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：A mechanism for migration and invasion of tumor cells under oxidative stress is not well understood. Here, we focused on a membrane receptor, G2A, that is activated with oxidized lipids, and it was found to be associated with the migration and invasion of glioma cell lines, U251 cells, and U87 cells. An oxidized linoleic lipid, 9(S)-hydroxy-octadecadienoic acid, is a potent ligand for G2A that is produced under the oxidative environment. The G2A activation with the ligand enhanced the migration and invasion through the epithelial-mesenchymal transition-like process of the cells in vitro, whereas the G2A-knockdown abolished them. The orthotopic and heterotopic xenograft mouse bearing G2A-knockdown cells significantly diminished tumorigenic and metastatic events and notably extended the survival compared to that bearing G2A-overexpressing cells. These data suggest that G2A suppression might be an effective therapeutic strategy to prevent glioma invasion.

研究分野：細胞生物学、脂質生化学

キーワード：G2A 酸化遊離脂肪酸 リノール酸 悪性腫瘍 遊走 浸潤 転移

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫は浸潤性の高い腫瘍で腫瘍細胞の異形化に伴って転帰不良となるために腫瘍細胞浸潤の機序の早急な解明と新規治療法の開発が望まれている。また、悪性腫瘍細胞の遊走・浸潤は酸化ストレスによって促進されることが示されているが、その関係機序はよく理解されていない点が多い。酸化遊離脂肪酸によって活性化される膜受容体ヒト G2A (G2A) はヒト表皮角化細胞において紫外線 (酸化ストレス) で誘導されることや (*J Invest Dermatol* 128:1123-33 2008) 免疫細胞の遊走を制御していること (*PNAS* 101:245-50 2004) などが示されている。G2A は酸化ストレスによって生理学的な制御を受け、細胞の運動性制御に関わっているというこれらの結果に基づいて悪性腫瘍の遺伝子発現データベースおよび脳腫瘍組織アレイを用いた悪性腫瘍における G2A の発現解析を行った。その結果、G2A は悪性脳腫瘍を含むさまざまな組織の転移性腫瘍で高発現していることが示された。これらの根拠を背景にして G2A は酸化ストレス下において悪性腫瘍細胞の遊走・浸潤の機序に寄与しているのではないかと仮定し、この関係機序について明らかにすることを目的とした。なお、マウス G2A は酸化遊離脂肪酸に対するリガンド特異性を示さないことから、本研究はヒトの G2A に焦点を当てた。

2. 研究の目的

神経膠腫は浸潤性の高い腫瘍で腫瘍細胞の異形化に伴って転帰不良となることから、浸潤の機序の早急な解明と新規治療法の開発が望まれている。これまでに悪性腫瘍細胞の遊走・浸潤が酸化ストレスによって促進されることが示されているが、その関係機序については不明な点が多い。研究代表者は酸化遊離脂肪酸によって活性化される膜受容体ヒト G2A (G2A) が酸化ストレスによって生理学的に制御を受け、細胞運動性の制御に関わっていることが示されていることから G2A が悪性腫瘍細胞の遊走・浸潤の機序に関わっている可能性を想定し、悪性腫瘍の遺伝子発現データベースおよび脳腫瘍組織アレイを用いて悪性腫瘍における G2A の発現解析を行ったところ、悪性脳腫瘍を含む多様な転移性腫瘍で G2A の発現が高くなっている結果を得た。これらの背景から G2A の悪性腫瘍細胞の遊走・浸潤の機序における役割について *in vitro* および *in vivo* で明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) G2A が悪性腫瘍細胞の遊走・浸潤に関わっているのか推定するために悪性腫瘍の遺伝子発現データベース、Oncomine のプラットフォームを用いてさまざまな悪性腫瘍における G2A mRNA の発現について調べた。加えて脳腫瘍における G2A タンパク質の発現レベルを確かめるために病期ごとの脳腫瘍組織アレイを用いて G2A の免疫染色を行った。

(2) 悪性腫瘍の遺伝子発現データベースやアレイ解析によって示された G2A の発現結果をもとに、G2A の発現と活性化が遊走・浸潤に与える効果について *in vitro* の評価を行った。神経膠芽腫細胞株 U251 細胞の G2A 安定ノックダウン細胞を用いて G2A の強力なリガンドの一つであるリノール酸酸化物、9(S)-ヒドロキシオクタデカジエン酸 [9(S)-HODE] 刺激下にボイデン・チャンパーアッセイおよび神経膠芽腫細胞株 U251 細胞、U87 細胞および子宮頸部腺がん細胞株 HeLa 細胞の G2A 安定ノックダウン細胞を用いて創傷治癒解析を行った。引き続きこの遊走・浸潤の生化学的機序を明らかにするために 9(S)-HODE 刺激後の上皮間葉転換関連タンパク質の発現の変化について評価した。

(3) *In vitro* の解析で得られた結果が *in vivo* で反映されるのか評価するために免疫不全マウス (NOG マウス) を用いた G2A ノックダウン細胞の異種同所および異所移植を行い、G2A の抑制効果を造腫瘍能と転移能および生存期間の観点から評価した。

4. 研究成果

(1) 悪性腫瘍の遺伝子発現データベースを用いてさまざまな組織の悪性腫瘍における G2A の発現レベルについて調べた。これまでに各組織の正常細胞において G2A の発現レベルは低く維持されている一方で血液系細胞、とりわけリンパ系細胞には高発現していることが示されている。データベースの結果でも G2A は血液系悪性腫瘍で高発現していることが示された。また、血球系以外のさまざまな組織の悪性腫瘍でも G2A は高発現していることが示されたが、とりわけ転移性腫瘍細胞で発現が高くなっていることが示された。また、高い病期の悪性腫瘍でも G2A は病末期の神経膠芽腫 (グレード IV) よりも退形成性の悪性腫瘍細胞が多くを占める病期 (グレード III) において高発現していることが明らかとなり、脳腫瘍組織アレイを用いた G2A の免疫染色でも同様の結果が得られた。これらの結果から G2A が悪性腫瘍の遊走・浸潤の機序に関与している可能性が示唆された。加えて、症状の発現までに時間を要するが、上皮間葉転換が誘導される未分化な細胞に G2A の発現は高い可能性が推察された。

(2) 次にデータベースおよびアレイを用いた結果と *in vitro* における悪性腫瘍細胞株の遊走・浸潤における G2A 依存性あるいは 9(S)-HODE 依存性を評価するために G2A 安定ノックダウン細胞を用いてボイデン・チャンバーアッセイおよび創傷治癒解析を行った。ボイデン・チャンバーアッセイにおいて MOCK コントロール細胞 (U251 細胞) の遊走は 9(S)-HODE 刺激によって増大したが、G2A ノックダウン細胞では顕著に減少した。U251 細胞、U87 細胞および HeLa 細胞を用いた創傷治癒解析においても G2A ノックダウン細胞は 9(S)-HODE 刺激 (100 nM) に対して顕著な浸潤を示さなかった。一方で G2A の過剰発現細胞はコントロールレベルよりもさらに高い遊走・浸潤能を示した。これらの結果から G2A はこれら悪性腫瘍細胞の遊走・浸潤の機序に関与している可能性が推察された。

In vitro における G2A を介した遊走・浸潤の機序を生化学的に解明するために U251 細胞において 9(S)-HODE (100 nM) に刺激に対する間葉マーカー (N-カドヘリン、MMP-2、ZEB-1) と上皮マーカー (ZO-1) の発現の経時変化について検証すると間葉マーカーが刺激後 24 時間で有意に増大する一方で上皮マーカーは 72 時間後から顕著に減少することが示された。次に間葉マーカーおよび上皮マーカーの発現における G2A 依存性を明らかにするために G2A のノックダウン、過剰発現および MOCK コントロールの細胞を用いて 9(S)-HODE (100 nM) 刺激を行い、24 時間後の間葉マーカーの発現と 72 時間後の上皮マーカーの発現を評価した。G2A のノックダウン細胞では間葉マーカーの増大と上皮マーカーの減少は示されなかったが、G2A 発現細胞では顕著な増大と減少が示された。続いて、上皮間葉転換の誘導にともなうアポトーシス活性について G2A の依存性を検証するために 9(S)-HODE (100 nM) 刺激後のアポトーシス阻害タンパク質である XIAP の発現およびカスパーズ-3、-7 の基質である PARP の切断を検証した。G2A 発現細胞では 9(S)-HODE 刺激後、24 時間で XIAP は顕著に増大した一方、G2A のノックダウン細胞ではほとんど増大は見られず、その後の増大も示されなかった。この結果を反映して 9(S)-HODE 刺激後 24 時間で G2A ノックダウン細胞においては PARP の顕著な切断が見られたが、G2A 発現細胞においては PARP の切断レベルは非常に低いことが示された。これらの結果から、U251 細胞において G2A は上皮間葉転換様の機序およびアポトーシス活性の制御に関与している可能性が示された。

(3) *In vivo* における G2A の腫瘍悪性化への寄与を評価するために G2A ノックダウン細胞の造腫瘍能について同所および異所移植モデルによって検証した。G2A 発現細胞および G2A ノックダウン細胞を NOG マウスの脳実質および腹側部皮下に移植した。G2A 発現細胞の移植マウスは頭部および腹側部皮下に顕著な腫瘍を形成し、移植後 3-5 ヶ月以内に致死に至ったが、G2A ノックダウン細胞の移植マウスは明らかな腫瘍を形成せず、移植後 14-15 週まで致死には至らなかった。また、G2A 発現細胞の異所移植モデルにおいては原発巣の腫瘍に加えて、肺、肝臓、腎臓、腸管などの末梢臓器をはじめ骨髄、胸腺、脾臓およびリンパ節への転移が認められたが、G2A ノックダウン細胞の移植モデルにおいてはそれらの組織における転移は有意に減少していた。以上の結果から G2A の不活性化によって U251 細胞の悪性化を制御できる可能性が示された。加えて、造腫瘍能と転移能および生存率について MOCK コントロール細胞と過剰発現細胞の移植マウスモデルとの間には有意差がなかった。そこで U251 細胞の MOCK コントロールおよび G2A 過剰発現細胞の同所移植マウスモデルの腫瘍切片を用いて G2A に対する免疫染色を行ったところ、両者の間で G2A の発現に差がなくなっていることが示された。G2A は酸化ストレスによって誘導される受容体であることを考えると移植後、長期にわたる腫瘍形成において腫瘍塊内部の酸化ストレスによって MOCK コントロール細胞にはより強力に G2A が誘導された可能性が推察される。

以上の結果から、G2A は悪性腫瘍細胞の遊走・浸潤の機序に深く関与している可能性が示され、G2A の抑制は悪性脳腫瘍の浸潤を妨げる効果的な治療戦略の一つになりえる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岸本幸治、原口 崇、清水 健志、宮下知治、和泉 孝志
2. 発表標題 膜受容体G2Aはアストロサイトーマ細胞株にグリア間葉移行を誘導する
3. 学会等名 第76回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岸本幸治、原口崇、清水健志、井出宗則、宮下知治、大野綾子、二川健、和泉孝志
2. 発表標題 酸化脂質膜受容体であるヒトG2Aは脳腫瘍細胞の上皮間葉転換様プロセスを制御する
3. 学会等名 第59回 日本生化学会 中国・四国支部例会（鳥取）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	亀村 典生 (KAMEMURA Norio) (10632656)	徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教 (16101)	
研究分担者	宮下 知治 (MIYASHITA Tomoharu) (30397210)	金沢大学・医学系・協力研究員 (13301)	