

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09344

研究課題名(和文)新規グレリン受容体結合蛋白PLA2G16の消化管癌細胞における役割

研究課題名(英文) Role of novel ghrelin receptor binding protein PLA2G16 in gastrointestinal cancer cells

研究代表者

武田 宏司 (Takeda, Hiroshi)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：60261294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：消化器がんが発現しているグレリン受容体(GHS-R1a)の意義を明らかにするため、GHS-R1aと相互作用する細胞内分子をyeast two-hybrid法にて探索した。その結果、Rasの機能を負に制御する分子として報告されている PLA2G16 (HRASLS3 / HRSL3 / HREV107 H-Rev107 / AdPLA) がGHS-R1aのC末端部分と結合することを見出した。さらに、GHS-R1aがPLA2G16のホスホリパーゼA2活性を抑制することを明らかにした。GHS-R1aは、PLA2G16の制御を介して消化器がん細胞の機能に影響を与える可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで不明確であった消化器癌細胞におけるグレリン受容体の機能制御を明らかにしたものである。本研究をさらに展開することにより、グレリンによる癌増殖経路を細胞選択的に遮断する方法を見出すことが期待できる。また、グレリン受容体作動薬を臨床応用する際、これまで懸念されてきたような癌細胞増殖への影響を排除して、このクラスの薬剤を臨床現場で安全に使用できる理論的基盤を構築できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To clarify the significance of the ghrelin receptor (GHS-R1a) expressed in gastrointestinal cancer cells, we searched for intracellular molecules that interact with GHS-R1a by the yeast two-hybrid method. As a result, I found that PLA2G16 (HRASLS3 / HRSL3 / HREV107 H-Rev107 / AdPLA), which has been reported as a molecule that negatively regulates Ras function, binds to the C-terminal part of GHS-R1a. Furthermore, it was revealed that GHS-R1a suppresses phospholipase A2 activity of PLA2G16. It is suggested that GHS-R1a may influence the function of gastrointestinal cancer cells via regulation of PLA2G16.

研究分野：消化器内科学

キーワード：グレリン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

グレリンは成長ホルモン分泌の他、摂食亢進、消化管運動亢進、脂肪蓄積をはじめ、代謝、循環、免疫、中枢神経など生体の生理機能に広範にかかわっている。またごく最近では、内在性のグレリンシグナルの増強が抗加齢作用および寿命延長効果をもたらすことがわれわれのグループにより明らかにされている (Fujitsuka N et al. Mol Psychiatry 2016)。グレリンのもつこれらの多彩な生理作用を応用して、心不全、慢性閉塞性肺疾患、神経性食思不振症などに対するグレリンの臨床試験が開始されており、消化器領域においても、グレリン受容体の作動薬が癌悪液質、術後腸管麻痺、胃排出遅延などの病態における治療薬として期待されている。グレリン受容体作動薬の欠点として、脱感作されやすいことその他、ある種の癌細胞にグレリン受容体の発現がみられ癌の成長を促進する懸念が払拭されていないことがある。これまでの *in vivo* の検討ではグレリンが癌の増殖・進展を促進したとの報告はないが、グレリン受容体作動薬を臨床応用する際には常に念頭におくべき重要な課題のひとつである。

グレリン及びグレリン受容体 (GHS-R1a) は非常に多くの正常および癌組織に発現しており、グレリンおよび GHS-R1a の一塩基多型 (SNP) が癌のリスクに関係するとの報告がある。グレリンは胃癌細胞 (AGS)、大腸癌細胞 (SW480, HT-29, Caco-2) などある種の消化管癌細胞において増殖を促進し、アポトーシス抵抗性、浸潤能を高めるとされている。ところが一方、他の癌種では増殖に影響を与えないもしくは抑制するとの報告も多数認められる (Chopin LK et al. Endocr Rev. 2012)。

癌細胞の種類によりグレリンの影響がこれほどまでに異なる理由は未だ不明である。グレリン受容体において癌種ごとに特有のアミノ酸変異が生じている可能性は低く、その他の理由として考えられるのは、リン酸化をはじめとするグレリン受容体の翻訳後修飾の違いである。また別な可能性としては、癌細胞にグレリン受容体と相互作用する分子が存在し、その仕組みが癌細胞ごとに異なっていることも考えられる。しかしながら、これまでのところ、その可能性を検討したに報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究は、これまで不明確であった消化器癌細胞におけるグレリン受容体 (GHS-R1a) の機能制御を明らかにすることを最終的な目標とする。そこで、今回は癌細胞にグレリン受容体と相互作用する分子が存在し、その仕組みが癌細胞ごとに異なっているとの仮説を立てて検討をおこなうこととした。これまでのところ、GHSR1a と相互作用することが報告されている分子は、ヘテロダイマーを形成する他の GPCR を除けば、G 蛋白 (G<sub>s</sub>、G<sub>i</sub>)、アレスチンのみである。そこで、申請者は GHS-R1a と相互作用する可能性のある分子について網羅的な探索を行い、同定された新規分子が癌細胞におけるグレリンの作用にどのような影響をあたえるかを明らかにすることを計画した。

## 3. 研究の方法

GHS-R1a と相互作用する分子を探索するために、GHS-R1a の C 末端側 43 残基 (C-tail) を bait として、yeast two-hybrid 法を用いてヒトユニバーサル cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。得られたクローンから消化器癌の病態に関わる可能性を有する候補遺伝子を選択した。PCR 法にて目的遺伝子のクローニングをおこなった後、GHS-R1a 安定発現 HEK-293 細胞に導入し、免疫沈降-ウェスタンブロットによる結合実験および機能解析実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 新規結合タンパク質のスクリーニング

GHS-R1a の C 末端側 43 残基 (C-tail) を bait として yeast two-hybrid スクリーニングの結果、58 個の陽性クローンが得られ、このなかから 7 種の候補遺伝子を抽出した。本研究では、以下の理由から PLA2G16 に注目して検討をおこなった。PLA2G16 は HRASLS3 / HRSL3 / HREV107 H-Rev107 / Adipocyte phospholipase A2 ( AdPLA) などの名称でも報告されている 162 アミノ酸残基からなる 18kDa のタンパク質である。本分子は原癌遺伝子 Ras の機能を負に制御する分子として subtraction cloning によって見出されたため、癌抑制遺伝子のひとつと考えられてきた。事実、多くの消化管癌においてプロモーターのメチル化によりその発現が強く抑制されていることが明らかにされている (Mardian EB et al. J Biomed Sci. 2015)。また、ごく最近、PLA2G16 が Ras のファルネシル化を阻害することにより Ras の機能を抑制することが明らかにされた (Wang CH et al. J Biomed Sci. 2014)。しかし、一方で PLA2G16 のホスホリパーゼ活性がグリセロリン脂質から脂肪酸を遊離させ、生成するプロスタグランジンやリゾリン脂質が癌の増殖や浸潤・転移を促進するとする報告もあり、癌遺伝子としての一面もあわせ持っていると考えられている。

### (2) GHS-R1a と AdPLA の結合性の検討

続いて、GHS-R1a と AdPLA の結合性を確認するため、HEK293 細胞に両者を一過性に発現させ共免疫沈降法 ( IP) とウェスタンブロット法を用いて検討を行った。その結果、野生型の GHS-R1a と AdPLA が結合することが確認された。なお、C-tail を欠損させた変異体 (GHS-R1a<sup>-C</sup>) と AdPLA の結合も確認されたことから、C-tail 以外にも結合部位が存在することが示唆された。

### (3) AdPLA が GHS-R1a を介したシグナル伝達に与える影響の検討

次に、HEK293-GHS-R1a 安定発現株を用い、AdPLA が GHS-R1a を介した既知のシグナル伝達に与える影響を検討した。GHS-R1a は Gq タンパク質を介して ERK シグナルを活性化することが知られているため、SRE (serum response element) を有するレポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイおよび定量的 RT-PCR 法による c-fos mRNA 発現量を解析した。その結果、グレリンにより誘導される SRE レポーター遺伝子の活性化および c-fos mRNA 発現上昇のいずれも、AdPLA の共発現により変動しないことが明らかとなった。

### (4) GHS-R1a が AdPLA のホスホリパーゼ活性に与える影響の検討

最後に、AdPLA の酵素活性に与える GHS-R1a の影響を検討した。HEK293 細胞に一過性に発現させた AdPLA を免疫沈降法により回収し、Enzchek® PLA2 Assay Kit を用いてホスホリパーゼ A2 活性を測定した。その結果、GHS-R1a の共発現は AdPLA のホスホリパーゼ A2 活性を低下させることが見出された。この効果は、GHS-R1a アゴニスト/インバースアゴニストによる影響がみられなかったことから、GHS-R1a はシグナル非依存的に AdPLA の酵素活性を低下させていると考えられた。

本研究において、GHS-R1a 新規結合タンパク質として AdPLA を同定した。AdPLA は GHS-R1a による ERK シグナル活性化の制御には関与しない可能性が高いと考えられた。一方、GHS-R1a の共発現は AdPLA のホスホリパーゼ A2 活性を低下させること、また、その作用はグレリン非依存的であることが示唆された。

これまでのところ癌細胞の種類によりグレリンの影響が著しく異なる機序を明確にした報告はない。特に本研究のように、癌細胞のグレリン受容体と相互作用する分子に着目した研究は皆無である。今後、本研究をさらに展開することで、グレリンによる癌細胞の増殖経路を細胞選択的に遮断する方法を発見できるようになる可能性がある。また、グレリン受容体作動薬を臨床応用する際、これまで懸念されてきたような癌細胞増殖への影響を排除して、このクラスの薬剤を臨床現場で安全に使用できる理論的基盤を構築できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsumoto C, Yamada C, Sadakane C, Nahata M, Hattori T, Takeda H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Psychological stress in aged female mice causes acute hypophagia independent of central serotonin 2C receptor activation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0187937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0187937	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka H, Watanabe A, Konishi M, Nakai Y, Yoshioka H, Ohkawara T, Takeda H, Harashima H, Akita H.	4. 巻 4
2. 論文標題 The delivery of mRNA to colon inflammatory lesions by lipid-nano-particles containing environmentally-sensitive lipid-like materials with oleic acid scaffolds.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heliyon.	6. 最初と最後の頁 e00959.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2018.e00959.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maehara O, Ohnishi S, Asano A, Suda G, Natsuizaka M, Nakagawa K, Kobayashi M, Sakamoto N, Takeda H.	4. 巻 21
2. 論文標題 Metformin Regulates the Expression of CD133 Through the AMPK-CEBP Pathway in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines.10.1016/j.neo.2019.03.007.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neoplasia.	6. 最初と最後の頁 545-556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neo.2019.03.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Iizuka S, Nahata M, Sekine H, Fujitsuka N, Ohbuchi K, Komokata N, Shimobori C, Hattori T, Takeda H.
2. 発表標題 Dysfunction of starvation-induced liver autophagy is associated with disruption of adaptive energy metabolism and increased mortality in aged mice on restricted diet.
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamada C, Iizuka S, Saegusa Y, Hattori T, Takeda H.
2. 発表標題 Gender difference in anorexia following stress exposure is dependent on the blocking of ghrelin signal in the NTS.
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nahata M, Sekine H, Iizuka S, Fujitsuka N, Hattori T, Takeda H.
2. 発表標題 Reduction in autophagic activities is associated with decline in gluconeogenesis and thermogenesis in aged mice on restricted diet.
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mogami S., Nahata M., Sekine H., Iizuka S., Sadatomi D., Fujitsuka N., Takeda H.
2. 発表標題 Induction of liver autophagy ameliorates impaired energy metabolism in aged mice with undernutrition.
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nahata M., Sekine H., Mogami S., Iizuka S., Fujitsuka N., Takeda H.
2. 発表標題 Dysregulation of liver mitochondrial function and dynamics is associated with vulnerability to undernutrition in aged mice.
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----