

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：35302

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21493

研究課題名(和文) 苦味受容体が起点となる有害物排除機構の発見と創薬への応用

研究課題名(英文) Elimination of toxic substance through the activation of bitter taste receptor

研究代表者

中村 元直 (Nakamura, Motonao)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：40431762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：苦味受容体の発現をヒト皮膚細胞やがん細胞で認めた。この受容体は小胞体に局在し、G12/13型と共役することを確認した。細胞内に苦味物質、あるいは抗がん剤が侵入した場合、この受容体で感知され、ABC-B1の活性化による排出機構の亢進で有害物を細胞外へ排除すると推察する。ちなみに、皮膚細胞やがん細胞を苦味物質で刺激するとABC-B1の発現は上昇する。抗がん剤耐性との関連を調べるため、苦味物質存在下で1カ月以上培養した乳がん細胞株MCF-7細胞を調整し、この細胞の抗がん剤耐性を苦味物質に晒していない親株と比較した結果、長期曝露MCF-7細胞は親株と比較して有意な抗がん剤耐性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内GPCRからの情報発信という新たなGPCR情報伝達概念を立ち上げ、生体防御の観点からは苦味受容体を基軸とした新たな生体防御(有害物排除)機構を提唱する。また臨床への応用も期待できる。ガン治療時の抗ガン剤頻回投与で起こる耐性化は臨床的に大きな問題であるが、抗ガン剤を感受する苦味受容体の拮抗剤を創製すれば抗ガン剤耐性を回避できる。皮膚組織に侵入した有害物を苦味受容体が感受できず、排除低下で皮膚障害が起こるならば、苦味受容体の賦活剤による排除亢進で皮膚障害を抑制できる。本研究は、苦味受容体を創薬標的として捉えた点では全く前例のない研究である。

研究成果の概要(英文)：We confirmed the expressions of bitter taste receptors in human keratinocytes and various human cancer cells. These receptors were intracellularly localized in ER, but not in plasma membrane, and coupled with G12/13 type of G-proteins. Furthermore, we demonstrated the enhanced expression of ABC transporter type-B1 by the stimulation with bitter substances. When cancer cells were exposed to bitter substances for over 60 days, these cells exhibited resistance to anti-cancer drug compare with parental cells. These data suggest that in these cells, bitter taste receptors function as a sensor for toxic substances entered into cells, and activate the exclusion system to export the toxic substances to extracellular area.

研究分野：細胞生物学、分子生物学

キーワード：苦味受容体 GPCR 皮膚細胞 がん細胞 有害物質排出機構

1. 研究開始当初の背景

苦味受容体は G 蛋白質共役型受容体(GPCR)ファミリーに属し、ヒトはこの遺伝子を25種類持つ。これらが受容体として働くにはホモ又はヘテロ二量体を形成することから理論上、352通りの組合せが存在する。しかも各々の二量体が異なる、且つ複数の苦味物質を感知することから、これら苦味受容体群全体で感受できる化合物は多岐に渡る。当初、苦味受容体の発現は味覚組織に局限すると考えられたが、最近では味覚器官以外の組織、例えば腸上皮細胞での発現も報告されている。しかし、いずれの報告もその生理学的意義までには至っていない。我々はこの苦味受容体が様々ながん細胞にも発現していることを見出した。では、がん細胞に発現する苦味受容体はどんな働きをしているのだろうか？我々は、がん細胞では苦味受容体は形質膜ではなく小胞体に局在することを見出した。この受容体は脂質二重膜を超えて細胞内に侵入した有害物(抗がん剤等)を感受後、これらを細胞外に排出するシステムを作動し、有害物の蓄積による細胞ダメージを回避するという作業仮説を立てた(図1)。

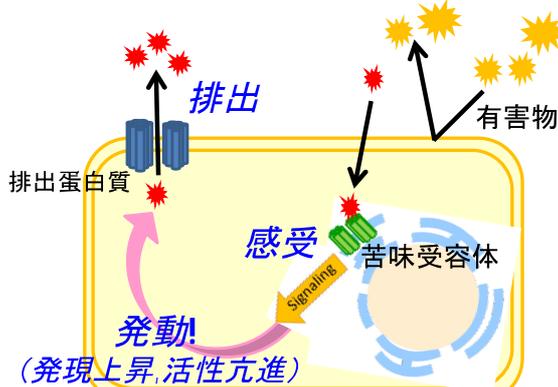
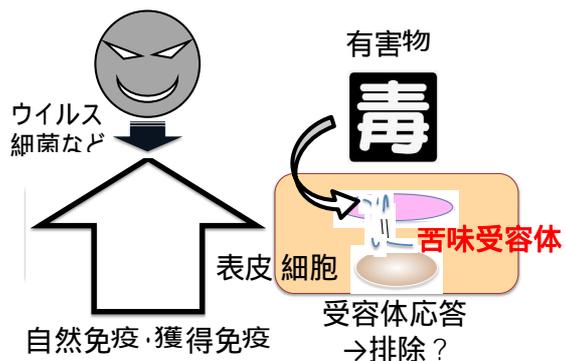


図1: 巨大分子や親水性物質の細胞内侵入は脂質二重膜によって阻止できる。しかし、疎水性の低分子(抗がん剤など)は細胞内に浸入する。苦味受容体は細胞内に侵入したこれら有害物をリガンドとして感受して活性化され、侵入を細胞に伝えて排出機構を作動し(排出蛋白質 ABC-B1 の活性化)、有害物を細胞外に積極的に排出すると予想した。

ヒトは自然界で生きる限り様々な異物に触れる。生命をも脅かすこうした有害物質は2つに分類される。1つはウイルスや細菌等の病原微生物であり、もう1つは有害化合物である。ヒトは前者に対しては主に免疫防御システムで対抗する。しかし後者に対しては、苦味感覚による摂食時の拒絶反応こそあるものの、細胞に侵入した有害物を感知し、これを排出する機構については十分解明されていない(図2)。

図2: 脂質二重膜を透過して細胞に侵入した低分子有害物(抗がん剤など)は排出されなければならない。苦味受容体はこの排出過程において基軸的な役割を担う分子に違いない。ならば、創薬標的とすることはできないだろうか？



我々は、がん細胞に発現する苦味受容体は細胞内に侵入した抗がん剤と結合することで活性化され、排出機構を作動させることで抗がん剤を細胞外に恒常的に排出し、やがては細胞に抗がん剤耐性を獲得させると推察している。加えて、本研究ではこの発見を創薬へと発展させたい。がんの化学療法時に抗がん剤を頻回投与することで起こる耐性化は臨床上の重大な問題である。もしがん細胞内の苦味受容体が抗がん剤の細胞外排出に関わるならば、苦味受容体群の中から抗がん剤を感受するものを明らかにし、その結合を拮抗剤でブロックすれば抗がん剤耐性は回避できるに違いない(図3)。

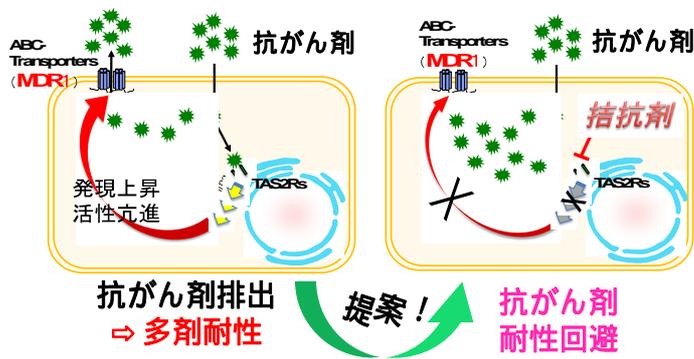


図3: 苦味受容体群の中から抗がん剤を感受するものを明らかにし、認識を阻害する拮抗剤を創製して抗がん剤と併用すれば、抗がん剤の細胞外への排出は抑制でき、抗がん剤に対する耐性は回避できるに違いない

2. 研究の目的

我々は、皮膚系細胞やがん細胞では苦味受容体は形質膜ではなく小胞体に局在することを明らかにし、その働きは細胞内に侵入した有害物を受容後、排出機構(ABC-B1 発現誘導など)をオンにすることで有害物質を細胞外に排出し、この蓄積による細胞ダメージから回避していると推察し、その証拠を積み上げつつある。この仮説を立証し、細胞内苦味受容体を標的とした新しいコンセプトの抗がん剤耐性回避薬、或いは、皮膚保護剤の開発を提案することが本研究の目的であった。

3. 研究の方法

以下の7つの項目を遂行する。

- (i) がん細胞/組織での苦味受容体の発現
- (ii) 苦味受容体の小胞体局在決定
- (iii) 苦味受容体の活性化から ABC-B1 の発現上昇へ ~ 情報伝達経路の解明
- (iv) リガンド(苦味物質/抗がん剤)と受容体の特異性の決定
- (v) リガンドによる苦味受容体活性化後の ABC-B1 を介した異物の細胞外排出
- (vi) 苦味物質曝露によるがん細胞の抗がん剤耐性化
- (vii) 苦味受容体の拮抗剤の探索系の構築

4. 研究成果

上記7つの項目の成果をまとめる。

(i) がん細胞/組織での苦味受容体の発現: 様々なヒト由来がん細胞株(MCF7, A549, PK1, HuH7, NUGC4, LNCap, FGC, Caco2 など)での25種類全ての苦味受容体遺伝子の発現は RT-PCR で確認済みである。The Human Protein Atlas データベースに公開されている免疫染色解析結果よりヒトがん組織での苦味受容体蛋白質(TAS2R14, TAS2R38 など)の存在も確かめた。更なるヒトがん組織標本を用いた苦味受容体の発現解析に関しては、申請者が以前に所属した東京大学医学部と共同解析を現在準備中である。

(ii) 苦味受容体の小胞体局在決定: ヒト乳がん細胞株(MCF7)や肺がん細胞株(A549)での苦味受容体の小胞体局在は蛍光免疫染色解析で確認した(図4)。オルガネラゾーン研究の専門家にご相談さ

せていただき、小胞体内ゾーンの詳細な局在解析を進める。本学で稼働中の電子顕微鏡も活用して詳細な苦味受容体の細胞内局在解析を進める。

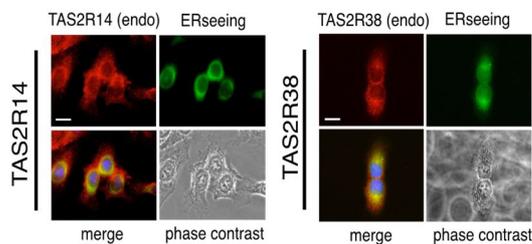
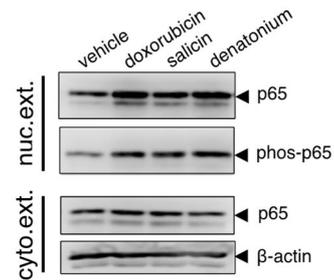


図4: MCF7 の蛍光免疫染色解析。赤; 内在の苦味受容体(TAS2R14[左], TAS2R38[右]), 緑; ERseeing (小胞体特異的蛍光マーカー), bar; 10 μ m

(iii) 苦味受容体の活性化から ABC-B1 の発現上昇へ ～ 情報伝達経路の解明: 苦味受容体を起点とする情報伝達を解明する。我々は数種類の GPCR 応答エレメントを用いたレポーター実験で共役 G 蛋白質が G_{12/13} であること、また、MCF7 を苦味物質或いは抗がん剤 doxorubicin(Dox) で刺激すると NF- κ B が活性化され(図5)、その制御下にある ABC-B1 が発現上昇することを確認した。本研究では引き続き苦味受容体/G_{12/13} 活性化以降、NF- κ B の活性化に至るまでの伝達経路を解明する。まず、何れの MAP キナーゼ(ERK1/2, p38, JNK)を介するかを明確にする。予備データとして MCF7 を denatonium(Denato)或いは Dox で刺激すると p38 キナーゼが活性化する結果を得ている。他のがん細胞株でも同様の経路が否かを調べる。

図5: 苦味受容体活性化後の情報伝達解析。MCF7 を 1mM Salicin, 0.5mM Denato 或いは 20nM Dox で 15 時間刺激した際の NF- κ B の活性化を調べた。刺激後にリン酸化 p65(phos-p65)の核内移行が認められた。



(iv) リガンド(苦味物質/抗がん剤)と受容体の特異性の決定: 苦味受容体群には 325 通りの組み合わせが存在する。これら受容体群とリガンド(抗がん剤や苦味物質)との対応を明らかにする。G_{12/13} 応答エレメントを連結させた Luc レポーターを活用し、苦味受容体発現がない HEK293 細胞を宿主として 25 種類の当該受容体を様々な組み合わせで共発現させ、リガンド添加後のレポーター活性から特異性を評価する。

(v) リガンドによる苦味受容体活性化後の ABC-B1 を介した異物の細胞外排出: MCF7 をリガンドで刺激した後の ABC-B1 の排出活性を調べる。蛍光標識した異物(蛍光ローダミン)を細胞に取り込ませ、苦味物質刺激でこれが細胞外に促進的排出されるか、排出されるなら ABC-B1 ブロッカーで抑制されるか調べる。

(vi) 苦味物質曝露によるがん細胞の抗がん剤耐性化: 苦味物質存在下での長期培養で苦味受容体は恒常的に刺激され、ABC-B1 活性化による異物排出で抗がん剤耐性化が進むと予想する。実際、苦味物質(Denato)存在下で1ヶ月培養した MCF7 は ABC-B1 の発現が上昇し、このがん細胞は Dox に対して耐性を示す予備データを得ている(図6)。他のがん細胞株でも同現象が認められるか調べる。

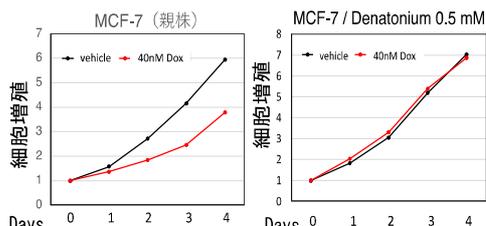


図6: (左) 親株 MCF7 の増殖曲線。40nM Dox 添加で増殖は低下した。(右) 0.5mM Denato 存在下で1ヶ月培養すると同濃度 Dox に対して耐性能を獲得した。

(vii) 苦味受容体の拮抗剤の探索系の構築: 申請者は最近、小胞体型 GPCR の N 末端に融合することでその受容体を形質膜に移行できるペプチド断片を見出した(*The FASEB.J.* 2022)。この断片で苦味受容体も表在化させることができるか検討する。形質膜移行が可能であれば、東北大学井上飛鳥教授が考案された表在型 GPCR 活性評価系を利用してリガンドと受容体との認識特異性を決定する(井上教授とは既に共同研究継続中)。またこれを抗がん剤耐性回避のための拮抗剤スクリーニング系として社会に提供する(図3)。もし表在化が困難なようならば、(iv)の項目で示したように、受容体は内在化のまま Luc レポーターを活用して拮抗剤のスクリーニング系を作り上げる計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 中村元直	4. 巻 5
2. 論文標題 苦味受容体を起点とした皮膚組織での有害物質排除機構について	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 84-88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 中村元直	4. 巻 41
2. 論文標題 皮膚に発現する苦味受容体の発見とその生理学的意義に関する考察	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 52-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 中村元直	4. 巻 53
2. 論文標題 皮膚組織に発現する苦味受容体について	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊 細胞	6. 最初と最後の頁 (305) 41 - (308) 44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 中村元直、堀哲哉、宮野雅司	4. 巻 94
2. 論文標題 最近のGPCR創薬 - GPCRの構造ゲノム創薬の発展とさらなる創薬研究にむけて	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 496-506
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮里奏佑、武良麗華、中村聖、河原正浩、山口哲志、中村元直
2. 発表標題 血球系細胞に発現する2つの短鎖脂肪酸受容体の特徴について
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立巳莉子、相原咲希、井上飛鳥、青木淳賢、中村元直
2. 発表標題 ロイコトリエンB4第一受容体（BLT1）のリン酸化修飾に関する研究 ~ 責任キナーゼの決定とリン酸化の意義について
3. 学会等名 第94回日本生化学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森脇大貴、谷口梨奈、森脇瑞貴、中村元直
2. 発表標題 ロイコトリエン B4受容体の細胞内移行におけるユビキチン修飾の関与について
3. 学会等名 第94回日本生化学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森爽々波、宮本拓実、真鍋 光、中村元直
2. 発表標題 ヒト表皮角化細胞株（HaCaT）に発現する苦味受容体の機能解析について
3. 学会等名 第94回日本生化学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本拓実、森爽々波、眞鍋光、中村元直
2. 発表標題 がん細胞株における苦味受容体の機能に関する研究
3. 学会等名 第94回日本生化学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮里奏佑、武良麗華、井上飛鳥、青木淳賢、中村元直
2. 発表標題 白血球に発現する2つの短鎖脂肪酸受容体、GPR41とGPR43の機能的差異に関する研究
3. 学会等名 第94回日本生化学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮里奏佑、中村元直
2. 発表標題 白血球における短鎖脂肪酸受容体GPR43の発現意義に関する研究
3. 学会等名 2021日本生化学会中四国支部会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮里奏佑、中村元直
2. 発表標題 2種類の合成リガンドを活用した短鎖脂肪酸受容体GPR43の機能解析について
3. 学会等名 2021年度日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真鍋 光、真田 恵、中村 元直
2. 発表標題 ヒト皮膚細胞における苦味受容体の生理学的機能の解明
3. 学会等名 日本生化学会中国四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相原 咲希、森脇 瑞貴、谷口 梨奈、森脇 大貴、井上 飛鳥、青木 淳賢、中村 元直
2. 発表標題 ロイコトリエンB4 第一受容体 (BLT1) が受けるリン酸化修飾のヒエラルキーについて
3. 学会等名 第93回日本生化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 真鍋 光、真田 恵、宮本 拓実、榊原 萌、住田 隼一、中村 元直
2. 発表標題 ヒト表皮角化細胞に発現する苦味受容体について
3. 学会等名 第93回日本生化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口 梨奈、森脇 瑞貴、相原 咲希、森脇 大貴、中村 元直ロイコトリエンB4 受容体 (BLT1) のユビキチン修飾に関わる責任ユビキチンリガーゼについて
2. 発表標題 ロイコトリエンB4 受容体 (BLT1) のユビキチン修飾に関わる責任ユビキチンリガーゼについて
3. 学会等名 第93回日本生化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩田 久瑠実、宮里 奏佑、武良 麗華、中村 聖、河原 正浩、山口 哲志、中村 元直
2. 発表標題 顆粒球様に分化したHL60細胞に発現する2つの短鎖脂肪酸受容体の機能的差異について
3. 学会等名 第93回日本生化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本 拓実、真田 恵、眞鍋 光、中村 元直
2. 発表標題 がん細胞株に発現する苦味受容体に関する研究
3. 学会等名 第93回日本生化学会年会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------