

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390108

研究課題名（和文） G 蛋白共役型受容体 G P R 4 9 / L G R 5 のヒト組織並びに疾患における発現・機能解析

研究課題名（英文） Expression and functional analyses of G protein coupled receptor GPR49/LGR5 in human tissues and diseases.

研究代表者

坂元 亨宇 (SAKAMOTO MICHIE)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40221270

研究成果の概要（和文）: GPR49/LGR5 遺伝子は、幾つかの癌で過剰発現すると共に、マウス小腸上皮並びに毛胞の幹細胞マーカー遺伝子であることが報告されている。我々は大腸発癌における意義を検討した。LGR5 は対応する正常粘膜と比較して大腸癌 50 例中 35 例で高発現して、大腸腺腫においても全例で高発現していた。また LGR5 の発現レベルは、リンパ管侵襲、静脈侵襲、腫瘍深達度、リンパ節転移、腫瘍病期(IIIC vs. IIIB)と有意な相関を認めた。一方、in situ ハイブリダイゼーションにて、背景粘膜では、小腸と大腸の陰窩底部の円柱状細胞において特異的に LGR5 の発現が認められた。以上の結果は LGR5 が大腸癌発癌の初期のみならず浸潤転移といった後期においても重要な役割を果たしていることを示唆している。さらに、LGR5 の癌における機能を明確にする目的で、肝癌細胞を用い LGR5 の高発現ないし発現抑制細胞株を作成した。In vitro, in vivo 解析の結果から、ヒト肝癌組織における結節形成や索状配列、あるいは肝癌の薬剤治療の抵抗性など肝癌に特徴的な形態が LGR5 の高発現によることが一因となっている可能性が高いことが示された。

研究成果の概要（英文）: GPR49/LGR5 is reportedly expressed in stem cells of the intestinal crypts and hair follicles of mice, and is overexpressed in some types of cancer. We showed that there was significant overexpression of LGR5 in 35 of 50 colorectal cancers, and in all sporadic colonic adenomas, compared with matched normal mucosa. LGR5 expression correlated significantly with lymphatic invasion, vascular invasion, tumor depth, lymph node metastasis, and tumor stage (IIIC vs. IIIB). In addition to cancer cells, crypt base columnar cells of the small intestine and colon were shown by in situ hybridization to express LGR5. This is the first report suggesting the involvement of LGR5, not only in early events but also in late events in colorectal tumorigenesis. We also overexpressed or down-regulated LGR5 expression in HCC cell lines to explore the function of LGR5 in cancer cells. In vivo and in vitro data suggested that aberrant expression of LGR5 regulates epithelial cell phenotype and survival.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：GPR49・LGR5・細胞増殖・幹細胞・肝癌・大腸癌・浸潤・転移

1. 研究開始当初の背景

GPR49/LGR5 (G 蛋白共役受容体) 遺伝子は、我々が、肝癌において *catenin* の変異と強く相関し過剰発現する遺伝子として発見し、さらに基底細胞癌のほとんどの症例で過剰発現しその増殖に関わっていることを見出し Wnt シグナルならびに hedgehog (HH) シグナルのターゲット遺伝子として報告してきた。組織幹細胞の研究では Wnt ならびに HH シグナルは幹細胞維持のための重要なシグナルであることがほぼ定説となり、さらに GPR49 は小腸上皮の幹細胞マーカー遺伝子であることが報告され、その重要性に一躍注目が集まっている。GPR49 遺伝子は成人の脳、骨格筋、胎盤、骨髄、副腎などの正常組織に発現し、ノックアウトマウスでは、上舌癒着や消化管の拡張で新生児致死となる。しかし、GPR49 に対する特異的な抗体は無く、蛋白並びに遺伝子発現の細胞レベルでの詳細な検討は行われておらず、機能も殆ど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、高感度での検出が可能となった *in situ hybridization* 法並びに現在作成中のヒト GPR49 に対するポリクローナル抗体を用いて、正常並びに各種疾患での GPR49 の発現を詳細に調べる。その知見をもとに、GPR49 発現細胞の動態、機能解析を総合して行うことで、GPR49 の各種疾患、特に癌ならびに前癌状態における病態・診断マーカーとしての有用性、さらに病態の形成・進展への機能的関与を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) PR49 の *in situ hybridization* 法並びに免疫組織化学による発現解析：

皮膚・大腸・胃・肝・膵等の正常組織での陽性細胞の分布、他の幹細胞マーカー発現との関連、慢性肝炎・肝癌、炎症性腸疾患・家族性大腸腺腫症における背景粘膜・大腸癌、慢性胃炎・胃癌等を主な対象として前癌状態から癌への発現細胞の動態を解析する。

in situ hybridization による mRNA 発現の解析

免疫組織学的検討、抗体作成

定量 PCR による mRNA 発現の定量

(2) GPR49 の細胞増殖、細胞運動能、浸潤転移能における機構解析：

GPR49 の腫瘍形成における機能を明らかにするために、過剰発現ベクター、及びノックダウンベクターを作成し、株化細胞へ導入することにより *in vitro* では細胞増殖率、細胞形態の変化、遊走性を検討し、*in vivo* では腫瘍形成能、転移能の変化を検討する。

発現ベクターの作成

ノックダウンベクターの作成

In vitro, *in vivo* における評価

(3) GPR49 の遺伝子発現機構の解析：

[研究目的]の項目で述べたように GPR49 の高発現は肝癌において *catenin* の変異ときわめて強く相関する。また、皮膚基底細胞癌細胞においては HH シグナルにも関与している。そこで GPR49 の高発現機構を Wnt, HH その他のシグナル系との関連において詳細に解析する。

Luciferase reporter gene の作成
GPR49 のプロモーター活性にたいする Wnt
シグナル促進因子と抑制因子の影響

クロマチン免疫沈降法による転写因子複
合体との結合の検討

4. 研究成果

(1) 癌細胞株並びに大腸癌における GPR49
の発現と意義

37 の代表的な癌細胞株における LGR5 mRNA の
発現を調べるために quantitative RT-PCR を
行った。他臓器癌由来の細胞株に比べて、
LGR5 は高頻度で大腸癌細胞株で高発現して
いた。さらに、LGR5 は原発巣由来のものに比
べ、転移巣由来の大腸癌細胞株でより高発現
していた。臨床検体における検討では、LGR5
は対応する正常粘膜と比較して大腸癌 50 例
中 35 例で高発現していた。また、大腸腺腫
においても 7 例中 7 例で高発現していた。こ
のことは LGR5 の発現増加が大腸癌発癌の初
期段階から起こっていることを示唆してい
る。また LGR5 の発現レベルは大腸癌におい
て著明なばらつきを認めており、リンパ管侵
襲、静脈侵襲、腫瘍深達度、リンパ節転移、
腫瘍病期(IIIC vs. IIIB)と有意な相関を認
めた。一方、in situ ハイブリダイゼーシ
ョンにて発現細胞の詳細な解析を行ったとこ
ろ、大腸癌高発現症例ならびに腺腫において
は、腫瘍内でほぼ均一に腫瘍細胞に高発現を
認めた。背景粘膜では、小腸と大腸の陰窩底
部の円柱状細胞において特異的に LGR5 の発
現が認められ、マウスでの報告と同様にヒト
においても腸管の幹細胞に発現しているこ
とが示唆された。以上の結果は LGR5 が大腸
癌発癌の初期のみならず浸潤転移といった
後期においても重要な役割を果たしている
ことを示唆しており、LGR5 は大腸癌の新規予

後因子および治療標的としての可能性を有
していると考えられた。

(2) 胃癌における GPR49 の発現と意義
慢性胃炎・胃癌等を主な対象として前癌状態
から癌への発現細胞の動態を解析した。その
結果正常胃粘膜組織に比して進行胃癌組織
のいくつかで GPR49 の発現亢進がみとめられ
た。未だ解析の途中ではあるが、分化型の腺
癌で高発現する傾向を認めている。また、胃
癌においては、カテニンの核移行と高発現
には相関を認めなかった。

(3) 抗 GPR49 特異抗体の作成
GPR49 遺伝子全長のタンパク質発現細胞を免
疫原としてモノクローナル抗体の作成を行
った。しかし、内在性 GPR49 を検出可能にす
る力価の特異抗体を作成することができな
かった。そこで本年度は新たに第一細胞外ド
メインおよび第三細胞外ドメイン含む N 末
端タンパクを細胞膜上に発現する細胞を用
いて高力価のモノクローナル抗体の作成を
試みた。現在 GPR49 発現細胞や組織を用いて
特異的染色性を検討中である。

(4) GPR49 の癌の悪性度進展過程における
機能解析

GPR49 の癌における機能を明確にする目的で、
肝癌細胞を用い GPR49 の高発現細胞株を作成
し、in vitro においては細胞増殖、細胞運動
能、コロニー形成能、細胞接着能を測定する
ことにより GPR49 の機能を解析した。さらに
RNA 干渉 (siRNA や shRNA) により GPR49 発
現を抑制し同様の実験を行った。GPR49 を恒
常的に高発現した細胞は、細胞同士の接着が
密になり凝集性を獲得し、コロニー形成率が
増加し、細胞死に対し抵抗性となり、細胞運
動能が減少した。一方 siRNA で GPR49 発現を

抑制すると、細胞同士の接着性が低下し、細胞運動能の上昇が認められた。これらのことは GPR49 を高発現する癌細胞は癌幹細胞類似の形態を獲得することを示唆している。in vivo においては重度免疫不全マウス NOD/SCID/IL2 への移植実験を行い腫瘍形成能、転移能、および組織型の変化を検討した。組織学的には、GPR49 非発現細胞は肝内接種後に瀰漫性の腫瘍を形成するのに対し、GPR49 高発現細胞の腫瘍は索状構造を示し、血洞間質の形成がみとめられた。また、GPR49 非発現細胞の腫瘍からはしばしば隣接する組織への浸潤がみとめられたが、GPR49 高発現細胞の腫瘍から浸潤は稀であった。さらに、GPR49 高発現細胞は非発現細胞に比して肝内転移が抑制されていた。これらの結果は、ヒト肝細胞癌において、GPR49 高発現群で索状構造を示す高分化型が多い傾向にあること、また、GPR49 高発現群で肝内転移が少ない傾向にあることなどと良く相関していた。これらの結果からヒト肝癌組織における結節形成や索状配列、あるいは肝癌の薬剤治療の抵抗性など肝癌に特徴的な形態が GPR49 の高発現によることが一因となっている可能性が高いことが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

Kanamori H, Kawakami T, Effendi K, Yamazaki K, Mori T, Ebinuma H, Masugi Y, Du W, Nagasaka K, Ogiwara A, Kyono Y, Tanabe M, Saito H, Hibi T, Sakamoto M. Identification by Differential Tissue Proteome Analysis of Talin-1 as a Novel Molecular Marker of Progression of Hepatocellular Carcinoma. *Oncology* 80: 406-415, 2011, 査読有

Tanese K, Fukuma M, Ishiko A, Sakamoto

M. Endothelin-2 is upregulated in basal cell carcinoma under control of Hedgehog signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391:486-491. 査読有

Uchida H, Yamazaki K, Fukuma M, Yamada T, Hayashida T, Hasegawa H, Kitajima M, Kitagawa Y, Sakamoto M. Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer. *Cancer Sci* 101(7): 1731-7, 2010, 査読有

Sakamoto M, Effendi K, Masugi Y. Molecular diagnosis of multistage hepatocarcinogenesis. *Jpn J Clin Oncol.* 40(9): 891-6, 2010, 査読有

〔学会発表〕(計0件)

〔産業財産権〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂元 亨宇 (SAKAMOTO MICHIEE)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：40221270

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

福間 真理子 (FUKUMA MARIKO)
慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)
研究者番号：60101995