

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月2日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659029

研究課題名（和文）腫瘍形成における宿主 pH 感知性受容体の役割～受容体欠損マウスを用いた解析

研究課題名（英文）Role of host proton-sensing receptors in tumorigenesis: analysis with receptor-deficient mice

研究代表者

岡島 史和 (OKAJIMA FUMIKAZU)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：30142748

研究成果の概要（和文）：

腫瘍形成には低 pH（高プロトン）が伴うことはよく知られている。この細胞外 pH 低下が宿主細胞の腫瘍形成制御に対してどのような役割を發揮しているかは不明である。本研究では最近同定されたプロトン感知性受容体の機能に関して受容体欠損マウスを用いて解析した。その結果、宿主のプロトン感知性受容体は腫瘍形成に影響を与えていること、また、細胞外 pH 低下はマクロファージの M1-M2 フェノタイプ変化を起こすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It is well known that tumorigenesis is accompanied by extracellular acidification. However, the role of acidification remains unknown. Here, we investigated the role of recently identified proton-sensing receptors by using their receptor-deficient mice. Our results suggested that proton-sensing receptors are involved in tumorigenesis and extracellular acidification changes the M1-M2 macrophage phenotype.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：腫瘍制御学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：プロトン感知性受容体、TDAG8、細胞外 pH、腫瘍、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

腫瘍形成に低酸素と低 pH（高プロトン）が伴うことはよく知られている。腫瘍内では酸素供給の不足により、解糖系／乳酸産生が亢進し pH が 5.8 に低下する場合もある。低酸素時に対しては HIF-1 を中心とした解析が進ん

でいる。即ち、HIF-1 は様々な蛋白の転写活性を高め、低酸素から細胞を守っている。一方、低 pH に対する癌細胞、宿主の応答機構としては、血管新生に関わる因子の産生、癌細胞傷害性サイトカイン産生抑制作用（これらは癌細胞の生存戦略と考えられる）、血管新生を抑制し、癌細胞の増殖にとって必要な

安定した栄養、酸素供給を断つ（宿主の癌細胞に対する防御戦略）作用などがある。しかし、このような腫瘍形成をめぐる癌と宿主の攻防の分子メカニズムの詳細は不明である。

2. 研究の目的

最近、我々の研究グループを含む国内外のグループによって、従来リゾ脂質性のG蛋白質共役受容体(GPCR)と報告されていた OGR1 ファミリー (OGR1, GPR4, TDAG8, G2A)が細胞外の pH (プロトン)を感知して細胞内にシグナルを伝達する GPCR であることが判明した。私達はこのユニークな GPCR の生体での機能を知る目的で受容体欠損マウスを作成した。そこで、本研究ではこれらの受容体欠損マウスを用いて、腫瘍形成を巡る癌細胞と宿主の攻防に宿主 OGR1 ファミリーが関わっていることを明らかにする。

3. 研究の方法

プロトン感知性受容体欠損マウスにマウス由来のがん細胞、B16F10、LLC1あるいはPAN02を接種して一定の日数を経た後（B16F10では2週間程度、LLC1では4週間程度、PAN02では60日程度）の腫瘍形成を調べた。また、チオグリコレートで処理したマウスの腹腔内浸潤マクロファージを調製し、細胞外pH変化によるM1(iNOS, TNF α , IL-1b, IL-6, IL-12), M2マーカー (arginase, Clec7a, Ym-1, IL-10) 発現をTaqMan PCRで調べた。

4. 研究成果

4.1. 担癌マウスの腫瘍形成におけるプロトン感知性受容体の役割

B16F10、LLC1 あるいは PAN02 細胞をプロトン感知性受容体欠損マウスの皮下に移植した後の腫瘍重量を測定した。その結果、TDAG8 欠損マウスでは野生型マウスと比較してやや抑制的 (B16F10 の場合)、ほとんど無効 (LLC1 の場合)、あるいは促進的な傾向がみられた (PAN02 の場合)。OGR1 欠損マウスでは LLC1、PAN02 で野生型マウスと比較して、効果は弱いが増加傾向がみられた。また、GPR4 では B16F10 の場合のみであるが顕著な効果は見られない。例数が少ない場合もあり、現時点で不明な点が多いが、がんの種類による効果の違いも考慮する必要があるかもしれない。たとえば、B16F10 は増殖が早い一方、PAN02 は同程度の重量に達するのに5倍以上の時間がかかり、宿主のプロトン感知性受容体サブタイプの関与の仕方が異なる可能性も考慮する必要がある。このように、担癌マウスのプロトン感知性受容体のがん細胞の増殖にポジティブあるいはネガティブに作用しているかの結論には達しなかった。今後も、さらに実験の追加を重ねる必要がある。

4.2. マクロファージのM1-M2変化におけるプロトン受容体の役割

マクロファージには TDAG8 が著明に発現している。この TDAG8 は TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカイン産生を抑制することが知られている。そこで、細胞外 pH 低下が M1 や M2 タイプのサイトカイン産生にどのような影響をもたらすかを調べた。その結果、細胞外 pH が 7.6 から 6.8 に低下すると M1 マーカー (iNOS, TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-12) はいずれも低下し、一方、M2 マーカー (arginase, Clec7a, Ym-1, IL-10) はいずれも増加することが、mRNA レベルで判明した。TDAG8 欠損マウスから調製したマクロファ-

ジでは、LPS で刺激したマクロファージでは細胞外 pH 低下の作用を抑制するのに対して、INF-g 存在下では TDAG8 欠損の効果は観察されなかった。また、M2 マーカーの細胞外 pH 低下による促進作用は TDAG8 欠損の影響を受けなかった。このように、M1-M2 のフェノタイプ変化は細胞外 pH で変化をうけ、その一部の作用に TDAG8 の関与が示唆されたものの、この受容体だけでは説明されない機構の存在が示唆された。今後、細胞内シグナル系、転写因子機能との関連で検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Wang J, Sun Y, Tomura H, Okajima F.: Ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 induces the expression of the pain mediator prostaglandin E2 in response to an acidic extracellular environment in human osteoblast-like cells. **Int J Biochem Cell Biol.** 44:1937-1941 (2012) 査読有
2. Nakakura T, Mogi C, Tobo M, Tomura H, Sato K, Kobayashi M, Ohnishi H, Tanaka S, Wayama M, Sugiyama T, Kitamura T, Harada A, and Okajima F.: Deficiency of Proton-Sensing Ovarian Cancer G Protein-Coupled Receptor 1 Attenuates Glucose-Stimulated Insulin Secretion. **Endocrinology** 153:4171-4180 (2012) 査読有
3. Komachi M, Sato K, Tobo M, Mogi C, Yamada T, Ohta H, Tomura H, Kimura T, Im DS, Yanagida K, Ishii S, Takeyoshi I, and Okajima F.: An orally active lysophosphatidic acid receptor antagonist attenuates pancreatic cancer invasion and metastasis in vivo. **Cancer Sci** 103:1099-1104 (2012) 査読有
4. He XD, Tobo M, Mogi C, Nakakura T, Komachi M, Murata N, Takano M, Tomura H, Sato K, Okajima F.: Involvement of proton-sensing receptor TDAG8 in the anti-inflammatory actions of dexamethasone in peritoneal macrophages. **Biochem Biophys Res Commun.** 2011 415:627-631 (2011) 査読有
5. Matsuzaki S, Ishizuka T, Yamada H, Kamide Y, Hisada T, Ichimonji I, Aoki H, Yatomi M, Komachi M, Tsurumaki H, Ono A, Koga Y, Dobashi K, Mogi C, Sato K, Tomura H, Mori M, and Okajima F.: Extracellular acidification induces connective tissue growth factor production through proton-sensing receptor OGR1 in human airway smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 413: 499-503 (2011) 査読有
6. Uchiyama T, Tomono S, Utsugi T, Ohyama Y, Nakamura T, Tomura H, Kawazu S, Okajima F, and Kurabayashi M.: Constitutively active heat shock factor 1 enhances glucose-driven insulin secretion. **Metabolism** 60:789-798 (2011) 査読有
7. Sato K, Horiuchi Y, Jin Y, Malchinkhuu E, Komachi M, Kondo T, Okajima F.: Unmasking of LPA(1) receptor-mediated migration response to lysophosphatidic acid by interleukin-1 β -induced attenuation of Rho signaling pathways in rat astrocytes. **J Neurochem** 117:164-174 (2011) 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. 佐藤幸市、小竹美絵、岡島史和、N1E115 神経細胞における細胞外酸性 pH による細胞内 Ca²⁺動員、Akt リン酸化とプロトン感知性受容体の関与、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14~16 日、福岡国際会議場 (福岡)
2. Ye Jin, Koichi Sato, Fumikazu Okajima, Involvement of TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of interleukin-1beta production in microglia、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14~16 日、福岡国際会議場 (福岡)
3. 中倉敬、茂木千尋、戸村秀明、岡島史和、膵β細胞におけるプロトン感知性 OGR1 を介したインスリン分泌シグナルの解析、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14~16 日、福岡国際会議場 (福岡)
4. 岡島史和、プロトン感知性 OGR1 ファミリー-GPCR とその機能、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14~16 日、福岡国際会議場 (福岡)
5. 青木悠、茂木千尋、久田剛志、石塚全、上出庸介、鶴巻寛朗、土橋邦生、岡島史和、森昌朋、プロトン感知性 G タンパク質共役型受容体 OGR1KO マウスにおける気管支喘息モデルの解析、第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2012 年 11 月 29 日~12 月 1 日、大阪国際会議場 (大阪)
6. 上出庸介、石塚全、鶴巻寛朗、山下均、山田秀典、宇津木光克、小野昭浩、古賀康彦、久田剛志、土橋邦生、岡島史和、森昌朋、プロトンはマウス肥満細胞からのサイトカイン産生を調節する、第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2012 年 11 月 29 日~12 月 1 日、大阪国際会議場 (大阪)
7. 佐藤幸市、小町麻由美、当房雅之、茂木千尋、岡島史和、ヒト膵臓がん細胞の浸潤・

転移に対する経口可能なリゾホスファチジン酸受容体アンタゴニスト Ki16198 の抑制作用、第 54 回日本脂質生化学会、2012 年 6 月 7~8 日、九州大学医学部百年講堂 (福岡)

[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]

ホームページアドレス

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/sigtra/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡島 史和 (OKAJIMA FUMIKAZU)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号 : 30142748

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし