

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460091

研究課題名(和文) 2つのプロスタノイド受容体情報伝達系活性化バランスによる結腸癌細胞制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of colon cancer malignancy regulation by two endogenous prostanoid receptors

研究代表者

藤野 裕道 (FUJINO, Hiromichi)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40401004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：プロスタグランジンD2 (PGD2) とプロスタグランジンE2 (PGE2) は、それぞれの受容体へのクロストークが知られているが、その生理的役割や意義についての報告は少ない。本研究にてPGD2とPGE2は、それぞれEP2受容体またDP受容体に作用した場合、パーシャル・アゴニストではなく、バイアス・アゴニストとして特定の情報伝達系を偏重して活性化する事などを明らかとした。PGD2は癌の抑制、PGE2は癌悪性化への関与が報告されているが、内因性プロスタノイドのバイアス性を明らかにできた事は、受容体の生理的な役割を研究するうえで、これまでとは異なる解釈やアプローチを提供できる大きな成果であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Prostaglandin D2 (PGD2) and prostaglandin E2 (PGE2) are known as positional-isomers so that they are known to cross-talk to the other receptors besides its own cognate receptors. However, the physiological roles and/or significances of the cross-talks have been remained unclear. In this study, we have elucidated that PGD2 or PGE2 acts to DP receptors or EP2 receptors not as a partial agonist but as a biased ligand followed by activating a biased signaling pathway, respectively. It is widely reported that PGD2 has a role on anti-cancer activity whereas PGE2 has a pro-cancer activity. The findings about the biased activity evoked by endogenous prostanoids as biased agonists are very significant that may answer the reasons why both prostanoids show the opposite functions in the body. We believe that our study will provide innovated ideas and/or approaches in the field of understanding physiological functions of the G protein-coupled receptors including prostanoid receptors.

研究分野：分子細胞薬理学

キーワード：Gタンパク質共役型受容体 プロスタノイド 細胞内情報伝達系 バイアスリガンド

1. 研究開始当初の背景

プロスタグランジン D₂ (PGD₂) とプロスタグランジン E₂ (PGE₂) は、それぞれの位置異性体であり、生体においてしばしば、真逆の反応を示す事がある。例えば食物の摂取量は PGD₂ により増加するが、PGE₂ では減少する。また体温についても PGD₂ は低下させるのに対して、PGE₂ は上昇させる。さらに PGD₂ により睡眠は誘導されるが、PGE₂ は覚醒を促すと考えられている (Nutrition, (2008) 24:798)。癌においても、一般的に PGD₂ は改善あるいは抗癌効果が言われているが、PGE₂ は悪性を亢進させると言われている。ところで多くのヒト結腸癌細胞株において、PGE₂ を主要なリガンドとする EP2 受容体や EP4 受容体の発現がみられるが、PGD₂ をリガンドとする DP 受容体の発現も確認されている (Cancer Lett, (2004) 210: 81)。興味深い事に、PGE₂ 刺激によって産生誘導される癌の悪性化に関与する因子が、ヒト結腸癌細胞株において、PGD₂ 刺激によっても誘導される事が報告されている (J Biol Chem, (2005) 280:476、Br J Pharmacol, (2000) 131:1537)。大腸癌の 75% において発現の上昇が報告されている Decay accelerating factor (DAF/CD55) は、補体調節タンパク質であり、異物細胞に作用し排除する機構に関与している (Br J Cancer, (2001) 84: 80)。正常細胞は、補体系に抵抗性を示す事が知られているが、それは補体制御タンパク質である DAF/CD55 を発現しているためと考えられている。ところが癌細胞はこの DAF/CD55 を過剰に発現させる事で免疫系から逃れ、癌の増悪を亢進させていると考えられている (Cancer Immunol Immunother, (2003) 52:638)。また一般的に物理的なバリアーとしての保護作用を有する“粘液”であるムチンであるが、ある種のムチンは、むしろ癌の浸潤性増殖に関連した増悪因子である可能性も報告されている (Nat Rev Cancer, (2004) 4:45)。このムチンも、PGE₂ 刺激だけではなく、PGD₂ 刺激によっても、その産生が誘導亢進される事がヒト結腸癌細胞株において報告されている (J Biol Chem, (2005) 280:476、Br J Pharmacol, (2000) 131:1537)。さらに、DP 受容体をノックアウトしても癌の発症率は変わらなかった事や (Cancer Res, (2002) 62:28)、PGE₂ と PGD₂ は、それぞれの受容体に相互に作用する事などから (Biochim Biophys Acta, (2000) 1483:285)、PGD₂ の抗癌作用は DP 受容体を、あるいは PGE₂ の癌亢進作用は EP 受容体を、それぞれ介していない可能性も考えられる。これは癌を含む病態を制御している受容体は、その受容体に作用する内因性リガンド以外の、別のリガンドによっても制御されている可能性が考えられる。すなわち上記に示した PGD₂ と PGE₂ による真逆の生体反応の制御は、従来のリガンド:受容体=1:1 とする概念とは異なる機構にも起因する可能性が強く示唆される。

2. 研究の目的

本研究は、結腸癌における PGE₂/EP 受容体情報伝達系への PGD₂/DP 受容体系の役割、あるいは両情報伝達系の相互作用などを明らかにすることを目的とした。それにより EP 受容体情報伝達系のみならず DP 受容体情報伝達系も含めた、より詳細な癌のメカニズムを明らかにする事で、複合薬理学的な立場から癌治療に繋がる有益な情報を提供できるのではないかと考え、以下の系を中心に研究を進めた。

(1) 癌の活性化系として報告されている PGE₂ 情報伝達系、および抑制系として報告されている PGD₂ 情報伝達系による癌悪性化への寄与率を、DAF/CD55 やムチンの発現量などを指標にして明らかにする。

PGE₂ や PGD₂ は、それぞれ EP 受容体あるいは DP 受容体だけではなく、相互の受容体にも作用して癌の情報伝達系を制御している可能性が考えられる。つまり、同一の受容体でも結合するリガンドの僅かな構造の違いに応じて受容体を取りうるコンフォメーションが異なり、それが癌制御に関して異なる作用を引き起こす原因となる事が考えられる。すなわち癌は、複数の受容体情報伝達系の活性化の複合的なバランスにより、その進行状態が制御されている可能性が高い。そこでまずは、PGE₂ 情報伝達系、あるいは PGD₂ 情報伝達系の結腸癌細胞への悪性化に関する因子発現への寄与率を解析するために、DAF/CD55 発現量、あるいは産生するムチンのタイプや、その発現量の変化などを明らかにする目的で研究を行った。

(2) 2つのプロスタノイド/受容体系の交錯は、どの程度なのか、また癌細胞における一つのシステムとしての役割などを明らかにする。

PGD₂ や PGE₂ の作用点を、それぞれの受容体のみを設定するのではなく、例えば PGE₂ が DP 受容体に作用した場合、PGD₂ が EP 受容体に作用した場合など、より生体での反応に近い状態での情報伝達系の解明を目指し、2つのプロスタノイド/受容体系の交錯が、どの程度なのかを、また癌細胞における一つのシステムとしての役割などを明らかにする目的で研究を行った。

3. 研究の方法

予備実験により、PGE₂ はヒト結腸癌 LS174T 細胞株において DP 受容体にも作用し、cAMP 産生を亢進させる事を明らかとしていた。平成 25 年度には、LS174T 細胞を用いて PGD₂ あるいは PGE₂ 刺激した場合に発現してくる mRNA の質的、あるいは量的な違いを、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。また市販されている DP 受容体のアンタゴニストは存在するが、EP2 受容体のアンタゴニストは存在しない。そこで PGE₂ あるいは PGD₂ で刺激したときの cAMP 産生量への DP 受容体と EP2 受容体の寄与率を推定するために、ま

ずは EP2 受容体のアンタゴニストを、新規インドール化合物ライブラリーの中から、千葉大学大学院理学研究科化学コースとの共同研究のもと探索を行った。その化合物について EP2 受容体と共に DP 受容体も発現している LS174T 細胞や、EP2 受容体あるいは DP 受容体を安定発現している HEK293 モデル細胞を用いて解析を行った。また平成 26 年度、平成 27 年度では、癌化関連因子である β -カテニン情報伝達系、DAF/CD55、さらにムチン産生への DP 受容体の役割を明らかにしたいすべく、LS174T 細胞および HEK293 モデル細胞を使用し、cAMP アッセイやレポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイ、またウェスタンブロット法を用いてリガンドによる活性化程度の違いなどについての解析を行った。さらに、1000 ゲノムプロジェクトのヒト遺伝子データベースを用いて、EP2 受容体と DP 受容体の遺伝子変異について千葉大学真菌センターとの共同研究にて行った。また PGD₂ や PGE₂ が、それぞれ DP 受容体あるいは EP2 受容体への結合様式の違いについて、千葉大学医学部生命情報科学研究室との共同研究による *in silico* 解析を行った。

4. 研究成果

(1) LS174T 細胞における PGD₂ あるいは PGE₂ により誘導される mRNA 発現の差異について

LS174T 細胞における DP 受容体および EP2 受容体の両受容体による情報伝達系を 1 つのシステムとして捉えた時のアウトプットとして mRNA の発現変動を、次世代シーケンサーを用いて解析した。その結果、ムチン 13 をはじめ、その殆どの mRNA 発現変動の傾向は、PGD₂ あるいは PGE₂ の、どちらのリガンドで刺激しても、ほぼ共通であった。これは恐らく 2 つのリガンドが、程度の差こそあれ 2 つの受容体に同時に作用している結果だと考えられた。しかしながら少数ではあるが、PGD₂ ではなく、PGE₂ にも特異的に発現が変動する mRNA の存在も明らかとなった。この変動に差異があった mRNA については、その詳細を今後解析して行く予定である。

(2) 新規インドール化合物 AWT-489 をヒト DP 受容体アンタゴニストとして同定

非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) の長期服用が、大腸癌による死亡率や発症率を低下させることから、我々は代表的な NSAID であるインドメタシンの抗癌作用について、これまで検討してきた (Biochem Biophys Res Commun. (2007) 359:568, Arch Biochem Biophys. (2010) 494:78, Biochem Pharmacol. (2011) 82:1781 など)。その過程でインドメタシンの EP2 受容体アンタゴニスト様作用を明らかとした (Eur J Pharmacol. (2012) 680:16)。選択的 EP2 受容体アンタゴニストは、これまで上市されていない事と、インドール化合物はプロスタノイド受容体研究にとって、有用なツールとなりうる可能性を考え、千葉大学

理学部化学系コースとの共同研究にて、より選択性の高い受容体アンタゴニストの探索を試みた。その結果、EP2 受容体アンタゴニストは見出せなかったものの、DP 受容体アンタゴニストとして新規インドール化合物 AWT-489 を見いだした。DP 受容体あるいは EP2 受容体を安定発現させたモデル細胞を用いた結果、この化合物は EP2 受容体には作用しないのみならず、これまで広く使用されている強力な DP 受容体アンタゴニストである BWA868C に比べて、全くアゴニスト作用を有しない事を見出した (図 1)。そのため AWT-489 を、新規 DP 受容体アンタゴニストとして特許申請した (Arch Biochem Biophys (2014) 541:21, 特願 2013-192422 号)。また、この新規化合物を、LS174T 細胞を用いて評価したところ、PGE₂ 刺激による DAF/CD55 や、ムチン 13 の mRNA 発現の一部は DP 受容体を介している事を、AWT-489 を用いる事で確認できた。

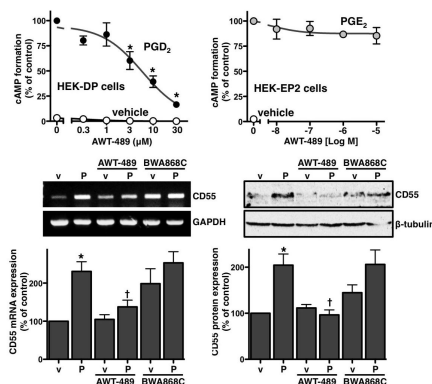


図 1 AWT-489はDP受容体のアンタゴニストとしてDAF/CD55発現を抑制する

(3) ヒト DP 受容体、ヒト EP2 受容体の遺伝子多形の解析

プロスタノイド受容体の系統樹では、DP 受容体は進化的に EP2 受容体に近いことが示されている。そこで DP 受容体と EP2 受容体との遺伝子変異数の比較に焦点を当てた研究も行った。この 2 つの受容体遺伝子は、ヒトでは同じ染色体上にタンデムにたんでおり遺伝子重複によって生じたと考えられる。これら受容体の遺伝子変異に起因するアミノ酸変異について、千葉大学真菌センターとの共同研究として、世界の 14 グループの 1092 人のヒトゲノム情報を集計した、1000 ゲノムプロジェクトのデータベースを使用し比較解析した。その結果、DP 受容体には 16 アミノ酸の変異が見出されたのに対して、EP2 受容体は僅かに 4 アミノ酸であり、DP 受容体の方に多くの変異が存在している事が明らかとなった (図 2)。DP 受容体は、その他の 14 種類のプロスタノイド受容体に見つかった変異に比べても最多であるのに対して、EP2 受容体の変異は EP1 受容体と FP 受容体に見つかった 3 アミノ酸変異に次ぐ少なさであった。すなわち DP 受容体は、変異に対して制約を受けにくい可能性があり、現在も新しい

機能を獲得するために進化している可能性が考えられた。それに対してEP2受容体は変異に対して制約を受けているため、代替がきかない受容体として生体維持にとって極めて重要な役割を担っている可能性が強く示唆された (*FEBS Lett.* (2015) 589:766)。

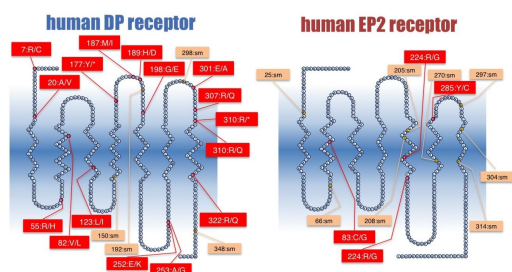


図2 DP受容体、EP2受容体のアミノ酸変異

(4) DP 受容体とEP2 受容体へのPGD₂、PGE₂のバイアス性の研究

次世代シーケンサーを用いて得られた僅かな mRNA 発現の違いが癌の増悪を左右する可能性が考えられるため、その詳細なメカニズムを解明する目的で、HEK293細胞に、それぞれの受容体を発現させたモデル細胞を用いて、異なるリガンド刺激による細胞応答の違いの解明を行った。またDP受容体およびEP2受容体のリガンド/受容体結合様式の違いについても千葉大学医学部生命情報科学研究室との共同研究により、コンピューターを用いた *in silico* 解析を、上記の実験系と平行して遂行した。その結果PGD₂とPGE₂は、それぞれEP2受容体、あるいはDP受容体に作用した場合、パーシャル・アゴニストとして作用するのではなく、バイアス・アゴニストとして、特定の情報伝達系を偏重して活性化することを明らかにした(図3)。すなわち、例えばDP受容体に対して、生理的生体内濃度に近い10 nMにおいて、PGD₂はcAMP産生と、β-カテニン情報伝達系を同程度に活性化するが、PGE₂はcAMP産生を、ほとんど引き起こさず、癌の悪性化に関与するβ-カテニン情報伝達系のみを活性化することを明らかとした。PGD₂による癌抑制効果とPGE₂による癌悪性化を鑑みると、PGE₂の癌悪性化は、EP受容体に作用して引き起こされているだけではなく、DP受容体の癌化情報伝達系に対してバイアス性を示す事でも引き起こされる可能性を明らかとした。さらに、それぞれのリガンドと受容体の結合様式を *in silico* 解析したところ、このバイアス性は、受容体とリガンドとの水素結合の形成様式の違いに起因している可能性も明らかになった。このとき受容体のコンフォメーション変化には、少なくとも経時的に2段階あり、それぞれのステップ毎に異なる情報伝達系が活性化される可能性も見出し、現在論文投稿準備中である。本研究において内因性のプロスタノイドのバイアス性を明らかにできた事は、受容体の生理的な役割を研究するうえで、これまでとは異なる解釈やアプローチ

を提供できると考えており、大きな成果であると考えている。

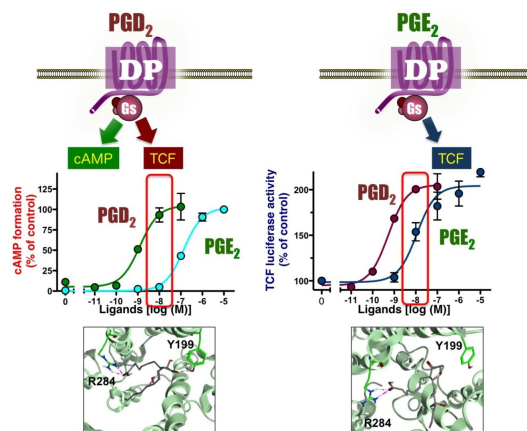


図3 PGE₂はDP受容体へバイアス・アゴニストとして作用する

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10件)

Fujino H*. The roles of EP4 prostanoid receptors in cancer malignancy signaling. *Biol Pharm Bull.* **39**:149-155 (2016). DOI: 10.1248/bpb.b15-00840. 査読有
*corresponding author

Fujino H*, Seira N, Kurata N, Araki Y, Nakamura H, Regan JW, Murayama T. Prostaglandin E₂-stimulated prostanoid EP4 receptors induce prolonged de novo prostaglandin E₂ synthesis through biphasic phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases mediated by activation of protein kinase A in HCA-7 human colon cancer cells. *Eur J Pharmacol.* **768**:149-159 (2015). DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.10.044. 査読有
*corresponding author

Otake S, Yoshida K, Seira N, Sanchez CM, Regan JW, Fujino H*, Murayama T. Cellular density-dependent down-regulation of EP4 prostanoid receptors via the up-regulation of hypoxia-inducible factor-1α in HCA-7 human colon cancer cells. *Pharma Res Per.* **3**:e00083 (2014). DOI: 10.1002/prp2.83. 査読有
*corresponding author

Tanimoto J, Fujino H*, Takahashi H, Murayama T. Human EP2 prostanoid receptors exhibit more constraints to mutations than human DP prostanoid receptors. *FEBS Lett.* **589**:766-772. (2015) DOI: 10.1016/j.febslet.2015.02.006. 査読有
*corresponding author

Oyama S, Fujino H*, Yamazaki R, Okura I, Regan JW, Awata A, Arai T, Murayama T. A novel indole compound, AWT-489, inhibits prostaglandin D₂-induced CD55 expression by acting on DP prostanoid receptors as an antagonist in LS174T human colon cancer cells. *Arch Biochem Biophys.* **541**:21-29 (2014). DOI: 10.1016/j.abb.2013.10.023. 査読有
*corresponding author

Yoshida K, Fujino H*, Otake S, Seira N, Regan JW, Murayama T. Induction of cyclooxygenase-2 expression by prostaglandin E₂ stimulation of the prostanoid EP4 receptor via coupling to G_{αi} and transactivation of the epidermal growth factor receptor in HCA-7 human colon cancer cells. *Eur J Pharmacol.* **718**:408-417 (2013). DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.08.002. 査読有
*corresponding author

〔学会発表〕(計 20 件)

清良尚史、藤野裕道、大竹翔、Regan JW、村山俊彦 ヒト結腸癌 HCA-7 細胞において HIF-1 は EP4 受容体プロモーターHRE 配列に結合し、受容体発現を制御する 日本薬学会第 136 年会(パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2016 年 3 月 26-29 日)

谷本淳、藤野裕道、樋坂章博、高橋弘喜、村山俊彦 ヒト DP および EP2 プロスタノイド受容体の cDNA 配列変異の解析 第 89 回日本薬理学会年会(パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2016 年 3 月 9-11 日)

柳沢直樹、藤野裕道、和才真希子、荒井孝義、村山俊彦 新規インドール化合物のヒト結腸がん LS174T 細胞への抗がん作用の探索 第 89 回日本薬理学会年会(パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2016 年 3 月 9-11 日)

倉田直希、藤野裕道、清良尚史、村山俊彦 Gi 型 G タンパク質共役機構を中心としたヒト EP4 プロスタノイド受容体 C 末端領域の役割の解明 第 133 回日本薬理学会関東部会(柏の葉カンファレンスセンター(千葉県柏市)、2015 年 10 月 10 日)「薬理学会関東部会 若手優秀発表賞 受賞」

清良尚史、藤野裕道、倉田直希、Regan JW、村山俊彦 ヒト EP4 プロスタノイド受容体細胞内ループ 3 の T cell factor 転写活性への影響 日本薬学会第 135 年会(デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫県神戸市)、2015 年 3 月 25-28 日)

藤野裕道 がん増悪化情報伝達系へのプロスタノイド受容体の役割 日本薬学会第

135 年会(神戸学院大学(兵庫県神戸市)、2015 年 3 月 25-28 日)「日本薬学会 学術振興賞受賞講演」

藤野裕道、大竹翔、吉田憲司、清良尚史、Sanchez CM、Regan JW、村山俊彦 ヒト結腸癌 HCA-7 細胞の細胞密度依存的な EP4 プロスタノイド受容体発現量の減少 第 88 回日本薬理学会年会(名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)、2015 年 3 月 18-20 日)

大蔵伊織、藤野裕道、清良尚史、Sanchez CM、Regan JW、村山俊彦 プロスタグランジン D₂ は EP2 プロスタノイド受容体を介して cAMP 非依存的に T cell factor シグナルを活性化 第 88 回日本薬理学会年会(名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)、2015 年 3 月 18-20 日)

清良尚史、藤野裕道、大竹翔、吉田憲司、Regan JW、村山俊彦 ヒト結腸癌 HCA-7 細胞における EP4 受容体発現と hypoxia inducible factor-1 発現との関連性の解明 日本薬学会第 134 年会(熊本市総合体育館(熊本県熊本市)、2014 年 3 月 27-30 日)

藤野裕道、大山聡美、山崎璃沙、大蔵伊織、Regan JW、阿波田篤子、荒井孝義、村山俊彦 新規インドール化合物 AWT-489 は DP プロスタノイド受容体にアンタゴニストとして作用し CD55 発現を抑制する 第 87 回日本薬理学会年会(仙台国際センター(宮城県仙台市)、2014 年 3 月 19-21 日)

藤野裕道、吉田憲司、中村浩之、Regan JW、村山俊彦 ヒト結腸癌 HCA-7 細胞において EP4 受容体は G_i タンパク質/上皮成長因子受容体を介してシクロオキシゲナーゼ-2 発現を亢進する 第 12 回生命科学研究会 浅虫観光ホテル(青森県青森市)、2013 年 6 月 28-29 日)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: インドール化合物、DP プロスタノイド受容体アンタゴニスト、それを用いた薬剤、及び DP プロスタノイド受容体アンタゴニストの使用

発明者: 荒井孝義、藤野裕道、村山俊彦、大山聡美、阿波田篤子

権利者: 千葉大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-192422 号

出願年月日: 2013 年 9 月 17 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

藤野裕道 癌メカニズムの解明を目指し

て 研究戦略 薬事日報 薬学学生新聞
第51号 9月1日(2015)

藤野裕道 大腸癌とプロスタグランジン
受容体-「癌悪性化サイクル」形成への潜在的なメカニズム- 研究戦略 YAKU 学の研究現場から No.95 薬事日報 第11599号 7月13日(2015)

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/hinka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野 裕道 (FUJINO, Hiromichi)
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：40401004

(2) 連携研究者

村山 俊彦 (MURAYAMA, Toshihiko)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：90174317