

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：82302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640087

研究課題名(和文)腫瘍形成にpH感知性受容体は機能しているか～受容体欠損マウスを用いた解析

研究課題名(英文) Dose T Cell Death-Associated Gene 8 (TDAG8), One of Proton-Sensing G-protein-coupled Receptors, Play A Roll in 3-Methylcholanthrene-induced Tumor Formation?

研究代表者

村田 直哉 (Murata, Naoya)

群馬県衛生環境研究所・その他部局等・研究企画係研究員

研究者番号：00533473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍形成における宿主免疫の役割を、TDAG8受容体欠損マウスを用いて解析した。その結果、化学発がん物質3-メチルコラントレン(3-MCA)の投与による腫瘍形成は、野生型の9割に認められたが、TDAG8欠損型では半減した。しかし、免疫組織学的検討で腫瘍組織へのCD3+T細胞など免疫細胞の浸潤に違いを認めず、また、3-MCA誘発マウス繊維肉腫細胞株(MC57G)の接種による腫瘍形成や、MC57Gによって誘導される細胞障害活性に野生型とTDAG8欠損型で違いを認めなかった。以上から、TDAG8欠損型での腫瘍形成抑制は、直接的な細胞障害活性の違いではなく、宿主免疫の間接的な調節機構によるものと推定された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed a role of the host immunity in the tumor formation using TDAG8-receptor-deficiency mice. As a result, the tumor formation was induced with a single subcutaneous dosage of chemical carcinogen 3-methylcholanthrene(3-MCA) in more than 90% of the wild type, but was reduced to its half in the TDAG8-deficiency type. However, immunohistological examination show no significant difference in the degree of immune cells(e.g. CD3-positive T cell)infiltration to the tumor tissues between both types. In addition, no significant difference was found between both types not only in the tumor formation with inoculation of 3-MCA-induced mouse fibrosarcoma cell strain (MC57G) but also in MC57G-induced cytotoxic activity. Thus, it was supposed that the suppressive effect on the tumor formation found in TDAG8-deficiency type is induced by indirect cellular or humoral regulation mechanisms of the host immunity, but not by direct cytotoxic activity by the immune cells, such as T cells.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：発癌 pH感知性受容体 TDAG8

1. 研究開始当初の背景

腫瘍部位では低酸素と酸性化(低 pH)が伴うことはよく知られている。酸素供給の不足によって解糖系/乳酸産生が亢進し、pH が 6.0 近くまで低下する場合もある。低酸素時には HIF-1 を中心とした解析が進んでいる。一方、酸性 pH もがん細胞や宿主細胞に対して様々な応答をひきおこすことが知られているが、その分子機構は最近まで、ほとんど明らかにされてこなかった。最近、私達の研究グループ (Wang JQ, et al, J Biol Chem 279:45626,2004; Tobo M, et al, Cell Signal 280:34458,2005) を含む国内外のグループ (Ludwig, et al, Nature 425:93,2003 など) 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 ファミリー受容体 (OGR1, GPR4, TDAG8) 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。さらに私達は、マクロファージでは細胞外 pH 低下によって LPS による炎症性サイトカイン産生が減弱し、その pH 作用に TDAG8/cAMP が介在していることや (Mogi C, et al, J Immunol.182:3243,2009)、マクロファージの TDAG8 発現増加が糖質コルチコイドの抗炎症性作用の一部として関わっていることを示し (He XD, et al, BBRC 415:627,2011)、また、好中球では細胞外酸性 pH がスーパーオキシドアニオン産生を TDAG8 を介して抑制することも見出した (Murata N, et al, Cell Immunol 259:21,2009)。これらの知見は TDAG8 が抗炎症性に作用していることを示唆しているものであり、炎症性サイトカインが抗腫瘍作用を発揮することが考えられることから、TDAG8 は腫瘍形成に対しては好ましい作用を発揮している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、pH 感知性受容体の中でも特に TDAG8 に焦点をあて、pH 感知性受容体が腫瘍形成に対して促進的に機能しているという我々の仮説を実証するために、TDAG8 受容体欠損マウスを用いて解析した。

3. 研究の方法

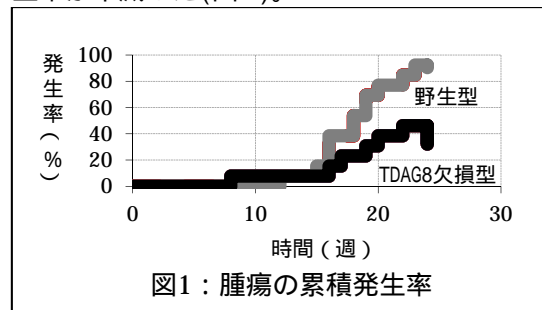
腫瘍形成における T 細胞など免疫細胞の役割を明らかにするため、化学発がん物質である 3-methylcholanthrene(3-MCA) の投与、あるいは、マウス由来がん細胞(メチルコラントレン誘発マウス繊維肉腫細胞株: MC57G) の接種を

行い、腫瘍形成、生存、免疫・炎症細胞の集積などを指標に、OGR1 ファミリー受容体、特に TDAG8 受容体欠損マウスを用いて解析した。免疫・炎症細胞の集積については、腫瘍組織を採取し、腫瘍組織をホルマリンで固定した後に、免疫組織学的に検討した。さらに、マウス由来がん細胞(MC57G)に対するマウス脾エフェクター細胞の細胞障害活性については、MC57G によってマウスをインビボで刺激後、さらにマウス脾エフェクター細胞をインビトロで刺激し、MC57G を標的とした LDH 遊離法によって測定した。

4. 研究成果

(1) 化学発がん物質 3-MCA の投与後の腫瘍形成

3-MCA をマウス背部に皮下投与すると、投与後 10 週間後から腫瘍形成 (>500 立方 mm) を認めた。その発生率は野生型マウスでは 9 割以上であるのに対し、TDAG8 欠損マウスでは発生率が半減した(図 1)。



腫瘍組織を採取し、腫瘍組織をホルマリンで固定した後に、免疫組織学的に検討したところ、腫瘍組織への CD3+T 細胞の浸潤が認められた。しかし、その程度は野生型と TDAG8 欠損型で明らかな違いは認められなかった。FOXP3+ 細胞(制御性 T 細胞:Treg)でも同様の所見であった。NK1.1+細胞(NKT 細胞)については、免疫染色による染色が不良であり、判断が困難であった。

(2) マウス由来がん細胞(MC57G)の接種後の腫瘍形成

MC57G をマウス皮下に接種し、毎週ごとに腫瘍を計測した。接種された MC57G は腫瘍を形成し、徐々に増大していったが、その増大スピードは野生型と TDAG8 欠損型で明らかな違いを認めなかった。

(3) マウス由来がん細胞(MC57G)刺激により誘導される、がん細胞に対するマウス脾エフ

エクター細胞の細胞障害活性

マウスを MC57G 接種によりインビボで刺激後、さらにマウス脾細胞を取り出し、さらにインビトロで刺激した。その結果、脾エフェクター細胞は無刺激状態では細胞障害活性を示さないが、インビボ、インビトロで刺激後にはほぼ 100% の細胞障害活性を示した。しかし、その細胞障害活性は、野生型と比べて、TDAG8 欠損型にて増強傾向を認めなかった。そのため、TDAG8 欠損マウスでの腫瘍形成の抑制効果は、宿主 T 細胞などの直接的な細胞障害活性の違いではなく、細胞性、液性などの宿主免疫の調節機構によって修飾されている可能性が推定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Sato K, Tobo M, Mogi C, Murata N, Kotake M, Kuwabara A, Im DS, and Okajima F.: Lipoprotein-associated lysolipid molecules are differentially involved in high-density lipoprotein- and its oxidized form-induced neurite remodeling in PC12 cells. *Neurochem Int* 68:38-47 (2014) DOI: 10.1016/j.neuint.2014.02.005. 査読有
Jin Y, Sato K, Tobo A, Mogi C, Tobo M, Murata N, Ishii S, Im DS, Okajima F.: Inhibition of interleukin-1 production by extracellular acidification through the TDAG8/cAMP pathway in mouse microglia. *J Neurochem* 129(4):683-695 (2014) DOI: 10.1111/jnc.12661 査読有
Kotake M, Sato K, Mogi C, Tobo M, Aoki H, Ishizuka T, Sunaga N, Imai H, Kaira K, Hisada T, Yamada M, Okajima F.: Acidic pH increases cGMP accumulation through the OGR1/phospholipase C/Ca(2+)/neuronal NOS pathway in N1E-115 neuronal cells. *Cell Signal*. 26(11):2326-32 (2014) DOI: 10.1016/j.cellsig. 査読有
Tobo A, Tobo M, Nakakura T, Ebara M, Tomura H, Mogi C, Im DS, Murata N, Kuwabara A, Ito S, Fukuda H, Arisawa M, Shuto S, Nakaya M, Kurose H, Sato K, Okajima F.: Characterization of Imidazopyridine Compounds as Negative

Allosteric Modulators of Proton-Sensing GPR4 in Extracellular Acidification-induced Responses. *PLoS ONE* 10(6):e0129334 (2015) DOI: 10.1371/journal.pone.0129334. 査読有
Kamide Y, Ishizuka T, Tobo M, Tsurumaki H, Aoki H, Mogi C, Nakakura T, Yatomi M, Ono A, Koga Y, Sato K, Hisada T, Dobashi K, Yamada M, Okajima F.: Acidic environment augments Fc RI-mediated production of IL-6 and IL-13 in mast cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 464(3):949-55 (2015) DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.077. 査読有
Tsurumaki H, Mogi C, Aoki-Saito H, Tobo M, Kamide Y, Yatomi M, Sato K, Dobashi K, Ishizuka T, Hisada T, Yamada M, Okajima F.: Protective Role of Proton-Sensing TDAG8 in Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury. *Int J Mol Sci*. 16(12):28931-42 (2015) DOI:10.3390/ijms161226145. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

村山佳予子、入沢寛之、村田直哉、五十嵐忠彦、中里直正、Aggressive Lymphoma の化学療法後に発症した MALT Lymphoma の 4 例、第 54 回日本リンパ網内系学会総会、2014 年 6 月 19 日～21 日、山形国際ホテル(山形)
佐藤幸市、金暉、当房文香、茂木千尋、岡島史和、マウスミクログリアにおいて酸性 pH は TDAG8/PKA を介して MAPK 系を抑制することによって IL-1 産生を抑制する、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15 日～18 日、国立京都国際会館(京都)
村山佳予子、入沢寛之、村田直哉、五十嵐忠彦、横濱章彦、A case of Waldenstrom macroglobulinemia with multiple bone involvement、第 76 回日本血液学会学術集会、2014 年 10 月 31 日～11 月 02 日、大阪国際会議場(大阪)
五十嵐忠彦、村田直哉、入沢寛之、村山佳予子、中里直正、小島勝、15 年の臨床経過から Intestinal nodular lymphoid hyperplasia と診断した 1 例、第 55 回日本リンパ網内系学会総会、2015 年 7 月 09 日～10 日、岡山コンベンションセンター

群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号：30142748

(岡山)

村山佳予子、入沢寛之、村田直哉、五十嵐忠彦、中里宜正、Diffuse large B-cell lymphoma, anaplastic variant 症例の検討、第 55 回日本リンパ網内系学会総会、2015 年 7 月 09 日～10 日、岡山コンベンションセンター(岡山)

入沢寛之、村田直哉、村山佳予子、五十嵐忠彦、Analysis of infectious complication after intensive chemotherapy for acute leukemia、第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月 16 日～18 日、石川県立音楽堂(金沢)
佐藤幸市、当房文香、当房雅之、茂木千尋、岡島史和、脳虚血再灌流モデルマウスの脳障害におけるプロトン感知性受容体 TDAG8 の役割、第 88 回日本生化学会大会、2014 年 12 月 01 日～04 日、神戸ポートアイランド(神戸)

当房文香、佐藤幸市、当房雅之、茂木千尋、岡島史和、プロトン感知性受容体 GPR4 選択的阻害物質の特性解析：imidazopyridine 化合物による負のアロステリック作用、第 88 回日本生化学会大会、2014 年 12 月 01 日～04 日、神戸ポートアイランド(神戸)

下田佳央莉、田島弘、金巻初弥、櫻井通恵、村田直哉、土屋謙仕、外里富佐江、辻哲也、がん患者の日常生活動作におけるリハビリテーション介入の効果、第 5 回日本がんリハビリテーション研究会、2016 年 1 月 09 日、神戸大学医学部附属病院シスメックスホール・神緑会館(神戸)

村山佳予子、入沢寛之、村田直哉、五十嵐忠彦、中里宜正、胃原発 T 細胞性リンパ腫の臨床的検討、第 56 回日本リンパ網内系学会総会、2016 年 9 月 01 日～03 日、ホテル日航熊本(熊本)

6. 研究組織

(1)研究代表者

村田 直哉 (MURATA, Naoya)
群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員
研究者番号：00533473

(2)連携研究者

岡島 史和 (OKAJIMA, Fumikazu)