

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：18001  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2012～2014  
 課題番号：24791792  
 研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌におけるリゾフォスファチジン酸経路：新規非EDG型受容体の意義  
  
 研究課題名(英文) The Signaling Pathway of Lysophosphatidic Acid in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: The Role of Non-EDG Family Receptors  
  
 研究代表者  
 又吉 宣 (MATAYOSHI, Sen)  
  
 琉球大学・医学部附属病院・助教  
  
 研究者番号：60448587  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リゾフォスファチジン酸(LPA)は生体内で様々な働きを持つ生理活性脂質として近年注目を集めている。癌細胞に関してはLPA刺激が癌細胞の増殖や遊走といった悪性形質の発現に働くことが報告されている。その受容体はLPA1-6の6つのタイプがこれまでに知られているが、2003年に発見されたLPA4に関してその働きはよくわかっていない。今回、頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いLPA刺激に関する増殖能、遊走能を調べる実験を行った。次に遺伝子導入によりLPA4を過剰発現させた頭頸部扁平上皮癌細胞株を用い同様の実験を行うことによってLPA4を介したシグナリングが癌細胞の悪性形質発現抑制につながる可能性を見い出した。

研究成果の概要(英文)：Lysophosphatidic acids (LPAs) have been implicated in the tumorigenesis of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). LPA receptors belong to endothelial differentiation gene (Edg) family (LPA1-3) and phylogenetically distant non-Edg family (LPA4-6). In the present study, we investigated the effect of ectopic expression of LPA4 in SQ-20B, a HNSCC cell line, which expressed trivial level of endogenous LPA4. LPA stimulated proliferation of SQ-20B cells. Infection with doxycycline-regulatable adenovirus vector expressing green fluorescent protein-tagged LPA4 (AdvLPA4G) abolished LPA-stimulated proliferation in SQ-20B cells with the accumulation of G2/M-phasic cells. In the presence of Ki16425 or Rac1 inhibitor, ectopic LPA4-expressing SQ-20B cells showed further down-regulation of the proliferation. LPA induced cell motility was suppressed by ectopic LPA4 expression. Our data suggest that LPA4 signaling potentially modulates malignant behaviors of SQ-20B cells.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：リゾフォスファチジン酸 LPA 頭頸部癌 Gタンパク共役受容体

## 1.研究開始当初の背景

### 1) リゾフォスファチジン酸受容体の発見

リゾフォスファチジン酸 (LPA) は生体膜を構成する脂質の中で最も単純な構造を持っており、フォスファチジン酸 (PA) からグリセロールの sn-1 位、または sn-2 位の脂肪酸のどちらかが脱アシル化されたものである。通常の生体内では全リン脂質中に占める LPA の割合は 0.5%以下で 1980 年代まではリン脂質合成の中間産物としてしか認識されていなかった。しかし 1996 年 LPA 受容体の一つがクローニングされて以降、LPA は生体内で様々な働きを持つ生理活性脂質として認識されるようになり、LPA および LPA 受容体に関する研究報告がみられるようになった。

### 2) LPA の働き

これまで報告されている LPA の生理的、病的な機能としては様々なものがあげられる。例として、精神神経疾患においては統合失調症や双極制障害の進展、心血管系においては心筋のサバイバルや心肥大、また神経因性疼痛の進展や生殖系では受精卵の着床に参与するとされている。癌に関するものとしては癌細胞の浸潤や遊走、セルサバイバルや血管形成などに LPA が関与するとされている。

### 3) LPA の産生経路

生体内に広く分布する LPA であるが、その産生経路は、リゾフォスファチジルコリンからオートタキシン(ATX) という酵素の働きによって作られる細胞外産生系と細胞内で、フォスファチジン酸やモノアシルグリセロールより産生される細胞内産生系が明らかになっている。

LPA は単離した直後の血漿中では 100nM 程度の濃度で存在しており、血中の LPA は ATX を介した細胞外産生系が唯一の産生経路とされている。

この ATX は LPA の産生酵素として知られる以前にメラノーマ細胞が分泌する運動性促進因子として知られており、この発見により癌の転移・浸潤に LPA が重要な役割を担っていることが初めて示唆された。

### 4) LPA 受容体

LPA は血中、そして細胞内に広く分布しているがその受容体は G 蛋白共役型受容体 (GPCR) として細胞膜上に存在し、現在 LPA1 から LPA6 まで 6 つのアイソフォームが同定されている。これら膜上の受容体により、Gi、G12/13、Gq、Gs といった G タンパクが活性化され、下

流の様々なシグナル伝達が惹起されることが知られている。

### 5) EDG 型受容体と非 EDG 型受容体

LPA の果たす作用の多くは 1996 年に発見された LPA1 をはじめとする EDG( endothelial differentiation gene ) 型受容体によるものが殆どであったが、2003 年野口らにより非 EDG 型受容体である LPA4 が同定され、その働きが注目されるようになった。

もともとオーファン受容体の検索により明らかになった非 EDG 型受容体 LPA4-6 だが、以前より知られる LPA1-3 といった EDG 型受容体と比べ、アミノ酸相同性は低く、EDG ファミリーとは独立して LPA を認識する機構を得たものと考えられている。

2003 年に野口らが初めて非 EDG 型受容体である LPA4 の cDNA クローニングに成功している。

だがこれまでの LPA に関する研究は EDG 型受容体をターゲットにしたものがほとんどで非 EDG 型受容体に関する報告は数少ないのが現状である。

### 6) LPA 受容体の発現

ヒトにおける各組織での LPA 受容体発現であるが、LPA1 は全身の広組織に広く発現しており、LPA シグナリングの主要な役割を担っていることが示唆される。一方、LPA4 に関してはヒトでは卵巣での高発現が報告されているものの、頭頸部領域の組織においてはその発現様式は明らかではない。

### 7) LPA 受容体シグナリング

非 EDG 型レセプターである LPA4 に関しては、ラット neuroblastoma において、LPA4 を介したシグナリングは LPA1 を介するシグナリングに拮抗して細胞形態を変化させたり、ヒト間葉系幹細胞においては骨芽細胞への分化に関して LPA1 と LPA4 を介したシグナルがそれぞれ拮抗する可能性が示唆されている。

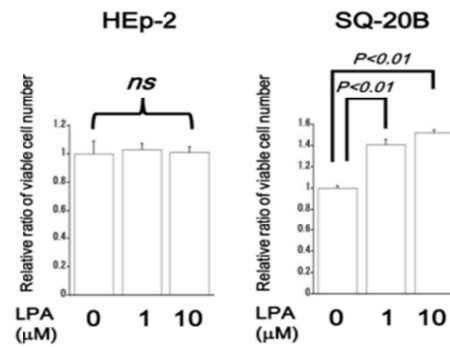
口腔底癌をはじめとする頭頸部扁平上皮癌においても EDG 型受容体を介した悪性形質発現に関する報告はみられるが、LPA4 をはじめとする非 EDG 型受容体の作用については不明のままである。

## 2.研究の目的

本研究の目的は頭頸部扁平上皮癌の細胞機能発現におけるリゾフォスファチジン酸受容体 LPA4 の役割を明らかにすることである。

### LPA 刺激下の増殖実験

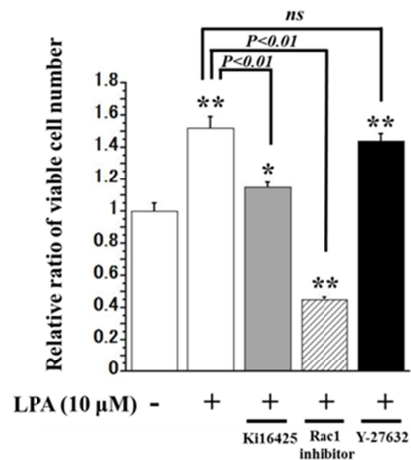
次にこれらの細胞において LPA 刺激に対する増殖実験を行ったところ、HEp-2 細胞株では LPA に対する増殖反応は認めなかったが、SQ-20B 細胞株では濃度依存性に増殖亢進を認めた(図 2)。この結果より、SQ20B 細胞において LPA に対する増殖応答は LPA4 の低発現が関与しているとの仮説を立て、引き続き SQ-20B 細胞株を用いて実験を行った。



(図 2)

### 各種阻害剤添加による増殖実験

次に LPA 刺激にて増殖応答を示す SQ20B 細胞に各種阻害薬を添加し増殖実験を行った。EDG 型レセプター阻害剤である Ki16425 と Rac inhibitor では増殖が抑制され、特に Rac inhibitor で最も増殖が抑制される結果となった(図 3)。一方、Rock inhibitor である Y27632 では変化を認めなかった。このことより LPA 刺激による増殖応答は EDG 型受容体および下流の Rac を介した経路が重要と考えられ、LPA4 の強発現がこの増殖応答に与える影響をみるために外来性 LPA4 の過剰発現株の作製を行った。



\*P<0.05; \*\*P<0.01 against the control LPA-unstimulated cells.

(図 3)

### 3.研究の方法

まずは始めにいくつかの扁平上皮癌細胞で各 LPA 受容体の発現を PCR、リアルタイム PCR にて調べた。次にこれらの細胞において LPA 刺激に対する増殖実験を行い、続けて各種阻害剤を添加して LPA 刺激下の増殖実験を行った。

次に LPA 刺激に対し最も増殖応答がみられた SQ20B 細胞株を用い外来性 LPA4 過剰発現株の作製を行った。

SQ20B の外来性 LPA4 過剰発現株を用いて LPA 刺激下の増殖実験、セルサイクルアッセイ、各種阻害剤添加による LPA に対する増殖実験を行った。

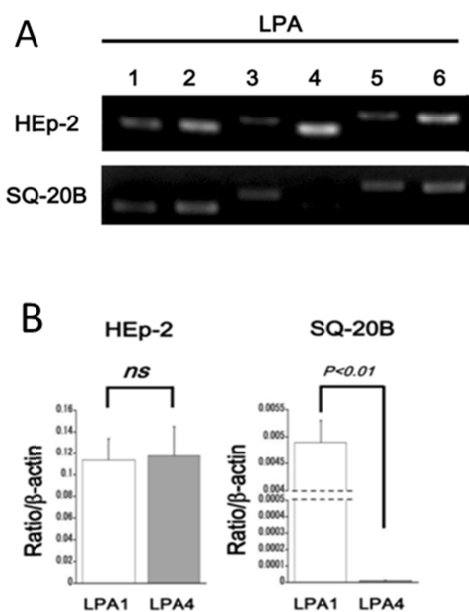
また LPA 刺激に対する遊走能の変化をみる目的で wound healing assay を行った。

### 4.研究成果

#### LPA 受容体発現

いくつかの扁平上皮癌細胞で各 LPA 受容体の発現を PCR、リアルタイム PCR にて調べたところ、ヒト扁平上皮癌である HEp-2 細胞株では LPA1 から 6 全ての発現を認め、ヒト喉頭癌細胞株である SQ-20B では LPA4 のみきわめて低いレベルの発現を呈した。

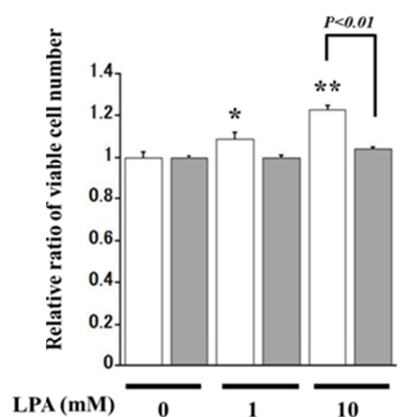
リアルタイム PCR においても HE-p-2 細胞株で LPA1 と LPA4 の発現量は同程度であるのに対し、SQ20B 細胞株では LPA1 に比べ、極めて低いレベルの LPA4 発現を示した(図 1A、B)。



(図 1A,B)

## 外来性 LPA 過剰発現株による増殖実験およびセルサイクルアッセイ

SQ20B の外来性 LPA4 過剰発現細胞株を用い、LPA 刺激下の増殖実験を行ったところ予想通り増殖応答は減弱した(図 4)。続いてフローサイトメトリーを用い細胞核の DNA 量を分析したところ、コントロールに比べ G2/M のポピュレーションが増加していることが明らかになった(表 1)。LPA4 過剰発現株では細胞周期上、G2/M 期でセルサイクルの停止がおこり増殖能が低下したことが示唆された。



\*P<0.05; \*\*P<0.01 against the control LPA-unstimulated cells.

(図 4)

Flowcytometric cell cycle analysis			
	G0/G1	S	G2/M
Dox(-) control	52.8±1.14	11.4±0.33	35.6±0.78
Dox(+)	38.2±0.44**	9.83±0.15**	51.9±0.22**

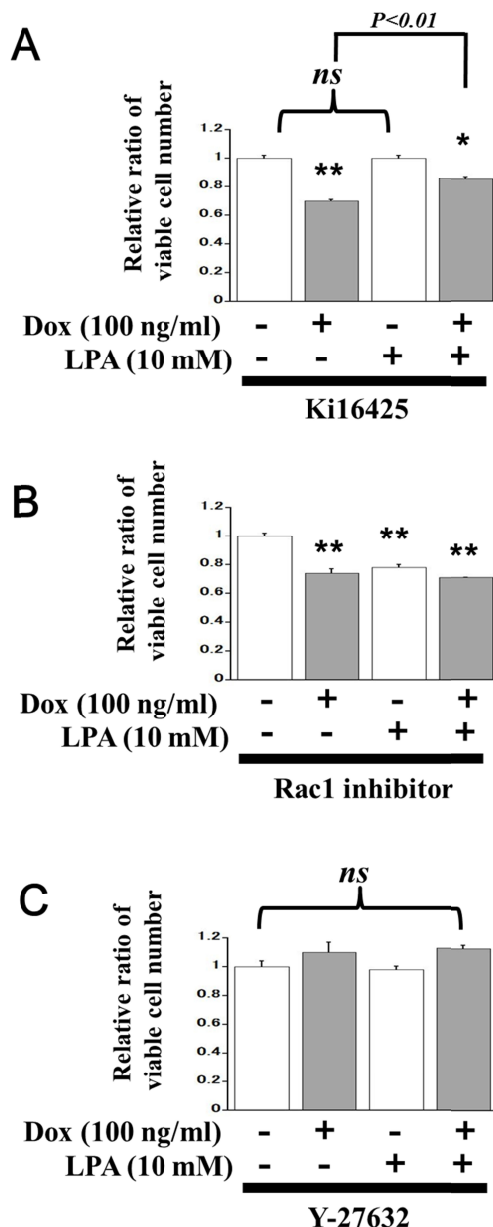
Percentages of each cells in each cell cycle phase are shown as mean ± SEM. \*\*\* P<0.01 against controls.

(表 1)

## 外来性 LPA4 過剰発現株における各種阻害剤添加後の増殖実験

LPA4 過剰発現株において、Ki16425 存在下ではコントロールに比べ増殖は抑制されるが LPA 添加によりわずかだが回復傾向がみられた(図 5A)。また、Rac1 inhibitor 存在下では増殖は抑制され、LPA 添加によっても増殖応答は回復を認めず、LPA 4 過剰発現株においても下流に存在する Rac シグナリングが増殖抑制に強く関与していることが示唆された(図 5B)。一方、Y27632 存在下では LPA 添加の有無に関わらず増殖応答の変化はみられなかった(図 5C)。外来性 LPA4 遺伝子の導入は、LPA 刺激に対する増殖刺激を抑制し、EDG 型受容

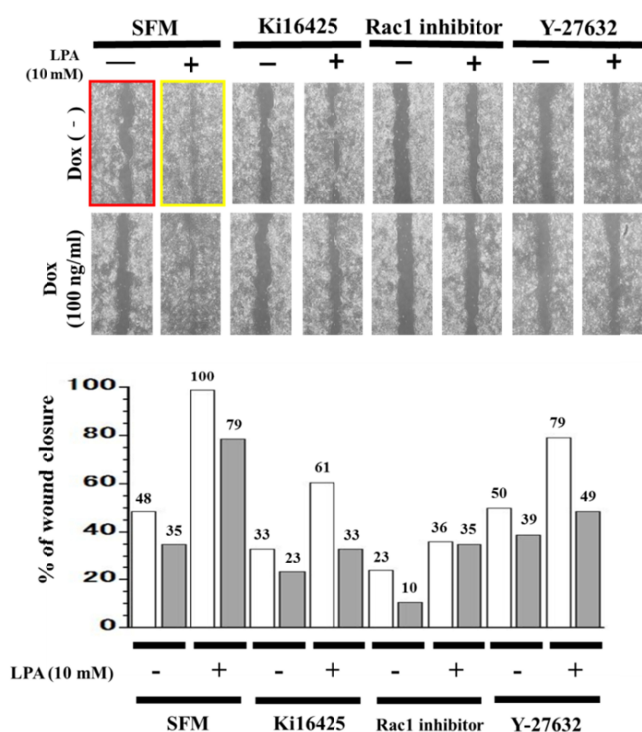
体阻害剤である Ki16425 や Rac1 inhibitor 存在下では特に増殖応答が抑制されることが明らかとなった。



(図 5A,B,C)

## wound healing assay

LPA 刺激に対する遊走能の変化をみるため wound healing assay を行った。各条件においてコントロールと比較し、外来性 LPA4 遺伝子導入株では遊走面積が減少する結果となった。このことより SQ20B 細胞における LPA 刺激下の遊走能は、外来性 LPA4 遺伝子の導入によって抑制されることが示唆された(図 6)。



(図6)

これらの研究結果をまとめると

1. 内因性 LPA4 の発現レベルの低い SQ20B 細胞株では LPA 刺激による増殖応答がみられた。
2. SQ20B において LPA 刺激による増殖応答は EDG 型受容体を介したシグナリング、あるいは RAC を介したシグナリングが重要と考えられた。
3. SQ20B における外来性 LPA4 遺伝子の導入は LPA 刺激による増殖、遊走刺激を抑制した。
4. 頭頸部扁平上皮癌の悪性形質発現において LPA シグナリングは重要で、LPA4 を介するシグナリングにより腫瘍細胞の悪性形質を制御できる可能性が示唆された。

#### 引用文献

1. Gendaszewska-Darmach E: Lysophosphatidic acids, cyclic phosphatidic acids and autotaxin as promising targets in therapies of cancer and other diseases. *Acta Biochim Pol* 55: 227-240, 2008.
2. Mills GB and Moolenaar WH: The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 582-591, 2003.
3. Moolenaar WH: Lysophospholipids in the limelight: autotaxin takes center stage. *J Cell Biol* 158: 197-199, 2002.

4. Umez-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, Yamori T, Mills GB, Inoue K, Aoki J and Arai H: Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol* 158: 227-233, 2002.

5. Yanagida K and Ishii S: Non-Edg family LPA receptors: the cutting edge of LPA research. *J Biochem* 150: 223-232, 2011.

6. Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, Lin ME, Teo ST, Park KE, Mosley AN and Chun J: LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 157-186, 2010.

7. DM Zu Heringdorf and KH Jakobs: Lysophospholipid receptors: Signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1768: 923-940, 2007.

8. Noguchi K, Ishii S and Shimizu T: Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem* 278: 25600-25606, 2003.

9. Lee CW, Rivera R, Dubin AE and Chun J: LPA(4)/GPR23 is a lysophosphatidic acid (LPA) receptor utilizing G(s)-, G(q)/G(i)-mediated calcium signaling and G(12/13)-mediated Rho activation. *J Biol Chem* 282: 4310-4317, 2007.

10. Yanagida K, Ishii S, Hamano F, Noguchi K and Shimizu T: LPA4/p2y9/GPR23 mediates rho-dependent morphological changes in a rat neuronal cell line. *J Biol Chem* 282: 5814-5824, 2007.

11. Lee Z, Cheng CT, Zhang H, Subler MA, Wu J, Mukherjee A, Windle JJ, Chen CK and Fang X: Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility. *Mol Biol Cell* 19: 5435-5445, 2008.

12. Liu YB, Kharode Y, Bodine PV, Yaworsky PJ, Robinson JA and Billiard J: LPA induces osteoblast differentiation through interplay of two receptors: LPA1 and LPA4. *J Cell Biochem* 109: 794-800, 2010.

13. Gschwind A, Prenzel N and Ullrich A. : Lysophosphatidic acid-induced squamous cell carcinoma cell proliferation and motility involves epidermal growth factor receptor signal transactivation. *Cancer Res* 62: 6329-6336, 2002.

14. Rolin J and Maghazachi AA: Effects of lysophospholipids on tumor microenvironment. *Cancer Microenviron* 4: 393-403, 2011.

15. Bhawe SL, Teknos TN and Pan Q: Molecular parameters of head and neck cancer metastasis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 21: 143-153, 2011.

16. Hall A: Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 33: 891-895, 2005.

17. Routhier A, Astuccio M, Lahey D, Monfredo N, Johnson A, Callahan W, Partington A, Fellows K, Ouellette L, Zhidro S, Goodrow C, Smith A, Sullivan K, Simone P, Le L, Vezuli B, Zohni M, West E, Gleason D and Bryan B: Pharmacological inhibition of Rho-kinase signaling with Y-27632 blocks melanoma tumor growth. *Oncol Rep* 23: 861-867, 2010.

18. Moore KA, Sethi R, Doanes AM, Johnson TM, Pracyk JB, Kirby M, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ and Finkel T: Rac1 is required for cell proliferation and G2/M progression. *Biochem J* 326: 17-20, 1997.

19. Mack NA, Whalley HJ, Castillo-Lluva S and Malliri A: The diverse roles of Rac signaling in tumorigenesis. *Cell Cycle* 10: 1571-1581, 2011.

20. Shoval I and Kalcheim C: Antagonistic activities of Rho and Rac GTPases underlie the transition from neural crest delamination to migration. *Dev Dyn* 241:

1155-1168, 2012

21. Guilluy C, Garcia-Mata R and Burridge K: Rho protein crosstalk: another social network? *Trends Cell Biol.* 2011 Dec;21(12):718-26.

22. Abraham MT, Kuriakose MA, Sacks PG, Yee H, Chiriboga L, Bearer EL and Delacure MD: Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. *Laryngoscope* 111: 1285-1289, 2001.

23. Harper K, Arsenault D, Boulay-Jean S, Lauzier A, Lucien F and Dubois CM: Autotaxin promotes cancer invasion via the lysophosphatidic acid receptor 4: participation of the cyclic AMP/EPAC/Rac1 signaling pathway in invadopodia formation. *Cancer Res* 70: 4634-4643, 2010.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Matayoshi S, Chiba S, Lin Y, Arakaki K, Matsumoto H, Nakanishi T, Suzuki M, Kato S.: Lysophosphatidic acid receptor 4 signaling potentially modulates malignant behavior in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol.* 査読あり、1560-8, 2013

〔学会発表〕(計2件)

— 又吉宣、喉頭扁平上皮癌におけるリゾフォスファチジン酸受容体 LPA4 遺伝子導入の効果、第102回日本病理学会総会(2013年6月6日、札幌)

又吉宣、頭頸部扁平上皮癌におけるリゾフォスファチジン酸レセプター4による悪性形質の改変、第119回日本耳鼻咽喉科学会沖縄県地方部会総会(2013年7月27日、沖縄)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

又吉 宣 (Matayoshi, Sen)

琉球大学・大学院医学研究科・耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座・助教

研究者番号：60448587