

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09779

研究課題名(和文) 癌細胞の飢餓を引き起こすケモカインCXCL14の糖代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of Glucose metabolism mechanism of chemokine CXCL14 that causes starvation of cancer cells

研究代表者

小澤 重幸 (ozawa, shigeyuki)

神奈川県大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：40434394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：CXCL14の受容体となり得るグルコースセンサーGPRC5Bに着目し、癌細胞におけるGPRC5Bの機能解析を行った。頭頸部扁平癌細胞におけるGPRC5Bの発現量は、担癌患者の予後に関与し、GPRC5Bの発現が高い担癌患者は、GPRC5Bの発現が低い担癌患者と比較して、5年生存率が短かった。また、GPRC5Bの発現が高い頭頸部扁平上皮癌は、グルコース依存性が低く、グルコース飢餓におけるアポトーシスを回避することが明らかとなった。また、そのメカニズムとして、GPRC5Bを高発現している頭頸部扁平上皮癌細胞は、グルコース飢餓状態になると、依存する栄養源をグルコースから脂質に変更する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CXCL14と同様にGPRC5Bの糖代謝における機能解析は、糖尿病について行われたものであり、癌については着目されていなかった。現在、GPRC5Bを標的とした糖尿病治療薬の開発が進んでいる。この糖尿病治療薬を、癌治療に応用することや、ケトン食療法の有効性の評価など、本研究は今後の癌研究の基盤となることが予想される。本研究成果は、はじめて、癌におけるGPRC5Bの機能解析を行ったものであり、新たな治療戦略を立案するためにも意義があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：GPRC5B is a diabetes-causing gene, which can be a receptor for CXCL14. In this study, we analysed the function of GPRC5B in cancer cells. We revealed that the expression level of GPRC5B in head-and-neck squamous carcinoma cells was involved in the prognosis of tumour-bearing patients, and that tumour-bearing patients with high expression of GPRC5B had a shorter 5-year survival rate compared to those with low expression of GPRC5B. We also revealed that head-and-neck squamous cell carcinoma cells with higher expression of GPRC5B showed reduced glucose-dependence and avoided apoptosis during glucose-starvation. We also showed, as a mechanism, that head and neck squamous cell carcinoma cells, with high GPRC5B expression may change their nutrient source from glucose to lipids during glucose starvation.

研究分野：口腔外科

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 糖代謝 CXCL14 GPRC5B

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CXCL14 の抗腫瘍効果メカニズムについては様々な研究者が解明することを試みたが成功にはいたらなかった。CXCL14 は、1999 年に発見された化学走化性を示すサイトカイン (ケモカイン) であり、すべての正常細胞で発現しているにもかかわらず、悪性腫瘍で発現が消失する遺伝子であることが報告された。この報告をもとに、申請者を含む多くの癌研究者は、CXCL14 が癌の縮小にかかわる分子であると考え、癌に対する CXCL14 の抗腫瘍効果について免疫細胞を介した抗腫瘍効果や、血管新生阻害効果を介した抗腫瘍効果など様々な研究が行われたものの、現在に至るまで決定的なものは存在しなかった。申請者はこれまでに、CXCL14 が EGFR シグナルによって発現制御を受ける分子であり、頭頸部癌に対して強力な抗腫瘍効果を有すること、さらには、EGFR 阻害剤の抗腫瘍効果に関与することを見出した。さらには、CXCL14 が癌の自然発生や転移に関与するかどうかを検討するため、CXCL14 トランスジェニックマウス、およびノックアウトマウスの作成を行った。申請者らの期待通り、CXCL14 トランスジェニックマウスでは、大腸癌の自然発生率や悪性黒色腫の転移能を激減させる結果を得た。一方、CXCL14 ノックアウトマウスは生まれず実験には至らなかった。同時期に、他研究施設でも CXCL14 ノックアウトマウスの作成が行われ、正常組織における CXCL14 の機能が解明された。申請者と同じく、ホモのノックアウトマウスはほとんど生まれなかったが、わずかに生まれた CXCL14 ノックアウトマウスはワイルドタイプマウスと比較し低体重であり、また、脂肪組織が著しく少ないとのことだった。結論は、CXCL14 が細胞のインスリン抵抗性を増強し糖尿病に関わる分子であることが報告された。申請者はこの結果が、CXCL14 の新たな抗腫瘍効果メカニズムを解明する重要なカギになるのではとないかと考え本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

現在まで、CXCL14 がケモカインに分類されることから、免疫系細胞や血管新生抑制作用を介して腫瘍を縮小していることが考えられてきた。しかしながら、実際には CXCL14 は免疫系細胞の走化性や分化を誘導する能力が乏しく、血管新生抑制作用についても不明な点が多い。以上のことから、クローニングされてから約 18 年間の経過した現在でも、CXCL14 の抗腫瘍効果メカニズムは明確には解明されていない。近年、前述したように CXCL14 が糖尿病に関与する分子であることが報告された。申請者は「ケモカイン」という枠組みが CXCL14 の抗腫瘍効果メカニズム解明の足枷となっていると考え、CXCL14 が癌細胞に及ぼす糖代謝制御に着目し研究を行うこととした。周知のとおり、癌細胞が増殖するためには非常に多くの糖を細胞内へ取り込む必要があり、その取り込み量は正常細胞の約 8 倍ともいわれている。すなわちそれだけ糖代謝を必要とする癌細胞は、糖尿病から最も遠い存在であることを意味する。事実、がん遺伝子、およびがん抑制遺伝子は糖尿病と密接な関係がある。現在、CXCL14 も糖尿病原因遺伝子と認識され、糖尿病と CXCL14 の関連性について研究が盛んに行われている。しかしながら、CXCL14 のインスリン抵抗性メカニズムについてはいまだ解明されておらず、まして癌細胞における糖代謝と CXCL14 の関わりについては調査されていないことが挙げられる。近年、マウスにおいて CXCL14 と同じ表現型を示すオーファン受容体 (GPC5B) の存在が明らかとなった。申請者は、GPC5B が CXCL14 の受容体ではないかと考え、まず、GPC5B の癌における機能解明を行うこととした。

3. 研究の方法

- (1) 頭頸部扁平上皮癌細胞株を6種類用いて、GPRC5Bの発現量をqPCRにて確認した。また、これらの細胞を96穴プレートに播種し、希釈法を用いてグルコース濃度を変化させ、細胞増殖・細胞毒性を測定するCell counting Kit 8を用いて細胞活性を計測した。
- (2) GPRC5Bの発現が最も低い頭頸部扁平上皮癌細胞株にGPRC5B強制発現ベクターとそのコントロールベクターを導入、グルコース不含培地を用いて経時的な細胞数の測定を行った。
- (3) さらに、これらの細胞をHoechst33342（生細胞）、FITC-Annexin V（アポトーシス細胞）、Ethidium Homodimer（ネクローシス細胞）を用いて免疫染色した。
- (4) GPRC5B強制発現細胞およびそのコントロール細胞を通常培地およびグルコース不含培地で培養後、細胞を溶解させたものをサンプルとし、メタボローム解析を行った。

4. 研究成果

- (1) GPRC5Bの遺伝子発現は、すべての頭頸部扁平上皮癌細胞株で確認されたものの、検出困難なレベルのものが多く存在した。GPRC5Bの発現レベルとグルコース濃度低下における細胞の生存活性を測定すると、GPRC5Bの発現レベルが高い頭頸部扁平上皮癌細胞株ではグルコース濃度低下における影響が少ない結果を得た。
- (2) GPRC5Bの発現が最も少ない頭頸部扁平上皮癌細胞株にGPRC5B強制発現ベクターを導入すると、コントロール細胞であるMOCK細胞と比較して、グルコース不含培地培養下での細胞数が多いことが明らかとなった。
- (3) 研究の方法3で記載したもので細胞を染色した結果、GPRC5B強制発現細胞株はMOCK細胞株と比較して、Hoechst33342陽性率が高く、FITC-Annexin V陽性率が低かった。また、Ethidium Homodimerについては顕著な差は確認されなかった。
- (4) メタボローム解析の結果、通常培地培養下でのGPRC5B強制発現細胞株とMOCK細胞株での差は確認されなかったが、グルコース不含培地培養下では、GPRC5B強制発現細胞株では脂質であるマロニル補酵素Aが消費されていることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 金森慶亮 |
| 2. 発表標題 新規エネルギーセンサーGPC5bは頭頸部扁平上皮癌細胞の無糖培養下での細胞死を抑制する。 |
| 3. 学会等名 神奈川歯科大学学会 第159回例会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 金森慶亮 |
| 2. 発表標題 エネルギーセンサーGPC5bは頭頸部扁平上皮癌細胞の無糖培養下での細胞死を抑制する。 |
| 3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|-------------------------------------------------|------------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 畑 隆一郎 (Hata Ryuichiro) (10014276) | 神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・特任教授 (32703) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|