

平成 21 年 4 月 28 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590064
 研究課題名(和文) 癌悪性化に関与する GPR48 の新規分子標的としての評価
 研究課題名(英文) Evaluation of GPR48 as a novel molecular target which is involved in the tumor progression
 研究代表者 北川 恭子 (KITAGAWA KYOKO)
 浜松医科大学・医学部・助教
 研究者番号 20299605

研究成果の概要：
 細胞浸潤能変化

invasion assayによりGPR48発現量に正相関した浸潤能の亢進が細胞レベルで認められていたため、そのメカニズムを探るため、細胞運動能の変化をscratch assayで調べた。使用した恒常発現株のGPR48発現量は株間で様々であったが、運動能との相関性は見出せなかった。さらに浸潤能亢進レベルも対照群と有為差が認められなくなった。このため、細胞外マトリックス分解能などの測定も計画していたが中止とした。

発癌促進効果

GPR48遺伝子を導入した培養細胞でcolony formation assayとfocus assayを行い、GPR48発現亢進による発癌性への寄与を検討したが、発癌促進効果は認められなかった。しかし細胞レベルでの研究から、GPR48は癌の悪性度を促進する作用を示した。

GPR48トランスジェニックマウスの解析

全身性発現型トランスジェニックマウスの作成に成功し、外来性GPR48発現臓器の異なる3ラインを得た。個体レベルでの機能解析は、ノックアウトマウスにおいて発育不全や腎臓形成不全が認められているが、全身性発現型GPR48トランスジェニックマウスでは発育程度、腎形成の異常は出現せず、長期通常飼育下で癌その他の疾患の発生の傾向は認められなかった。

我々はこれまでの他の研究プロジェクトにより、p27のエピキチンプロテアソームシステムによる分解の基質認識タンパクであるSkp2ホモノックアウトマウスは、尿管結紮による腎不全モデル(UUOマウス)を作成すると腎障害レベルがヘテロまたはホモ野生型と比較して著明に軽減されていることを見出していた。このような表現系の発現に、Skp2によるp27分解の抑制、さらにGPR48発現量の上昇が関与している可能性を考え、GPR48トランスジェニックマウスでUUOを作成して組織学的に解析した。その結果、腎障害の程度はコントロールUUOマウスと同等であり、Skp2ノックアウトマウスで見られた腎の特徴はGPR48を介してはいないと考えられた。これらのマウスを用いた結果から、GPR48はp27の下流因子の一つではあるものの、腎障害および発癌の過程においてGPR48がp27下流の主経路に関与している可能性は低いと思われた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：分子生物学

1. 研究開始当初の背景

■ p27と癌進行の関係

早期発見、外科的治療の進歩などから癌の治癒率は上昇している。しかし、予後不良の癌の治療は困難を極め、その克服は癌研究の最重要課題の一つである。これまでの臨床病理学的解析から、大腸癌、乳癌、肺癌、胃癌等広範囲の癌で予後不良はCDK阻害によって細胞周期を負に調節するp27のタンパク質低下(分解亢進)と強い相関性を示すことが我々を含む複数グループから報告されている。しかしp27の低下による癌の悪性形質増強のメカニズムは不明である。

我々はこのメカニズムの解明が予後不良の癌の診断治療法発展のための糸口に繋がると考えて研究を開始し、今までにいくつかの興味深い知見を得ている。まず p27 の発現低下によって遺伝子発現が変動する因子を同定するために、ヒト大腸癌細胞 HCT116 の p27 遺伝子の片側をソマティックノックアウトし、p27 発現低下モデル細胞 (p27-hKO) を作成した。この細胞をマイクロアレイ解析したところ、p27 の発現低下で発現が上昇する因子の一つとして、リガンド不明の GPCR に属する GPR48 が見出された (Gao et al. *Cancer Res.* 2006)。GPR48 と p27 の逆相関性はアレイ解析に用いた HCT116 細胞のみならず、p27 ノックアウトマウス由来の MEF を用いた場合でも確認された。

■ GPR48 の持つ機能

我々はさらに、GPR48 が癌悪性化にどのような関与をしているのか推察できる、いくつかの解析結果を得た。まず GPR48 の細胞浸潤能への影響を、癌細胞株を材料として強制発現およびノックダウン形質転換細胞を作製して比較検討した。マトリジェルコートチャンバーを用いた *in vitro* 評価系では、浸潤能は GPR48 導入により亢進し (図 2) ノックダウンでは抑制され、GPR48 存在量と浸潤能は正相関する事がわかった。さらに *in vivo* 評価系としてヌードマウスへの癌細胞移植実験を行い、移植癌細胞の浸潤・転移能についても *in vitro*

と

も膜に移行しないことが多く、候補薬品の下流シグナルへの阻害効果も GPCR 膜外領域への結合の有無も評価できない。この点において我々は重要なツールを3点取得して本研究課題を開始した。

リガンド非存在下で同様の結果が得られた。またヒト大腸癌検体において GPR48 の発現を解析したところ、リンパ節転移と GPR48 の発現亢進が有意に相関した。以上より GPR48 は p27 の発現低下により誘導される新たな浸潤転移促進遺伝子であることが強く示唆された。

2. 研究の目的

・ シグナル伝達経路が不明なことは GPCR をターゲットとした研究を困難にする場合が多い。GPCR は膜蛋白であるが、一般にはリガンドの存在によってその構造が大きく変化して活性型となり、細胞内局在が変化して膜に移行する性質を持つ。そのためリガンドが不明な GPCR は細胞内に強制発現させてもシグナル活性を評価できる GPR48 発現ベクター

・ 恒常的活性型の性質を持つ GPR48 変異体

・ 抗 GPR48 中和抗体

リガンドは未同定のまま、シグナルを強化された状態のレセプター GPR48 が評価対象とされる。また、N 末端の膜外領域の部分ペプチド配列に対するポリクローナル抗体を作成したところ、シグナル伝達を阻害する効果を持っていた。

本研究では今までに得られた成果を基盤として I. GPR48 の癌悪性化への関与をさらに検討するとともに、II. GPR48 の機能解析および III. GPR48 を分子標的とした診断治療薬開発を行うことを目標とした。

3. 研究の方法

◆ 細胞浸潤能変化の解析

マトリジェルチャンバーを用いた invasion assay により GPR48 発現量に正相関した浸潤能の亢進が細胞レベルで認められていたため、そのメカニズムを探るため、細胞運動能の変化を scratch assay で調べた。

◆ GPR48 発現亢進による発癌性への寄与
GPR48 遺伝子を導入した培養細胞で colony

formation assay と focus assay で GPR48 発現亢進による発がん性への寄与を評価した。

◆ GPR48 トランスジェニックマウスの解析
恒常性強発現プロモーターを持つ発現ベクターを構築し、全身発現型トランスジェニックマウスを作成し、通常飼育下で見られる表現系の異常の有無を調べた。トランスジェニックマウスはさらに UUO モデル作成に使用し、腎障害レベルを評価した。

4. 研究成果

◆ 細胞浸潤能変化の解析

様々なGPR48発現量の恒常発現株を用いて scratch assayを行ったが、GPR48発現量と運動能との相関性は見出せなかった。

◆ GPR48発現亢進による発癌性への寄与
colony formation assayとfocus assayいずれにおいても、GPR48発現亢進による発癌促進効果は認められなかった。

◆ GPR48 トランスジェニックマウスの解析
全身性発現型トランスジェニックマウスの作成に成功し、外来性GPR48発現臓器の異なる3ラインを得た。ノックアウトマウスでは発育遅延が見られる事が他の研究グループから報告されているが、我々の作成したマウスの体重変化は対照群とほぼ同様で、外観上は癌を含めた疾患の発症は全く確認されなかった。各臓器の標本をHE染色で観察したが、特に異常が発生した臓器はなかった。また尿および血液を用いた生化学的検査ではLDHの上昇が示唆されたが、例数を増やした検証で有意差はつかなかった。我々はこれまでの他の研究プロジェクトにより、p27のユビキチンプロテアソームシステムによる分解の基質認識タンパクであるSkp2ホモノックアウトマウスは、尿管結紮による腎不全モデル(UUOマウス)を作成すると腎障害レベルがヘテロまたはホモ野生型と比較して著明に軽減されていることを見出していた。このような表現系の発現に、Skp2によるp27分解の抑制、さらにGPR48発現量の上昇が関与している可能性を考え、GPR4トランスジェニックマウスでUUOを作成して組織学的に解析した。その結果、腎障害の程度はコントロールUUOマウスと同等であり、Skp2ノックアウトマウスで見られた腎の特徴はGPR48を介してはいないと考えられた。

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 19 件)

- 1 Matsumoto, A., Kawamoto, T., Mutoh, F., Isse, T., Oyama, T., Kitagawa, K., Nakayama, K.-i. and Ichiba, M.: Effects of 5-week ethanol feeding on the liver of aldehyde dehydrogenase 2

knockout mice. *Pharmacogenet Genomics* **18(10)**: 847-52, 2008

- 2 Kunugita, N., Isse, T., Oyama, T., Kitagawa, K., Ogawa, M., Yamaguchi, T., Kinaga, T and Kawamoto, T.: Increased frequencies of micronucleated reticulocytes and T-cell receptor mutation in Aldh2 knockout mice exposed to acetaldehyde. *J. Toxicol. Sci.* **33(1)**: 31-6, 2008
- 3 Yamamoto, M., Kikuchi, H., Ohta, M., Kawabata, T., Hiramatsu, Y., Kondo, K., Baba, M, Kamiya, K., Tanaka, T., Kitagawa M. and Konno H. TSU68 prevents liver metastasis of colon cancer xenografts by modulating the pre-metastatic niche. *Cancer Res.* **68**: 9754-9762, 2008.
- 4 Ohashi, N., Yamamoto, T., Huang, Y., Misaki, T., Fukasawa, H., Suzuki, H., Togawa, A., Suzuki, S., Fujigaki, Y., Nakagawa, T., Nakamura, Y., Suzuki, F., Kitagawa, M., Hishida, A., Intrarenal RAS activity and urinary angiotensinogen excretion in anti-thymocyte serum nephritis rats. *Am J. Physiol Renal Physiol.* **295**: F1512-1518, 2008.
- 5 Hayakawa, M., Matsushima, M., Hagiwara, H., Oshima, T., Fujino, T., Ando, K., Kikugawa, K., Tanaka, H., Miyazawa, K. and Kitagawa, M. Novel insights into FGD3, a putative GEF for Cdc42, that undergoes SCF^{FWD1/b-TrCP}-mediated proteasomal degradation analogous to that of its homologue FGD1 but regulates cell morphology and motility differently from FGD1. *Genes to Cells* **13**: 329-442, 2008.
- 6 Abe, K., Hattori, T., Isobe, T., Kitagawa, K., Oda, T., Uchida, C. and Kitagawa, M.: Pirh2 interacts with and ubiquitylates signal recognition particle receptor beta subunit. *Biomed Res.* **29**:53-60, 2008.
- 7 Kurata, K., Yanagisawa, R., Ohira, M. Kitagawa, M., Nakagawara, A.,

- Kamijo, T.; Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa upregulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells. *Oncogene* **27**: 741-754, 2008.
- 8 Fukasawa, H., Yamamoto, T., Kitagawa, M. and Hishida, A.: Regulation of TGF-beta signaling by Smads and its roles in tissue fibrosis. *Current signal transduction therapy* (review article) **3**: 1-6, 2008.
 - 9 Wang, R.S., Ohtani, K., Suda, M., Kitagawa, K., Nakayama, K.-i., Kawamoto, T. and Nakajima, T.: Reproductive Toxicity of Ethylene Glycol Monoethyl Ether in Aldh2 Knockout Mice. *Industrial Health* **45(4)**: 574-578, 2007
 - 10 Matsuda, T., Matsumoto, A., Uchida, M., Kanaly, R., Misaki, K., Shibutani, S., Kawamoto, T., Kitagawa, K., Nakayama, K.-i., Tomokuni, K. and Ichiba, M.: Increased formation of hepatic N2-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase 2 knockout mice treated with ethanol. *Carcinogenesis* **28(11)**: 2363-2366, 2007
 - 11 Hattori, T., Isobe, T., Abe, K., Kikuchi, H., Kitagawa, K., Oda, T., Uchida, C. and Kitagawa, M.: Pirh2 Promotes Ubiquitin-Dependent Degradation of the CDK Inhibitor p27Kipl. *Cancer Research* **67**:10789-10795, 2007.
 - 12 Ohoka, N., Hattori, T., Kitagawa, M., Onozaki, K. and Hayashi H.: Critical and functional regulation of CHOP (C/EBP homologous protein) through the N-terminal portion. *J Biol Chem*. **282**: 35687-35694, 2007.
 - 13 Arakawa, T., Yamamura, T., Hattori, T., Hayashi H., Mori, A., Yoshida, A., Uchida, C., Kitagawa, M. and Onozaki, K.: Contribution of Extracellular Signal-Regulated Kinases to the IL-1-induced Growth Inhibition of Human Melanoma Cells A375. *International Immunopharmacology* **8**: 80-89, 2007.
 - 14 Kono, S., Suzuki, H., Oda, T., Takahashi, Y., Shirakawa, K., Takahashi, Y., Kitagawa, M. and Miyajima, H.: Cys-881 is essential for the trafficking and secretion of truncated mutant ceruloplasmin in aceruloplasminemia. *J. Hepatology* **47**:844-850, 2007.
 - 15 Kikuchi, H., Yamamoto, M., Hiramatsu, Y., Baba, M., Ohta, M., Kamiya, K., Tanaka, T., Suzuki, S., Sugimura, H., Kitagawa, M., Kanai, T., Kitayama, Y., Kanda, T., Nishikura, K. and Konno, H.: Effect of loss of heterozygosity of the c-kit gene on prognosis after hepatectomy for metastatic liver gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Sci.* **98**: 1734-1739, 2007.
 - 16 Kikuchi, H., Uchida, C., Hattori, T., Isobe, T., Hiramatsu, Y., Kitagawa, K., Oda, T., Konno, H. and Kitagawa, M.: ARA54 is involved in transcriptional regulation of the *cyclin D1* gene in human cancer cells. *Carcinogenesis* **28**:1752-1758, 2007.
 - 17 Suzuki, S., Fukasawa, H., Kitagawa, K., Uchida, C., Hattori, T., Isobe, T., Oda, T., Misaki, T., Ohashi, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Hishida, A., Yamamoto, T. and Kitagawa, M.: Renal damage in obstructive nephropathy is decreased in Skp2-deficient mice. *Am. J. Pathol.* **171**:473-483, 2007.
 - 18 Inoue, Y., Kitagawa, M. and Taya, Y.: Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage. *EMBO J.* **26**:2083-2093, 2007.
 - 19 Li, S., Gao, Y., Tokuyama, T., Yamamoto, J., Yokota, N., Yamamoto, S., Terakawa, S., Kitagawa, M. and Namba, H.: Genetically engineered neural stem cells migrate and suppress glioma cell growth at distant intracranial sites. *Cancer*

Letters, 251(2): 220-227, 2007.

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：50294971

〔学会発表〕(計 5 件)

1 北川雅敏 癌関連核内因子のユビキチン依存的制御機構、Nuclear Signaling JAPAN 2007 シンポジウム、2007年 7月13日、東京

2 Kitagawa, M. et al. Novel regulatory mechanisms of Cyclin D1 expression、第66回日本癌学会学術総会、2007年10月5日、横浜

3 北川雅敏 細胞周期制御分子 p27 のユビキチン依存的分解機構と病態、第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会合同大会、2007年12月12日、横浜

4 小田敏明 服部隆行 磯部智康、北川恭子 内田千晴 横田貞記 北川雅敏、タンパク質過剰発現誘導性小胞体の構造と機能、第31回日本分子生物学会、第81回日本生化学会 合同大会、2008年12月9日神戸

5 磯部智康 島田真衣 劉寧 北川恭子 鈴木小由里 小田敏明 服部隆行 内田千晴 北川雅敏、GPR48 による癌転移機構の解析、第31回日本分子生物学会、第81回日本生化学会 合同大会、2008年12月10日神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 恭子 (KITAGAWA KYOKO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：20299605

(2) 研究分担者

北川 雅敏 (KITAGAWA MASATOSHI)

(平成19年度)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：50294971

(3) 連携研究者

北川 雅敏 (KITAGAWA MASATOSHI)

(平成20年度)