

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590305

研究課題名（和文）プロトン感知性 G タンパク質共役型受容体 TDAG8 による生体制御

研究課題名（英文）Biological role of the proton-sensing G-protein coupled receptor TDAG8

研究代表者

石井 聡 (SATOSHI ISHII)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10300815

研究成果の概要（和文）：

本研究では、細胞外 pH 感知性受容体である TDAG8 を安定発現させた Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞をマウスに投与したところ、TDAG8 が肺での腫瘍形成を促進することを見いだした。酸性培養条件下における LLC 細胞の増殖は、TDAG8 を過剰発現させることにより PKA 及び ERK 依存的に亢進した。TDAG8 はヒトの細胞株や腫瘍組織で発現の亢進が認められることから、今回観察した現象は、腫瘍内で酸化化した細胞外 pH によって活性化された TDAG8 が細胞の生存や増殖を促し、この現象が腫瘍形成の進展につながることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

T cell death-associated gene 8 (TDAG8) is an extracellular pH-sensing G protein-coupled receptor. In this study, we show that TDAG8-overexpressing mouse Lewis lung carcinoma (LLC) cells enhance tumor development in animal models. The exogenously expressed TDAG8 rendered LLC cells resistant to acidic culture conditions by PKA and ERK *in vitro*. Provided that TDAG8 is overexpressed in various tumors and tumor cell lines, our data suggest that TDAG8 enhances tumorigenesis by linking tumor-induced acidity to tumor cell survival/proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：LLC 細胞、プロトンセンサー、癌

## 1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は多彩なリガンドを持つことが知られているが、2003 年に互いにアミノ酸配列の相同性が高い二つのオーファン GPCR である OGR1 と GPR4 が、細胞外 pH すなわち細胞外のプロトンを感じて活性化することを示す論文が報告

された。これに続いて、同じファミリーに属するオーファン GPCR であった G2A と TDAG8 (T cell death-associated gene 8, 別名 GPR65) が、OGR1 や GPR4 と同様に細胞外 pH センサーであることを、私たちを含めた研究グループが明らかにした。特に私たちは、TDAG8 が細胞外 pH の低下に応じて cAMP を産

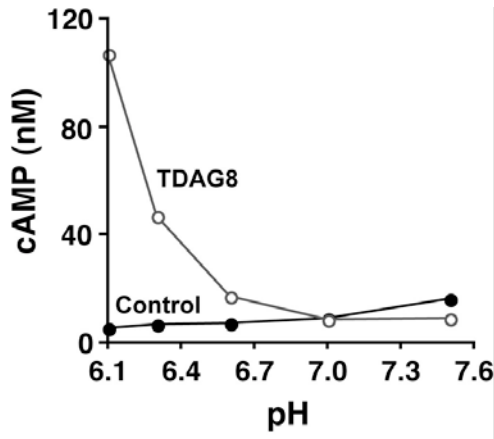


図1 細胞外 pH に依存した TDAG8 による cAMP の産生

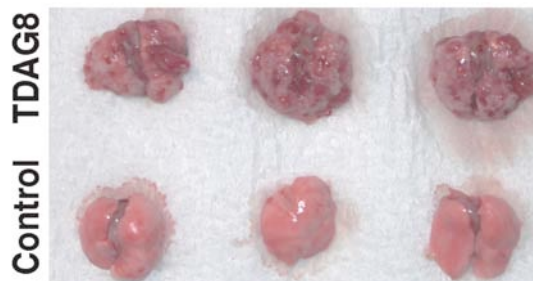


図2 TDAG8 を介した腫瘍の進展

生することと Rho の活性化を介してストレスファイバーを形成することを報告した。

TDAG8 はその名の通り T 細胞のアポトーシスの際に発現が上昇する機能不明の遺伝子として発見された。TDAG8 の mRNA はヒトでは脾臓、胸腺、血球細胞などに発現が高いが、ノックアウトマウスの解析では免疫学的な異常は観察されていない。TDAG8 mRNA は免疫組織・細胞以外にも癌細胞において高い発現が報告されている。また、遺伝子チップを用いた遺伝子発現プロファイルのデータベースである GNF SymAtlas (<http://biogps.gnf.org>) によると、肺癌やメラノーマなどの一部の非血液系腫瘍細胞においても TDAG8 の mRNA は高発現している。さらに NCBI GEO Profile では腎癌や神経膠芽種において TDAG8 mRNA の発現が上昇していることを示しており、TDAG8 の発現上昇が腫瘍の進展に関わっている可能性が示唆される。加えて TDAG8 に限らず多くの腫瘍組織で様々な GPCR が過剰発現し (トロンビンの受容体である PAR1 やエンドセリン受容体、LPA 受容体など)、腫瘍の増悪化に関わるという報告も少なくない。

## 2. 研究の目的

悪性腫瘍内部が酸性であることは昔からよく知られている。癌細胞の増殖はしばしば血管から離れた栄養・酸素不足の部位でも進行することで低酸素状態となり、さらなる増殖により ATP の消費、解糖系の活性化すなわち乳酸の蓄積によって細胞内が酸性となる。細胞は細胞死を防ぐためにプロトンや乳酸などを細胞外に汲み出すことにより周辺環境の pH が酸性に傾くのである。このように腫瘍形成により引き起こされた酸性状態で TDAG8 シグナル経路が活性化され、これが腫瘍の進展に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。よって、本研究ではまずマウスへの癌細胞の移植実験により TDAG8 と腫瘍増殖の関連を *in vivo* で調べることにした。

## 3. 研究の方法

マウスを使った腫瘍増殖実験に適している細胞として、本研究では C57BL/6 マウス由来の肺癌細胞である LLC 細胞を用いて TDAG8 の安定発現細胞を樹立することにした。この細胞は、4 種類の細胞外 pH 感知性 GPCR のうち OGR1 mRNA を内在性に発現する一方、他の 3 つの mRNA をほとんど発現していなかった (データ略)。

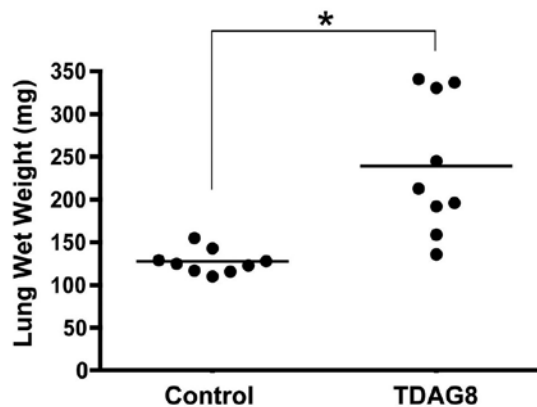


図3 LLC 細胞投与後の肺湿重量への TDAG8 の影響

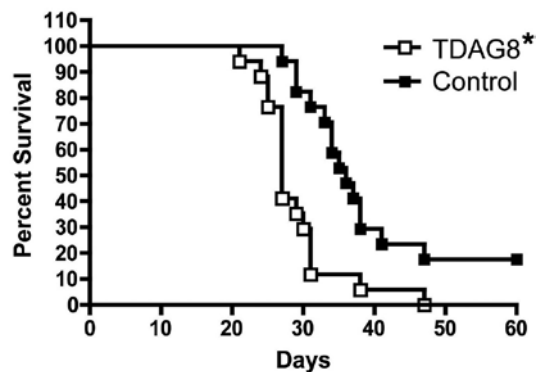


図4 LLC 細胞投与後のマウス生存期間に対する TDAG8 の影響

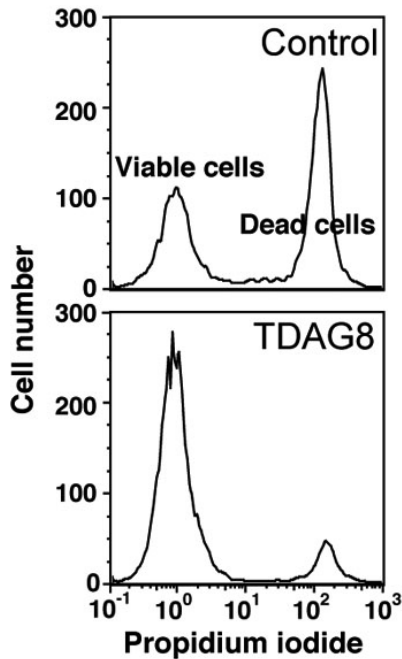


図5 酸性の培養条件下における LLC 細胞の生存に対して TDAG8 が及ぼす効果

N 末端（細胞外領域に相当）に HA エピトープタグが挿入された TDAG8 または変異 TDAG8 をコードする遺伝子を LLC 細胞へ導入し、G418 による薬剤スクリーニングを行った。続いて、得られた薬剤耐性細胞群を抗 HA 抗体で染色し、セルソーターを用いて、同程度に各受容体を高発現するポリクローナル細胞群を回収した。またネガティブコントロールとして発現ベクター（pCXN2.1）のみを導入した細胞群（以下、コントロール細胞と呼ぶ）も同時に作製した。

#### 4. 研究成果

以前に CHO-S 細胞に発現させた TDAG8 の解析で報告したのと同様に、TDAG8 発現 LLC 細胞は pH 依存的に cAMP の産生を増大させた（図 1）。一方、コントロール細胞は酸性刺激への反応を示さなかった。以上の結果から LLC 細胞内で TDAG8 が細胞外感知性 GPCR として機能していると判断し、TDAG8 と腫瘍増殖の関連を *in vivo* で調べることにした。

まず LLC 細胞を C57BL/6 マウスに尾静脈注入し、19 日後に肺組織を観察した。コントロール細胞と比較して TDAG8 安定発現細胞を注入したマウスでは肺における腫瘍形成が著しく促進していた（図 2）。更に肺組織のパラフィン切片の HE 染色により、TDAG8 安定発現細胞を注入したマウスにおいて肺内部の腫瘍の形成も促進していることが分かった（データ略）。また体重には差はなかったものの、肺の湿重量（図 3）及び乾燥重量（データ略）には有意な差が見られた。この実験に加えて、

同条件で LLC 細胞を投与したマウスの致死率について時間経過を追う実験も行い、TDAG8 安定発現細胞を投与したマウスの方が有意に生存期間は短いという結果が得られた（図 4）。さらに TDAG8 の腫瘍増殖亢進へのより幅広い関与を検討するために皮下注射実験を行った。コントロール細胞と比較して TDAG8 安定発現細胞を注入したマウスでは腫瘍形成が有意に促進された（データ略）。

TDAG8 は細胞外 pH 感知性受容体である。従って腫瘍の形成に伴う周辺環境の酸性化が TDAG8 を活性化し、発現細胞に何らかの影響を与えていると考えられる。そこで LLC 細胞の腫瘍形成促進のメカニズムを以下の *in vitro* 実験で解析することにした。酸性条件下での細胞の生存能を評価するため、細胞を pH 6.4 の培地で 48 時間培養してヨウ化プロピジウムで染色し生存細胞の割合を計測した。その結果、TDAG8 安定発現 LLC 細胞はコントロール細胞よりも有意に細胞の生存率が高いことが明らかとなった（図 5）。次に酸性条件下での細胞の増殖能を MTT アッセイで評価した

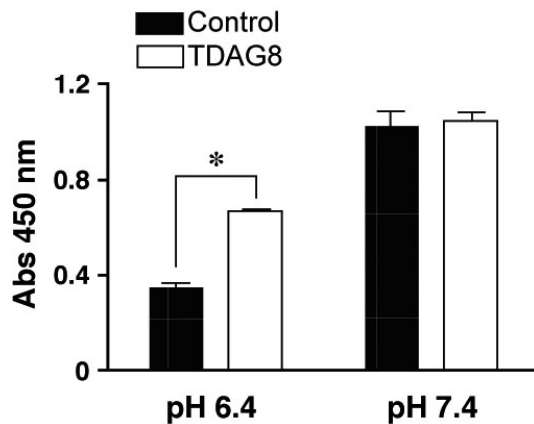


図6 酸性の培養条件下における LLC 細胞の増殖に対して TDAG8 が及ぼす効果

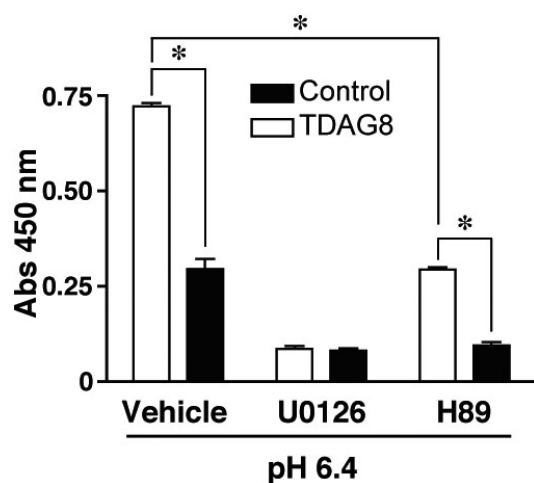


図7 TDAG8 が賦与する細胞増殖促進に対して MEK1/2 阻害剤と PKA 阻害剤が及ぼす効果

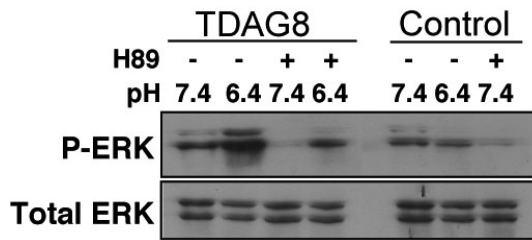


図8 TDAG8 を介した酸刺激による ERK のリン酸化と H-89 の効果

ところ、中性条件 (pH 7.4) に比べ酸性条件下では増殖は抑制されるものの、TDAG8 安定発現 LLC 細胞はコントロール細胞よりも増殖能が高かった (図 6)。一方で中性条件における増殖には差は見られなかった。次に ERK と呼ばれる MAP キナーゼをリン酸化する MEK1/2 の阻害剤である U0126 (10 μM) で細胞を処理したところ、酸性条件下における TDAG8 安定発現細胞の増殖能が大きく減少した (図 7)。

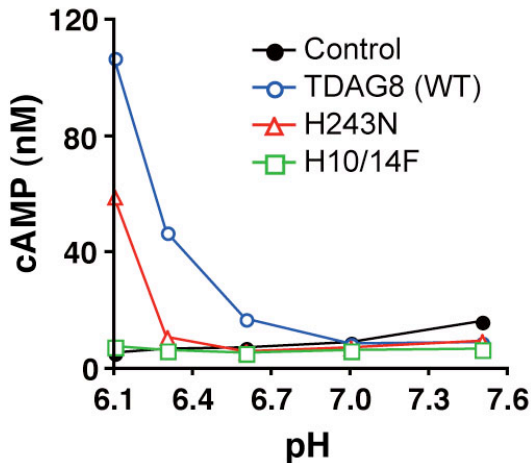


図9 TDAG8 変異体を発現した LLC 細胞の酸性に対する反応性

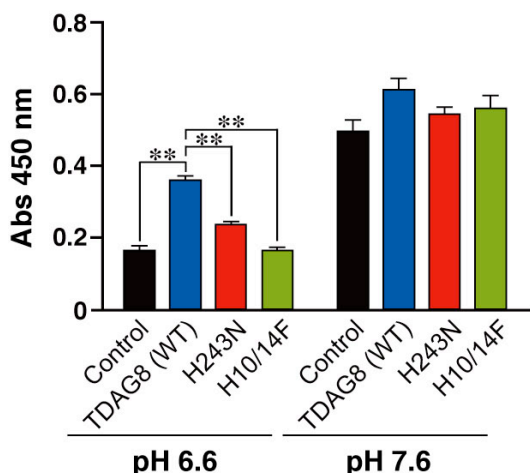


図10 TDAG8 変異体を発現した LLC 細胞の酸性の培養条件下における増殖

また、cAMP によって活性化されるキナーゼ PKA の阻害剤 H-89 (10 μM) で処理しても、細胞増殖能は抑制された。続いて、実際に ERK が TDAG8 の下流で機能しているかどうかをタンパク質レベルで確認するために、リン酸化 ERK のレベルをウエスタンブロット法により観察した。中性条件と比較したとき、コントロール細胞では酸性条件でリン酸化 ERK の減少が見られたが、TDAG8 安定発現細胞ではリン酸化が亢進した (図 8)。また、H-89 (10 μM) を培地に添加することにより、このリン酸化 ERK レベルは劇的に減少した。以上の結果から TDAG8 の過剰発現は酸性条件における LLC 細胞の生存・増殖を促進すること、そのシグナル経路として PKA と ERK の活性化が関与することが示唆された。

pH 感知機能を著しく減弱する変異 TDAG8 を LLC 細胞に安定発現させ、その細胞の性質を野生型 TDAG8 発現細胞のものと比較した。TDAG8 変異体は 1 つまたは 2 つのヒスチジンを変異させて得られたものであり (H10/14F と H243N)、これら 2 種類の変異体における pH 感知機能の減弱は LLC 細胞に発現させた状態で cAMP 産生試験によって確認した (図 9)。実験の結果、変異 TDAG8 を発現する LLC 細胞は *in vitro* で低 pH 培養条件下での増殖能力が低下することが明らかとなった (図 10)。*in vivo* では肺での腫瘍形成能が大きく減弱するとともに (19 日後: 図 11)、マウスの生存期間が延長することが示された (図 12)。これらの結果から今回観測された現象は、TDAG8 を過剰発現させたことによる酸性刺激非依存的なものではなく、TDAG8 の細胞外 pH 感知機能を介した酸性刺激依存的な活性化に起因することを強く支持していると考えられる。

本研究の結果をまとめると、酸性状態において活性化される TDAG8 が、細胞増殖亢進と密接に関連して腫瘍形成の進展に深く関わることを強く示唆している。また、腫瘍内では細胞から放出された乳酸などの産生代謝産物によって細胞外 pH が酸性に傾いている可能性も併せて示唆された。TDAG8 が細胞外 pH センサーとして増殖に重要な役割を果たしている腫瘍細胞の場合、TDAG8 を標的とするアンタゴニストや抗体が病態の進行を食い止めることができるかもしれない。

##### 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 13 件)

- ① Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, Abe M, Yanagida K, Hamano F, Sato S, Tamaki K, Morishita Y, Kano MR., Iwata C, Miyazono K, Sakimura K, Shimizu T, and \*Ishii S: (2010)

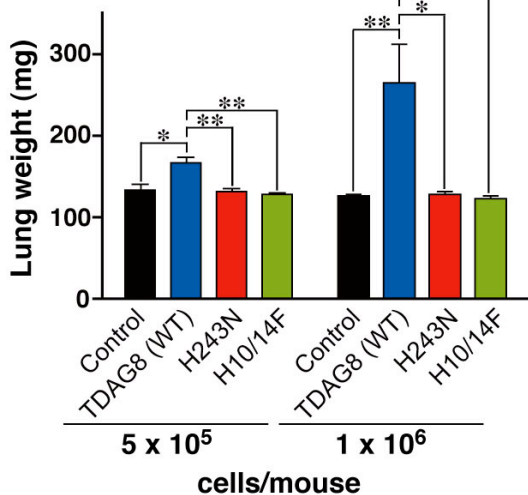


図 11 TDAG8 変異体を発現した LLC 細胞を投与されたマウスの肺湿重量

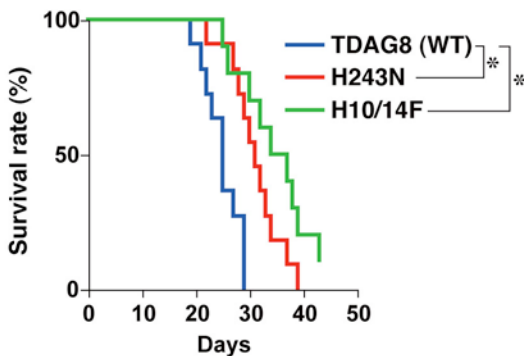


図 12 TDAG8 変異体を発現した LLC 細胞を投与されたマウスの生存曲線

LPA<sub>4</sub> regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis.

**Blood** 116, 5060-5070. (\*Correspondence) 査読有

- ② Ihara Y, Kihara Y, Hamano F, Yanagida K, Morishita Y, Kunita A, Yamori T, Fukayama M, Aburatani H, Shimizu T, and **Ishii S**: (2010) The G protein-coupled receptor TDAG8 facilitates tumor development by serving as an extracellular pH sensor. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107, 17309-17314. (Direct submission) (\*Correspondence) 査読有
- ③ Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, Yamaguchi M, Namiki S, Nakayama R, Tabata M, Ogata H, Kubota N, Takamoto I, Hayashi YK, Yamauchi N, Waki H, Fukayama M, Nishino I, Tokuyama K, Ueki K, Oike Y, **Ishii S**, Hirose

K, Shimizu T, Touhara K, and Kadowaki T: (2010) Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca<sup>2+</sup> and AMPK/SIRT1. **Nature** 464, 1313-1319. 査読有

- ④ Hasegawa S, Kohro Y, Shiratori M, **Ishii S**, Shimizu T, Tsuda M, and Inoue K: (2010) Role of PAF receptor in proinflammatory cytokine expression in the dorsal root ganglion and tactile allodynia in a rodent model of neuropathic pain. **PLoS One** 5, e10467. 査読有
- ⑤ Kihara Y, Yokomizo T, Kunita A, Morishita Y, Fukayama M, **Ishii S**, and Shimizu T: (2010) The leukotriene B(4) receptor, BLT1, is required for the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 394, 673-678. 査読有
- ⑥ Kihara Y, Matsushita T, Kita Y, Uematsu S, Akira S, Kira J-i, **Ishii S** and Shimizu T: (2009) Targeted lipidomics reveals mPGES-1-PGE2 as a therapeutic target for multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 106, 21807-21812. (Direct submission) (\*Correspondence) 査読有
- ⑦ Hikiji H, **Ishii S**, Yokomizo T, Takato T and Shimizu T: (2009) A distinctive role of the leukotriene B4 receptor BLT1 in osteoclastic activity during bone loss. **Proc Natl Acad Sci U S A** 106, 21294-21299. (Direct submission) (\*Correspondence) 査読有
- ⑧ **Ishii S**, Noguchi K and Yanagida K: (2009) Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors. **Prostaglandins Other Lipid Mediat** 89, 57-65. (Invited Review) (\*Correspondence) 査読有
- ⑨ Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, Kihara Y, Hamano F, Tajima Y, Taguchi R, Shimizu T and **Ishii S**: (2009) Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. **J Biol Chem** 284, 17731-17741. (\*Correspondence) 査読有
- ⑩ Mogi C, Tobo M, Tomura H, Murata N, He XD, Sato K, Kimura T, Ishizuka T, Sasaki T, Sato T, Kihara Y, **Ishii S**, Harada A and Okajima F: (2009) Involvement of

proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of proinflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. *J Immunol* 182, 3243-3251. 査読有

- ⑪ Welch EJ, Naikawadi RP, Li Z, Lin, P, **Ishii S**, Shimizu T, Tiruppathi C, Du X, Subbaiah PV, and Ye RD: (2009) Opposing effects of platelet-activating factor and lyso-platelet activating factor on neutrophil and platelet activation. *Mol Pharmacol* 75, 227-234. 査読有
- ⑫ Moos MPW, Mewburn JD, Kan FWK., **Ishii S**, Abe M, Sakimura K, Noguchi K, Shimizu T, and Funk CD: (2008) Cysteinyl leukotriene 2 receptor-mediated vascular permeability via transendothelial vesicle transport. *FASEB J* 22, 4352-4362. 査読有
- ⑬ Jiang W, Hall SR, Moos MPW, Cao RY, **Ishii S**, Ogunyankin KO, Melo LG, and Funk CD: (2008) Endothelial cysteinyl leukotriene 2 receptor (CysLT2R) expression mediates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 172, 592-602. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 真砂佳代、柳田圭介、浜野文三江、清水孝雄、\*石井聡 ヒト貧毛症の原因となる p2y5/LPA<sub>6</sub> 変異体の機能解析 第52回日本脂質生化学会シンポジウム 群馬・伊香保 2010年6月 (\*発表者)
- ② 石井聡、浜野文三江、柳田圭介、清水孝雄 新規リゾリン脂質受容体の探索 第82回日本生化学会大会シンポジウム 神戸 2009年10月
- ③ 石井聡、木原泰行、北芳博、清水孝雄 脂質メディエーターによる実験的アレルギー性脳脊髄炎の調節 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム 岐阜 2009年6月
- ④ **Ishii S**, Yanagida K, Sumida H, and Shimizu T: Biological roles of Non-Edg family LPA receptors. FASEB Summer Research Conferences; Lysophospholipids and related lipids in biology and diseases, Carefree (Arizona), June 2009.
- ⑤ **Ishii S**, Yanagida K, Sumida H, and

Shimizu T: Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors. 4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, Tokyo (Japan), May 2009.

- ⑥ 石井聡、柳田圭介、住田隼一、野口響子、木原泰行、浜野文三江、清水孝雄、阿部学、崎村建司 非EDG型リゾホスファチジン酸受容体の生体機能 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会シンポジウム 神戸 2008年12月

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: オートタキシン測定によるステロイド服用効果の検査方法

発明者: 石井聡, 住田隼一, 矢富裕, 中村和宏, 佐藤伸一, 門野岳史, 五十嵐浩二

権利者: 国立大学法人東京大学, 東ソー株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2010-136250

出願年月日: 2010/06/15

国内外の別: 国内

[その他]

・プレスリリース

東京大学 (2010年9月24日)

[http://www.u-tokyo.ac.jp/public/pdf/220924\\_01.pdf](http://www.u-tokyo.ac.jp/public/pdf/220924_01.pdf)

・新聞記事掲載

日経産業新聞 11 ページ (2010年9月28日)

朝日新聞 朝刊 21 ページ (2010年10月26日)

・講座ホームページ

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~bougyo/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 聡 (SATOSHI ISHII)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 10300815