

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18118

研究課題名（和文）腫瘍細胞表面バイオマーカーGPR87を標的とした新規治療の開発

研究課題名（英文）Development of a therapeutic strategy for urologic cancers targeting Protein-Coupled Receptor 87

研究代表者

土肥 洋一郎 (Yoichiro, Tohi)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60867290

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝子導入を目的としてアデノ随伴ウイルスベクター（AAVベクター）に着目した。既に膀胱癌細胞株においてAd-sh GPR87ベクターにより証明した有効なsiRNA配列のshRNApAAV-CMV Vectorにクローニング、トランスフェクション後培養させ、shRNA発現アデノ随伴ウイルスベクター（AA-shsiGPR87）を作製した。しかし、in vitroでこのAAVの膀胱癌細胞株RT112への導入効率が20%程度と十分ではなかった。よりよい導入効率を目指しexosomeに着目し、AAV-containing exosomeを精製を行い、通常のAAVと比較して導入効率の増加を証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍細胞表面バイオマーカーであるGPR87を標的とする治療戦略の構築は、泌尿器癌の治療において新たなアプローチとなる可能性がある。GPR87の発現は多くの悪性腫瘍にみられるため、泌尿器科領域以外の癌にも応用可能性があり、より効果的かつ個別化された治療が実現できる可能性がある。ただし、遺伝子導入効率の点ではAAVでは不十分であることが明らかになった。よりよい導入効率を目指しexosomeに着目し、AAV-containing exosomeを精製を行い、通常のAAVと比較して導入効率の増加を証明した点は遺伝子導入や薬物デリバリーの分野での新たなアプローチの開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The GPR87 (G protein-coupled receptor 87) is a receptor located on the cell surface and is involved in cell proliferation. Our study aimed to develop a therapeutic strategy for urothelial cancer targeting the tumor cell surface biomarker GPR87. We focused on adeno-associated virus (AAV) vectors because they can deliver genes to have low immunogenicity, and are suitable for introduction into animal models. We cloned the effective siRNA sequence demonstrated by Ad-sh GPR87 vector in bladder cancer cell lines into shRNApAAV-CMV Vector, and after transfection and culturing, we created an adeno-associated virus vector expressing shRNA (AA-shsiGPR87). However, it was found that the efficiency of introducing this AAV into bladder cancer cell line RT112 in vitro was only around 20%. Therefore, we focused on exosomes to achieve better introduction efficiency. We purified AAV-containing exosomes and demonstrated an increase in introduction efficiency compared to conventional AAV.

研究分野：Urologic oncology

キーワード：GPR87

1. 研究開始当初の背景

泌尿器科領域の3大癌は、腎細胞癌、膀胱癌、前立腺癌である。その中でも膀胱癌は予後が悪い。筋層浸潤性膀胱癌は根治治療の膀胱全摘後で5年全生存率は約50%で、また有転移症例については一次化学療法後の全生存期間は1年と短い。さらに罹患率は過去15年間の推移では約1.4倍となっている。免疫療法を代表とする標的治療の進歩は急速に進み、以前は治療が困難であった膀胱癌の治療奏効率が高くなっている。しかし長期的な治療効果が得られるのは少数の患者で、予後も不良である。そのため、新たな治療標的の同定や新たな治療法の開発が求められる。

GPR87 (G protein-coupled receptor 87) はGPCR (Gタンパク質共役型受容体) の一つと推定される7回膜貫通型たんぱく質である¹⁾。その機能についてはほとんどわかってはいない。Guggerらは扁平上皮癌にGPR87が高発現していることを報告し²⁾、GlattらはGPR87が、肺癌(扁平上皮癌、腺癌)、頭頸部癌、子宮頸部扁平上皮癌などさまざまな癌種で発現していることを報告した³⁾。われわれもこれまでに経尿道的膀胱腫瘍切除術後に膀胱内再発する膀胱癌におけるGPR87遺伝子の過剰発現を明らかにした⁴⁾。つまりGPR87を標的とすることで膀胱癌の膀胱内再発を抑えられる可能性を示した。本研究では、われわれがこれまでに報告した再発性膀胱癌にはGPR87が高発現していることに着目し、「そのGPR87を標的とすることで抗腫瘍効果を発揮する」との仮説を基に開始される。さらに多くの悪性腫瘍に特異的に発現しているGPR87に着目し、GPR87を標的とした癌治療戦略は有効か、というのが本研究の背景である。

2. 研究の目的

GPR87については肺癌や子宮頸癌などさまざまな癌種において発現していることが明らかになっている。一方で、泌尿器科領域の癌種でGPR87の発現について報告しているのは本研究室のみである。我々は経尿道的膀胱腫瘍切除術後に膀胱内再発する膀胱癌におけるGPR87遺伝子の過剰発現していることを明らかにした。そしてGPR87が癌抑制遺伝子p53介して細胞増殖促進およびアポトーシス抑制により膀胱癌細胞の生存能を制御することを報告した。さらにGPR87発現したゼノグラフトモデルを用い、Ad-shGPR87ベクターの抗腫瘍効果を証明した(Figure 1)⁶⁾。これらを背景に、本研究の目的は膀胱癌に対するGPR87を標的とする治療戦略の構築を行うことであった。

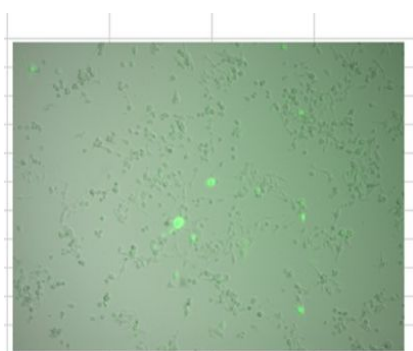
3. 研究の方法

既に膀胱癌細胞株においてAd-sh GPR87ベクターにより証明した有効なsiRNA配列のshRNAをpAAV-CMV Vector (AAVpro Helper Free System, 6230, Takara) にクローニングする。次に、目的遺伝子をクローニングしたpAAV-CMV Vectorとキットに含まれるpRC Vector、pHelper VectorをAAVpro 293T Cell Line (632273) にトランスフェクションして2~3日培養しウイルスのパッケージングを行う。トランスフェクション後に培養したAAVベクター産生細胞からウイルスを抽出・精製し、最終的に臨床応用可能な高力価shRNA発現アデノ随伴ウイルスベクター(AA-shsiGPR87)を作製する。膀胱癌細胞株におけるGPR87遺伝子の発現レベルを解析する。GPR87遺伝子高発現細胞株に対して、AA-shsiGPR87より特異的siRNAによりGPR87遺伝子発現を抑制し、細胞の増殖能への影響を解析する。

*AAV: Adeno-associated virus

4. 研究成果

2種類の血清型の AAV2 と AAV5 を用いて、ヒト膀胱癌細胞株 RT112 に対する遺伝子導入効率を調査した。



AAV2



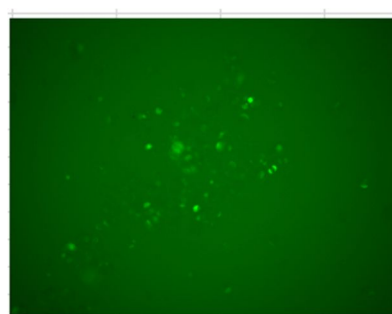
AAV5

蛍光顕微鏡にて、AAV2 あるいは AAV5 の RT112 に対する導入効率はそれぞれ 10%、15% と低率であった。感染条件の調節などを行うことで検証を繰り返したが、導入率の改善を認めなかった。

そこで遺伝子導入効率の向上を目指し、過去の報告から exosome-associated AAV に着目した⁷⁾。培地から分離された AAV の一部は exosome に含有される。従来の AAV の精製は技術的に困難な手順があり、その成功率を左右する。一方で、exosome-associated AAV の精製は従来の方法よりは簡便とされる。超遠心法により、AAV の培養液から exosome-associated AAV を行った。次に従来の AAV と exosome-associated AAV の導入効率の比較を行った。



AAV2 (conventional)



exosome-associated AAV2

蛍光顕微鏡にて、AAV2 の RT112 に対する導入効率は従来の AAV で 20%、exosome-associated AAV で 60%であった。

この結果から、exosome-associated AAV は従来の AAV と比較してのヒト膀胱癌細胞株 RT112 導入効率を増加させることが明らかになった

<引用文献>

1. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Biol.* 2002; Sep;3(9):639-650
2. Gugger M, White R, Song S et al. GPR87 is overexpressed g-protein coupled receptor in squamous cell carcinoma of the lung. *Disease markers.* 2008;24:41-50
3. Glatt S, Halbauer D, Heindl S et al. hGPR87 contributes to viability of human tumor cells. *Int. J. Cancer.* 2008;122,2008-2016
4. Okazoe H Zhang X, Liu D et al. Expression and role of GPR87 in urothelial carcinoma of the bladder. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14,12367-12379
5. Tabata K, Baba K, Shiraishi A et al. The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 2007, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.09.063.
6. Zhang X, Liu D, Hayashida Y et al. G protein-coupled receptor 87 (GPR87) promotes cell proliferation in human bladder cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16,24319-24331

7. Hudry E, Martin C, Gandhi S, et al. Exosome-associated AAV vector as a robust and convenient neuroscience tool. *Gene Ther.* 2016;23:380-92.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------