

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07109

研究課題名(和文) LPA受容体シグナルを介するがん細胞の抗がん剤・放射線感受性調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of chemo- and radio-resistance through LPA receptor-mediated signaling in cancer cells.

研究代表者

辻内 俊文(Tsujiuchi, Toshifumi)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号：10254492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク共役型受容体であるリゾフォスファチジン酸(LPA: lysophosphatidic acid)受容体(LPA1-LPA6)は、脂質メディエーターであるLPAと結合することで、多様な生物学的応答を誘発する。近年、LPA受容体の活性化が、がん細胞の増殖・進展を制御することが明らかとなってきている。本研究は、がん細胞の抗がん剤・放射線抵抗性におけるLPA受容体シグナルの関与を明らかにする目的で、がん細胞に抗がん剤処理・放射線照射を行い細胞機能の変化を解析した。本研究結果により、LPA受容体を介する細胞内シグナルががん細胞の抗がん剤・放射線抵抗性獲得を制御することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん薬物療法ならびに放射線治療は、外科的切除とともにがん治療における基本的なアプローチである。さらに広範囲な浸潤・転移をきたした進行症例に対して抗がん剤・放射線治療は限られた選択肢であり、がん細胞の抗がん剤・放射線抵抗性獲得機序の解明は、がん患者の予後改善と長期延命にむけた重要な研究課題である。本研究における、がん細胞の抗がん剤・放射線抵抗性にLPA受容体を介する細胞内シグナルの活性化が制御するという知見は、LPA受容体を標的分子とする効果的な薬物療法ならびに放射線治療法の開発への基礎的情報源となるとともに、今後さらなる詳細な解析を推進する価値を有するものでもある。

研究成果の概要(英文)：Lysophosphatidic acid (LPA) is a biological lipid mediator that consists of a fatty acid, glycerol and a phosphate. LPA exhibits a variety of cellular responses through binding to specific G protein-coupled LPA receptors. Six subtypes of LPA receptors (LPA1-LPA6) have been classified so far. LPA receptor-mediated signaling contributes to the promotion of tumor progression, including cell growth, invasion, metastasis and angiogenesis. This study aimed to investigate the roles of LPA receptors in the acquisition of chemo- and radio-resistance in cancer cells, using LPA receptor knockdown cells. We indicated that the individual LPA receptors positively or negatively regulate the cell viability to anticancer drugs and X-ray irradiation of cancer cells. These results suggest that LPA receptor-mediated signaling plays an important role in the regulation of chemo- and radio-resistance in cancer cells.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：LPA LPA受容体 抗がん剤抵抗性 放射線感受性 がん細胞

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脂質メディエーターのひとつであるリゾフォスファチジン酸 (LPA, lysophosphatidic acid) は、G タンパク質共役型 LPA 受容体と結合し、細胞増殖・分化・形態形成ならびにアポトーシスからの回避など多様な生物学的応答を誘発する。現在までに 6 種類の LPA 受容体 (LPA<sub>1</sub>-LPA<sub>6</sub>) が同定され、各受容体は細胞特異的に異なった細胞機能を制御する。LPA 受容体シグナルに関する研究は、当初は神経科学領域を中心に行われていたが、1990 年代に進行性卵巣がん患者の腹水中に高濃度の LPA が検出されたのを契機に、大腸がんや乳がん組織において LPA 受容体発現異常などが報告された。しかしながら、LPA 受容体シグナルが、がん細胞の発生や細胞機能にどのように関与するかという観点からの研究は行われていなかった。その後、我々の研究を中心に、LPA 受容体シグナルが発がんに関わることのみならず、膵・肺・大腸がん細胞やメラノーマ・骨肉腫細胞など、種々のがん細胞の増殖・運動・浸潤・転移・造腫瘍性ならびに血管新生などのがん増悪化に各 LPA 受容体が促進的または抑制的に作用することが次第に明らかとなっていった。さらに近年の研究により、抗がん剤処理によるがん細胞の生物学的特性の変化に LPA 受容体シグナルが密接に関わるという多くの知見が得られている。一方、がん細胞の抗がん剤・放射線抵抗性獲得における LPA 受容体を介する細胞内シグナルの分子機構は不明である。

### 2. 研究の目的

がん薬物療法ならびに放射線治療は外科的切除とあわせて基本的な臨床がん治療法である。近年、様々な分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬ががん薬物治療に導入され、多くのがん症例において一定の予後改善がみこまれるようになってきている。一方では、いまだ治療当初より抗がん剤・放射線抵抗性を示すものや、広範囲な浸潤や遠隔転移を呈した治療困難ながん症例も少なくはない。これら円滑ながん治療遂行に妨げとなるがん細胞の増悪化に対する有効な抗がん剤・放射線療法の確立は、がん患者の予後改善と長期延命をはかるうえで重要な研究課題である。本研究は、がん細胞の抗がん剤・放射線抵抗性獲得における LPA 受容体シグナルの生物学的機能を解明し、LPA 受容体を標的とする効果的ながん薬物・放射線療法開発への基礎的知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

細胞培養：各種がん細胞は、10%FBS 含有 DMEM 培地を用いて 37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養を行った。X 線照射は日立 X 線照射装置 MBR-1520R-3 を使用し、0~15Gy の線量にてがん細胞に照射した。また、長期抗がん剤処理細胞は、抗がん剤を低濃度から徐々に濃度を上げながら約 6 か月間処理することにより作成した。

LPA 受容体遺伝子発現：抗がん剤処理・放射線照射を行ったがん細胞より total RNA を抽出し逆転写反応にて鋳型 cDNA を合成した。LPA 受容体遺伝子発現レベルは real-time RT-PCR 法により解析した。内部コントロールには GAPDH を用いた。

細胞運動能：Cell Culture Insert (8.0μm pore size) の内面に細胞を播種し、5% charcoal stripped FBS 含有 DMEM を満たした 24 well プレートに設置して 37℃ で 16 時間培養した。細胞運動能は、Cell Culture Insert 外側底面に移動した細胞をギムザ染色し顕微鏡下でその細胞数を計測した。

細胞生存率：96well プレートに 3000 個/well の細胞を播種し、抗がん剤を連日 3 日間処理した後に Cell Counting Kit-8 (CCK-8) を用いて細胞生存率を計測した。また、放射線照射に対する細胞生存率は、放射線照射 3 日後に CCK-8 により計測した。

LPA 受容体ノックダウン細胞の作成：ノックダウン細胞の作成には、遺伝子導入試薬を用いて各 LPA 受容体 (LPA<sub>1</sub>-LPA<sub>6</sub>) に対する shRNA plasmid をがん細胞に導入し、puromycin 処理により selection を行った。

Gelatin zymography：がん細胞を無血清培地に 1 日間培養した上清を採取し、ゼラチン含有 10% SDS-PAGE により電気泳動した。その後ゲルを incubation buffer にて 37℃ で 16 時間反応させクマシー染色により MMP-2、MMP-9 活性を検索した。

免疫染色：X 線 (5Gy) 照射 1、3、6、24 および 48 時間後に、がん細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定した。1 次抗体として Anti-phospho-Histone H2AX (Ser139) を用い、2 次抗体反応後に蛍光標識を行った。細胞あたりの γ-H2AX の foci 数は ImageJ により計測した。

Western blot 解析：がん細胞から RIPA buffer を用いてタンパク質を抽出し、7%SDS-PAGE で電気泳動後、PVDF メンブレンにタンパク質を転写した。アポトーシスの検索には、一次抗体として PARP-1 を使用し二次抗体反応後に化学発光により目的のタンパク質を検出した。内部コントロールには Tubulin を用いた。

### 4. 研究成果

抗がん剤処理・放射線照射により発現レベルの変動がみられた LPA 受容体に着目し、各 LPA 受容体に対する agonist・antagonist 処理ならびに LPA 受容体ノックダウン細胞を用いて各種がん細胞の細胞生存率を中心に解析を行った。

がん細胞の抗がん剤抵抗性獲得における LPA 受容体シグナルの分子機構

シスプラチン(CDDP)処理に対する膵がん(PANC-1)細胞の細胞生存率は、GRI-977143(LPA<sub>2</sub> agonist)および(2S)-OMPT(LPA<sub>3</sub> agonist)処理により上昇し、AM966(LPA<sub>1</sub> antagonist)処理により低下した。骨肉腫(MG-63)細胞のCDDP処理に対する細胞生存率は、LPA<sub>2</sub>ノックダウン細胞において有意に低下するもののLPA<sub>3</sub>ノックダウン細胞において上昇が見られた。また、フルオロウラシル(5-FU)処理大腸がん(DLD-1)細胞の細胞生存率は、LPA<sub>4</sub>およびLPA<sub>6</sub>ノックダウンにより有意に上昇した。LPA<sub>2</sub>はGiタンパク質、LPA<sub>4</sub>・LPA<sub>6</sub>はGi・Gsタンパク質と共役し、アデニル酸シクラーゼ活性を調節しATPよりcAMP産生を促進または抑制する。近年、細胞内cAMPの蓄積がアポトーシス誘導に関わることが報告されている。そこで抗がん剤処理に対する細胞内ATPの関与を検索するために、MG-63細胞よりエチジウムブロマイド処理(MG63-EtBr)細胞を作成した。ミトコンドリアDNA量・細胞内ATP量はMG63-EtBr細胞において有意に減少した。LPA受容体遺伝子発現レベルはエチジウムブロマイド処理により変動した。CDDP処理に対する細胞生存率は、MG-63細胞に比してMG63-EtBr細胞において有意に抑制された。さらに、低酸素・低栄養状態における抗がん剤処理PANC-1細胞の細胞生存率へのLPA受容体シグナルの役割を、1%酸素濃度ならびに低グルコース培地を用いて培養し細胞機能解析を行った。LPA<sub>2</sub>・LPA<sub>3</sub>遺伝子発現レベルは、21%酸素に比して1%酸素培養により有意な増加がみられた。CDDP処理に対する細胞生存率は、1%酸素培養により上昇した。一方、PANC-1細胞のLPA<sub>1</sub>・LPA<sub>2</sub>遺伝子発現レベルは低グルコース培養により増加がみられた。CDDP処理に対するPANC-1細胞の細胞生存率は、低グルコース培養では低下するものの、1%酸素濃度で培養することで有意に増加することが示された。

#### がん細胞の放射線感受性におけるLPA受容体シグナルの効果

放射線照射(0~15Gy)3日後におけるPANC-1細胞、線維肉腫(HT1080)細胞および肺がん(A549)細胞の細胞生存率を解析したとこと、HT1080細胞に比してPANC-1細胞・A549細胞では高い生存率がみられた。LPA受容体遺伝子発現は、放射線照射PANC-1細胞においてLPA<sub>2</sub>・LPA<sub>5</sub>遺伝子に経時的な増加がみられた。放射線照射に対するPANC-1細胞の細胞生存率はLPA<sub>2</sub>ノックダウン細胞において有意に低下した。アポトーシスの指標であるcleaved PARP-1蛋白発現は、放射線を照射したLPA<sub>2</sub>ノックダウン細胞において明らかな増加がみられた。一方、放射線照射によるPANC-1細胞の細胞生存率はLPA<sub>5</sub>ノックダウン細胞において有意に上昇した。さらに、MG-63細胞を用いて放射線照射を行ったところ、LPA<sub>2</sub>・LPA<sub>3</sub>遺伝子発現に有意な増加がみられた。放射線照射後の細胞増殖率は(2S)-OMPT処理により有意に増加するものの、放射線照射MG63細胞の細胞運動能および抗がん剤に対する細胞生存率は(2S)-OMPT処理により抑制された。

本研究により、各LPA受容体シグナルが抗がん剤・放射線に対するがん細胞の細胞生存率を細胞依存的に増強または抑制することが示された。特に、LPA<sub>2</sub>を介する細胞内シグナルは抗がん剤・放射線抵抗性獲得に促進的に作用することが膵がん・骨肉腫細胞で明らかとなった。本研究結果は、抗がん剤・放射線治療に対して治療困難ながん症例に対し、LPA受容体シグナルを標的とした効果的ながん薬物療法ならびに放射線治療法開発に向けた重要な情報源となりうるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kurisu Rio, Takai Miwa, Takamoto Miyu, Tsujiuchi Toshifumi	4. 巻 646
2. 論文標題 Effects of free fatty acid receptor-2 (FFAR2)-mediated signaling on the regulation of cellular functions in osteosarcoma cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 56 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.01.067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kado Tsuyoshi, Kusakari Naoki, Tamaki Takeru, Murota Kaeko, Tsujiuchi Toshifumi, Fukushima Nobuyuki	4. 巻 657
2. 論文標題 Oleic acid stimulates cell proliferation and BRD4 <sup>2</sup> -MYC-dependent glucose transporter transcription through PPAR activation in ovarian cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 24 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.03.051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kurisu Rio, Takamoto Miyu, Minami Kanako, Ueda Nanami, Yamada Marina, Shima Nanami, Otani Tomoka, Sakai Yuma, Kondo Daisuke, Tsujiuchi Toshifumi	4. 巻 54
2. 論文標題 Effects of lysophosphatidic acid (LPA) signaling via LPA receptors on cellular functions associated with ATP reduction in osteosarcoma cells treated with ethidium bromide	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioenergetics and Biomembranes	6. 最初と最後の頁 109-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10863-022-09933-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okuda Aya, Takai Miwa, Kurisu Rio, Takamoto Miyu, Ikeda Hiroko, Tsujiuchi Toshifumi	4. 巻 99
2. 論文標題 Roles of lysophosphatidic acid (LPA) receptor-2 (LPA <sub>2</sub> ) in the regulation of cellular responses induced by X-ray irradiation and hydrogen peroxide in pancreatic cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Radiation Biology	6. 最初と最後の頁 1925 ~ 1933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09553002.2023.2241890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takai Miwa, Okuda Aya, Amano Yuka, Yashiro Narumi, Hara Koki, Yamamoto Mao, Tsujiuchi Toshifumi	4. 巻 55
2. 論文標題 Effects of LPA receptor-mediated signaling on the modulation of cellular functions of pancreatic cancer cells cultured in fibroblast supernatants under hypoxic conditions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bioenergetics and Biomembranes	6. 最初と最後の頁 169 ~ 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10863-023-09969-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takai Miwa, Takauchi Minori, Kuribayashi Mako, Tsujiuchi Toshifumi	4. 巻 661
2. 論文標題 LPA receptor-mediated signaling regulates cell motility and survival to anticancer drug of pancreatic cancer cells under glucose-deprived and hypoxic conditions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 21 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.04.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takai Miwa, Takamoto Miyu, Amano Yuka, Yamamoto Mao, Hara Koki, Yashiro Narumi, Tsujiuchi Toshifumi	4. 巻 89
2. 論文標題 Induction of lysophosphatidic acid (LPA) receptor-mediated signaling regulates cell motility and survival to anticancer drugs in cancer cells treated with hydrogen peroxide	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Advances in Biological Regulation	6. 最初と最後の頁 100978 ~ 100978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbior.2023.100978	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Honoki Kanya, Tsujiuchi Toshifumi, Kishi Shingo, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 15
2. 論文標題 Revisiting 'Hallmarks of Cancer' In Sarcomas	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1786 ~ 1804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/jca.92844	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Hiroko, Takai Miwa, Tsujiuchi Toshifumi	4. 巻 92
2. 論文標題 Lysophosphatidic acid (LPA) receptor-mediated signaling and cellular responses to anticancer drugs and radiation of cancer cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Advances in Biological Regulation	6. 最初と最後の頁 101029 ~ 101029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbior.2024.101029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takai Miwa, Yashiro Narumi, Hara Koki, Amano Yuka, Yamamoto Mao, Tsujiuchi Toshifumi	4. 巻 255
2. 論文標題 Roles of lysophosphatidic acid (LPA) receptor-mediated signaling in cellular functions modulated by endothelial cells in pancreatic cancer cells under hypoxic conditions	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 155192 ~ 155192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2024.155192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yashiro Narumi, Takai Miwa, Yamamoto Mao, Amano Yuka, Hara Koki, Tsujiuchi Toshifumi	4. 巻 699
2. 論文標題 Effects of free fatty acid receptor (FFAR) signaling on the modulation of cancer cell functions under hypoxic conditions	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149554 ~ 149554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2024.149554	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Hiroko, Takai Miwa, Yashiro Narumi, Amano Yuka, Hara Koki, Yamamoto Mao, Tsujiuchi Toshifumi	4. 巻 257
2. 論文標題 Regulation of cellular responses to X-ray irradiation through the activation of lysophosphatidic acid (LPA) receptor-3 (LPA3) and LPA2 in osteosarcoma cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 155293 ~ 155293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2024.155293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高本美友、栗栖梨緒、上田七海、池田裕子、辻内俊文
2. 発表標題 大腸がん細胞の抗がん剤抵抗性制御におけるLPA受容体 - 4 (LPA4) シグナルの抑制効果
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗栖梨緒、高本美友、上田七海、池田裕子、辻内俊文
2. 発表標題 抗がん剤処理大腸がん細胞の細胞生存率におけるLPA受容体 - 6 (LPA6) シグナルの調節機構
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田七海、高本美友、栗栖梨緒、池田裕子、辻内俊文
2. 発表標題 間質細胞による肺がん細胞の細胞機能促進にける r リゾフォスファチジン酸受容体 - 12 (LPA2) シグナルの役割
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田裕子、上田七海、栗栖梨緒、高本美友、辻内俊文
2. 発表標題 骨肉腫細胞における化学療法抵抗性の増強に対するLPA2を介したリゾフォスファチジン酸 (LPA) シグナル伝達の効果
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗栖梨緒、高本美友、池田裕子、辻内俊文
2. 発表標題 リゾフォスファチジン酸受容体-2を介する過酸化水素処理による骨肉腫細胞の機能解析
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高本美友、栗栖梨緒、池田裕子、辻内俊文
2. 発表標題 過酸化水素処理により誘発される大腸がん細胞の細胞機能調節におけるLPA受容体の役割
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高井美和、辻内俊文
2. 発表標題 低酸素環境下における膵がん細胞の細胞機能制御におけるLPA受容体シグナルの役割
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023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	池田 裕子  (Ikeda Hiroko)  (90806465)	近畿大学・理工学部・助教   (34419)	

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