

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24390069

研究課題名(和文)細胞周期および幹細胞性を制御するGタンパク質共役受容体に関する研究

研究課題名(英文)Studies on G protein-coupled receptor controlling cell cycle and stemness

研究代表者

和泉 孝志 (IZUMI, TAKASHI)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70232361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：G2Aは酸化遊離脂肪酸をリガンドとするGタンパク質共役受容体である。培養細胞に9-HODE等の酸化遊離脂肪酸を添加すると細胞周期が停止した。また、グルコース飢餓及び低酸素刺激などのストレス刺激によって、G2Aの誘導が観察された。G2Aを発現しているグリオーマ細胞を免疫不全マウスに移植すると、腫瘍を形成し、臓器への転移が観察された。また、新規のリン脂質代謝酵素やその代謝産物の生体作用機序に関する解明を行った。

研究成果の概要(英文)：G2A is a G protein-coupled receptor that uses oxidized free fatty acids as ligands. The addition of oxidized free fatty acids such as 9-HODE to the cultured cells resulted in cell cycle arrest. G2A induction was also observed by stress stimulation such as glucose starvation and hypoxia. It became clear that G2A induction is deeply involved in changes in intracellular pH and glutathione concentration. When glioma cells expressing G2A were transplanted into immunodeficient mice, tumor-formation and metastasis to the organs was observed. Immunohistochemical analysis of metastatic lesion revealed that epithelial mesenchymal transition occurred. Thus, G2A, a stress-inducible GPCR, stops the cell cycle in response to oxidized free fatty acids. On the other hand, G2A increases stemness in tumor cells resulting in epithelial mesenchymal transition and forms metastatic foci.

研究分野：生化学

キーワード：細胞医化学 細胞内シグナル伝達 Gタンパク質共役受容体 酸化遊離脂肪酸 幹細胞性 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞外からのシグナルを細胞内に伝える役割をもつ GPCR は、ヒトでは約 900 個存在し、いくつかのサブタイプに分類されている。ロドプシタイプに属する G2A は、GPR4 や OGR1、TDAG8 などと構造的類似性をもち、酸性条件下でシグナルを伝えるプロトン感知性受容体ファミリーに属しており、微小細胞環境が酸性に傾くと様々なシグナルを細胞内に伝える。G2A はその発現により細胞周期が停止することから名付けられた GPCR である。

(2) 申請者らは 9-HODE (リノール酸酸化物) や 11-HETE (アラキドン酸酸化物) を初めとする酸化遊離脂肪酸が G2A のリガンドとして作用することを発見した (Obinata H ら, J Biol Chem, 2005)。生体内に多量に存在するリノール酸由来の GPCR リガンドとしてはこれが初めての報告である。

(3) 従来、これらの GPCR の役割については、動脈硬化や骨代謝との関わりなどの他にはあまり解明されてこなかった。特に、その細胞内シグナルの解析や、生体において果たす役割については不明な点が多かった。

2. 研究の目的

本研究は、酸化遊離脂肪酸-受容体の情報伝達機構を解明し、生体における役割を明らかにすることを大きな目的とした。さらに、得られた研究成果を新たな治療法の開発などの臨床応用に展開するための基礎的な研究成果を得ることを目指した。

(1) 酸化遊離脂肪酸や G2A が細胞周期や幹細胞性に及ぼす影響を細胞レベルや小動物個体レベルで明らかにし、その細胞内情報伝達機構の解明を目指した。

(2) G2A は DNA 損傷刺激によって誘導され、比較的速やかに減少することが報告されている。本研究では、G2A がどのような状況で誘導され、機能を発揮するのかについて検討した。

(3) リガンドである酸化遊離脂肪酸の産生機序の解明を目指した。酸化遊離脂肪酸は、リン脂質にリパーゼなどの分解酵素が作用して脂肪酸が遊離した後に酸化されて産生されると考えられたため、各種リン脂質代謝酵素の精製、クローニング、酵素学的な性質について検討した。

3. 研究の方法

(1) 9-HODE 等の酸化遊離脂肪酸をグリオー

マ系やリンパ球系の培養細胞に添加し、酸化遊離脂肪酸-受容体系が細胞周期や細胞増殖に及ぼす影響を、細胞数や細胞内 ATP 濃度の測定を行い、細胞周期に関わるシグナル分子の活性化状態等の解析により検討した。

(2) ヒトアストロサイトーマ U251 細胞を用いて、G2A の幹細胞性に及ぼす影響について解析した。すなわち、U251 細胞の G2A 過剰発現、及び抑制発現細胞を確立し、これらの細胞に対してグルコース飢餓、及び低酸素刺激を行いその影響を調べた。

(3) G2A 発現 U251MG 細胞を免疫不全マウスへ移植し、その腫瘍形成能と転移能を解析した。

(4) 新規のリン脂質代謝酵素やその代謝産物の生体作用機序に関する解明を行った。

4. 研究成果

(1) 培養細胞に 9-HODE を添加すると、細胞増殖が停止し細胞内 ATP 濃度が減少した。しかし、9-HODE を除去すると再び細胞が増殖を開始した。細胞周期の分析から、9-HODE は一時的な細胞停止を起こしていることが明らかになった。

(2) U251 細胞の G2A 過剰発現、及び抑制発現細胞を確立し、これらの細胞に対してグルコース飢餓、及び低酸素刺激を行なうと、G2A の発現誘導が観察された。この現象には、細胞内 pH 及びグルタチオン濃度の変化が、深く関与していることが明らかになった。

(3) G2A の発現はスフェロイド/スフェアを形成させ、G2A の誘導発現レベルに相関して細胞生存率は高くなった。また、G2A の発現は、間葉性マーカーである N-カドヘリン及び幹細胞性因子 Oct3/4 や Sox2 の発現を亢進させ、ほとんどの細胞集団の細胞周期を G1 相で停滞させた。この時、細胞の酸化状態は低下し、同時に ATP レベルも低下していることがわかった。以上のことから G2A は U251 細胞の幹細胞性を亢進させるとともに上皮間葉転換を促し、腫瘍細胞の浸潤にも関わっている可能性が示された。

(4) スフェア/スフェロイドを形成したヒトグリオーマ細胞をサブクローン化した後にマウスに移植すると、G2A の発現に応じてマウスの全身に転移を認め、転移した場所で増殖巣を形成した。転移巣を免疫組織学的に解析したところ、上皮間葉転換を生じていることが明らかになった。

(5) さらに、このマウスに低酸素プローブであるイリジウム錯体を投与し in vivo イメージングを行うと、増殖巣及び転移巣が描出され、腫瘍の中は低酸素状態になっているこ

とが明らかになった。

(6) U251 細胞において G2A をノックダウンすると、カススペースの発現が増加し、アポトーシスを示す細胞が増加した。また、ノックダウン細胞を用いたマウスの皮下移植モデルでは腫瘍形成や臓器への転移が顕著に抑制された。

(7) グリセロホスホジエステルを加水分解する酵素である哺乳類の7種類の GDE のうち GDE4 と GDE7 のリゾリン脂質に対する活性を示し、その組織分布を報告した。

(8) イノシトールリン脂質代謝と胚発生との関連について検討し、ホスホイノシチド 3-キナーゼ及びその代謝産物の細胞分化における役割について解明し報告した。

(9) 新規ジアシルグリセロールリパーゼのラット脳からの cDNA クローニングに成功し、そのリコンビナントタンパク質の酵素学的な性質を、質量分析を用いた定量系を用いて酵素産物を定量することによって詳細に解析し報告した。

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6件)

- ① Araki M, Ohshima N, Aso C, Konishi A, Obinata H, Tatei K, Izumi T, Enzymatic characterization of recombinant rat DDHD2: a soluble diacylglycerol lipase., J. Biochem., 査読有, 160: 269-279, 2016
- ② Aso, C., Araki, M., Ohshima, N., Tatei, K., Hirano, T., Obinata, H., Kishi, M., Kishimoto, K., Konishi, A., Goto, F., Sugimoto, H., Izumi, T., Protein purification and cloning of diacylglycerol lipase from rat brain., J. Biochem., 査読有, 159: 585-597, 2016
- ③ Ohshima, N., Kudo, T., Yamashita, Y., Mariggio, S., Araki, M., Honda, A., Nagano, T., Isaji, C., Kato, N., Corda, D., Izumi, T., Yanaka, N., New members of the mammalian glycerophosphodiester phosphodiesterase family, GDE4 and GDE7 produce lysophosphatidic acid by lysophospholipase D activity., J. Biol. Chem., 査読有, 290: 4260-4271, 2015
- ④ Xi, X., Tatei, K., Kihara, Y., Izumi,

T., Expression pattern of class I phosphoinositide 3-kinase and distribution of its product, phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate, during Drosophila embryogenesis., Gene Expr. Patterns, 査読有, 15: 88-95, 2014

[学会発表] (計16件)

- ① Mari Araki, Purification and characterization of a soluble diacylglycerol lipase from rat brain14th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases, 2015/07/12, Budapest (Hungary)
- ② 大嶋紀安, 新規リゾホスファチジン酸産生酵素、GDE4・GDE7 の酵素学的解析、第57回日本脂質生化学会、2015/05/28、一橋大学 一橋講堂 (東京)
- ③ Yoshihara T, Quantitative Analysis of Oxygen in Living Cells and Tissues Using Iridium(III) Complexes with Cationic Substituent, GUMI & MADE 2014, 2014/12/05, 桐生市民文化会館 (桐生)
- ④ 大嶋紀安, ラット脳ジアシルグリセロールリパーゼの精製と機能解析、第3回生体情報研究シンポジウム、2014/08/04、秋田キャッスルホテル (秋田)
- ⑤ 岸本幸治, G タンパク質共役型受容体、G2A が制御するがん幹細胞性と上皮間葉転換、第23回日本がん転移学会学術集会、2014/07/10、金沢市文化ホール (金沢)
- ⑥ Koji Kishimoto, 9-HODE-activated G2A induces epithelial-to-mesenchymal transition of human astrocytoma cells prior to generation of stem cell-like properties, 北米神経科学会 2013, 2013/11/09, San Diego (USA)
- ⑦ 岸本幸治, G タンパク質共役型受容体、G2A はアストロサイトーマ細胞株のがん幹細胞性を制御する、第86回日本生化学会大会、2013/09/11、パシフィコ横浜 (横浜)
- ⑧ 荒木麻理, 新規脳ジアシルグリセロールリパーゼの同定, 第55回日本脂質生化学会, 2013/06/06, 大観荘(宮城)
- ⑨ Xi Xin, Subcellular distribution and binding specificity of phospholipid-binding proteins, 第55

回日本脂質生化学会, 2013/06/06, 大
観荘(宮城)

- ⑩ 原口崇、ヒトアストロサイトーマ U251
細胞の幹細胞性と上皮間葉転換制御に
関わる G2A の役割、第 85 回日本生化学
会大会、2012/12/15、福岡国際会議場(福
岡)
- ⑪ Koji Kishimoto, Oxidized Free Fatty
Acids-Activated GPCR, G2A Regulates
Stemness and Malignant Behavior of An
Astrocytoma Cell Line, Neuroscience
2012, 2012/10/13, New Orleans (USA)
- ⑫ Koji Kishimoto, G2A Regulates
Stemness and malignant behavior of
Astrocytoma Cells, 第 71 回日本癌学会
学術総会, 2012/09/19, ホテルロイト
ン札幌 (札幌)

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.gunma-u.ac.jp/med-organ
ization/bioreg/bioreg-function/123.html](http://www.med.gunma-u.ac.jp/med-organization/bioreg/bioreg-function/123.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和泉 孝志 (IZUMI, Takashi)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70232361

(2) 研究分担者

立井 一明 (TATAI, Kazuaki)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00192633

大嶋 紀安 (OHSHIMA, Noriyasu)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30360514

岸本 幸治 (KISHIMOTO, Koji)
徳島大学・生物資源学部・講師
研究者番号：50280699

山本 正道 (TATAI, Kazuaki)
京都大学・大学院医学研究科・特任講師
研究者番号：70423150