

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590493

研究課題名(和文) がんの増悪化における LPA 受容体機能の解析と臨床応用にむけた標的分子の探究

研究課題名(英文) Functional analysis of LPA receptors in the acquisition of malignant properties 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) 4,100,000 円

研究成果の概要(和文)：リゾホスファチジン酸(LPA)は生理活性物質のひとつで、7回膜貫通型Gタンパク共役受容体であるLPA受容体(LPA1 - LPA6)に結合することで様々な細胞応答を制御する。本研究は、がんの浸潤・転移、造腫瘍性、血管新生、抗がん剤耐性などがんの増悪化に6種類のLPA受容体がどのような役割を演じるかを検索した。その結果、LPA受容体はがん細胞の種類によって発現レベルが異なることと、がん細胞特異的にがんの増悪化を促進または抑制することが明らかとなった。本研究結果より、LPA受容体を介するLPAシグナル伝達経路が新規分子標的療法の標的候補分子となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Lysophosphatidic acid (LPA) is one of extracellular physiological lipids and interacts with G protein-coupled transmembrane LPA receptors (LPA receptor-1 (LPA1) to LPA6). LPA receptors regulate a variety of biological functions through the binding of LPA, such as cell proliferation, migration, morphogenesis and differentiation. In this study, to assess an involvement of LPA receptors in the acquisition of malignant potency, we generated LPA receptor knockdown cells and measured cell motile and invasive activities, tumorigenicity and angiogenic activity of cancer cells. The present results demonstrate that each LPA receptor acts as a positive or negative regulator of tumor progression, dependent on types of cancer cells. Therefore, it is suggested that LPA signaling via LPA receptors may be a target molecule for the establishment of chemoprevention agents in clinical cancer therapy.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：LPA受容体 がん浸潤 がん転移 抗がん剤耐性 血管新生

1. 研究開始当初の背景

近年、臨床がん治療において種々の分子標的療法が行われているものの、がんの浸潤・転移および抗がん剤耐性といった悪性増殖能を獲得したがんにおいて効果的な分子標的薬はいまだ見出されていない。従って、これら治療抵抗性を示す症例に対してがんの進展を制御しうる選択肢の広い新規分子標的療法の開発が重要な研究課題のひとつである。

リゾフォスファチジン酸(LPA)は生理活性物質のひとつで、7回膜貫通型Gタンパク共役受容体であるLPA受容体に結合することで様々な細胞応答を制御する。現在までに6種類のLPA受容体(LPA₁~LPA₆)が同定され、特に神経細胞を用いた研究領域において細胞内機能の検索が進められている。一方、がん細胞におけるLPAシグナル伝達経路の関与についても報告があり、卵巣がん患者の腹水中に高濃度のLPAが検出されることや、卵巣がん・大腸がんなどのがん細胞においてLPA受容体遺伝子発現異常が見られている。しかしながら、発がん過程におけるLPAシグナル伝達経路の関与についての解析は行われていなかった。我々は、まずLPA受容体に着目し、ニトロソ化合物で誘発したラット肝・肺発がん実験系を用いてLPA受容体遺伝子異常を検索したところ、肝細胞癌においてLPA₁遺伝子点突然変異が高頻度に検出された。さらに、肺発がん系では、肺腺癌はもとより肺腺腫においてもLPA₁遺伝子点突然変異が高頻度に見られることから、肝・肺発がん過程にLPA₁遺伝子異常が重要な役割を演じることが判明した。また、大腸がんをはじめとした種々のがん細胞におけるLPA受容体遺伝子発現異常が、遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化異常によるものであることも見出した。このように、我々はLPA受容体を介するLPAシグナル伝達経路ががんの発生に深く関与することを世界に先駆けて

明らかにした。

2. 研究の目的

がんの発生にLPA受容体異常が関与するという、これまでの我々の研究成果をふまえて、本研究では、治療抵抗性を示す難症例を想定し、がんの浸潤・転移および抗がん剤抵抗性獲得などがん細胞の増悪化におけるLPA受容体の分子機構を明らかにすることで、LPA受容体を候補分子とした新規分子療法開発のための基礎的情報を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

がん細胞におけるLPA受容体遺伝子発現を検索するために、種々のがん細胞からRNAを抽出しcDNAを合成したのちに、リアルタイムRT-PCR法によりLPA受容体(LPA₁~LPA₆)遺伝子発現プロファイリングを行った。これらのLPA受容体遺伝子発現パターンをもとに、LPA受容体(LPA₁~LPA₆)発現の見られない細胞には遺伝子導入によりLPA受容体発現細胞を作製した。一方、LPA受容体(LPA₁~LPA₆)遺伝子が発現している細胞に対しては、shRNAを用いてLPA受容体遺伝子ノックダウンを行い、LPA受容体ノックダウン細胞を樹立した。さらに、抗がん剤抵抗性獲得におけるLPAシグナル伝達経路の関与を検索するために、低濃度の抗がん剤を処理し徐々に濃度を上げながら長期間(>6カ月)培養することで抗がん剤抵抗性細胞を作製も行った。

これらLPA受容体遺伝子発現改変細胞を用いてLPA受容体(LPA₁~LPA₆)の各種がん細胞における細胞機能解析を行った。また、発がん物質を含めた化学物質に対するLPA受容体の機能解析を行うために、肝上皮細胞に各種化学物質を短期処理してLPA受容体発現レベルの変化と細胞運動能を検索した。細胞機能解析は以下のように大きく6つの項目で行った。細胞増殖：96wellプレートに3000個の細胞を播種し0、1、3日における細

細胞増殖率を、CCK-8 を用いて測定した。細胞運動能：Cell Culture Insert (8 μm) を用い upper chamber に 5×10^4 個 $\sim 1 \times 10^5$ 個の細胞を播種し、lower chamber には 5% charcoal stripped FBS 含有 DMEM にて 16 時間培養し、Culture Insert 外側底面に移動した細胞を、ギムザ染色を行った後に計数した。細胞浸潤能：マトリゲルをコートした Cell Culture Insert (8 μm) を用い upper chamber に 1×10^5 個の細胞を播種して 20 時間培養した後に移動した細胞数を計数した。細胞外基質分解酵素活性：がん細胞を無血清培地で 2 日間培養した培養上清を用いて gelatin zymography を行い、MMP-2、MMP-9 の活性を検索した。

造腫瘍能：アガロース含有培地に細胞を播種した後に 10 日 \sim 14 日間培養し形成されたコロニーの大きさを計測した(colony assay)。

血管新生：Cell Culture Insert (8 μm) を用い、upper chamber には血管内皮細胞を播種し、がん細胞を無血清培地で 2 日間培養した培養上清を lower chamber に用いて培養し、移動した血管内皮細胞数を計数した。さらに、マトリゲルでコートしたプレート上に血管内皮細胞を播種し形成される血管様構造の長さを計測した。

4. 研究成果

膵がん(HPD1NR)細胞を用いて LPA1 および LPA3 ノックダウン細胞を作成し、細胞運動・浸潤能解析を行ったところ、LPA1 は細胞運動・浸潤能を抑制し LPA3 は促進することがわかった。また、膵がん症例で効率に異常が検出される Ki-ras 遺伝子ノックダウン細胞を用いて Ki-ras と LPA 受容体の相互作用を検索し、LPA2 で促進される細胞運動能は Ki-ras の作用によって増強されることを明らかにした。さらに、膵がん(PANC-1)細胞から LPA4、LPA5 および LPA6 ノックダウン細胞を作成して細胞機能を解析し、LPA4・LPA5 は細胞運動・浸潤能、造腫瘍性に対して抑制的に、LPA6 は促進的に作用した。同様に骨

肉腫(HOS)細胞および線維肉腫(HT1080)細胞から LPA 受容体機能を LPA ノックダウン細胞を作成し細胞機能解析を行った。その結果、LPA3 は細胞運動・浸潤能を促進し、LPA5 は抑制的に働いた。また、骨肉腫(COS)細胞と悪性線維性組織球腫(MFH)細胞においても LPA5 は細胞運動に抑制的に作用することが明らかとなった。

肝がん細胞を用いた細胞機能解析では、内因性に LPA 受容体発現の見られない肝がん(RH7777)細胞に LPA3 を発現させた細胞を作成し解析を行った。コントロール細胞に比して、LPA3 発現肝がん細胞では細胞運動・浸潤能は有意に上昇した。さらに造腫瘍能を検索するために colony assay を行ったところ、LPA3 発現肝がん細胞ではサイズの明らかに大きいコロニー形成が見られた。また、抗がん剤(シスプラチン・ドキシソルピシン)に対する細胞生存率は、LPA3 発現肝がん細胞において有意に増加し、抗がん剤耐性関連遺伝子である MDR1 ならびに GSTP 遺伝子発現レベルと相関性が見られた。一方、LPA3 ノックダウン大腸がん(HT116)細胞では、細胞運動・浸潤能ともに有意に促進したことから、大腸がん細胞の細胞運動・浸潤に対して LPA3 は抑制的に作用することがわかった。

血管新生に及ぼす LPA 受容体の効果は、マウス血管内皮(F2)細胞の細胞運動能を指標に検索した。LPA1、LPA3 を発現させた神経芽細胞腫(B103)細胞では高い F2 細胞の運動能を誘発し、変異型 LPA1 を発現させた B103 細胞ではその運動能はさらに増強することがわかった。また、F2 細胞の細胞運動能と各 LPA 受容体発現 B103 細胞における VEGF 遺伝子発現レベルとは相関性がみられた。LPA1 発現乳がん(FM3A)細胞においては、F2 細胞の細胞運動能を促進し、LPA3 発現乳がん細胞では抑制することがわかった。LPA3 ノックダウン細胞を用いた肺がん(LL/2)細胞では F2 細胞の細胞運動能が抑制された。

化学物質の処理によって誘発される肝上皮(WB-F344)細胞の細胞運動能に、LPA 受容体が関与するかを明らかにするために、化学物質を種々の濃度で WB-F344 細胞に 2 日間処理し、LPA 受容体遺伝子発現と細胞運動能を検索した。肝発がん物質であるエチオニンを WB-F344 細胞に処理すると、LPA3 遺伝子発現レベルが増加するとともに細胞運動能が上昇した。同様の LPA3 遺伝子発現とそれに伴う細胞運動能の上昇は過酸化水素処理においても見られた。また、細胞運動能における内分泌かく乱物質の作用を検索したところ、エストロゲン(エストラジオール)と合成エストロゲンであるエチニルエストラジオールは LPA3 遺伝子発現と細胞運動能を上昇させるのに対して、合成エストロゲンであるジェチル・スチルベストロ - ルは LPA1 遺伝子発現の増加と細胞運動能の抑制を示した。さらに、線維芽(3T3)細胞を用いて同様の検索を行ったところ、過酸化水素と、2,3-ジメトキシ-1,4-ナフトキノン(LPA3 遺伝子発現と細胞運動能を上昇させ、その効果は LPA1 によって抑制されることがわかった。これらの結果より、WB-F344 細胞および 3T3 細胞の細胞運動能において、LPA1 は抑制的に LPA3 は促進的に作用することが明らかとなった。

本研究結果より、LPA 受容体は細胞運動・浸潤、造腫瘍性、抗がん剤耐性および血管新生などががんの悪性増殖能獲得に関与することが判明した。これら LPA 受容体を介するがん細胞の細胞機能は、がん細胞特異的に促進または抑制的に作用することならびに LPA 受容体遺伝子発現パターンは細胞によって異なることから、LPA 受容体を介する LPA シグナル伝達経路が新規分子標的療法の標的候補分子となりうる可能性が明らかとなった。

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 18 件)

1. Ishii S, Hirane M, Kato S, Fukushima N, Tsujiuchi T. Opposite effects of GPR120 and GPR40 on cell motile activity induced by ethionine in liver epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 456 (2015) 135-138. 査読有. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.11.047.
2. Ishii S, Hirane M, Kitamura Y, Mori S, Fukushima N, Honoki K, Tsujiuchi T. Role of GPR120 in cell motile activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in liver epithelial WB-F344 cells. *Mol Cell Biochem*. 400 (2015) 145-151. 査読有. DOI: 10.1007/s11010-014-2270-5.
3. Morimoto Y, Ishii S, Ishibashi J, Katoh K, Tsujiuchi T, Kagawa N, Fukushima N. Functional lysophosphatidic acid receptors expressed in *Oryzias Latipes*. *Gene*. 551 (2014) 189-200. 査読有. DOI: 10.1016/j.gene.2014.08.056.
4. Dong Y, Hirane M, Araki M, Fukushima N, Honoki K, Tsujiuchi T. Lysophosphatidic acid receptor-5 negatively regulates cell motile and invasive activities of human sarcoma cell lines. *Mol Cell Biochem*. 2014 (393) 17-22. 査読有. DOI:10.1007/s11010-014-2042-2.
5. Araki M, Kitayoshi M, Dong Y, Hirane M, Ozaki S, Mori S, Fukushima N, Honoki K, Tsujiuchi T. Inhibitory effects of lysophosphatidic acid receptor-5 on cellular functions of sarcoma cells. *Growth Factors*. 2014 (32) 117-122. 査読有. DOI:10.3109/08977194.2014.911294.
6. Dong Y, Hirane M, Araki M, Fukushima N, Tsujiuchi T. Lysophosphatidic acid receptor-5 negatively regulates cellular responses in mouse fibroblast 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 (446) 585-589. 査読有. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.03.016.
7. Tsujiuchi T, Araki M, Hirane M, Dong Y,

- Fukushima N. Lysophosphatidic acid receptors in cancer pathobiology. *Histol Histopathol* 2014 (29) 313-321. 査読有.DOI なし.
8. Tsujiuchi T, Nakae D, Konishi Y. Multi-step lung carcinogenesis model induced by oral administration of N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2014(66)81-88. 査読有. DOI:10.1016/j.etp.2013.11.006.
9. Tanaka J, Yamaguchi K, Ishikura H, Tsubota M, Sekiguchi F, Seki Y, Tsujiuchi T, Murai A, Uemura T, Kawabata A. Bladder pain relief by HMGB1 neutralization and soluble thrombomodulin in mice with cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuropharmacology* 2014(79)112-118. 査読有. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.11.003.
10. Hirane M, Araki M, Dong Y, Honoki K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Inhibitory effects of LPA1 on cell motile activities stimulated by hydrogen peroxide and 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone in fibroblast 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 (441) 47-52. 査読有. DOI:10.1016/j.bbrc.2013.10.009.
11. Honoki K, Tsujiuchi T. Senescence bypass in mesenchymal stem cells: a potential pathogenesis and implications of pro-senescence therapy in sarcomas. *Expert Rev Anticancer Ther*. 13 (2013) 983-996. 査読有. DOI:10.1586/14737140.2013.820010.
12. Kuwata S, Ohkubo K, Kumamoto S, Yamaguchi N, Izuka N, Murota K, Tsujiuchi T, Iwamori M, Fukushima N. Extracellular lipid metabolism influences the survival of ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 (439) 280-284. 査読有. DOI:10.1016/j.bbrc.2013.08.041
13. Yoshikawa K, Tanabe E, Shibata A, Inoue S, Kitayoshi M, Okimoto S, Fukushima N, Tsujiuchi T. Involvement of oncogenic K-ras on cell migration stimulated by lysophosphatidic acid receptor-2 in pancreatic cancer cells. *Exp Cell Res*. 2013 (319) 105-109. 査読有. DOI:10.1016/j.yexcr.2012.09.014
14. Tanabe E, Kitayoshi M, Yoshikawa K, Shibata A, Honoki K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Loss of lysophosphatidic acid receptor-3 suppresses cell migration activity of human sarcoma cells. *J Recept Signal Transduct Res*. 2012 (32) 328-334. 査読有. DOI: 10.3109/10799893.2012.738698.
15. Fukui R, Tanabe E, Kitayoshi M, Yoshikawa K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Negative regulation of cell motile and invasive activities by lysophosphatidic acid receptor-3 in colon cancer HCT116 cells. *Tumor Biol*. 2012 (33) 1899-1905. 査読有. DOI: 10.1007/s13277-012-0450-z.
16. Kato K, Yoshikawa K, Tanabe E, Kitayoshi M, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T. Opposite roles of LPA₁ and LPA₃ on cell motile and invasive activities of pancreatic cancer cells. *Tumor Biol*. 2012 (33) 1739-1744. 査読有.DOI:10.1007/s13277-012-0433-0.
17. Kitayoshi M, Kato K, Tanabe E, Yoshikawa K, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T. Enhancement of endothelial cell migration by constitutively active LPA₁-expressing tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 (422) 339-343. 査読有. DOI:10.1016/j.bbrc.2012.05.012
18. Tanabe E, Shibata A, Inoue S, Kitayoshi M, Fukushima N, Tsujiuchi T. Regulation of cell motile activity through the different induction of LPA receptors by estrogens in liver epithelial WB-F344 cells. *Biochem Biophys*

Res Commun. 2012 (428) 105-109. 査読有.
DOI:10.1016/j.bbrc.2012.10.015.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 福嶋伸之、田中亚以子、辻内俊文、岩森正男. 多価不飽和脂肪酸は活性酸素産生と MAP キナーゼ経路活性化を介して卵巣がん細胞死を引き起こす. (第 87 回日本生化学会大会. 2014 年 10 月 15 日~18 日. 国立京都国際会館 (京都府)).
2. 石井章一、森本祐司、石橋潤一、辻内俊文、加川尚、福嶋伸之. メダカ LPA 受容体遺伝子の発現と機能. (第 87 回日本生化学会大会. 2014 年 10 月 15 日~18 日. 国立京都国際会館 (京都府)).
3. 平根未来、董燕、朴木寛弥、辻内俊文. 化学発がん物質により誘発されるラット肝細胞運動能への LPA シグナル伝達経路の関与. (第 73 回日本癌学会総会. 2014 年 9 月 25 日~27 日. パシフィコ横浜. 神奈川県)).
4. 福嶋伸之、石井章一、森本祐司、石橋潤一、辻内俊文、加川尚. メダカリゾホスファチジン酸受容体の発現と機能. (第 37 回日本神経科学大会 Neuro2014. 2014 年 9 月 11 日~13 日. パシフィコ横浜 (神奈川県)).
5. 石井章一、辻内俊文、加川尚、福嶋伸之. メダカ LPA 受容体遺伝子の発現と機能. (生体機能と創薬シンポジウム 2014. 2014 年 8 月 28 日~29 日. 近畿大学. 大阪府)).
6. Honoki K, Fujii H, Kido A, Tsukamoto S, Mori T, Tanaka Y, Tsujiuchi T. Receptor type-specific role of Lysophosphatidic acid signaling for migration and invasion in sarcoma cells (第 72 回日本癌学会総会. 2013 年 10 月 3 日~5 日. パシフィコ横浜 (神奈川県)).
7. 石井章一、辻内俊文、福嶋伸之. LPA1 の変異は小胞体への蓄積と情報伝達の異常を生じる. (第 86 回日本生化学会大会. 2013

年 9 月 11 日~13 日. パシフィコ横浜 (神奈川県)).

8. 福嶋伸之、辻内俊文、岩森正男. 脂肪酸による卵巣がん細胞 HNOA の細胞死抑制機構. (第 86 回日本生化学会大会. 2013 年 9 月 11 日~13 日. パシフィコ横浜 (神奈川県)).
9. 石井章一、辻内俊文、福嶋伸之. ラットがん組織から見出された LPA1 変異体の機能解析. (第 85 回日本生化学会大会. 2012 年 12 月 14 日~16 日. 福岡国際会議場 (福岡県)).
10. 福嶋伸之、大久保慶、桑田聖平、辻内俊文、岩森正男. 卵巣がん細胞の生存および増殖に対する種々の脂肪酸の作用. (第 85 回日本生化学会大会. 2012 年 12 月 14 日~16 日. 福岡国際会議場 (福岡県)).
11. 朴木寛弥、藤井宏真、城戸顕、塚本真治、辻内俊文. リゾフォスファチジン酸受容体阻害はヒト肉腫細胞の運動・浸潤能を抑制する. (第 71 回日本癌学会総会. 2012 年 9 月 19 日~21 日. ロイトン札幌 (北海道)).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者
朴木 寛弥 (HONOKI, Kanya)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 40336863

(3) 連携研究者
福嶋 伸之 (FUKUSHIMA, Nobuyuki)
近畿大学・理工学部・准教授
研究者番号: 10254161