

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462482

研究課題名(和文)生理活性脂質LPAの新規受容体GPR87の泌尿器癌における増殖制御機構の解析

研究課題名(英文)Anti-proliferative activity of Adenoviral vector expressing short hairpin RNA targeting G-Protein coupled receptor (GPR87) in urothelial carcinoma

研究代表者

張 霞 (zhang, xia)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：30524061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：GPR87の過剰発現は泌尿器癌増殖能や悪性度に関連することが報告された。新たな遺伝子治療法を開発ため、我々はshRNA発現アデノウイルスベクター(Ad-shGPR87)を作製し、GPR87遺伝子の抑制効果及びGPR87シグナル伝達経路の制御を研究した。GPR87高発現膀胱癌細胞株に対して、Ad-shGPR87による腫瘍増殖抑制作用をin vitro, in vivo的に証明した。また、GPR87抑制はp53依存的にアポトーシスを引き起こしたことを発見した。これらの研究結果を国内外の学会に採用され、論文、学会発表も論文発表に通じてGPR87を標的とした遺伝子治療の可能性が積極的に発信した。

研究成果の概要(英文)：GPR87 is a newly orphanized member of the cell surface molecule G protein-coupled receptor family. GPR signaling was shown to play a role in promotion of cell growth and survival, metastasis, and drug resistance. To explore effective gene therapies for GPR87-expressing cancers including urothelial cancer, we constructed an adenoviral vector expressing short hairpin RNA targeting GPR87 (Ad-shGPR87). We found that Ad-shGPR87 effectively inhibited the proliferation of GPR87-expressing cell lines both in vitro and in vivo. With this effective tool, we then analyzed the intracellular pathways to uncover the mechanism by which GPR87 is able to regulate the proliferation and survival of human bladder cancer cells. Further, knockdown of GPR87 led to a p53-dependent signal transduction and caused apoptosis in the bladder cancer cells. Consequently, GPR87 appeared to be a promising target for gene therapy. These results of were adopted by domestic and international conferences.

研究分野：医歯薬学

キーワード：GPR87 shRNA Adenovirus Gene therapy

様式 C-19,F-19,Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌細胞の増殖を刺激する因子としてはタンパク質性の増殖因子や各種ホルモンなどがよく知られている。多様な生理活性を有する脂質メディエーターである**リゾチアリン酸 (LPA)**は、生体内に広く分布し、癌細胞の増殖刺激因子としても近年注目を集める様になった。我々はこれまで、成人男性精液中の LPA 合成や代謝に関する研究、前立腺細胞に対する生理活性、前立腺癌組織における LPA 合成酵素の発現と患者予後などに関して報告してきた(Tanaka K, Kakehi Y, et al., *FEBS Lett*, 523:187-92, 2000. Sakamoto S, Kakehi Y, et al., *Endocrinology* 145:2929-2940, 2004)。また、LPA の受容体に関して、前立腺肥大症や前立腺癌細胞における LPA3 の役割や、ホルモン非依存性前立腺癌への形質変換に伴う LPA3 から LPA1 へのスイッチなどを見出してきた(Zeng Y, Kakehi Y, et al., *Prostate*, 69:283-92, 2008, Noh M, Kakehi Y, et al., *Cancer Sci*, 100:1631-8, 2009)。

LPA 受容体としては、これまでに LPA 1-4 の 4 種類が知られていたが、Gタンパク質共役型受容体 (GPCRs) の 1 種で ligand が不明であった orphan receptor の hGPR87 が LPA を ligand とすることが Tabata らにより最近明らかにされた。GPCR の多くが、その発現や機能異常によりいくつかの疾患と密接な関連性を指摘されており、医薬品開発の観点からも重要な標的分子となってきた。特に癌に関しては、GPCR を介したシグナル伝達が腫瘍の増殖促進、血管新生、癌細胞の遊走、転移、薬剤耐性などに関与することが報告されてきた。hGPR87 に関しては、肺癌、子宮頸癌、頭頸部癌、膀胱癌などで発現の上昇が報告されているが、その役割など詳細はまだ不明である。最近の研究報告により、GPR87 の発現は癌抑制遺伝子 p53 と関連することを示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、泌尿生殖器癌における GPR87 の発現と GPR87 を介したシグナル伝達経路の発現制御、増殖や血管新生、浸潤・転移や薬剤耐性との関連を解析し、泌尿生殖器癌に対する新規治療法の開発に結びつけるための基盤的データを得ることを目的に計画された。

これまでの研究から、様々な抗腫瘍剤標的分子の腫瘍内過剰発現が、その抗癌剤の耐性に関連することを報告されている。その中で最新の我々の研究から、抗腫瘍剤標的分子が遺伝子治療のターゲットとなり、抗腫瘍剤標的分子発現抑制ベクターにより抗腫瘍剤の感受性を獲得しうる事が判明してきた。そこで我々は薬剤耐性の進行期肺癌の治療として、抗腫瘍剤関連分子の発現抑制ベクターと

抗腫瘍剤の併用療法による化学・遺伝子治療の研究を行う。我々は臨床応用可能な shRNA 発現ベクターを導入高率の高いアデノウイルスベクター作製し、癌細胞株での RNA interference (RNAi) 実験後、実験動物(担癌ヌードマウス)で標的分子抑制ベクターと抗腫瘍剤の併用療法による化学・遺伝子治療の研究を行う。

3. 研究の方法

1) in vitro 実験により、最適な hGPR87 特異的 siRNA 配列とループ配列を含む shRNA 配列で合成オリゴ DNA を作製して、この合成オリゴ DNA を RNA polymerase III 系プロモーターを搭載したプラスミドベクターに組み込み、shRNA 発現プラスミドベクターを作製する。‘プロモーター+shRNA’を切り出し、インサートして、コスミドベクターに組み込み、COC-TPC 法で、shRNA 発現アデノウイルスベクターを作製する。最終的に臨床応用可能な高力価 shRNA 発現アデノウイルスベクター Ad-shsiGPR87 を作製した。

2) in vivo 実験により、泌尿生殖器癌における GPR87 の発現と GPR87 を介したシグナル伝達経路の発現制御、増殖や血管新生、浸潤・転移や薬剤耐性との関連を解析し、生着した腫瘍にアデノウイルスベクター、または siRNA を投与し、それらの遺伝子治療の効果を総合的に評価し、泌尿生殖器癌に対する新規治療法の開発に結びつけるための基盤的データを得た。

3) Ad-shsiGPR87 ウイルスを用いて、免疫不全マウス皮下または同所移植癌細胞モデルを用いて、遺伝子治療を行い、その治療効果を解析した。

4. 研究成果

1). 25 年度には、膀胱がん細胞株における hGPR87 の遺伝子発現とタンパク質発現を解析した(Figure 1)。また GPR87 合成 siRNA による遺伝子治療実験を実施し、siRNA のノックダウン効率を評価した。これにより得られた最適な siRNA 配列とループ配列を含む shRNA 配列をプラスミドベクターに組み込み、shRNA 発現プラスミドベクターの作成を完了した。

2). 26 年に GPR 87 高発現膀胱がん細胞株に対して、Ad-shGPR87 のノックダウン効率を評価した(Figure 2, 3)。更に、Ad-shGPR87 抗腫瘍効果のメカニズムに関して、解析した(Figure 4)。

3). 27 年度にはさらに、免疫不全マウス皮下同所移植癌細胞モデルを用いて、Ad-shGPR87 による遺伝子治療を行い、in vivo で治療効果を評価して、遺伝子治療の可能性を確認した(Figure 5)。

4). これらの研究結果を国内外の学会に採用され「第73回日本がん学会学術総会(2014年9月、横浜)論文(Int J Mol Sci. 2015 Oct 14;16)」など、積極的に発信し、Ad-shGPR87による泌尿器癌における新規治療法の開発を進んでいる。

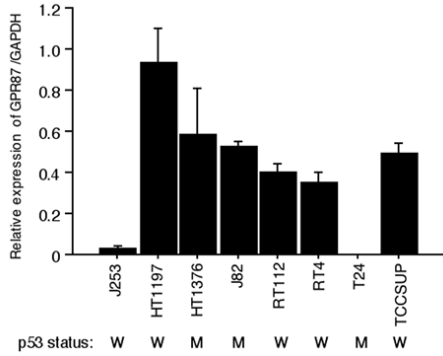


Figure 1. GPR87 gene expression and p53 status in eight human bladder cancer cell lines.

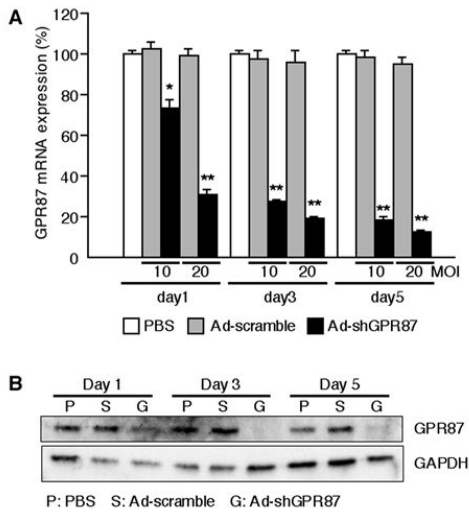


Figure 2. Expression of GPR87 in GPR87-expressing human bladder cancer cells RT112 after infection with adenoviral vectors. (A), time-dependent and dose-dependent GPR87 gene expressions in RT112 cell. (B) time-dependent GPR87 protein expressions in RT112 cells.

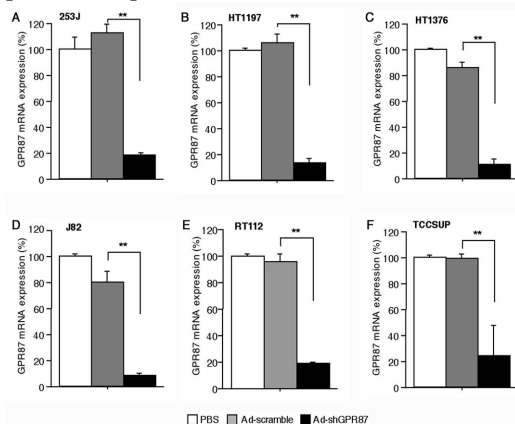


Figure 3. Gene expression of GPR87 in GPR87-expressing human bladder cancer cells 3 days after infection with adenoviral vectors

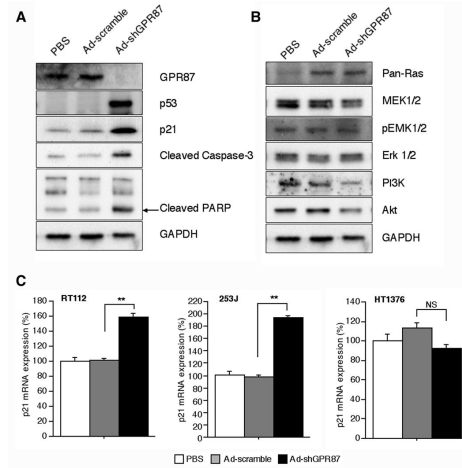


Figure 4. GPR87 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis via p53 pathway in bladder cell RT112. The RT112 cell were collected and analyzed for western blot and real-time PCR 5 days after virus infection. GPR87 The p53 protein expression severely increased and so was its downstream proteins p21 (A). On the other hand, the MARP pathway was not changed, but the PI3K/Akt pathway was decreased significantly (B). The gene expression of p53 downstream gene of p21 were also increased significantly in wild-type p53 253J and RT112 cell, but not in the p53 mutant HT1376 cell (C).

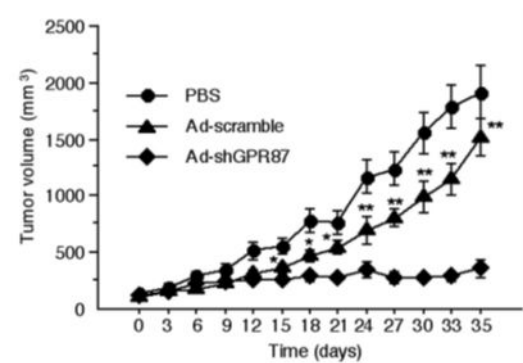


Figure 5. In vivo anti-tumor effect of Ad-shGPR87 on RT112 xenografts.

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. Tokunaga Y, Liu D, Nakano J, Zhang X, Nii K, Go T, Huang CL, Yokomise H. Potent effect of adenoviral vector expressing short hairpin RNA targeting ribonucleotide reductase large subunit

- M1 on cell viability and chemotherapeutic sensitivity to gemcitabine in non-small cell lung cancer cells. *Eur J Cancer*. 2015 Nov;51(16):2480-9.
2. Zhang X, Liu D, Hayashida Y, Okazoe H, Hashimoto T, Ueda N, Sugimoto M, Kakehi Y. G Protein-Coupled Receptor 87 (GPR87) Promotes Cell Proliferation in Human Bladder Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2015 Oct 14;16(10):24319-31.
 3. Nii K, Tokunaga Y, Liu D, Zhang X, Nakano J, Ishikawa S, Kakehi Y, Haba R, Yokomise H. Overexpression of G protein-coupled receptor 87 correlates with poorer tumor differentiation and higher tumor proliferation in non-small-cell lung cancer. *Mol Clin Oncol*. 2014 Jul;2(4):539-544.
 4. Ahmed SM, Wu X, Jin X, Zhang X, Togo Y, Suzuki T, Li Y, Kanematsu A, Nojima M, Yamamoto S, Sugimoto M, Kakehi Y. Synergistic induction of apoptosis by mapatumab and anthracyclines in human bladder cancer cells. *Oncol Rep*. 2015 Feb;33(2):566-72
 5. Shibuya S, Xia Z, Sugimoto M, Ueda N, Haba R, Kakehi Y. The phytotherapeutic agent, eviprost, suppresses stromal proliferation and inflammation even after establishment of nonbacterial prostatitis in the rat prostate. *Urology*. 2014 Mar; (83(3))528-34.
 6. Okazoe H, Zhang X, Liu D, Shibuya S, Ueda N, Sugimoto M, Kakehi Y. Expression and role of GPR87 in urothelial carcinoma of the bladder. *Int J Mol Sci*. 2013 Jun 10;14(6):12367-79
- [学会発表](計 10 件)
1. Dage Liu, Nariyasu, Nakashima, Yoshuke Kita, Yoshimasa Tokunaga, Kazuhito Nii, Natsumi Matsuura, Jun Nakano, Shintaro Tarumi, Masaya Okuda, Tetsuhiko Go, Xia Zhang, Yoshiyuki Kakehi, Hiroyasu Yokomise. Verification of biomarkers in predicting drug sensitivity with in vitro 3D drug sensitivity test in non-small cell lung cancer tumor. ASCO 2016 (June 3-7, 2016, Chicago, USA).
 2. 張 霞, 林田有史, 杉元幹夫, 笥 善行, 田村啓敏, 北井有里加. Enhydrin の前立腺がん細胞に対する抗腫瘍効果. 2016年2月27日 ハイアットリージェンシー大阪(大阪)
 3. 張 霞, 北井有里加, 劉 大革, 杉元幹夫,
- 田村啓敏, 笥 善行. ヒト膀胱癌細胞株における新規化合物 uvedafolin の抗腫瘍効果. 2015年10月8日名古屋国際会議場(名古屋)
4. 劉 大革, 徳永 義昌, 中野 淳, 張 霞, 喜田 裕介, 中島 成泰, 黄 政龍, 横見 瀬 裕保. RRM1 抑制アデノウイルスベクターによる RRM1 発現肺癌細胞株への抗腫瘍作用. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015年10月8日 名古屋国際会議場(名古屋).
 5. 張 霞, 劉 大革, 杉元幹夫, 笥 善行. 前立腺がん細胞株における GPR87 抑制アデノウイルスベクターの抗腫瘍効果. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014年09月27日 横浜・パシフィコ(横浜)
 6. 劉 大革, 徳永義昌, 中野 淳, 張 霞, 新居和人, 中島成泰, 黄 政龍, 横見瀬 裕保. RRM1 抑制アデノウイルスベクターによる癌遺伝子治療の基礎的研究. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014年9月27日 2014年09月27日 横浜・パシフィコ(横浜)
 7. Dage Liu, Jun Nakano, Yoshimasa Tokunaga, Xia Zhang, Yositaka Kasai, Natsumi Matsuura, Masaya Okuda, Masasi Gotoh, Tetsuhiko Go, Hiroyasu Yokomise. Effect of adenoviral vector expressing short hairpin sirna targeting rrm1 gene on cell viability and chemosensitivity to gemcitabine in human non-small cell lung cancer cell. Drug Discovery & Therapy World Congress 2014(August 22-25, 2014, Boston, USA)
 8. 張 霞, 劉 大革, 加藤琢磨, 杉元幹夫, 笥 善行, 田村啓敏, 北井有里加. 前立腺がん細胞株におけるエンヒドリンの抗腫瘍効果. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013年09月27日 横浜・パシフィコ(横浜)
 9. 劉 大革, 徳永義昌, 張 霞, 新居和人, 中島成泰, 石川 真也, 横見瀬裕保. RRM1 抑制アデノウイルスベクターによる癌遺伝子治療の基礎的研究. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013年09月27日 横浜・パシフィコ(横浜)
 10. Yoshiyuki kakehi. Expression and role of GPR87 in urothelial carcinoma of the

bladder.29th Annual urological
research society meeting. (Sep.7-8,
2013,Austria)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

張 霞 (Zhang Xia)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：30524061

(2)研究分担者

杉元 幹史 (Sugimoto Mikio)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号：10243768

(3) 研究分担者

笥 善行 (Kakehi Yoshiyuki)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：20214273

(4)研究分担者

劉 大革 (Liu Dage)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：30314941

(5)研究分担者

林田 有史 (Hayashita Yushi)

香川大学・医学部・助教
研究者番号：30615034

(6)研究分担者

平間 裕美 (Hirama Hiromi)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：50552725