

図 6. TgCAGmBD6-1 マウスの生存曲線.

TgCAGmBD-6-1 マウスの寿命は、野生型の同腹仔と比較して有意に短く、一年以内にはほぼすべてのマウスが死亡した。



図 7. TgCAGmBD6-1 マウスの亀背

生後 6 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスは、進行性の亀背を示した (矢印)。

7) TgCAGmBD6-1 マウスの筋病理所見

我々は、生後 3 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋の組織学的な解析を行った。TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋の HE 染色において、筋線維の多くは、中心核線維に置換され、円形化し、大小不同も目立ち、肥大線維はしばしば分割して、いわゆる fiber splitting の所見を示した。さらに、エオジンに淡染する壊死線維や単核細胞の集簇巣が散在し、塩基性の再生線維も認められた (図 8)。これらの特徴は、調べたすべての骨格筋、すなわち、横隔膜、頸部の筋、背部の筋に共通して認められた。

筋の病理変化を経時的に評価するために、生後 20 日および生後 4 週の TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋を解析した。生後 20 日の TgCAGmBD6-1 マウスでは、外見上も野生型の同腹仔と相違を認めず、病理学的にも骨格筋に異常を認めなかった (図 8)。

生後一ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスの骨格筋では、筋線維の壊死や単核細胞の集簇巣が、生後 3 ヶ月のマウスと同程度に認められた。しかし、多くの筋線維の核は、細胞内に偏在しており、壊死の進行しつつある状態を示す所見であった (図 8)。

一方、TgCAGmBD-6-2 マウスは、生後 6 ヶ月ころまで、骨格筋の病理像において明らかな異常は認められなかった。しかし、生後 1 年の TgCAGmBD-6-2 マウスでは、少数の淡染する変性線維が認められた。また、生後 1 年の TgCAGmBD-6-2 マウスの腓腹筋において、同年齢の野生型マウスと比較して有意に多い中心核線維が認められた ($2.5 \pm 0.5\%$ vs. $0.2 \pm 0.1\%$) ($p < 0.01$) (図 9)。

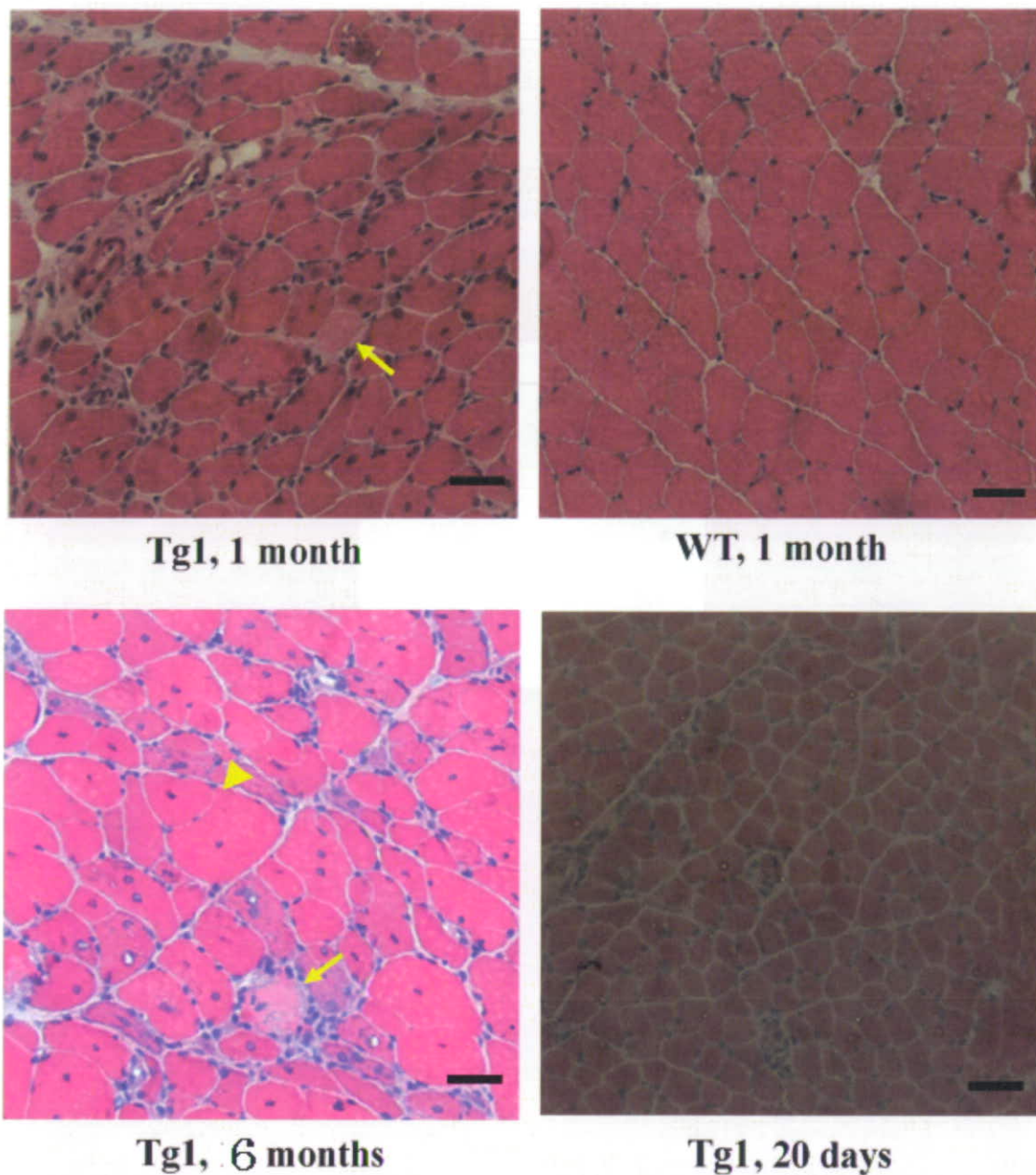


図 8. TgCAGmBD6-1 マウスの筋線維変性の進行

生後 20 日、1 ヶ月、6 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスの下肢筋の HE 染色による評価。生後 1 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスには、野生型の同腹仔にはない、淡染する変性線維（矢印）や中心核線維が出現した。矢印は、単核細胞の浸潤を示している。生後 6 ヶ月には、中心核線維はさらに増加し、筋線維の大小不同も著明となる。fiber splitting（矢頭）もみとめられた。生後 20 日の TgCAGmBD6-1 マウスの筋組織には、明らかな異常は認められなかった。

Scale Bars: 40 μ m

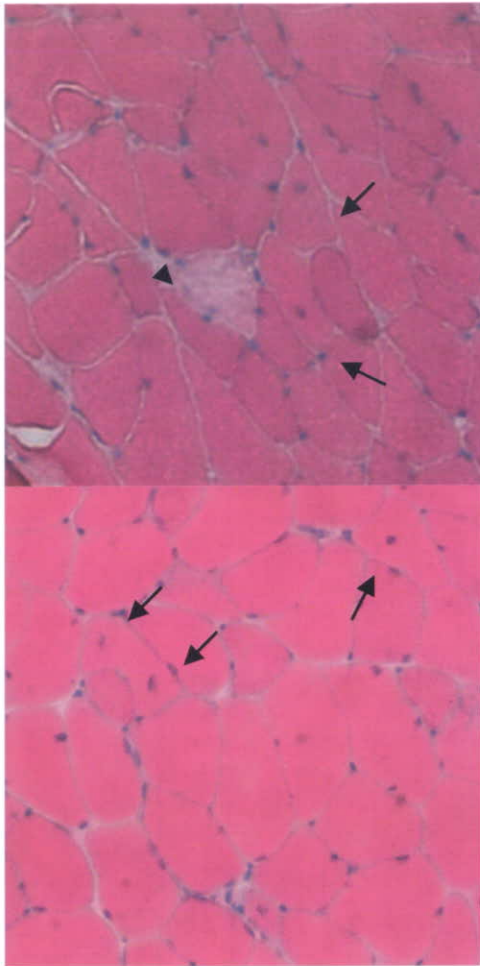


図9. 生後1年のTgCAGmBD6-2マウスの筋病理所見

生後1年のTgCAGmBD6-2マウスの腓腹筋には、HE染色において、筋線維の変性所見(矢頭)や中心核線維(矢)が少数認められた。中心核線維の割合は、同年齢の野生型マウスより有意に多かった ($p<0.01$)。

8) TgCAGmBD6 マウスの骨密度

生後3ヶ月のTgCAGmBD6-1マウスの大腿骨の骨密度は、平均して♂ 0.0451 g/cm²、♀ 0.0424 g/cm²であり、野生型の同腹仔の骨密度、♂ 0.0647 g/cm²、♀ 0.0590 g/cm²と比較して、有意に低値であった ($p<0.01$) (図10)。

また、生後20ヶ月のTgCAGmBD6-2マウス♂の大腿骨の骨密度は、平均して0.0518 g/cm²であり、野生型の同腹仔の骨密度は、0.0585 g/cm²であった。

9) TgCAGmBD6-1 マウスの尿中 8-OHdG

defensin 過剰発現マウス DNAの酸化損傷を評価するために、生後3ヶ月のTgCAGmBD6-1マウスの尿中 8-OHdGを測定した。尿中クレアチニン補正した尿中 8-OHdGは有意に上昇しており、酸化ストレスの増強が示された。

12) hBD-3 の細胞膜傷害性

ヒト肺由来のEBC-1細胞やA549細胞にhBD-3を投与し、30分後にその細胞毒性をトリパンブルー染色により評価した。50 µg/ml以上のhBD-3投与後には、多数の細胞がトリパンブルー陽性であった(図12)。この強い細胞傷害性は、同じくヒト肺由来のA549細胞、マウス筋芽細胞由来のC2C12細胞、マウス胎仔線維芽細胞のいずれに対しても認められた。

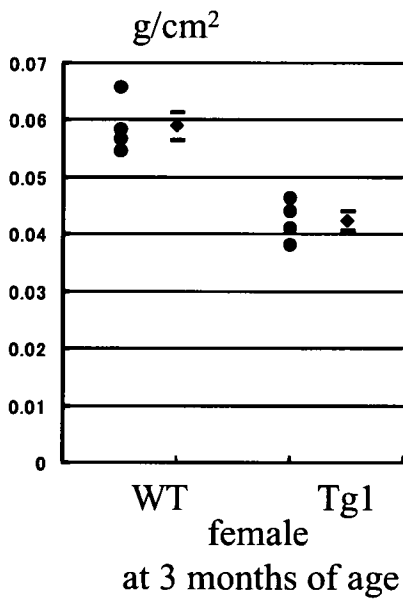
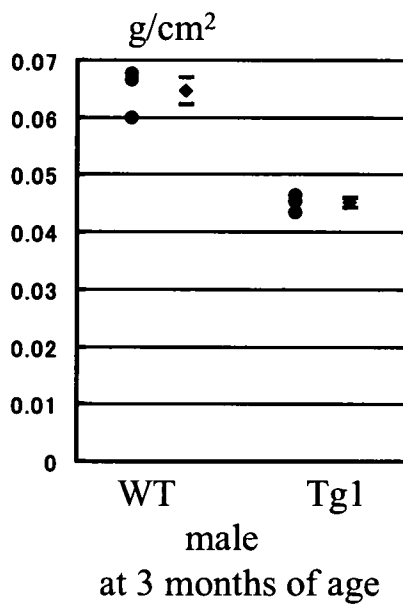


図 10. TgCAGmBD6-1 マウスの骨密度低下

TgCAGmBD-6-1 (Tg1) マウスの大腿骨の骨密度は、野生型の同腹仔と比較して有意に低値であった ($p < 0.01$)。

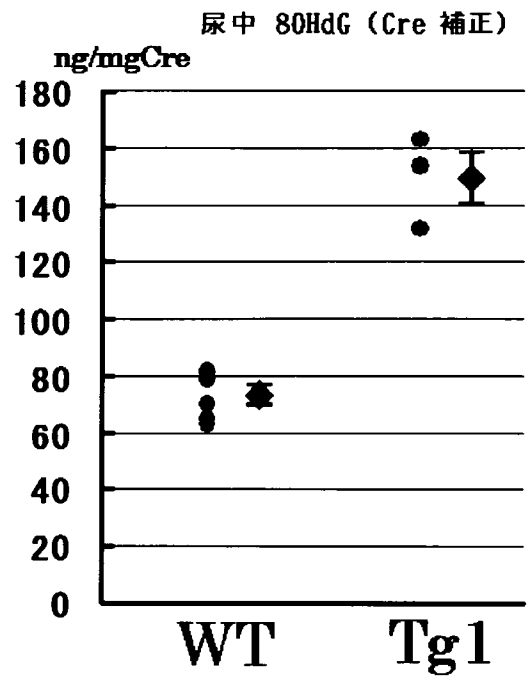


図 11. 生後 3 ヶ月の Tg1 マウスの尿中 8OHdG
生後 3 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスの尿中 8OHdG を測定した。尿中クレアチニン補正した尿中 8OHdG は有意に上昇しており、酸化ストレスの増強が示された。

次に我々は、より短時間での hBD-3 による細胞膜の傷害を PI 染色により評価した。10 分間の hBD-3 刺激により、多くの A549 細胞で、PI の取り込みが認められ、急性の細胞膜傷害を示す所見がえられた (図 13)。PI 陽性細胞の割合は、hBD-3 濃度に比例して直線的に増加した。70 $\mu\text{g/ml}$ 以上の hBD-3 では、統計学的に有意な差をもって細胞傷害性が示された (図 14)。

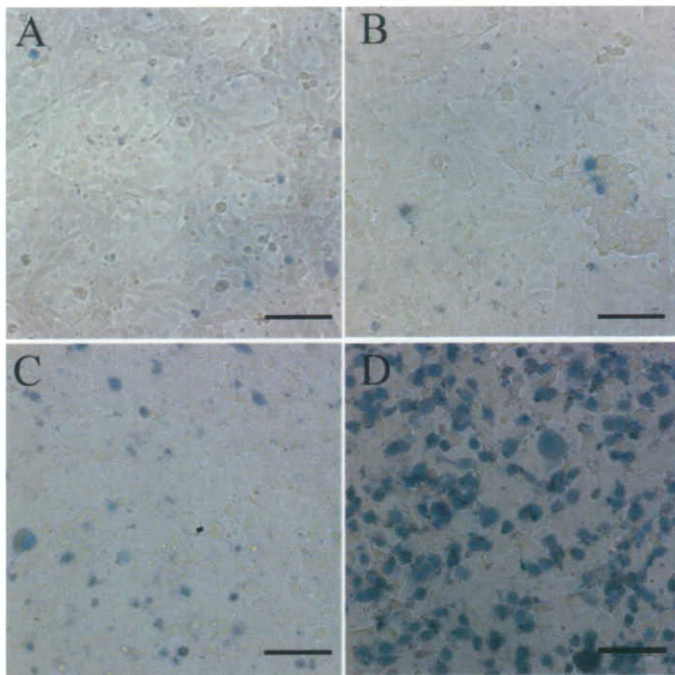


図 12. EBC-1 細胞に対する hBD-3 の急性の細胞傷害性

50 $\mu\text{g/ml}$ の hBD-3 存在下で 30 分間培養すると、多くの EBC-1 細胞がトリパンブルーを排出できず、細胞死の所見を示した。A: no hBD-3, B: 10 $\mu\text{g/ml}$ hBD-3, C: 20 $\mu\text{g/ml}$ hBD-3, D: 50 $\mu\text{g/ml}$ hBD-3. *Scale Bars:* 100 μm

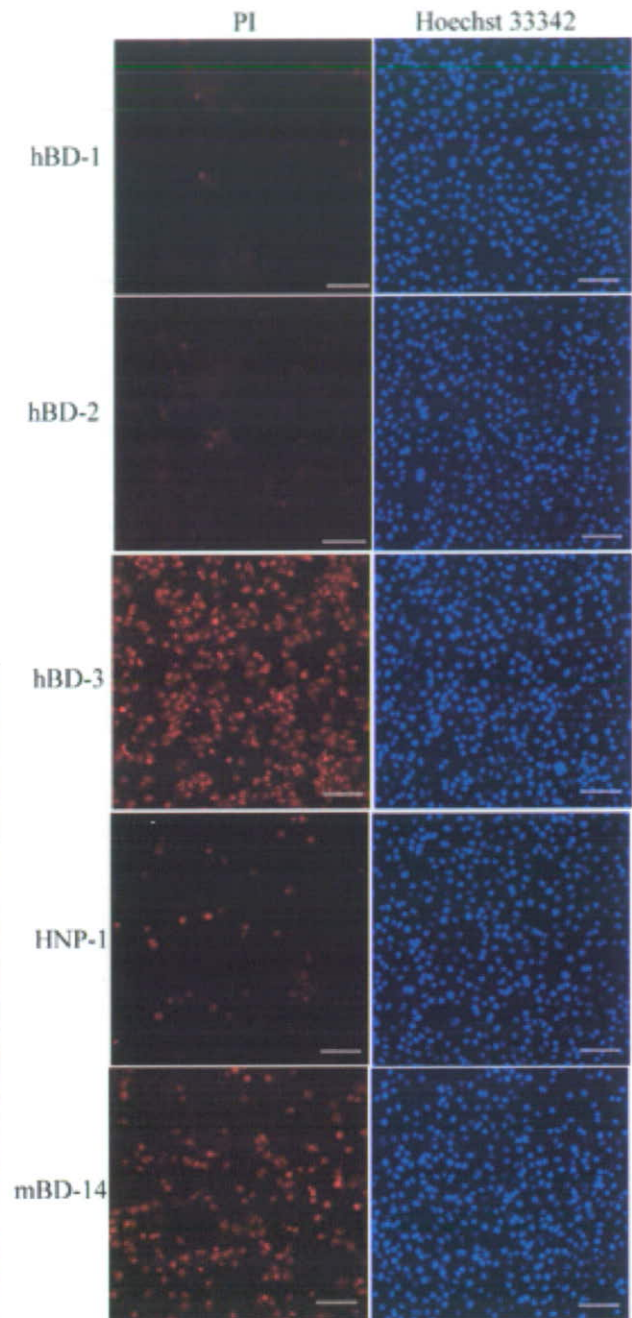


図 13. PI 染色による A549 細胞に対する defensin の細胞膜傷害の評価

200 $\mu\text{g/ml}$ の hBD-3 の 10 分間の刺激により、多数の A549 細胞が PI 染色陽性を示し、細胞膜傷害が惹起されたことを示す。hBD-3 の傷害性は、他のヒト β -defensin や HNP-1 よりも著明であった。hBD-3 のマウスホモログである mBD-14 もまた、著明な細胞膜傷害をきたした。*Scale Bars:* 100 μm

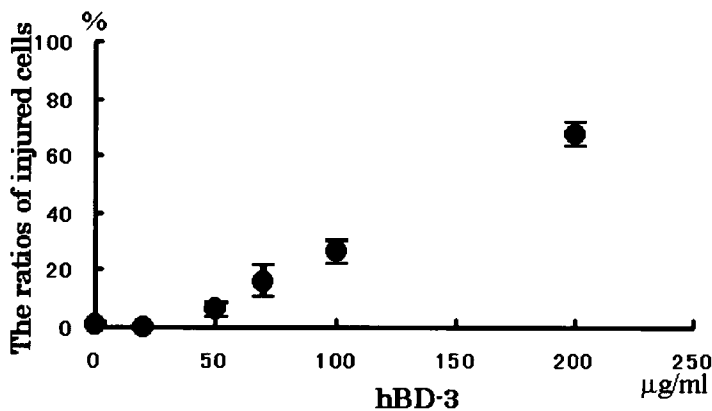


図 14. 10 分間の hBD-3 刺激後の PI 取り込みと hBD-3 濃度依存性

hBD-3 の 10 分間の刺激により、多くの A549 細胞の PI 取り込みが惹起された。damaged cells の割合は、Hoechst 33342 により染まる核全体のなかで、PI 陽性の細胞の割合を示す。damaged cells の割合は、hBD-3 の濃度に比例して直線的に増加した。

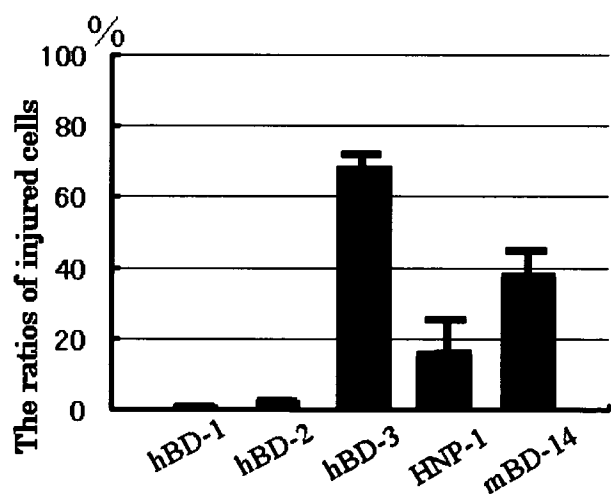


図 15. ヒト defensin の細胞傷害性の比較

hBD-3 の細胞傷害性は、他のヒトβ-defensin や HNP-1 よりも有意に著明であった。hBD-3 のマウスホモログである mBD-14 もまた、著明な細胞膜傷害をきたした。

HNP-1 の細胞毒性が以前から報告されてきたが、hBD-3 の細胞傷害性は、HNP-1 より有意に強かった。また、他のβ-defensin アイソフォームである hBD-1 や hBD-2 では、200 μg/ml の濃度においても、PI 陽性細胞は惹起されなかった。興味深いことに、hBD-3 のマウスホモログである mBD-14 は、hBD-3 と同様の強い細胞傷害性を示した(図 15)。

hBD-3 の細胞傷害の経時変化を検討したところ、PI 陽性細胞の割合は、10 分以内には急速に増加し、20 分後および 40 分後には、比較的緩やかな増加を示すのみであった(図 16)。

より長時間の hBD-3 刺激の影響を観察するために、hBD-3 を含む 10% (v/v) FCS 含有培地で 9 時間培養後、TUNEL 染色を施行した。多くの細胞が TUNEL 陽性を示し、hBD-3 による DNA の断片化が示された(図 17)。この所見は、アポトーシスによる細胞死に相当する所見であるが、PI 染色において、hBD-3 刺激 30 分後には、すでに相当数の細胞が PI 陽性を呈しており、DNA 損傷は、細胞膜破壊に続いて起こっていると思われる。

以前の報告において、HNP-1 が細胞膜傷害の後、細胞内に入り、DNA 損傷を惹起することが指摘されている。我々は、100 μg/ml の hBD-3 と FITC にてラベルした mBD-6 100 μg/ml を含む 10% (v/v) FCS 含有培地で 9 時間、A549 細胞を培養したところ、多くの細胞で、FITC ラベルした mBD-6 が細胞内および核内に取り込まれている像が確認された(図 18)。このように細胞内に取り込まれた defensin が、ミトコンドリアなどに作用し、アポトーシスの経路をも活性化するのかもしれない。

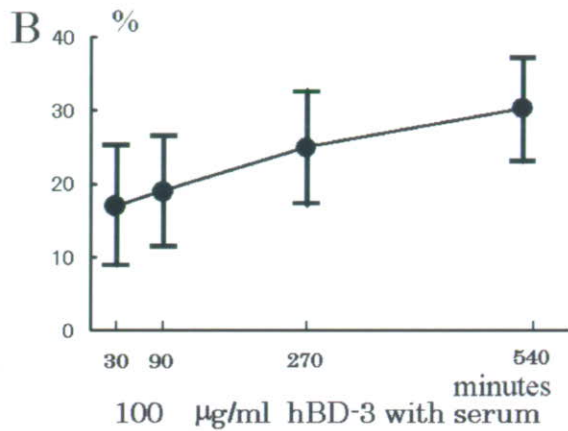
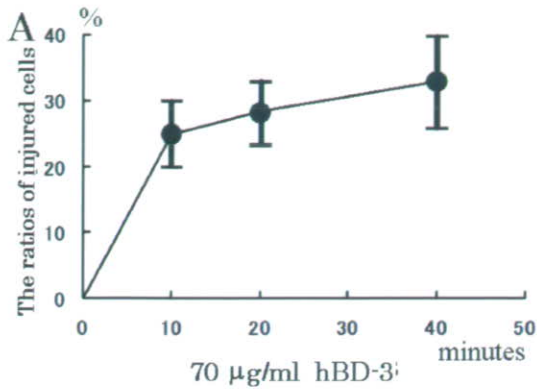


図 16. hBD-3 による細胞傷害の経時変化

A. 我々は、70 µg/ml の hBD-3 を含む PBS+ 液下で、10 分、20 分、40 分培養後、PI 取り込み像を確認した。PI 陽性を示す細胞膜障害の大部分は、10 分以内に急性に惹起されていた。B. 100 µg/ml の hBD-3 を含む 10% (v/v) 非働化済ウシ胎仔血清含有 DMEM 培地下で、より長時間培養して観察した。30 分後には、ほぼ 20% の細胞が、PI 陽性像を示し、その後、90 分、270 分、540 分後には、PI 陽性細胞は少しずつ増加した。

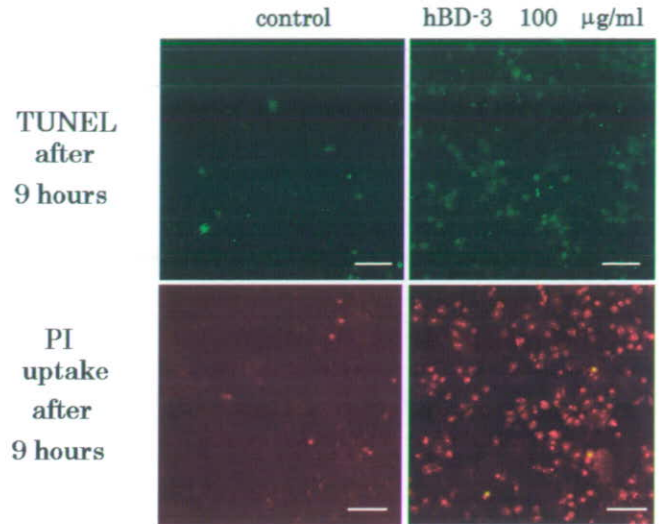


図 17. 9 時間の hBD-3 刺激後の TUNEL 染色および PI 染色 A549 細胞を 100 µg/ml の hBD-3 存在下で 9 時間培養後の TUNEL 染色において、多くの TUNEL 陽性細胞 (green) が認められた。左パネルは刺激をしていないコントロール。下段は、同じく 100 µg/ml の hBD-3 存在下で 9 時間培養後の PI 染色であり、TUNEL 陽性細胞に相当する数の細胞が PI 陽性でもある。Scale Bars: 100 µm

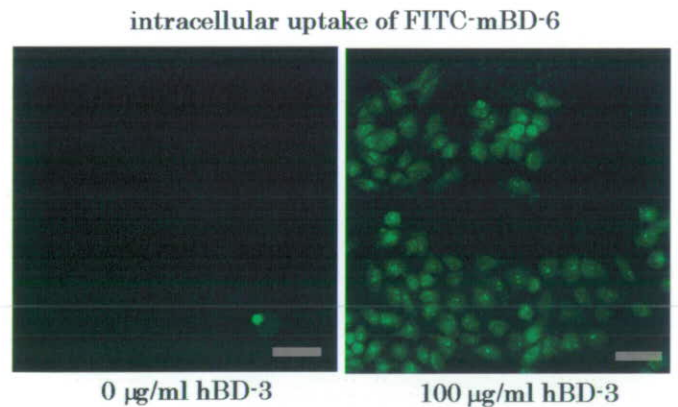


図 18. 9 時間の hBD-3 刺激時の FITC ラベル mBD-6 の動態 A549 細胞を 100 µg/ml の hBD-3 存在下で、100 µg/ml の FITC-mBD-6 とともに 9 時間培養後、共焦点蛍光顕微鏡にて FITC-mBD-6 の局在を観察した。β-defensin が、細胞内および核内に取り込まれている像が得られた。Scale Bars: 30 µm

我々の観察は、また、血清の存在が、hBD-3 の細胞障害性を、少なくとも部分的にしか阻害しないことを示している。対照的に、以前の報告によると、HNP-1 の細胞膜傷害は、5%の血清存在下では惹起されなかった。強力な hBD-3 の細胞膜傷害性を支持する所見である。

13) hBD-3 の細胞傷害性に対する P2X 受容体拮抗薬の影響

hBD-3 の細胞傷害性の分子機序を検討するために、我々は、P2X 受容体に注目した。A549 細胞から抽出した mRNA の RT-PCR により P2X3、P2X4、P2X5 受容体の発現が認められた。

P2X 受容体の拮抗薬であるスラミンや PPADS の存在下では、hBD-3 の細胞傷害性は著しく阻害された(図 19)。より定量的な評価のために hBD-3 と 45 分間共培養の後、上清の LDH 活性を測定した。PPADS は、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の hBD-3 による LDH release を、有意に抑制することが確認された(図 20)。

P2X7 受容体は、非選択的なポアを形成するので、P2X7 選択的な阻害薬である KN-62 の効果を検討した。しかし、10 μM の KN-62 の有無による有意な差は確認されなかった(図 21)。

D. 考察

我々は、mBD-6 を過剰発現する遺伝子改変マウスを作製し、筋ジストロフィーに相当する骨格筋線維の変性、再生の所見と筋力低下を呈することを見出した。

生後 20 日頃までの TgCAGmBD6-1 マウスでは、正常の筋線維が主体であること

から、骨格筋の発生過程に異常はないと考えられる。しかし、生後一ヶ月ころより、低体重が明らかとなり、進行性に筋力も低下し、生後 6 ヶ月ころには、一見して亀背が認められた。一方、TgCAGmBD6-2 マウスは、TgCAGmBD6-1 マウスのような顕著な表現型は示さないものの、生後 1 年での筋線維の変性と中心核線維の増加が認められた。

同時に、この β -defensin 過剰発現マウスの表現型は、早老症にも類似する。特に TgCAGmBD6-1 マウスのるいそう、寿命の短縮、骨密度の低下は、代表的な早老症の所見である。さらに、酸化ストレスによる DNA 損傷の指標としての尿中 8-ODdG の増加は、加齢変化の代表的な要因である酸化ストレスが、本マウスにおいても増強していることが明らかとなった。

我々の研究は、defensin の哺乳類細胞自身への作用が、個体レベルで疾患をきたしうることを明確に実証した初めての知見である。これまでの動物モデルの研究は、defensin の感染防御上の重要性を示すものであった。しかし、defensin は、免疫系のエフェクター因子としての機能だけでなく、炎症反応の制御にも関わり、またそれ自身、細胞毒性を有する。したがって、defensin の過剰発現は、感染防御に有利になる一方で、様々な炎症性疾患を惹起するものと思われる。さらに、このような炎症と加齢変化との関連が示唆されたことも興味深い。

次に、我々は、培養細胞への β -defensin の急性の作用を検討した。これまでも、抗菌ペプチドにより惹起される哺乳類細胞のアポトーシスの報告がみられたが、

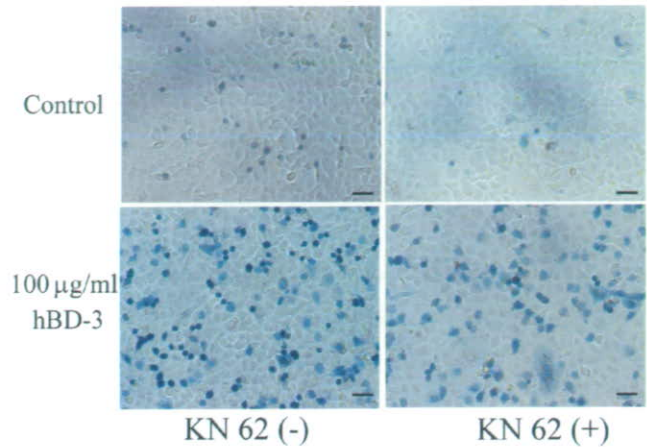
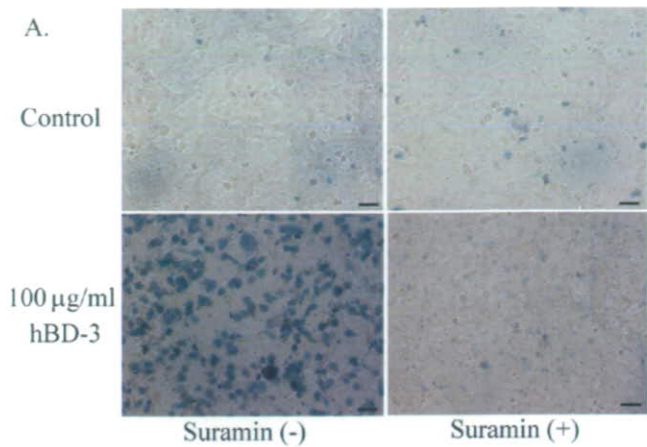


図 20. hBD-3 による細胞死に対する KN-62 の影響

P2X7 受容体特異的な拮抗薬である KN-62 (10 μ M) は、100 μ g/ml の hBD-3 による A549 細胞の細胞死を抑制せず、KN-62 存在下でも多くの細胞がトリパンブルー陽性となった。

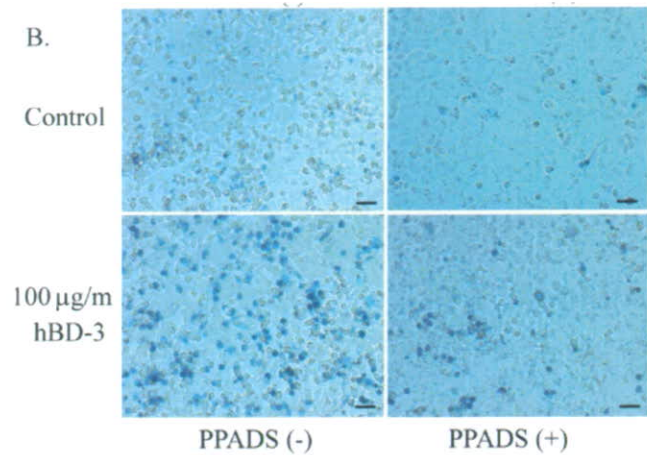


図 18. スラミンや PPADS による hBD-3 の細胞傷害性の阻害

100 μ M のスラミン (A) あるいは、100 μ M の PPADS (B) の存在下では、100 μ g/ml の hBD-3 刺激後のトリパンブルー陽性細胞は、著しく減少しており、その細胞死をほぼ完全に阻害された。

Scale Bars: 50 μ m

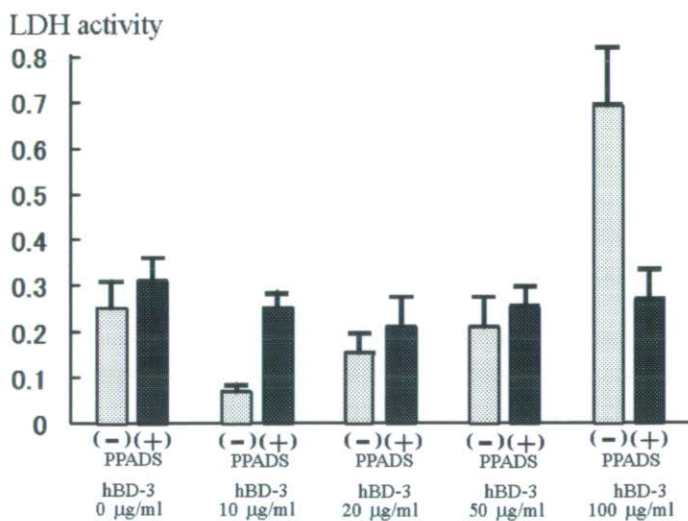


図 19. hBD-3 による培養上清 LDH 活性上昇の測定

我々は、hBD-3 存在下で 45 分間培養後の細胞上清の LDH 活性を測定した。300 μ M の PPADS は、100 μ g/ml の hBD-3 による A549 細胞からの LDH release を有意に抑制した。

我々の研究においても、hBD-3 の長時間の刺激に DNA の損傷が確認された。

しかし、hBD-3 は、より顕著な急性の細胞膜破壊を惹起することが、PI 染色の所見から示され、細胞膜破壊が、細胞死の主要なメカニズムと考えられた。その後、defensin は細胞内にとりこまれ、直接的にも間接的にも DNA 損傷を惹起すると思われる。

hBD-3 とそのマウスホモログの細胞傷害性は、HNP-1 と比べても際立って強く、他の β -defensin、hBD-1、hBD-2 は細胞傷害性を示さなかった。このような特性は、hBD-3 が、塩濃度非依存性の抗菌活性を示すなど、他の β -defensin と異なる生化学的特徴を有することに起因していると思われる。

我々の研究では、hBD-3 による細胞膜傷害における P2 受容体の関与を示唆する所見がえられた。Purinergic 受容体は、様々な炎症性疾患の病態生理に関与しているので、これらの所見は、さらに hBD-3 の病態生理への関与を支持する。

我々の知見は、cathelicidin による IL-1 β の分泌の報告に合致する。ただし、cathelicidin が、P2X7 受容体を活性化あるいは調節するとされている一方、A549 細胞における P2X7 受容体の発現は、極めて弱く、KN-62 は、hBD-3 による細胞傷害を阻害しなかった。抗菌ペプチドの P2 受容体への作用は、P2X7 受容体に限らないと思われる。また、PPADS は、イノシトール(1, 4, 5) 3 リン酸のアンタゴニストとして、P2Y 受容体の下流でも作用するとの報告もあり、他の機序が hBD-3 による細胞傷害に関与しているのかもしれない。

これまで、様々な興味深い研究が、抗菌ペプチドの哺乳類細胞に対する作用を明らかにしてきたが、その機序には不明な点が多い。抗菌ペプチドの多様性を考慮すると、単一の受容体や単一のシグナル伝達で、これらの共通の作用を説明することは難しい。本研究から予想される、hBD-3 の細胞傷害性と P2 受容体との関連からも、抗菌ペプチドの作用は、メカニカルストレスと共通するところが多いように思われる。

E. 結論

defensin 過剰発現マウスは、筋の変性疾患に類似する所見とともに、酸化ストレスの増強を伴う、寿命の短縮、低体重、骨密度低下など、老化の促進を示唆する所見を示した。

また、我々は、細胞膜の傷害による hBD-3 の細胞毒性の特性を明らかにした。興味深いことに、これらの作用に、P2 受容体が寄与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamaguchi Y et. al. β -defensin overexpression induces progressive muscle degeneration in mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292: C2141-C2149, 2007.

2. 学会発表

1) 山口泰弘 ら. 老化モデルとしてのディフェンシン過剰発現マウスの表現型と筋障害の機序
第 49 回日本老年医学会学術集会 (2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況

19年度分担研究報告書

細胞外 pH 感知性 G 蛋白質共役型受容体 TDAG8 の癌の進展における機能解析

分担研究者 石井 聡 東京大学大学院医学系研究科生化学分子生物学講座 准教授

研究要旨

細胞外 pH 感知性受容体 TDAG8 は G タンパク質共役型受容体の一種であり、細胞外 pH の低下に伴い活性化されることは私どもが以前に報告した (Ishii, S., Kihara, Y., and Shimizu, T. (2005) Identification of T cell death-associated gene 8 (TDAG8) as a novel acid sensing G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 280, 9083-9087)。TDAG8 はヒトでは脾臓、胸腺、血球細胞で発現が高いが、これらの組織以外の様々な癌化した組織で発現の増加が確認されている。そこで、TDAG8 をマウス肺癌 Lewis Lung Carcinoma (LLC) 細胞に過剰発現させ、これをマウスに尾静脈投与したところコントロール細胞投与マウスと比べて肺における腫瘍形成が促進されることが明らかとなった。また、皮下に LLC 細胞を注射した場合も同様の結果が得られた。様々な *in vitro* 解析を行ったところ、TDAG8 は酸性条件で PKA 及び ERK を介して細胞増殖の維持に関わり、さらに癌関連遺伝子である Cox-2 の発現を誘導していることが示された。悪性腫瘍内部が酸性であることは昔からよく知られている。これは血管から離れた部位で癌細胞が増殖すると低酸素状態となり、pH を下げる乳酸などが蓄積することに起因すると考えられている。今回の結果から、TDAG8 はこのような腫瘍内の酸性状態を感知して癌細胞の増殖を維持し、さらに Cox-2 などの癌関連遺伝子を誘導していると考えられる。

A. 研究目的

多細胞生物の細胞は外界からの熱、味、匂い、病原体といった情報に応答するシステムを発達させている。このシステムでは外界からの情報（生理活性物質間、すなわちリガンド）が主に細胞膜センサーである細胞膜受容体を介して細胞内に伝えられる。

G タンパク質共役型受容体（以下、GPCR）は全受容体数の約 80% を占め、酵母、昆虫から人に至るまで普遍的に

存在している。チロシンキナーゼ経路などと並んで生体内で重要な経路であり、その多くは疾患の発症や進展にも大きく関与している。GPCR は疎水性アミノ酸クラスターが細胞膜を 7 回貫通する特徴的な構造を有しており、しばしば 7 回膜貫通型受容体と呼ばれている。GPCR は細胞質側で G α 、G β 、G γ からなるヘテロ三量体 G タンパク質と共役している。受容体が特異的な分子すなわちリガンドと結合すると受容体の

立体構造が変化し、G α サブユニットと結合している GDP が GTP に置き換わることにより三量体 G タンパク質が活性化される。その結果、カルシウムイオン、ジアシルグリセロール (DAG)、イノシトールトリスリン酸 (PIP3)、環状 AMP (cAMP)、環状 GMP (cGMP) といったセカンドメッセンジャー産生系を制御することにより、細胞の増殖、分化、遊走、形態変化など非常に多様な生理機能の調節を司っている。

GPCR のリガンドは多岐に渡り、カテコールアミンなどのアミン、ペプチドホルモン、プロスタノイド、リゾホスファチジン酸 (LPA) といった脂質メディエーターなどがある。細胞膜表面上に存在する GPCR は経口摂取可能な低分子化合物製剤の標的分子となる可能性が高く、創薬上のメリットも大きい。実際 GPCR は医薬品の研究対象として非常に重要な存在であり、臨床薬の 50% 以上は一つ以上の GPCR に作用する低分子のアゴニストかアンタゴニストである。これらの薬剤の売上高も全医薬品売上高のかなりを占めている。加えて、GPCR は発現臓器分布

が特異的である場合が少なくないので、このような場合は副作用の少ない効率的な治療標的として期待できると考えられている。このような観点から GPCR のより詳細な生理機能解析は、様々な疾患の原因追及や創薬研究の進展において非常に重要な位置を占めると考えられる。

上で述べたように GPCR は多彩なりガンドを持つことが知られているが、2003 年に互いにアミノ酸配列の相同性が高い OGR1 と GPR4 が細胞外 pH に反応して活性化されることを示す論文が報告された。これに続いて 2004 年には G2A が、2005 年には TDAG8 (T cell death-associated gene 8, 別名 GPR65) が同様に細胞外 pH センサーであることが当研究室などにより明らかにされた。4つの細胞外 pH 感知性 GPCR の組織分布及び共役する三量体 G 蛋白質を表 1 にまとめた。TDAG8 と G2A の発現は免疫系に集中しているのに対して、OGR1 と GPR4 は比較的幅広い組織に分布している。

TDAG8 はその名の通り T 細胞のアポトーシスの際に発現が上昇する遺伝

	OGR1	GPR4	G2A	TDAG8
Expression	Spleen, Testis Heart, Brain, Placenta	Ovary, Liver Kidney, Lung Lymph Node, Vascular Cells	Lymphoid Tissues	Lymphoid Tissues
Coupling G-protein	Gq	Gs	Gq, G12/13	Gs, G12/13
Signal	PLC / Ca ²⁺	cAMP ↑	PLC / Ca ²⁺ , cAMP ↑ Rho activation	cAMP ↑ Rho activation

表1 4種の細胞外pH感知性GPCRの特徴

子として発見された。細胞外 pH の低下に応じて活性化され cAMP を産生し、さらに Rho の活性化によるストレスファイバー生成を促進することを私どもは突きとめている。また、デキサメタゾン刺激によりその発現が促進されること、NIH 3T3 細胞に過剰発現させた場合トランスフォーメーション活性を示すことなども他の研究室から報告されている。TDAG8 の mRNA はヒトでは脾臓、胸腺、血球などに発現が高い。しかしながらこれらの組織以外にも癌細胞において発現の増加が報告されている。また、遺伝子チップを用いた遺伝子発現プロファイルのデータベースである GNF SymAtlas (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>) によると肺癌細胞やメラノーマなどの腫瘍細胞においても TDAG8 の mRNA は高発現している。さらに NCBI GEO Profile では腎癌や神経膠芽種において TDAG8 mRNA の発現が上昇していることを示しており、TDAG8 の発現上昇が癌の進行に関わっている可能性が示唆される。加えて TDAG8 に限らず多くの腫瘍組織で様々な GPCR が過剰発現し、増悪化に関わるという報告も少なくない。

悪性腫瘍内部が酸性であることは昔からよく知られている。癌細胞の増殖はしばしば血管から離れた栄養・酸素不足の部位でも進行することで低酸素状態となり、さらなる増殖により ATP の消費、解糖系の活性化すなわち乳酸の蓄積によって細胞内が酸性となる。細胞は細胞死を防ぐためにプロトンや乳酸などを細胞外に汲み出すことにより周辺環境の pH が酸性に傾くのであ

る。このように腫瘍形成により引き起こされた酸性状態で TDAG8 シグナル経路が活性化され、癌の進行に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。以上の知見から、本研究では癌モデルとして一般的なマウスへの癌細胞の尾静脈注射実験及び皮下注射実験により、TDAG8 と癌の関連を調べることにした。

B. 研究方法

TDAG8 安定発現細胞株の樹立

TDAG8 遺伝子のオープンリーディングフレーム内にはイントロンが存在しない。そこでヒトゲノム DNA を鋳型とした入れ子 PCR により TDAG8 をコードする DNA をクローニングした。この際、N 末端に 9 アミノ酸より成る HA エピト-プタグを付加した。このクローンを、強力な発現作用を有する CAG プロモーターとネオマイシン耐性遺伝子を持つ発現用プラスミドベクター (pCXN2.1) に挿入し、10% FCS 含有 DMEM 培地で培養する LLC 細胞にトランスフェクトした。その後 G418 で薬剤選択をかけ、G418 耐性細胞群を得た。GPCR は 7 回膜貫通型構造で、その N 末端は細胞膜の外側に位置する。従って、HA エピト-プタグが細胞膜表面に多く検出される細胞株は、受容体を高発現していると考えられる。この理論に基づき、この G418 耐性細胞株群について抗 HA 抗体で蛍光染色して蛍光強度の強い細胞を選択的にフローサイトメーターで分取することにより、ポリクローナルな TDAG8 の安定高発現細胞群を取得した。この措置により、モノクローナルな細胞とは違

い、機能に偏りのない細胞集団を得ることができた。

バッファー

生理塩溶液 (PSS) は 130 mM NaCl, 0.9 mM NaH_2PO_4 , 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO_4 , 1.0 mM CaCl_2 , 25 mM glucose, 0.1% BSA で調製した。断りのない限り PSS は、種々の pH (6.0-8.0) に調整した HEPES/EPPS/MES (濃度各 333 mM) を 40 倍に希釈してバッファーとした (HEM-PSS)。細胞を血清飢餓状態にした実験では、重炭酸塩で pH を調整した 0.1% BSA 含有 DMEM 培地で細胞を刺激した。溶液の実際の pH は、各実験条件下で pH メーターを用いて測定した。

cAMP 濃度の測定

細胞を 2 mM EDTA を含む PBS でディッシュからはがし、洗浄後に 0.5 mM IBMX を含む HEM-PSS (pH 7.2) に懸濁した。常温で 15 分間処理して遠心後、フォルスコリンの存在下または非存在下で細胞を常温で 30 分間刺激し、反応停止には終濃度 1% Tween 20 を用いた。4°Cで一晩静置した後、上清に含まれる cAMP 濃度を PerkinElmer 社の AlphaScreen cAMP Functional Assay Kit と Fusion で検出した。

細胞数計測アッセイ

細胞を 5×10^4 個/ウェルの割合で 6 ウェルプレートに播き 36 時間培養した。その後、pH 6.4 または 7.4 の 0.1% BSA 含有 DMEM 培地に交換してさらに 36 時間培養した。2 mM EDTA/PBS で細胞を剥がし、細胞数を計測した。

チミジン取り込みアッセイ

細胞を 2×10^4 個/ウェルの割合で 96 ウェルプレートに播き 24 時間培養した。その後、pH 6.4 または 7.4 の 0.1% BSA 含有 DMEM 培地に交換してさらに 24 時間培養した時点で 0.25 μCi の [^3H]-メチルチミジンを加えた。8 時間の培養後、水で細胞を溶解して放出させたゲノム DNA を PerkinElmer 社の Unifilter-96-GF/C ガラスフィルターに吸着した。乾燥後のフィルターの放射能を 8 時間培養している間に取り込まれた [^3H]-メチルチミジン量に相当すると見なした。

細胞毒性アッセイ

細胞を 1×10^4 個/ウェルの割合で 96 ウェルプレートに播き 24 時間培養した。その後、pH 6.4 または 7.4 の 0.1% BSA 含有 DMEM 培地に交換してさらに 48 時間培養した。ここで培地を 10% の WST-8 塩溶液 (同仁社製 Cell Counting Kit-8) を含む 0.1% BSA/DMEM 培地に変え、90 分間発色させた。450 nm における吸光度をプレートリーダーで測定して発色の程度を定量した。

リン酸化 ERK の検出

細胞を 4×10^5 個/ウェルの割合で 6 cm ディッシュに播いた翌日に、培地を pH 6.4 または 7.4 の 0.1% BSA 含有 DMEM 培地に交換した。24 時間後に細胞を PBS で洗浄し、250 μl の溶解液 (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 50 mM グリセロリン酸, 1 mM Na_3VO_3 , 2 mM DTT, 5 mM 2-メルカプトエタノール, 1 \times プロテアーゼインヒビターカクテル [Roche 社製: Complete]) で溶解した。遠心上清のタンパク質濃

度を定量後、12% SDS-PAGE でタンパク質を展開し PVD 膜へ転写した。ウサギ抗 p44/p42 MAPK 抗体とセイヨウワサビペルオキシダーゼを結合した抗ウサギ IgG 抗体でリン酸化 ERK を検出した。

リン酸化 ERK の検出

Qiagen 社の RNeasy を使って総 RNA を抽出した。0.53 μ g の総 RNA を Invitrogen 社の SuperScript II で逆転写した。 β -アクチン、シクロオキシゲナーゼ-2 (Cox-2), マトリックスメタロプロテアーゼ-2 (MMP-2), MMP-9, 膜結合型 PGE 合成酵素-1 (mPGES-1), 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF), ケモカイン CXCL12, 低酸素誘導因子 1- α (HIF1- α), アンジオポエチン-2 (Ang-2), エピレグリン (EREG) の各 mRNA の発現レベルは Roche 社の LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I を使った定量的 PCR で求めた。すべてのプライマーセットはイントロンを挟んで設定し、コンタミネーションしたゲノム DNA に由来する PCR 産物が cDNA に由来する PCR 産物と同じ長さと同じにならないようにした。

肺転移実験

ハンクス緩衝液に 2.5×10^6 個/ml の割合で懸濁した LLC 細胞 200 μ l を 6-8 週齢の C57BL/6 雌マウスへ尾静脈投与した。14-19 日後、肺を取り出しホルマリン固定するか若しくは乾湿重量を測定した。固定した肺はパラフィン包埋後に切片を作製し、HE 染色を施した。

皮下注射実験

ハンクス緩衝液に 1.2×10^5 個/ml の

割合で懸濁した LLC 細胞 100 μ l を 6-8 週齢の C57BL/6 雌マウスの皮下へ投与した。その後に皮下に形成された腫瘍の大きさをノギスで計測した。腫瘍の体積は

$$0.4 \times \text{長径} \times \text{短径}^2$$

の式で求めた。

(倫理面への配慮)

マウスの実験は本学の動物実験委員会へ届けた上で、動物実験実施マニュアルに沿って行った。

C. 研究結果

TDAG8 安定発現細胞の樹立及びマウス癌モデル実験

多くの癌組織では TDAG8 だけでなく様々な GPCR が過剰発現していることが知られている。そこで研究を開始するにあたり、4 種類の細胞外 pH 感知性 GPCR のいずれもほとんど発現しておらず且つマウス癌モデルに適している細胞として C57BL/6J マウス由来の肺癌細胞である LLC 細胞を用いて TDAG8 の安定発現細胞を作製することにした (図 1)。

細胞膜上の発現状態をフローサイトメトリーにより確認するために、N 末端に HA エピトープタグが挿入された TDAG8 の発現ベクター (pCXN2.1) をリポフェクション法により遺伝子導入し、G418 による一次スクリーニン

TDAG8 G2A OGR1 GPR4 β -actin



図 1 LLC 細胞ではいずれの細胞外 pH 感知性 GPCR も mRNA レベルでは検出されなかった。

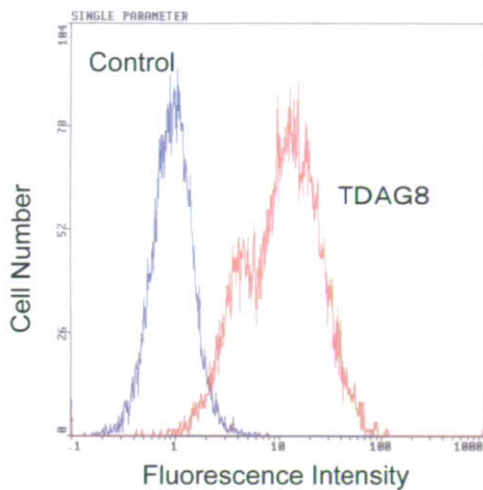


図2 TDAG8の安定発現 LLC 細胞を作製し、フローサイトメトリーにより発現レベルを確認した。

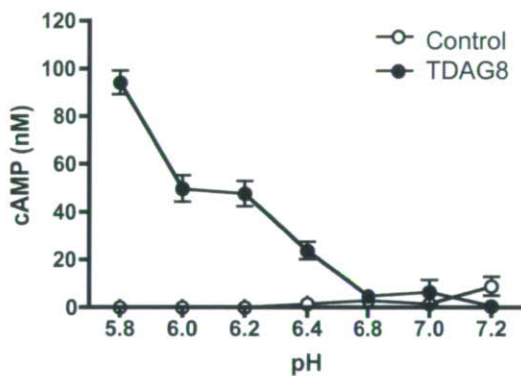


図3 TDAG8の安定発現 LLC 細胞は細胞外 pH 刺激に反応して cAMP の産生を促進した (n = 4)。

グを行った。続いて、得られた薬剤耐性細胞群を抗 HA 抗体で染色し、セルソーターを用いて、TDG8 高発現細胞群をポリクローナルとして回収した。またネガティブコントロールとして pCXN2.1 ベクターのみを導入した細胞群も同時に作製した。(以下、コントロール細胞と呼ぶ)。

得られた TDAG8 のポリクローナル安定発現細胞群の受容体発現レベルをフローサイトメトリーにより確認した

(図2)。この細胞の pH 刺激に対する cAMP 産生を測定したところ、以前に報告した通り、TDAG8 発現細胞は pH 依存的に cAMP の産生を増大させた(図3)。一方、コントロール細胞は酸性刺激への反応を示さなかった。以上の結果から LLC 細胞内で TDG8 が細胞外感知性 GPCR として機能していると判断し、癌モデルとして一般的なマウスへの癌細胞の尾静脈注射実験及び皮下注射実験により、TDAG8 と癌の関連を調べることにした。

LLC 細胞を C57BL/6J マウスに尾静脈注入し、19 日後に肺組織を観察した。コントロール細胞と比較して

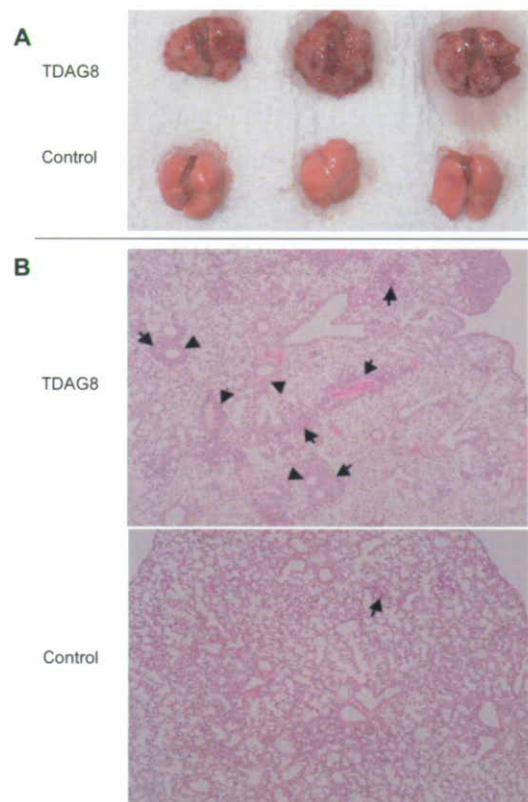


図4 A: LLC 細胞を静脈投与した 19 日後のマウス肺の様子。コントロール細胞とは対照的に TDAG8 発現細胞を注入したマウスの肺には、多くの腫瘍が形成されていた。B: 肺のヘマトキシリン・エオジン染色切片。気管支周囲(矢頭)や血管周囲(矢印)に転移結節が認められ、その数は TDAG8 細胞を投与されたマウスの肺で顕著に多かった。

TDAG8 安定発現細胞を注入したマウスでは肺における腫瘍形成が著しく促進していた (図 4A)。更に肺組織のパラフィン切片の HE 染色により、TDAG8 安定発現細胞を注入したマウスにおいて肺内部の腫瘍の形成も促進

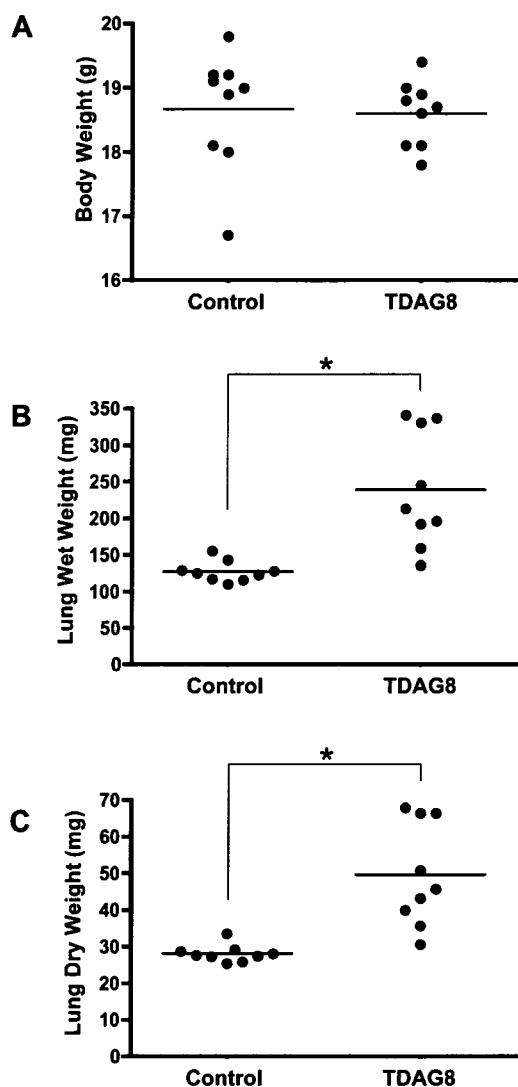


図 5 コントロール LLC 細胞または TDAG8 安定発現 LLC 細胞を尾静脈から投与し、19 日後に肺重量及び体重を測定した。A: マウスの体重。コントロール細胞及び TDAG8 安定発現細胞投与マウス間に差はなかった。B: 肺の湿重量。コントロール細胞投与マウスと比べて TDAG8 安定発現細胞投与マウスの肺は有意に重かった ($P < 0.001$ by Mann-Whitney Test)。C: 肺の乾燥重量。やはり TDAG8 安定発現細胞投与マウスの方が有意に重かった ($P < 0.001$ by Mann-Whitney Test)。各点は 1 匹のマウスを示す。

していることが分かった (図 4B)。また体重には差はなかったものの、肺の湿重量及び乾燥重量には有意な差が見られた (図 5)。この実験に加えて、同条件で LLC 細胞を投与したマウスの致死率について時間経過を追う実験も行い、TDAG8 安定発現細胞を投与したマウスの方が有意に生存期間は短いという結果が得られた (図 6)。さらに TDAG8 の腫瘍増殖亢進へのより幅広い関与を検討するために皮下注射実験を行った。コントロール細胞と比較して TDAG8 安定発現細胞を注入したマウスでは腫瘍形成が有意に促進された (図 7)。このように LLC 細胞に TDAG8 を過剰発現させると尾静脈注射モデルだけでなく、皮下注射モデルにおいて瘍形成が促進されたことから、以下の実験でこの現象のメカニズムを解析することにした。

酸性条件における TDAG8 の細胞増殖促進能

TDAG8 は細胞外 pH 感知性受容体である。従って腫瘍の形成に伴う周辺

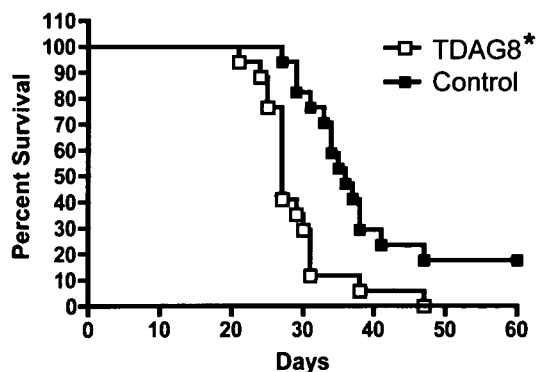


図 6 コントロール細胞または TDAG8 安定発現細胞をマウスの尾静脈から投与し、致死率の経過を追った。TDAG8 安定発現細胞投与マウスの致死率はコントロール細胞投与マウスと比べて有意に高かった (* $P < 0.001$ by Log-rank Test, $n = 17$)。

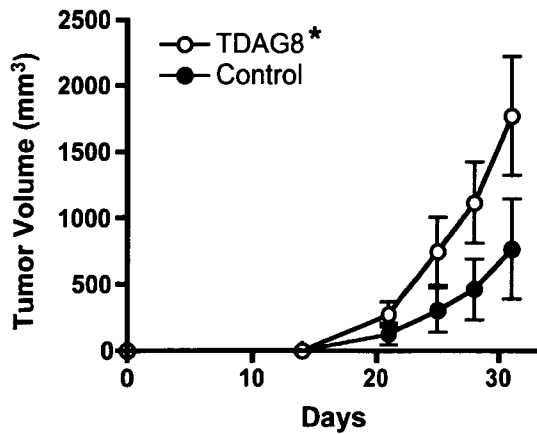


図7 LLC細胞皮下注射後の腫瘍形成の経過を追った。TDAG8安定発現細胞投与マウスの腫瘍はコントロール細胞投与マウスの腫瘍と比べて有意に大きかった (* $P < 0.05$ by Repeated-measures ANOVA, $n = 10$)。

環境の酸性化がTDAG8を活性化し、発現細胞に何らかの影響を与えていると考えられる。そこでLLC細胞を *in vitro* で酸性刺激したときの細胞の反応を解析することにした。

酸性条件での細胞の増殖能を評価するため、細胞を異なるpHの0.1%BSA培地で2日間培養し、細胞数を計測した。中性条件(pH 7.4)に比べ、酸性条件(pH 6.4)ではLLC細胞の増殖は抑制されるものの、TDAG8安定発現細胞はコントロール細胞よりも有意に増殖能が高かった(図8)。一方で中性条件における増殖には差は見られなかった。チミジンの取り込み及び細胞毒性を観察する実験においても、酸性条件下でTDAG8安定発現細胞はコントロール細胞よりも有意に細胞増殖能が高いことが確認された(図9)。

次に酸性条件下における増殖能の維持にどの細胞内シグナル経路が関与しているかを様々なキナーゼ阻害剤を用いた細胞毒性アッセイで調べた。中性

条件または酸性条件下におけるコントロール細胞とTDAG8安定発現細胞のキナーゼ阻害剤への感受性を比較することにした。その結果、図10に示すように酸性条件下でPKA, MEK1/2の阻害剤であるH-89, U0126で細胞を処理した場合、TDAG8安定発現細胞の細胞増殖能はコントロール細胞と比較してより大きく減少した。一方で、それぞれPI3K, Akt, mTORの働きを阻害するLY294002, Akt inhibitor V, ラパマイシンによる細胞増殖能抑制効果はTDAG8安定発現細胞、コントロール細胞共に同程度であったことから、これらのキナーゼは酸性条件下でのTDAG8の細胞増殖促進効果にはそれ

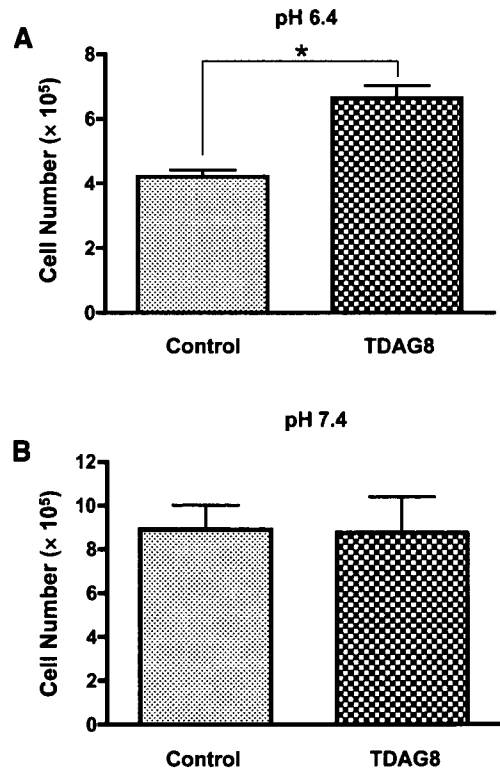


図8 LLC細胞をpH 6.4または7.4の0.1%BSA含有培地で培養し細胞数を計測した($n = 3$)。A: pH 6.4での培養。TDAG8安定発現細胞の数はコントロール細胞の数よりも有意に多かった (* $P < 0.01$ by t-test)。B: pH 7.4での培養。この条件では細胞数に差は見られなかった。

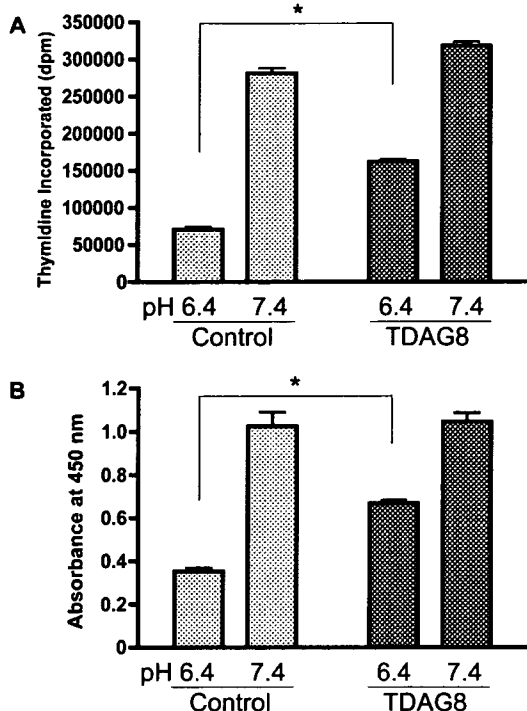


図9 LLC細胞をpH 6.4または7.4の0.1%BSA含有培地で培養し、細胞の増殖能を評価する以下の二つの実験を行った。A: チミジンの取り込みアッセイ。pH 6.4において、TDAG8安定発現細胞は有意にコントロール細胞よりもチミジンの取り込み量は多かった(* $P < 0.01$ by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test, $n = 4$)。B: 細胞毒性アッセイ。pH 6.4において、TDAG8安定発現細胞のミトコンドリア代謝活性はコントロール細胞に比べて有意に高かった(* $P < 0.01$ by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test, $n = 5$)。

ほど大きな役割は果たしていないと考えられた。なお、中性条件すなわちTDAG8がほとんど活性化されていない条件でもERKとPKAがLLC細胞の増殖に重要

であることが示唆された(データ略)。

続いて、実際にERKがTDAG8の下流で機能しているかどうかをタンパク質レベルで確認するために、リン酸化ERKレベルをウエスタンブロット法により観察した。コントロール細胞では酸性条件でリン酸化ERKの減少が見られたが、TDAG8安定発現細胞では中性条件とほぼ同レベルであった(図11A)。また、PKA阻害剤H-89を培地に添加することにより、TDAG8安定発現細胞の酸性条件下でのリン酸化ERKレベルは劇的に減少した(図11B)。PKAはRafアイソフォーム(B-Raf)の有無によりERKシグナル経路を活性化もしくは抑制することが知られている(図12A)。すなわち、PKAはB-Rafを発現しない細胞ではRap1を活性化することによりRasによるRaf-1の活性化を抑制し、結果としてERKのリン酸化を阻害する。一方、B-Rafを発現する細胞ではPKAはRap1を介してB-Rafを活性化しその結果ERKのリン酸化が促進される。そ

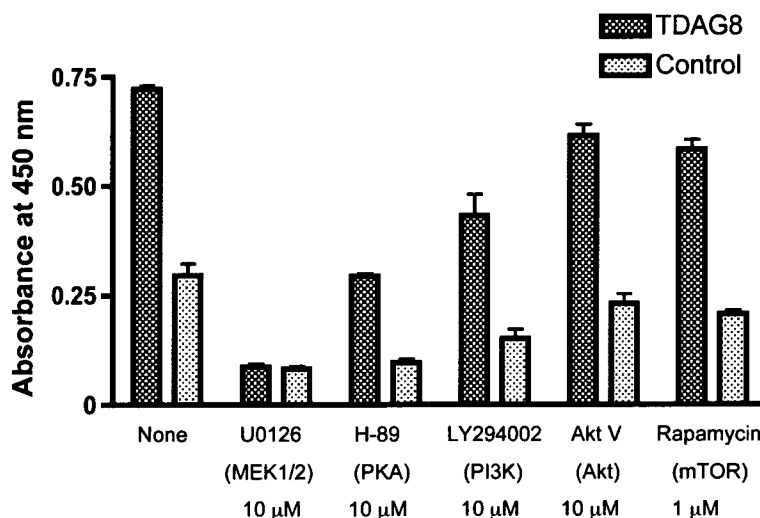


図10 細胞毒性実験により阻害剤のスクリーニングを行った。pH 6.4の培養条件下において各種キナーゼ阻害剤でLLC細胞を処理した(括弧内は標的蛋白を示す)。U0126及びH-89はTDAG8安定発現細胞の細胞増殖活性をコントロール細胞と比較してより大きく減少させた($n = 3$)。

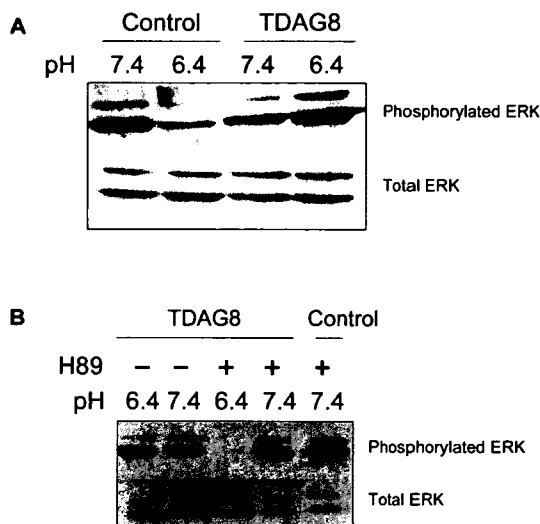


図 11 A: 種々の条件で刺激した LLC 細胞のリン酸化 ERK をウエスタンブロッティングにより観察した。pH 6.4 における TDAG8 発現細胞のリン酸化 ERK レベルはコントロール細胞と比較して高かった。B: pH 6.4 における TDAG8 発現細胞のリン酸化 ERK は 10 μ M H-89 処理ではほぼ消失した。

ここで PCR 法を用いたところ、LLC 細胞は B-Raf を発現していることが分かった (図 12B)。以上の結果から TDAG8 の過剰発現は酸性条件における LLC 細胞の生存・増殖を促進すること、そ

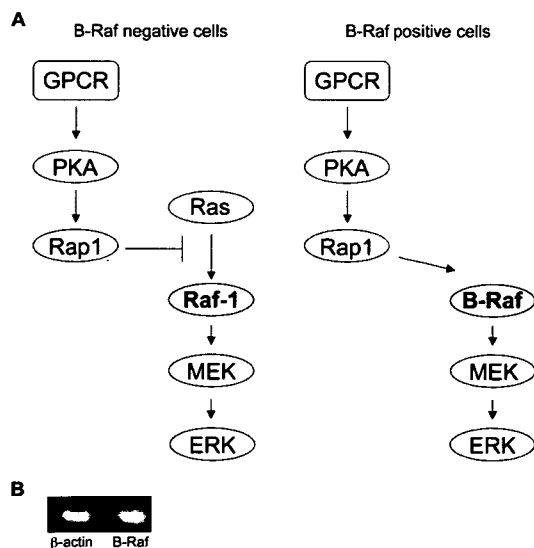


図 12 A: B-Raf 陰性細胞 (左) では PKA は ERK の活性化を抑制し、B-Raf 陽性細胞 (右) では ERK を活性化する。B: LLC 細胞における B-Raf mRNA の発現を PCR により確認した。

のシグナル経路として PKA を介した ERK の活性化が必要であることが示唆された。

TDAG8 を介した遺伝子発現誘導の解析

癌細胞内のシグナル経路が活性化されることにより、Cox-2, VEGF, PDGF, MMP などの遺伝子の発現が上昇し、増悪化を促すことはよく知られている。そこで、TDAG8 発現 LLC 細胞及びコントロール LLC 細胞を酸性条件で培養し、総 RNA を回収した後に定量的 RT-PCR 法によって種々の癌関連遺伝子の発現変動を解析した。その結果、酸性条件で TDAG8 安定発現細胞における Cox-2 の mRNA 発現誘導はコントロール細胞と比べて有意に促進されることが示された (表 2)。mPGES-1 及び MMP-2 も発現上昇が見られたのに対して、iNOS, CXCL12, VEGF, MMP-9, EREG の mRNA 発現レベルは刺激前後で特に変化は見られなかった (表 3)。続いて TDAG8 安定発現細胞及びコントロール細胞を尾静脈投与し、19 日後に肺から総 RNA を抽出した。先の実験と同様に定量的 RT-PCR 法で Cox-2 と β -アクチンの発現量を調べたところ、 β -アクチンには大きな差がなかったのに対して、Cox-2 の発現は TDAG8 安定発現細胞投与マウスの方が有意に多かった (図 13)。これらの結果から、*in vitro* および *in vivo* において TDAG8 は Cox-2 の遺伝子発現を促進することが明らかになった。また、同様に肺から脂質を抽出し、質量分析による定量を行ったところ、Cox-2 が産生に関わる PGE₂ と PGI₂ の