

最近、遺伝学的アプローチにより $p2y_5$ がヒトの毛髪成長異常原因遺伝子であることが報告され、 $p2y_5$ が LPA の受容体であることも併せて示唆された (Pasternack *et al.* (2008) *Nat Genet* 40, 329-334)。グリセロール骨格の *sn*-2 位に脂肪酸を結合した 2-アシル LPA の産生酵素である mPA-PLA1 の変異も $p2y_5$ の変異と同様の毛髪異常につながることから、 $p2y_5$ の天然アゴニストとして 2-アシル型 LPA は 1-アシル LPA よりも強力である可能性が高い。そこで、上述した G_s と G_{13} のキメラタンパク質を発現させて cAMP 産生を観察するアッセイ

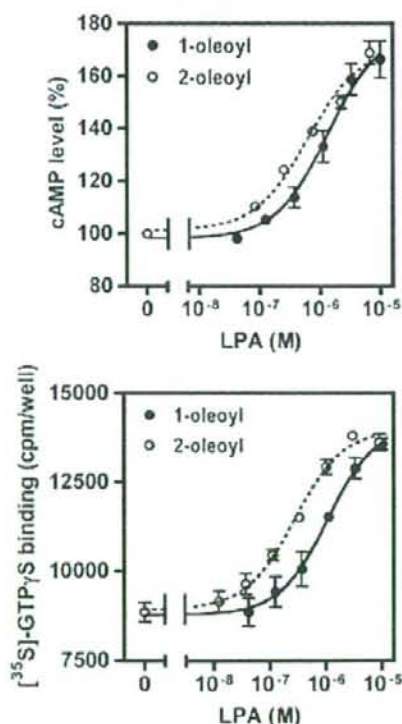


図 2-7 $p2y_5$ のリガンド選択性。1-オレオイル LPA と 2-オレオイル LPA のアゴニストとしての活性を、 G_s/G_{13} キメラタンパク質を発現する B103- $p2y_5$ 細胞における cAMP 産生 (上) と RH7777- $p2y_5$ 細胞の細胞膜画分への GTP γ S 結合 (下) について検討した。n = 3。

系を利用して、この点についての検討を行った。図 2-7 に示すように、2-オレオイル LPA が 1-オレオイル LPA に比べて $p2y_5$ のより強いアゴニストとして機能することがわかった。

オレイン酸以外の脂肪酸が結合した LPA について、 $p2y_5$ のアゴニストとしての活性を検討したところ、1-アシル LPA でも 2-アシル LPA でもアラキドン酸が結合した LPA はオレイン酸が結合した LPA よりも活性弱く、逆にリノール酸が結合した LPA はより強いことが明らかになった (データ略)。

HUVEC 内在性の $p2y_5$ を介した LPA による細胞形態変化

ここまでの実験では培養細胞に外来性の $p2y_5$ を発現した条件で行い、この GPCR の機能を解析してきた。そこで次に、細胞に内在的に発現する $p2y_5$ の機能を解析することとした。HUVEC は LPA 刺激により Rho の活性化を起こすことが論文報告されている。これに加え、トランスクリプトームデータベース (東京大学システム生物医学データベースシステム) には HUVEC における $p2y_5$ mRNA の高い発現が示されている。このことから我々は、 $p2y_5$ を内在的に発現する細胞として HUVEC を解析対象に選び、この細胞の形態に対する $p2y_5$ の機能を調べた。もともと扁平型の HUVEC は LPA に反応して球形に細胞形態を急速に変化させた (図 2-8A)。細胞の形態変化を客観的に評価するために Roche 社の xCELLigence というシステムで細胞とディッシュの間の抵抗値に相当する "Cell Index" を計った。

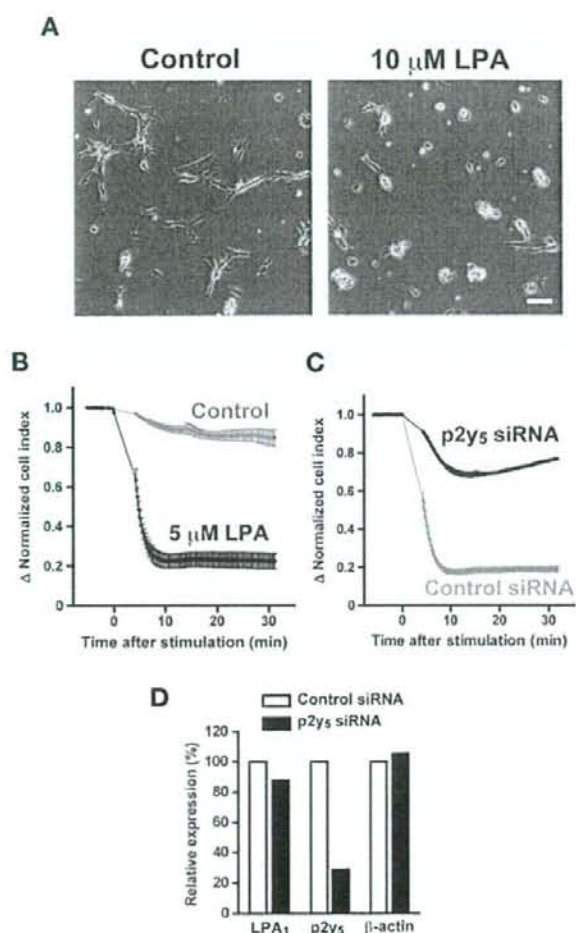


図 2-8 A. HUVEC 内在性の p2y₅ を介した LPA による細胞形態変化。3% BSA に溶解した 5 mM 1-オレオイル LPA を血清飢餓状態の HUVEC に加え、LPA の終濃度 10 μ M で刺激した。30 分後に 2% パラホルムアルデヒドで固定したときの細胞の退縮の様子を示す。“Control”には溶媒 (3% BSA) のみを投与した。横方向のバーは 50 μ m を表す。B. xCELLigence システムを用いた細胞形態変化の定量的解析。血清飢餓状態で培養した HUVEC を 5 μ M LPA で刺激したときの “Cell Index” の時間変化。“Control”には溶媒 (3% BSA) のみを投与した。n = 6。C. siRNA による p2y₅ の関与の検討。p2y₅ siRNA またはコントロール siRNA をトランスフェクションした HUVEC を血清飢餓状態で培養し、B. と同様の実験を行った。n = 6。D. siRNA が LPA 受容体 mRNA 発現レベルへ及ぼす影響。p2y₅ siRNA をトランスフェクションした HUVEC の LPA1、p2y₅、 β -アクチンの mRNA レベルを、コントロール siRNA をトランスフェクションした細胞のレベルと比較した値を示す。mRNA レベルは定量的 PCR 法で求めた。n = 2。

LPA 刺激後に Cell Index 値は急速に低下し、しかも細胞形態変化観察のときと同等の時間経過を辿った (図

2-8B)。この LPA による細胞形態変化は、先に述べた p2y₅ を発現する B103 細胞で観察されたものと似ており (図 2-3A)、p2y₅ が関わる可能性が考えられた。そこで、siRNA によって HUVEC 内の p2y₅ mRNA レベルを低下させたときの LPA への反応を xCELLigence システム観察した。ネガティブコントロールの siRNA を導入された HUVEC では、LPA によって細胞が球形になることに起因すると思われる抵抗値の急激な低下が起きた (図 2-8C)。一方で p2y₅ の siRNA を導入された HUVEC では LPA による抵抗値の低下は大きく抑制された。この結果は内因性の p2y₅ もまた細胞の形態を調節する機能をもつことを強く示唆する。なお、p2y₅ siRNA のトランスフェクションにより、HUVEC における p2y₅ mRNA の発現レベルが大きく低下した一方で、LPA₁ mRNA の発現量はほとんど影響を受けなかったことを定量的 PCR によって確認した (図 2-8D)。

2-D. 考察

本研究では、³H]-LPA の結合実験及び ³⁵S]-GTP γ S

結合実験により、オーファン GPCR の p2y₅ が新規 LPA 受容体であることを明らかにした。図 2-1 に示すように

p2y₅ は LPA₄ と最も高い相同性(56%)を示すオーファン GPCR であったことから、LPA 受容体であることが期待されたが、我々の以前の細胞内シグナル伝達の観察(Ca 応答とアデニル酸シクラーゼの活性変化)や³H]-LPA 結合実験の結果がすべてネガティブであったため、LPA の受容体である可能性は低いと考えていた。本研究での詳細な解析によりはじめて、p2y₅ は G₁₃ タンパク質と共役して細胞形態を調節するが、Ca 応答やアデニル酸シクラーゼの活性変化を引き起こさず、LPA に対する親和性も低いという独特の特徴を持つ LPA 受容体であることが明らかになった。

以前に行った³H]-LPA 結合実験では、p2y₅ を一過性に発現する RH7777 細胞の膜画分を用いて、特異的結合は検出できなかった。ちなみに、LPA₃ を除く 4 つの LPA 受容体については、同じ実験条件で³H]-LPA の特異的結合は明確に検出できている (Kd 値: 60-100 nM; データ略)。一方、今回は p2y₅ を高いレベルで安定発現する細胞を用いたところ、³H]-LPA の特異的結合が僅かではあるが観察できた。今回の実験の方が受容体の発現レベルの高いからなのか、それとも安定発現した p2y₅ の方が一過性発現したものよりも親和性が高いからなのか、その明確な理由は明らかでない。いずれにせよ p2y₅ の LPA 親和性は低く、Kd 値の算出はできなかった。

[³⁵S]-GTPγS 結合は G タンパク質における GDP/GTP 交換反応に基づいた現象であり、GPCR がアゴニストによって活性化されたことを意味する。

一過性発現と安定発現のどちらの実験条件においても、p2y₅ が LPA 依存的に [³⁵S]-GTPγS を細胞膜画分へ結合させたことは、p2y₅ が LPA 受容体であることを支持した結果であると考えられる。

p2y₅ が G₁₃ タンパク質と Rho を介して細胞形態を調節することを、p2y₅ を安定発現させた B103 細胞や RH7777 細胞で示した。これと矛盾しない結果が、内在的に p2y₅ を発現する HUVEC の解析でも得られた。すなわち、p2y₅ の活性化は HUVEC の退縮に至った。この結果は、p2y₅ が血管内皮細胞における形態変化を通して血管透過性の調節因子として働く可能性を示している。

p2y₅ のリガンド指向性に関しては 2-アシル LPA の方が 1-アシル LPA よりも高く、この結果は毛包の内根鞘に発現する p2y₅ の欠損が毛髪成長異常に至ることと矛盾しないと思われた。加えて、やはり毛包の内根鞘に発現し、2-アシル LPA を産生する酵素 mPA-PLA1 の欠損が同様の毛髪成長異常に至ることとも矛盾しない。毛包の内根鞘に含まれる LPA が実際にどのような組成なのかを明らかにすることは興味深い。

2-E. 結論

LPA は多彩な生理機能を発揮する脂質メディエーターであるが、現在までに 5 種類の GPCR (LPA₁-LPA₅) が明らかになっていた。本研究の結果は p2y₅ の生物学的機能の一端を明らかにしたと同時に、p2y₅ が第 6 番目の LPA 受容体 LPA₆ と命名できる分子であることを示した。今後の更なる LPA₆

の解析によって毛髪成長や血管透過性に関する詳細なメカニズムはもとより、このGPCRの別の生物学的機能を解明することを目指したい。

3) 細胞外pH感知性GPCR TDAG8の癌の進展における機能解析

3-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

	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 3-1 4種の細胞外pH感知性GPCRの特徴

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 は多彩なリ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我々は突きとめている。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、解糖系の活発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。

3-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 μ Ci の [3 H]-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 [3 H]-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 μ l 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



図 3-1 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。

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。その後皮下に形成された腫瘍の大きさをノギスで計測した。

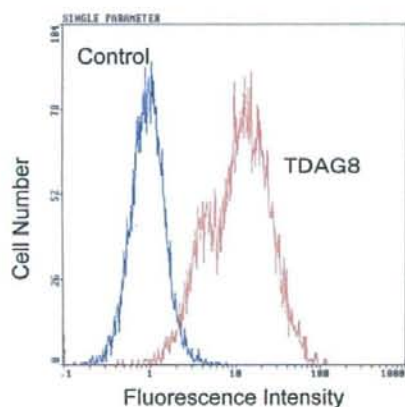


図 3-2 TDAG8 の安定発現 LLC 細胞を作製し、フローサイトメトリーにより発現レベルを確認した。

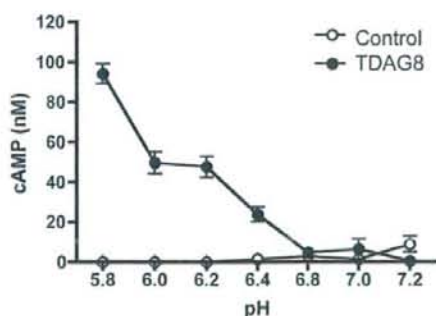


図 3-3 TDAG8 の安定発現 LLC 細胞は細胞外 pH 刺激に反応して cAMP の産生を促進した ($n = 4$)。

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。

3-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

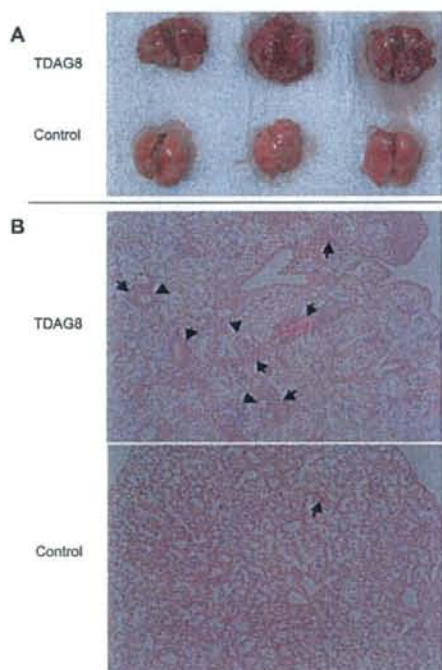


図 3-4 A: LLC 細胞を静脈投与した 19 日後のマウス肺の様子。コントロール細胞とは対照的に TDAG8 発現細胞を注入したマウスの肺には、多くの腫瘍が形成されていた。B: 肺のヘマトキシリン・エオジン染色切片。気管支周囲 (矢頭) や血管周囲 (矢印) に転移結節が認められ、その数は TDAG8 細胞を投与されたマウスで顕著に多かった。

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 3-1)。

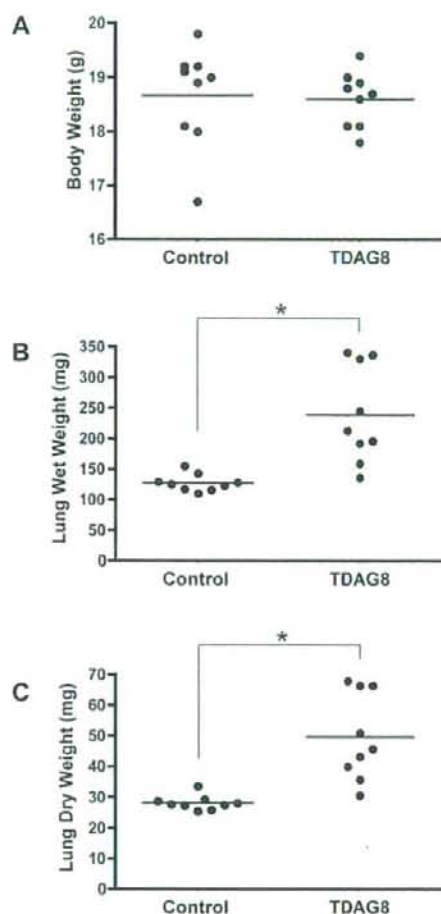


図 3-5 コントロール LLC 細胞または TDAG8 安定発現 LLC 細胞を尾静脈から投与し、19 日後に肺重量及び体重を測定した。A: マウスの体重。コントロール細胞及び TDAG8 安定発現細胞投与マウス間に差はなかった。B: 肺の湿重量。コントロール細胞投与マウスと比べて TDAG8 安定発現細胞投与マウスの肺は有意に重かった ($P < 0.001$ by Mann-Whitney Test)。C: 肺の乾燥重量。やはり TDAG8 安定発現細胞投与マウスの方が有意に重かった ($P < 0.001$ by Mann-Whitney Test)。各点は 1 匹のマウスを示す。

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、TDAG8 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 3-2)。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 3-3)。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 TDAG8 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 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 3-4A)。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

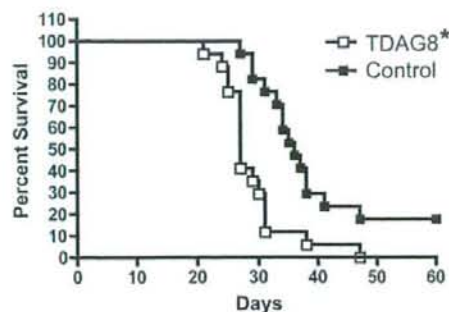


図 3-6 コントロール細胞または TDAG8 安定発現細胞をマウスの尾静脈から投与し、致死率の経過を追った。TDAG8 安定発現細胞投与マウスの致死率はコントロール細胞投与マウスと比べて有意に高かった (* $P < 0.001$ by Log-rank Test, $n =$

していることが分かった (図 3-4B)。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 3-5)。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 3-6)。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 3-7)。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

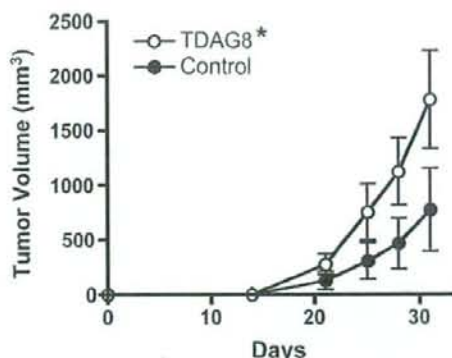


図 3-7 LLC 細胞皮下注射後の腫瘍形成の経過を追った。TDAG8 安定発現細胞投与マウスの腫瘍はコントロール細胞投与マウスの腫瘍と比べて有意に大きかった (* $P < 0.05$ by Repeated-measures ANOVA, $n = 10$)。

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 3-8)。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 3-9)。

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

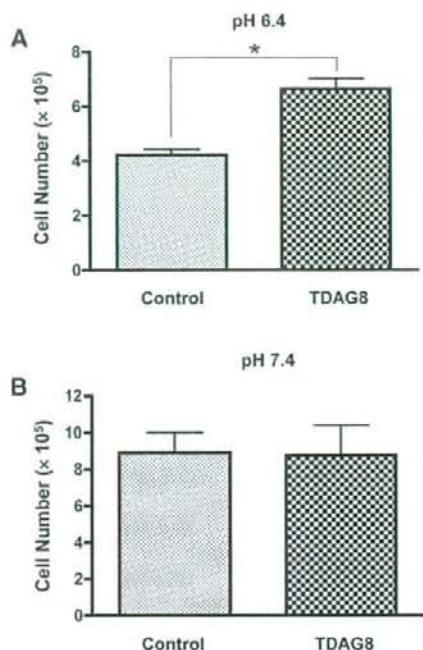


図 3-8 LLC 細胞を pH 6.4 または 7.4 の 0.1%BSA 含有培地で培養し細胞数を計測した ($n=3$)。A: pH 6.4 での培養。TDAG8 安定発現細胞の数はコントロール細胞の数よりも有意に多かった ($*P < 0.01$ by t -test)。B: pH 7.4 での培養。この条件では細胞数に差は見られなかった。

条件または酸性条件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 3-10 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

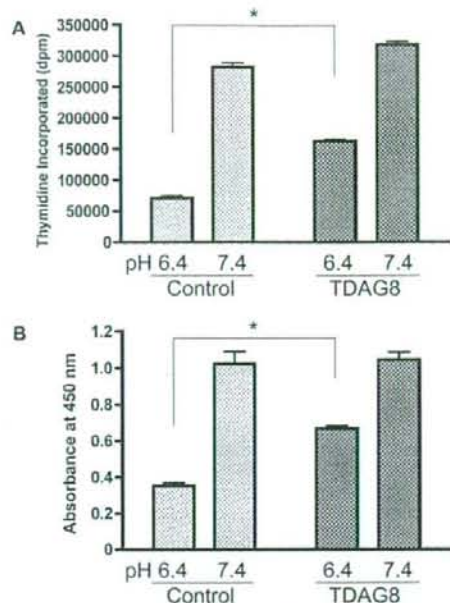


図 3-9 LLC 細胞を pH 6.4 または 7.4 の 0.1%BSA 含有培地で培養し、細胞の増殖能を評価する以下の二つの実験を行った。A: チミジンの取り込みアッセイ。pH 6.4 において、TDAG8 安定発現細胞は有意にコントロール細胞よりもチミジンの取り込み量は多かった ($*P < 0.01$ by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test, $n=4$)。B: 細胞毒性アッセイ。pH 6.4 において、TDAG8 安定発現細胞のミトコンドリア代謝活性はコントロール細胞に比べて有意に高かった ($*P < 0.01$ by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test, $n=5$)。

TDAG8 の細胞増殖促進効果にはそれ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 3-11A)。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 3-11B)。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 3-12A)。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 3-12B)。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

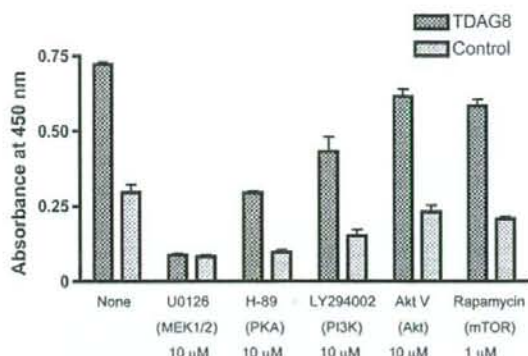


図 3-10 細胞毒性実験により阻害剤のスクリーニングを行った。pH 6.4 の培養条件下において各種キナーゼ阻害剤で LLC 細胞を処理した (括弧内は標的蛋白を示す)。U0126 及び H-89 は TDAG8 安定発現細胞の細胞増殖活性をコントロール細胞と比較してより大きく減少させた ($n=3$)。

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較べて有意に促進されることが示された (表 2)。

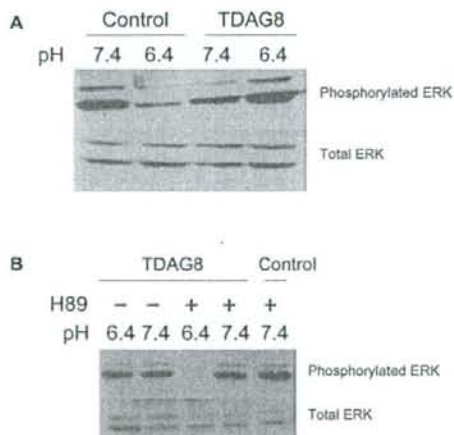


図 3-11 A: 種々の条件で刺激した LLC 細胞のリン酸化 ERK をウエスタンブロットングにより観察した。pH 6.4 における TDAG8 発現細胞のリン酸化 ERK レベルはコントロール細胞と比較して高かった。B: pH 6.4 における TDAG8 発現細胞のリン酸化 ERK は 10 μM H-89 処理ではほぼ消失した。

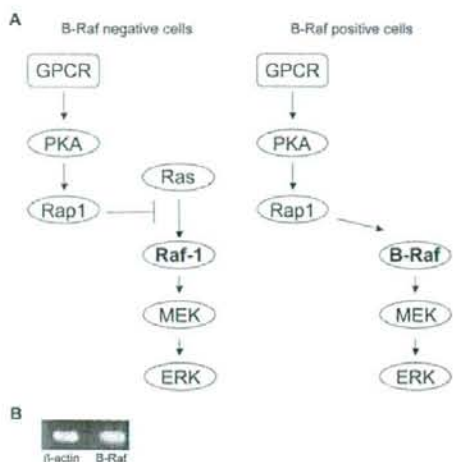


図3-12 A: B-Raf 陰性細胞(左)では PKA は ERK の活性化を抑制し、B-Raf 陽性細胞(右)では ERK を活性化する。B: LLC 細胞における B-Raf mRNA の発現を PCR により確認した。

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3-13)。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 の含有量が TDAG8 安定発現細胞投与マウスにおいて有意に高かった(図3-14)。

Cox-2 の発現誘導が TDAG8 安定発現細胞の増殖に直接関与しているかを調べるために、Cox-2 の阻害剤である NS-398 を用いて細胞毒性アッセイを行った。その結果、pH 6.4 及び 7.4 のいずれの場合も濃度依存的に細胞増殖が阻害されたものの、pH が 6.4 でも 7.4 でも NS-398 への感受性に明らかな違いは認められなかった(図3-15)。また、PGE₂ の添加は酸性条件でのコントロール細胞の増殖に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、Cox-2 は LLC 細胞の増殖には強く関与していないと考えられる。

TDAG8	β-actin		Cox-2		Control	β-actin		Cox-2	
pH6.4 - 0h		20.44		21.52	pH6.4 - 0h		19.81		21.82
	4h	20.68		20.8		4h	19.83		22.53
	24h	19.82		19.05		24h	21.2		21.99
pH7.4 - 0h		20.41		21.55	pH7.4 - 0h		19.33		22.82
	4h	19.89		24.66		4h	19.96		25.42
	24h	21.49		22.21		24h	20.29		24.79

表3-2 LLC 細胞を pH 6.4 又は 7.4 の 0.1%BSA 含有 DMEM 培地で各時間培養し、抽出した総 RNA を逆転写した後に定量的 PCR 法により Cox-2 の mRNA 量を測定した。酸性条件ではコントロール細胞と比較して TDAG8 安定発現細胞において Cox-2 の誘導が促進された。数字は Crossing Point を表す。これは定量的 PCR 時において、設定した閾値レベルを越えたときのサイクル数である。この値が低いほど mRNA の量は多いことを意味する。PCR の理論に照らし合わせると、立ち上がりが 1 サイクル早いと、mRNA の量はおよそ 2 倍量存在すると考えられる。

		MMP-2	MMP-9	VEGF	EREG	mPGES1
TDAG8	0h	25.86	34.84	23.33	26.49	24.64
	4h	26.81	34.77	25.13	26.53	26.2
	24h	23.79	34.74	23.86	25.59	21.87
Control	0h	24.76	34.71	23.6	26.77	23.55
	4h	24.69	33.93	25.84	26.89	24.44
	24h	25.04	32.33	24.48	27.02	24.94

表 3-3 酸性条件下で培養した TDAG8 安定発現細胞では MMP-2 と mPGES-1 の遺伝子発現も増強された。数字は Crossing Point を表す。

3-D. 考察

癌細胞の増殖は、しばしば必要な血管新生を上回る速度に達する。加えて、

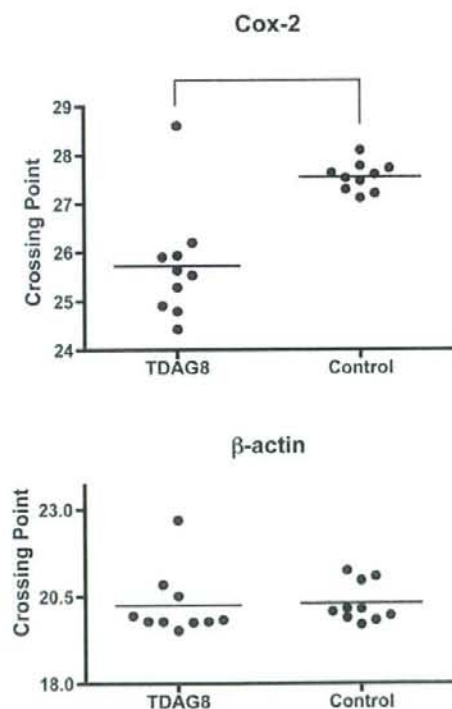


図 3-13 マウスに TDAG8 安定発現細胞またはコントロール細胞を尾静脈投与し、19 日後に肺を回収し総 RNA を抽出した。逆転写後に定量的 PCR 法で Cox-2 と β-actin の mRNA 発現量を調べた。β-actin mRNA には大きな差がなかったのに対して、Cox-2 mRNA の発現は TDAG8 安定発現細胞投与マウスの方が有意に高かった (*P < 0.01 by Mann-Whitney test)。

癌細胞における血管新生は総じて不完全でありその血管網は無秩序・脆弱であることから一時的な血流遮断が頻繁に起こる。また、発癌及び転移生着の初期においては基底膜を超えて血管は進入してこない。これらの要因により癌細胞とその周辺部位は必然的に低酸素・栄養状態に陥る。低酸素状態に引き続いて腫瘍部位が次第に酸性に移行していくことは古くから知られている。低酸素状態は解糖系関連酵素を誘導し、エネルギー産生が解糖系にシフトする結果、乳酸などの解糖系代謝物が産生されることが主な原因であると考えられている。腫瘍部位における酸性状態は様々な遺伝子発現を促すという報告が多数ある。例えば、マウス B16 メラノーマでは MMP-9 の発現が上昇する。また、ヒト乳ガン細胞では PDGF の発現誘導が、神経膠腫では誘導型一酸化窒素合成酵素が、卵巣腫瘍ではインターロイキン-8 がそれぞれ誘導されるという報告がある。しかしながら酸性状態に特異的な腫瘍細胞の増殖機構や細胞外酸性環境の感知機構については未だ詳細は明らかになってない。

本研究では、細胞外 pH 感知性受容体である TDAG8 を LLC 細胞に安定発

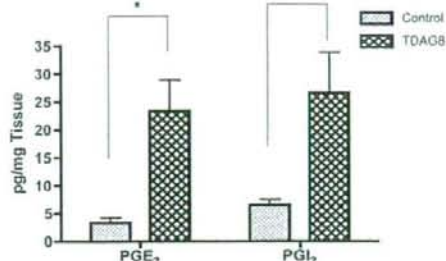


図 3-14 図 13 と同様にして回収した肺組織から脂質を抽出して質量分析計で定量したところ、コントロール細胞投与マウスと比べて TDAG8 安定発現細胞投与マウスの PGE₂ と PGI₂ 含有量は有意に高かった (*P < 0.05 by Mann-Whitney test, n = 10)。

現させ、マウスの尾静脈に投与した結果、TDAG8 が肺での腫瘍形成を促進することを見いだした。また同様の腫瘍形成促進は皮下注射モデルにおいても観測されたことから、TDAG8 は多岐に渡る腫瘍形成を促進することが考えられる。TDAG8 はヒト腫瘍組織で発現の亢進が見られ、細胞が酸性環境に曝されることで活性化される GPCR であると考えられる。従って今回観察した現象は酸性状態において TDAG8 が活性化され、その結果癌転移・腫瘍形成の過程に深く関わっていることを強く示唆している。そこでその分子メカニズム解析を *in vitro* で行った。

癌転移・腫瘍形成において最も重要な要因の一つは増殖能の促進である。酸性条件における LLC 細胞の増殖は TDAG8 を過剰発現させることにより亢進した。この増殖能は PKA, ERK 依存的であり、PI3K, Akt, mTOR はあまり関与していないことが示唆された。さらに PKA 阻害剤を用いた ERK リン酸化実験により ERK は PKA を介して活性化されていることが分かった。B-Raf を有する細胞では、GPCR のシ

グナル伝達経路において、ERK が PKA を介して活性化されることが知られている。PCR により LLC 細胞は B-Raf を mRNA レベルで発現していることが示された。また、cAMP 産生能を欠損した TDAG8 の変異体は酸性条件下の細胞増殖活性を有さず、癌転移モデルにおいても症状は劇的に緩和されていた。以上のことから、おそらく TDAG8 のシグナル経路において PKA は ERK の上流に位置し、細胞増殖能の維持に関与していると考えられる。実際 Ras-ERK 経路の活性化は腫瘍形成において主要な経路であることが報告されている。一方で、GPCR が

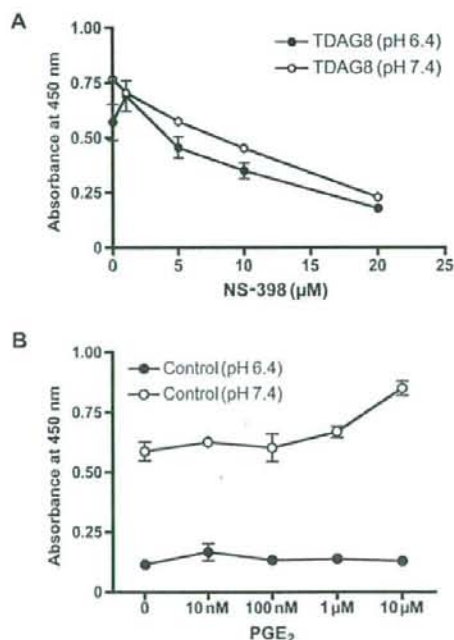


図 3-15 Cox-2 の選択的阻害剤 NS-398 および PGE₂ の細胞増殖への効果を調べた。A: pH 6.4 及び 7.4 のいずれの条件下においても TDAG8 安定発現細胞では NS-398 濃度依存的な細胞増殖能の低下が観測された (n = 5)。B: pH 6.4 及び 7.4 でコントロール細胞を PGE₂ 存在下で培養したが、pH 6.4 において増殖促進効果は見られなかった (n = 5)。

EGFR などのチロシンキナーゼ型受容体を介して ERK 経路を刺激している報告もある。EGFR シグナルが TDAG8 のシグナル経路に関与しているかは明らかではなく、PKA との関連も不明である。従って今後詳細なシグナル解明が必要であると考えている。

TDAG8 を LLC 細胞に過剰発現させた場合、コントロール細胞と比較して酸性条件培養下での増殖に差が見られた一方で、中性（無刺激）条件ではほとんど差が見られなかった。また、TDAG8 変異体発現細胞では野生型 TDAG8 発現細胞で見られた酸性条件下での増殖維持能は大幅に減弱した。これらの結果から、今回観測された現象は TDAG8 を過剰発現させたことによる酸性刺激非依存的な ERK の活性化を見ているわけではなく、TDAG8 の細胞外 pH 感知機能を介した酸性刺激依存的な活性化が起きていることを強く支持していると言える。

in vitro での解析により、酸性刺激によって mPGES-1, MMP-2, Cox-2 等の癌関連遺伝子の mRNA は TDAG8 により発現が促進した。さらに、TDAG8 安定発現 LLC 細胞を尾静脈投与したマウスの肺組織においてもコントロール細胞投与マウスと比較して、Cox-2 の mRNA レベルは亢進していた。また、同様の肺組織から抽出した脂質の解析から PGE₂ と PGI₂ の含有量にも有意な差が見られた。Cox-2 は様々な癌に深く関与することが知られている。PGE₂ は PGE 受容体を介した増殖経路の活性化やケモカインなどの発現誘導により細胞の浸潤を促進する。今回の結果は Cox-2 及び PGE₂ は LLC

細胞の増殖には関与していないことを示唆している。しかし Cox-2 は腫瘍細胞自身のみならず、宿主細胞にも作用することで腫瘍の悪性を促すことが知られており、誘導された Cox-2 及び脂質メディエーターは LLC 細胞の増殖以外に幅広く作用している可能性があると考えられる。

先に述べたように GPCR の過剰発現は癌細胞において数多くの例が見られる。トロンビンの受容体である PAR1 やエンドセリン受容体、LPA 受容体などは主に増殖に関連した受容体である。また、ケモカインの受容体である CXCR4 や CXCR2 の過剰発現は癌細胞や腫瘍関連マクロファージの遊走を促すことが知られている。このようなりガンド依存的な現象にとどまらず時にはリガンド非依存的に増悪下に関わる例もある。これらの知見から、GPCR の過剰発現は癌の進行において大きな役割を担っていると考えられる。

本研究で得られた結果から、TDAG8 が腫瘍細胞の細胞外 pH センサーとして重要な役割を果たしていること、そして過剰発現により pH 依存的に癌を増悪化する可能性を初めて示すことができた。TDAG8 とは別の細胞外 pH 感知性受容体である OGR1 をヒト前立腺癌細胞（PC3 細胞）に過剰発現させると、マウスの癌転移モデルにおいて OGR1 が転移に抑制的に働くことが最近報告された。しかしながら、細胞レベルの解析ではこの OGR1 の転移抑制能は pH 感知性非依存的であることが示唆されている。したがって、細胞外 pH 感知性 GPCR と腫瘍形成及び癌転移を結びつけたのも本研究が初

めてである。ちなみに、TDAG8 と GPR4 が NIH3T3 細胞をトランスフォーメーションしたという報告があるが、その当時はこれら分子が細胞外 pH 感知性 GPCR であることが知られていなかった。この現象に細胞外 pH が関連性するかどうかについては検討されていない。TDAG8 は細胞膜上に発現しているため、今後 TDAG8 の拮抗薬や抗体医薬の開発により一部の癌の進行を食い止めることが期待できるであろう。

3-E. 結論

細胞外 pH 感知性 G 蛋白質共役型受容体 TDAG8 の生理機能解析を行った。その結果、TDAG8 はマウス尾静脈注射および皮下注射による癌モデルにおいて腫瘍形成を促進すること、その主要な分子メカニズムは PKA 及び ERK を介した細胞増殖促進であることを明らかにした。さらに、TDAG8 は酸性条件下で Cox-2 や mPGES-1 などの癌関連遺伝子の発現誘導をすることも合わせて明らかにした。

研究協力者

東京大学大学院医学系研究科

生化学分子生物学講座

清水 孝雄、柳田 圭介、井原 裕一郎、木原 泰行、真砂 佳代、野口 響子、浜野 文三江、北 芳博

病理学講座

深山 正久、国田 朱子、森下 保幸

メタボローム講座

田口 良、中西 広樹、田島 陽子

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

英文原著

1. van der Sluijs, K.F., van Elden, L.J.R., Nijhuis, M., Schuurman, R., Florquin, S., Shimizu, T., Ishii, S., Jansen, H.M., Lutter, R., and van der Poll, T. (2006) Involvement of the platelet activating factor receptor in host defense against *Streptococcus pneumoniae* during postinfluenza pneumonia. **Am. J. Physiol.** 290, L194-L199.
2. Doi, K., Okamoto, K., Negishi, K., Suzuki, Y., Nakao, A., Fujita, T., Toda, A., Yokomizo, T., Kita, Y., Kihara, Y., Ishii, S., Shimizu, T., and Noiri, E. (2006) Attenuation of folic acid-induced renal inflammatory injury in platelet-activating factor receptor-deficient mice. **Am. J. Pathol.** 168, 1413-1424.
3. Schaefer, M.B., Ott, J., Mohr, A., Bi, M.H., Grosz, A., Weissmann, N., Ishii, S., Grimminger, F., Seeger, W., and Mayer, K. (2007) Immunomodulation by n-3- vs. n-6-rich lipid emulsions in murine acute lung injury – role of platelet-activating factor receptor. **Crit. Care Med.**, 35, 544-554.
4. Yanagida, K., Ishii, S. (correspondence), Hamano, F., Noguchi, K., and Shimizu, T. (2007) LPA₄/p2y₉/GPR23 mediates Rho-dependent morphological changes in a rat neuronal cell line. **J. Biol. Chem.**, 282, 5814-5824.

5. Shindou, H., Hishikawa, D., Nakanishi, H., Harayama, T., Ishii, S., Taguchi, R., and Shimizu, T. (2007) A single enzyme catalyzes both PAF production and membrane biogenesis of inflammatory cells: cloning and characterization of acetyl-CoA:lyso-PAF acetyltransferase. **J. Biol. Chem.**, 282, 6532–6539.
6. Witzernath, M., Gutbier, B., Owen, J.S., Schmeck, B., Mitchell, T.J., Mayer, K., Thomas, M.J., Ishii, S., Rosseau, S., Suttrop, N., and Schütte, H. (2007) Role of platelet-activating factor in pneumolysin-induced acute lung injury. **Crit. Care Med.**, 35, 1756-1762.
7. Tsuda, M., Ishii, S., Masuda, T., Hasegawa, S., Nakamura, K., Nagata, K., Yamashita, T., Furue, H., Tozaki-Saito, H., Yoshimura, M., Koizumi, S., Shimizu, T., and Inoue, K. (2007) Reduced pain behaviors and ERK activation in primary sensory neurons by peripheral tissue injury in mice lacking platelet-activating factor receptor. **J. Neurochem.**, 102, 1658-1668.
8. Hikiji H., Takato T., Shimizu T., and *Ishii S. (2008) The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. **Prog. Lipid Res.** 47, 107-126.
9. Jiang, W., Hall, S.R., Moos, M.P.W., Cao, R.Y., Ishii, S., Ogunyankin, K.O., Melo, L.G., and Funk, C.D. (2008) Endothelial cysteinyl leukotriene 2 receptor (CysLT2R) expression mediates myocardial ischemia-reperfusion injury. **Am. J. Pathol.** 172, 592-602.
10. Kihara, Y., Yanagida, K., Masago, K., Kita, Y., Hishikawa, D., Shindou, H., Ishii, S., and Shimizu, T. (2008) Platelet-activating factor production in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis mice via the group IVA cytosolic PLA2-LysoPAFAT axis. **J. Immunol.** 181, 5008-5014.
11. Moos, M.P.W., Mewburn, J.D., Kan, F.W.K., Ishii, S., Abe, M., Sakimura, K., Noguchi, K., Shimizu, T., and Funk, C.D. (2008) Cysteinyl leukotriene 2 receptor-mediated vascular permeability via transendothelial vesicle transport. **FASEB J.** 22, 4352-4362.
12. Welch, E.J., Naikawadi, R.P., Li, Z., Lin, P., Ishii, S., Shimizu, T., Tirupathi, C., Du, X., Subbaiah, P.V., and Ye, R.D. (2009) Opposing effects of platelet-activating factor and lyso-platelet activating factor on neutrophil and platelet activation. **Mol. Pharmacol.** 75, 227-234.
13. Mogi, C., Tobo, M., Tomura, H., Murata, N., He, X.-d., Sato, K., Kimura, T., Ishizuka, T., Sasaki, T., Sato, T., Kihara, Y., Ishii, S., Harada, A., and Okajima, F. (2009) Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of pro-inflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. **J. Immunol.** in press.

和文総説

1. 石井聡 遺伝子改変マウスの問題点 呼吸と循環, vol. 56, 913-918 (2008)
2. 石井聡 気管支喘息とGタンパク質共役型受容体 Annual Review 呼吸器 2009, 1-6 (2009)

2) 学会発表

1. Keisuke Yanagida, Satoshi Ishii, Kyoko Noguchi, Fumie Hamano and Takao Shimizu "LPA₄/p2y₉/GPR23 mediates morphological changes in rat neuronal cell line", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, (June 18-23, 2006).
2. Yasuyuki Kihara, Yoshihiro Kita, Satoshi Ishii and Takao Shimizu "Arachidonic acid cascade in the animal model of multiple sclerosis", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, (June 18-23, 2006).
3. Keisuke Yanagida, Satoshi Ishii, Fumie Hamano, Kyoko Noguchi and Takao Shimizu "Comparison of binding activities of LPA receptors / Morphological effect of LPA₄", FASEB Summer Research Conferences: Lysophospholipid Mediators in Health & Disease, Tucson, Arizona, USA, (June 9-14, 2007).
4. 石井聡 Gタンパク質共役型受容体の機能解明と呼吸器学への応用

- 第47回日本呼吸器学会学術講演会
教育講演 2007年5月12日 東京
5. 石井聡 システイニルロイコトリエンの生体機能 -CysLT2とアレルギー性炎症- 第28回日本炎症・再生医学会 ワークショップ 2007年8月2日 東京
 6. 石井聡, 柳田圭介, 井原裕一郎, 住田隼一, 木原泰行, 野口響子, 清水孝雄, 阿部学, 崎村建司 リゾホスファチジン酸受容体LPA₄とLPA₅の生体機能 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 シンポジウム 2007年12月13日 横浜
 7. 石井聡 脂質メディエーター受容体の病態機能 --- ベンチサイドからの呼吸器研究 第5回東京レスピレーションフロンティア 2008年11月7日 東京
 8. 石井聡, 柳田圭介, 住田隼一, 木原泰行, 野口響子, 木原泰行, 浜野文三江, 清水孝雄, 阿部学, 崎村建司 非EDG型リゾホスファチジン酸受容体の生体機能 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会シンポジウム 2008年12月9日 神戸
 9. 石井聡, 井原裕一郎, 木原泰行, 国田朱子, 北芳博, 浜野文三江, 柳田圭介, 油谷浩幸, 深山正久, 清水孝雄 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役割 第3回炎症・脂質代謝・メタボリサーチフォーラム 2009年1月31日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

- | | |
|-----------|----|
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |