

## G タンパク質共役型受容体を介した生体機能調節\*

石井 聡

秋田大学大学院医学系研究科 生体防御学講座

(平成 23 年 1 月 26 日掲載決定)

### Biological functions of G-protein coupled receptors

Satoshi Ishii

*Department of Immunology, Akita University Graduate School of Medicine, Akita 010-8543, Japan*

#### はじめに

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、外界からの情報は主に細胞膜表面のセンサーである「受容体」を介して細胞内に伝えられる。細胞膜表面に存在する受容体は G タンパク質共役型受容体（以下、GPCR）、イオンチャネル型受容体、酵素連結型受容体などに分類できる。これら受容体はどれも膜を貫通する構造をもつが、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  $G\alpha$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$  からなるヘテロ三量体 G タンパク質と共役している。GPCR は特異的分子すなわちリガンドと結合するとその立体構造が変化し、 $G\alpha$  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なり、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ることが可能となる。ヒトにおいて GPCR の総数はお

よそ 800 種類存在し、細胞膜表面受容体の約 80% を占めると考えられている<sup>1)</sup>。

GPCR のリガンドは多岐にわたり、カテコールアミンなどのアミン、ペプチドホルモン、脂質などがある。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<sup>2)</sup>。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。ゆえに、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。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。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。

脂質とは、長鎖脂肪酸もしくはそれに類似する炭化水素鎖を構成成分とした生体内に存在する物質を指す。脂質には 10,000 種類以上の分子種が存在するが、GPCR のリガンドとなるのはロイコトリエン、血小板活性化因子 (PAF)、リゾホスファチジン酸 (LPA) など一部の脂質である。このような特殊な性質を持つ脂質を、特に「生理活性脂質」または「脂質メディエーター」と呼んで、他の脂質と区別することがある。私は日本たばこ産業社員時代 (1992 年) に東京大学大学院医学系研究科 生化学分子生物学講座 細胞情報部門 (清水孝雄教授) において研究をする機会を与えられたことを契機として、現在まで生理活性脂質の GPCR を軸に様々な研究を行ってきた。本稿ではその中から代表的な成果をピックアップして述べたい。まず、私が最初に手がけた PAF 受容体ノックアウト

Correspondence: Satoshi Ishii, Ph. D.  
Department of Immunology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan  
Tel: 81-18-884-6089  
Fax: 81-18-884-6444  
E-mail: satishii@med.akita-u.ac.jp

\*平成 22 年 9 月 10 日新任教授就任講演

(2)

GPCR を介した生体機能調節

(PAFR-KO) マウスの解析プロジェクトの中から、代表的な「骨粗鬆症の増悪因子としての PAF」についての解析結果について触れ、次にリガンド未同定の GPCR (オーファン GPCR) の中から LPA の新規 GPCR を同定した結果を、そして最後に(結果的には脂質をリガンドとするオーファン GPCR ではなかったが)細胞外プロトンを感じ取る GPCR であると同定した TDAG8 が腫瘍形成の進展に寄与する結果を解説する。

## 1 骨粗鬆症の増悪因子としての PAF<sup>3)</sup>

### 1-1 研究目的

図 1 に化学構造を示す PAF (Platelet-activating factor, 1-アルキル-2-アセチル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン) は、血小板の凝集作用のほか白血球の活性化や気道収縮、血管透過性亢進等、多彩な活性を持つ生理活性脂質である<sup>4)</sup>。PAF は特異的な GPCR を介して細胞に薬理作用を及ぼすが、現在までに報告された「PAF 受容体」は 1991 年に清水教授らがクローニングに成功した分子のみである<sup>5)</sup>。したがって PAF については、多くのリガンドで存在する受容体サブタイプは存在しないと考えられている。この PAF 受容体を欠損したマウスを使って私たちは、PAF が急性肺損傷<sup>6)</sup>や気管支喘息<sup>7)</sup>、多発性硬化症<sup>8)</sup>をはじめとした多くの疾患の炎症性疾患の増悪化に関わることを明らかにしてきた。

PAF と骨吸収性疾患との関連については、関節炎や歯周病などで PAF の産生上昇は報告されているものの、具体的に産生された PAF の疾患への関与や具体的な役割については今まで解明されていなかった<sup>9)</sup>。閉経後骨粗鬆症は、代表的な骨吸収性疾患の一つである。現在のところ、卵巣機能の低下とともに血液中のエストロゲンレベルが急激に減少することが引き金になって発症する疾患と考えられている<sup>10)</sup>。エストロゲンが減ると、骨代謝回転が増加して骨の形成・吸収(リモデリング)のバランスが崩れる結果、骨吸収の方が

PAF

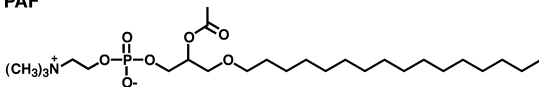


図 1. PAF の化学構造. グリセロールの *sn*-1 位に結合した炭化水素鎖は C16 と C18 があるが、ここに示した前者の方が活性が高い。

活発となり骨折の危険性が増大するのである。しかしながら、エストロゲンの低下から過剰な骨吸収に至る機序は複雑で、その全容は解明されていない。本研究では PAFR-KO マウスを用いて、卵巣摘除による閉経

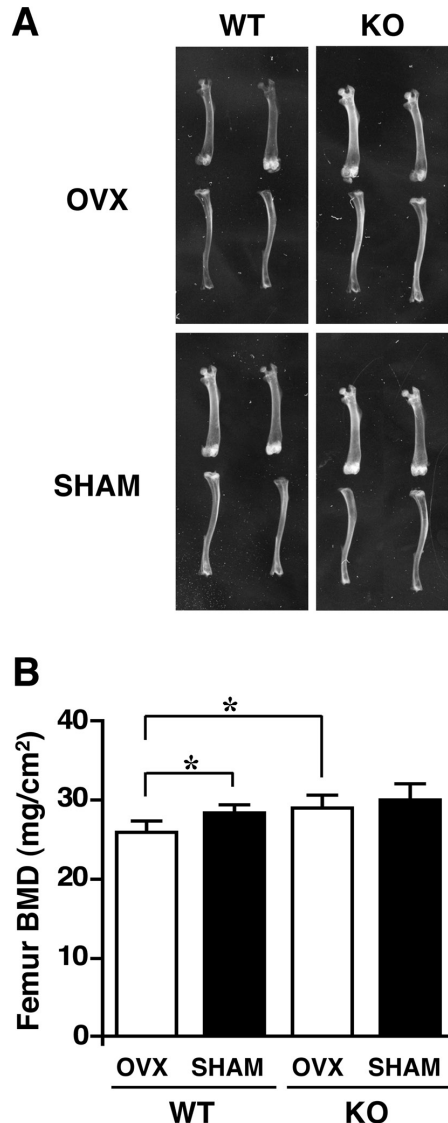


図 2. X 線撮影による骨の解析. (A) 卵巣摘除 4 週間後の頸骨及び大腿骨の X 線写真. OVX: 卵巣摘除; SHAM: 模擬手術. (B) 骨密度の測定. 卵巣摘除 4 週間後に大腿骨の骨密度 (BMD) を二重エネルギー X 線吸収法で測定した. 値は平均±標準偏差を示す ( $n=5-7$ ;  $*P<0.05$  by one-way ANOVA with Fisher's PLSD test).

後骨粗鬆症モデルの実験とそれに関連した *in vitro* の実験を行い、PAFの骨粗鬆症増悪化における寄与とその作用機序を明らかにした。

### 1-2 研究結果

卵巣摘除マウスの骨のレントゲン写真観察 (図2A), さらに骨密度測定 (図2B) および組織学的解

析 (図3) の結果から、野生型マウスに比較して PAFR-KO マウスは卵巣摘除されても骨吸収が抑制されていることが示された。この *in vivo* で得られた結果は、PAFが骨粗鬆症の増悪因子であることを示すと考えられた。

骨リモデリングに関連する主な細胞は骨芽細胞と破骨細胞である。どちらの細胞がPAFを産生するのか

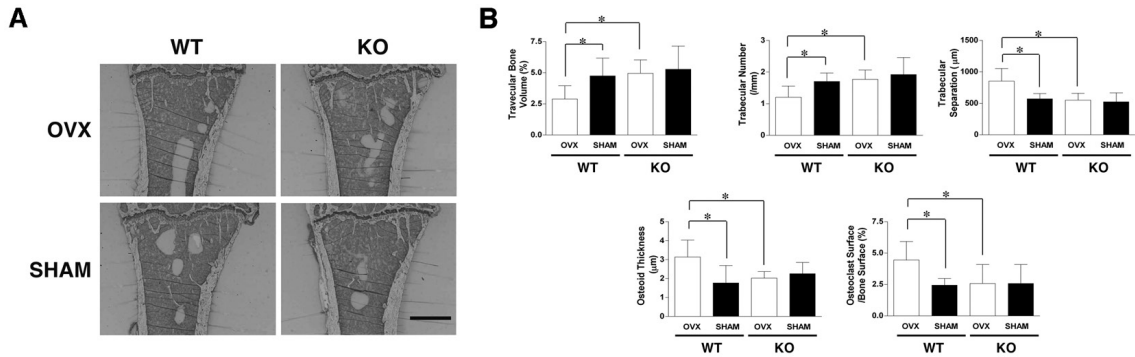


図3. PAFR-KO マウスにおける骨量減少の抑制と骨代謝回転の不変性。(A) 頸骨の骨幹端領域のトルイジンブルー染色像。スケールバーは1.0 mmを表す。(B) 骨の組織形態計測。Aの写真をもとして海綿骨量 (Trabecular bone volume), 骨梁数 (Trabecular number), 骨梁間隔 (Trabecular separation), 類骨の厚さ (Osteoid thickness), 骨吸収面 (Osteoclast surface/Bone surface) を測定した。値は平均±標準偏差を示す ( $n=5-7$ ;  $*P<0.05$  by one-way ANOVA with Fisher's PLSD test)。

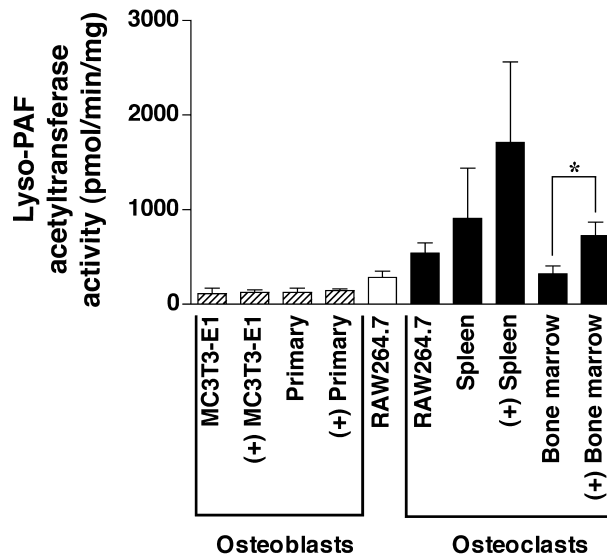


図4. 骨の細胞におけるリゾPAFアセチルトランスフェラーゼ活性。MC3T3-E1細胞及びRAW264.7細胞はそれぞれマウスの骨芽細胞株とマクロファージ株である。破骨細胞はRAW264.7細胞や脾臓、骨髓から誘導することができる。(+)はTNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ で刺激したことを示す。値は平均±標準偏差を示す ( $n=3-4$ ;  $*P<0.05$  by Mann-Whitney U Test)。

(4)

GPCR を介した生体機能調節

を明らかにするために、PAF 合成に重要な酵素であるリゾPAF アセチルトランスフェラーゼ<sup>11)</sup>の活性を *in vitro* で調べた (図4)。その結果、骨芽細胞にはこの酵素の活性はほとんどないが、対照的に破骨細胞では高い活性が認められた。エストロゲンのレベルの低下はTNF- $\alpha$ やIL-1などのサイトカインの産生を増加させるという報告がある<sup>10)</sup>。そこで破骨細胞をTNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ で刺激すると、この酵素活性が増加することも明らかとなった。

次に骨芽細胞と破骨細胞のどちらがPAF受容体を発現しているのかを調べるために、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、PAF受容体mRNAは主に骨芽細胞ではなく破骨細胞に発現することが明らかとなった (図5)。実際、初代培養破骨細胞はPAFに反応して細胞内カルシウム濃度を上昇させたが、骨芽細胞はPAFに反応しなかった (データ略)。

IL-1 $\beta$ は破骨細胞に対し、生き残り作用 (サバイバル) とカルシウム吸収促進作用を及ぼすが、PAF受容体が機能しない状態 (PAFR-KO マウスまたはPAF受容体アンタゴニストWEB2086で処理した野生型マ

ウス)の破骨細胞ではこれらIL-1 $\beta$ の作用は両方とも減弱していた (図6)。骨の器官培養の結果からも同様に、IL-1 $\beta$ の骨吸収効果の一部はPAF受容体を介していることが明らかとなった (データ略)。

### 1-3 考察

今回得られたデータをまとめると、閉経後骨粗鬆症において、1) エストロゲンレベルの低下により作られたサイトカインが破骨細胞のリゾPAFアセチルトランスフェラーゼ活性を上げる、2) PAF産生が増加する、3) PAFは骨芽細胞を介さずに破骨細胞に作用する (オートクライン・パラクライン)、4) 骨吸収が過度に促進される、という過程でPAFは骨粗鬆症を悪化させると考えられた (図7)。

破骨細胞は骨芽細胞から指令を受けて骨を壊すことだけに専念する受け身的な細胞なので、PAFというメディエーターを破骨細胞自身が産生するのは希な例である。またPAF受容体についても、骨芽細胞には発現せず破骨細胞のみに発現している受容体の例は珍しく、カルシトニンや破骨細胞分化因子 (RANKL)の受容体などに限られる<sup>12,13)</sup>。この研究に続いて我々は、ロイコトリエンB4と呼ばれる生理活性脂質もまたPAF同様、破骨細胞で作られ自らが発現する特異的受容体を刺激して活性化することを報告した<sup>14)</sup>。したがって、PAFとロイコトリエンB4は破骨細胞において、オートクライン・パラクラインに作用する数少ないメディエーターと言えるであろう。PAFが骨粗鬆症の増悪化因子として作用するという発見は、PAFとPAF受容体に注目した骨粗鬆症に対する新しい治療法の開発の糸口を明らかにしたものと考えている。PAF受容体の研究には歴史があり、PAF受容体アンタゴニストは製薬企業各社から幾つも開発されてきた<sup>4)</sup>。しかし残念ながら疾患治療薬として臨床で使われているPAF受容体アンタゴニストは未だないので、PAF受容体の研究者の立場としてこれらの薬剤が骨粗鬆症の治療薬として効能を発揮することを期待している。

## 2 新規リゾホスファチジン酸 (LPA) 受容体の同定<sup>15)</sup>

### 2-1 研究目的

ヒトのGPCRが約800種類存在することは上述したが、このうち内在性代謝産物に対するGPCRは約370種類といわれている。しかし、リガンドが既知の

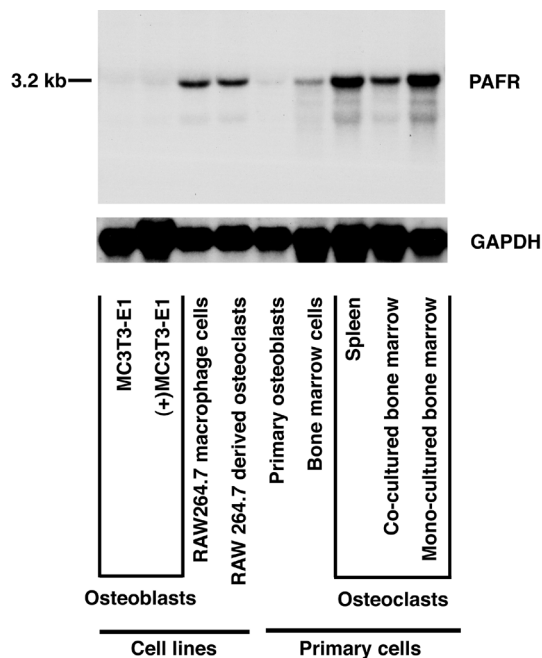


図5. PAF受容体 mRNA の発現解析. 総 RNA 10  $\mu$ g に対するノーザンハイブリダイゼーションの結果、約 3.2 kb の長さの mRNA が検出された。

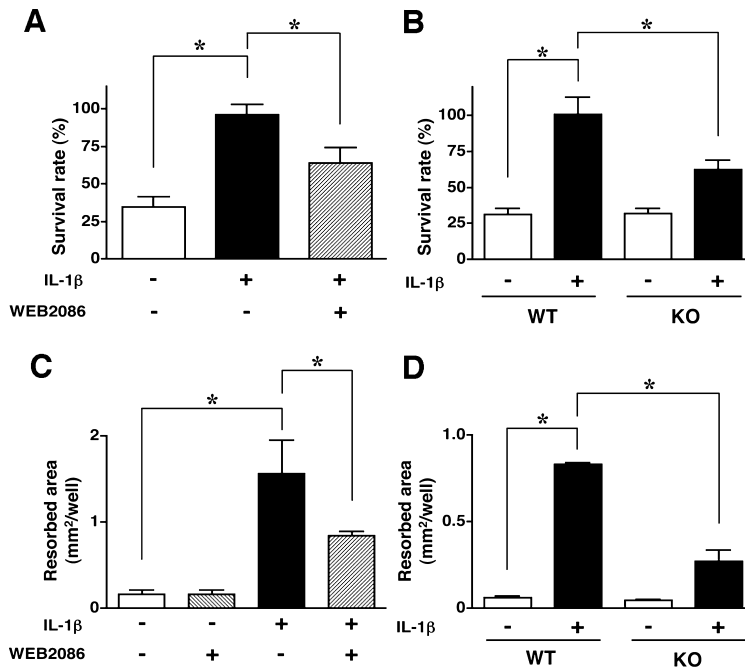


図6. IL-1 $\beta$ で促進される破骨細胞のサバイバルとカルシウム吸収に対するPAF受容体の効果。(A)破骨細胞のサバイバルへのPAF受容体アンタゴニストWEB2086の効果を観察した( $n=5$ ;  $*P<0.0001$ )。 (B) PAFR-KO破骨細胞のサバイバルをWT破骨細胞と比較した( $n=5$ ;  $*P<0.0001$ )。 (C)破骨細胞のカルシウム吸収へのPAFRアンタゴニストの効果を観察した( $n=3$ ;  $*P<0.005$ )。 (D) PAFR-KO破骨細胞のカルシウム吸収をWT破骨細胞と比較した( $n=3$ ;  $*P<0.0001$ )。A-Dとも値は平均 $\pm$ 標準偏差を示し、統計解析はone-way ANOVA with Fisher's PLSD testで行った。

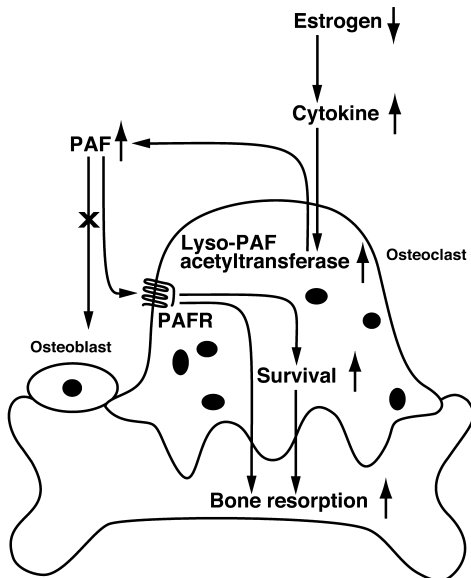


図7. 骨吸収におけるPAFとPAF受容体の働きについての提唱モデル。詳細は本文参照。

受容体は約250種類であり、残りの約120種類は依然としてリガンドが不明の、いわゆるオーファンGPCRである<sup>1)</sup>。リガンド既知のGPCRの基礎研究や応用研究が今までにもたらした成果を考えたとき、オーファン受容体は多様な生物学的意義を理解するための基礎研究としてだけでなく、応用研究の面からも極めて重要であると考えられる。このような状況から、オーファンGPCRのリガンド同定や生物学的意義の解明においては産学を問わず競争が展開されている。

本研究では脂質を特異的リガンドとする未知のGPCRが存在することを作業仮説とし、PAF受容体の一次構造に相同性の高いヒトのオーファンGPCRをBLASTで検索して候補とした。その結果、p2y9(別名LPA4)やp2y5と呼ばれるオーファンGPCRを含むいくつかを候補とした(図8)。これらGPCRをクローニングして、1種類ずつCHO細胞に安定発現させ、細胞内シグナル伝達を指標に脂質をリガンドとする受容体の探索を試みた。

(6)

## GPCR を介した生体機能調節

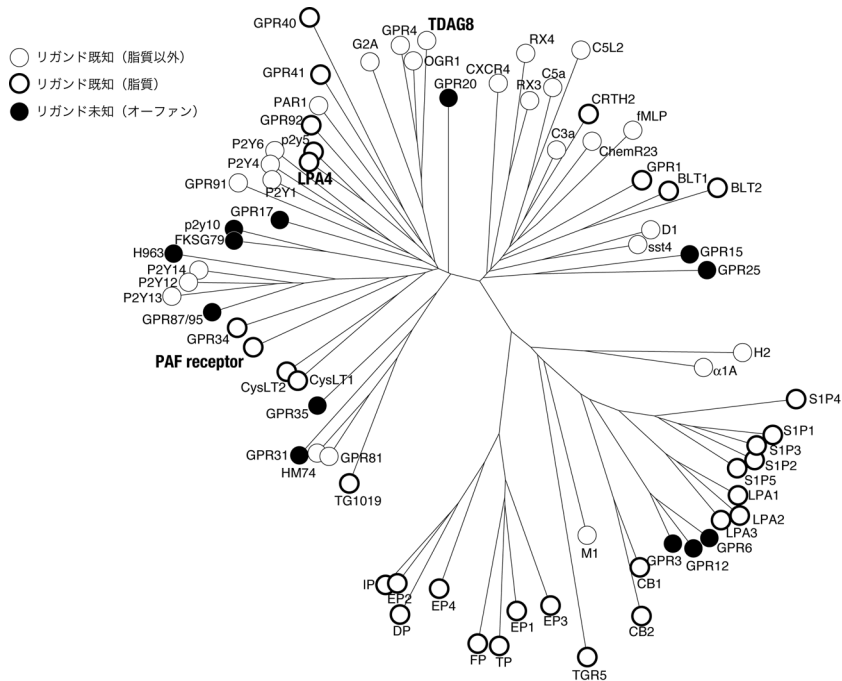


図 8. 種々のヒト GPCR のアミノ酸配列をもとに構築した系統樹. 任意の 2 つの受容体を結ぶ線の長さの総和が小さい程, お互いは近縁でアミノ酸相同性が高い, リガンドが同じまたは類似の化学構造をもつ GPCR だろうし, また機能が類似する GPCR だろうしはこの系統樹上で集まる傾向がある. リガンドが既知かもしくは未知かについては現在の状況を示している, この研究を開始したときの状況とは異なっている.

## 2-2 結果

オーファン GPCR を安定発現する CHO 細胞のそれぞれに約 200 種類の脂質を個別に作用させて細胞内のカルシウム反応を調べた. その結果, p2y9 発現細胞がリゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic Acid, LPA, 1-アシル-*sn*-グリセロ-3-リン酸: 図 9) に反応することを発見した (図 10). 一方, p2y5 では LPA によるカルシウム反応は認められなかった. (ただし, その後 p2y5 も LPA 受容体であること, さらに p2y5 に共役する三量体 G タンパク質の種類の特性からこの GPCR はカルシウム反応を惹起しないこと等を私たち

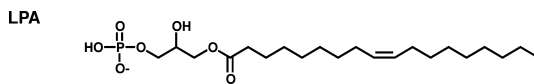


図 9. LPA の化学構造. グリセロールの *sn*-1 位にオレイン酸が結合した分子種を示す. LPA にはオレイン酸以外にも様々な脂肪酸が結合した分子種が存在する.

は明らかにした<sup>16)</sup>. 本稿では誌面の都合上, この研究内容についての記述を割愛する.) 次に, p2y9 を一過性に発現させた RH7777 細胞の膜画分に, トリチウムラベルした LPA を作用させたところ, LPA が p2y9 に

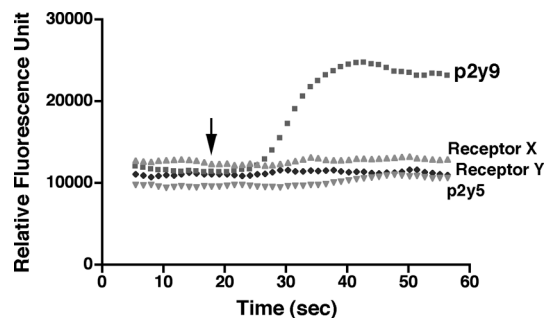


図 10. LPA による受容体発現細胞のカルシウム反応. p2y9 を発現する CHO 細胞でのみ, 矢印で示す 10  $\mu$ M LPA の投与後に反応が観察された. この受容体とアミノ酸配列の相同性が高い p2y5 や他の受容体 (X と Y と略す) を発現した細胞は LPA に対してカルシウム反応を示さなかった.

特異的に結合することを確認した (図 11A)。この特異的結合は、スキッチャード解析により、解離定数 (Kd 値) は 45 nM を示した (図 11B)。LPA に構造が類似した脂質について、トリチウムラベルした LPA に対する p2y9 への競合的結合を調べたが、この受容体は LPA 以外と結合しなかった (データ略)。次に、p2y9 安定発現 CHO 細胞を使って、LPA により誘発されるサイクリック AMP (cAMP) 産生量変化について調べた。図 12 に示すように、発現ベクター (pCXN2.1) をトランスフェクトしただけの CHO 細胞では、アデニル酸シクラーゼ活性化剤であるフォルスコリン処理により上昇した cAMP レベルが LPA 濃度依存的に下降したのに対し (CHO 細胞が内在的に発現する LPA

受容体による作用と考えられる)、p2y9 安定発現 CHO 細胞では cAMP レベルが LPA 濃度依存的に逆に上昇した。さらに、細胞を Gi 阻害薬である百日咳毒素 (PTX) で前処理すると、ベクターをトランスフェクトしただけの CHO 細胞ではフォルスコリン処理後の cAMP レベルの下降は見られなくなったのに対し、p2y9 安定発現 CHO 細胞の cAMP レベルはさらに上昇した。これらの結果を合わせると、CHO 細胞の内在性 LPA 受容体は Gi と、p2y9 は Gs と共役していて、PTX 前処理で内在性 LPA 受容体による Gi の活性化が阻害されることにより、p2y9 による Gs の活性化がより顕著に現れたと考えられた。

### 2-3 考察

LPA はおもに血漿タンパク質 (オートタキシン) によって合成されるグリセロリン脂質で、血清中に豊富に存在する<sup>17)</sup>。LPA は細胞分裂促進や細胞形態変化作用をもち、神経発生、血管形成、創傷治癒、癌の進行などに関与すると考えられている。LPA 受容体としては互いに一次配列の相同性の高い (50-57%) 3 種類の G タンパク質共役型受容体、すなわち LPA1 (別名 Edg2)、LPA2 (別名 Edg4)、LPA3 (別名 Edg7) が既に同定されていた (図 9 を参照)。しかし、LPA1、LPA2、LPA3 とは異なるタイプの LPA 受容体の存在が示唆されてきた。LPA1 と LPA2 のダブルノックアウトマウス由来の線維芽細胞において、LPA3 が発現していないにもかかわらず LPA に対する反応性が残つ

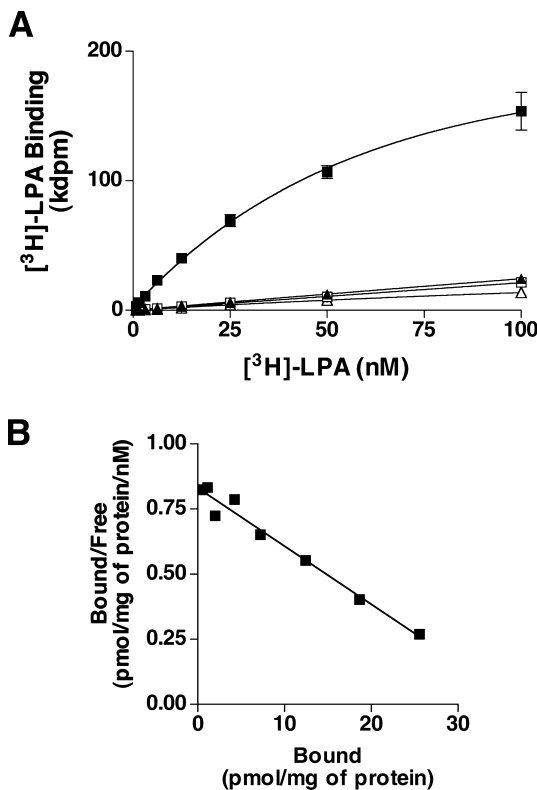


図 11. p2y9 の LPA に対する結合の濃度依存性とスキッチャード解析。(A) p2y9 を一過性発現する RH7777 細胞由来の膜画分と、種々の濃度のトリチウムラベルされた 1-オレオイル-LPA を反応させた。値は平均±標準偏差を示す ( $n=3$ )。 (B) A のデータをスキッチャード解析した結果、p2y9 の 1-オレオイル-LPA に対する結合定数は 45 nM であることがわかった。

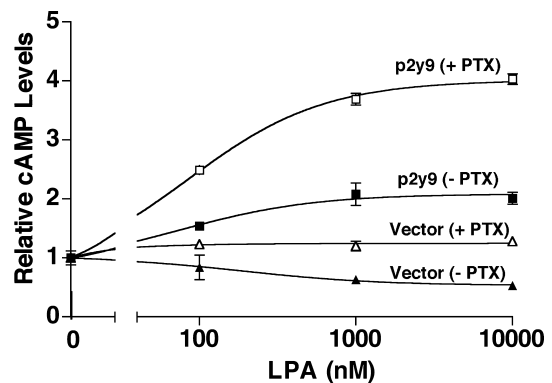


図 12. LPA に依存した p2y9 による cAMP の産生。p2y9 を安定発現した CHO 細胞をフォルスコリン存在下で 1-オレオイル-LPA と反応させたときの、cAMP 産生量の相対変化を示す。百日咳毒素で処理および未処理の細胞をそれぞれ“(+PTX)”、“(-PTX)”で表す。値は平均±標準偏差を示す ( $n=4$ )。

ていること<sup>18)</sup>、LPA によって凝集することが知られる血小板の反応特性（アルキル基を含む LPA 分子種がアシル基を含む LPA 分子種よりも強い活性を示す）がこれら 3 種の LPA 受容体では薬理学的に説明がつかないこと<sup>19)</sup>、等が理由である。このような研究背景の中で、私どもは p2y9 が第 4 の LPA 受容体（LPA4 と命名）であることを同定することができた。しかしながら、ヒト血小板において LPA4 mRNA の発現は認められるものの<sup>20)</sup>、私どもが調べた限りでは LPA4 は血小板が示す上記の LPA への反応特性を示さなかった（データ略）。ゆえに、血小板における LPA4 の役割は未解明のままである。なお最近になって、血小板は LPA5 と命名された受容体（後述）を介して LPA によって活性化される可能性が報告されている<sup>21)</sup>。

PAF 受容体と比較的相同性が高い（約 30%）LPA4 が、図 1 と図 9 を比較してわかるように PAF と化学構造が比較的似ている LPA と結合したことは、当初の作業仮説が正しかったことを示す結果であった。LPA4 の同定の後、LPA4 と相同性の高かった別のオーファン受容体 GPR92 と p2y5 がやはり LPA 受容体であることが明らかとなり、LPA5<sup>22)</sup> と LPA6<sup>16)</sup> とそれぞれ命名された。ゆえに本研究が端緒となって、従来から知られていた LPA 受容体ファミリー（LPA1, LPA2, LPA3）とはおそらく異なる進化を辿ってきた別の LPA 受容体ファミリーの存在が明らかになったことになる。最近ではそれぞれの LPA 受容体、およびそれぞれの LPA 受容体ファミリーがどのような生物学的な役割を担っているかを解明することに LPA 受容体研究の焦点は移りつつある。私たちは LPA4 が G12/13 型の G タンパクと共役することを報告し<sup>23)</sup>、さらに最近になって LPA4 ノックアウトマウスが胎生期に致死的な血管やリンパ管の発生異常を呈することを報告した<sup>24)</sup>。この LPA4 ノックアウトマウスの表現型のメカニズムは未だ解明には至っていないが、G12/13 と共役することが関連するかどうかも含め、メカニズムの解明は喫緊の検討課題と考えている。

### 3 細胞外 pH 感知性 GPCR である TDAG8 に よって促進される腫瘍増殖<sup>25)</sup>

#### 3-1 研究目的

上述したように 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二つのオーファン GPCR である OGR1

と GPR4 が、細胞外 pH すなわち細胞外のプロトンを感じて活性化することを示す論文が報告された<sup>26)</sup>。これに続いて、同じファミリーに属するオーファン GPCR であった G2A と TDAG8（T cell death-associated gene 8, 別名 GPR65）が、OGR1 や GPR4 と同様に細胞外 pH センサーであることを、私たちを含めた研究グループが明らかにした<sup>27-29)</sup>。特に私たちは、TDAG8 が細胞外 pH の低下に応じて cAMP を産生することと Rho の活性化を介してストレスファイバーを形成することを報告した<sup>29)</sup>。これら 4 種の細胞外 pH 感知性 GPCR 群における一次配列の相同性の高さは、図 8 の系統樹に示されている。

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機能不明の遺伝子として発見された<sup>30)</sup>。TDAG8 の mRNA はヒトでは脾臓、胸腺、血球細胞などに発現が高いが<sup>30, 31)</sup>、ノックアウトマウスの解析では免疫学的な異常は観察されていない<sup>32)</sup>。TDAG8 mRNA は免疫組織・細胞以外にも癌細胞において高い発現が報告されている<sup>33)</sup>。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://biogps.gnf.org>) によると、肺癌やメラノーマなどの一部の非血液系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 の発現上昇が腫瘍の進展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（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）、腫瘍の増悪化に関わるという報告も少なくない<sup>34)</sup>。

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<sup>35)</sup>。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<sup>36)</sup>。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、これが腫瘍の進展に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。よって、本研究ではまずマウスへの癌細胞の移植実験により TDAG8 と腫瘍増殖の関連を *in vivo* で調べることにした。



### 3-2 結果

マウスを使った腫瘍増殖実験に適している細胞として、本研究では C57BL/6 マウス由来の肺癌細胞である LLC 細胞を用いて TDAG8 の安定発現細胞を樹立することにした。この細胞は、4 種類の細胞外 pH 感知性 GPCR のうち OGR1 mRNA を内在性に発現する一方、他の 3 つの mRNA をほとんど発現していなかった (データ略)。

N 末端 (細胞外領域に相当) に HA エピトープタグが挿入された TDAG8 をコードする遺伝子を LLC 細胞へ導入し、G418 による薬剤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発現ベクター (pCXN2.1) のみを導入した細胞群 (以下、コントロール細胞と呼ぶ) も同時に作製した。以前に報告した通り<sup>29)</sup>、TDAG8 発現細胞は pH 依存的に cAMP の産生を増大させた (図 13)。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、TDAG8 と腫瘍増殖の関連を *in vivo* で調べることにした。

まず LLC 細胞を C57BL/6 マウスに尾静脈注入し、

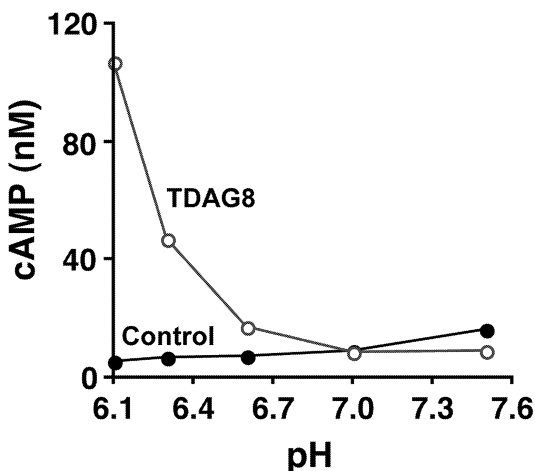


図 13. 細胞外 pH に依存した TDAG8 による cAMP の産生。TDAG8 の安定発現 LLC 細胞を様々な細胞外 pH で刺激したときの cAMP の産生を示す。値は平均 ± 標準誤差を示す (n=4)。

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 14A)。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していることが分かった (図 14B)。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 14C)。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 14D)。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 (データ略)。

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 細胞の腫瘍形成促進のメカニズムを以下の *in vitro* 実験で解析することにした。酸性条件での細胞の生存能を評価するため、細胞を異なる pH の培地で培養してヨウ化プロピジウムで染色し生存細胞の割合を計測した。酸性条件 (pH 6.4) では TDAG8 安定発現 LLC 細胞はコントロール細胞よりも有意に細胞の生存率が高かった (図 15A)。次に酸性条件での細胞の増殖能を MTT アッセイで評価したところ、中性条件 (pH 7.4) に比べ酸性条件下では増殖は抑制されるものの、TDAG8 安定発現 LLC 細胞はコントロール細胞よりも増殖能が高かった (図 15B)。一方で中性条件における増殖には差は見られなかった。次に ERK と呼ばれる MAP キナーゼをリン酸化する MEK1/2 の阻害剤である U0126 で細胞を処理したところ、酸性条件下における TDAG8 安定発現細胞の増殖能が大きく減少した (図 15C)。また、cAMP によって活性化されるキナーゼ PKA の阻害剤 H-89 で処理しても、細胞増殖能は抑制された。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 のレベルをウエスタンブロット法により観察した。中性条件と比較したとき、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 安定発現細胞ではリン酸化が亢進した (図 15D)。また、H-89 を培地に添加することにより、こ

(10)

GPCR を介した生体機能調節

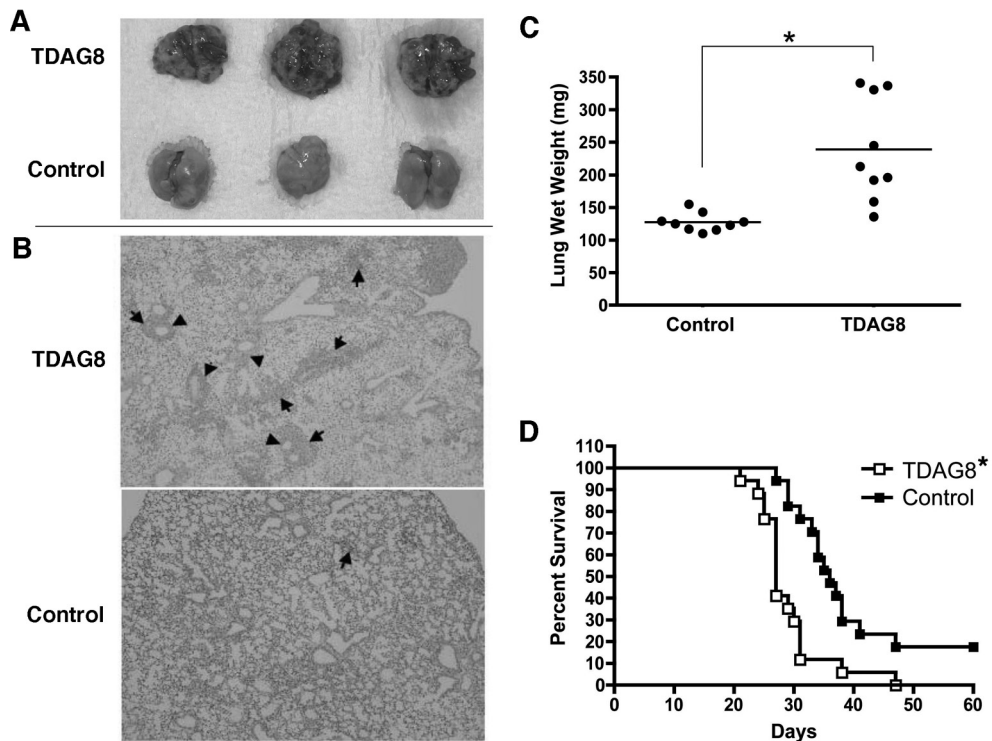


図 14. TDAG8 を介した腫瘍の進展. (A) LLC 細胞を静脈投与して 19 日後のマウス肺の様子を観察した. (B) LLC 細胞を静脈投与して 15 日後の肺について、ヘマトキシリン・エオジン染色切片を作製し顕微鏡観察した. 「矢頭」は気管支周囲に形成された腫瘍を、「矢印」は血管周囲の腫瘍を示す. (C) LLC 細胞を静脈投与して 19 日後の肺湿重量を計測した. 各点は 1 匹のマウスを示す. 値は平均±標準誤差を示す (\* $P < 0.001$  by Mann-Whitney U Test). (D) LLC 細胞を静脈投与した後のマウス致死率の時間経過を追った ( $n = 17$ ; \* $P < 0.001$  by Log-rank Test).

のリン酸化 ERK レベルは劇的に減少した. 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 と ERK の活性化が関与することが示唆された.

### 3-3 考察

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においても観測されたことから, TDAG8 は様々な条件で腫瘍形成を促進することが考えられる. 上述したように TDAG8 はヒトの細胞株や腫瘍組織で発現の亢進が認められる. 従って今回観察した現象は酸性状態において活性化される TDAG8 が, 腫瘍形成の進

展に深く関わっていることを強く示唆している.

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. 酸性培養条件下における 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 及び ERK 依存的であり, さらに PKA 阻害剤を用いた ERK リン酸化実験により, 少なくとも一部の ERK は PKA を介して活性化されていることが分かった. 以上のことから, おそらく腫瘍内では細胞外環境の酸性化による TDAG8 の活性化に伴って cAMP が産生され, その結果 PKA の活性化とそれに続く ERK の活性化が起きることによって細胞増殖が亢進するメカニズムが考えられた (図 16). 実際, PKA が B-Raf を介して ERK を活性化し, 腫瘍形成を促すことは以前から報告されている<sup>37, 38)</sup>. ただし, PKA が ERK 非依存的に細胞増殖を亢進している可能性も考えられる.

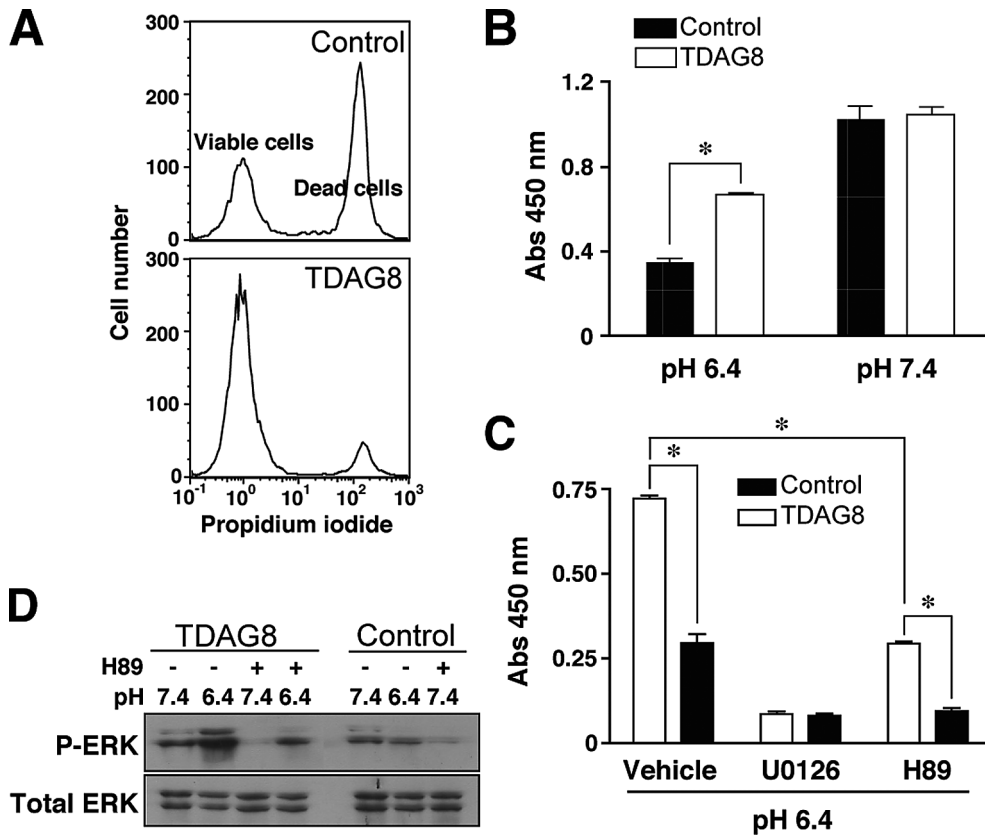


図 15. 酸性の培養条件下における LLC 細胞の生存と増殖に対して TDAG8 が及ぼす効果. (A) pH 6.4 の無血清培地で 48 時間培養後にヨウ化プロピジウム染色した細胞についてフローサイトメトリー解析を行った. (B) pH 6.4 または pH 7.4 で LLC 細胞を培養したときの細胞増殖を MTT アッセイで測定した ( $n=5$ ;  $*P<0.01$  by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test). 値は平均 $\pm$ 標準誤差を示す. (C) pH 6.4 の培養条件下において, MEK1/2 阻害剤または PKA 阻害剤 (10  $\mu$ M) で LLC 細胞を処理したときの細胞増殖を MTT アッセイで測定した ( $n=3$ ;  $*P<0.001$ ; one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test). (D) pH 6.4 の培養条件下において, 10  $\mu$ M H-89 で LLC 細胞を処理したときのリン酸化 ERK をウエスタンブロッティングにより観察した.

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, pH 感知能力が著しく減弱した TDAG8 変異体 (2 種類) を発現した LLC 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低下した (データ略). 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ものではなく, 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に起因することを強く支持し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<sup>39)</sup>. しかしながら, この論文における解析ではこの OGR1 の転移抑制能は pH 感知性非依存的であることが示されている. したがって, 細胞外 pH 感知性 GPCR と腫瘍形成を結びつけたのは本研究が初めてである.

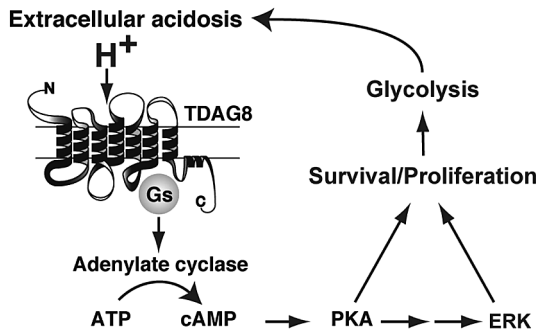


図 16. 腫瘍形成に対して正に働く TDAG8 の機構モデル. 詳細は本文参照.

本研究は、TDAG8 を標的とするアンタゴニストや抗体を開発することによって一部の癌の進行を食い止めることができる可能性を示している。今後の TDAG8 の研究展開として、他の生物学的機能を解明することに加えて、アンタゴニストや抗体を開発することも進めていきたいと考えている。

## 謝 辞

本研究は一貫して、東京大学 大学院医学系研究科 生化学分子生物学講座 教授 清水孝雄先生以下の監督・指導の下に行われたものです。長きにわたりお世話下さったことに厚く御礼申し上げます。また、以下の共同研究者（敬称略）の多大なる貢献に感謝致します。

東京大学大学院医学系研究科  
・生化学分子生物学講座

引地 尚子, 野口 響子, 井原裕一朗, 木原 泰行,  
浜野文三江, 柳田 圭介

・病理学講座

深山 正久, 森下 保幸, 国田 朱子

## 文 献

- 1) Lagerstrom, M.C. and Schioth, H.B. (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **7**, 339-357.
- 2) Lee, H.J., Wall, B. and Chen, S. (2008) G-protein-

coupled receptors and melanoma. *Pigment. Cell Melanoma Res.*, **21**, 415-428.

- 3) Hikiji, H., Ishii, S., Shindou, H., Takato, T. and Shimizu, T. (2004) Absence of platelet-activating factor receptor protects mice from osteoporosis following ovariectomy. *J. Clin. Invest.*, **114**, 85-93.
- 4) Ishii, S. and Shimizu, T. (2000) Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog. Lipid Res.*, **39**, 41-82.
- 5) Honda, Z., Nakamura, M., Miki, I., et al. (1991) Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature*, **349**, 342-346.
- 6) Nagase, T., Ishii, S., Kume, K., Uozumi, N., Izumi, T., Ouchi, Y. and Shimizu, T. (1999) Platelet-activating factor mediates acid-induced lung injury in genetically engineered mice. *J. Clin. Invest.*, **104**, 1071-1076.
- 7) Ishii, S., Nagase, T., Shindou, H., Takizawa, H., Ouchi, Y. and Shimizu, T. (2004) Platelet-activating factor receptor develops airway hyperresponsiveness independently of airway inflammation in a murine asthma model. *J. Immunol.*, **172**, 7095-7102.
- 8) Kihara, Y., Ishii, S., Kita, Y., Toda, A., Shimada, A. and Shimizu, T. (2005) Dual phase regulation of experimental allergic encephalomyelitis by platelet-activating factor. *J. Exp. Med.*, **202**, 853-863.
- 9) 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.
- 10) Weitzmann, M.N. and Pacifici, R. (2006) Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J. Clin. Invest.*, **116**, 1186-1194.
- 11) Shindou, H., Hishikawa, D., Nakanishi, H., Harayama, T., Ishii, S., Taguchi, R. and Shimizu, T. (2007) A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-CoA: LYSO-PAF acetyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **282**, 6532-6539.
- 12) Body, J.J. (2002) Calcitonin for the long-term prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Bone*, **30**, 75S-79S.
- 13) Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., et al. (1998)

- Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3597-3602.
- 14) Hikiji, H., Ishii, S., Yokomizo, T., Takato, T. and Shimizu, T. (2009) **A distinctive role of the leukotriene B4 receptor BLT1 in osteoclastic activity during bone loss.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 21294-21299.
  - 15) Noguchi, K., Ishii, S. and Shimizu, T. (2003) **Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family.** *J. Biol. Chem.*, **278**, 25600-25606.
  - 16) Yanagida, K., Masago, K., Nakanishi, H., Kihara, Y., Hamano, F., Tajima, Y., Taguchi, R., Shimizu, T. and Ishii, S. (2009) Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *J. Biol. Chem.*, **284**, 17731-17741.
  - 17) Ishii, S., Noguchi, K. and Yanagida, K. (2009) Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **89**, 57-65.
  - 18) Contos, J.J., Ishii, I., Fukushima, N., Kingsbury, M.A., Ye, X., Kawamura, S., Brown, J.H. and Chun, J. (2002) Characterization of lpa (2) (Edg4) and lpa (1)/lpa (2) (**Edg2/Edg4**) **lysophosphatidic acid receptor knockout mice : signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa (2).** *Mol. Cell Biol.*, **22**, 6921-6929.
  - 19) Gueguen, G., Gaige, B., Grevy, J.M., Rogalle, P., Bellet, J., Wilson, M., Kläebe, A., Pont, F., Simon, M.F. and Chap, H. (1999) Structure-activity analysis of the effects of lysophosphatidic acid on platelet aggregation. *Biochemistry*, **38**, 8440-8450.
  - 20) Amisten, S., Braun, O.O., Bengtsson, A. and Erlinge, D. (2008) **Gene expression profiling for the identification of G-protein coupled receptors in human platelets.** *Thromb. Res.*, **122**, 47-57.
  - 21) Khandoga, A.L., Pandey, D., Welsch, U., Brandl, R. and Siess, W. (2010) **GPR92/LPA5 lysophosphatidate receptor mediates megakaryocytic cell shape change induced by human atherosclerotic plaques.** *Cardiovasc. Res.*, in press.
  - 22) Lee, C.W., Rivera, R., Gardell, S., Dubin, A.E. and Chun, J. (2006) GPR92 as a new G(12/13)- and G(q)-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *J. Biol. Chem.*, **281**, 23589-23597.
  - 23) Yanagida, K., Ishii, S., 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.
  - 24) Sumida, H., Noguchi, K., Kihara, Y., et al. (2010) LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood*, **116**, 5060-5070.
  - 25) Ihara, Y., Kihara, Y., Hamano, F., et al. (2010) The G protein-coupled receptor T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) facilitates tumor development by serving as an extracellular pH sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 17309-17314.
  - 26) Ludwig, M.G., Vanek, M., Guerini, D., Gasser, J.A., Jones, C.E., Junker, U., Hofstetter, H., Wolf, R.M. and Seuwen, K. (2003) Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature*, **425**, 93-98.
  - 27) Murakami, N., Yokomizo, T., Okuno, T. and Shimizu, T. (2004) G2A is a proton-sensing G-protein-coupled receptor antagonized by lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.*, **279**, 42484-42491.
  - 28) Wang, J.Q., Kon, J., Mogi, C., et al. (2004) TDAG8 is a proton-sensing and psychosine-sensitive G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.*, **279**, 45626-45633.
  - 29) **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.
  - 30) **Choi, J.W., Lee, S.Y. and Choi, Y. (1996) Identification of a putative G protein-coupled receptor induced during activation-induced apoptosis of T cells.** *Cell Immunol.*, **168**, 78-84.
  - 31) Kyaw, H., Zeng, Z., Su, K., Fan, P., Shell, B.K., Carter, K.C. and Li, Y. (1998) Cloning, characterization, and mapping of human homolog of mouse T-cell death-associated gene. *DNA Cell Biol.*, **17**, 493-500.
  - 32) Radu, C.G., Cheng, D., Nijagal, A., Riedinger, M., McLaughlin, J., Yang, L.V., Johnson, J. and Witte, O.N. (2006) **Normal immune development and glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in mice deficient for the T-cell death-associated gene 8 receptor.** *Mol. Cell Biol.*, **26**, 668-677.

- 33) Sin, W.C., Zhang, Y., Zhong, W., Adhikarakunnathu, S., Powers, S., Hoey, T., An, S. and Yang, J. (2004) G protein-coupled receptors GPR4 and TDAG8 are oncogenic and overexpressed in human cancers. *Oncogene*, **23**, 6299-6303.
- 34) Dorsam, R.T. and Gutkind, J.S. (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 79-94.
- 35) Stubbs, M., McSheehy, P.M., Griffiths, J.R. and Bashford, C.L. (2000) **Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment.** *Mol. Med. Today*, **6**, 15-19.
- 36) Gatenby, R.A. and Gillies, R.J. (2004) **Why do cancers have high aerobic glycolysis?** *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 891-899.
- 37) Enserink, J.M., Christensen, A.E., de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H.G., Doskeland, S.O., Blank, J.L. and Bos, J.L. (2002) A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat. Cell Biol.*, **4**, 901-906.
- 38) Calipel, A., Mouriaux, F., Glotin, A.L., Malecaze, F., Faussat, A.M. and Mascarelli, F. (2006) **Extracellular signal-regulated kinase-dependent proliferation is mediated through the protein kinase A/B-Raf pathway in human uveal melanoma cells.** *J. Biol. Chem.*, **281**, 9238-9250.
- 39) Singh, L.S., Berk, M., Oates, R., *et al.* (2007) **Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1, a new metastasis suppressor gene in prostate cancer.** *J. Natl. Cancer Inst.*, **99**, 1313-1327.