OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	がんの増殖および転移における乳酸受容体GPR81の役割
Author(s)	石原, 翔太
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82136
rights	This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　石原　翔太　）	
論文題名	がんの増殖および転移における乳酸受容体GPR81の役割

論文内容の要旨

以下本文

【緒言】

解糖系は嫌気的環境下で見られる非効率的なエネルギー代謝であるが，がん細胞では好気的環境下においても解糖系が亢進しており，その結果大量の乳酸が産生される．このWarburg効果により産生された乳酸は乳酸/H^+共輸送体MCT1およびMCT4を介して腫瘍微小環境へと分泌されるのみならず，がん細胞自身が乳酸をエネルギー源として細胞内に取り込む乳酸シャトルを構築し，がんの増殖，代謝に関与することが明らかになりつつある．

近年，乳酸の受容体としてG-タンパク質共役型受容体GPR81が同定された．乳酸を受容したGPR81は，$G_{\alpha i}$タンパク質と共役することでサイクリックAMP(cAMP)シグナル伝達経路を抑制し，脂肪細胞や筋組織でその生物学的作用を発揮することが明らかとなっている．しかし，腫瘍微小環境に豊富に存在する乳酸を感知したGPR81が，がん細胞の増殖や転移においてどのような役割を担っているかは不明である．

本研究では，がんの増殖，浸潤，転移および解糖系におけるGPR81の役割，ならびに乳酸シャトルとの関連について検討した．

【材料および方法】

1.　細胞

ヒト乳がん細胞株MDA-MB-231(MDA-231)およびMCF7，ヒト正常乳腺上皮細胞MCF-10A，ならびにヒト口腔がん細胞株SAS，HSC2，HSC3およびHSC4細胞を用いた．

2.　GPR81ノックダウン細胞の作製

ヒトGPR81遺伝子を標的とするshRNAを組み込んだshGPR81発現ベクターをリポフェクタミンならびにレンチウィルスを用いてMDA-231細胞に導入したのち，ピューロマイシンによりshGPR81安定発現細胞株を選別した(shGPR81細胞)．コントロールとしてNon-Targeting RNA(shNT細胞)を安定発現させた細胞株を作製した．

3.　細胞内cAMP測定

cAMP-Glo測定キットを用いた．

4.　細胞増殖評価

細胞を24，48時間培養後，細胞増殖試薬WST-1により発色させ吸光度を測定した．

5.　細胞浸潤/遊走能評価 (Migration/Invasion Assay)

細胞浸潤能は2層構造トランスウェルチャンバーにて細胞を培養後，メンブレンを通過し底面に付着した細胞数を計測した．遊走能は創傷治癒法により評価した．

6.　動物実験モデル

1)　皮下移植モデル

細胞懸濁液 ($2x10^7$個/100μl)とマトリゲル®細胞外マトリクス(100μl)の混和液を，5週齢雌性ヌードマウス(BALB/c nu/nu)の乳腺脂肪内に接種した．腫瘍体積はπ/6x1/2x長径(mm)x短径$(mm)^2$の公式を用いて算定した．

2)　脛骨注入骨転移モデル

細胞懸濁液 ($1x10^5$個/ 20μl)を5週齢雌性BALB/c nu/nuマウスの脛骨内に26G注射針を用いて接種した．骨破壊範囲は，X線およびマイクロCT撮影を行い，画像処理ソフトイメージJを用いて面積を計測した．

【結果】

乳がん細胞MDA-231，MCF7および正常乳腺上皮細胞MCF-10AにおけるGPR81発現をウエスタンブロッティングによって検討した結果，乳がん細胞により強いGPR81の発現を認めた．また，乳がん細胞はMCT4も高発現しており，培養液中に分泌される乳酸濃度もMCF10A細胞に比較して増加しており，乳酸シャトルが亢進していることが示唆された．また口腔がん細胞株SASにおいてもGPR81の高発現が見られた．

乳がん細胞の増殖，転移におけるGPR81の役割を検討するために，*GPR81*遺伝子をノックダウンしたshGPR81細胞では，shNT細胞に比較してGPR81発現が減少に伴ってMCT1，MCT4の発現も低下した．この結果に一致して，shGPR81細胞の培養液中に分泌される乳酸の濃度は減少し，乳酸シャトルの機能低下を認めた．さらに，shGPR81細胞ではshNT細胞に比較して細胞内cAMP濃度が増加しており，GPR81を介するcAMPシグナル伝達経路の抑制が減弱していることが示唆された．

WST-1アッセイによる検討の結果，shGPR81細胞はshNT細胞と比較して増殖能が低下していた．また口腔がん細胞SASにおいても*GPR81*遺伝子ノックダウンにより増殖能の低下を認めた．

がん細胞の悪性度を反映する細胞浸潤と細胞遊走はshGPR81細胞では低下しており，GPR81ががん細胞の悪性度と関連することが示唆された．

乳がんの腫瘍原性におけるGPR81の役割を検討するために，shGPR81細胞およびshNT細胞を乳腺脂肪内に接種し，腫瘍形成能を検討した結果，shGPR81細胞はshNT細胞に比較して腫瘍形成頻度および腫瘍体積が顕著に低下した．したがってGPR81は原発巣での乳がんの増大を調節することが示唆された．

乳がんは高頻度に骨に転移するが，脛骨骨髄内接種によるshGPR81細胞の骨内での増大，それに伴う骨破壊が減少していることが判明した．したがってGPR81は乳がんの骨転移進展にも関与することが示された．

shGPR81細胞における原発腫瘍形成能・遊走能・浸潤能の低下ならびに骨転移減少の分子メカニズム解明を目的に，解糖系ならびに骨転移関連遺伝子群の発現検討を行った．その結果shGPR81細胞では解糖系律速酵素HK2，PFK1，乳酸脱水素酵素LDHAの発現低下が認められ，解糖系の抑制が示唆された．また，がんの骨転移成立過程において破骨細胞の分化に関与するサイトカインIL6，IL11の発現が有意に減少していることが示された．

【結論】

本研究により，がん細胞が発現する乳酸受容体GPR81は解糖系による乳酸産生および乳酸/H^+共輸送体による乳酸シャトルを制御することによりがん細胞のエネルギー代謝，ならびに増殖，浸潤，転移に関与することが示された．またGPR81はがん治療の新たなターゲットとしての可能性を秘めていると考えられる．

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　石原　翔太　）			
	（職）		氏　名
論文審査担当者	主 査	教授	鵜澤　成一
	副 査	教授	豊澤　悟
	副 査	准教授	相川　友直
	副 査	講師	山下　元三

論文審査の結果の要旨

本研究は、がん細胞の悪性形質制御における乳酸とその受容体 GPR81 の機能的役割について検討したものである。その結果、乳がん細胞は GPR81 を高発現し、GPR81 は、乳酸輸送体 MCT1/MCT4 の発現を調節することでがん微小環境への乳酸分泌を促進すること、さらに乳がん細胞の増殖、運動性、浸潤性を促進することによりがん細胞の悪性形質制御に深く関与することが明らかとなった。

以上の研究結果は、GPR81 による腫瘍悪性形質制御の分子メカニズムを解明したのみならず、乳酸代謝を利用したがん治療開発に貢献するものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値すると認める。