

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
2020 年度 博士論文

頭頸部扁平上皮癌において GPRC5B はグルコース飢餓における
ストレスによって誘導されるアポトーシスを抑制する

2021 年 2 月 26 日

金森 慶亮

Keisuke Kanamori

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

顎顔面病態診断治療学講座

岩淵博史准教授 指導

論文内容要旨

Gタンパク共有型受容体(GPCR)ファミリーの1つであるGPRC5Bは、細胞外のグルコース濃度の感知、グルコース代謝およびインスリン抵抗性に関与する分子であるが、増殖・浸潤するために多くのグルコースを必要とする悪性腫瘍との関連性については報告されていない。それゆえ我々は、GPRC5Bが頭頸部扁平上皮癌細胞のグルコース代謝に如何なる役割を果たすかについて検討を行った。頭頸部扁平上皮癌担癌患者から得た同一検体における正常組織と癌組織でのGPRC5Bの遺伝子発現量を比較すると、GPRC5Bの遺伝子発現は癌組織で低下していた。6種類の頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いて、低濃度のグルコースにおける細胞生存活性を検討したところ、GPRC5Bの遺伝子発現が高い細胞は低濃度グルコースに抵抗性を示す可能性があった。GPRC5Bをほとんど発現していない頭頸部扁平上皮癌細胞株にGPRC5B強制発現ベクターを遺伝子導入したところ、GPRC5B強制発現細胞は通常の培地ではコントロール細胞(MOCK)と同様の細胞増殖を示したものの、グルコースを除いた培地ではMOCKと比較して生細胞数が多く、アポトーシスを生じた細胞の発生率が減少していた。本研究結果から、頭頸部扁平上皮癌細胞においてGPRC5Bはグルコース飢餓によって生じた低栄養状態によるアポトーシスを回避させる可能性が示された。

論文審査要旨

頭頸部扁平上皮癌において GPRC5B はグルコース飢餓における
ストレスによって誘導されるアポトーシスを抑制する

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

顎顔面病態診断治療学講座 金森慶亮

(指導：岩渕博史 准教授)

主査 梶木恵一 教授

副査 半田慶介 教授

副査 森本佳成 教授

論文審査要旨

G protein-coupled receptor (GPR) ファミリー1の1つである GPRC5B は、細胞外のグルコースを感知し、細胞内に情報伝達するセンサーとしての役割を有する。頭頸部扁平上皮癌を含む多くの悪性腫瘍は、生存や増殖するために多くのグルコースを必要とする。グルコース代謝に関与する GPRC5B は、糖尿病に対しては飛躍的に研究が進んでいるものの、この分子の癌に対する役割についてはほとんど報告されていない。そこで、グルコース依存的な生育をする頭頸部扁平上皮癌細胞株における GPRC5B の役割について、癌のグルコース代謝に着目し検討しようという目的は、新規性があり評価できる。

研究方法としては、data base よりヒト正常組織と扁平上皮癌組織の GPRC5B の情報を取得し遺伝子発現の検索を行っている。さらに、頭頸部扁平上皮癌細胞株である HSC-3、HSC-3-M3、Ca-9、SKN-3、SAT、SCC-4 を用いて、GPCR5B をリアルタイム PCR にて遺伝子発現を確認している。さらに、培地中のグルコース濃度依存的な細胞変化として、細胞生存アッセイを行いグルコースによる影響を確認している。また、GPRC5B の発現ベクターの構築と遺伝子導入を GPRC5B の遺伝子発現をほとんど認めない HSC-3-M3 細胞株に行い、ウエスタンブロットにより、GPRC5B の発現を確認後、グルコース含有培地での Mock 細胞と GPRC5B Ex 細胞の生細胞数、アポトーシス、ネクローシス細胞の検出を行い比較している。以上の様にヒト組織で GPRC5B の発現を確認した後、培養細胞を用いて GPRC5B 発現の意義を検討しており、将来の応用を念頭においた研究計画に基づく研究方法であり、適切であると判断した。また、統計手法も適切に用いられていた。

GPRC5B の遺伝子発現は、正常組織より癌組織で低下していた。培養細胞株の検討では、GPRC5B の遺伝子発現が高い細胞は低濃度のグルコースに抵抗性を示した。GPRC5B の発現の低い細胞に強制発現をした HSC-3-M3 では、グルコース抵抗性を獲得し、低栄養でもコントロールと比較し、アポトーシスを回避し、生細胞が多かった。これらの結果は、対照群を適切に設定し、また、内部コントロールとの比較なども行い合理的に導き出された結果であることを確認した。

以上の結果を受けて、GPRC5B は、ヒト頭頸部扁平上皮癌では正常組織より発現は低くなるが、頭頸部扁平上皮癌培養細胞の結果から、低栄養によるアポトーシス回避をするようになり、生存を維持する分子であることが明らかとなった。また、現在ケトン体療法を担癌患者に行うことがあるが、GPRC5B の発現が高い癌では奏功しにくい可能性も考えられる。この様に本研究において、細胞生存の延長は癌の予後に関与する可能性や、ケトン体療法に個別化を導入できる可能性なども考えられ、極めて今後の癌研究の発展に貢献する重要な意義を見出している。

本審査委員会は申請者が博士（歯学）の学位に十分値するものと認めた。

緒言

エネルギーの代謝は生物が生存するために必須である。それゆえ、生体におけるエネルギーの貯蔵と消費のバランスが崩れると、肥満や羸瘦などの重大な疾病を引き起こす。通常、生体は恒常性によってエネルギーの貯蔵と消費のバランスを保つが、如何なる分子が生体にとって必要となるエネルギー量を検知しているかは不明であった。近年、頭頸部扁平上皮癌ではじめてクローニングされた G protein-coupled receptor 5 (GPCR5) ファミリー¹⁾の 1 つである GPRC5B は、細胞膜上の脂質ラフトに局在する²⁾7 回膜貫通型のオーファン受容体^{3,4)}であり、細胞外のグルコースを感知し、細胞内に情報伝達するセンサーとしての役割を有することが報告された⁵⁾。GPRC5B はショウジョウバエの BOSS 遺伝子とも相同性があり⁴⁾、グルコースセンサーとしての機能を有する領域は、ショウジョウバエでもよく保存されている。GPRC5B/BOSS 遺伝子は Fyn- $IKK\ \epsilon$ シグナルを活性化させ、脂肪組織内での炎症反応を惹起し、脂肪組織の蓄積に関与する分子であることが明らかとなった²⁾。また、GPRC5B ノックアウトマウスにおいて、腹腔内投与されたグルコースの消費が速やかであること²⁾、GPRC5B がスフィンゴミエリンシンターゼ 2 のリン酸化を誘導し、インスリン抵抗性に関与すること^{6,7)}などが示されたことから、現在 GPRC5B は糖尿病の原因遺伝子として注目されている。

一方で、頭頸部扁平上皮癌を含む多くの悪性腫瘍は、生存や増殖するために多くのグルコースを必要とする。癌細胞に取り込まれたグルコースは、解糖系における ATP の産生⁸⁾や、ペントースリン酸経路における細胞増殖や生存に必要な基質の合成に利用される⁹⁾。このグルコースに依存した癌の性質は臨床的にも広く応用されている。画像検査の 1 つである fluorodeoxyglucose (FDG) positron emission tomography (PET) imaging (FDG-PET) は、2-デオキシグルコースの 2 位の水素基を陽電子放出核種であるフッ素 18 に置換したグルコース誘導体を癌細胞に取り込ませて、癌の診断や早期検出に用いられる重要な検査法である。さらにこの 2-デオキシグルコースは、グルコースの代謝を競合的に拮抗して解糖系とペントースリン酸経路を阻害するため、抗腫瘍効果を示す物質として研究されている¹⁰⁾。その他、癌のグルコース代謝に着目した補助療法の 1 つにケトン食療法がある。栄養素に糖質を含まない、主にアミノ酸と脂質からなる食事を摂取させるケトン食療法は、担癌患者のグルコース摂取量を制限することで、臨床において抗腫瘍効果¹¹⁾、さらには活性酸素の産生を介した抗がん剤や放射線治療の増強効果を得ている¹²⁾。

グルコース代謝に関与する受容体 GPRC5B は、糖尿病に対しては飛躍的に研究が進んでいるものの、この分子の癌に対する役割についてはほとんど報告されていない。そこで著者は、頭頸部扁平上皮癌担癌患者の正常組織と癌組織にお

ける GPRC5B の遺伝子発現レベルを比較し、さらにグルコース依存的な生育をする頭頸部扁平上皮癌細胞株における GPRC5B の役割について、分子生物学的手法を用いて検討した。

実験材料および方法

mRNA の発現頻度のデータ取得

頭頸部扁平上皮癌担癌患者における正常組織と癌組織の GPRC5B 遺伝子発

現 Pubmed GEO Profiles

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS2520:40240_at)

に登録されているオープンデータから，頭頸部扁平上皮癌担癌患者の正常組織と癌組織における mRNA の発現頻度のデータを取得し，GPRC5B 遺伝子発現頻度を解析した．このデータは，22 検体の頭頸部扁平上皮癌担癌患者から採取された病理組織を，癌組織と正常組織それぞれに分けてサンプルとし，マイクロアレイ解析を行ったものである．

細胞株と細胞培養

頭頸部扁平上皮癌細胞株である HSC-3, HSC-3-M3, Ca-9, SKN-3, SAT, SCC-4 は Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank から取得した．培養は，グルコース濃度 4.5g/L, Gentamicin Sulfate Solution を 50mg/L, amphotericin B を 250 μ g/L, 10%牛胎児血清(FBS)を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-10) (Gibco™, USA) を用いた．継代は，Mg²⁺および Ca²⁺

を含まない Phosphate Buffered Salts Tablets(PBS, TAKARA BIO INC, Japan)溶液(PBS(-))でディッシュを2回洗浄した後, PBS(-)に溶かした 0.1 % Trypsin 1-250, Virus Free(MP Biomedicals, LLC, France)/ 1mMEDTA 溶液 (トリプシン溶液) で5分間処理し, DMEM-10 で中和した本溶液から任意の細胞数を播種することで施行した. 培養する環境条件として温度 37 °C, 95 %空気, 5 % CO₂ に設定したインキュベーターを用いた. グルコース濃度を検討する実験は, グルコースを除いた DMEM-10 を基本に, Glucose Solution (Gibco™, USA)を用いてグルコース濃度を調整した培地で行った.

逆転写およびリアルタイム PCR (qPCR)

35 mm ディッシュで培養した解析対象の細胞に対し, 2 ml の PBS(-)でディッシュを2回洗浄した後, 1 ml の TRIzol® Reagent (ambion®, USA)を用いてトータル RNA を抽出した. サンプルにクロロホルムを 200 μ l 添加し, 15 秒間攪拌後に 3~5 分静置して 4 °C, 15000 RPM, 15 分の条件で遠心分離した. 上澄は 1.5 ml チューブに移し, イソプロパノールを 500 μ l 添加して再度 4 °C, 15000 RPM, 15 分の条件で遠心分離し, 70 %エタノールで2度洗浄した. ペレットを残して乾燥させた後, フリーウォーター(DNase, RNase 不含)30 μ l を添加し振盪攪拌した. 新たな 1.5 ml チューブにトータル RNA を 11 μ l, dN

TP Mixture(TAKARA BIO INC, Japan)および Oligo dT プライマー(TAKARA BIO INC, Japan)を 1 μ l ずつ添加して 65 $^{\circ}$ C, 5 分熱処理し, SuperScript[®] IV Buffer(Invitrogen, USA)4 μ l, DTT(TAKARA BIO INC, Japan)1 μ l, RNase OUT(TAKARA BIO INC, Japan)1 μ l, そして逆転写酵素である SuperScript[®] IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA)1 μ l を添加して 50 $^{\circ}$ C, 10 分, 80 $^{\circ}$ C, 10 分熱処理した. 逆転写した cDNA サンプルに RNase H (TAKARA BIO INC, Japan) を 1 μ l 添加し, 37 $^{\circ}$ C, 20 分で熱処理した後, これを PCR 解析用サンプルとした. サンプルをフリーウォーター(DNase, RNase 不含)で 10 倍希釈した後, Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix(Agilent Technologies, USA)10 μ l, フリーウォーター8 μ l, オリゴヌクレオチドプライマー (フォワードプライマーおよびリバースプライマーをそれぞれ 0.5 μ l), cDNA サンプル 1 μ l を含む計 20 μ l で調製し, Real Time PCR を行った. qPCR 分析は, Mx 3000P[™] Multiplex Quantitative PCR System(STRATAGENE, USA, California)を用いた. qPCR の熱サイクル条件は, ディネイチャーを 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間, アニーリングを 58 $^{\circ}$ C で 30 秒間, 増幅を 72 $^{\circ}$ C で 30 秒間と設定し 40 サイクル施行した. PCR に用いた GPRC5B のオリゴヌクレオチドプライマーは 5'-TGTACCTCTTCGGCAATGTC-3'(forward), 5'-CGGAGAGCTGCATTGTGTTC-3'(Reverse), GAPDH のオリゴヌ

クレオチドプライマーは、5'-CATGGCAAATTCCATGGCAC-3' (forward), 5'-ATGACGAACATGGGGGCATC-3' (Reverse)である。GPRC5B の PCR 産物は 282 bp, GAPDH の PCR 産物は 244 bp である。

細胞生存アッセイ

6種類それぞれの頭頸部扁平上皮癌細胞株を PBS(-)でディッシュを2回洗浄した後、トリプシン溶液で5分間インキュベートし DMEM-10 で中和した。この細胞溶液を Z1 Coulter® Particle Counter (BECKMAN COULTER INC, USA) で計測し、7000 /well の密度で 96 well ディッシュに播種した。24 時間後、グルコースを含まない DMEM-10 を基本としてグルコース濃度を 4.5 g/L から段階希釈した培地に置き換え、48 時間培養後に Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Japan) を用いて検討した。発色基質である WST-8 は、細胞内脱水素酵素により還元され、水溶性のホルマザンを生成する。本試薬はこのホルマザンの 450 nm の吸光度を直接測定することにより、生細胞数を計測することが可能である。各 Well に発色試薬を 10 μ l ずつ添加し、3 時間後に解析を行った。解析には GLOMAX MULTIDETECTION SYSTEM (Promega, USA) を使用し、波長はプロトコルに準じて 450 nm で行った。

GPRC5B 発現ベクターの構築と遺伝子導入

ヒト GPRC5B の cDNA の遺伝子配列を獲得するため、クローニングベクターである hGPRC5B VersaClone cDNA(R&D SYSTEMS, USA)を使用した。GPRC5B Cloning Vector1 μl をスタンド上で溶かした DH-5 α (大腸菌) に入れ軽くペッティングし、氷上で 20 分間冷却した後に 45 °C で 1 分間ヒートショックを行った。さらに氷上で 2 分間冷却後、SOC 培地 100 μl を添加し 37 °C で 1 時間 30 分保温した。このベクター溶液を、事前に作製しておいた X-GAL Agar 培地に 50 μl 添加し、コンラージ棒とターンテーブルで薄く伸ばして吸収させ、37 °C で 24 時間培養した。ブルーホワイトセレクションにより判別したコロニーをピペッティングし新たな SOC 培地下で、37 °C で 20 時間攪拌培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN, USA)にてクローニングベクターを精製し、4 °C の冷蔵庫へ保管した。増幅、精製した GPRC5B クローニングベクターから制限酵素処理を用いて GPRC5B の cDNA 配列を取り出し、発現ベクターである pTargetTM Mammalian Expression Vector (Promega, USA) に挿入した (GPRC5B Ex)。制限酵素として BamH I と Sal I を使用したが、作製された発現ベクターに良好な挿入を認めなかったため、本実験系統では TA クローニングで挿入することとした。発現ベクターに挿入された GPRC5B の cDNA 配列が正しいことは、シーケンスの受託サービスを使用して確認している。コン

トロールベクターとして pTarget™ Mammalian Expression Vector をセルフライゲーションした(Mock).

GPRC5B の遺伝子発現をほとんど認めない HSC-3-M3 細胞株を 8×10^5 /100mm ディッシュの密度で播種し, 24 時間後に GPRC5B Ex ベクターと Mock ベクターを FuGENE®6 Transfection Reagent (Promega, USA) を用いて遺伝子導入した. この遺伝子導入された細胞を, 24 時間後に 35 mm ディッシュに播種し, GPRC5B Ex 細胞および Mock 細胞 (Transient) として実験に用いた.

ウェスタンブロット法

HSC-3-M3 細胞株は 8×10^5 /100mm ディッシュの密度で播種し, 24 時間後に GPRC5B Ex ベクターと Mock ベクターを FuGENE®6 Transfection Reagent (Promega, USA) を用いて遺伝子導入した. さらに 24 時間後に 35 mm ディッシュに 1×10^5 個の密度で播種し 48 時間培養した後, 以下に示すウェスタンブロット法のためのサンプルとして用いた.

Mock 細胞および GPRC5B Ex 細胞は, PBS(-)でディッシュを 2 回洗浄した後, 2-Mercaptoethanol を 5 %含む 2×Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD USA) で溶解し, 95 °C 5 分で熱処理後にウェスタンブロット法を施行した. EzRun

(ATTO, Japan)を超純水で10倍希釈し、5~20%濃度のポリアクリルアミドゲル e-PAGEL HR(ATTO, Japan)をセットした PageRun(ATTO, Japan)に規定量注いだ後、マーカー Precision Plus Protein™ Laleidoscope(BIO RAD, USA)を10 μ l, Sample を15 μ l 注入し24W-25分で電気泳動した。次に5倍希釈した Gel Wash Buffer で電気泳動したゲルを2分間振盪、洗浄した後にメンブレンとともに Power Blot(ATTO, Japan)に規定通りセットし、24V-15分の設定で転写した。メンブレンを10倍希釈した TBS-T(ATTO, Japan)と EzTWEEN(1/100)(ATTO, Japan)の混合溶液で2分間振盪、洗浄した。5倍希釈した Ez Block Chemi(ATTO, Japan)で1時間振盪、ブロッキングした後、5倍希釈した Ez Block Chemi(ATTO, Japan)で一次抗体を希釈し1時間振盪反応させた。一次抗体の濃度は次のとおりである。Anti-GAPDH 抗体 (Abcam, USA) は1/10000希釈とした。Anti-GPRC5B 抗体 (ATLAS ANTIBODIES, Sweden) は1/250希釈とした。メンブレンを10倍希釈した TBS-T(ATTO, Japan)と EzTWEEN(1/100)(ATTO, Japan)の混合溶液で5分×3回振盪、洗浄した後、5倍希釈した Ez Block Chemi で二次抗体を希釈し1時間振盪反応させた。二次抗体の濃度は次のとおりである。Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP)抗体 (Abcam, USA)は1/10000希釈とした。TBS-T+EzTWEEN(1/100)で5分×3回振盪、洗浄した後、メンブレンを Ez WestLumiOne(ATTO, Japan)によく浸透させた。メンブレンは

LuminoGraph I(ATTO, Japan)で検出したのち CS Analyzer 4 (ATTO, Japan) で定量した. Anti-GAPDH 抗体 (Abcam, USA) はローディングコントロールとして使用した.

細胞数計測

細胞数の計測は $Mg^{2+}(-)$, $Ca^{2+}(-)$, PBS(Phosphate Buffered Salts) Tablets(TAKARA BIO INC, Japan)溶液(PBS-)でディッシュを2回洗浄した後, トリプシン溶液で5分間処理した溶液を Z1 Coulter®Particle Counter(BECKMAN COULTER INC, USA)で計測した.

各細胞は3枚ずつディッシュに播種して同様の処理を行い, 1枚のディッシュにつき3回の計測をした後, その平均値を解析値とした.

①グルコース含有培地で培養した時の Mock 細胞と GPRC5B Ex 細胞の細胞数

HSC-3-M3 細胞株を $8 \times 10^5 / 100\text{mm}$ ディッシュの密度で播種し, 24 時間後に GPRC5B Ex ベクターと Mock ベクターを FuGENE®6 Transfection Reagent (Promega, USA) を用いて遺伝子導入した. さらに 24 時間後に 35 mm ディッシュに 1×10^5 個の密度で播種し, その翌日に 4.5 g/L 濃度のグルコースを含む DMEM-10 に置き換えて (Day0 とする) 4 日間細胞数を計測した.

②グルコース不含培地で培養した時の Mock 細胞と GPRC5B Ex 細胞の細胞数

HSC-3-M3 細胞株を 8×10^5 /100mm ディッシュの密度で播種し、24 時間後に GPRC5B Ex ベクターと Mock ベクターを FuGENE®6 Transfection Reagent (Promega, USA) を用いて遺伝子導入した。24 時間後に 35 mm ディッシュに 2×10^5 個の密度で播種し、その翌日にグルコースを除いた DMEM-10 に置き換えて (Day0 とする) 4 日間細胞数を計測した。

生細胞およびアポトーシス細胞とネクローシス細胞の検出

HSC-3-M3 細胞株を 8×10^5 /100mm ディッシュの密度で播種し、24 時間後に GPRC5B Ex ベクターと Mock ベクターを FuGENE®6 Transfection Reagent (Promega, USA) を用いて遺伝子導入した。さらに 24 時間後に 35 mm ディッシュに 1×10^5 個の密度で播種し、その翌日にグルコースを除いた DMEM-10 に置き換えて 48 時間培養した。それぞれの細胞は、Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit (PromoKine, USA) のプロトコルに従い染色した。以下に染色に用いた蛍光色素と手法を示す。

蒸留水で 1 : 5 に希釈した 5×Binding Buffer で細胞を 2 回洗浄後、100 μ l の 1×結合バッファーを添加して調製した 5 μ l の FITC-Annexin V, 5 μ l のエチジウムホモジマーIII, および 5 μ l の Hoechst 33342 をディッシュに添加し、室温に 15 分間静置した。1×結合バッファーで 2 回細胞を洗浄した後、BZ-

9000(KEYENCE, Japan)を用いて各群を任意の撮影範囲で 3 か所撮影したデータをもとに、陽性細胞数を Analysis Application BZ-X800(KEYENCE, Japan)でカウントした。

解析結果の統計処理

担癌患者における正常組織と癌組織の GPRC5B の遺伝子発現の比較は、両検体が同じ母集団から抽出されているため、発現量について中央値（四分位範囲）を用いて表し、マンホイットニーの U 検定により解析を行った。

in vitro におけるすべての実験データは 3 群以上のサンプルを 3 回以上独立して計測を行った。結果の分布には正規性があることから、解析結果は平均値±標準偏差で表し、2 つの独立したサンプルを比較するためスチューデント t 検定を用いた。P 値が 5 %未満のものを統計的に有意とみなした。

結果

頭頸部扁平上皮癌担癌患者の正常組織と癌組織における GPRC5B 発現比較

GPRC5B は全ての患者の正常組織および癌組織で遺伝子発現が確認された。22名の担癌患者の正常組織と癌組織で GPRC5B の遺伝子発現量を比較すると、正常組織の中央値は 94.7427 (四分位範囲 72.6087-113.2098)、癌組織の中央値は 60.7336 (四分位範囲 51.33125-81.68293) となり、22 検体中 14 検体で正常組織より癌組織で GPRC5B の遺伝子発現が低下していることが分かった (図.1A,B)。

頭頸部扁平上皮癌細胞株における GPRC5B の遺伝子発現レベルとグルコース濃度依存的な細胞生存活性

今回研究に用いた 6 種類すべての HNSCC 細胞株において、GPRC5B の遺伝子発現が確認された。HSC-3-M3 細胞は GPRC5B の遺伝子発現がごくわずかであり発現レベルが最も低い細胞株であった。一方、SAT は GPRC5B の遺伝子発現が最も高い細胞株であり、HSC-3-M3 の 72 倍程度の遺伝子発現量であった (図.2A)。次にそれぞれの癌細胞株において、培地中のグルコース濃度を段階的に希釈し、細胞生存活性を検討した (図.2B-G)。HSC-3-M3 はこれらの細胞で最もグルコース濃度が高い 0.5625 g/L で細胞生存活性が 50% となった (図.2C)。

一方、SAT は最もグルコース濃度が低い 0.0703125 g/L で細胞の生存活性が 50 %となった(図.2F).

さらに、6 種類の HNSCC 細胞株間で minIC50 と GPRC5B 発現レベルが優位な逆相関を示したことから、HNSCC 細胞株において GPRC5B の発現が増加することにより低濃度グルコース環境下での生存活性が高くなる傾向があることが分かった (相関係数 $R=-0.80458$) (図.2H).

GPRC5B 強制発現細胞のグルコース含有培地での細胞増殖と、グルコース不含培地での細胞生存

GPRC5B の発現がごくわずかである HSC-3-M3 細胞を用いた GPRC5B 強制発現細胞(GPRC5B Ex 細胞)では、GPRC5B の遺伝子発現が上昇していることが qPCR 法(図.3A)で、蛋白質量が増加していることがウエスタンブロッティング法(図.3B)で確認された。Mock 細胞と GPRC5B Ex 細胞は、グルコース含有培地で培養したところ、同様の増殖曲線を示した(図.3C)。一方、グルコース不含培地で培養した Mock 細胞と GPRC5B Ex 細胞は、いずれも細胞数の減少が認められたが、GPRC5B Ex 細胞の細胞数は Mock 細胞と比較して有意に多かった(図.3D)。

GPRC5B 強制発現細胞のグルコース不含培地培養下でのアポトーシス抵抗性

グルコース不含培地培養下での GPRC5B Ex 細胞および Mock 細胞において、健全な細胞の割合は Mock 細胞より GPRC5B Ex 細胞の方が多かった(図.4A,E,I). アポトーシスが生じている細胞の割合は, Mock 細胞より GPRC5B Ex 細胞で少なかった(図.4B,F,J). 一方, ネクローシスを生じている細胞の割合は, GPRC5B Ex 細胞と Mock 細胞で有意差は認められなかった(図.4C,G,K).

考察

悪性腫瘍は、急速に進展するための ATP、核酸、脂肪酸をグルコースから産生することが知られている^{8,9)}。我々がターゲットとする頭頸部扁平上皮癌も多くの糖を必要とする悪性腫瘍であり、細胞内への糖の取り込みを利用した FDG-PET 検査で正診率が高い腫瘍の 1 つである。しかしながら、癌細胞は自身がおかれている環境の変化に適応するため、グルコース以外にもグルタミンなどの他の栄養素を利用する^{13,14)}。著者は、癌細胞が生存するために利用するエネルギー源の多様性に着目し、細胞内と細胞外のエネルギーバランスを感知する分子が癌の生命力に関与するのではないかと仮定した。

近年 GPCR5B は、細胞外のグルコースの感知や⁵⁾、グルコース代謝²⁾やインスリン抵抗性に関与する^{6,7)}ことが明らかとなり、糖尿病の研究で注目されている。しかしながらグルコース代謝が亢進している癌に対する役割については報告されていない。そこで初めに、著者は Pubmed GEO Profiles のデータベースから、GPCR5B の遺伝子発現は頭頸部扁平上皮癌組織で低下する傾向がある分子であることを見出した。GPCR5B ノックアウトマウスにおいて、細胞内へのグルコース取込みが増大し血糖値低下が速やかであることから、正常組織と比較して頭頸部扁平上皮癌組織における GPCR5B の遺伝子発現の低下は、癌組織におけるグルコースへの依存性の高さを反映しているものと考えられる。し

かし、GPRC5B が癌遺伝子であるかどうかは現時点では不明であり、発癌の際に遺伝子発現が低下する、すなわちがん抑制遺伝子である可能性も今後検討が必要である。例として GPCR5 ファミリーである GPRC5A は肺がんの発生を抑制する分子として報告されており¹⁵⁾、GPRC5B も頭頸部扁平上皮癌の発癌を抑制する分子である可能性は否定できない。

次に頭頸部扁平上皮癌細胞株における GPRC5B の遺伝子発現レベルとグルコース依存性について検討したところ、GPRC5B の遺伝子発現が高い細胞株は、培地中のグルコース含有量がわずかであっても高い細胞生存活性を示し、逆に最も発現の低い細胞株は、グルコース濃度の低下に伴い、最初に細胞生存活性が50%以下となった。他の細胞株においても同様の傾向が確認され、GPRC5B の遺伝子発現レベルとグルコース飢餓が引き起こす細胞死には、負の相関関係があることが考えられた。事実、GPRC5B をほとんど発現していない頭頸部扁平上皮癌細胞株に GPRC5B を強制発現させると、グルコース不含培地での培養下において、細胞死が抑制される結果を得た。GPRC5B は癌細胞がグルコース欠乏によって飢餓状態にさらされていることを感知し、情報伝達することで糖飢餓による細胞死を緩和すると考えられた。

近年、Sphingosine 1-phosphate (S1P)-atypical protein kinase C シグナルが、飢餓環境ストレスによって生じる癌細胞のアポトーシスを回避させるシグナル

経路であることが報告されている¹⁶⁾。今回我々は、グルコース飢餓によって生じる癌細胞のアポトーシスを、GPRC5B が抑制することを明らかにしている。GPRC5B の下流分子であり、癌遺伝子ファミリーメンバーとしても知られている *fyn* は、S1P の産生に関与する SphK の活性化を誘導することが明らかとなっており^{17,18)}、今後 GPRC5B が S1P-aPKC シグナルを制御する分子であるかどうかを検討する必要がある。また、大腸癌細胞株を用いた実験で、グルコース欠乏条件下で GluD1 が増強し、グルタミン代謝が亢進することが明らかとなっている¹⁴⁾。GPRC5B がグルコース飢餓を感知して、グルコース代謝からグルタミン代謝などの他の代謝経路にエネルギーの獲得を変換する機能を有する可能性がある。

本研究結果から、GPRC5B は頭頸部扁平上皮癌組織で遺伝子発現が低下していること、さらには頭頸部扁平上皮癌細胞のグルコース依存性に関与することが明らかとなった。しかし、GPRC5B が頭頸部扁平上皮癌の増悪因子であるかどうかはいまだ不明であり、GPRC5B の遺伝子発現レベルを標準化し、癌患者の予後を調査することは今後の課題である。また、GPRC5B が頭頸部扁平上皮癌のグルコース依存性に関与することから、FDG-PET 検査における感度や正診率についても検討することが重要である。GPRC5B は、生体のエネルギー代謝に重要な役割を持つ分子であり、悪性腫瘍における GPRC5B の機能解析を行

うことは、今後の癌研究をさらに発展させる可能性がある。

結論

以上の結果より、GPRC5B は頭頸部扁平上皮癌組織で発現が低下する分子であること、また、この分子の発現が高い頭頸部扁平上皮癌細胞株においてはグルコース代謝への依存性が低く、グルコース飢餓によって生じるアポトーシスを回避することが明らかとなった。

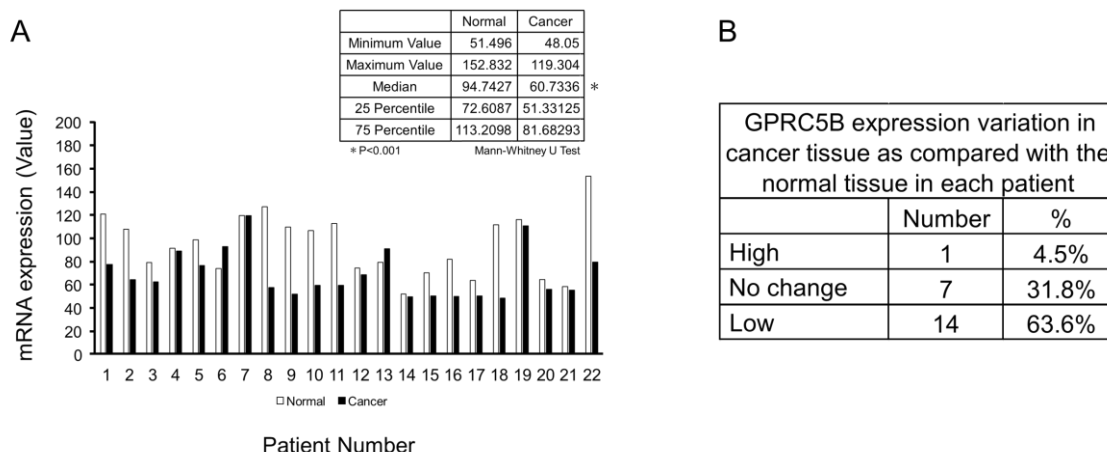
文献

- [1] Cheng Y, Lotan R: Molecular cloning and characterization of a novel retinoic acid-inducible gene that encodes a putative G protein-coupled receptor, *J Biol Chem.* 273(52): 35008-15, 1998
- [2] Yeon-Jeong K, Takamitsu S, Takuji N et al: GPRC5B activates obesity-associated inflammatory signaling in adipocytes, *Sci Signal.* 5(251): ra85, 2012
- [3] Hart A C, Krämer H, Zipursky S L et al: Extracellular domain of the boss transmembrane ligand acts as an antagonist of the sev receptor, *Nature.* 361(6414): 732-6, 1993
- [4] Stefan K, Christoph M, Thomas P et al: Molecular evolution of a chordate specific family of G protein-coupled receptors, *BMC Evol Biol.* 11: 234, 2011
- [5] Ayako K K, Yeon-Jeong K, Masayuki M et al: A Drosophila orphan G protein-coupled receptor BOSS functions as a glucose-responding receptor: loss of boss causes abnormal energy metabolism, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(40): 15328-33, 2008
- [6] Yeon-Jeong K, Peter G, Yoshio H et al: GPRC5B-Mediated Sphingomyelin Synthase 2 Phosphorylation Plays a Critical Role in Insulin Resistance, *iScience.* 8: 250-266, 2018

- [7] Arvind S, Stefan A, Patrik R et al: GPRC5B a putative glutamate-receptor candidate is negative modulator of insulin secretion, *Biochem Biophys Res Commun.* 441(3): 643-8, 2013
- [8] Otto W: On the origin of cancer cells, *Science.* 123: 309-14, 1956
- [9] Jiang P, Du W, Wu M et al: Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer, *Protein Cell.* 5(8): 592-602, 2014
- [10] Pelicano H, Martin D S, Xu R-H et al: Glycolysis inhibition for anticancer treatment, *Oncogene.* 25(34): 4633-46, 2006
- [11] Keisuke H, Katsufumi K, Satoshi O et al: Promising Effect of a New Ketogenic Diet Regimen in Patients with Advanced Cancer, *Nutrients.* 12(5) 1473, 2020
- [12] Allen B G, Bhatia S K, Buatti J M et al: Ketogenic diets enhance oxidative stress and radio-chemo-therapy responses in lung cancer xenografts, *Clin Cancer Res.* 19(14): 3905-13, 2013
- [13] Turowski G A, Rashid Z, Hong F et al: Glutamine modulates phenotype and stimulates proliferation in human colon cancer cell lines, *Cancer Res.* 54(22): 5974-80, 1994

- [14] Masaaki M, Masamitsu K, Naohiro N *et al.*: Metabolic Adaptation to Nutritional Stress in Human Colorectal Cancer, *Sci Rep.* 6: 38415, 2016
- [15] Jiong D, Junya F, Xiao-F Y *et al.*: Knockout of the tumor suppressor gene Gprc5a in mice leads to NF- κ B activation in airway epithelium and promotes lung inflammation and tumorigenesis, *Cancer Prev Res.* 3(4): 424-37, 2010
- [16] Taketoshi K, Alisha D C, Irene S T *et al.*: Activation of atypical protein kinase C by sphingosine 1-phosphate revealed by an aPKC-specific activity reporter, *Sci Signal.* 12(562): eaat6662, 2019
- [17] Ana O, Nicole U, Kiyomi M *et al.*: IgE-dependent activation of sphingosine kinases 1 and 2 and secretion of sphingosine 1-phosphate requires Fyn kinase and contributes to mast cell responses. *J Biol Chem.* 281(5): 2515-25, 2006
- [18] Juan R, Ana O: Src family kinases and lipid mediators in control of allergic inflammation. *Immunol Rev.* 217: 255-68, 2007

図.1 頭頸部扁平上皮癌担癌患者の正常組織と癌組織での GPRC5B の発現レベル



PubmedGEOProfiles(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi>

?ID=GDS2520:40240_at)に登録された 22 人の頭頸部扁平上皮癌担癌患者デー

タをもとに、同一検体の正常組織と癌組織の GPRC5B の遺伝子発現量を比較

した。正常組織での中央値 94.7427（四分位範囲 72.6087-113.2098）および癌

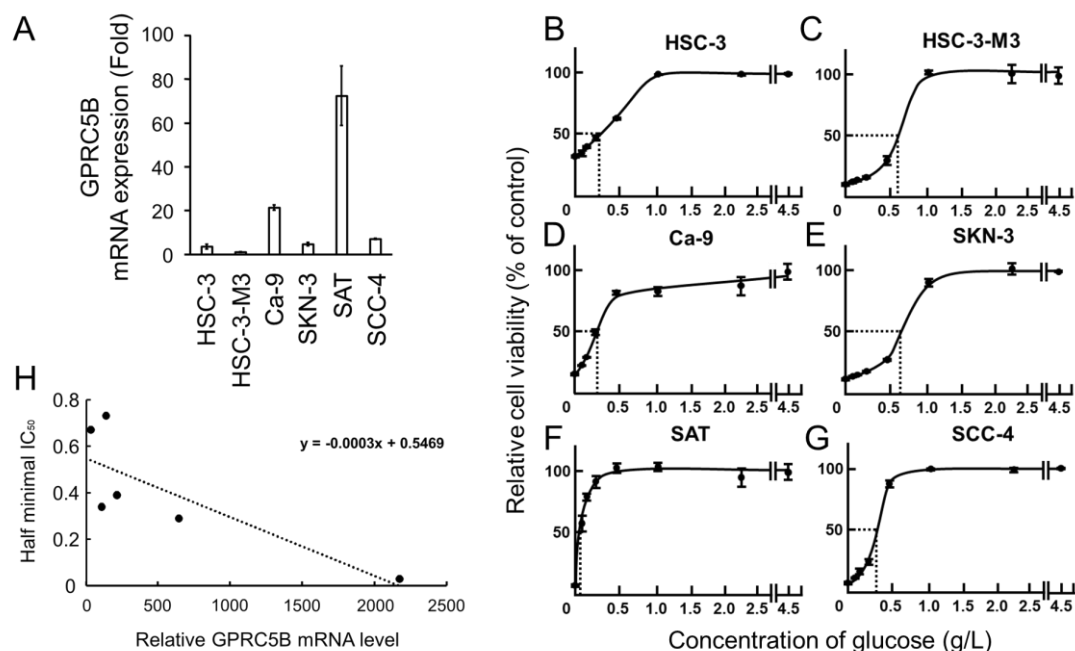
組織での中央値 60.7336（四分位範囲 51.33125-81.68293）を用いてマン・ホ

イットニーの U 検定を行った(A)。正常組織での GPRC5B 発現量との差が

10%未満の検体を No Change とし、癌組織で GPRC5B 発現が高い検体、癌組

織で GPRC5B 発現が低い検体を簡易的に示す(B)。

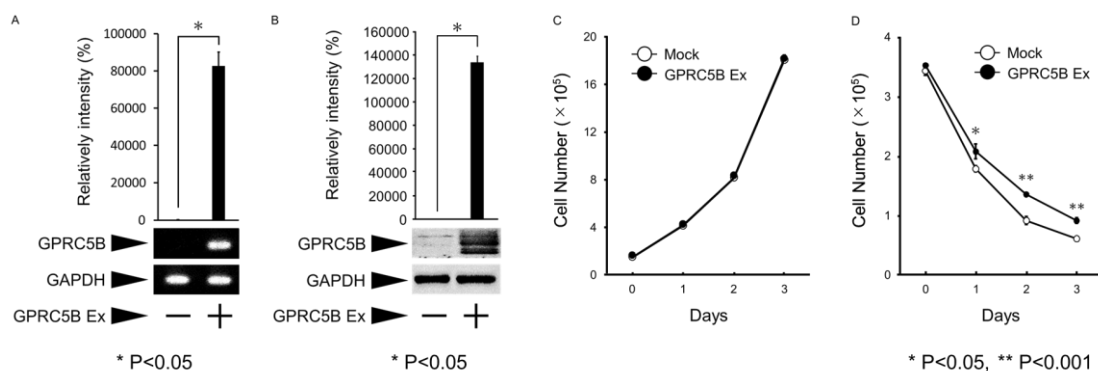
図.2 6種類の HNSCC 細胞株における GPRC5B の mRNA レベルとそれぞれの細胞の培地中の糖濃度依存的な生存活性



6種類の HNSCC 細胞株から total RNA を抽出した後、逆転写によって cDNA を作成した。GAPDH を内部標準として、GPRC5B の遺伝子発現レベルは qPCR で定量比較した(A)。それぞれの HNSCC 細胞株をグルコース濃度が 4.5 g/L から 0 g/L まで段階希釈された培地で 48 時間培養し、Cell Counting Kit-8 を用いて細胞生存活性を測定した(B-G)。6種類の HNSCC 細胞株間で minIC₅₀ と GPRC5B 発現レベルは優位な逆相関を示す(H) (相関係数 R=-0.80458)。解析結果は平均値±標準偏差で表し、スチューデント t 検定を用いて解析した。P 値が 5 %未満のものを統計的に有意とみなした。

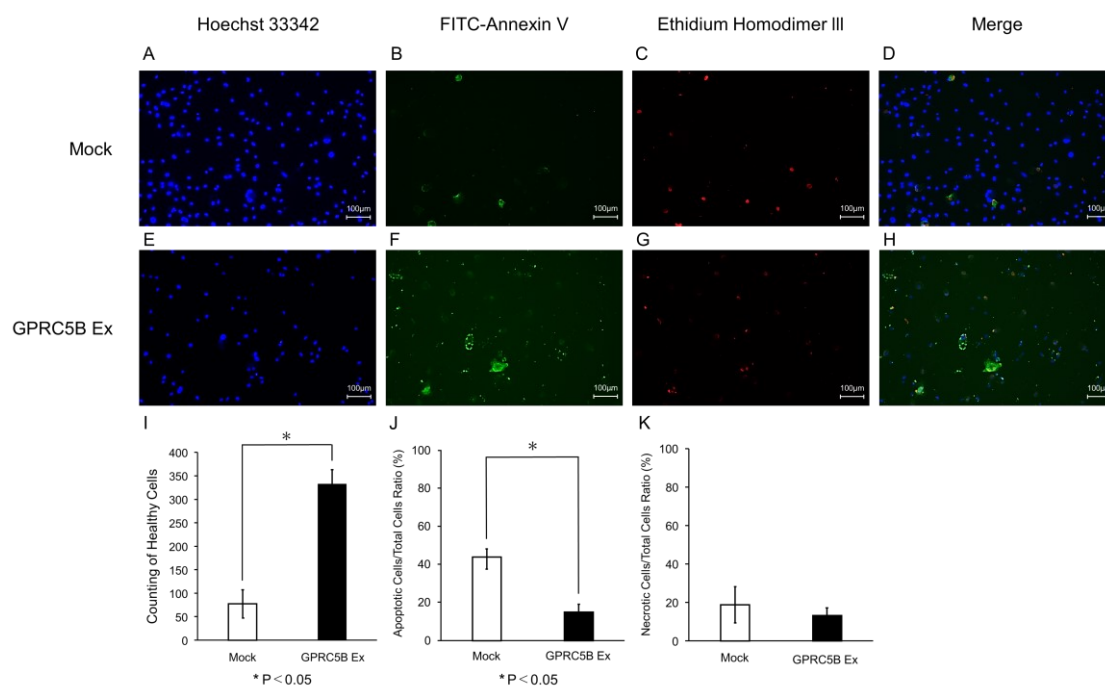
図.3 Mock 細胞と GPRC5B Ex 細胞をグルコース含有および不含培地で培養

した時の細胞数



Mock 細胞と GPRC5B Ex 細胞の total RNA を抽出した後、逆転写によって cDNA を作成した GAPDH を内部標準として、GPRC5B の遺伝子発現レベルは qPCR で定量比較した(A)。Mock 細胞と GPRC5B Ex 細胞を溶解し、GPRC5B および GAPDH のバンドを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離したのち、ウェスタンブロッティング法で検出した。GAPDH を内部標準として、GPRC5B のたんぱく質発現レベルを比較した(B)。Mock 細胞と GPRC5B Ex 細胞を播種後、グルコース含有培地で培養し 24 時間ごとに細胞数をカウントした(C)。Mock 細胞と GPRC5B Ex 細胞を播種後、グルコース不含培地で培養し 24 時間ごとに細胞数をカウントした(D)。解析結果は平均値±標準偏差で表し、スチューデント t 検定を用いた。P 値が 5 % 未満のものを統計的に有意とみなした(*P<0.05, **P<0.001(スチューデント t 検定))。

図.4 グルコース不含培地培養下における Mock 細胞と GPRC5B Ex 細胞の Apoptotic, Necrotic,および Healthy cell の検出



Mock 細胞と GPRC5B Ex 細胞を播種後, グルコース不含培地で 24 時間培養し, 全細胞は Hoechst33342(A)(E), アポトーシス細胞は FITC-Annexin V(B)(F), ネクローシス細胞は Ethidium Homodimer III(C)(G)で検出した. (D)(H)は Merge したものである. Hoechst33342 で染色された細胞を全細胞とし, 全細胞から Apoptotic Cells と Necrotic Cells の合計を差し引いたものを Healthy Cells とした. (I) Healthy Cells, (J) Apoptotic Cells, (K) Necrotic Cells の割合は, 全細胞数で標準化した. 解析結果は平均値±標準偏差で表し, スチューデント t 検定を用いて解析した. P 値が 5 %未満のものを統計的に有意とみなした.

