

学 位 論 文 要 旨

氏 名 沢田 雄一郎

論 文 名 GPRC5A は前立腺癌の細胞増殖と骨転移を促進する

学位論文要旨

【背景】

前立腺癌は世界的にみて、非常に発症頻度の高い疾患で、早期治療により高い確率で根治が見込める癌腫であるが、治療抵抗性前立腺癌や進行性前立腺癌はリンパ節転移や、内臓転移を起こし、予後の悪化や、疼痛や骨折、麻痺などによる QOL の低下を招くこととなる。局所浸潤前立腺癌や進行前立腺癌の治療戦略としてアンドロゲン除去療法は重要な位置づけにあるが、アンドロゲン除去療法の問題点は、治療経過とともにアンドロゲン非依存的な腫瘍増殖機構により治療抵抗性となることにある。近年、上皮細胞成長因子(EGF)とその受容体(EGFR)や血管内皮成長因子(VEGF)やインスリン様成長因子(IGF)などのアンドロゲン受容体を介さない増殖機構が注目されている。これらのシグナルの多くは G 蛋白質共役型受容体(GPCR)を起点としており、前立腺癌に限らず GPCR は多くの癌腫の治療、創薬ターゲットとなっている。なかでもリガンドが不明な Orphan GPCR は様々な癌腫において創薬ターゲットとなるポテンシャルを秘めているが、前立腺癌における報告はほとんど存在せず、前立腺癌の治療標的として未だ多くの可能性を秘めている。我々は前立腺癌細胞株の生物学的性質に着目し、ビッグデータ解析により、前立腺癌進展の制御因子の一つとして Orphan GPCR より GPRC5A を見出し、前立腺癌における GPRC5A の機能解析を行った。

【方法】

(1) CRISPR/Cas9 によるゲノム編集で代表的な前立腺癌細胞株である PC3 及び DU145 において GPRC5A をノックアウト (KO) し、*in vitro* において細胞増殖能、細胞遊走能、細胞浸潤能、細胞接着能の変化を解析した。

- (2) *In vivo* における細胞増殖能の解析のため、ヌードマウスにコントロール細胞及び GPRC5A KO 細胞を皮下投与し、*in vivo imaging* で経時的の腫瘍の増大を評価した。
- (3) コントロール細胞と GPRC5A KO 細胞の RNA シークエンスを行い、GPRC5A KO により有意に発現変動する遺伝子群を抽出し、Gene ontology (GO) 解析にて発現変動する遺伝子群の機能を分類した。GO 解析にて変動を認めた細胞周期関連遺伝子群の発現変動を改めてサンプルで確認し、フローサイトメトリーで細胞周期の変動を解析した。
- (4) GPCR のメインシグナルである、cAMP/PKA 情報伝達経路の活性を確認するため、ウエスタンブロットにより CREB のリン酸化を確認した。また、アデニルシクラーゼの活性化により細胞内 cAMP 濃度の上昇作用を有する Forskolin を添加し、CREB のリン酸化および細胞増殖の変化を確認した。さらに GPRC5A KO 細胞において GPRC5A を過剰発現させ、細胞増殖能の変化が救済されるかを確認した。
- (5) 前立腺癌骨転移成立に及ぼす影響を確認するため、ヌードマウスの脛骨にコントロール細胞及び GPRC5A KO 細胞を播種し、細胞生着と増大を *in vivo imaging* で経時的に評価した。6 週間後に脛骨を採取し、マイクロ CT による画像評価、骨密度測定、HE 染色および TRAP 染色による組織学的評価を行った。

【結果と考察】

GPRC5A をノックアウトしたところ、*in vitro*、*in vivo* 共に増殖能が著明に抑制されるとともに遊走能が抑制された。RNA シークエンスによる解析の結果、GPRC5A ノックアウトにより細胞周期関連遺伝子群が有意に発現亢進していた。細胞周期の解析では GPRC5A KO 細胞において、G2/M 期の割合が増加し、G1 期の割合が減少していた。GPCR のシグナル活性の解析においては GPRC5A KO 細胞で CREB のリン酸化が亢進していた。Forskolin により CREB のリン酸化を惹起した際には、GPRC5A KO 細胞と同様に、増殖能の抑制を認めた。一方で、GPRC5A KO 細胞における GPRC5A の過剰発現により細胞増殖は上昇することが確認できた。これらの結果からは GPRC5A は前立腺癌細胞において細胞周期関連遺伝子の発現を調節し、細胞増殖を促進させているものと考えられた。脛骨骨髓内異種移植においては、GPRC5A KO 細胞の骨転移成立が著明に抑制された。詳細な分子メカニズムは解明できていないが GPRC5A は骨転移の成立にも関与していることが明らかとなった。Kaplan meier plot 解析では GPRC5A の発現と前立腺癌の予後との相関を認めた。これらのことから、GPRC5A は前立腺癌の増殖・進展に関与し、新規の予後予測マーカーあるいは創薬のターゲットとなりえることが示された。

【倫理審査】

本研究にて実施した動物実験は愛媛大学動物実験委員会、遺伝子組換え実験は愛媛大学医学系研究科等遺伝子組換え実験安全委員会により承認されている。

キーワード (3~5)	前立腺癌 GPRC5A 細胞周期 骨転移
-------------	-------------------------------