

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	沢田 雄一郎
審査委員	主査 東山 繁樹 副査 飯村 忠浩 副査 北澤 理子 副査 阿部 雅則 副査 亀井 義明

論文名 GPRC5A は前立腺癌の細胞増殖と骨転移を促進する

審査結果の要旨

【背景】

前立腺癌は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、予後の悪化によるQOLの低下を招くこととなる。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、G蛋白質共役型受容体(GPCR)を起点としたシグナル伝達機構が多くの癌腫の治療、創薬ターゲットとなっており、前立腺癌においてもアンドロゲン受容体を介さないGPCR依存性の増殖機構が注目されている。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。申請者は、この点に着目し、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 の機能解析を行い、治療標的分子としての可能性を検討した。

【方法】

(1)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 ノックアウト細胞を皮下投与し、*in vivo* imaging で経時的な腫瘍の増大を評価した。

(3) コントロール細胞と GPRC5A ノックアウト細胞の RNA シークエンスを行い、GPRC5A ノックアウト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) GPRC5A のシグナル伝達経路解析は、cAMP/PKA 経路を中心に解析した。

(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 ノックアウト細胞を播種し、細胞生着と増大を *in vivo* imaging で経時的に評価した。また、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 ノックアウト細胞において、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 ノックアウト細胞で CREB のリン酸化が亢進していた。一方で、GPRC5A ノックアウト細胞における 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 ノックアウト群の骨転移の成立が著明に抑制された。また、データベースを用いた解析では 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。

本論文は、新規な前立腺癌治療標的分子として GPRC5A を見出し、前立腺癌における GPRC5A の機能解析を行った結果、治療標的分子としての高いポテンシャルを提示した。公開審査会は、平成 31 年 1 月 7 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表し、1) GPRC5A の正常機能は何か、2) GPRC5A ノックアウトによる表現系は複数の前立腺癌細胞株に共通しているか、3) ヒト前立腺癌生検試料での GPRC5A 組織染色はどのようになっているのか、4) GPRC5A のリガンドは何か、どのような方法で同定するのか、5) 前立腺癌細胞の骨転移と悪性化における GPRC5A の役割は何か、6) GPRC5A のシグナル伝達分子機構の特徴的な点は何か、などに関する多くの質問に対し日本語で的確に回答した。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。