

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860239

研究課題名(和文) 異所性発現型嗅神経受容体による大腸癌幹細胞維持機構の基盤的解析

研究課題名(英文) Analysis of ectopically expressed olfactory receptor in colon cancer stem cell

研究代表者

守田 玲菜 (MORITA, Rena)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00516916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がん幹細胞をSide population (SP)細胞として分離した。SP細胞に嗅神経受容体 OR7C1が異所性発現を示す事を見出した。OR7C1遺伝子過剰発現および、siRNAを用いた遺伝子ノックダウン実験により、OR7C1が幹細胞関連分子 SOX2, OCT3/4, LGR5 の上流に存在する事を見出した。OR7C1過剰発現により PI3/AKTシグナルが活性化される可能性が示唆された。また、OR7C1は新規がん精巣抗原であり、免疫療法の標的になる事を見出した。本研究結果は、OR7C1が大腸がん幹細胞維持に重要な機能を有する一方で、免疫の標的になる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Colon cancer stem cells were isolated as side population (SP) cells. We identified Olfactory Receptor Family 7 Subfamily C Member 1 (OR7C1) is ectopically expressed in SP cells. Gene over expression analysis and gene knockdown analysis using siRNAs revealed that stem cell related genes including SOX2, OCT3/4 and LGR5 are located on the downstream of OR7C1. OR7C1 over expression activated PI3/AKT signal suggesting that OR7C1 uses PI3/AKT signal. Furthermore, OR7C1 is a novel cancer-testis antigen, and can be a target of cancer immunotherapy. These results indicate that OR7C1 has a role in the maintenance of colon cancer stem cells and can be a target of cancer immunotherapy.

研究分野：病理学

キーワード：大腸がん幹細胞 嗅神経受容体 OR7C1

### 1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は、(1)高い造腫瘍能、(2)自己複製能、(3)多分化能を有する細胞群と定義される (Clarke *et al.* Cancer Res 66, 9339-, 2006)。また、がん幹細胞は (i) 休止期にある、(ii) トランスポーター分子の発現が高い、(iii) 抗アポトーシス分子 (IAP) の発現が高い、(iv) 活性酸素が低い等の機序により、化学療法や、放射線療法、あるいは分子標的治療に対して抵抗性を示す事が示されている。これらの性質を有する為、がん幹細胞は治療後の再発や、遠隔転移といったがん患者の予後を直接左右するイベントに関わると考えられている。しかしながら、がん幹細胞を維持する分子メカニズムについて不明な点が多い。

正常大腸臓器幹細胞の分子メカニズムにおいては、遺伝子改変マウスを用いた検索により Wnt/ -Catenin シグナルおよび、その下流に位置する Lgr5 分子が、大腸幹細胞の維持に重要であることが、Clevers らの研究室により明らかにされている。また、同グループの報告により、Lgr5 陽性大腸幹細胞が大腸がんの起源になりうる事が示されている (Baker *et al.*, Nature 457, 608-, 2009)。申請者らの検討でも、ヒト大腸がん株から Side population (SP) 細胞として分離したがん幹細胞で LGR5 分子が高発現することを明らかにした (Inoda *et al.*, Am J Pathol 178, 1805-, 2011)。すなわち、大腸幹細胞および大腸がん幹細胞において LGR5 およびその上流シグナルである WNT/ -Catenin シグナルが共通して活性化している可能性が示唆される。しかしながら、LGR5 および WNT/ -Catenin シグナルは正常幹細胞にも発現する為、がん治療の観点からがん幹細胞を標的とする治療戦略を考える上で、免疫療法や分子標的治療の標的分子とはなり難い。

申請者らは、大腸がん幹細胞の分子メカニズムを明らかにする目的で、ヒト大腸がん幹細胞および非幹細胞を用いて、DNA マイクロアレイにてスクリーニングした結果、新規ヒト大腸がん幹細胞分子 Olfactory receptor, family 7, subfamily C, member 1 (OR7C1) を同定した。OR7C1 は分子構造上 7 回膜貫通ドメインを有し、細胞膜局在タンパクの一つである。また OR7C1 は、精巣を除いて、正常臓器では大腸を含めほとんどの臓器で発現を認めない。すなわち、がん精巣抗原に分類される。反面、大腸がん幹細胞では異所性に発現を認め、大腸がん幹細胞特異的な発現を示す。さらに、外科切除検体を 100 例の OR7C1 免疫染色の検討では、OR7C1 陽性率が高いほど予後不良であった。これらのことから、がん治療の標的として有望であることが示

唆される。

### 2. 研究の目的

申請者らは、大腸がん幹細胞の分子メカニズムを解明する為、大腸がん幹細胞に発現する遺伝子群をマイクロアレイ法にてスクリーニングし、Olfactory receptor, family 7, subfamily C, member 1 (OR7C1) が大腸がん幹細胞に高発現することを見出した。OR7C1 はがん幹細胞特異性が高い分子であり正常臓器では精巣にのみ発現する新規がん精巣抗原である。本研究において、OR7C1 が大腸がん幹細胞においてどのような機能を有しているか、遺伝子過剰発現実験および siRNA を用いた遺伝子ノックダウン実験にて検討する。また、OR7C1 は新規がん精巣抗原であるため、OR7C1 が有望ながん免疫療法の標的分子となる可能性を示唆する。本研究において OR7C1 標的免疫療法の可能性を探る。さらに、OR7C1 は膜タンパクであるため、OR7C1 が機能的である場合、何らかのシグナル伝達を使用している可能性が考えられる。本研究では、シグナル伝達を中心に OR7C1 機能解析を行う事により、がん幹細胞維持に関わる分子メカニズムを解明し、がん幹細胞標的療法の基盤とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) OR7C1 遺伝子過剰発現

ヒト大腸がん細胞株、SW480, HCT15, HT29 細胞に、OR7C1 をコードする発現ベクターをトランスフェクションし、OR7C1 安定過剰発現株を作成した。

#### (2) OR7C1 遺伝子ノックダウン

ヒト大腸がん細胞株、SW480, HCT15, HT29 細胞に OR7C1 特異的 siRNA をトランスフェクションし、OR7C1 遺伝子ノックダウンを行った。

#### (3) 幹細胞関連分子発現

SOX2, OCT3/4, NANOG, LGR5 等の幹細胞関連分子発現を定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。

#### (4) Sphere 形成能

Ultra-low attachment plate を用いて、EGF, bFGF 含有培養液下にて sphere 形成能を検討した。

#### (5) マウス造腫瘍能試験

OR7C1 過剰発現細胞株もしくは、OR7C1 特異的 siRNA トランスフェクション株を、NOD/SCID 免疫不全マウスの皮下に移植し、造腫瘍能を検討した。

#### (6) 細胞障害性 T 細胞 (CTL) 誘導

OR7C1 アミノ酸配列より、human leukocyte antigen (HLA)-A24 結合モチーフを有するペプチドをデザインし、ペプチドを合成した。

合成ペプチドを用いて、HLA-A24 陽性ドナーより得られた末梢血単核球(PBMC)から CTL 誘導を行った。

(7)OR7C1 遺伝子過剰発現株を用いた免疫沈降

FLAG タグを付加した OR7C1 遺伝子過剰発現細胞株を用いて、抗 FLAG タグ抗体で免疫沈降を行った。

#### 4. 研究成果

(1)OR7C1 遺伝子過剰発現実験

OR7C1 の機能を解析するために、OR7C1 遺伝子過剰発現株を作成した。過剰発現は、qRT-PCR 法にて確認した。さらに、OR7C1 過剰発現株は、SOX2, LGR5, OCT3/4(POU5F1)などの幹細胞関連分の発現が高かった(図1)

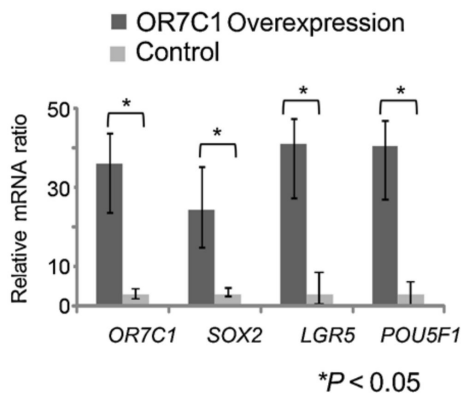


図1、OR7C1 過剰発現細胞の qRT-PCR OR7C1 過剰発現 SW480 細胞を用いて、OR7C1, SOX2, LGR5, POU5F1 の遺伝子発現を検討した。

さらに、OR7C1 過剰発現株では、SP 細胞が増え、sphere 形成能が上昇し、マウスにおける造腫瘍能が亢進した(図2)

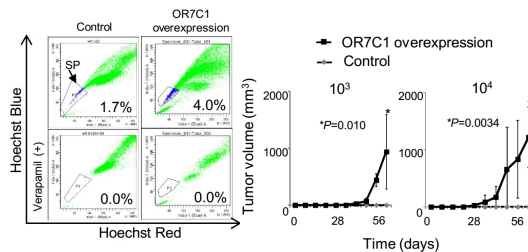


図2、OR7C1 過剰発現株における SP 解析およびマウス造腫瘍能

OR7C1 過剰発現 SW480 細胞を用いて、side population (SP) 解析を行った(左)。OR7C1 過剰発現 SW480 細胞を、1000 個、10000 個、NOD/SCID マウスに移植し、腫瘍増殖曲線を観察した。

(2)siRNA による遺伝子ノックダウン実験 OR7C1 特異的 siRNA を用いて OR7C1 遺伝子ノックダウンを行った。遺伝子発現は、定量的 RT-PCR(qRT-PCR)で検討した。また、SOX2, LGR5, OCT3/4(POU5F1) などの幹細胞関連分子発現を検討した(図3)。その結果、OR7C1 を 3 種類の siRNA でノックダウンした結果、SOX2, LGR5, POU5F1 の遺伝子発現低下を観察した。

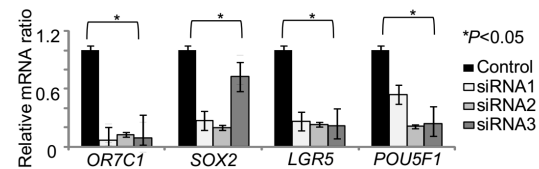


図3、siRNA による遺伝子ノックダウン実験 OR7C1 を siRNA トランスフェクションにて遺伝子ノックダウンを行った。遺伝子発現は qRT-PCR にて検討した。SOX2, LGR5, POU5F1 遺伝子発現を qRT-PCR 法にて検討した。

さらに、siRNA にて OR7C1 遺伝子ノックダウンした細胞では、SP 細胞が低下し、造腫瘍能が低下した(図4)

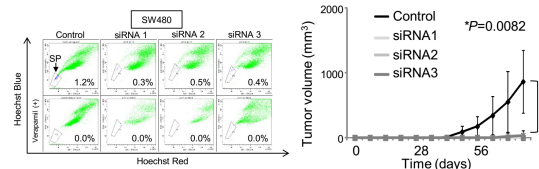


図4、siRNA による遺伝子ノックダウン実験 OR7C1 特異的 siRNA をトランスフェクションした細胞を用いて、SP 解析(左)および NOD/SCID マウスにおける造腫瘍能を検討した(右)。

OR7C1 過剰発現実験および、siRNA による遺伝子ノックダウンの実験から、OR7C1 が大腸がん幹細胞の維持に極めて重要な役割を担っている事が示唆された。



(5) OR7C1 特異的 CTL 誘導 RT-PCR 法による遺伝子発現解析では OR7C1 は正常臓器では精巣にのみ発現した(図5)

図5、OR7C1 遺伝子発現解析 OR7C1 発現を、成人臓器および胎児臓器 cDNA を用いて検討した。

すなわち、OR7C1 は新規がん精巢抗原となり、高い免疫原性が期待される。OR7C1 の免疫原性を確認するため、HLA-A24 結合モチーフを有する OR7C1 由来ペプチドを合成した。OR7C1 ペプチドを用いて、HLA-A24 陽性ドナーから分離した末梢血単核球を用いて CTL クローンを作成した (図 6)。

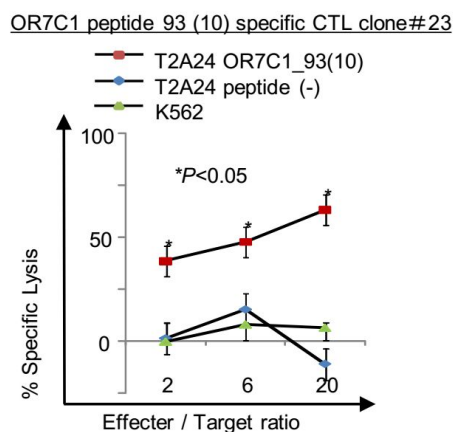


図 6、OR7C1 ペプチド特異的 CTL クローンの樹立

OR7C1 ペプチド 93(10)を用いて、CTL 誘導を行った。CTL クローンは、OR7C1 93(10) ペプチド特異的細胞障害性を示した。

さらに、OR7C1 特異的 CTL クローンは、SP 細胞に対して高い細胞障害性を示した (図 7)。

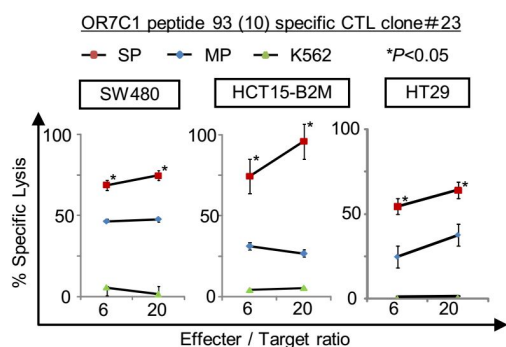


図 7、OR7C1 93(10) ペプチド特異的 CTL を用いた細胞障害性試験

OR7C1 93(10) ペプチド特異的 CTL クローンをを用いて、大腸がん株 SW480, HCT15, HT29 から分離した side population (SP) 細胞および、main population (MP) 細胞に対する細胞障害性を検討した。

これらの結果は、OR7C1 が高い免疫原性を示す新規がん精巢抗原であり、がん幹細胞標的免疫療法の有効な標的抗原となることを示唆する。

#### (6)OR7C1 結合タンパクの解析

FLAG タグを付加した OR7C1 遺伝子過剰発現 SW480 細胞を作成した。同細胞における

OR7C1 タンパク発現は、抗 FLAG タグ抗体を用いたウエスタンブロット法にて確認した。

OR7C1 結合タンパクを解析するため、抗 FLAG タグ抗体を用いて免疫沈降を試みた。しかしながら、様々な Lysis buffer を用いた条件検討を行ったにもかかわらず、抗 FLAG タグ抗体を用いて OR7C1 タンパクを沈降させることが出来なかった。

OR7C1 が 7 回膜貫通型タンパクであることにより、タンパクの可溶化が極めて困難である可能性が示唆された。

一方では、OR7C1 過剰発現株では、ウエスタンブロット法によりリン酸化型 AKT が亢進している事が判明した。当該結果は、OR7C1 が何らかのシグナル伝達分子を介して AKT シグナルを活性化させている可能性が示唆された。しかしながら、その分子機能の解明には至らなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1: Takaya A, Hirohashi Y, Murai A, Morita R, Saijo H, Yamamoto E, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Tamura Y, Takemasa I, Kondo T, Sato N, Torigoe T. Establishment and Analysis of Cancer Stem-Like and Non-Cancer Stem-Like Clone Cells from the Human Colon Cancer Cell Line SW480. PLoS One. 2016 Jul 14;11(7):e0158903. doi: 10.1371/journal.pone.0158903. (査読あり)

2: Morita R, Hirohashi Y, Torigoe T, Ito-Inoda S, Takahashi A, Mariya T, Asanuma H, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Kutomi G, Mizuguchi T, Terui T, Ishitani K, Hashino S, Kondo T, Minagawa N, Takahashi N, Taketomi A, Todo S, Asaka M, Sato N. Olfactory Receptor Family 7 Subfamily C Member 1 Is a Novel Marker of Colon Cancer-Initiating Cells and Is a Potent Target of Immunotherapy. Clin Cancer Res. 2016 Jul 1;22(13):3298-309. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1709. (査読あり)

3: Morita R, Hirohashi Y, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Torigoe T, Sato N. Production of multiple CTL epitopes from multiple tumor-associated antigens. Methods Mol Biol. 2014;1139:345-55. doi: 10.1007/978-1-4939-0345-0\_28. (査読なし)

4: Morita R, Nishizawa S, Torigoe T, Takahashi A, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Sokolovskaya A, Kochin V, Kondo T, Hashino S, Asaka M, Hara I, Hirohashi Y, Sato N. Heat shock protein DNAJB8 is a novel target for immunotherapy of colon cancer-initiating cells. **Cancer Sci.** 2014 Apr;105(4):389-95. doi: 10.1111/cas.12362. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1件)

1. 守田玲菜, 他。Prognostic impact of ORC7C1, a new colon cancer stem cell marker, in primary human colorectal cancer。第104回日本病理学会総会。2015年4月30日。名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)。

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

守田 玲菜 (MORITA, Rena)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：00516916