

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07060

研究課題名（和文）癌特異的代謝を介し増悪化に寄与するGPCR OR7C1の作用機序解明と治療応用

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of action of the olfactory receptor involved in cancer-specific metabolism

研究代表者

武井 則雄 (Takei, Norio)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：50523461

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：細胞が機能する為のエネルギー代謝において、癌細胞では正常の細胞とは異なり、好气的環境下においても解糖系によるエネルギー代謝が生じることが知られており、この特性は腫瘍内の様々なストレス環境下において、癌の悪性化に関与している可能性も示唆されている。本研究では、この正常細胞とは異なる癌の特徴的なエネルギー代謝経路に着目し、本経路への関与が示唆されている機能未知の分子に着目し、その機能解析と本分子抑制による治療効果を検証する研究を行った。その結果、本分子は癌特有のエネルギー代謝経路において主要な代謝酵素を調節する役割を担っている可能性が示唆され、癌治療における新規標的分子としての可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は、癌の特殊なエネルギー代謝として知られ、癌の悪性化に影響を及ぼす可能性が示されているワールブルグ効果に着目し、その機構への関連が示唆される分子の機能を解明し治療への応用が可能かの基礎的知見を示した。

癌細胞は正常の細胞とは異なり、高い増殖能と分化・転移能を有しており、生物学的に癌細胞においてそのような悪性化に影響をおよぼす因子は治療標的・診断マーカーとなる可能性があることから、それらに関与する新規の因子を同定し、その役割を明らかにすることは、新しい治療法や診断法の開発に有用である。

研究成果の概要（英文）：In glucose metabolism, cancer cells are known to have a predominant energy metabolism by glycolysis, even in an aerobic environment, as compared to normal cells. This property has been suggested to be associated with malignant tumors of cancer in various stress environments within the tumor.

In this study, we focused on the characteristic metabolic pathways of cancer that differ from these normal cells and conducted a study about the role of an orphan receptor, which is thought to be involved in its metabolism, and the verification of therapeutic effect of its inhibition. This result suggested that this molecule may be involved in the regulation of major metabolic enzymes in cancer-specific energy metabolic pathways, and expected to be a novel target molecule in cancer treatment.

研究分野：実験病理学

キーワード：GPCR ワールブルグ効果 癌 糖代謝 CRISPR/Cas9

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

低酸素などのストレス環境下において癌細胞は浸潤・転移能の亢進や抗がん剤耐性などの作用を示すことが知られており、この性質は、正常細胞と異なり癌細胞は好氣的環境下においても解糖系によるエネルギー代謝が優位となる事象が認められており、これにより種々のストレス環境下においても高い増殖能、多分化能の維持、転移などの増悪化に寄与する可能性が示唆されている (Lu et al., Cancer Lett. 2015)。

この癌細胞特有の解糖系エネルギー代謝亢進の特性を利用し、癌における本経路の代謝酵素を標的とした治療法の開発およびその発現変化やグルコース取込および乳酸産生を測定することによる診断法の解析などが報告されているが、この癌細胞におけるワールブルグ効果と呼ばれる正常細胞とは異なる代謝経路への移行の意義およびその分子機構に関してはいまだ不明な点が多い。

OR7C1 は G protein coupled receptor (GPCR) に分類され、正常細胞では精巢に有意に、また癌細胞でも発現が認められる、癌細胞・精巢特異的分子として報告されているが、その詳細な機能は明らかにされていない機能未知の「オーファン受容体」である。これまでに申請者はゲノム編集を用いてヒト乳がん細胞株における OR7C1 遺伝子を欠損させ、野生型との比較解析を行うことで、OR7C1 が腫瘍形成能および転移能に寄与し、乳がん細胞株においてエネルギー代謝経路に関与している可能性を示してきた。このことから OR7C1 は癌生物学において新規分子標的および診断マーカーとなり得る重要な因子であることが推察され、臨床への応用につながることも期待できる。

本研究は、OR7C1 遺伝子を欠損させた種々の癌細胞株およびマウスを用いて、癌病態と周辺の微小環境における OR7C1 発現と癌増悪化との相関関係および癌生物学における OR7C1 の作用機序を明らかにし、OR7C1 を標的とした新規治療・診断法開発の可能性を検証することで臨床応用につながる知見を得る。

### 2. 研究の目的

本研究では、OR7C1 機能解析を目的として、癌細胞株およびマウスを用いたゲノム編集による遺伝子欠損を行い、その表現型を野生型と比較解析を行うことで、その機能を明らかとし、本分子を標的とした新規診断・治療法への応用の可能性を検証する。

### 3. 研究の方法

本研究では癌細胞および個体レベルにおける OR7C1 の作用機序を明らかとすることを目的として OR7C1 KO 癌細胞株およびマウスを作製し、生物学的な表現型解析とそれらを用いた癌モデルでの病態を比較解析することで OR7C1 発現と癌病態との因果関係ならびに OR7C1 の癌生物学における機能を解明し、抑制による治療効果を検証、診断・治療法へ向けた基礎的知見を得る。具体的には以下の方法で研究を遂行する。

#### (1) ヒトおよびマウス癌細胞株を用いた KO 細胞の樹立と表現型解析

ヒトおよびマウス癌細胞株を用い、OR7C1 およびマウス homolog の遺伝子を欠損させた細胞 (KO 細胞) 株をゲノム編集技術により作成する。得られた KO 細胞は *in vitro* および *in vivo* においてその増殖および遊走能を野生型と比較解析を行い、その表現型を検証する。

#### (2) エネルギー代謝量の測定

前述の KO 細胞株を用いて、これまでの結果から本分子が関与する可能性が示唆されているエネルギー代謝経路であるグルコース、乳酸を測定し野生型 (WT) および陰性コントロール (mock) の群の結果と、比較することでその変化の検証を行う。

#### (3) 代謝変化をおよぼす責任分子の解析

(2) で得られた結果を基に、影響を及ぼしていると考えられる経路において、既知の報告からその経路を制御すると考えられる主要な代謝酵素を中心に、その発現を WT および mock 並びに KO 間で比較し、解析を行う。

#### (4) 低分子化合物を用いた治療効果の確認

OR7C1 を標的とした分子標的治療の可能性を検証する為、siRNA を用いた RNA 干渉による標的分子の一過性の遺伝子発現抑制による増殖および腫瘍形成抑制効果を *in vitro* および *in vivo* モデルで検証する。

#### (5) KO マウス作成と表現型の解析

正常細胞における本分子遺伝子欠損における影響および正常組織における機能を解析する為、本分子のマウス homolog を欠損させた KO マウスを作成し、個体レベルでの影響を解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒトおよびマウス癌細胞株を用いた KO 細胞の樹立と表現型解析

ヒトおよびマウス大腸がん癌および膀胱癌細胞株を用い、ゲノム編集により OR7C1 およびマウス homolog の標的遺伝子座において欠損を生じさせた KO 細胞株を新たに樹立した。得られた KO 細胞は *in vitro* において増殖能を解析した結果、WT および mock 群と比べ、有意な増殖抑制効果が確認され、さらにマウスを用いた腫瘍モデルでの検証を行った所、腫瘍形成の抑制される傾向が認められた。

##### (2) エネルギー代謝量の測定

前述の KO 細胞株を用いて、*in vitro* におけるエネルギー代謝変化を検証する為、主要な代謝マーカーであるグルコース、グルタミン、乳酸およびグルタミン酸の測定を行い、野生型との比較解析を行った。その結果、control 群 (WT および mock) に比べ、グルコースの取込量および乳酸の減少傾向が KO 細胞において認められた。

##### (3) 代謝変化をおよぼす責任分子の解析

先の結果から、本分子を遺伝子欠損することにより、癌細胞株において、特にグルコース代謝経路が抑制されていることが示唆された為、本分子がワールブルグ効果に影響をおよぼす可能性が考えられたことから、好氣的代謝経路の主要代謝酵素の発現変化を解析した。その結果、本経路の上流に位置し、その機能調節において主要な代謝酵素として報告のある、PFKB の抑制が認められた。

##### (4) 低分子化合物を用いた治療効果の確認

OR7C1 を標的とした分子標的治療の可能性を検証する為、まず初めに *in vitro* における shRNA による安定株の作成および siRNA 導入による増殖抑制効果の検証を行った。その結果、control 群に比べ、KO 細胞株に類似した増殖抑制効果が認められ、さらに siRNA を用いた癌細胞株皮下移植マウスモデルにおける腫瘍形成抑制効果を検証した結果、OR7C1 siRNA 投与による腫瘍形成抑制効果が認められたことから本分子の分子標的薬としての可能性が示唆された。

##### (5) KO マウス作成と表現型の解析

正常細胞における本分子遺伝子欠損における影響および正常組織における機能を解析する為、本分子のマウス homolog を欠損させた KO マウスを作成した。結果、8-11 塩基を欠損し、フレームシフトにより、本分子を欠損する KO マウスの作成に成功した。本系統を数世代戻し交配することにより、オフターゲット効果の可能性を除き、その後ヘテロ同士の交配により両遺伝子座において OR7C1 マウスホモログを欠損させたホモ化を行い、野生型との正常状態での個体レベルでの生化学的および血液学的解析を行った所、その表現型に顕著な変化は認められなかった。

#### 引用文献

Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett.* 356(2 Pt A):156-64., 2015

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takei Norio, Yoneda Akihiro, Kosaka Marina, Sakai-Sawada Kaori, Tamura Yasuaki	4. 巻 19
2. 論文標題 ER01 is a novel endogenous marker of hypoxia in human cancer cell lines	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-019-5727-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakurai Takayuki, Kamiyoshi Akiko, Takei Norio, Watanabe Satoshi, Sato Masahiro, Shindo Takayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Bindel-PCR: a novel and convenient method for identifying CRISPR/Cas9-induced biallelic mutants through modified PCR using Thermus aquaticus DNA polymerase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9923
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46357-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武井 則雄, 米田 明弘, 澤田 香織, 小坂 まりな, 田村 保明
2. 発表標題 ER01 は癌における新規内在性低酸素マーカーと成り得る
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武井 則雄, 米田 明弘, 澤田 香織, 小坂 まりな, 田村 保明
2. 発表標題 癌におけるER01 の新規内在性低酸素マーカーとしての有効性の検証
3. 学会等名 第13回 臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 米田 明弘, 武井 則雄, 澤田 香織, 小坂 まりな, 田村 保明
2. 発表標題 HSP47はトリプルネガティブ乳癌の転移能を増強する
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 米田 明弘, 武井 則雄, 澤田 香織, 小坂 まりな, 田村 保明
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳癌の転移能におけるHSP47の作用機序の解明
3. 学会等名 第13回 臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 米田 明弘, 武井 則雄, 澤田 香織, 小坂 まりな, 田村 保明
2. 発表標題 HSP47によるトリプルネガティブ乳癌の転移能獲得機序の解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	太田 明伸  (Ota Akinobu)  (30438048)	愛知医科大学・医学部・講師    (33920)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	桜井 敬之  (Sakurai Takayuki)  (80317825)	信州大学・学術研究院医学系・准教授     (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関