

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20874

研究課題名(和文) 癌細胞特異的に発現するOR7C1の分子機構解明と新規治療法開発へ向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Uncovering the molecular mechanisms of OR7C1 in cancer biology.

研究代表者

武井 則雄 (Takei, Norio)

北海道大学・産学・地域協働推進機構・特任助教

研究者番号：50523461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：OR7C1は癌幹細胞特異的に発現する分子として同定され、癌病態増悪化への関与が示唆されている機能未知のGPCRである。本研究では、OR7C1の癌生物学における機能を明らかにすることを目的として、OR7C1遺伝子欠損細胞株(KO)を樹立し、野生型細胞株(WT)との比較解析を行った。結果、KOでは、*in vivo*における腫瘍形成能および転移能の減弱が認められた。また*in vitro*における細胞増殖能を検証した結果、糖および特定のアミノ酸に依存して、細胞増殖能の抑制が認められた。以上の結果から、OR7C1は癌細胞におけるエネルギー代謝において重要な役割を果たしていると考えられた。

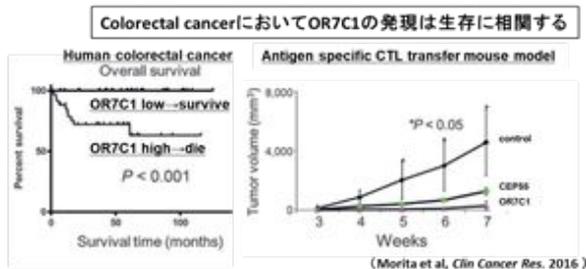
研究成果の概要(英文)：OR7C1 is a G protein coupled receptor and expressed in cancer stem cell and suggested the possibility as a novel factor of poor prognosis. However, the function in cancer remain unclear. In this study, to uncover the importance of OR7C1 expression in cancer biology, we generated conventional OR7C1 knockout clones by using the CRISPR/Cas9 system. As a result, OR7C1 KO decreased tumorigenicity and metastasis *in vivo* and cell proliferation under specific medium conditions *in vitro*. In conclusion, our findings suggest that OR7C1 is predominantly activated under specific condition such as starvation and contributes to cancer progression. Collectively, OR7C1 could be used as both a diagnostic biomarker of cancer exacerbation and a therapeutic target.

研究分野：分子生物学

キーワード：GPCR OR7C1 CRISPR/Cas9 糖代謝 癌 嗅神経細胞

1. 研究開始当初の背景

種々の癌細胞株において、幹細胞様の形質を有する未分化な細胞集団として「癌幹細胞」が同定され、これらは高い自己複製能と多分化能を有することから造腫瘍、転移において中心的役割を担っていると考えられている。したがって、癌幹細胞の生物学的な特性を理解することは、癌幹細胞を標的とした新規治療法の開発のみならず、術後の再発・転移を抑制する新規予防法ならびに特異度の高い予後診断法の確立にもつながることが期待できる。Olfactory receptor familyの一つである OR7C1 は、癌幹細胞特異的抗原として同定され、正常組織においては精巣においてわずかにのみ発現しているのに対し、癌、特に癌幹細胞において過剰発現していること、マウスモデルにおいて本分子特異的 CTL クローンが癌幹細胞を特異的に障害すること、大腸癌患者検体における OR7C1 の発現と予後（生存）には相関が見られることから、OR7C1 の発現が癌の重篤化に作用することが示唆されている。(Morita et al, Clin Cancer Res. 2016)



また、本分子は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、これまでに数種の olfactory receptor が癌のバイオマーカーならびに増殖関連分子として報告されていることから OR7C1 も癌細胞において重要な役割を担っていることが予想され、癌細胞特異的な新規分子標的と成り得ることが期待できる。

2. 研究の目的

G protein coupled receptor (GPCR) であり、olfactory receptor の一つである OR7C1 は癌細胞特異的、且つ、癌幹細胞において過剰発現していること、また、本分子特異的抗原を用いたペプチドワクチン療法において癌幹細胞を特異的に障害することから、OR7C1 は癌生物学において重要な因子であると考えられる。そこで本研究では、リガンドが同定されておらず、その細胞内シグナルなどの生体における機能が未知の受容体 (orphan receptor) である OR7C1 に関して、その発現と癌の増殖・分化能などの癌病態生理との因果関係を明らかとし、癌根治を目的とする OR7C1 を分子標的とした新規予防・治療法の開発に向けた基礎的知見を得ることを目的として、OR7C1 遺伝子欠損 (KO) 細胞を作製し、癌における OR7C1 発現抑制

による病態への影響を検証する。

3. 研究の方法

(1) OR7C1 遺伝子欠損癌細胞株の樹立

遺伝子欠損細胞株の樹立には、細菌の獲得免疫機構を応用した genome 編集技術である CRISPR/Cas9 システムを用い、本分子 genome 上の exon 配列に特異的な gRNA を設計、細胞に導入することで欠損・変異 (INDEL) を誘導し、クローニング、genotyping PCR および sequence 解析により遺伝子欠損し、定量 PCR により、OR7C1 mRNA の発現抑制を確認する。

(2) xenograft model を用いた腫瘍形成能、転移能の検証

得られた KO 細胞株と野生型細胞株 (WT) を用い、免疫不全マウス皮下に移植することで腫瘍形成能の比較解析を行った。また転移能の検証には、癌細胞を尾静脈に注入することにより肺への転移を誘引し、その転移能を評価した。

(3) WT と KO における in vitro 細胞増殖能の比較解析

WT と KO 細胞株を用いて、培養条件としては、まず初めに通常培地での細胞増殖能を検証し、他の実験結果を踏まえて、様々な栄養成分を調整した培地条件下での細胞増殖能の比較解析も行った。

(4) メタボローム解析を用いた OR7C1 の機能探索

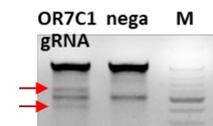
WT と KO 細胞株を用いて、上記 in vitro で細胞増殖能に有意な差の認められた条件下での培養細胞を用いたメタボローム解析を行った。

4. 研究成果

(1) OR7C1 遺伝子欠損癌細胞株の樹立

Cas9 および OR7C1 遺伝子座上の exon 領域を特異的に認識する gRNA を lipofection 法により導入し、一過性発現での INDEL を T7 endonuclease assay により確認することで gRNA の効果を検証した。結果、良好な INDEL が確認された為、続いてクローニングによりシングルセルクローンを樹立、genotyping PCR により得られたクローンから良好な標的遺伝子座の欠損が認められたクローンを選抜し、シーケンス解析による欠損領域の確認を行った。得られたクローンの中から、代表的な 2 クローンを以下の実験に用いることし、定量 PCR による、OR7C1 mRNA の発現も確認、その結果、良好な遺伝子発現減少を確認した。

T7 endonuclease assay



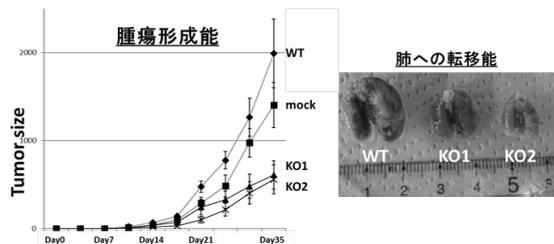
KO1:220塩基欠損, KO2:14/272塩基欠損, KO3:188/26塩基欠損

WT
KO-139
KO-134
KO-131
KO-130
KO-128

なお、タンパクレベルでの発現消失も試みたが、本分子に対する市販抗体は推定分子量サイズに顕著な非特異的バンドが検出されたことから、タンパクレベルでの解析を目指し、現在新規抗体を作成中である。

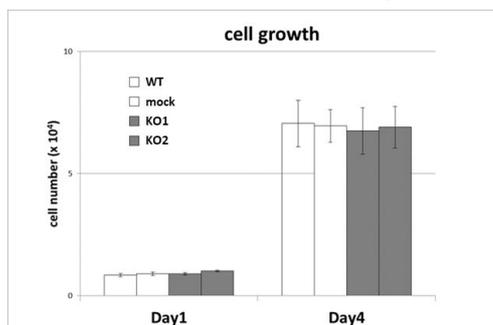
(2) xenograft model を用いた腫瘍形成能、転移能の検証

WT と KO 細胞を用いて、nude マウス皮下移植による xenograft model ならびに尾静注による肺転移モデルによる癌病態への影響を検証した。結果、KO 群で顕著な腫瘍形成能抑制と、肺転移能抑制効果が認められた。

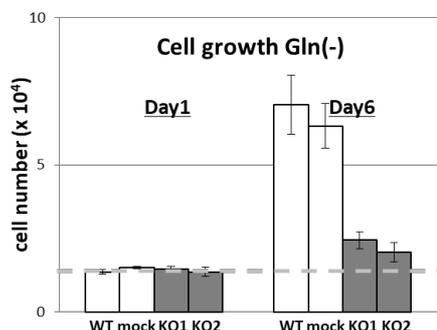


(3) WT と KO における in vitro 細胞増殖能の比較解析

はじめに、通常培養下での細胞増殖能を検証したところ、WT と KO 間ではその細胞増殖能に有意差は認められなかった。



そこで、様々な栄養成分を調整した複数の培養液を用い、その条件下での細胞増殖能を WT と KO 群で検証した結果、Glutamine 濃度依存的な顕著な細胞増殖能抑制が KO で認められた。

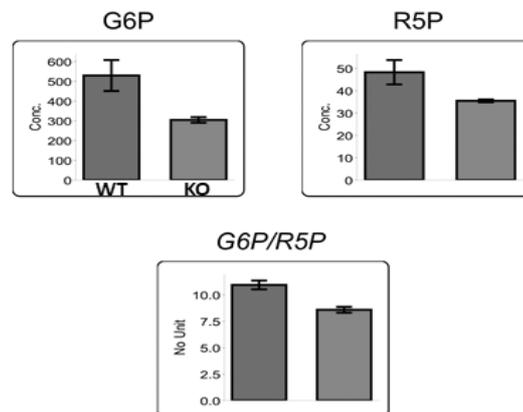


(4) メタボローム解析を用いた OR7C1 の機能探索

上述の様に、KO 群では Glutamine 濃度に依存した細胞増殖能に変化が認められたことから、OR7C1 はエネルギー代謝系に関与している可能性が考えられる。そこで、WT

および KO 細胞株を用いてメタボローム解析を行い、網羅的な代謝変化を検証した。その結果、期待した通り、KO 群では、解糖系の中間代謝物質であるグルコース 6-リン酸ならびにグルコース 6-リン酸からのペントースリン酸経路への、ボトルネック反応で本経路により変換されるリボース 5-リン酸の両者の減少が KO 群で認められた。

がん細胞は正常細胞とは異なり、解糖系を利用して ATP を得ることが知られており（ワールブルグ効果）、加えて癌細胞の増殖には、ATP の他に、代謝性要求、すなわち核酸、アミノ酸、リン脂質、脂肪酸が必須であることから、癌細胞はワールブルグ効果により、ペントースリン酸経路も利用することで炭素骨格、NADPH を得ていると考えられている (Vander et al, Science, 2009)。以上のことから OR7C1 は本経路に関与する重要な分子であることが推察された。



< 引用文献 >

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. 1;22(13):3298-309, 2016
Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science. 324(5930) 1029-33, 2009

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 3 件)

Fujii M, Yoneda A, Takei N, Sakai-Sawada K, Kosaka M, Minomi K,

Yokoyama A, Tamura Y. Endoplasmic reticulum oxidase 1α is critical for collagen secretion from and membrane type 1-matrix metalloproteinase levels in hepatic stellate cells. J Biol Chem. 査読有, 292(38):15649-15660, 2017. doi: 10.1074/jbc.M117.783126.

Takei N, Yoneda A, Sakai-Sawada K, Kosaka M, Minomi K, Tamura Y. Hypoxia-inducible ERO1α promotes cancer progression through modulation of integrin-β1 modification and signalling in HCT116 colorectal cancer cells. Sci Rep. 査読有, 7(1):9389, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-09976-7.

Tamura Y, Yoneda A, Takei N, Sawada K. Spatiotemporal Regulation of Hsp90-Ligand Complex Leads to Immune Activation. Front Immunol. 査読有, 7:201, 2016. doi: 10.3389/fimmu.2016.00201.

〔学会発表〕(計 7件)

武井則雄、米田明弘、澤田香織、小坂まりな、味吞憲二郎、田村保明 ERO1α は低酸素環境下において integrin-β1 の立体構造形成に関与し癌細胞増殖に寄与する 第12回臨床ストレス応答学会大会 2017年

米田明弘、武井則雄、澤田香織、小坂まりな、味吞憲二郎、田村保明 癌細胞における HSP47 の IRE1α 活性調節機構 第12回臨床ストレス応答学会大会 2017年

米田明弘、武井則雄、澤田香織、小坂まりな、味吞憲二郎、田村保明。癌細胞における HSP47 の ER ストレスセンサー IRE1α の活性調節機構 第40回日本分子生物学会年会(ConBio2017) 2017年

武井則雄、米田明弘、澤田香織、田村保明 低酸素誘導性 ERO1α は大腸がん細胞株においてがん増殖に寄与する 第76回日本癌学会学術総会 2017年

米田明弘、武井則雄、澤田香織、小坂まりな、味吞憲二郎、田村保明 HSP47 は ER ストレスセンサー IRE1α の活性抑制を介して癌細胞増殖を調節する 第76回日本癌学会学術総会 2017年

Akihiro Yoneda, Norio Takei, Kori Sakai-Sawada, Marina Kosaka, Kenjiro Minomi, Yasuaki Tamura. Heat

shock protein 47 maintain cancer cell survival through its inhibitory effect on ER stress sensor IRE1α activity American Association for Cancer Research 2017年

米田明弘、藤井瑞希、武井則雄、澤田香織、横山敦郎、田村保明。肝星細胞における小胞体酸化還元酵素 ERO1α の機能解析 第39回日本分子生物学会年会 2016年

〔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 0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

武井 則雄 (TAKEL, Norio)
北海道大学・産学・地域協働推進機構・難治性疾患治療部門・特任助教
研究者番号: 50523461

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()