

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861341

研究課題名(和文) 顆粒膜細胞腫悪性化に関するGPRC5Bの機能解析

研究課題名(英文) IDENTIFICATION OF CANDIDATE GENES FOR GRANULOSA CELL TUMOR PROGRESSION

研究代表者

今井 美沙 (IMAI, Misa)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50709003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：顆粒膜細胞腫は、卵巣癌の一種であり、初期の発症から数十年の歳月をかけて再発・転移するという経過をたどる。そのため、早期発見、早期治療が非常に困難であり、有効な治療法は未だに確立されていない。申請者は、網羅的遺伝子発現解析により顆粒膜細胞腫で発現の上昇している遺伝子群を明らかにし、それらの分子の詳細な機能解析を行った。その結果、顆粒膜細胞腫の悪性化を司る因子としてGPRC5Bを同定した。GPRC5Bは創薬ターゲットとして近年注目されているGタンパク質共役受容体(GPCR)の一種であり、さらなる解析により、顆粒膜細胞腫を中心とした女性特異的な癌の新たな治療薬の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Granulosa cell tumours (GCTs) are frequently seen in menopausal women and are relatively indolent. Although approximately 80% of patients with advanced tumors die from recurrence, little is known about the molecular mechanisms of GCT progression. In this study, we searched for candidate genes based on the expression level, and the selected genes were employed for functional analysis. Focusing on the genes highly expressed in KGN cells, 9 genes were selected throughout screening based on distinct properties of KGN cells at different passages. Of these, GPRC5B was highly expressed in KGN cells and human GCT according to the western blot analyses. In the cells carrying a GPRC5B knockdown construct, reduce proliferation and invasion ability. These results strongly suggest that GPRC5B is involved in etiology and progression of GCT.

研究分野：分子生物学

キーワード：GPRC5B 顆粒膜細胞腫 婦人科系がん がんの浸潤・転移

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣は表層上皮、胚細胞、性ホルモンを分泌する細胞とこれらの組織の間にある間質細胞から成っており、これらのすべての部分から腫瘍が発生することが知られている。卵巣癌は婦人科系癌の中で最も致死率が高く、その中でも表層上皮細胞由来の癌が最も多い。その他には顆粒膜細胞や間質細胞由来の癌などが存在し、顆粒膜細胞腫は、原始卵胞の上皮細胞に由来し、エストロゲンを産生する性索腫瘍であり、時に悪性の経過をとることが知られている。卵巣の悪性腫瘍のうちホルモンを産生する腫瘍の発生原因やリスク因子は明らかになっておらず、ホルモン産生を伴う顆粒膜細胞腫の特性を研究することは、卵巣腫瘍のみならずホルモンを産生する腫瘍の特性を知る上で有用であると考えられる。また、近年、女性の社会進出による晩婚化、出産年齢の高齢化などにより不妊治療を受ける女性が増加し、過剰な量のゴナドトロピンおよび排卵誘発剤の投与による卵巣への負荷の増大により卵巣癌、特に顆粒膜細胞腫の発生リスクが増大するという報告(Nasu et al., 2007)もあり、不妊治療におけるリスクマネージメントの観点からも卵巣癌、特に顆粒膜細胞腫の悪性化機構の解明は重要であると考えられる。

現在、顆粒膜細胞腫のマウスモデルを用いた研究から、Wnt signaling が顆粒膜細胞腫の悪性化に関与しているとの報告がある(Boerboom et al., 2005; Boyer et al., 2010)。また、FOXL2 は卵巣機能に重要であるということが知られており、この遺伝子の不活性化、または遺伝子の変異が卵巣の癌化に関与するとも報告されている(Benayoun et al., 2011; Geiersbach et al., 2011)。さらに、GATA4 の発現は、顆粒膜細胞腫の悪性化にともない上昇することも報告されている(Kyrönlähti et al., 2008)。しかしながら、これらの分子は一般的な癌の悪性化においても重要な働きをすることが報告されている分子であり、顆粒膜細胞腫特異的な癌のマーカーを特定するには至っていない。

2. 研究の目的

顆粒膜細胞腫は、卵巣癌の一種であり、初期の発症から数十年の歳月をかけて再発・転移するという経過をたどる。そのため、早期発見、早期治療が非常に困難であり、有効な治療法は未だに確立されていない。致死率も比較的高いこと、また女性の社会進出により近年、発症率が上昇してきていることから、早急な治療法の開発が必須である。申請者は、網羅的遺伝子発現解析により、顆粒膜細胞腫の悪性化を司る因子として GPRC5B を同定した。本研究では、新たな創薬ターゲットとして近年注目されている G タンパク質共役受容体 (GPCR) の

一種である GPRC5B の機能解析を行い、顆粒膜細胞腫を中心とした女性特異的な癌の新たな治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) ヒトサンプルおよび細胞株

インフォームドコンセントを得た不妊症患者の卵巣より、顆粒膜細胞を吸引採取し、PBS で3回洗浄後、RNA 採取用またはタンパク質採取用サンプルとして -80°C に保存した。また、一部は DMEM/F12 + 10% FBS 培地に再懸濁し、CO₂ インキュベーターで48時間培養を行った。一方、顆粒膜細胞腫細胞株 KGN は、理研バイオリソースセンター (Tsukuba, Japan) より入手し、DMEM/F12 + 10% FBS 培地にて継代維持を行った。

(2) 網羅的遺伝子発現解析

ランダムに選別したヒト顆粒膜細胞5検体および KGN 細胞から ISOGEN RNA 抽出試薬 (Nippon Gene, Japan) を用いて total RNA を回収した。ヒト顆粒膜細胞の RNA は5検体分を等量ずつ混合し、正常細胞のサンプルとした。これらのサンプルを鋳型として、Affymetrix 社 Genechip Human Genome U133 Plus2.0 array による差別的トランスクリプトーム解析を行った。また、GeneSpring GX 7.3 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) 及びがん特化したデータベース、Oncomine を用いてデータマイニングを行った。

(3) RT-PCR による検証

ヒト顆粒膜細胞および KGN 細胞の total RNA を用いて、SuperScript III による逆転写反応を行った。その後、ヒト特異的プライマーを用いて PCR 反応を行い、アガロース電気泳動により mRNA の発現の変化を明らかにした。

(4) 候補分子の発現制御

KGN 細胞において shRNA による遺伝子発現制御を行うため、特定の遺伝子に対する shRNA をデザインし、マニュアルにしたがって Block-iT U6 RNAi Entry vector (Invitrogen) に遺伝子を導入した。シークエンス反応により、配列確認を行った後、リコンビネーションにより同社の pLenti6/Block-iT-DEST gateway vector に標的遺伝子を導入した。あらかじめ用意した 293FT 細胞に作製したベクターをトランスフェクションし、レンチウイルスを作製した。マニュアルに従い、レンチウイルスを約 80% confluent の KGN 細胞に添加し、1日培養後、余分なウイルスを除去するため細胞を洗浄したのち、blasticidin による細胞の選別を行った。選別された細胞は5継代以降アッセイに用いた。

(5) Western blot

ヒト顆粒膜細胞およびヒト顆粒膜細胞腫は protease inhibitor cocktail I および II を含む RIPA buffer で氷上にて2時間溶解した。遠心により不要画分を除去した後、Micro BCA assay kit を用いてタンパク質濃度の測定を行った。それぞれのタンパク質 1 μ g を 10%ポリアクリルアミドにて電気泳動により分離し、常法に従い分子の検出を行った。

(6) 細胞の形態および浸潤能、増殖能

細胞の増殖の観察のため、細胞をガラスボトムの culture dish に 2×10^4 /ml の濃度で播種し、透過光下の撮影を行った。また、血清不含 DMEM/F12 で 200 μ g/ml に調整したマトリゲルをトランスウェルフィルターに 30 μ L ずつ添加し、37°Cで30分間コーティングした。4日から1週間培養し sub-confluent の状態にある KGN 細胞を 5mM EDTA/2mM EGTA で剥離し、細胞を DMEM/F12 + 1mg/ml BSA で 4×10^4 /ml に調整してトランスウェルに添加した。下部チャンバーには DMEM/F12 + 10% FBS を添加し (750 μ L)、一晚培養した。その後、細胞をメタノールで固定し、Crystal Violet で染色してフィルターを通過した細胞数を計測した。

4. 研究成果

(1) 顆粒膜細胞腫の悪性化に関与する候補分子は顆粒膜細胞腫細胞においてのみ発現している。

KGN 細胞および正常顆粒膜細胞との比較による差別的トランスクリプトーム解析より顆粒膜細胞腫の悪性化に関与する候補分子として注目した GPRC5B 以外の候補分子を選別するため、PCR によるさらなる発現解析を行った。その結果、コラーゲン分解に関与する遺伝子が6つ (COL1A1、LOXL1、NRXN3、LOXL2、BMP1) 選択され、コラーゲンのリモデリングが顆粒膜細胞腫の悪性化に関与している可能性が示唆された。さらに、がんにおける機能が明らかとなっていない遺伝子も3つ (STC2、CREB3L1、FAM38B) 選択された (図1)。

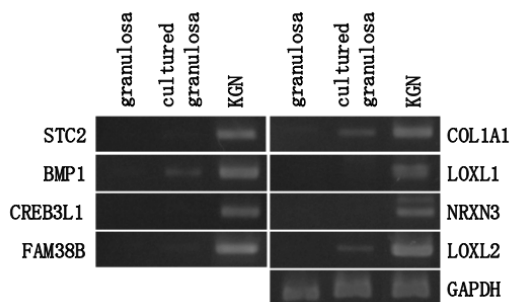


図1. KGN細胞特異的な遺伝子発現解析

正常顆粒膜細胞、培養した正常顆粒膜細胞及びKGN細胞を用いてRT-PCRを行った。

つまり、顆粒膜細胞腫の悪性化に関与する候補分子は顆粒膜細胞腫細胞においてのみ発現している。

(2) 顆粒膜細胞腫の悪性化に関与する候補分子は卵巣がんの悪性化にも関与する可能性が明らかとなった。

がんにおける発現や機能が明らかとなっていない遺伝子 STC2、CREB3L1、FAM38B について、がんの特化したデータベース、Oncomine を利用し、その発現についてバイオインフォマティクス解析を行った。その結果、全ての遺伝子について卵巣がんにおける発現が上昇していることが明らかとなった (Data not shown)。つまり、顆粒膜細胞腫の悪性化に関与する候補分子は卵巣がんの悪性化にも関与する可能性を示唆される。

(3) 顆粒膜細胞腫特異的に発現し、その癌の悪性化に関与する GPRC5B の発現制御による機能解析

KGN 細胞および正常顆粒膜細胞を用いて、RT-PCR を行ったところ、KGN 細胞でのみ GPRC5B の発現が確認された (図2A)。さらに、顆粒膜細胞腫細胞株、KGN が体外培養で悪性化様の変化をすることから (Imai et al., 2008)、継代数の少ないKGN細胞及び継代の進んだKGN細胞を用いてRT-PCRを行った。その結果、継代数の少ない細胞に比べ、継代の進んだKGN細胞でGPRC5Bの発現が上昇していることが明らかとなった (図2B)。さらに、正常顆粒膜細胞及び顆粒膜細胞腫よりタンパク質を抽出し、Western blot 法を用いてその発現を確認したところ、顆粒膜細胞腫でのみ GPRC5B の発現を確認することができた (図2C)。

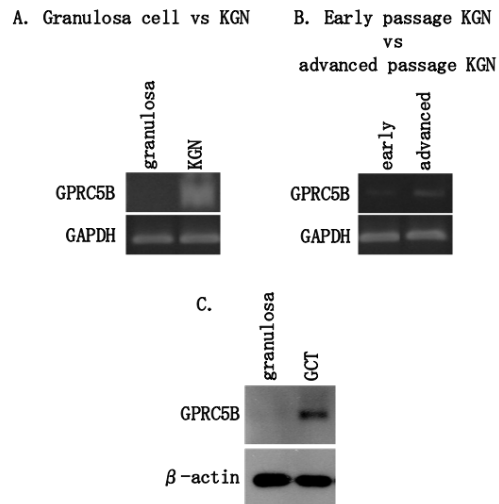


図2. GPRC5Bの発現解析

A. 正常顆粒膜細胞とKGN細胞、B. 継代数の異なるKGN細胞を用いてRT-PCRを行った。C. 正常顆粒膜細胞と顆粒膜細胞腫より抽出したタンパク質を用いてイムノブロット法による解析を行った。

そこで、GPCR5B の RNAi による発現制御を行い (図 3A)、顆粒膜細胞腫細胞株の増殖能、浸潤能に影響を与えるか検討した。その結果、細胞の増殖能 (図 3B) 及び浸潤能 (図 3C) は GPCR5B の発現を抑制した細胞で、抑制されることが明らかとなった。

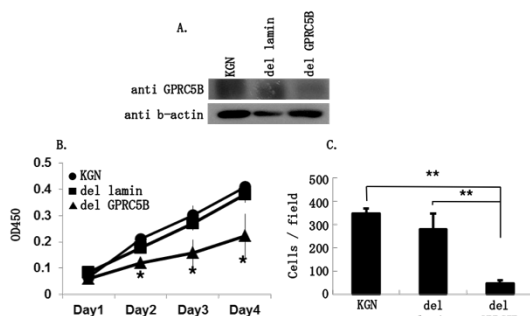


図3. RNAiによる発現制御を行ったKGN細胞における機能解析
A. RNAiによるGPCR5Bの発現抑制を行ったKGN細胞より抽出したタンパク質を用いてイムノブロット法による解析を行い、GPCR5Bの発現の確認を行った。B. RNAiによるGPCR5Bの発現抑制を行ったKGN細胞、LaminのRNAiを行ったKGN細胞及びKGN細胞の増殖能をDay1, 2, 3, 4に解析した。C. RNAiによるGPCR5Bの発現抑制を行ったKGN細胞、LaminのRNAiを行ったKGN細胞及びKGN細胞の浸潤能の解析を行った。

以上の結果から、GPCR5Bは顆粒膜細胞腫特異的に発現し、その癌の悪性化に関与する分子であることが強く示唆された。

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)

- Takei H, Imai M, Komatsu N, et al. (16名中6番目) Skewed megakaryopoiesis in human induced pluripotent stem cell-derived haematopoietic progenitor cells harbouring calreticulin mutations. *Br J Haematol*. 2018. [Epub ahead of print] DOI: 10.1111/bjh.15266. (査読有)
- Sunami Y, Imai M, Komatsu N, et al. (9名中6番目) Histone Acetyltransferase PCAF is Required for All-trans Retinoic Acid-induced Granulocytic Differentiation in Leukemia Cells. *J Biol Chem*. 2017;292(7):2815-2829. DOI: 10.1074/jbc.M116.745398. (査読有)
- Imai M, Araki M, Komatsu N. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol*. 2017;105(6):743-7. DOI: 10.1007/s12185-017-2246-9. (査読有)
- Imai M, and Hino O. Environmental carcinogenesis-100th anniversary of creating cancer. *Cancer Science*. 2015; 106(11):1483-5. DOI: 10.1111/cas.12798. (査読有)

[学会発表](計 10 件)

- Masubuchi N, Imai M, Komatsu N, et al. (13名中5番目). Localization of Mutant Calreticulin in the Golgi Apparatus Is Required for Its Oncogenic Capacity. **59th Annual Meeting of the American Society of Hematology and Exposition; 2017; Atlanta, USA.** (査読有)
- Masubuchi N, Imai M, Komatsu N, et al. (13名中5番目). Engagement of mutant calreticulin and MPL in a cellular compartment is required for MPL activation. **第79回日本血液学会学術集会; 2017; 東京.** (査読有)
- 林英里奈, 今井美沙, 小松則夫, et al. (12名中5番目) 骨髄増殖性腫瘍に見出される変異型 CALR 蛋白質の細胞内局在. **第79回日本血液学会学術集会; 2017; 東京.** (査読有)
- 木原慶彦, 今井美沙, 小松則夫, et al. (11名中4番目) 変異型 CALR タンパク質の発現を制御するメカニズム. **第79回日本血液学会学術集会; 2017; 東京.** (査読有)
- Takei H, Imai M, Komatsu N, et al. (16名中6番目) Establishment of an in vitro model for the skewed megakaryopoiesis by calreticulin mutation in human cells. **22nd Congress of the European Hematology Association; 2017; Madrid; Spain**
- 増渕菜弥, 今井美沙, 小松則夫, et al. (12名中7番目) 骨髄増殖性腫瘍を引き起こす変異型 Calreticulin の細胞内局在. **第39回日本分子生物学会年会; 2016; 横浜.** (査読有)
- Masubuchi N, Imai M, Komatsu N, et al. (11名中7番目) Subcellular localization of mutant Calreticulin that induces Myeloproliferative neoplasms (MPNs). **第78回日本血液学会学術総会; 2016; 横浜.** (査読有)
- Sunami Y, Imai M, Komatsu N, et al. (9名中6番目) PCAF is required for ATRA-induced APL cell differentiation. **第78回日本血液学会学術集会, 2016; 横浜.** (査読有)
- Imai M, Tkahashi Y. Identification of candidate genes for granulosa cell tumor progression. **Global Academic Program (GAP) 2016 - Challenging Cancer, April 26-28 2016, Renaissance Hotel, São Paulo, Brazil.** (査読有)
- Hino O, Abe M, Imai M. Early diagnosis system for Asbestos-related Mesothelioma. **Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics, February 16-20, 2016, The Hyatt Regency Maui in Maui, Hawaii.** (査読有)

[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

今井 美沙(IMAI, Misa)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号:50709003

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者