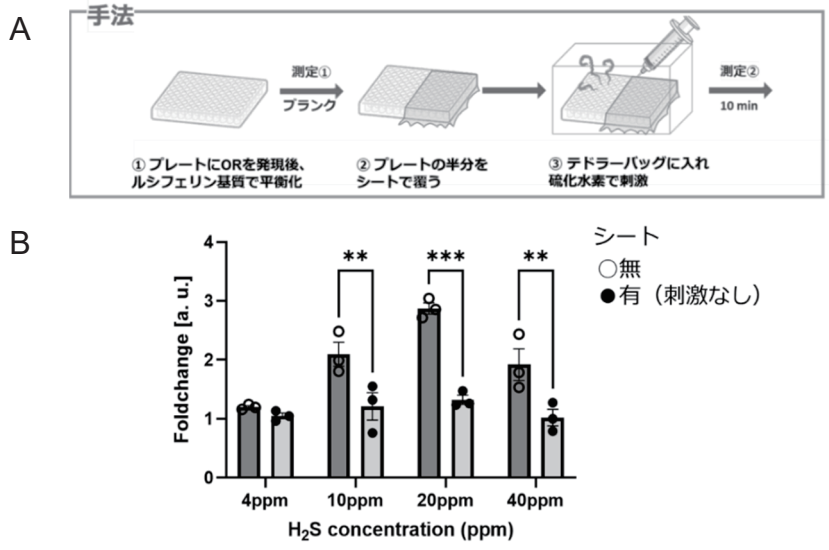
142　嗅覚受容体を介した乳がん細胞の硫化水素応答機構	福谷　洋介

【目的】硫化水素（H_2S）は、揮発性硫黄化合物であり悪臭防止法において特定悪臭化合物に指定される。硫化水素は嗅覚閾値が低く、しばしばその悪臭が問題となる。一方で、硫化水素は生体内でも存在し、L-システインもしくはD-システインを基質にcystathioniney-lyase（CSE）などの酵素反応によって生合成されることが分かっている。硫化水素は生体内において、神経伝達や血管緊張性、炎症の調節などに作用し、細胞の酸化ストレスからの保護や生体内におけるエネルギーの産生などの役割を担っている。これらの生理活性をもつことから、硫化水素は一酸化炭素（CO）や一酸化窒素（NO）に次ぐ第3のガス状の生理活性シグナル伝達分子であると言われている。乳がん細胞において嗅覚受容体OR2T6が選択的に発現しており、がん細胞増殖とOR2T6の発現量に相関関係があることが報告されている。しかし、OR2T6が受容するアゴニストについてはこれまで明らかになっていなかった。著者は、独自の嗅覚受容体解析技術により、OR2T6が硫化水素応答受容体であることを同定した。そこで、本研究では乳がん細胞のOR2T6を介した硫化水素応答性の検証と、その意義について解析することを目的とした。

【方法】ヒト乳がん細胞MCF-7を対象に、OR2T6のタンパク質発現の有無の確認のため、ウエスタンブロットを行った。硫化水素ガス刺激でOR2T6の活性化を介したcAMP産生が起きるかどうか確認するために、気相刺激Glosensorアッセイ法によって解析した。また、硫化水素刺激におけるMCF-7細胞内の遺伝子発現変化を調べるためにRNA-Seq解析を行った。

【結果】ヒト乳がん細胞MCF-7におけるOR2T6のタンパク質発現を確認した。気相刺激Glosensorアッセイによって、MCF-7細胞が硫化水素気相濃度依存的にcAMPを産生することを確認した。OR2T6を過剰発現させた場合に、MCF-7の硫化水素応答性が向上し、OR2T6のアンタゴニストを添加すると硫化水素応答が抑制された。硫化水素刺激に伴う遺伝子発現変化を調べたところ、硫化水素刺激なしのコントロール、30 分間刺激、120分間刺激でそれぞれ、がん原遺伝子FOSの著しい遺伝子発現増加が確認された。このことから、OR2T6を介した硫化水素応答により、MCF-7細胞内でFOSの遺伝子発現が誘導されることが示唆された。

気相刺激Glosensorアッセイを用いたMCF-7細胞の硫化濃度依存的応答解析



142. 嗅覚受容体を介した乳がん細胞の硫化水素応答機構

福谷　洋介

東京農工大学 大学院工学研究院 生命機能科学部門

Key words：嗅覚受容体，硫化水素，乳がん細胞

緒　言

硫化水素（H_2S）は、揮発性硫黄化合物であり、悪臭防止法において特定悪臭化合物に指定される。硫化水素は嗅覚閾値が約 40 ppb と低いことから、しばしばその悪臭が問題となる。その一方で、硫化水素は生体内にも存在し、L-システインやD-システインを基質にcystathionineγ-lyase（CSE）などの酵素反応によって合成されることが分かっている。硫化水素は生体内において、神経伝達や血管緊張性、炎症の調節などに作用し、細胞の酸化ストレスからの保護や生体内におけるエネルギーの産生などの役割を担っている。これらの生理活性をもつことから、硫化水素は一酸化炭素（CO）や一酸化窒素（NO）に次ぐ第 3 のガス状の生理活性シグナル伝達分子であるという報告がなされている［1］。

細胞内の硫化水素受容体として、三叉神経節（TG neuron）においてTRPV1（Transient Receptor Potential Vanilloid 1）チャネルが機能しているとこれまで報告されている［2］。しかし、他の生体内組織を含めて硫化水素受容体として機能するタンパク質の詳細は明らかにされていないので、硫化水素の生体内での応答作用機構はほとんど分かっていない。

著者は、哺乳類の嗅覚受容体（Olfactry receptor：OR）を対象に、OR の匂い分子機構の解明や OR の成熟化機構解明を行うため、実際の嗅覚応答を模倣した嗅覚受容体機能解析法として、気相から匂い刺激をする方法で哺乳類 OR の機能解析を行う Vapor stimulation assay 法の開発している［3］。そこで、常温気体である硫化水素に応答するヒト OR の網羅的スクリーニングを Vapor stimulation assay を基盤に行ったところ、約 400 種のヒト OR のうち、OR2T11、OR2T6、OR2T1 の 3 種類が硫化水素受容体であることを世界で初めて発見した［4］。興味深いことに、3 つの硫化水素応答 OR のうち OR2T6 が、乳がん細胞において選択的に発現しており、乳がん細胞増殖と OR2T6 の発現量が相関関係にあることが 2019 年に報告されている［5］。しかし、OR2T6 が応答するアゴニストについてはこれまで明らかになっておらず、OR2T6 が乳がんにおいてどの分子の受容体として機能するか、OR2T6 の選択的発現にどういう意義があるのかについて全く分かっていなかった。そこで、本研究では、硫化水素受容体であるヒト OR2T6 発現乳がん細胞における硫化水素応答受容体として機能するかどうか検証し、生体内硫化水素が乳がん細胞に与える作用を明らかにすることを目的とした。

方　法

1. タンパク質発現用ベクター調製

硫化水素応答ヒト嗅覚受容体 OR2T6 遺伝子は、N 末端にヒトロドプシンの N 末端 20 アミノ酸（Rhodopsin-tag）を付加するように、pCI expression vector（プロメガ）に導入した。OR2T6 発現ベクターと Glosensor 発現 pGlosensor F-22（プロメガ）は、大腸菌 XL10 Gold ウルトラコンピテントセル（アジレント）を利用して増やし、Nucleospin Plasmid TF（タカラバイオ）で精製した。

2. 気相刺激 cAMP シグナリングアッセイ

乳がん細胞 MCF-7 細胞を 10% FBS、ペニシリンストレプトマイシン、アンフォテリシン B を含む D-MEM 培地を用いて、37℃、5% CO_2環境下で培養した。MCF-7 細胞をポリ D リジンでコートされた 96 ウェル細胞培養プレートに播種した。24 時間培養後の MCF-7 に OR2T6 発現ベクター、Glosensor 発現ベクターをトランスフェクションし、24 時間培養した。培地を除去し、HBSS バッファーで洗浄した後に、発光基質 Glosensor cAMP reagent（プロメガ）を溶解した HBSS バッファーに置換した。遮光環境下で 2 時間静置し、発光基質を細胞内に取り込ませた。硫化水素刺激を行わないウェルにプレートシールを貼り保護した後に、硫化水素刺激前の発光値をプレートリーダーで測定した。アッセイプレートをサンプリングバッグ内に入れた。純空気でサンプリングバッグを充満させた後に、設定濃度になるように硫化水素ガスを注入した。10 分後にアッセイプレートを取り出し、プレートリーダーで再度発光を測定した。硫化水素刺激前後の発光の変化量を細胞の硫化水素応答値として比較した。

3. ウエスタンブロット

MCF-7 細胞ライセートを RIPA バッファーにより調製した。MCF-7 細胞ライセートを SDS-PAGE にて分画した後、トランスブロット Turbo 転写システム（Bio-rad）を用いて PVDF メンブレンに転写した。転写後のメンブレンをブロッキングした後に、1 次抗体として抗 OR2T6 抗体（Sigma-Aldrich）を用い、2 次抗体として HRP 標識抗 Rabbit IgG 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。検出には Western BLoT Hyper HRP Substrate（Takara bio）を用いた。

4. RNA-Seq 解析

MCF-7 細胞をそれぞれ、硫化水素刺激なし、20 ppm の硫化水素環境下で 30 分間、および 120 分間刺激の 3 条件に分け回収した。TRIzol Plus RNA Purification kit を用いて、Total RNA を抽出した。Total RNA に対しライブラリ調製をした後に Illumina NovaSeq による RNA-Seq 解析により遺伝子発現変化を調べた。

結果および考察

1. MCF-7 細胞の OR2T6 発現確認と硫化水素応答性評価

過去の報告と同様に MCF-7 細胞に OR2T6 タンパク質が発現しているか検証するために、MCF-7 の細胞ライセートを回収し、抗 OR2T6 抗体を利用したウエスタンブロットを行った。その結果、MCF-7 細胞で OR2T6 とみられるバンドを確認でき、MCF-7 細胞に OR2T6 が発現していることを確認した（図 1）。比較対象とした Hep2G 細胞では OR2T6 のバンドが見られなかった。

次に OR2T6 のアゴニストである硫化水素で刺激した場合に、OR2T6 の活性化と細胞内シグナル伝達に伴う cAMP の産生が誘導されるかどうか検証するために、MCF-7 細胞に対する気相刺激 Glosensor アッセイを行った。硫化水素による気相刺激は密閉されたテドラーバッグを用い、閉状態で設定した硫化水素濃度になるように硫化水素ガスを注入し、10 分間刺激した（図 2A）。ウェル上部にシートを貼りマスキングをすることで、刺激をしない比較対象を作製した。その結果、硫化水素ガス濃度依存的に MCF-7 細胞の cAMP 産生に伴う Glosensor の発光値変化を確認した（図 2B）。この結果は、MCF-7 細胞が OR2T6 を介して硫化水素に応答性を有していることを示唆している。

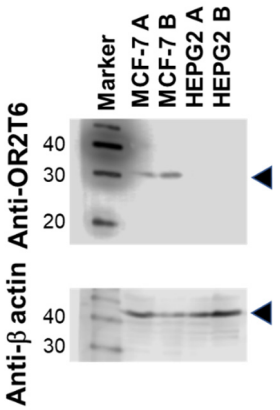


図 1. MCF-7 細胞ライセートに対する Anti-OR2T6 抗体を用いたウエスタンブロット
MCF-7 と比較対象として HEPG2 細胞をそれぞれ独立して培養した 2 つずつ評価した。MCF-7 細胞のライセートでのみ anti-OR2T6 抗体でのバンドを検出した。左の数字は分子量を示す。

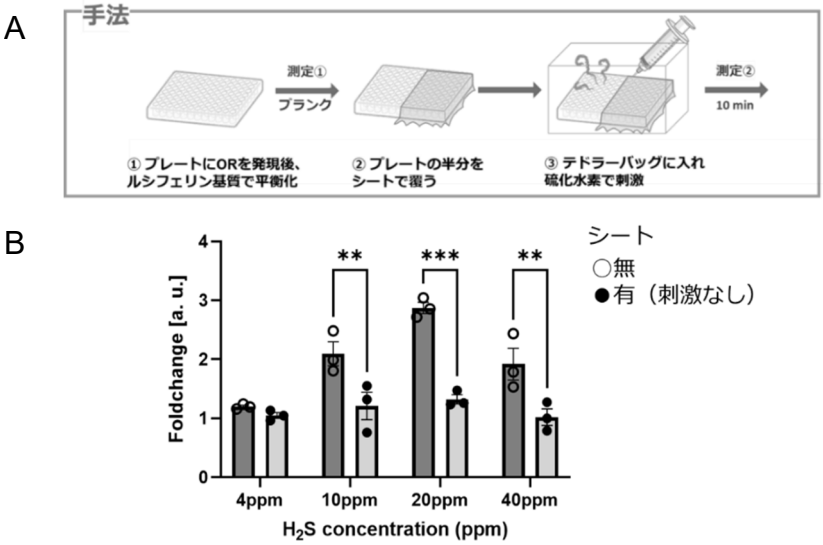


図 2. MCF-7 細胞に対する硫化水素応答評価
A） 硫化水素刺激手法　プレートにシートを貼ることで硫化水素刺激を防ぐ比較対象ウェルを作った。
B） 気相濃度の異なる硫化水素に対する MCF-7 細胞の応答評価（n＝3）。
p＜0.01、*p＜0.001（Bonferroni 法による多重比較）。

2. OR2T6 の発現量増加に伴う硫化水素応答変化

通常の MCF-7 細胞が硫化水素に応答し、cAMP を産生することを確認した。そこで、OR2T6 を過剰発現させることで、硫化水素に対する応答が増加するかどうか、OR2T6 を MCF-7 細胞に一過性で過剰発現させ同様に硫化水素気相刺激を行った。さらに、著者らが発見している OR2T6 のアンタゴニストである β-ionone を添加した条件での硫化水素刺激を行うことで、MCF-7 細胞の硫化水素応答が OR2T6 を介したものであるか確認した[4]。

その結果、OR2T6 野生型ならびに細胞膜発現向上型の OR2T6 P161L を過剰発現させた MCF-7 細胞では、10 ppm の硫化水素に対する応答が通常の MCF-7 細胞に比べ著しく増加した（図 3）。さらに、OR2T6 のアンタ

ゴニストである β-ionone を添加した場合、いずれの MCF-7 細胞においても硫化水素応答がなくなった。このことから、MCF-7 細胞の硫化水素応答は OR2T6 の活性化と G タンパク質の共役にともなって生じており、その応答は OR2T6 のアンタゴニストにより抑制されることを確認した。

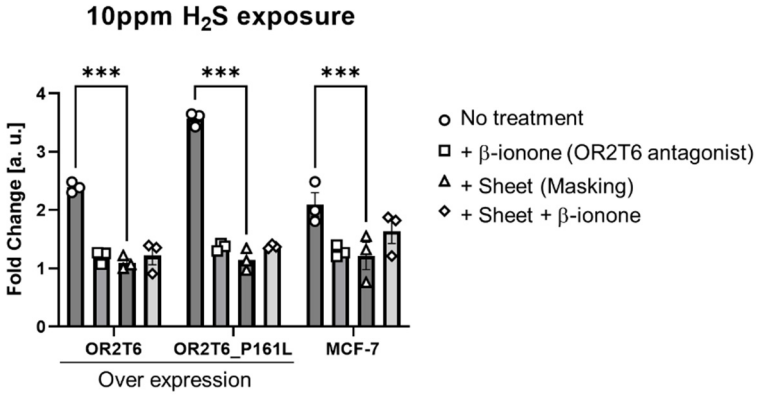


図 3. OR2T6 過剰発現とアンタゴニスト添加による MCF-7 の硫化水素応答変化
OR2T6 および OR2T6 P161L 変異体（発現向上）を過剰発現させた MCF-7 細胞と MCF-7 を比較。No treatment：通常条件の気相刺激、＋β-ionone：OR2T6 アンタゴニスト添加、＋Sheet：ウェルのマスキング。
***p＜0.001（n＝3、Dunnette 法による多重比較）。

3. 硫化水素刺激に伴う遺伝子発現変化

MCF-7 細胞が OR2T6 を介した硫化水素応答を確認したことから、硫化水素に応答した後に MCF-7 細胞内で起きる遺伝子発現の変化を RNA-seq 解析によって解析した。その結果、30 分の硫化水素刺激において、多くの機能未知の遺伝子の遺伝性発現量の有意な増減変化が確認された。硫化水素刺激をしない MCF-7 細胞と硫化水素刺激後 30 分後の MCF-7 細胞で発現が有意に増加した遺伝子として *WNT2B* や *FOS* がみられた（図 4 左）。*FOS* は先行文献において、OR2T6 の発現増加に伴って遺伝子発現が増加する因子の 1 つであることが報告されている［5］。*FOS* は硫化水素刺激後 30 分後と 120 分後の比較でもその発現が優位増加していた。硫化水素刺激後 30 分後から 120 分後では、*EGR1* などの遺伝子も有意に発現増加がみられた（図 4 右）。

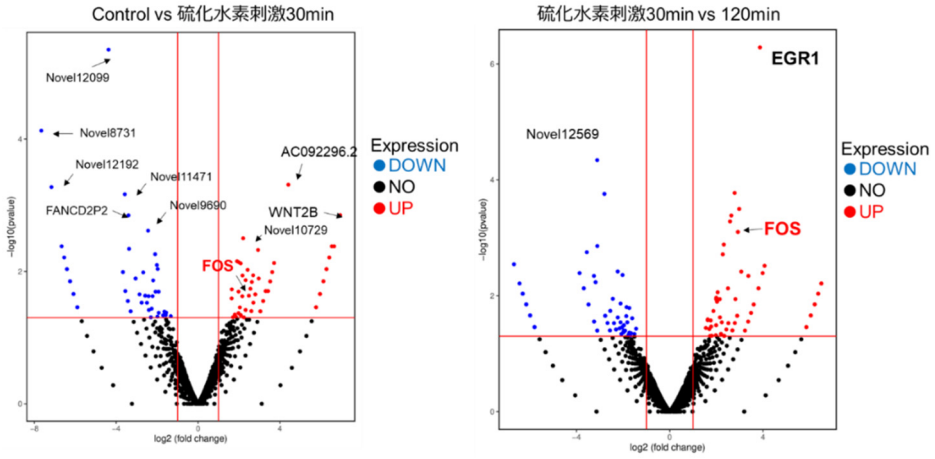


図 4. MCF-7 の硫化水素刺激後の遺伝子発現変化
左）硫化水素で刺激なしと、硫化水素刺激 30 分後の MCF-7 細胞の遺伝子発現比較。
右）硫化水素刺激 30 分後と 120 分後の MCF-7 細胞の遺伝子発現比較。
青：発現が有意に低下、黒：有意な変化なし、赤：発現が有意に増加。

このことから、MCF-7 は嗅覚受容体 OR2T6 を発現し、OR2T6 の硫化水素応答に伴って cAMP の産生を誘導する細胞内シグナル伝達が活性化することが明らかになった。特に、OR2T6 の硫化水素応答に伴うシグナル伝達によって、*FOS*、*EGR1* などのがん細胞増殖に影響を与える遺伝子発現の増加を誘導することが明らかになった。

本研究では、乳がん細胞培養環境に硫化水素ガスを気相から溶け込ませる手法で MCF-7 細胞を刺激しているため、実際の乳がん細胞が存在する生体内の環境とは大きく異なる環境で行っている。そのため、体内で産生される硫化水素が実際に、内因性リガンドとして乳がん細胞に発現している OR2T6 を刺激し、特異的な遺伝子発現を引き起こすかどうかは、さらなる検証が必要である。内因性のシグナル伝達分子として硫化水素の乳がん細胞への影響が明らかになることで、嗅覚受容体を標的とした新たながん免疫療法の開発などに繋がる可能性がある。そのため、今後、OR2T6 欠損乳がん細胞や、より侵襲性の高い乳がん細胞である MDA-MB-231 細胞等の種々の細胞に対して同様の硫化水素応答評価を行うことで、乳がん細胞における OR2T6 の硫化水素応答が誘導するがん細胞への影響の解明が期待される。

文　献

1） Li M, Liu Y, Deng Y, Pan L, Fu H, Han X, Li Y, Shi H, Wang T. Therapeutic potential of endogenous hydrogen sulfide inhibition in breast cancer （Review）. Oncol Rep. 2021 May;45（5）:68. doi: 10.3892/or.2021.8019. Epub 2021 Mar 24. PMID: 33760221; PMCID: PMC8020202.

2） Koroleva K, Mustafina A, Yakovlev A, Hermann A, Giniatullin R, Sitdikova G. Receptor Mechanisms Mediating the Pro-Nociceptive Action of Hydrogen Sulfide in Rat Trigeminal Neurons and Meningeal Afferents. Front Cell Neurosci. 2017 Jul 27;11:226. doi: 10.3389/fncel.2017.00226. PMID: 28798669; PMCID: PMC5529342.Koroleva et al., Front. Cell. Neurosci. 11:226 2017.

3） Kida H, Fukutani Y, Mainland JD, de March CA, Vihani A, Li YR, Chi Q, Toyama A, Liu L, Kameda M, Yohda M, Matsunami H. Vapor detection and discrimination with a panel of odorant receptors. Nat Commun. 2018 Nov 1;9（1）:4556. doi: 10.1038/s41467-018-06806-w. PMID: 30385742; PMCID: PMC6212438.

4） Fukutani Y, Abe M, Saito H, Eguchi R, Tazawa T, de March CA, Yohda, Matsunami H. Antagonistic interactions between odorants alter human odor perception. Curr Biol. in press

5） Li M, Wang X, Ma RR, Shi DB, Wang YW, Li XM, He JY, Wang J, Gao P. The Olfactory Receptor Family 2, Subfamily T, Member 6 （OR2T6） Is Involved in Breast Cancer Progression via Initiating Epithelial-Mesenchymal Transition and MAPK/ERK Pathway. Front Oncol. 2019 Nov 11;9:1210. doi: 10.3389/fonc.2019.01210. PMID: 31781505; PMCID: PMC6859866.