

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11271

研究課題名(和文) 卵巣明細胞癌のLipocalin2による酸化ストレス耐性機序の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of oxidative stress tolerance by Lipocalin2 in ovarian clear cell carcinoma and development of treatment methods

研究代表者

小原 久典 (Kobara, Hisanori)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：30598818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで、卵巣明細胞癌(CCC)細胞において、鉄運搬タンパクLipocalin2(LCN2)が、酸化ストレス耐性に作用することを示してきた。そこで本研究ではそのメカニズム解明を目的とした。shRNAによるLCN2発現抑制(KD)により細胞内抗酸化物質グルタチオン(GSH)濃度、癌幹細胞マーカーCD44v8-10、CD133発現は低下するが、その効果は合成LCN2タンパク(sLCN2)添加により相殺された。網羅的遺伝子発現解析によりLCN2-KDで発現が細胞間で共通して低下する8遺伝子を見出した。これらの因子がLCN2による酸化ストレス耐性に関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣子宮内膜症性嚢胞(OEM)患者の増加に伴い、OEM関連の悪性腫瘍の頻度も増加している。我が国ではOEM由来の癌の多くはCCCであり、抗癌剤などの治療抵抗性であるといった問題が存在する。強い酸化ストレス環境下にあるOEM内で、発癌に至ったCCCは細胞生存のために酸化ストレス耐性を獲得していると考えられ、我々の見出したLCN2はCCC細胞の酸化ストレス耐性に係ることが考えられた。酸化ストレス耐性機序は、抗癌剤投与下での細胞生存機序に関連する可能性が高く、治療標的となる可能性が考えられるため、LCN2による酸化ストレス耐性機序を解明することは大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that Lipocalin2 (LCN2), an iron transporter, is involved in oxidative stress tolerance in ovarian clear cell carcinoma (CCC) cells. Therefore, the purpose of this study is to clarify its mechanism. Knock-down (KD) of LCN2 expression by shRNA reduced intracellular glutathione (GSH) concentration, the expression of cancer stem cell markers CD44v8-10 and CD133, whereas that effect was canceled by the addition of synthetic LCN2 protein (sLCN2). By comprehensive gene expression analysis using microarray, we found eight genes whose expression commonly reduced between cells in LCN2-KD. These results suggest that these factors may be involved in oxidative stress tolerance by LCN2.

研究分野：産科婦人科学

キーワード：Lipocalin2 卵巣子宮内膜症性嚢胞 卵巣明細胞癌 酸化ストレス耐性 CD44 CD133

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国の卵巣癌(OC)の罹患数は、1975年の2295人から2015年の10438人と急速に増加している。また2014年の死亡数は4840人で婦人科悪性腫瘍の中でも最も死亡率が高い(国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」)。OCのうち明細胞癌(CCC)は、米国では数%程度と稀であるが(Heintz et al. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;95:S161-92)、本邦では20~30%と高率であることが特徴である(Yahata et al. *J Obstet Gynaecol Res* 2012;38:645-50)。CCCは抗癌剤抵抗性であるため(Sugiyama et al. *Cancer* 2000;88:2584-9)、より有効な治療法の開発のために癌発生・進展の分子メカニズムの解明が急務である。

CCCと類内膜癌(EC)は主に卵巣子宮内膜症性嚢胞(OEM)を発生母地とすることが知られている。OEMの癌化率は約0.7%だが(Kobayashi et al. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;138:187-93)、OEM患者は増加傾向であり、OEM関連OCの増加は重大な問題とされている。OEMの癌化には、慢性炎症や酸化ストレスが重要と考えられており、我々もこれまでに、慢性炎症によりミスマッチ修復異常が誘発され、OEMの癌化が誘導される可能性を示した(Fuseya et al. *Hum Pathol* 2012;43:1964-72)。また近年、OEM内に豊富に存在する鉄イオンが、フェントン反応から活性酸素種(ROS)を産生し、酸化ストレスを誘導することから、OEM癌化の大きな要因と考えられるようになってきている(Yamaguchi et al. *Oncogene* 2010;29:1741-52、Toyokuni *Cancer Sci* 2009;100:9-16、Yamada et al. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21:1200-7)。

Lipocalin2(LCN2)は25kDの分泌蛋白で、鉄イオンの運搬に関与し、細胞内や局所の鉄イオン濃度を調節することにより感染防御、細胞の増殖・浸潤・遊走等の種々の効果を示すことが注目されている。(Devireddy et al. *Cell* 2005;123:1293-305、Chakraborty et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1826:129-69)我々は子宮内膜癌で高発現する因子としてLCN2を見出し、(Miyamoto et al. *Hum Pathol* 2011;42:1265-74、Miyamoto et al. *Exp Mol Pathol.* 2011;91:563-8) LCN2が子宮内膜癌細胞の浸潤能や遊走能を促進するなど、悪性度増強に関与することを示してきた(Miyamoto et al. *PLoS One* 2016;11:e0155220)。さらにLCN2がOEMの上皮および関連するCCCやEC部分で高発現していることを見出した。またin vitroでの検討では、LCN2はCCC細胞株の浸潤能・遊走能を亢進し、細胞内への鉄取り込みを促進するにもかかわらず、ROS産生が抑制され、酸化ストレスとしての過酸化水素や抗癌剤シスプラチン添加に対して、細胞の生存能が亢進することを明らかにしてきた[1]。LCN2によるROS産生抑制、酸化ストレス耐性のメカニズムとしては、癌幹細胞(CSC)マーカーCD44v8-10とxCT発現の増強、抗酸化物質グルタチオン(GSH)の細胞内濃度上昇が関与していると考えられた。(図1:引用文献[1]のFigure 5を改変)一方で、GSH濃度変化は有意であったが、大きくはなかったことから、さらに他の酸化ストレス耐性のメカニズムが存在する可能性がある。そこで本研究では、LCN2の酸化ストレス耐性機序をさらに明らかにする。

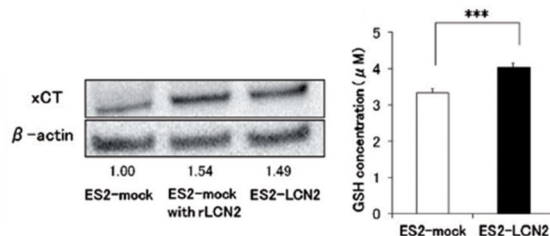


図1^[1]: xCT発現と細胞内GSH濃度(CCC細胞株ES2)組換えLCN2(rLCN2)やLCN2増強により、xCT発現増強および細胞内GSH濃度上昇を認める。

2. 研究の目的

強い酸化ストレス環境下にあるOCM内で、細胞が生存し続けるためには、酸化ストレス耐性を獲得する必要があり、OCMより発生したCCCの細胞も酸化ストレス耐性を獲得していると考えられる。CCCは抗癌剤感受性が低いことが知られているが、酸化ストレス耐性機序は、抗癌剤投与下での細胞生存機序に関連する可能性が高く、治療標的となる可能性が考えられる。これまでの研究で我々の見出したLCN2はCCC細胞の酸化ストレス耐性に係わることが考えられた。そこで本研究ではLCN2による酸化ストレス耐性機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) LCN2タンパク合成

LCN2高発現の培養細胞より採取したmRNAよりlipocalin2 cDNAを合成した。このcDNAとPUREflex再構成型無細胞タンパク質合成キット((株)ジーンフロンティア、柏市)を用いてLCN2タンパクを合成した。以後、合成LCN2タンパクをsLCN2と記載する。

(2) sLCN2による細胞内GSH濃度変化

培養細胞にsLCN2を添加し、細胞内の抗酸化物質であるGSH濃度の測定を行った。

(3) LCN2発現変化による癌幹細胞(CSC)マーカー発現の変化

既に確認しているCD44v8-10はCD44のvariant typeであるが、CD44は代表的なCSCマーカーである。CSCは酸化ストレスや抗癌剤に対して耐性を持つことが知られており、CD44同様に代表的なCSCマーカーであるCD133も抗癌剤耐性や放射線耐性に関与すると報告されている(Zhang Q et al. *Cancer Lett* 2010;289:151-60、Piao LS et al. *Cancer Lett* 2012;315:129-37)。そこで培養細胞株にLCN2 cDNA導入による発現増強、shRNA、siRNAによる発現低下、およびsLCN2添加によるCD44v8-10、CD133発現変化を観察した。

(4) LCN2 発現上昇、発現低下に伴う遺伝子発現変化の網羅的解析

LCN2 高発現細胞である HHUA、RMG1 細胞は shRNA で発現抑制 (KD) による変化を、LCN2 低発現細胞である ES2 細胞は cDNA 導入による発現増強による遺伝子発現変化の網羅的解析を SurePrint G3 Human 8x 60K v2 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) LCN2 による細胞内 GSH 濃度変化

LCN2 発現が非常に強い RL95-2 細胞では shRNA による LCN2-KD により細胞内 GSH 濃度は 30~40% まで低下するが、control 細胞を 24 時間培養した conditioned medium (分泌タンパクである LCN2 が高濃度で含まれる) で培養を行うと 50~60% まで回復した。また HHUA 細胞では LCN2-KD で細胞内 GSH 濃度は約 70% まで低下するが、sLCN2 添加により、ほぼ完全に相殺された。(図 2) これにより sLCN2 は細胞の産生する LCN2 と同様の作用を示すと考えられた。

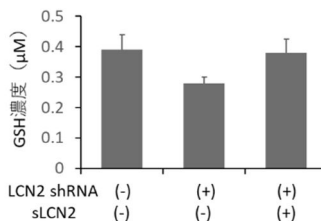


図2: 細胞内GSH濃度変化 LCN2発現低下によるGSH濃度低下はsLCN2添加により相殺される。

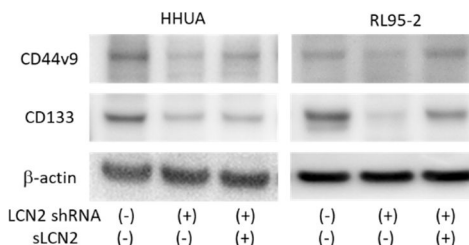


図3: CD44v8-10およびCD133発現変化 (Western blotting) 両細胞ともLCN2-KDによりCD44v9抗体で認識されるCD44v8-10、およびCD133発現が减弱するが、sLCN2添加により相殺される。

(2) CD44v8-10、CD133 発現変化

LCN2 高発現細胞である HHUA、RL95-2 では shRNA による LCN2-KD により CD44v8-10、CD133 発現の减弱が観察される。またその作用は sLCN2 添加により、相殺される傾向が認められる。また HHUA ではシスプラチン (CDDP) 添加により 72 時間後の CD44 発現は添加前と変化がないが、sLCN2 添加により 2 倍近くまで増強した。

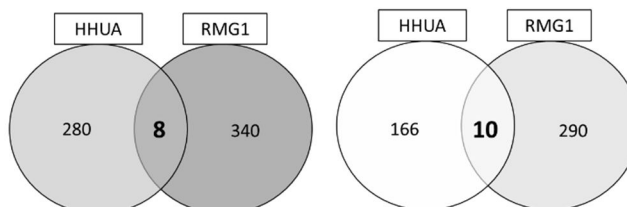


図4: 網羅的遺伝子発現解析結果 LCN2-KDにより50%以上発現が低下 (左)、もしくは2倍以上発現が上昇 (右)した遺伝子数を示す。低下8遺伝子が上昇10遺伝子が両細胞に共通していた。

(3) LCN2 発現変化による遺伝子発現変化の網羅的解析

LCN2 高発現細胞株 HHUA と RGM1 の shRNA による LCN2-KD により発現が 50%以上低下した遺伝子のうち、8 遺伝子が共通していた (図 4)。また発現が 2 倍以上上昇した遺伝子は 10 遺伝子が共通していた。

発現低下共通 8 遺伝子について、real-time RT-PCR で確認したところ、全遺伝子で発現が低下していたが、特に Gene2, 4, 6, 7 では 0.5 倍以下に低下していた (図 5)。これらの中には、細胞周期やアポトーシス調節を介して種々のストレスに対する抵抗性に関連する因子や、細胞の遊走能に関連する因子、MYC や JAK/STAT 経路の調節に関与する因子などが含まれている。

次に上昇共通 10 遺伝子について、real-time RT-PCR で確認したところ、2 倍以上発現が上昇していた遺伝子は Gene12, 15, 17, 18 であった (図 6)。

一方、他の RL95-2 細胞では上昇遺伝子に関しては共通性がなかったことから、現時点では LCN2-KD で発現低下する遺伝子に注目して解析を行っている。

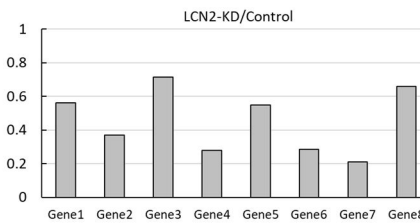


図5: 発現低下8遺伝子のreal-time RT-PCR結果

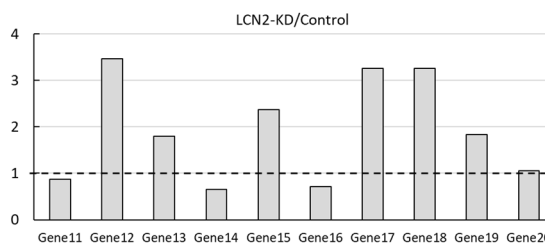


図6: 発現上昇10遺伝子のreal-time RT-PCR結果

本研究により、LCN2 の酸化ストレス耐性メカニズムの一部が明らかにされてきた。これには CSC マーカーである CD44、CD133 など複数の因子が関与していると考えられる。今後、さらなる検討が必要であると考えられる。

5. 引用論文

- [1] Yasushi Yamada, Tsutomu Miyamoto, Hiroyasu Kashima, Hisanori Kobara, Ryoichi Asaka, Hirofumi Ando, Shotaro Higuchi, Koichi Ida, Tanri Shiozawa. Lipocalin 2 Attenuates Iron-Related Oxidative Stress and Prolongs the Survival of Ovarian Clear Cell Carcinoma Cells by Up-Regulating the CD44 Variant. *Free Radic Res* 2016;50:414-25. doi: 10.3109/10715762.2015.1134795.

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 1件）

1. 著者名 Kobara Hisanori, Kashima Hiroyasu, Miyamoto Tsutomu, Yamada Yasushi, Asaka Shiho, Shiozawa Tanri	4. 巻 22
2. 論文標題 A case of pure-type ovarian squamous cell carcinoma producing granulocyte-colony stimulating factor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 89 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gore.2017.11.001	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 Higuchi Shotaro, Miyamoto Tsutomu, Kobara Hisanori, Yamada Satoshi, Asaka Ryoichi, Kikuchi Norihiko, Kashima Hiroyasu, Ohira Satoshi, Shiozawa Tanri	4. 巻 85
2. 論文標題 Trophoblast type-specific expression of senescence markers in the human placenta	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 56 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.placenta.2019.06.377	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	塩沢 丹里 (Shiozawa Tanri) (20235493)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	
研究分担者	宮本 強 (Miyamoto Tsutomu) (70418721)	信州大学・学術研究院医学系・准教授 (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	鹿島 大靖 (Kashima Hiroyasu) (70464089)	信州大学・学術研究院医学系（医学部附属病院）・講師 (13601)	
研究 分担者	小野 元紀 (Ono Motoki) (10816432)	信州大学・医学部附属病院・医員 (13601)	