

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15654

研究課題名(和文) 卵巣明細胞癌の新規バイオマーカーLeftyの上皮間葉転換転写制御による抗腫瘍作用

研究課題名(英文) TGFbeta-mediated LEFTY/Akt/GSK-3beta/Snail axis modulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in ovarian clear cell carcinomas

研究代表者

松本 俊英 (Matsumoto, Toshihide)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：10623184

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)：卵巣明細胞癌(OCCA)におけるLEFTYの機能的役割に着目した。STK2で培養またはTGF-1で処理されたOCCA細胞株は、上皮間葉転換(EMT)や癌幹細胞(CSC)化を示した。LEFTY発現阻害により、紡錘形細胞数とCSCマーカー発現の減少を認めた。TGF-1処理では、LEFTY発現とAktの活性化が増加し、GSK-3の不活性化が誘導され、結果的にSnail発現が増加した。臨床検体では、LEFTY発現は、vimentinの発現と正の関連性を示した。結論として、LEFTYは、EMT/CSC制御を通じてOCCAの表現型特性の確立と維持に貢献している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦ではOCCAの発生頻度が高く(卵巣癌の約20%)、その臨床的特徴として、子宮内膜症性嚢胞からの発癌、抗癌剤に抵抗性で再発癌は極めて予後不良、などがある。しかし、現時点で、OCCAの発癌機構を含む生物学的特性は不明な点が多い。本研究は、申請者のグループが卵巣癌検体のショットガンプロテオミクス法による網羅的解析により独自に同定したLefty遺伝子に焦点を絞り、そのシグナルネットワークによるOCCAの細胞動態やEMTの調整を介した腫瘍転移・進展制御に関する分子機構を解明することによってOCCAの新たな臨床的・生物学的特性の一側面を明らかにすることに学術的特色がある。

研究成果の概要(英文)：We focused on the functional roles of the left-right determination factor (LEFTY) in ovarian clear cell carcinoma(OCCCa). OCCCa cell lines that were cultured in STK2 or treated with TGF-1, underwent morphological changes toward an epithelial-mesenchymal transition (EMT) appearance and showed cancer stem cell(CSC) properties. Inhibition of LEFTY expression induced decreases in the number of spindle-shaped cells and CSC features. Finally, treatment of cells with TGF-1 led to increased LEFTY expression and activation of Akt, which subsequently induced inactivation of GSK-3, while inhibition of GSK-3 resulted in increased expression of both LEFTY and Snail. In clinical samples, LEFTY expression showed a tendency for positive associations with expression of vimentin, as well as Sox2 and ALDH1. In conclusion, TGF-1-mediated LEFTY/Akt/GSK-3/Snail axis may contribute to the establishment and maintenance of phenotypic characteristics of OCCCas through modulation of EMT/CSC properties.

研究分野：分子病理学

キーワード：卵巣明細胞癌 上皮間葉転換 がん幹細胞 Lefty

1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣明細胞癌 (OCCA) の臨床的問題点

本邦における OCCA の発生率は、上皮性卵巣腫瘍の約 20% で、欧米の 4~6% に比して極めて高い (Oncol Rep, 2009)。現在、OCCA の前癌病変の 1 つである子宮内膜症性嚢胞は、卵巣内異所性子宮内膜が月経周期に伴い出血・炎症を繰り返すことにより嚢胞化した病変で、出血により生じた赤血球由来の活性型 Fe イオンが嚢胞上皮の DNA 損傷を惹起し、OCCA (発癌率: 約 1%) が発生する (endometriosis-carcinoma sequence)。申請者の検索でも、28 例の子宮内膜症性嚢胞合併の OCCA のうち、10 例 (35.7%) に *PIK3CA* 遺伝子の点突然変異が認められ、更に、4 例で背景の嚢胞上皮に同様の遺伝子異常を認めた (Am J Clin Pathol, 2015)。このような臨床病理的背景より、子宮内膜症性嚢胞は 40 歳代で 6 cm 以上、閉経後は大きさによらず全て摘出することが推奨されている。しかし、手術侵襲や術後の後遺症のリスクを考慮すると、盲目的な手術は避け、OCCA の発生した嚢胞性病変のみを切除することが望ましい。しかし、現時点で嚢胞内に OCCA 合併を予知するバイオマーカーは確立されていない。加えて、化学療法に低感受性の OCCA 再発例に対する新規治療法の開発も急務を要する。

(2) 卵巣明細胞癌 (OCCA) のバイオマーカーとしての Lefty

上記問題点の解決に挑戦すべく、第一段階として臨床検体を用いた OCCA の新規バイオマーカーの同定に着手した。ホルマリン固定パラフィン包埋された卵巣癌検体 (4 大組織型の卵巣癌から夫々 4 例ずつ: 計 16 例) から抽出したタンパク質をショットガンプロテオミクス法 (Proteomics, 2013; Clin Proteomics, 2014) で網羅的に解析した結果、総計 5382 種のタンパク質が検出され、52 種が 4 例の OCCA の全てに高発現した。この内、他の組織型に比べて OCCA で最も高発現を示した Lefty (Left right determinant factor) に注目した。Lefty はマウスの初期胚の左側にのみ非対称に発現する分子として発見され (Genes Dev 1999)、その後の研究で、TGF- β (transforming growth factor - β) スーパーファミリーに属し、腫瘍増殖因子 Nodal と細胞膜上の共通受容体で競合的に結合して細胞の増殖・分化に関与する (Mol Cell 2001)。しかし、卵巣癌での Lefty 発現や機能に関しては殆ど手付かずの状態である。

2. 研究の目的

Lefty 依存性シグナルネットワークによる OCCA の細胞動態と EMT の分子制御機構の検索を通じて抗腫瘍分子としての Lefty の特性を解明し、OCCA の新たな臨床的・生物学的特性を提唱する。更に、Lefty 関連シグナル系に対する阻害剤の探索による新規治療法開発を視野に入れた基礎データを集積する。

3. 研究の方法

(1) Plasmid、細胞株

LEFTY1、LEFTY2 の Full-kebgcg cDNA を pcDNA3.1 ベクターにサブクローニングした。また、*Snail* promoter を pGL-3B ベクターにサブクローニングした。OCCCA 細胞株として OVICE、TOV-21G、ES-2 を用いた。

(2) 抗体、薬剤

LEFTY、Smad2、pSmad2、Sox2、CD44v6、ALDH1、N-cadherin、GSK-3 β 、pGSK-3 β 、p27^{Kip1}、p21W^{af1}、Cyclin D1、CD44s、Snail、Akt、pAkt、Cyclin A 及び β -actin に対する市販抗体を使用した。また、TGF- β 1 とその阻害剤 SB525334、STK2 培地を使用した。

(3) Transfection

LipofectAMINE PLUS (Invitrogen) を使用した。

(4) RT-PCR 法

Isogen (ニッポンジーン) により total RNA を抽出し、PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara) により cDNA 合成、PCR 反応により増幅を行った。

(5) Western Blot

RIPA buffer によりタンパク質を抽出した。一定量のタンパク質を SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜に転写後、一次抗体を反応させた。検出は ECL 検出システムを用いた。

(6) Flow cytometry

細胞を 70% アルコールにて固定を行い、核染色液 PI を用いて解析を行った。

(7) Spheroid assay

低吸着プレートに細胞を 1000 個巻き、STK2 培地にて 2 週間培養を行った。その際形成されるスフェロイド数を算出した。

(8) 臨床検体

2006 年から 2015 年北里大学病院にて外科的切除された卵巣明細胞癌 86 症例のホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いた。

(9) 免疫染色

免疫染色は、マイクロウェーブ加温による賦活化とポリマー免疫複合法を組み合わせて行った。評価方法は、染色強度と陽性細胞率から算出した IHC score (0~12) を算出した。

4. 研究成果

(1) OCCA 細胞における EMT と CSC 特性の関係性

まず、EMT と化学耐性には密接な関係があるため、OCCA 細胞株を使用して、LEFTY 発現と EMT 機能との関連性を解析した。間葉系幹細胞用の無血清培地である STK2 で培養した OVICE 細胞は、線維芽細胞への形態変化を示した。さらに、細胞周期 S 画分の減少と、細胞増殖能の低下を示しました。これは、Cyclin A2 の発現亢進と相関しているが、Cyclin D1、p21^{waf1}、および p27^{kip1}とは関連性はなかった。STK2 で培養した OVICE 細胞は、Sox2 を含む CSC マーカーの発現増加と一致して、サイズが 50 μ m を超える明確な丸いスフェロイドの数が大幅に増加した。また、ALDH1、CD133、および CD44v6 の発現増加および ALDH^{high} 活性を認めた。

上記の所見に加え、STK2 培地で培養した OVICE 細胞は、LEFTY mRNA およびタンパク質発現の増加、および Snail と vimentin の増加、さらに pSmad2 および E-cadherin の発現低下を示した。OVICE 細胞を TGF- β 1 で処理すると、LEFTY mRNA およびタンパク質発現の増加とともに、EMT 機能に向けた細胞形態変化が誘導されたが、低 LEFTY 発現系である ES-2 および TOV-21G 細胞ではその変化は比較的軽微であった。さらに、LEFTY1 および LEFTY2 プロモーターが、TGF- β 1 による処理、STK2 での培養、または Smad2 によるトランスフェクションのいずれかによって活性化された。以上より、EMT の誘導が LEFTY の過剰発現とともに、OCCA 細胞の CSC 特性と密接に関連していることが示唆された。

(2) OCCA 細胞における LEFTY 発現と EMT/CSC 特性の関係

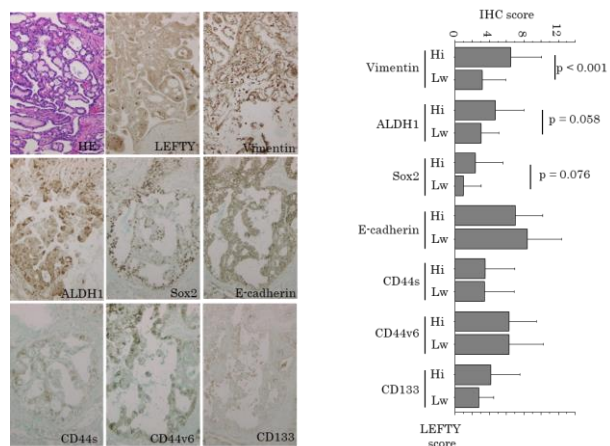
LEFTY が EMT/CSC 化誘導に直接寄与するかどうかを解析するため、OVICE 細胞を shRNA による LEFTY1 ノックダウン系 (OV-shL1#4 および #5) を作製した。STK2 で培養した OV-shL1 細胞は、pSmad2、E-cadherin、Snail、および vimentin と非依存性に、mock 細胞より紡錘形細胞への形態変化が大幅に減少していた。OV-shL1 細胞は、Sox2、ALDH1、CD44 などの CSC 関連マーカーの発現の減少、さらに ALDH1^{high} 活性とスフェロイド形成数の減少を示した。

次に、TOV-21G 細胞株を用いた LEFTY1 恒常発現系 (TOV-L1#7 および #38) を作製した。STK2 で培養した TOV-L1 細胞は、Snail と vimentin の発現増加と E-cadherin、pSmad2 の発現低下を認め、mock と比較して紡錘形への形態変化を示す細胞数が大幅に増加した。また、TOV-L1 恒常発現系は、ALDH1^{high} 活性化と、vimentin、N-cadherin、および ALDH1 を含む EMT/CSC マーカーの発現増加を示した。これらの結果より、LEFTY が OCCA 細胞における EMT/CSC 機能の誘導と密接に関連していることが示唆された。

(3) OCCA 細胞における LEFTY/Akt/GSK-3 β axis による Snail 発現の亢進

PI3K/Akt 経路が非 Smad 系 TGF- β シグナル伝達系であることより、LEFTY 発現と TGF- β 1/Akt シグナル系を解析した。STK2 で培養した OVICE 細胞は、pAkt 発現増加を示した、TGF- β 1 で処理すると、LEFTY と pSmad2 だけでなく、pAkt と pGSK-3 β の発現が増加した。

次に、Akt を介した GSK-3 β 活性抑制は、Snail の発現安定性を高めることが知られているため、LEFTY、GSK-3 β 、および Snail の関連性を解析した。OVICE 細胞を GSK-3 β の活性阻害剤である塩化リチウムにより処理すると、LEFTY と Snail の両方の発現増加とともに、pGSK-3 β の発現亢進していた。また、TGF- β 1 および Smad2 を介した Snail プロモーターの活性化は、LEFTY1 または LEFTY2 のいずれかによるトランスフェクションにより無効化された。以上より、OCCA 細胞において、Snail 発現を制御する TGF- β 、Smad2、および



LEFTY を含む複雑なフィードバック ループの存在が示唆された。

(4) 臨床検体を用いた免疫染色結果

OCCAにおける LEFTY および EMT/CSC 関連マーカーを免疫組織化学的に解析した。LEFTY 高発現群は低発現群に比して、vimentin 発現が有意に高かった。ALDH1 および Sox2 発現についても同様の結果が観察されましたが、その差は統計的有意性には至らなかった (fig 参照)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumoto Toshihide, Chino Hiromi, Akiya Masashi, Hashimura Miki, Yokoi Ako, Tochimoto Masataka, Nakagawa Mayu, Jiang Zesong, Saegusa Makoto	4. 巻 59
2. 論文標題 Requirements of LEFTY and Nodal overexpression for tumor cell survival under hypoxia in glioblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 1409 ~ 1419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mc.23265	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 -
1. 著者名 Miura Rinako, Yokoi Ako, Matsumoto Toshihide, Oguri Yasuko, Hashimura Miki, Tochimoto Masataka, Kajita Sabine, Saegusa Makoto	4. 巻 19
2. 論文標題 Nodal induces apoptosis and inhibits proliferation in ovarian endometriosis-clear cell carcinoma lesions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-019-5539-y	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 -
1. 著者名 Matsumoto Toshihide, Yokoi Ako, Hashimura Miki, Oguri Yasuko, Akiya Masashi, Saegusa Makoto	4. 巻 57
2. 論文標題 TGF- β -mediated LEFTY/Akt/GSK-3 β /Snail axis modulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in ovarian clear cell carcinomas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 957 ~ 967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mc.22816	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 -
1. 著者名 Fei Wu, Kijima Daiki, Hashimoto Mami, Hashimura Miki, Oguri Yasuko, Kajita Sabine, Matsumoto Toshihide, Yokoi Ako, Saegusa Makoto	4. 巻 15
2. 論文標題 A functional role of LEFTY during progesterone therapy for endometrial carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12964-017-0211-0	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 -

1. 著者名 Akiya Masashi, Yamazaki Masaaki, Matsumoto Toshihide, Kawashima Yusuke, Oguri Yasuko, Kajita Sabine, Kijima Daiki, Chiba Risako, Yokoi Aki, Takahashi Hiroyuki, Kodera Yoshio, Saegusa Makoto	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification of LEFTY as a molecular marker for ovarian clear cell carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 63646 ~ 63664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.18882	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松本俊英、横井愛香、紺野亮、小寺義男、三枝信
2. 発表標題 EBP50は卵巣明細胞癌の再発・予後不良因子である
3. 学会等名 第108回日本病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsumoto T, Akiya M, Kawashima Y, Kodera Y, Yokoi A, Oguri Y, Hashimura M, Saegusa M
2. 発表標題 A functional role of LEFTY as a molecular marker for ovarian clear cell carcinoma
3. 学会等名 9th Asia-Oceania Human Proteome Organization Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本俊英、秋谷昌史、川島祐介、小寺義男、横井愛香、小栗康子、橋村美紀、三枝信
2. 発表標題 卵巣明細胞癌におけるLefty発現とその臨床的意義
3. 学会等名 第69回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本俊英、横井愛香、橋村美紀、小栗康子、秋谷昌史、三枝信
2. 発表標題 TGFbeta-mediated LEFTY/Akt/GSK3b/Snail modulates EMT/CSC properties in ovarian clear cell carcinoma
3. 学会等名 第107回日本病理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本俊英、高橋博之、橋村美紀、梶田咲美乃、三枝信
2. 発表標題 Lefty acts as a positive regulator for epithelial-mesenchymal transition in carcinomasarcomas
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松本俊英、横井愛香、秋谷昌史、小栗康子、三枝信
2. 発表標題 子宮・卵巣癌肉腫におけるTGF-β/Lefty/Snail系依存性EMT/CSC機構の解析
3. 学会等名 第30回北里大学バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2017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
研究協力者	三枝 信 (SAEGUSA Makoto)		

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
研究協力者	横井 愛香 (YOKOI Aka)		
研究協力者	橋村 美紀 (HASHIMURA Miki)		
研究協力者	小栗 康子 (OGURI Yasuko)		
研究協力者	秋谷 昌史 (AKIYA Masashi)		

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