

令和 2 年 11 月 20 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16882

研究課題名(和文) 卵巣癌進展におけるLSRの病態生理学的機能の解明

研究課題名(英文) Biological function of LSR in ovarian cancer

研究代表者

平松 宏祐 (HIRAMATSU, Kosuke)

高知大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：10650591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：LSRは脂質分子を細胞に取り込む膜タンパクであるが、LSR陽性の卵巣癌細胞株に複数種の脂肪酸を投与すると、トランス脂肪酸の一つであるエライジン酸がLSRを介して卵巣癌細胞に取り込まれることを発見した。エライジン酸投与によりLSR陽性細胞内の脂質は増加し、ATP産生と細胞増殖が増加することを証明した。さらにエライジン酸はLSR陽性細胞の遊走を促進することを証明した。以上よりLSRはトランス脂肪酸を取り込み卵巣癌の進展に寄与することが示唆された。また新規に開発した抗LSR抗体はATP産生、細胞増殖、細胞遊走を阻害した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回LSRが脂肪酸の一種であるトランス脂肪酸を取り込み癌細胞の増殖と遊走に貢献することを証明した。また抗LSR抗体が卵巣癌の進展に重要な要素である増殖と遊走を阻害することから、抗LSR抗体は新規の卵巣癌治療薬として可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：LSR is a membrane protein which takes in lipid molecules. When we administrated some fatty acids to LSR-positive ovarian cancer cell, Elaidic acid which is a one of the trans-fatty acid promoted accumulation of lipid droplets and promoted ATP production and cell proliferation. Moreover, Elaidic acid promoted cell migration of LSR-positive cells. These results suggest that LSR contributes ovarian cancer spread. Finally our newly developed anti-LSR antibody inhibited these processes.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣癌 脂質代謝 LSR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は日本では年間 4000 人以上が死亡する最も致死的な婦人科悪性腫瘍であり、近年増加傾向にある。腹腔内臓器である卵巣は悪性化しても無症状で経過することが多く、70%以上が III 期以上の進行癌として診断される。子宮頸癌のように確立された検診は卵巣癌では確立されておらず、現在のところ卵巣癌に対する有効な予防法は存在しない。卵巣癌の治療法は手術・化学療法が中心である。手術では病巣の完全摘出が予後を改善する限られた方法であるが、診断時にすでに腹膜播種を来し、完全切除が不可能な症例も多い。化学療法としては全世界的にタキサン+プラチナ製剤の併用が行われている。卵巣癌で最も多い組織型である高異型漿液性癌は、進行癌で診断されることが多い一方、初回化学療法には効果的であることが知られている。しかし、短期間に抗癌剤耐性を示すため、難治性であることが多い。また、日本人に多い組織型である明細胞癌は早期癌として診断されることが多いが、抗癌剤耐性を初回化学療法に対しても示すことから、難治性であり、進行癌として診断された時の予後は極めて不良である。

卵巣癌の進展様式として血行性、リンパ行性が知られているが、腹腔内臓器である卵巣から容易に腹腔内転移・播種を来しやすいという特徴も持つ。特に脂肪組織の豊富な大網や腸間膜、腹膜表面に転移しやすい。播種病変は腹水貯留、腸蠕動低下、腸閉塞等を引き起こし、患者の QOL を著しく低下させる。このことから卵巣癌と脂質の関係を解明することが、最終的には新規治療に結びつくと考えた。

申請者はこれまでにレーザーマイクロダイセクションによる純粋な癌組織の抽出と iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) 法による網羅的な定量的蛋白質発現解析を組み合わせて、30 以上のサンプルを同時に比較解析する手法を開発した。さらにクラスター解析を始めとしたバイオインフォマティクスを用いてこれらのデータを統計学的に処理し、婦人科高異型漿液性癌において insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 (IMP2) と minichromosome maintenance protein 2 (MCM2) が高発現していることを明らかにした (Hiramatsu K, et al. Br J Cancer. 2016)。iTRAQ 法では複数のサンプルを同時に解析することで信頼度の高い解析結果が得られることから、正常卵巣上皮細胞と卵巣癌細胞の発現蛋白質を比較することで新たな標的蛋白質が同定できると考えた。また卵巣癌の播種という特徴に着目すると、細胞膜表面の蛋白質が播種の初期段階に関わっている可能性や、細胞増殖の上流シグナルとなっている可能性が高いと考え、細胞膜蛋白質に着目した。

これまでに申請者は iTRAQ 法を用いて正常卵巣上皮細胞株と比較して高異型漿液性癌および明細胞癌細胞株の細胞膜に高発現する膜蛋白質を解析し、lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) を同定した。LSR は肝臓において VLDL 等のリポ蛋白質と結合し、血中のリポ蛋白質のクリアランスする分子として報告されている (Chemical Biology. 2012)。LSR は子宮体癌 (Oncotarget. 2016) や膀胱癌 (BMC Med Genomics. 2008) において高発現することが報告されているが、癌における LSR の機能は完全に解明されていない。これまでに申請者は卵巣癌において LSR が高発現することが有意に予後不良となることを世界で初めて明らかにした。また、LSR の高発現は卵巣癌の転移巣でも発現が確認されたため、治療標的となり得る可能性も示した。また、LSR 高発現は卵巣癌の予後因子であったことから、LSR が新規治療標的蛋白質に成り得ると考え、LSR の機能を阻害する活性を有するニワトリ・マウスキメラ抗 LSR モノクローナル抗体を新規に作成した。この抗体は LSR 発現卵巣癌細胞に対し in vivo と in vitro で有意に抗腫瘍効果を示した。またマウスに皮下移植したヒト卵巣癌組織に対しても有意に増殖抑制効果を示した。これらの背景から申請者は LSR が卵巣癌の腹膜播種や増殖などに深く関係していると考え、その機能解析を着想した。

2. 研究の目的

卵巣癌は婦人科領域では子宮体癌・子宮頸癌と並び、臨床・基礎研究の重要度が高い悪性腫瘍である。特に卵巣癌は容易に腹膜播種を来し、手術・抗癌剤治療が困難を極める。申請者は卵巣癌細胞の膜蛋白質の網羅的発現解析を行い、高発現を示す分子として lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) を同定した。さらに、新規に作成した抗 LSR 抗体が卵巣癌腹膜播種病変に対し抗腫瘍効果を示すことを証明した (論文投稿中)。しかし卵巣癌の病態における LSR の役割については全く解明されていない。本研究では卵巣癌の増殖・生存・腹膜播種に LSR が如何に関わるかを分子生物学的に解析することを目指す。

3. 研究の方法

申請者は卵巣癌細胞の膜蛋白質の網羅的発現解析を行い、高発現を示す lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) を同定した。申請者が新規に作成した抗 LSR 抗体は予備実験において卵巣癌腹膜播種病変に対し抗腫瘍効果を示すことを証明した。このことは LSR が卵巣癌の腹膜播種に関わる重要な分子であることを示唆している。本研究では卵巣癌腹膜播種における LSR の役割を in vitro, in vivo において分子生物学的に解析することを目的とした。

4. 研究成果

・ LSR の下流シグナルと脂質の関連の検討

これまで LSR のリガンドとしてリポタンクの一つである VLDL を投与し、LSR 陽性細胞に対するその増殖促進効果を検証してきたが、LSR 陽性細胞が必要とする脂質分子を明らかにするために

複数の脂肪酸を投与した。アラキドン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸は LSR 陽性細胞の増殖を促進しなかったが、オレイン酸 (OA) とエライジン酸 (EA)は増殖を促進した (図 1)。

図 1: 各種脂肪酸投与 72h 後の増殖アッセイ

LSR	(μM)	MA			PA			AA			OA			EA		
		0	50	100	0	50	100	0	50	100	0	50	100	0	50	100
(+)	RMGI	1.000	0.772	0.753	1.000	0.591	0.503	1.000	0.769	0.789	1.000	1.366	1.408	1.000	1.364	1.368
(-)	SKOV3	1.000	0.934	0.914	1.000	0.566	0.425	1.000	0.533	0.310	1.000	0.953	0.865	1.000	1.079	0.881

オレイン酸 (OA) とエライジン酸 (EA)は増殖を促進した

続いて LSR siRNA を卵巣癌細胞株に導入し、LSR をノックダウンした細胞を作成し、これに OA と EA を投与した。その結果 OA は LSR ノックダウン後も LSR 陽性細胞の増殖を促進したが、EA は促進しなかった (図 2)。

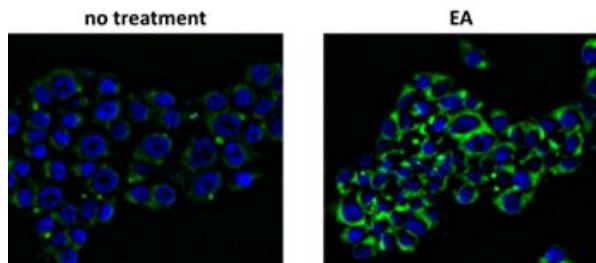
図 2: LSR ノックダウン細胞に OA、EA を投与し 72h 後に増殖アッセイ

	OA			EA			
	(μM)	0	5	10	0	10	25
72h		1.000	1.274	1.763	1.000	1.034	1.026

in LSR-siRNA transfected RMGI

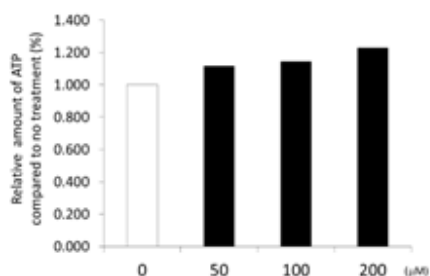
このことから EA は LSR を介して細胞増殖を促進することが判明した。その経路としては EA による ATP 産生の増加が考えられる。EA 投与後に LSR 陽性細胞内の脂質を蛍光色素で染色すると、EA 投与により細胞内脂質が増加した (図 3)。

図 3: LSR 陽性細胞に EA を投与し細胞内脂質を蛍光染色



さらに EA 投与後に細胞内 ATP 値を測定すると、EA により ATP 産生が増加していた (図 4)。

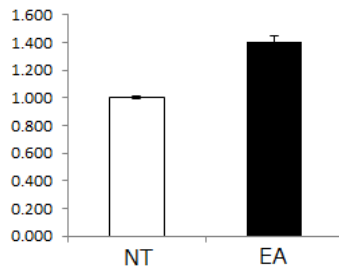
図 4: EA 投与後の ATP 測定結果



EA の濃度依存性に ATP 産生が増加した

以上から EA 投与により細胞内脂質が増加し、酸化、TCA サイクル、電子伝達系の活性化を経て ATP 産生が増加し、細胞増殖につながると考えられた。また卵巣癌の臨床的な特徴として腹膜播種があるが、EA が卵巣癌細胞の遊走を促進することを発見した (図 5)

図 5: EA 投与後の cell migration assay



・ LSR と増殖の関係

上記の様に、LSR は脂肪分子を細胞内に取り込み、そのエネルギーを増殖や遊走に利用しているが、さらに詳細なメカニズム探索のために、LSR 陽性細胞に LSR に特異的な siRNA を導入し LSR ノックアウト株を作成した。この細胞からタンパクを抽出しウェスタンブロット法にてタンパクの発現変動を検証すると、MAPK が抑制されていることが判明した。現在、関連する他のタンパクの発現を確認中であるが、LSR は MAPK を介して増殖に関連している可能性がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kosuke Hiramatsu, Satoshi Serada, Takayuki Enomoto, Yusuke Takahashi, Satoshi Nakagawa, Satoshi Nojima, Akiko Morimoto, Shinya Matsuzaki, Takuhei Yokoyama, Tsuyoshi Takahashi, Minoru Fujimoto, Hiroshi Takemori, Yutaka Ueda, Kiyoshi Yoshino, Eiichi Morii, Tadashi Kimura and Tetsuji Naka

LSR Antibody Therapy Inhibits Ovarian Epithelial Tumor Growth by Inhibiting Lipid Uptake

Cancer Res. 2018 Jan 15;78(2):516-527

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0910

査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Kosuke Hiramatsu, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka
LSR promotes cell proliferation and migration subsequent to uptake of fatty acid in epithelial ovarian cancer
AACR annual meeting 2019 (国際学会)

2. Kosuke Hiramatsu, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Shinya Matsuzaki, Yutaka Ueda, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka
LSR promotes lipid metabolism and contributes cell viability in low glucose environment in epithelial ovarian cancer
IGCS 2018 (国際学会)

3. Kosuke Hiramatsu, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Shinya Matsuzaki, Yutaka Ueda, Kiyoshi Yoshino, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka
LSR promotes lipid metabolism via beta oxidation and contributes cell viability in epithelial ovarian cancer
AACR annual meeting 2018 (国際学会)

4. 平松宏祐、吉野潔、世良田聡、藤本穰、上田豊、仲哲治、木村正
卵巣癌細胞膜発現タンパク質である LSR を標的とした新規抗体治療法の開発とその機能解析
第 6 回婦人科バイオマーカー研究会 2018

5. Kosuke Hiramatsu, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Shinya Matsuzaki, Yutaka Ueda, Kiyoshi Yoshino, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka
LSR promotes lipid uptake, beta-oxidation and subsequent tumor growth in ovarian cancer

ESGO 2017 (国際学会)

6. Kosuke Hiramatsu, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Shinya Matsuzaki, Yutaka Ueda, Kiyoshi Yoshino, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka

LSR promotes beta-oxidation via lipid uptake and subsequent tumor growth in ovarian cancer

癌学会 2017 (国際学会)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。