

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16748

研究課題名(和文) 卵巣癌においてLSRが制御する脂質代謝経路の解析と抗LSR抗体による阻害の検証

研究課題名(英文) Analysis of lipid metabolism via LSR and anti-tumor effect of anti-LSR antibody in ovarian cancer

研究代表者

平松 宏祐 (HIRAMATSU, Kosuke)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10650591

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)：(1) LSRの活性化条件とリガンドの同定：LSR陽性細胞を低酸素や低グルコース条件下で培養すると通常培養細胞と比べてLSRの発現は増加した。(3) 腹膜播種におけるLSRと脂質の役割：LSR陽性細胞にLDLやVLDLを加えたが細胞の遊走能は上昇しなかった。(4) その他：卵巣癌と同じ婦人科癌である子宮体癌でLSRの機能解析をすると、LSRの高発現は子宮体癌の予後不良因子であり、特に筋層浸潤と遠隔転移と関連していた。そのメカニズムはLSRがMAPK経路を活性化し増殖を活性化し、さらにEMTに関連するMMP2を介して浸潤を促進していた。これらは抗LSR抗体により阻害された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌においてLSRは低酸素や低Glcといった環境下での細胞の増殖/生存に関わることが示唆された。また同時に検証した子宮体癌におけるLSRの機能は、卵巣癌と同様に細胞の増殖の促進であり、今回新たにEMTに関連するMMP2の発現がLSRと関連することが証明され、LSRが卵巣癌と子宮体癌の増殖、浸潤、遊走に深くかかわることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：(1) LSR expression in LSR-positive cells was higher in hypoxic environment and glucose deprivation compared with normal culture. (3) LDL and VLDL did not induce cell migration of LSR-positive cells.

(4) In endometrial cancer which is one of the gynecologic cancer same as ovarian cancer, high expression of LSR was significantly poor prognostic factor. Especially, LSR strongly related to myometrial invasion and distant metastasis. LSR promoted MAPK pathway and subsequent cell proliferation. Furthermore, LSR promoted expression of MMP2 and Mt1-MMP which are related to EMT and contributed cell invasion. Finally, anti-LSR antibody inhibited these processes.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣癌 LSR 子宮体癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は婦人科領域では最も予後不良な悪性疾患であり、臨床・基礎研究の重要度が高い。卵巣癌は早期発見が困難で、診断時には腹膜播種・遠隔転移を来していることが多く、手術・抗癌剤治療は困難を極める。

申請者らは卵巣癌細胞のタンパク質発現解析を行い、lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) を同定し、この高発現が卵巣癌の予後不良因子であることを発見した。さらに新規に抗 LSR 抗体を作成し、この抗体が卵巣癌細胞株およびヒト卵巣癌組織移植マウスモデルに抗腫瘍効果を示すことを証明した。しかし LSR の役割と抗 LSR 抗体の作用機序はまだ十分に解明されていない。本研究では卵巣癌の増殖・生存・播種に LSR が如何に関わるか、抗 LSR 抗体が何を阻害するのかを分子生物学的に解析する

2. 研究の目的

上記先行研究により LSR が LSR 陽性卵巣癌の増殖に関係し、抗 LSR 抗体が増殖を抑制することは証明されたが、卵巣癌細胞における LSR の詳細な機能と抗 LSR 抗体の作用機序はまだ十分に解明されていない。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、抗 LSR 抗体が卵巣癌の何を阻害するのかを分子生物学的に解析することを旨とする。

3. 研究の方法

LSR の活性化条件とリガンドの同定

LSR 陽性卵巣癌細胞株を低栄養・低酸素等の条件下で培養し、LSR の発現変化を mRNA レベル(RT-PCR)、タンパク質レベル(ウェスタンブロット) で解析する。リガンドの同定には VLDL 構成要素であるコレステロールエステル、脂肪酸を含むトリアシルグリセロール、アポタンパク質等を LSR 陽性卵巣癌細胞株に投与し、細胞増殖アッセイで生細胞数の変化を評価する。同時に抗 LSR 抗体が増殖を阻害すること、LSR ノックアウト株では増殖促進作用が見られないことを評価する。

LSR を介した脂肪の蓄積と脂質代謝の活性化

LSR 陽性卵巣癌細胞株および LSR ノックアウト株を用いて、まず脂質投与後の細胞内脂肪滴を評価する。低栄養等の条件下で LSR が活性化した状態で脂質を投与し、細胞内脂肪滴を Flow cytometry および脂肪染色を用いて評価する。さらに脂質投与後の β 酸化・TCA サイクル・電子伝達系の活性化を評価するために、代謝産物であるアセチル CoA と ATP を定量する。また抗 LSR 抗体と β 酸化阻害剤を併用しこれらの経路の阻害効果を評価する。抗 LSR 抗体単独で脂質代謝を阻害した場合には、抗 LSR 抗体が脂質の取り込みを阻害したことを意味する。加えて β 酸化阻害剤を併用し、LSR を介して細胞内に取り込まれた脂質が β 酸化から ATP 産生を通して細胞増殖を促進していることを証明する。 β 酸化阻害剤併用時にも細胞増殖が促進した場合には取り込まれた脂質が β 酸化以外の経路を活性化し細胞増殖を促進している可能性がある。上記評価系をヒト大網組織を用いた実験でも検証する。ヒト大網組織に含まれる脂質を溶出させた培地を用い、LSR 陽性卵巣癌細胞株の増殖促進と、抗 LSR 抗体による阻害効果を確認する。

腹膜播種における LSR と脂質の役割

LSR 陽性卵巣癌細胞株に脂質を投与し遊走能の評価を migration assay で行う。さらに脂肪滴を内包した癌細胞を作成し、この癌細胞の低栄養・低酸素条件下での遊走能を同じく migration assay を用いて評価する。

その他：子宮体癌における LSR の機能解析

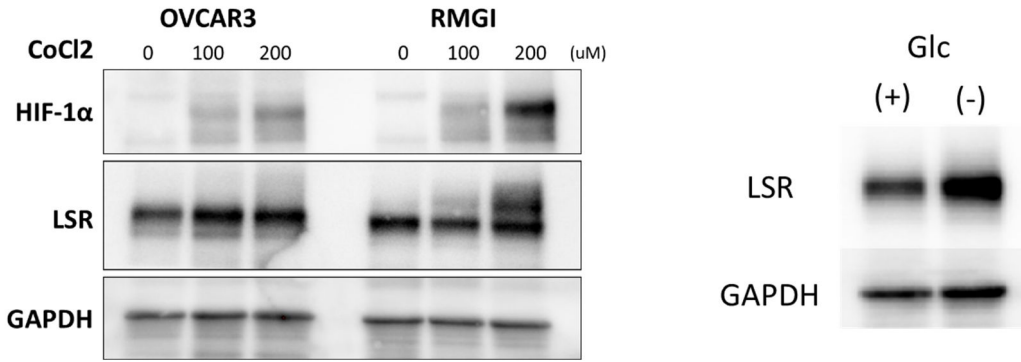
卵巣癌と同じ婦人科癌の一つである子宮体癌は、早期発見されることが多く比較的予後は良好であるが、進行症例や化学療法抵抗性を示す組織型では治療に難渋する。卵巣癌と子宮体癌は共通する組織型も多く、LSR が同様の機能を担っておれば抗 LSR 抗体の適応拡大につながるため、子宮体癌における LSR の機能と抗 LSR 抗体の抗腫瘍効果を検証する。

4. 研究成果

LSR の活性化条件とリガンドの同定

LSR 陽性卵巣癌細胞株の OVCAR3 と RMGI を、低酸素環境を模倣する CoCl_2 存在下で培養すると、低酸素化に伴う HIF-1 の増加に伴い LSR の発現は上昇した (左図)。また低 Glc 環境で培養すると LSR の発現が増加した (右図)。以上より低酸素や低 Glc といった細

胞にとって過酷な環境下では LSR が高発現することで細胞の増殖や生存に寄与していることが示唆された。



LSR を介した脂肪の蓄積と脂質代謝の活性化

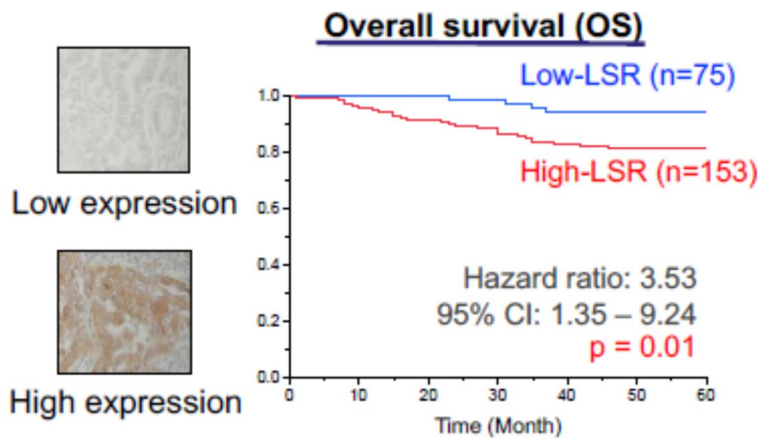
通常培養下ではリポタンパク投与による細胞増殖への影響は見られないことから、グルコース濃度を低下させた上でリポタンパクを投与したが、ATP 産生の増加は見られなかった。

腹膜播種における LSR と脂質の役割

LSR 陽性細胞に LDL や VLDL を加えたが細胞の遊走能は上昇しなかった。で同定した低グルコース環境下で同様の実験を行ったが、リポタンパク投与による変化は見られなかった。

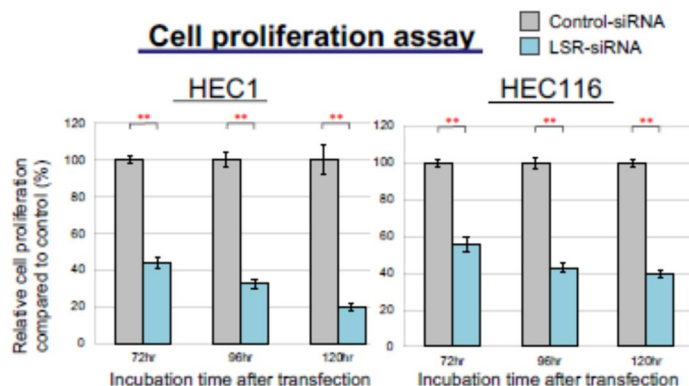
その他：子宮体癌における LSR の機能解析

卵巣癌では LSR の高発現は予後不良因子であったため、子宮体癌でも免疫組織学的染色を用いて、LSR の発現と子宮体癌の予後の関連を生存曲線を用いて評価した。

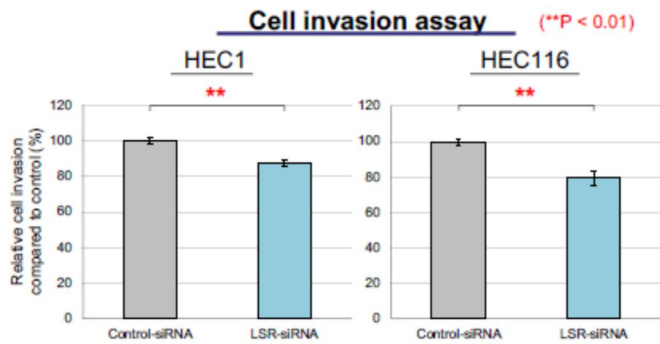


子宮体癌 228 例中、LSR の高発現を 153 例で認め、その予後は有意に不良であった

また、siRNA を用いて子宮体癌細胞株の LSR をノックダウンさせると増殖は有意に低下し、さらに浸潤能の低下も確認した。

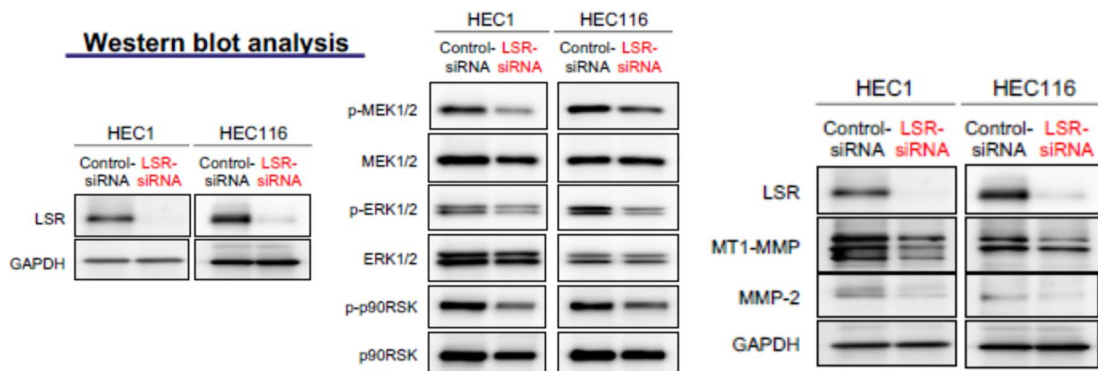


LSR のノックダウンにより細胞増殖能は有意に低下した



LSRのノックダウンにより細胞浸潤能は有意に低下した

LSR ノックダウン細胞で MAPK 経路の活性化を評価すると p-MEK や p-ERK は低下しており LSR の下流に MAPK 経路が存在することが示唆された。また EMT に関連する MT1-MMP と MMP2 の発現も LSR のノックダウンに伴い低下しており、これにより浸潤能が低下していることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshikazu Nagase, Kosuke Hiramatsu, Masashi Funauchi, Satoshi Nakagawa, Shinya Matsuzaki, Eiji Kobayashi, Toshihiro Kimura, Yutaka Ueda, Tetsuji Naka, Tadashi Kimura
2. 発表標題 Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor in endometrial cancer regulates cell proliferation in vitro and associates with poor prognosis in vivo.
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshikazu Nagase, Kosuke Hiramatsu, Masashi Funauchi, Mayu Shiomi, Satoshi Nakagawa, Shinya Matsuzaki, Eiji Kobayashi, Toshihiro Kimura, Yutaka Ueda, Tetsuji Naka, Tadashi Kimura
2. 発表標題 LSR in endometrial cancer: A novel prognostic factor by regulating cell proliferation and invasion via MEK/ERK pathway
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshikazu Nagase, Kosuke Hiramatsu, Masashi Funauchi, Satoshi Nakagawa, Shinya Matsuzaki, Eiji Kobayashi, Toshihiro Kimura, Yutaka Ueda, Tetsuji Naka, Tadashi Kimura
2. 発表標題 Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor regulates cell proliferation and invasion, and associates with poor prognosis in endometrial cancer.
3. 学会等名 第62回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kosuke Hiramatsu, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka
2. 発表標題 LSR promotes cell proliferation and migration subsequent to uptake of fatty acid in epithelial ovarian cancer
3. 学会等名 AACR 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kosuke Hiramatsu, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Shinya Matsuzaki, Yutaka Ueda, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka
2. 発表標題 Fatty acid promotes cell proliferation and migration via LSR in ovarian cancer
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kosuke Hiramatsu, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Shinya Matsuzaki, Yutaka Ueda, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka
2. 発表標題 Fatty acid promotes cell proliferation and migration via LSR in epithelial ovarian cancer
3. 学会等名 第61回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masashi Funauchi, Kosuke Hiramatsu, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Yutaka Ueda, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka
2. 発表標題 Elaidic acid promotes cell proliferation and migration via LSR in epithelial ovarian cancer
3. 学会等名 ESGO 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------