

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09660

研究課題名(和文) 子宮内膜癌におけるリポミクス解析

研究課題名(英文) Lipidomics analysis in endometrial cancer

研究代表者

伊藤 潔 (Ito, Kiyoshi)

東北大学・災害科学国際研究所・教授

研究者番号：70241594

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)：肥満が癌の発生に関与していることが知られるようになってきた。疫学的に脂肪が癌の再発に何らかの影響を与えていることは明確であるが、そのメカニズムは明らかにされていない。本研究では、リポクオリティの子宮内膜癌への影響を明らかにすることを目的とした。ヒト病理組織を用いた検討から、脂肪滴構成に関与するAdipophilin、脂質の取り込みに関与するCD36、酸化に関与するACADLはいずれも癌細胞の脂質の影響に関与することが明らかとなった。また培養細胞を用いた検討から、脂質の構成、癌細胞での代謝経路によって、脂質が癌細胞の増殖などを抑制的もしくは促進的に働くかを決定していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、脂質の取り込み、蓄積から代謝に至るまでの種々の段階に関わる因子群のパターンによって脂質の影響は異なり、これら因子の発現を総合的に判断することが重要であると示唆された。代謝物の影響に関するさらなる検討が求められるが、本研究からは、脂質代謝経路の阻害といった癌治療学的観点からの情報提供のみならず、食物やサプリメントとしての脂質摂取といった栄養学的観点からの癌予防にもつながる成果であると考えられる。本研究では子宮内膜癌を対象としたが、同様に大腸癌や乳癌はじめとする他癌においても、肥満・脂質研究の一助となるのではと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been known that obesity is involved in the development of several types of cancer. Epidemiological studies have clearly shown that lipid has some effect on cancer recurrence, but the mechanism has not been elucidated. The purpose of this study was to clarify the effect of lipoquality on endometrial cancer. Studies using human histopathological tissues revealed that Adipophilin, a lipid droplet component, CD36, a lipid uptake factor, and ACADL, a -oxidation-related enzyme, are all involved in the effects of lipids on endometrial cancer cells. In vitro studies also revealed that the effect of lipids on cancer cells depends on the composition of the added lipids and the metabolic pathways in cancer cells.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮内膜癌 脂質代謝

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、肥満が癌の発生に関与していることが知られるようになってきた。英国での女性(1,222,630人)を対象とした Million Women Study (MWS) では、肥満と悪性腫瘍との関連について疫学調査が行われ、子宮内膜癌、食道癌(腺癌)、大腸癌(閉経前)、乳癌(閉経後)、卵巣癌などの10臓器の悪性腫瘍において、肥満が危険因子となることが報告された [Reeves GK, et al. BMJ. 2007]。これらの癌のうち、子宮内膜癌が最も肥満との関連が高いことが示されている。一方、邦人では BMI の分布が欧米人と大きく異なるものの、同様に子宮内膜癌をはじめ、大腸癌(閉経前)、乳癌(閉経後)、卵巣癌などと肥満との関連が報告されている [Kuriyama S, et al. Int J Cancer. 2005]。

減量手術によって継続的に体重減少を維持することで、癌の罹患リスクのみならず、様々な癌種において再発率をも有意に減らすことが報告されている [Ashrafian H, et al. Cancer. 2011]。4,000人の乳癌サバイバーの調査では(California Teachers 試験)、エストロゲン受容体陽性乳癌で治療を受けた症例において試験登録時点で肥満であることが、乳癌による死亡リスクの著しい上昇に関連していた [Link LB, et al. Am J Clin Nutr. 2013]。疫学的に脂肪が癌の再発に何らかの影響を与えていることは明確であるが、そのメカニズムに関しては明らかにされていない。

一方で、癌細胞は脂肪を脂肪滴として蓄積する性質を有しており、乳癌細胞ではこれらの脂肪滴が化学療法の奏功性に影響を及ぼすことが報告されている。脂肪滴は有機溶剤によって溶出してしまうため、三木らは、脂肪滴を評価するための代替タンパクマーカーとしての Pelilipin 2 の意義を明らかにし、乳癌において脂肪の蓄積が増殖や浸潤に関わることを報告した [Kuniyoshi S, et al. Pathol Int. 2019]。脂質は様々な代謝を受けることで多くの構造的多様性を有しており(十数万種類と想定されている)、この脂質構造の多様性は「リポクオリティ」と呼ばれている。 $\omega$ 3脂肪酸の抗炎症作用は比較的よく知られているが、リポクオリティと癌の関連については未開の研究領域である。この腫瘍組織中のリポクオリティが癌と脂肪の関係を解明する手がかりになるのではと考えられる。

### 2. 研究の目的

脂肪酸メタボライトと癌罹患の疫学調査は比較的多く、乳癌や大腸癌においてリスクとの関連が報告されている [de Lorgeril M, et al. BMC Med. 2012; Shen XJ, et al. Br J Nutr. 2012; Zheng JS, et al. BMJ. 2013]。リポドミクス解析に関しては大腸癌、肝癌、乳癌を中心に論文が報告されているが、子宮内膜癌は最も肥満の影響を受けるにもかかわらず、脂肪酸代謝物の関与は明らかにされていない。本研究では、リポクオリティの子宮内膜癌への影響を明らかにするとともに、ホルモン依存性等の病態との関与を解明する。肥満関連癌としても過言ではない子宮内膜癌で結果を残すことで、さらに乳癌や大腸癌をはじめとする他癌での肥満・脂肪研究が飛躍的に進歩すると期待している。

### 3. 研究の方法

#### (1) 症例

東北大学病院にて外科切除された子宮内膜癌症例を用いた。いずれも10%ホルマリン固定後、パラフィン包埋された組織を使用した。本研究プロトコールについて、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得た(受付番号:2020-1-005)。

#### (2) 免疫組織化学

免疫組織化学はストレプトアビジン-ビオチン複合法にて実施した(ヒストファイニングット、ニチレイ、東京)。(1)の症例を対象に、adipophilin、CD36、アシル CoA デヒドロゲナーゼ長鎖(ACADL: Acyl-CoA Dehydrogenase Long Chain)、グルココルチコイド受容体(GR)、プロゲステロン受容体(PR)、Ki-67の発現を免疫組織化学にて評価した。

#### (3) $\beta$ 酸化

培養細胞に脂質を添加し、FAOBlue(フナコシ、東京)を用いて $\beta$ 酸化の活性化を評価した。FAOBlueは、青色蛍光色素クマリンの誘導体を含むノナン酸(C9)であり、4回目のFAOサイクルでFAOBlueが分解された後、クマリンはプロピオン酸から放出され、放出されたクマリンは405nmで励起された強い青色の蛍光を示す。本研究では、子宮内膜癌培養細胞ANA-3CA(ATCC、アメリカ)を用いた。また、陽性対象として乳癌培養細胞T-47D(ATCC)を使用した。脂質はRefeed(Re membrane、イタリア)を用いた。

#### (4) リポドーム解析

リポドーム解析について、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社(山形)にノンターゲット解析を依頼した。子宮内膜癌培養細胞Ishikawa 3-H-12(JCR細胞バンク、大阪)

に、構成の異なる3種類の脂質 (Refeed) を添加し、72 時間後に細胞を回収し、LC-HSI/MS/MS システム (熱エレクトロスプレーイオン化法) を用いた脂溶性・中性代謝物質の網羅解析を実施した。脂質分子種の同定及び測定サンプル間のアライメントには、脂質同定解析ソフト Lipid Search 5.1 (三井情報株式会社、東京) が用いられた。また、同脂質の添加 72 時間後の細胞数を測定した。

#### (4) PCR 解析

PCR には LightCycler 96 (Roche、ドイツ) を使い、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ II (CPT2) の定量的 RT-PCR を行った。Ishikawa に脂質 (Refeed) を添加し 72 時間後に RNA を抽出し、逆転写を行った。RPL13A を同様に定量し、インターナルコントロールとした。解析には  $\Delta\Delta C_t$  法を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 子宮内膜癌における adipophilin の発現とコルチゾールによる影響

Adipophilin (Perilipin 2, ADRP, PLIN2) は細胞内脂肪滴の表面に発現している PAT (perilipin/ADRP/TIP47) family タンパクのひとつであり、脂肪滴への脂肪の貯蓄、脂肪滴からの脂肪の動員に關与する。免疫染色により子宮内膜癌細胞、間質細胞のいずれも細胞質において adipophilin の発現が認められた (右図)。またその発現は低分化癌 (G3) ほど上昇して見られた (右表)。プロゲステロンレセプターとは有意に負の相関、増殖マーカーである Ki-67 とは正の相関傾向が認められた。

子宮内膜癌培養細胞での検討では、デキサメタゾン添加群では有意差をもって増殖能の増加が認められ、さらに adipophilin mRNA の増加が見られた。

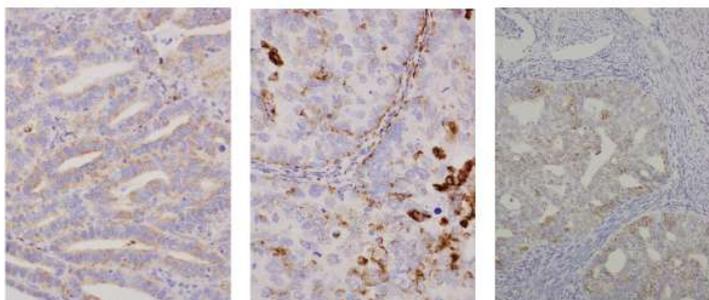
Adipophilin が低分化癌ほど発現し Ki-67 と発現の相関傾向もみられることから、adipophilin は細胞内の脂質バランスに關与するなどして癌の悪性度を高めることが考えられる。さらにコルチゾールは癌細胞の増殖能を上昇させ adipophilin 発現も上昇させる。これらからストレスによりコルチゾールが生産されることで癌が悪化し、その機序に adipophilin が關与していることが考えられる。

#### (2) 子宮内膜癌における CD36 およびアシル CoA デヒドロゲナーゼ長鎖 (ACADL) の発現

CD36 は長鎖脂肪酸に結合して長鎖脂肪酸の細胞内への輸送を促進する。また、癌細胞では、CD36 は癌の浸潤・転移に關与することが知られている。ACADL は  $\beta$  酸化の初期反応を触媒する酵素であり、 $\beta$  酸化によって癌細胞はエネルギーを得ることができる。子宮内膜癌における免疫組織化学解析の結果、CD36 は癌細胞の主に細胞膜、一部は細胞質に発現が認められ (下図)、リンパ節転移陽性症例において CD36 陽性症例の割合が有意に高かった。CD36 は正常子宮内膜においても発現が認められた。一方で、ACADL は癌細胞の細胞質に発現を認めたが (下図)、ACADL 発現と臨床病理学的因子との関連は認められなかった。同一癌細胞に CD36 と ACADL の発現を認めたが、両タンパクの発現局在が異なる症例もあった。

細胞増殖に対する脂質添加の効果を検討するために、同じレベルの CD36 を有する乳癌培養細胞 (T-47D) および子宮内膜癌培養細胞 (AN3CA) を使用した。脂質は Refeed (Remembrance、イタリア) を用いた。脂質の添加では、T-47D と AN3CA の両方におい

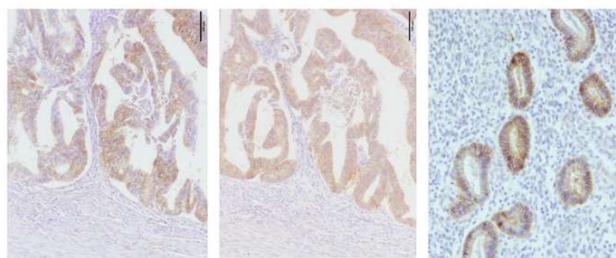
子宮内膜癌における adipophilin の免疫組織化学



グレードと adipophilin 陽性率の關係

	(-)	(+)	(++)	total
G1	18	6	7	31
G2	2	10	7	19
G3	2	4	6	12
total	22	20	20	62

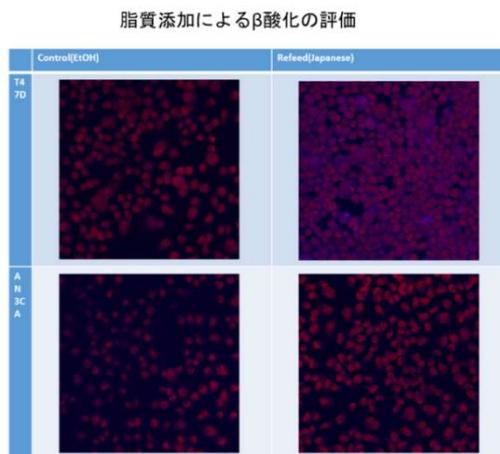
子宮内膜癌における CD36 及び ACADL の免疫組織化学



子宮内膜癌 CD36 陽性 子宮内膜癌 ACADL 陽性 正常子宮内膜 (増殖期) CD36 陽性

て、非添加群と比べて添加群で有意な細胞数の増加を認めた。さらに細胞内脂肪酸のβ酸化を可視化するFAOBlue (フナコシ、日本) にて、β酸化の活性化について検討を行った。脂質添加培地では、T-47Dはβ酸化活性を示す青色蛍光を示した(右図上段)。一方、AN3CAでは同じ条件下で蛍光が非常に弱かった(右図下段)。

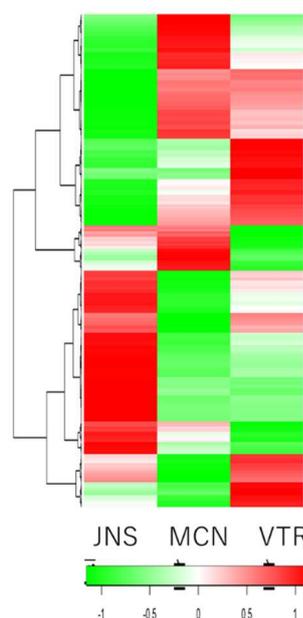
乳癌および子宮内膜癌は、細胞内脂質の取り込みとそれに続くβ酸化の経路を有すると考えられたが、その能力は症例によって異なるものと考えられた。組織解析から、子宮内膜癌の脂質の影響には、脂質の取り込みが重要であることが示唆された。



### (3) 子宮内膜癌培養細胞を用いたリポドーム解析

アメリカ (MCN)、日本 (JNS)、ベジタリアン (VTR) の食生活を模倣した添加用脂質を培地に添加し、Ishikawa の細胞増殖に及ぼす影響を検討した (72 時間)。結果、溶媒対象と比較して、MCN 添加のみで有意な細胞数の増加を認めた。さらに、MCN、JNS、VTR を添加した 72 時間後に細胞を回収し、LC-HSI/MS/MS システムを用いた脂溶性・中性代謝物質の網羅解析を実施した (リポドーム解析)。検出とその後の解析には、29 クラス 935 分子種が用いられた。階層クラスター解析の結果 (右図)、JNS と VTR のプロファイルが類似し、MCN のプロファイルはその二剤と大きく異なった。MCN の増殖に関する脂質を明らかにするため、MCN でのみ高い値を示した脂質を抽出し、中でもアシルカルニチンの高値に注目した。エネルギー産生に関わるアシルコエンザイムエー (CoA) はミトコンドリア内膜を通過することができない。そのためアシル CoA のアシル基をカルニチンへ転移し、アシルカルニチンとしてミトコンドリア内膜を通過させる。アシルカルニチンはミトコンドリア内で再びアシル CoA となる。癌ではこのアシルカルニチンが細胞内に蓄積することで、epithelial-mesenchymal transition や増殖に関与することが報告されている。

脂質代謝の階層的クラスタ解析



CPT2 は カルニチン-アシルカルニチントランスポーターによりミトコンドリア内に輸送された長鎖アシルカルニチンを長鎖アシル-CoA へと活性化し、β酸化回路に基質を供給する役割を担っている。MCN と VTR を Ishikawa に添加 24 時間後に CPT2 の発現を RT-PCR にて確認した。結果、MCN と VTR の添加によって、CPT2 の有意な増加を認めたが、VTR が 5 倍の増加だったのに対し、MCN は 2 倍程度の増加にとどまった。VTR は添加された脂質が CPT2 の発現増加に伴って、β酸化経路を経て代謝されるのに対し、MCN は CPT2 の発現増加が低いため、アシル CoA の状態で細胞内に蓄積されたと示唆される。

以上、子宮内膜癌における脂質の影響として、癌細胞が備える代謝機能に加え、脂質の構成成分が癌細胞に大きく影響を及ぼすことが考えられた。また、CD36 のような脂質の取り込みに関与する因子、adipophilin のような脂質を細胞内に蓄える因子等、種々の段階に関わる因子群のパターンによって脂質の影響は異なるものと考えられる。本研究から、これら因子の発現を総合的に判断することが重要であると示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yasuhiro MIKI, Fuka ONUMA, Kiyoshi TAKAGI, Erina IWABUCHI, Takashi SUZUKI, Hironobu SASANO, Kiyoshi ITO
2. 発表標題 Correlation between T cell infiltration subtypes and intratumoral hormone levels in endometrial cancer
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Miki, Erina Iwabuchi, Kiyoshi Takagi, Takashi Suzuki, Hironobu Sasano, Kiyoshi Ito
2. 発表標題 Co-Expression of Nuclear Heterogeneous Nuclear Ribonucleic Protein K and Estrogen Receptor in Endometrial Cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三木康宏、高木清司、鈴木 貴、伊藤 潔
2. 発表標題 子宮内膜癌におけるDehydroepiandrosteroneの直接作用に関する検討
3. 学会等名 第25回 日本生殖内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤悠人、齊藤涼子、三木康宏、Matti Poutanen、Risto Lammintausta、八重樫伸生、伊藤潔、笹野公伸
2. 発表標題 子宮内膜症及び腺筋症におけるエストロゲン合成・代謝酵素の発現
3. 学会等名 第25回 日本生殖内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020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 分担 者	三木 康宏  (Miki Yasuhiro)  (50451521)	東北文化学園大学・医療福祉学部・特任准教授   (31310)	

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