

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16196

研究課題名（和文）LSRが担うがん代謝リプログラミングと細胞間接着制御の分子機構

研究課題名（英文）Roles of LSR in cancer metabolic reprogramming and cell adhesion

研究代表者

高澤 久美（Takasawa, Kumi）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：50359709

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）：子宮頸部腺がん手術材料を用いて抗LSR抗体による免疫組織化学を行い、その染色態度を評価した。その結果、非腫瘍性の頸管腺上皮、乳管上皮と比較して、それぞれのがん成分においてLSRの発現態度には有意な差が認められた。CRISPR-Cas9システムにより作製したLSR発現欠損株は対照株と比較して有意に種々の腫瘍悪性化能が低下していた。比較プロテオーム解析では、細胞間接着に関連する遺伝子オントロジー（GO）termが複数検出された。また、乳がんの複数の細胞株を用いてLSRの発現解析を行ったところ、複数の薬剤曝露によりLSRの発現が増加することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、子宮頸がんにおけるLSRの異所性高発現および子宮頸がん悪性化におけるLSRの役割解明に関する研究は皆無である。細胞膜表面に異所性高発現するLSRは診断マーカーとして有望であると同時に、分子標的治療のターゲットともなり得ることから、本研究で得られる知見は、分子機序の理解に役立つと共に、LSR高発現がんの治療戦略立案にも寄与すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Immunohistochemistry with anti-LSR antibodies was performed on surgical material of cervical adenocarcinoma and its staining pattern was evaluated. The results showed a significant difference in the expression of LSR in each cancer component compared to non-neoplastic cervical glandular epithelium and breast duct epithelium. LSR expression-deficient lines generated by the CRISPR-Cas9 system had significantly reduced various tumor malignant potentials compared to control cell lines. Comparative proteomic analysis detected several gene ontology (GO) terms related to cell adhesion. In addition, LSR expression analysis of multiple breast cancer cell lines confirmed that LSR expression was increased by treatment with a couple of drugs.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：LSR タイト結合 細胞接着 がん代謝 子宮頸がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (以下、LSR) は、遊離脂肪酸により機能する超低密度リポタンパク質 (VLDL) 受容体として同定され、当初は脂質代謝異常症などでの機能が研究されていた。2011 年になり、この LSR が細胞間接着装置の一つであるタイト結合に局在するタンパク質として再発見されたことを契機に、LSR は代謝関連分子としてだけでなく、タイト結合関連タンパク質としても注目されるようになった。

申請者らは、正常組織と比べがんで異常高発現するタイト結合タンパク質に注目して研究を行ってきた。claudin-1 (子宮頸がん, Neoplasia 2018)、claudin-18 (胆道がん, Cancer Lett. 2017, Virchows Arch. 2015)、tricellulin (膵がん, Sci. Rep. 2016)、JAM-A (肺腺がん, Cancer Sci. 2017; 子宮頸がん, Histol. Histopathol. 2015) 等の高発現ががん診断マーカーになり得ること、さらに、細胞生物学的手法により、これらの分子ががん悪性化に関与することを明らかにした。最近、申請者は、がんにおけるタイト結合関連タンパク質の発現解析の過程で、LSR が子宮頸がん及び乳がん組織で高発現していることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍領域で異所性に高発現する LSR が、がん悪性化においてどのような役割を果たしているのかを明らかにすることを目的とする。特に、LSR が脂質代謝と細胞間接着という二つの細胞機能に関与するという特性に着目して、がん代謝リプログラミングと細胞間接着における LSR の役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

A. LSR 発現の免疫組織学的解析

子宮頸部腺がん・乳がん手術材料病理標本を用いて、抗 LSR 抗体による免疫組織化学を施行し、LSR の発現態度を評価する。得られた染色スコアと臨床病理学的因子との相関について解析し、Kaplan-Meier 法により生存曲線を作成して LSR 高発現群と低発現群の予後解析を行う。

B. LSR 発現欠損細胞株 (LSR KO 株) の作製と細胞生物学解析

LSR を高発現する細胞株について、CRISPR-Cas9 システムを用いて LSR KO 株を作製する。得られた LSR KO 株と野生株の表現型を比較するため、増殖能・遊走能・浸潤能・造腫瘍能等の腫瘍悪性形質の評価、細胞形態の観察、タイト結合関連機能解析等を実施する。

C. LSR KO 株と野生株の比較マルチオミクス解析

LSR KO 株と野生株の表現型の差異の背景となる分子機構を明らかにするため、比較マルチオミクス解析を実施する。

4. 研究成果

A. がんにおける LSR 発現の亢進

子宮頸部腺がんの外科切除材料の免疫組織化学を実施したところ、腫瘍領域が高頻度で抗 LSR 抗体陽性となった。各症例について、染色強度及び陽性領域の面積を評価し、それらの値を乗算して得られる染色スコアを比較したところ、隣接する非腫瘍領域のスコアに対して、腫瘍領域の染色スコアは有意に高かった。一方、染色スコアと臨床病理学的因子との間には有意な相関は認められず、Kaplan-Meier 法により得られた生存曲線解析において LSR 発現と予後には有意な相関は認めなかった。また、乳がん手術材料を用いた抗 LSR 抗体による免疫組織化学的検討では、非腫瘍性上皮と比較してがん組織で LSR の発現態度に有意な差を認めており、現在解析を進めている。

B. LSR-KO 株の作製と解析

複数の子宮頸部腺がん細胞株からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット解析を実施したところ、検討した全ての細胞株において LSR 発現を確認した。複数の細胞株を用いて、CRISPR-Cas9 システムにより LSR-KO 株の樹立を試行した結果、高分化型腺がん由来細胞株において LSR KO 株の樹立に成功した(図 1 A)。位相差顕微鏡を用いて KO 株を観察したところ、野生型株とは異なり紡錘状の細胞形態に変化していた。また、野生型株及び KO 株を用いて、腫瘍悪性形質について比較したところ、KO 株では細胞増殖能・遊走能・浸潤能のいずれも野生型株に比べて有意に低下しており(図 1 B、C)、LSR 発現が腫瘍悪性形質に寄与することが示された。乳がん細胞株についても LSR KO 株を樹立しており、現在解析を進めている。

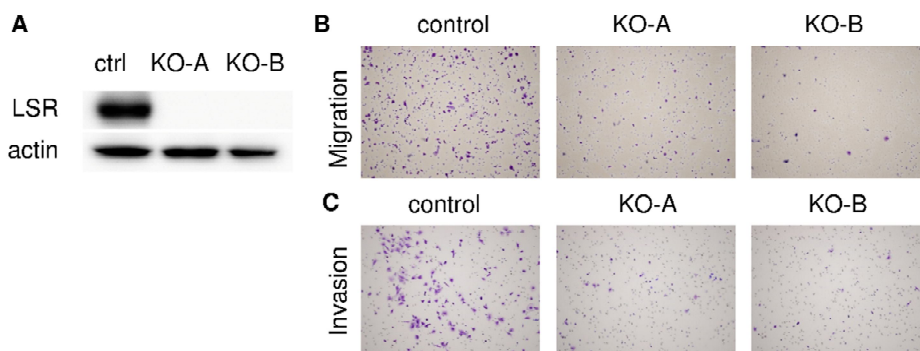


図 1 CRISPR-cas9 システムを用いて樹立した LSR 発現欠損子宮頸部腺がん細胞株(LSR-KO 株、A)では、遊走能(B)および浸潤能(C)が顕著に低下していた。これらの結果は、LSR 発現が腫瘍悪性形質に寄与することを示している。

C. 比較マルチオミクス解析

野生型株及び KO 株からタンパク質を抽出後、トリプシン消化によりペプチドサンプルを調製し、質量分析計を用いたプロテオーム解析を実施したところ、3000 個程度のタンパク質を同定した。野生型株との比較プロテオーム解析にて KO-A 株及び KO-B 株に共通し

で有意に発現低下しているタンパク質 114 個について遺伝子オントロジー(GO)・パスウェイエンリッチメント解析を実施したところ、21 個の GO term/pathway term がエンリッチされていた。見出された term には、細胞間接着に関連する GO term が複数検出されており、特異的抗体を用いたウエスタンブロット法でもタンパク質レベルでの発現低下を複数確認している。また、野生型株及び KO 株から mRNA サンプルを調製し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析を実施したところ、KO-A 株及び KO-B 株に共通して mRNA レベルで有意に発現低下している遺伝子が 535 個同定された。野生型株との比較解析にて KO 株で有意に発現変化している mRNA について遺伝子オントロジー(GO)エンリッチメント解析を実施したところ、23 個の GO term/pathway term がエンリッチされていた。トランスクリプトーム解析においても GO 解析で細胞間接着に関連する GO term がエンリッチされていた。さらに細胞生物学的な手法を用いて検証するため、ライブセルイメージング法を用いて野生型株と KO 株を経時的に観察したところ、LSR 発現が細胞接着機能に影響を及ぼす兆候を認めた。現在、さらにリピドーム解析の結果を併せて解析しており、以上の結果をまとめたものを投稿準備中である。

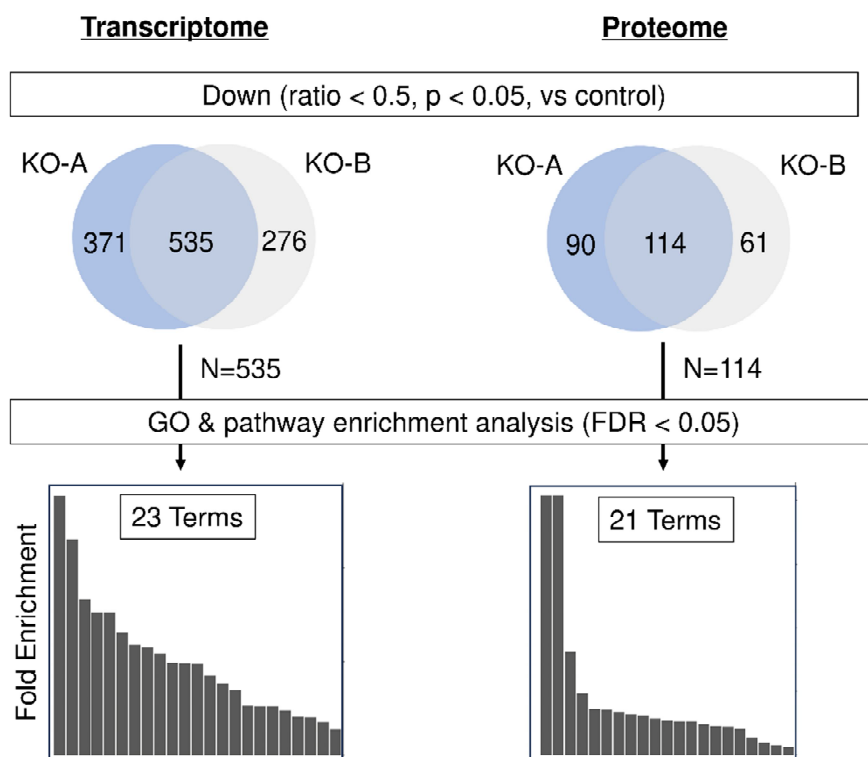


図2 マルチオミクス解析を用いた LSR-KO 株の特徴の探索.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takasawa Kumi, Takasawa Akira, Akimoto Taishi, Magara Kazufumi, Aoyama Tomoyuki, Kitajima Hiroshi, Murakami Taro, Ono Yusuke, Kyuno Daisuke, Suzuki Hiromu, Osanai Makoto	4. 巻 565
2. 論文標題 Regulatory roles of claudin-1 in cell adhesion and microvilli formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 36 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.070	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 Ito Yui, Takasawa Akira, Takasawa Kumi, Murakami Taro, Akimoto Taishi, Kyuno Daisuke, Kawata Yuka, Shano Kodai, Kirisawa Kurara, Ota Misaki, Aoyama Tomoyuki, Murata Masaki, Sugimoto Kotaro, Chiba Hideki, Saito Tsuyoshi, Osanai Makoto	4. 巻 113
2. 論文標題 Aberrant expression of claudin 6 contributes to malignant potentials and drug resistance of cervical adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1519 ~ 1530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15284	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 Kyuno Daisuke, Takasawa Akira, Takasawa Kumi, Ono Yusuke, Aoyama Tomoyuki, Magara Kazufumi, Nakamori Yuna, Takemasa Ichiro, Osanai Makoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Claudin-18.2 as a therapeutic target in cancers: cumulative findings from basic research and clinical trials	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tissue Barriers	6. 最初と最後の頁 1967080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21688370.2021.1967080	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 Murakami Taro, Takasawa Akira, Moriki Asako, Igaki Yusuke, Ikeda Hiroshi, Murase Kazuyuki, Takada Kohichi, Magara Kazufumi, Aoyama Tomoyuki, Ono Yusuke, Kyuno Daisuke, Takasawa Kumi, Murata Masaki, Osanai Makoto	4. 巻 479
2. 論文標題 A systemic apolipoprotein A-IV-associated amyloidosis confirmed by proteome analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 1041 ~ 1046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-021-03073-x	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 Saito Yuki, Takasawa Akira, Takasawa Kumi, Aoyama Tomoyuki, Akimoto Taishi, Ota Misaki, Magara Kazufumi, Murata Masaki, Hirohashi Yoshihiko, Hasegawa Tadashi, Sawada Norimasa, Saito Tsuyoshi, Osanai Makoto	4. 巻 111
2. 論文標題 Aldolase A promotes epithelial mesenchymal transition to increase malignant potentials of cervical adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3071 ~ 3081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14524	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 Murakami Taro, Takasawa Akira, Takasawa Kumi, Akimoto Taishi, Aoyama Tomoyuki, Magara Kazufumi, Saito Yuki, Ota Misaki, Kyuno Daisuke, Yamamoto Soh, Hasegawa Tadashi, Saito Tsuyoshi, Osanai Makoto	4. 巻 112
2. 論文標題 Aberrant expression of junctional adhesion molecule A contributes to the malignancy of cervical adenocarcinoma by interaction with poliovirus receptor/CD155	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 906 ~ 917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14734	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 Akimoto Taishi, Takasawa Akira, Takasawa Kumi, Aoyama Tomoyuki, Matsuura Motoki, Tamate Masato, Iwasaki Masahiro, Habata Shutaro, Murakami Taro, Osanai Makoto, Saito Tsuyoshi	4. 巻 55
2. 論文標題 Pathological classification of desmoplastic reaction is prognostic factor in cervical adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 275 ~ 282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-022-00329-6	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 Soini Ylermi, Pirinen Risto, Takasawa Kumi, Osanai Makoto, Takasawa Akira	4. 巻 73
2. 論文標題 Claudin 6 is associated with a short survival and a short recurrent free interval in non-small cell lung carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Polish Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5114/pjp.2022.117171	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 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kumi Takasawa, Akira Takasawa, Taishi Akimoto, Kazufumi Magara, Tomoyuki Aoyama, Yusuke Ono, Daisuke Kyuno, Makoto Osanai.
2. 発表標題 Roles of claudin-1 in cell adhesion and microvilli formation of cervical adenocarcinoma cells
3. 学会等名 The 39th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira Takasawa, Yuki Saito, Kumi Takasawa, Taishi Akimoto, Kazufumi Magara, Tomoyuki Aoyama, Yusuke Ono, Daisuke Kyuno, Yoshihiko Hirohashi, Tsuyoshi Saito, Makoto Osanai.
2. 発表標題 Abberant high expression of ALDOA contributes to the malignant transformation of uterine cervical adenocarcinoma
3. 学会等名 The 39th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kurara Kirisawa, Akira Takasawa, Yui Ito, Kodai Syano, Yusuke Ono, Tomoyuki Aoyama, Kumi Takasawa, Makoto Osanai
2. 発表標題 乳癌におけるALDOA発現とその病理学的意義
3. 学会等名 第67回 日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kodai Syano, Akira Takasawa, Yui Ito, Kurara Kirisawa, Tomoyuki Aoyama, Yusuke Ono, Kumi Takasawa, Daisuke Kyuno, Makoto Osanai
2. 発表標題 悪性神経鞘腫のFFPE組織標本を用いた新規バイオマーカー探索の試み
3. 学会等名 第67回 日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yui Ito, Akira Takasawa, Kurara Kirisawa, Kodai Syano, Tomoyuki Aoyama, Yusuke Ono, Kumi Takasawa, Makoto Osanai
2. 発表標題 子宮頸部腺癌におけるclaudin-6発現とその意義
3. 学会等名 第67回 日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kumi Takasawa, Akira Takasawa, Tomoyuki Aoyama, Hiroshi Kitajima, Daisuke Kyuno, Yusuke Ono, Makoto Osanai
2. 発表標題 Role of claudin-1 in tight junction-associated function in cervical adenocarcinoma cells
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akira Takasawa, Kumi Takasawa, Daisuke Kyuno, Makoto Osanai
2. 発表標題 Aberrant expression of ALDOA contributes to malignant potentials of uterine cervical adenocarcinoma
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 Akira Takasawa, Kumi Takasawa, Tomoyuki Aoyama, Taro Murakami, Kazufumi Magara, Yusuke Ono, Daisuke Kyuno, Makoto Osanai
2. 発表標題 Regulatory roles of claudin-1 in cell adhesion and microvilli formation
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akira Takasawa, Kumi Takasawa, Tomoyuki Aoyama, Taro Murakami, Kazufumi Magara, Yusuke Ono, Daisuke Kyuno, Makoto Osanai
2. 発表標題 細胞接着と微絨毛形成におけるタイト結合蛋白質claudin-1の役割
3. 学会等名 第54回 日本臨床分子形態学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akira Takasawa, Taishi Akimoto, Kumi Takasawa, Daisuke Kyuno, Makoto Osanai
2. 発表標題 Abberant expression of claudin-6 contributes to malignant potentials and drug resistance of cervical adenocarcinoma
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022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
---------	---------