

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09484

研究課題名（和文）卵巣明細胞腺がんにて発現するICAM-1：アポトーシス抑制機構を含む全容の解明

研究課題名（英文）ICAM-1 expressed in ovarian clear cell carcinoma: Elucidation of full aspects including apoptosis resistance mechanism

研究代表者

小井詰 史朗 (Koizume, Shiro)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・その他部局等・副技官・主任研究員

研究者番号：60416063

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）：プロフィラグリンは表皮角質層形成過程におけるアポトーシス抑制とバリア機能に重要なタンパク質である。本研究は虚血性環境に暴露された卵巣明細胞癌細胞がICAM-1依存的にアポトーシス抑制機構を獲得する際のフィラグリンの役割について解明することを目的とする。質量分析によりICAM-1依存的に卵巣明細胞癌細胞におけるフィラグリンの分解が抑制されることが分かった。実際、*in vitro*実験によりフィラグリンの発現をRNA干渉法により抑制すると虚血環境における細胞の生存能が減弱することが示された。動物実験においても同様の効果が認められ、フィラグリン発現のノックダウンにより腫瘍サイズの減弱が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では卵巣癌の進行に関係する可能性があるICAM-1と呼ばれるタンパク質に関する研究を行いました。ICAM-1はフィラグリンと呼ばれるタンパク質を介してその機能を担うことが分かってきました。今回の研究でフィラグリンは腫瘍の増殖に重要な役割を果たす可能性が見出されました。このフィラグリンの作用機序を明らかにすることにより将来難治性である卵巣明細胞癌の治療法の開発に繋がる可能性があります。

研究成果の概要（英文）：Filaggrin protein plays key roles in dermal barrier function and apoptosis process in granulocytes. Objective of this study is to elucidate roles of filaggrin in apoptosis resistance mechanism of ovarian clear cell carcinoma (CCC) cells exposed to serum starvation and hypoxia (SSH) condition. Mass spectrometry analysis revealed that ICAM-1 blocks degradation of pro-filaggrin to filaggrin monomer under SSH. Indeed, silencing of filaggrin expression by RNA interference methodology decreased viability of CCC cells cultured under SSH condition. We also found by xenograft experiments that growth of CCC tumor was inhibited by RNA interference-mediated knockdown of filaggrin expression. Thus, it was found that effect of filaggrin on CCC cell viability *in vitro* is true *in vivo*.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：卵巣癌 ハイポキシア アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣明細胞癌 (CCC) は、日本を含むアジア諸国において多発する卵巣がんの組織型である。化学療法に抵抗性を示すなど難治性として知られ、本がん腫の治療成績向上のため新規診断、治療法の開発が求められる。一方、固形腫瘍は概して血管形成不全に基づき低酸素環境に暴露される傾向にある。これまでに小分子化合物を利用した低酸素環境標的治療法が考案され臨床試験されてきたが、実臨床上使用されるまでの成功には至っていない。申請者は、がん細胞の詳細な低酸素環境適応機構のさらなる解明が必要と考え、腫瘍環境を模した酸素と血清成分が不足した虚血環境に暴露された CCC 細胞の研究を行ってきた。その結果、虚血環境において強度に発現する ICAM-1 タンパク質を見出し、その明細胞腺がん組織における発現と患者予後との関連や腫瘍進展効果、発現誘導の分子機構の解明について良好な研究成果を得た。本研究の他に国内外で虚血環境に着目した研究報告はなく、今後 CCC をはじめ低酸素環境を標的としたがんの診断、治療法の開発研究にあらたな切り口を与え得ると考えた。

2. 研究の目的

本研究ではさらに内容を発展させ、ICAM-1 の腫瘍進展促進メカニズムの解明と ICAM-1 標的診断、治療法の有望性について臨床検体解析や動物実験により検討することを目的とした。

申請者は、以前虚血環境に暴露された CCC 細胞における ICAM-1 のアポトーシス抑制機構について ICAM-1 発現ノックダウン細胞を用いた cDNA マイクロアレイやリン酸化ペプチドの質量分析などにより検討した。その結果、表皮角質層形成の際、顆粒層における顆粒細胞のアポトーシスの制御に関連すると共に皮膚バリア機能を担うタンパク質であるプロフィラグリン (以下 FLG) の脱リン酸化に続く FLG モノマーの生成が ICAM-1 の下流の事象であることを見出した。本研究では主に虚血環境に暴露された CCC 細胞におけるアポトーシス抑制における FLG の役割の解明を目指した検討を行った。

3. 研究の方法

(1) FLG発現抑制CCC細胞の樹立

申請者は、CCC 細胞株の OVISSE について RNA 干渉により ICAM-1 発現を抑制させた細胞株とその陰性コントロール細胞を樹立した。虚血環境にて培養したこれらの細胞についてリン酸化ペプチドの網羅的質量分析を行い ICAM-1 依存的にリン酸化が亢進するタンパク質として FLG を見出した。一過性の RNA 干渉により ICAM-1 発現を抑制すると FLG の脱リン酸化、分解を伴って虚血環境における OVISSE 細胞の生存が減弱することを既に確認している。本実験では、主に CCC 腫瘍増殖 (in vivo) における FLG の効果を検証するためにレンチウイルスベクターを利用し RNA 干渉法により FLG 発現を恒常的に抑制した CCC 細胞株とそのコントロール細胞株の樹立を試みた。実験には、申請者がこれまでに ICAM-1 の虚血環境における相乗的発現を確認済みで、免疫不全マウスへの腫瘍の生着が良好な OVISSE, TOV21G 細胞を用いた。

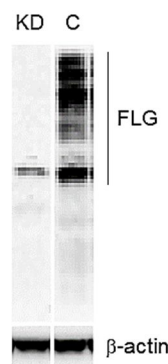


図1 FLGノックダウンOVISSE細胞 (KD) とそのコントロール細胞 (C) のウエスタンブロット解析

(2) CCC 腫瘍増殖における FLG の効果の検討

1 で作成した FLG ノックダウン細胞とそのコントロール細胞について免疫不全マウスの皮下に移植し、腫瘍の増殖における FLG 発現の効果を検討した。

(3) 質量分析による ICAM-1 依存性アポトーシス抑制機構における FLG の役割の検討

FLG は前駆体であるプロ FLG ポリマーとして皮膚顆粒層細胞に存在し、その脱リン酸化を引き金としてアポトーシスを伴って FLG モノマーとなる。FLG モノマーはケラチンを凝集させるなどして皮膚のバリア機能に与かる。この過程におけるアポトーシスにはカスパーゼ 14(Casp14) が関与することが知られている。本研究では、網羅的質量分析のデータを精査することにより ICAM-1 によるアポトーシス抑制に表皮角層形成における生理的アポトーシス制御機構がどのように関与するか検討した。

(4) FLG 重合体の分解における ICAM-1 の効果の検討

FLG は顆粒細胞において高度にリン酸化を受けたポリマーとして存在し、アポトーシスの際に脱リン酸化を受けて分解される。以前、虚血環境に暴露された OVISE 細胞においてこの現象を確認しているが、TOV21G 細胞でも同様の効果が見られるか検討した。

(5) ICAM-1 依存性アポトーシス抑制機構における FLG の効果の検討

CCC (OVISE, TOV21G)細胞について FLG 発現を RNA 干渉法により抑制し、その虚血環境や正常酸素濃度培養下における細胞の生存能における FLG 発現の効果を検討した。また FLG 発現抑制の代わりに ICAM-1 とその受容体との結合の小分子阻害剤である lifitegrast を用いても同様の実験を行った。すなわち ICAM-1-FLG 経路の抑制により腫瘍の進展が抑制されるか検討した。

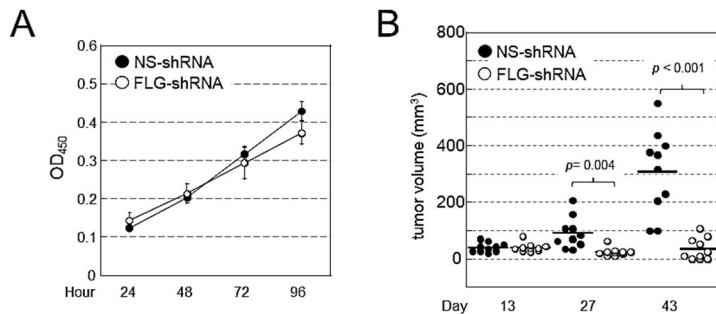


図2 OVISE細胞のin vitro増殖(血清有り、正常酸素条件)におけるFLG発現の効果(A)とNOD-SCIDマウス皮下移植OVISE腫瘍増殖におけるFLG発現の効果(B)

4. 研究成果

CCC 細胞について FLG 発現を抑制した細胞株およびそのコントロール細胞の樹立に成功した(図 1)。これらの細胞について増殖能を比較したところ in vitro では大きな差はなかったが(図 2 A) 免疫不全マウスの皮下に移植し腫瘍増殖における効果を観察したところ、FLG 発現の減弱と相まって腫瘍の増殖が著しく阻害されることが分かった(図 2 B)。また in vitro 実験においては ICAM-1 のノックダウンと同様に OVISE, TOV21G 両細胞において FLG のノックダウン(FLG-si)によっても虚血環境(Serum Starvation and Hypoxia, SSH)に暴露された細胞の生存能の減弱がコントロール細胞(NS-si)に比べて認められた(図 3)。正常酸素環境(Serum Starvation and Normoxia, SSN)ではそのような変化は認められなかった(図 3)。小分子阻害剤を用いた実験においても同様の効果が認められ

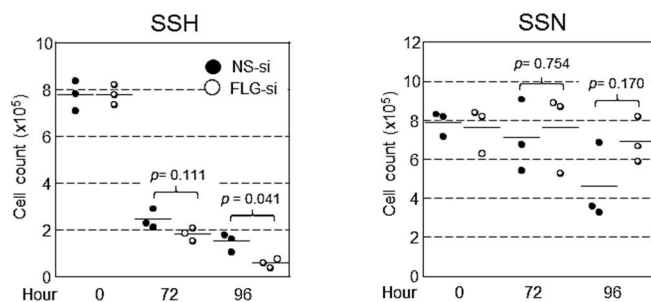


図3 無血清環境下で培養されたOVISE細胞の生存能におけるFLG発現抑制の効果

た。質量分析結果の精査により FLG の他に皮膚角質層の形成に重要である sciellin やアポトーシス抑制性タンパク質のリン酸化が ICAM-1 依存的に亢進していることが認められた。また、TOV21G 細胞においても虚血環境における ICAM-1 のノックダウンにより FLG 分解産物とみられるタンパク質の発現が確認されたことから (図 4) ICAM-1 が FLG 重合体の安定化に寄与し、細胞の生存能を増強させていることが示唆された。今後、臨床検体を用いた解析やさらなる詳細なメカニズムを解析することにより ICAM-1-FLG 経路を標的としたがん治療法の開発に繋がる可能性がある。

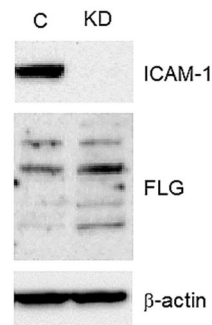


図 4 ICAM-1 ノックダウン (KD) TOV21G細胞とそのコントロール細胞 (C) のウエスタンブロット解析

【本研究の国内外における位置づけとインパクト、展望】

本研究の他に国内外で虚血環境に着目した研究報告はなく、今後CCCをはじめ低酸素環境を標的としたがんの診断、治療法の開発研究にあらたな切り口を与え得ると考える。虚血環境においてもたらされるCCC細胞のアポトーシス耐性にICAM-1が関与することを明らかにしたが、意外にもそのメカニズムに表皮形成過程にて誘導されるFLG脱リン酸化依存性アポトーシス制御機構が含まれていた。FLGはその遺伝子異常が皮膚のバリア機能に異常をきたし、アトピー性皮膚炎等の原因となることが知られている。がん細胞のアポトーシス制御におけるFLGの関与についてはこれまでに報告がなく、本メカニズムの解明が、がん細胞生存制御のより詳細な理解に繋がると期待される。今後、ICAM-1-FLG経路が卵巣明細胞癌、延いては他のがん種の治療標的として有用か解明するためにさらに研究を進展させていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koizume S, Takahashi T, Miyagi Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Lipid droplets: A candidate new research field for epithelial ovarian cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Front Pharmacol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Koizume S, Miyagi Y	4. 巻 127
2. 論文標題 Tissue factor in cancer-associated thromboembolism: possible mechanisms and clinical applications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Br J Cancer	6. 最初と最後の頁 2099-2107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-022-01968-3	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 Koizume S, Kanayama T, Kimura Y, Hirano H, Takahashi T, Ota Y, Miyazaki K, Yoshihara M, Nakamura Y, Yokose T, Kato H, Takenaka K, Sato S, Tadokoro H, Miyagi E, Miyagi Y.	4. 巻 0
2. 論文標題 Cancer cell-derived CD69 induced under lipid and oxygen starvation promotes ovarian cancer progression through fibronectin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15774	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 Koizume S, Takahashi T, Nakamura Y, Yoshihara M, Ota Y, Sato S, Tadokoro H, Yokose T, Kato H, Miyagi E, Miyagi Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Lipophagy-ICAM-1 pathway associated with fatty acid and oxygen deficiencies is involved in poor prognoses of ovarian clear cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Br J Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-022-01808-4	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 Koizume S, Kobayashi S, Ruf W, Miyagi Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Authors' reply to the Letter to the Editor: Tissue factor and its procoagulant activity on cancer-associated thromboembolism in pancreatic cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15324	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 該当する

1. 著者名 Kobayashi S, Koizume S, Takahashi T, Ueno M, Oishi R, Nagashima S, Sano Y, Fukushima T, Tezuka S, Morimoto M, Nakamura S, Narimatsu H, Ruf W, Miyagi Y	4. 巻 112
2. 論文標題 Tissue factor and its procoagulant activity on cancer-associated thromboembolism in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 4679-4691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15106	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 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小井詰史朗、中村圭靖、吉原光代、宮城悦子、宮城洋平
2. 発表標題 酸素、長鎖脂肪酸供給欠乏により誘起される卵巣明細胞がん細胞の悪性形質
3. 学会等名 第82回日本癌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田所弘子、太田幸秀、小井詰史朗、吉原光代、佐藤慎哉、吉原 光代、中村 圭靖、宮城洋平
2. 発表標題 がん関連血栓症を含む深部静脈血栓症研究のための下大静脈低灌流による血栓形成マウスモデル
3. 学会等名 第82回日本癌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小井詰史朗、太田 幸秀、中村圭靖、吉原光代、佐藤慎哉、田所弘子、宮城悦子、宮城洋平
2. 発表標題 異所性CD69発現は不フィブロネクチン依存的に卵巣明細胞がん細胞の上皮間葉転換を促進させる
3. 学会等名 第 8 1 回日本癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田所弘子、小井詰史朗、吉原光代、太田幸秀、佐藤慎哉、宮城洋平
2. 発表標題 卵巣明細胞癌細胞による組織因子陽性細胞外小胞の産生とその血液凝固活性
3. 学会等名 第 8 1 回日本癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小井詰史朗、宮城洋平
2. 発表標題 酸素、脂肪酸供給欠乏環境下で誘起されるリポファジー-ICAM-1経路は卵巣明細胞癌の予後不良性と相関する
3. 学会等名 第 1 8 回がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小井詰史朗、中村圭靖、吉原光代、太田幸秀、佐藤慎哉、田所弘子、宮城悦子、宮城洋平
2. 発表標題 リポファジー-ICAM-1経路は卵巣明細胞がんの予後不良性と相関する
3. 学会等名 第 8 0 回日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田所弘子、小井詰史朗、吉原光代、太田幸秀、佐藤慎哉、宮城洋平
2. 発表標題 卵巣明細胞がん細胞由来組織因子発現細胞外小胞の血液凝固能評価
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田幸秀、小井詰史朗、佐藤慎哉、田所弘子、星野大輔、中村圭靖、宮城悦子、宮城洋平
2. 発表標題 TFPI-2は接着斑の形成阻害により卵巣明細胞癌における細胞接着を抑制する
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
4. 発表年 2021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	宮城 洋平 (Miyagi Yohei) (00254194)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・臨床研究所・所長 (82713)	

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