

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430135

研究課題名(和文) ICAM-1を標的とした難治性卵巣癌の虚血環境標的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategy of poor prognostic ovarian cancer targeting ischemia-driven expression of ICAM-1

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・その他

研究者番号：60416063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素環境と低血清環境が共存する虚血環境下ICAM1タンパク質は卵巣明細胞癌(CCC)細胞において劇的に発現誘導を受ける。ICAM1が虚血環境下においてアポトーシスを抑制し、腫瘍の増殖を促進することを明らかにした。さらに血清中の長鎖脂肪酸の欠乏がICAM1遺伝子発現の要因であることを突きとめた。さらに網羅的解析を行ない、CCC細胞においてICAM1発現依存的に発現誘導される遺伝子群やフィラグリン等のICAM1発現依存的にリン酸化を受けるタンパク質群を見出した。実際ICAM1は卵巣癌組織で高発現しており、これらタンパク質群がICAM-1の抗アポトーシス機能に重要な役割を担っている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We found that ICAM-1 protein is strongly and synergistically induced in ovarian clear cell carcinoma (CCC) cells in response to serum starvation and hypoxia (SSH). We also found that ICAM1 contributes to CCC cell survival and CCC tumor growth by inhibiting apoptosis process. We identified long chain fatty acids as a major class of lipids that is associated with albumin, a serum factor responsible for synergistic gene activation under SSH. Furthermore, we comprehensively investigated how mRNA level and phosphorylation level of proteins in CCC cells can be altered in response to ICAM1 expression. We found that multiple proteins such as filaggrin can be phosphorylated in a ICAM1-dependent manner in CCC cells exposed to SSH condition. These results indicate that phosphorylation of these proteins may play crucial roles in anti-apoptotic function of ICAM1 in CCC cells under SSH condition.

研究分野：分子生物学

キーワード：ハイポキシア 卵巣癌

1. 研究開始当初の背景

近年、低酸素等癌の微小環境の重要性が明らかにされ、これを標的とした治療法が開発されているが、その有効性は不十分である。また、副作用面など克服すべき課題は多い。これらの問題を克服するために今後さらに詳細な癌の低酸素適応の分子機構の解明とそれに基づく新規治療法の開発が重要になると考えられた。また、卵巣癌は有効な早期診断マーカーの欠除、化学療法抵抗性などから予後不良癌として知られ、日本での罹患数は増加している。特に明細胞型卵巣癌は化学療法無効例が多い。明細胞型卵巣癌は日本人の卵巣癌患者のおよそ 20%に認められ、その新規治療法の開発は急務である。

2. 研究の目的

本計画では申請者がこれまでに見出した明細胞卵巣癌における虚血性環境下、転写因子 Sp1 依存的に誘導される ICAM1 遺伝子発現とその産物 ICAM-1 タンパク質による腫瘍増殖促進の詳細なメカニズムの解明を目指した。また、卵巣癌組織アレイを用いて ICAM-1 の癌治療標的としての有用性を免疫染色により解析した。

3. 研究の方法

主に明細胞型卵巣癌細胞株 OVSAYO を用いて血清中存在するが、無血清培地中には存在しない因子(ホルモン、成長因子、栄養素等)を推定し、虚血性環境下における相乗的 ICAM1 遺伝子発現の原因となる血清因子を RT-PCR やウエスタンブロット法により探索した。また、ICAM-1 特異的 shRNA または非特異的 shRNA を恒常的に発現させた細胞を用いて OVSAYO 細胞において ICAM-1 タンパク質発現依存的にリン酸化レベルが変化するタンパク質を液体クロマトグラフィー質量分析法により網羅的に解析した。さらに臨床検体における ICAM-1 発現を検討するために神奈川県立臨床研究・情報機構、腫瘍組織センターにて蓄積され、臨床情報が明らかな外科手術検体を用いて作成されたヒト卵巣癌組織アレイを用いて ICAM-1 免疫染色を行った。

4. 研究成果

これまでに cDNA マイクロアレイ解析を行ない、虚血環境下 Inter Cellular Adhesion Molecule-1 (ICAM1) をコードする ICAM1 遺伝子が卵巣明細胞癌 (CCC) 細胞において劇的に発現誘導を受けることを見出した。その後の研究により ICAM1 が低酸素環境と低血清環境が共存する虚血環境下においてアポトーシスを抑制し、CCC 細胞の生存を増強させることや ICAM1 が CCC 腫瘍の増殖を促進することを明らかにした。本研究では、この癌進展促進メカニズムを解明するためにさらに cDNA マイクロアレイ解析を行ない、低酸素、無血清環境下 CCC 細胞中において

ICAM1 発現依存的に発現が増加している遺伝子群を見出した。また虚血環境下において ICAM1 遺伝子発現を誘導する血清因子についても探索を行ない、アルブミンと結合して血清中に可溶化して存在する長鎖脂肪酸(オレイン酸等)の欠乏がその主原因であることを突きとめた。さらに ICAM1 発現と関連して変化する細胞内シグナルメカニズムを解明するために質量分析法により網羅的リン酸化ペプチド解析を行なった。具体的には CCC 細胞株である OVISE の非特異的 siRNA 発現細胞と ICAM-1 ノックダウン細胞について虚血環境下培養し、その細胞溶解液について液体クロマトグラフィー質量分析法により ICAM-1 依存的にリン酸化を受けるタンパク質群を探索した。その結果、興味深いことにフィラグリン等の表皮形成に重要な役割を担うタンパク質が ICAM1 依存的にリン酸化を受ける可能性が見出された。フィラグリンの脱リン酸化は表皮の形成過程において顆粒層細胞が角化細胞に変化する際に誘導されるアポトーシスにおける重要な事象である。従ってフィラグリンのリン酸化が ICAM-1 の抗アポトーシス機能に重要な役割を担っている可能性がある。実際ヒト卵巣癌組織アレイを用いた ICAM-1 免疫染色より正常コントロールに比べて癌組織における ICAM-1 強発現を認めており、今後さらなる解析により ICAM-1 発現の重臨床上の要性が明らかになると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

- 1) Potential coagulation factor-driven pro-inflammatory responses in ovarian cancer tissues associated with insufficient O₂ and plasma supply.

Koizume S, Miyagi Y. *Int J Mol Sci.* 査読有、18, 809, 2017.

doi: 10.3390/ijms18040809

- 2) Lipid droplets: A key cellular organelle associated with cancer cell survival under normoxia and hypoxia.

Koizume S, Miyagi Y. *Int J Mol Sci.* 査読有、17, 1430, 2016.

doi:10.3390/ijms17091430

- 3) A splicing mutation of proteolipid protein 1 in Pelizaeus-Merzbacher disease.

- Omata T, Nagai J, Shimbo H, Koizume S, Miyagi Y, Kurosawa K, Yamashita S, Osaka H, Inoue K. *Brain Dev.* 査読有、38, 581-584, 2016.
doi: 10.1016/j.braindev.2015.12.002.
- 4) Diverse mechanisms of Sp1-dependent transcriptional regulation potentially involved in the adaptive response of cancer cells to oxygen-deficient conditions.
Koizume S, Miyagi Y. *Cancers* 査読有、8, 2, 2016.
doi:10.3390/cancers8010002
- 5) High-level secretion of tissue factor-rich extracellular vesicles from ovarian cancer cells mediated by filamin-A and protease-activated receptors.
Koizume S, Ito S, Yoshioka Y, Kanayama T, Nakamura Y, Yoshihara M, Yamada R, Ochiya T, Ruf W, Miyagi E, Hirahara F, Miyagi Y. *Thromb. Haemost.* 査読有、115, 299-310, 2016.
doi: 10.1160/TH15-03-0213.
- 6) Tissue factor-factor VII complex as a key regulator of ovarian cancer phenotypes.
Koizume S, Miyagi Y. *Biomark Cancer*, 査読有、7(S1), 1-13, 2015.
doi: 10.4137/BIC.S29318.
- 7) Anti-apoptotic genes are synergistically activated in OVSAYO cells cultured under conditions of serum starvation and hypoxia. Koizume S, Miyagi Y. *Genom Data*, 査読無、5, 129-131, 2015.
doi: 10.1016/j.gdata.2015.05.029.
- 8) Suppressing the TF-fVII pathway at the gene expression level: A strategy to inhibit aberrant signalling cascades associated with cancer cells.
Koizume S, Miyagi Y. *Cancer Cell Microenviron.* 査読有、2, e734, 2015.
doi: 10.14800/ccm.734
- 9) Lipid starvation and hypoxia synergistically activates ICAM1 and multiple genes in an Sp1 dependent manner to promote the growth of ovarian cancer.
Koizume S, Ito S, Nakamura Y, Yoshihara M, Furuya M, Yamada R, Miyagi E, Hirahara F, Takano Y, Miyagi Y. *Mol Cancer* 査読有、14, 77, 2015.
doi: 10.1186/s12943-015-0351-z
- 10) Breast cancer phenotypes regulated by tissue factor-factor VII: possible therapeutic targets.
Koizume S, Miyagi Y. *World J Clin Oncol*, 査読有、5, 908-920, 2014.
doi: 10.5306/wjco.v5.i5.908

〔学会発表〕(計 8件)

1) 転写因子 SREBP-1 は虚血性環境における卵巣明細胞癌細胞による高凝固性細胞外小胞の生成に重要である

小井詰 史朗、中村 圭靖、吉原光代、宮城悦子、平原 史樹、宮城 洋平 第74回日本癌学会総会 2016年、10月 横浜

2) 明細胞卵巣癌細胞において虚血性環境下相乗的に発現誘導される CD69 は integrin を活性化させる

金山 知彦、小井詰 史朗、宮城 悦子、平原 史樹、宮崎 香、宮城 洋平 第74回日本癌学会総会 2015年、10月 名古屋

3) 卵巣明細胞癌細胞は組織因子陽性マイクロベジクルを高度に放出して血液凝固を促進させる

小井詰 史朗、中村 圭靖、吉原光代、宮城悦子、平原 史樹、宮城 洋平 第74回日本癌学会総会 2015年、10月 名古屋

4) Tissue-factor-coagulation factor VII complex: A potential key regulator of hypercoagulation in ovarian cancer patients

Koizume S, Nakamura Y, Yoshihara M, and Miyagi Y.

The 20th Japan-Korea Cancer Workshop
Nov.30-Dec.1, 2015 Tokyo, Japan

5) Synergistically activate the ICAM1 gene in an Sp1-dependent manner to promote

ovarian cancer cell growth
Koizume S, Nakamura Y, Yoshihara M, and Miyagi Y.
The 19th Japan-Korea Cancer Workshop
Nov. 28-30, 2014 Jeju, Korea

6) 虚血性環境下卵巣明細胞癌において誘発される相乗的遺伝子発現に関する血清因子

小井詰 史朗、宮城 洋平 12回がんとハイポキシア研究会 2014年、11月 佐賀

7) 明細胞卵巣癌細胞において虚血性環境下相乗的に発現誘導される CD69 は細胞運動能と浸潤能を促進する

金山 知彦、小井詰 史朗、宮城 洋平 第73回日本癌学会総会 2014年、9月 横浜

8) 脂質欠乏性ハイポキシアは Sp1 依存性遺伝子発現誘導を相乗的に増強させて卵巣腫瘍の増殖を促進する

小井詰 史朗、伊藤 慎、中村 圭靖、吉原光代、山田 六平、宮城 悦子、平原 史樹、宮城 洋平 第73回日本癌学会総会 2014年、9月 横浜

〔図書〕(計 1件)

Sp1

Koizume S, Miyagi Y. In “Encyclopedia of Signalling Molecules”, 2nd Ed., Springer, in press.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kcch.kanagawa-pho.jp/kccri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小井詰 史朗 (KOIZUME, Shiro)
神奈川県立がんセンター臨床研究所・主任
研究員

研究者番号：60416063

(2) 研究分担者

宮城 洋平 (MIYAGI, Yohei)
神奈川県立がんセンター臨床研究所・部長

研究者番号：00254194

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()