

平成21年 5月 1日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591929

研究課題名：子宮内膜癌において新たに同定された lipocalin 2 過剰発現の機能解析

研究課題名：Functional analysis of lipocalin 2 overexpression in endometrial carcinoma

研究代表者

塩沢 丹里 (SHIOZAWA TANRI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：20235493

研究成果の概要：子宮内膜癌の発生に關与する遺伝子変異を同定する目的で、正常および腫瘍性内膜組織に発現する遺伝子をマイクロアレイ解析で探索したところ、内膜癌で過剰発現している分子として従来鉄イオンの運搬に關与するとされている lipocalin 2 を同定した。今回の検討によって lipocalin 2 の過剰発現が内膜癌の増殖能と転移能の亢進に關与していることが新たに明らかとなり、lipocalin 2 が内膜癌に対する分子標的となりうる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮内膜癌、lipocalin 2、増殖

1. 研究開始当初の背景

近年我が国においては、子宮内膜癌の患者が急増しており、より深い生物学的性質の解明が待たれている。正常子宮内膜から前癌病変である子宮内膜増殖症を経て子宮内膜癌にいたる過程では、PTEN、K-ras、p53等の遺伝子の変異が蓄積されていることが報告されているが、このような既知の遺伝子の変異が判明している症例は全体の約半数にとどまるため、いまだに多くの未知の遺伝子異

常が存在すると考えられている。従って子宮内膜癌の新たな遺伝子変異を同定し、生物学的特性をさらに明らかにすることが課題となっている。

2. 研究の目的

子宮内膜の腫瘍化における遺伝子研究が難しい点は、内膜癌の発生母地である正常子宮内膜自体が腺上皮細胞と内膜間質細胞で構成され、内膜増殖症や高分化型内膜癌であ

っても腫瘍腺上皮細胞が比較的豊富な間質によって取り囲まれているという組織学的特性に由来する。したがって、これら前癌病変や初期癌の微小病変については、塊として採取した組織全体を用いて解析しても詳細な遺伝子変異の検討は不可能であり、このことが新規遺伝子の単離を妨げてきたと考えられる。すなわち、内膜癌初期発生に関わる遺伝子の同定には微細な病変部位だけを正確に採取しうる方法が必要である。今回我々はこの問題に対応するために、**laser captured microdissection (LCM)** 法を採用した。この方法は顕微鏡観察下にレーザーを用いて標的細胞のみを採取するもので、非常に組織特異性の高い細胞標本の採取が可能である。また、近年 DNA マイクロアレイ法により組織学的に異なる病変間の遺伝子発現の相違を網羅的に検出することが可能となった。さらに、遺伝子発現の差異をより特異的に検出するためには遺伝的背景の影響を受けないように同一患者から正常内膜腺上皮、増殖症腺上皮、腺癌上皮を採取することが求められる。以上より、本研究は内膜癌発生や進展に関わる遺伝子群の同定を LCM-マイクロアレイ解析により行うものである。

我々は同一症例中に正常と腫瘍性病変を同時に含む症例を 10 例集積し、その新鮮凍結切片から LCM 法で病変のみを正確に採取し、正常 vs. 増殖症、正常 vs. 内膜癌、および増殖症 vs. 内膜癌の間で発現量の変化している遺伝子をマイクロアレイ法により網羅的に解析したところ、全ての症例に共通して病変間で発現量の変化している遺伝子が合計 370 同定された。これらをさらに **Real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)** 法により検証中であるが、現在まで 30 遺伝子に組織特異的な発現が確認されている。これらのなかで、正常 vs.

内膜癌の間で発現量の差異が大きかった遺伝子の一つとして我々は **lipocalin 2** に注目した。**Lipocalin 2** は分子量約 26Kd の比較的小型の分泌蛋白で、従来までの報告では i) 様々な組織や上皮に発現し、また様々な **cytokine** や、エストロゲンを含むその他の因子によって誘導される、ii) 組織損傷部位において、炎症や組織再構築の **modulator** として働く、iii) 膵臓がん、乳がん、大腸直腸がん等の腫瘍で過剰発現を認める、iv) 鉄イオンの運搬に関与する、v) *in vitro* において、細胞増殖能や浸潤能を変化させる、等の報告がある。我々はまずこの **lipocalin 2** の子宮内膜組織における発現パターンをさらに明らかにするために、正常子宮内膜、子宮内膜増殖症、および子宮内膜癌における **lipocalin 2** の発現を免疫染色によって観察した。その結果興味深いことに従来は **lipocalin 2** は小型の分泌蛋白として主に細胞質に存在するといわれていたが、今回の検討では、細胞質に加えて核にも染色性が観察された。さらに組織型別にみると、正常内膜では増殖期に陽性染色が観察され、分泌期では発現が低下した。また増殖症、子宮内膜癌と病変が進行するに従い特に核における発現が増強していた。これらの免疫染色による結果は、LCM-マイクロアレイ解析の結果とよく一致するものであったが、子宮内膜癌における **lipocalin 2** 発現の意義は未だ不明である。今回の研究は種々の実験的アプローチを通して、子宮内膜組織における **lipocalin 2** 発現の意義を明らかにすること、さらには **lipocalin 2** が子宮内膜癌の新たな分子標的療法の対象となる可能性の有無について検討することとした。

3. 研究の方法

本研究では子宮内膜組織における **lipocalin 2** の意義を明らかにするために、具体的に以下の実験を施行する。

- (1) 子宮内膜組織における発現とその臨床病理学的意義の解明：我々は既に免疫染色によって lipocalin 2 が子宮内膜癌で過剰発現していることを確認しているが、この意義さらに明らかにするために、年齢、進行期、組織学的 grade などの臨床病理学的因子との相関性を検討し、さらに lipocalin 2 が予後因子であるかについて検討する。
- (2) lipocalin 2 の核内局在の検討：従来分泌蛋白として細胞質に存在するといわれていた lipocalin 2 が核内にも観察された。これを確認するために、培養正常子宮内膜上皮および内膜癌細胞における lipocalin 2 の発現を蛍光免疫組織学的に検討する。
- (3) lipocalin 2 の癌遺伝子としての機能解析：lipocalin 2 が内膜病変の進行に従って発現が増強したことから、lipocalin 2 が一種の癌遺伝子として作用している可能性がある。この可能性を検討するために、lipocalin 2 発現ベクターをマウス NIH3T3 細胞に導入し形質転換能を検討する。
- (4) 子宮内膜癌における発現増強の機序の解析：膀胱癌では lipocalin 2 遺伝子プロモーターの脱メチル化によって発現が増強することが報告されていることから、子宮内膜癌におけるこの可能性の検討のために、正常内膜および内膜癌のプロモーターのメチル化を検討する。
- (5) 子宮内膜癌細胞における lipocalin 2 の in vitro での機能解析：lipocalin 2 の機能を in vitro で解明するために、lipocalin 2 発現ベクター導入細胞を樹立し、増殖能、浸潤能などの変化を検討する。また lipocalin 2 の発現を siRNA あるいは short hairpin RNA を用いて

抑制し、同様に増殖能や浸潤能に対する影響を検討する。

4. 研究成果

(1) lipocalin 2 の内膜組織における発現

正常内膜(40例)、増殖症(10例)、内膜癌(67例)における lipocalin 2 の発現を免疫染色にて検討したところ、正常内膜増殖期、増殖症、内膜癌と病変が進行するに従って発現が増強していた。また、従来 lipocalin 2 は分泌型蛋白で細胞質に存在すると報告されていたが、今回の検討では核にも発現が観察されていた。

(2) lipocalin 2 の局在の in vitro での検討

各種の子宮内膜癌細胞株における lipocalin 2 の mRNA と蛋白質の発現を RT-PCR と Western blotting を用いて検討したところ、蛋白と mRNA の発現量はよく相関していたので、lipocalin 2 蛋白の発現量は主に mRNA レベルで調節されていることが判明した。これらの細胞株のうち、lipocalin 2 の発現が高かった Ishikawa 細胞と HHUA 細胞の細胞質分画と核分画の蛋白を抽出し、lipocalin 2 の発現を Western blotting にて観察したところ、両細胞とも核に発現が観察された。またこの結果は HHUA 細胞の蛍光免疫染色によっても確認された。

(3) lipocalin 2 の発現調節における lipocalin 2 遺伝子プロモーター領域のメチル化の関与

内膜癌における lipocalin 2 の発現増強の機序を検討するために、lipocalin 2 遺伝子プロモーター領域のメチル化の関与を検討した。各種の細胞株に脱メチル化剤である 5-aza-C を添加し、lipocalin 2 mRNA の発現を検討したところ、特に添加前に比較的 lipocalin 2 の発現の低かった Hec1A、Hec1B、KLE 細胞で添加後に発現が増加したことから、内膜癌では lipocalin 2 遺伝子プロモータ

一領域の脱メチル化によって lipocalin 2 の発現が亢進している可能性が示唆された。

(4) lipocalin 2の子宮内膜癌細胞の増殖能と浸潤能に対する作用

Hec1B 細胞に lipocalin 2 発現ベクターを導入しこの細胞を用いて WST-1 assay によって lipocalin 2 の増殖能に対する影響を検討したところ、lipocalin 2 強発現細胞(Hec1B LCN2-2)はコントロール細胞(Hec1B-pCEP4)と比較して増殖能が亢進していた。また lipocalin 2 の浸潤能に対する影響を Matrigel invasion assay を用いて検討したところ、lipocalin 2 の導入によって浸潤能が亢進していた。

これらの結果から、正常子宮内膜が癌化していく過程において、lipocalin 2 遺伝子の脱メチル化によって lipocalin 2 発現が増強し、これが内膜癌の細胞学的悪性度を高めているというメカニズムが存在することを新たに明らかにした。また、この結果は lipocalin 2 が子宮内膜癌の新たな分子標的になる可能性を示した。

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 2 件)

① Kashima H, Miyamoto T, Shiozawa T, et al.(他 5 名): Up-regulation of nuclear receptor corepressor (NCoR) by progestins is associated with growth suppression of endometrial neoplasia: Implication for the mechanism of progestin effect in the hormone-responsive neoplasia *Anti-Cancer Research*, 2009, in press (査読有)

② Kashima H, Shiozawa T, Miyamoto T, et al.(他 4 名): Autocrine stimulation of IGF1 in estrogen-induced growth of endometrial carcinoma cells: involvement of th

e mitogen-activated protein kinase pathway followed by up-regulation of cyclin D1 and cyclin E. *Endocrine Related Cancer* 16(1), 113-122, 2009 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

① 宮本 強、塩沢丹里、他子宮内膜癌化に関わる遺伝子の検索の試み: Lipocalin 2 の発現と機能第 40 回臨床分子形態学会 2008 年 10 月 4 日 福岡

② 宮本強、ほか子宮内膜癌化に関わる遺伝子の検索の試み: Lipocalin 2 の発現と機能第 6 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会 2007 年 7 月 21 日 熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩沢 丹里 (SHIOZAWA TANRI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号: 20235493

(2) 研究分担者

宮本 強 (MIYAMOTO TSUTOMU)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 70417821

小西 郁生 (IKUO KONISHI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号: 90192062