

平成30年6月7日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14637

研究課題名(和文) 卵巣癌幹細胞におけるLSRの機能解析と癌再発を克服する画期的治療法の開発

研究課題名(英文) Functional analysis of LSR and development of innovative therapy for ovarian cancer stem cells.

研究代表者

仲 哲治 (NAKA, TETSUJI)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：30303936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR)はリポタンパク質受容体であるが、癌における役割は不明な点が多い。本研究ではLSRが低グルコースなどの環境下において、リポタンパク質による細胞の増殖・生存に関わることをin vitroで明らかにした。さらに、VLDLの細胞内取り込みとそれに続く脂質代謝を、独自に開発したLSRの機能阻害抗体が阻害し、抗腫瘍効果を発揮することを卵巣癌PDXマウスを用いた実験で証明した。また、抗体投与後に腫瘍組織の癌幹細胞マーカーの発現が減弱することから、抗LSR抗体は癌幹細胞へ抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Principal investigator's (PI) group identified Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) as a new therapeutic target of ovarian cancer. LSR is one of the receptor of lipoprotein and located at cell surface, however, the function of LSR in cancer is still unclear. In this research, PI's group demonstrated that in low glucose environment, LSR promoted lipoprotein uptake and contributed to cell proliferation/viability in vitro. Moreover, PI's group also demonstrated that their newly developed anti-LSR monoclonal antibody inhibited these processes and showed anti-tumor effect in vitro and in vivo. In addition, the expression of CD44 which is one of the cancer stem cell related marker was decreased after administration of anti-LSR monoclonal antibody in vivo, suggesting that anti-LSR monoclonal antibody showed anti-tumor effect against cancer stem cell.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：卵巣癌 癌幹細胞 LSR

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は死亡リスクが 70%と致死率の高い癌であり、本邦でも毎年新たに約 8,000 人が診断され、4,000 人が死亡する婦人科悪性腫瘍で、近年増加傾向にある。卵巣癌は早期には無症状であることが多く、70%以上の患者が III 期以上の進行癌として診断される。特に、抗癌剤耐性の獲得や腹膜播種などによる再発が生じることと、これらに対する有効な治療法が確立されていないことから、III 期の 5 年生存率は 30%と低い。従って、患者の予後を改善させるにはこれらの問題を解決するような新規治療法の開発が急務である。

研究代表者等は卵巣癌の新規治療法の開発を目的とし、プロテオミクス手法を用いて卵巣癌の新規癌抗原を探索した結果、Lipolysis-stimulated receptor (LSR) を同定した。LSR は肝臓でリポタンパク質のクリアランスに働く分子であるが、LSR を介した癌と脂質との関係は十分に解析されていない。研究代表者等は LSR を高発現する卵巣癌患者群は低発現群より予後不良であることを明らかにしているが、これは LSR 高発現患者群では化学療法抵抗性を示すためではないかと考えた。抗癌剤抵抗性の要因の 1 つとして、癌幹細胞の存在が示唆されている。本研究では卵巣癌における LSR の機能解析と、新規治療法として抗体療法の開発を検討した。

2. 研究の目的

本研究の目的は研究代表者らが同定した LSR に着目し、卵巣癌における LSR の機能解析と、独自に開発した LSR 阻害モノクローナル抗体を用いた新規治療法の有用性を、動物モデルを用いて評価することとした。

3. 研究の方法

(1) FACS による LSR 発現の確認

卵巣癌細胞株として、OVCAR3, OV90, SW626, RMG-I, KURAMOCHI, OVISe を用いた。OVCAR3 は RCB より、OV90, SW626 は ATCC より、RMG-I, KURAMOCHI, OVISe は JCRB より入手した。

100mm dish に撒いた細胞は 90%コンフルエントに達した時点で PBS (Nacalai Tesque) で 2 回洗浄し、0.02% EDTA solution (Nacalai Tesque) で dish よりはがした。細胞を FACS staining buffer (PBS supplemented with 1% FBS and 0.1% sodium azide) で 2 回洗浄し、抗 LSR モノクローナル抗体で染色し、続いて 100 倍希釈した Goat Anti-Mouse IgG (H+L chain specific) (southernbiotech 社) で染色した。染色した細胞は FACS Canto II cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) で測定し、FlowJo software (Tree Star, Stanford, CA, USA) を用いてデータ解析した。

(2) VLDL を用いた細胞増殖・生存アッセイ

96 ウェルプレート (Corning 社) を用いて実施した。細胞を 10% FBS 含有培地で 1,000 cells/well (100 μ l/well) で播種し、24h 後にグルコース不含、FBS 不含、VLDL 添加培地に変更し、48 時間、37 度、5%CO₂ インキュベーターで培養した。生細胞数測定試薬 SF 試薬 (ナカライテスク) を用いて細胞増殖を評価した。

(3) 卵巣癌 PDX マウス作成

インフォームドコンセントに同意を得た卵巣癌患者から卵巣癌の手術により得られた腫瘍組織を超免疫不全マウス (NOG マウス) 皮下に移植し、腫瘍の正着を試みた。腫瘍正着後、F0 から F1 に継代した。継代時の腫瘍組織中における LSR の発現は免疫組織化学染色法より解析した。

(4) 卵巣癌 PDX マウスに対する抗 LSR モノクローナル抗体の薬効解析

卵巣癌 PDX マウス (Ovx2, Ovx4, Ovx6) について、腫瘍体積が 100mm³ に達した時点でマウスを 2 群に分け、コントロール抗体投与群および抗 LSR モノクローナル抗体投与群とした。抗体は PBS で希釈し、200 μ g/400 μ l となるように調製し、週 2 回の頻度で合計 6 回投与した。腫瘍体積は週 2 回の頻度で計測した。腫瘍体積は長径 x 短径 x 短径 x 0.5 として計算した。

(5) 免疫組織化学染色法による発現解析

ホルマリン固定されたパラフィン包埋組織は卵巣癌 PDX マウスより調製した。抗体は抗 LSR 抗体 (CST, #14804)、抗 CD44 抗体 (BD Pharmingen, 550392) を用いた。

パラフィン包埋組織の薄切は脱パラフィン処理、アルコールによる脱水を行った。癌抗原に対する免疫組織化学染色は Dako REAL EnVision Detection System を用いた。

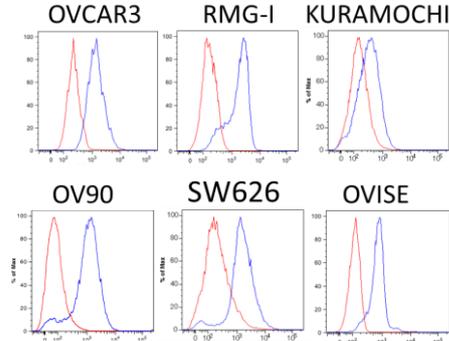
(6) 統計解析

Student's t test あるいは one way ANOVA Holm's POC hoc test を用いた。p < 0.05 を有意差有りとした。

4. 研究成果

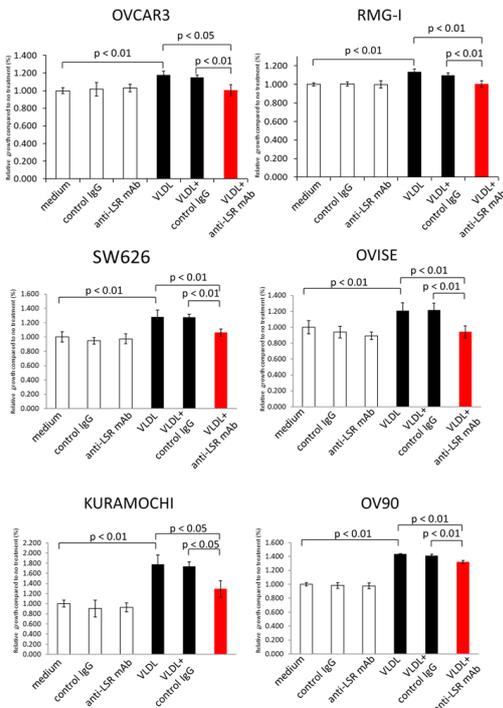
6種類の卵巣癌細胞株における LSR の発現を FACS 解析により解析した。その結果、LSR が6種類の卵巣癌細胞株において発現することを確認した(図1)。

図1 フローサイトメトリーによる卵巣癌細胞株における LSR の発現解析。



続いて、LSR による脂質を介した卵巣癌の増殖との関係を、細胞株を用いて *in vitro* で解明した。LSR 発現が陽性の卵巣癌細胞株である OVCAR3, RMG-I, KURAMOCHI, OV90, SW626, OVI5E 細胞株を 96 ウェルプレートに撒き、翌日、血清及びグルコース不含培地に交換し、VLDL を添加したときの細胞増殖促進作用が、抗 LSR 抗体により阻害されることが確認された(図2)。

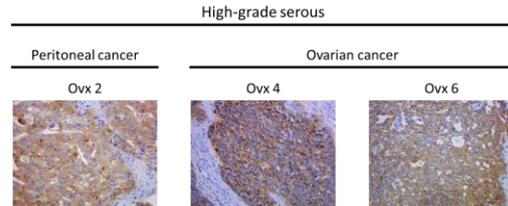
図2. 抗 LSR 抗体はグルコース、血清不含培地条件下での VLDL による細胞増殖促進作用を阻害する



卵巣癌の手術時の組織を NOG マウス皮下に移植することで、PDX マウスの作成を行った。移植した腫瘍組織により、生着に要する日数

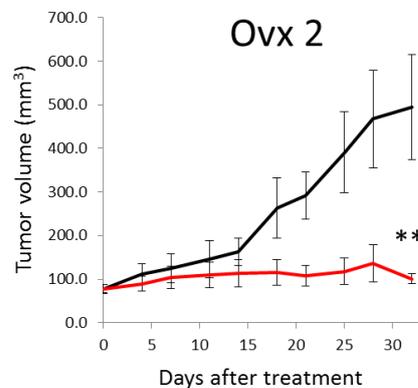
が異なったが、高異型度漿液性卵巣癌 2 系統 (Ovx4, Ovx6) と、これと臨床的に極めて類似した高異型度漿液性腹膜癌 1 系統 (Ovx2) の PDX モデルの 3 系統を樹立する事に成功した。NOG マウスの皮下に移植した腫瘍組織を摘出し、LSR の発現を免疫組織化学染色法により解析した結果、以下の図に示すように間質ではなく癌組織特異的に抗 LSR 抗体の反応性が認められたことから 3 系統全てにおいて LSR の発現が陽性であることを確認した(図3)。

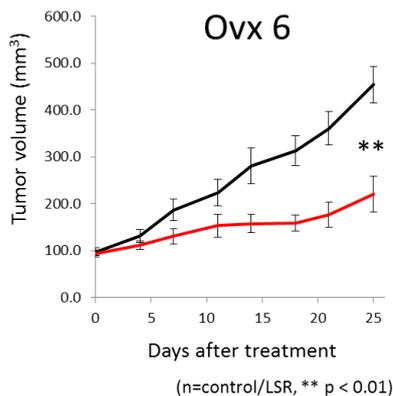
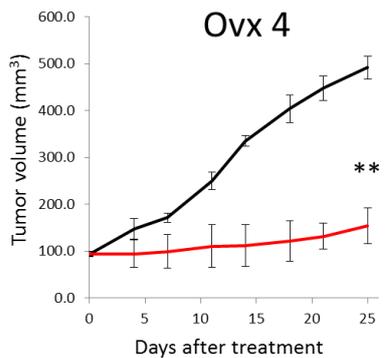
図3. 独自に樹立した 3 系統の卵巣癌 PDX はすべて LSR 陽性である。



研究代表者が同定した卵巣癌抗原 LSR に対する抗 LSR 抗体が卵巣癌に対して血中の脂質の取り込みを遮断することで抗腫瘍効果を発揮することを証明するには、LSR 陽性の卵巣癌組織を超免疫不全マウス (NOG マウス) の皮下に移植した patient tumor-derived xenograft (PDX) モデルを用いて証明する必要がある。連携研究者の吉野潔准教授のグループにて手術時に得られた卵巣癌腫瘍組織を NOG マウスの皮下に移植することで、PDX マウスを 3 系統樹立済みである (高異型度漿液性卵巣癌 2 系統 (Ovx4, Ovx6)、および、高異型度漿液性腹膜癌 1 系統 (Ovx2))。LSR 発現が陽性である高異型度漿液性卵巣癌 PDX2 系統 (Ovx4, Ovx6) および高異型度漿液性腹膜癌 1 系統 (Ovx2) に対して、コントロール抗体投与群と比較して、抗 LSR モノクローナル抗体投与群では有意な抗腫瘍効果が認められた(図4)。

図4. 抗 LSR モノクローナル抗体は LSR 陽性卵巣癌 PDX マウスの腫瘍増殖を阻害する。

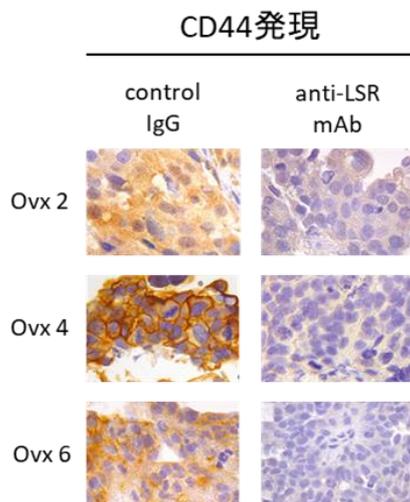




— control IgG
 — anti-LSR mAb
 何れも200 µg/body

抗 LSR 抗体の抗腫瘍効果の作用機序を解明すべく、抗 LSR 抗体投与マウスおよびコントロール抗体投与マウスの腫瘍組織において、卵巣癌の癌幹細胞マーカーとして知られている CD44 の発現を免疫組織化学染色法により解析した(図 5)。その結果、コントロール抗体投与群と比較し、抗 LSR 抗体投与群では腫瘍細胞における CD44 の発現低下が確認された。

図 5. 抗 LSR モノクローナル抗体は LSR 陽性卵巣癌 PDX マウス腫瘍組織中の CD44 発現細胞を減少させる。



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 1 件)

(1) Hiramatsu K, Serada S, Enomoto T, Takahashi Y, Nakagawa S, Nojima S, Morimoto A, Matsuzaki S, Yokoyama T, Takahashi T, Fujimoto M, Takemori H, Ueda Y, Yoshino K, Morii E, Kimura T, Naka T. LSR antibody therapy inhibits ovarian epithelial tumor growth by inhibiting lipid uptake.

Cancer Res. 2018 Jan 15;78(2):516-527.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0910.

査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲哲治 (NAKA TETSUJI)

高知大学・教育研究部・医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：30303936

(3) 連携研究者

藤本穰 (FUJIMOTO MINORU)

高知大学・教育研究部・医療学系臨床医学部門・准教授

研究者番号：00379190

世良田聡 (SERADA SATOSHI)

高知大学医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：50463302

吉野潔 (YOSHINO KIYOSHI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90362730