

令和元年5月27日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15250

研究課題名(和文) 卵巣明細胞癌の新規バイオマーカーLefty遺伝子の同定、機能解析、そして臨床応用

研究課題名(英文) Identification of LEFTY as a molecular marker for ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

梶田 咲美乃(Kajita, Sajiine)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60194734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞癌(OCCCa)でLEFTY(left-right determination factor)の高発現が認められた。本研究において特記すべきは、LEFTYの過剰発現がOCCCaの抗腫瘍作用を示すことであり、これはおそらくLEFTY過剰発現によるTGF- $\beta$ 1の作用を抑制することによるものである。この結論は、OCCCaにおける、LEFTY高発現症例でのKI-67 LIの数値などが裏付けしている。以上、LEFTYは、OCCCaに特異的な分子マーカーで、増殖能とアポトーシス制御を介して抗腫瘍効果を示すと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人に多い卵巣の明細胞癌の新規バイオマーカーとしてLEFTYを見出した。LEFTYは卵巣明細胞癌で特異的に高発現し、癌細胞の増殖を抑制するとともに、細胞死(アポトーシス)促進に関与する。これらの制御機構を介して卵巣明細胞癌に対して抗腫瘍効果を示す。今後、LEFTY分子を用いた卵巣明細胞癌の早期診断ツールの開発や分子標的薬としての活用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To identify proteins involved in ovarian clear cell carcinoma (OCCCa), shotgun proteomics analysis was applied. Of the highly expressed proteins in OCCCa, we focused on left-right determination factor (LEFTY). In 143 cases of ovarian carcinoma, LEFTY expression was significantly higher in OCCCas compared with non-OCCCas. OCCCa cells stably overexpressing LEFTY1 showed reduced cell proliferation, along with decreased pSmad2 expression, and also either displayed an activated p53/p21waf1 pathway or increased p27kip1 expression, directly or indirectly. Moreover, the treatment of stable cell lines with cisplatin led to increased apoptotic cells, together with the inhibition of protein expression of a pSmad2-mediated X-linked inhibitor of apoptosis and a decreased bcl2/bax ratio. These findings suggest that LEFTY may be an excellent OCCCa-specific molecular marker, which has anti-tumor effects in altering cell proliferation and cellular susceptibility to apoptosis.

研究分野：人体病理学

キーワード：卵巣明細胞癌 LEFTY TGF-beta 細胞増殖 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣癌(ovarian carcinoma: OvCa)は、漿液性腺癌(serous adenocarcinoma: OSeCa)、粘液性腺癌(mucinous adenocarcinoma: OMuCa)、類内膜腺癌(endometrioid adenocarcinoma: OEmCa)、明細胞腺癌(ovarian clear cell carcinoma: OCCCa)の4型に分けられ、極めて予後不良な悪性腫瘍である。OvCaの最も有効な化学治療法はシスプラチンなどの白金製剤をベースとしたものであるが、OCCCaはしばしば薬剤抵抗性で、進行期で発見された場合は、他の組織型に比べて治療成績が不良である。また、OCCCaは子宮内膜症としばしば関連が認められるなど、特有の生物学的特性を示す。

(2) Transforming growth factor- (TGF-) は、悪性腫瘍における細胞増殖、遊走能・浸潤能の獲得、転移における主要な転写因子である。TGF- は、腫瘍進展の初期には抑制、後期では促進するという表裏の機能を示す。TGF- 受容体にリガンドが結合すると、細胞内で Smad タンパクなどの下流シグナルのタンパク質が順次動員される。LEFTY (left-right determination factor)は、TGF- スーパーファミリーに属し、ヒトでは LEFTY1, LEFTY2 の isoforms がある。LEFTY は、TGF- 受容体活性化後の Smad2 のリン酸化を抑制し、その下流にある receptor (R)-Smad のリン酸化、R-Smad/Smad4 の二量体化およびその核内移行を抑制する。

## 2. 研究の目的

本研究は、OCCCaの新規バイオマーカーを同定するために、卵巣癌の臨床検体から得られたタンパク質をショットガンプロテオミクス法で網羅的に検索した。その結果、OCCCaにおいてLEFTYがOCCCaの新規バイオマーカーである可能性を得た。そこで、まずは、OCCCaの新規バイオマーカーとしてのLEFTYの有用性を確認し、次に、その機能解析をTGF- /Smad経路との観点から検索した。

## 3. 研究の方法

(1) 臨床検体：北里大学病院において、2000年～2017年間に外科的摘出されたOvCa症例143例(OCCCa:99例、OEmCa:13例、OSeCa:18例、OMuCa:13例)を用いた。すべての検体はホルマリン固定パラフィン包埋(FFAP)である。

(2) ショットガンプロテオミクス解析：FFPE検体から抽出したタンパク質を、LC-MS/MS(Q-Exactive)を用いてアミノ酸配列を分析し、MASCOTデータベース検索によりタンパク質を同定した。

(3) 抗体、リガンド：LEFTY、Smad2、pSmad2、XIAP、bax、 $\beta$ -catenin、HNF-1 $\alpha$ 、p27<sup>Kip1</sup>、p21<sup>waf1</sup>、cyclinD1、p53、bcl-2、Ki-67、cyclinA、cleaved caspase-3、及び  $\beta$ -actin に対する市販抗体を購入した。シスプラチン(CDDP)とRecombinant transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1も購入した。

(4) 免疫染色(IHC; immunohistochemistry)は、microwave法、polymer immunocomplex (Envision, Dako)法で実施した。LEFTY、pSmad2、XIAPのIHCの評価は、染色範囲を0-4(0, all negative; 1, <10%; 2, 10-30%; 3, 30-50%; 4, >50%)、染色強度を0-3(0, negative; 1, weak; 2, moderate; and 3, strong)にscoringし、両者の積をIHC scoreとした。Ki-67染色は、1000個の細胞をランダムにカウントし、100分率で表したものをLIとした。

(5) *In situ* ハイブリダイゼーション(ISH)は、GenPoint Tyramide Signal Amplification System (Dako)で実施した。ISHは、細胞の陽性率で1-4(1, <10%; 2, 10-30%; 3, 30-50%; 4, >50%)、染色強度を0-3(0, none; 1, weak; 2, moderate; 3, strong)で、両者の積をscoreとした。

(6) TdT-mediated dUTP-biotin nickend labeling (TUNEL)法でアポトーシス細胞を検出し、陽性細胞の個数を10HPFの平均として解析した。

(7) Plasmid、細胞株: LEFTY1、LEFTY2、Smad2のFull-length cDNAをpcDNA3.1にサブクローニングした。LEFTY1 promoter、LEFTY2 promoter (NM003240)、XIAP promoterをpGL-3B vector (Promega)にサブクローニングした。OCCCa細胞株としてTOV-21G、ES-2、及びOVISe細胞、子宮内膜癌細胞としてIshikawa細胞を用いた。LEFTY1恒常的高発現系及びノックダウン系細胞をTIOV-21G、ES-2、あるいはOVISe細胞で作製した。

(8) Transfection: LipofectAMINE PLUS (Invitrogen)を使用した。

(9) RT-PCR法: 2µgのtotal RNAからcDNAを合成、RT-PCR法によって増幅した。real-time PCR法も実施した。

(10) Western blot法: 培養細胞株はRIPA buffer、臨床検体は2x Laemmli sample bufferでタンパク質を抽出し、型の如くWestern blot法を実施した。

(11) Flow cytometry: BD FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences)及びCellQuest Pro software (BD Biosciences)を使用した。

(12) Cell counting Kit-8でViableな細胞を定量した。

(13) LEFTY1 methylation解析: 抽出したDNAをbisulfate処理しPCR法で検出した。

(14) p53 mutationの検索: TOV-21G、OVISe細胞株におけるp53のエクソン5~9をPCRによって増幅し、direct sequencing PCRによってmutationの有無を確認した。

(15) 統計: KruskalWallis、Mann-Whitney  $U$ -<sup>2</sup>検定、Spearmanの順位相関による検討を行った。 $p < 0.05$ をcut off値とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 臨床検体におけるOvCaのショットガンプロテオミクス法による解析

OCCCaとnon-OCCCaの分子発現の相違を明確にするため、ホルマリン固定パラフィン切片(formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE)検体を用い、ショットガンプロテオミクスを行った。合計5382種類のタンパク質が、16症例のOvCaで見出され、これらのうちOCCCaの4症例すべてに共通で発現し、non-OCCCa症例では発現が見られなかったタンパク質は52種類あった。このうち、最も高発現を示したLEFTY1とLEFTY2タンパク質に注目した。

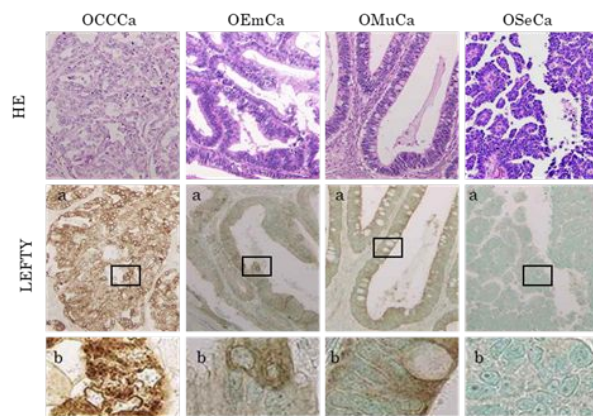


図1. 卵巣癌におけるLEFTY免疫染色

##### (2) OCCCaにおいて、LEFTYの発現は増加している

OvCaの4つの組織型について免疫染色を施行した。LEFTYのimmunohistochemistry (IHC) scoreの平均値はOCCCaで最も高かった(図1)。同様の結果は、western blot法による検索でも確認できた。しかし、85症例のOCCCaで、LEFTYのスコアはoverall survival、progression free survival、clinical stage、リンパ節転移などの臨床病理学的な要素との関連は見いだせなかった。LEFTY1、2の特異的プライマーを用いて、LEFTY発現とOvCaの組織型の関係を検索すると、LEFTY1の発現は、LEFTY2よりも著明に高かった。OCCCaについては、LEFTY1、LEFTY2

の発現は、mRNA およびタンパクレベルで non-OCCEa よりも著明に高かった。In situ hybridization にて OCCEa10 症例を検討すると、これらもまた LEFTY2 よりも LEFTY1 の発現が著明に高かった。LEFTY1 の mRNA レベルは、LEFTY 免疫染色の IHC score 高値・低値で分けるとき、正の相関関係が認められた。LEFTY と TGF- $\beta$ 1/Smad 経路との関連を調べるため、OCCEa の細胞株 (OVISE、TOV-21G) に TGF- $\beta$ 1 処理をして検討した。コントロールとして、OEmCa の細胞株である Ishikawa も使用した (Ishikawa 細胞は、TGF- $\beta$ 1 刺激によって LEFTY と pSmad2 の増加、それに伴って p21<sup>waf1</sup>、p27<sup>kip1</sup> の増加が認められたことを確認している)。OVISE と Ishikawa 細胞については、TGF- $\beta$ 1 刺激によって pSmad2、LEFTY の発現増加が見られた。一方、TOV-21G では、この効果は弱かった。Smad2 の遺伝子導入あるいは TGF- $\beta$ 1 刺激によって、LEFTY1、2 のプロモーター活性が Ishikawa 細胞において著明に増加したが、TOV-21G 細胞では認められなかった。臨床検体においては、LEFTY と pSmad2 の免疫染色は腫瘍内の同じ領域に染色が認められたが、IHC score は互いに関係が認められなかった。

#### (3) OCCEa における、LEFTY 発現と細胞増殖の関連

OCCEa において LEFTY 発現が細胞増殖にどのように関連するか調べるため、二種類の独立した恒常的 LEFTY1 高発現細胞 (TOV-L1、ES-L1) を作製し検討した。その結果、どちらの細胞株も、細胞増殖能は抑制されていた。さらに、細胞周期開始から 6 時間後と 24 時間後で、TOV-L1 の p53 と p21<sup>waf1</sup>、ES-L1 の p27<sup>kip1</sup> は mock と比較して上昇しており、対照的に pSmad2 は低下していた。臨床検体の OCCEa 症例では、Ki-67 標識数 (LI; labeling indice) は LEFTY IHC score の低い症例に比較して、高い症例のほうが低値を示した。LEFTY1 に特異的に結合する shRNA を用いて作製した 2 つの細胞株 (OV-shL1 #4、#5) において、mRNA とタンパク質ともに LEFTY は低下し、pSmad2 は増加した。また、増殖能は低下していた。一方、p53 の状態変化を伴わずに、p21<sup>waf1</sup>、p27<sup>kip1</sup> 発現は増加していた。

#### (4) OCCEa における LEFTY 発現とアポトーシスの関連性

CDDP 処理を行った TOV-L1 細胞株は、生存能力の低下と sub-G1 期・G2/M 期の分画が増え、G1 期分画が減った。mock と比較すると、X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)、pSmad2、p27<sup>kip1</sup> の発現低下、p53、bax、p21<sup>waf1</sup>、cleaved caspase -3 の発現上昇が見られた。似たような結果は、ES-L1 細胞株でも見られた。2 つの細胞株において、CDDP 処理によって、Bcl2/bax 比もまた著明に低下していた。臨床検体では、OCCEa におけるアポトーシス細胞は、LEFTY 免疫染色に陽性であった。アポトーシス数は、LEFTY 高値症例のほうが、低値症例よりも著明に多かった。CDDP 処理をしない場合においても、mock と比較して OV-shL1 細胞ではアポトーシス細胞数は多かった。これと同時に、G1 期の分画も増えているが、CDDP 処理に反応するアポトーシス細胞数は、OV-shL1 のほうが明らかに低下した。XIAP、pSmad2、bcl2 の発現上昇も見られた。対照的に、細胞の生存能力は mock と TOV-L1 の間に差は認められなかった。これらの関係は、TUNEL 法においても観察された。

#### (5) LEFTY による Smad2 依存 XIAP 発現の転写阻害

TGF- $\beta$ 1 処理をした Ishikawa 細胞は、mRNA、タンパク質レベルともに XIAP 発現の上昇とともに、pSmad2 と LEFTY 発現も上昇した。TOV および ES において、XIAP のプロモーター活性は Smad2 導入により上昇したが、この効果は LEFTY1 導入を同時に行うことにより、無効化されて、内因性の XIAP mRNA 発現も低下していると考えられた。OCCEa 組織において、免疫染色で細胞質に XIAP 陽性の細胞は腫瘍内に不均一に存在し、pSmad2 陽性細胞とは局在が一致し、LEFTY とは一致しなかった。この結果は、OCCEa において、XIAP と pSmad2 が正の相関関係にあり、LEFTY とは相関しないことを示している。

## (6) まとめ

ショットガンプロテオミクス法や免疫染色、Western blot 法によって、OCCCa において LEFTY の高発現が認められた。OCCCa における mRNA 発現は LEFTY2 に比べて LEFTY1 のほうが高かった。本研究において特記すべきは、LEFTY の過剰発現が OCCCa の抗腫瘍作用を示すことであり、これはおそらく LEFTY 過剰発現による TGF- $\beta$ 1 の作用を抑制することによるものである。この結論は、OCCCa における、LEFTY 高発現症例での KI-67 LI の数値などが裏付けしている(図 2)。以上、LEFTY は、OCCCa に特異的な分子マーカーで、増殖能とアポトーシス制御を介して抗腫瘍効果を示すと考えられる。

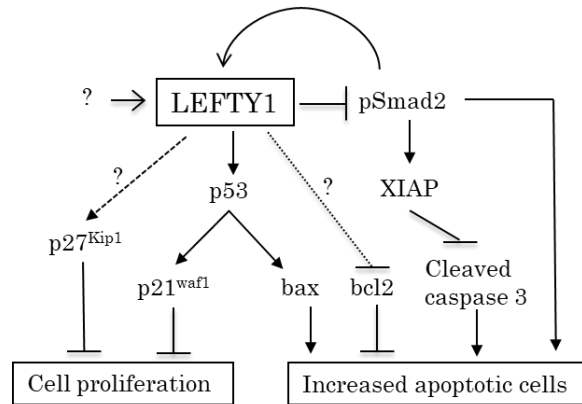


図2. 卵巣明細胞癌でのLEFTYシグナルカスケード

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

Miura R, , Kajita S, Saegusa M (他 5 名). Nodal induces apoptosis and inhibits proliferation in ovarian endometriosis-clear cell carcinoma lesions. BMC Cancer. 2019;19:308. doi: 10.1186/s12885-019-5539-y. 【査読有】

Fei W, Kajita S, Saegusa M (他 6 名). A functional role of LEFTY during progesterone therapy for endometrial carcinoma. Cell Commun Signal. 2017;15:56. doi: 10.1186/s12964-017-0211-0. 【査読有】

Akiya M, Kajita S, Saegusa M (他 9 名). Identification of LEFTY as a molecular marker for ovarian clear cell carcinoma. Oncotarget. 2017;8:63646-63664. doi: 10.18632/oncotarget.18882. eCollection 2017 Sep 8. 【査読有】

### 〔学会発表〕(計 2 件)

秋谷昌史、梶田咲美乃、三枝信 (他 2 名): Identification of Lefty as a molecular marker for ovarian clear cell carcinoma: its relation to apoptosis and cell proliferation. 第 107 回日本病理学会総会. 2018 年、札幌

秋谷昌史、梶田咲美乃、三枝信 (他 2 名): 卵巣明細胞腺癌の発癌・進展過程における Lefty の機能解析. 第 106 回日本病理学会総会. 2017 年、東京

### 〔図書〕(計 0 件)

#### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)  
なし

取得状況 (計 0 件)  
なし

#### 〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 三枝 信

ローマ字氏名：SAEGUSA MAKOTO

所属研究機関名：北里大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 00265711

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。