

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09285

研究課題名(和文) 婦人科癌細胞の幹細胞性維持におけるLCN2の機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the function of LCN2 in stem cell maintenance of gynecologic cancer cells

研究代表者

宮本 強 (Miyamoto, Tsutomu)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：70418721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：複数の婦人科癌細胞株において、LCN2発現抑制により癌幹細胞マーカーCD44v、CD133発現が低下し、合成LCN2(sLCN2)添加により発現が回復した。幹細胞性の指標である軟寒天培地上の足場非依存性増殖コロニー数は、LCN2発現抑制で有意に低下し、sLCN2添加により回復した。Sphere formation assayでも、LCN2発現抑制でsphere数が減少し、sLCN2添加で回復した。FlowcytometryでもLCN2発現抑制で癌幹細胞を多く含むside population細胞割合の減少が観察された。これらは、LCN2が癌幹細胞性維持に作用していることを示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果はLCN2の幹細胞性維持に対する作用を示している。一方、LCN2は鉄輸送に係る因子であるが、鉄イオンと幹細胞性維持の関連を示す論文も複数存在している。一般に癌幹細胞では酸化ストレス耐性や抗癌剤耐性が增强しているとされており、我々も本研究やこれまでの研究でLCN2の作用として示してきた。これまでLCN2を標的とした高悪性腫瘍治療は開発されておらず、新規性が高い。また本研究成果は癌幹細胞を標的とした新規治療法につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the effects and molecular mechanisms of LCN2 on the maintenance of cancer stemness in gynecological cancer cells. In several gynecological cancer cell lines, the expression of cancer stem cell markers CD44v and CD133 was decreased by suppressing LCN2 expression and was restored by the addition of synthetic LCN2 (sLCN2). In addition, the number of colonies with anchorage-independent growth on soft agar, an indicator of stemness, was significantly decreased by suppression of LCN2 expression and recovered by the addition of sLCN2. Flow cytometry also showed that LCN2 suppression reduced the percentage of side population cells that contained most of the cancer stem cells. These results indicate that LCN2 acts to maintain cancer stemness.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：LCN2 癌幹細胞性 鉄運搬タンパク 酸化ストレス耐性 CD44v 合成LCN2

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Lipocalin2 (LCN2) は **25kD** の分泌蛋白で、鉄イオンの運搬に関与し、細胞内や局所の鉄イオン濃度を調節することにより感染防御、細胞の増殖・浸潤・遊走等の種々の効果を示すことが知られている[1,2]。また感染や炎症部位、種々の癌で過剰発現が報告され、癌の発生や進展に関与する可能性が報告されている。我々はこれまで、**microarray** による網羅的解析により子宮内膜癌 (**EMC**) で発現が亢進する因子として **LCN2** を見出し[3]、**LCN2** とその受容体 **SLC22A17** 高発現が **EMC** 患者の独立した予後不良因子となること[4]、**LCN2** が **EMC** 細胞や卵巣明細胞癌 (**OCCC**) 細胞の浸潤能・遊走能、抗がん剤などの細胞障害性ストレスに対する生存能(耐性)、造腫瘍能を亢進することを報告してきた[5,6]。

LCN2 による耐性亢進機序は不明であり、**BAX**、**BCL2** や **PI3K** 経路の関与なども明らかではなかった。そこで、我々は癌幹細胞 (**CSC**) マーカー **CD44** の **variant type** であり、シスチントランスポーター **xCT** の安定化から酸化ストレス耐性への関与が報告されている **CD44v8-10** に着目し[7]、**OCCC** 細胞において **LCN2** が **CD44v8-10** 発現増強に関与し、酸化ストレス耐性に作用することを見出した[6]。また、**Salinomycin** が **lysosome** 内の鉄を隔離することで癌幹細胞に対し殺細胞効果を示すことが報告されており[8]、鉄イオンが癌幹細胞性維持に関与していると考えられることから、鉄イオン運搬タンパクである **LCN2** が幹細胞性維持に作用する可能性は十分考えられる。これらのことから、**LCN2** は癌幹細胞性維持から耐性亢進に作用している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では **EMC** 細胞、**OCCC** 細胞において、**LCN2** による癌幹細胞性への影響、およびその分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) LCN2 の抗酸化物質グルタチオン細胞内濃度への影響の検討

PUREfrex 再構成型無細胞タンパク質合成キット ((株) ジーンフロンティア、柏市) を用いて合成 **LCN2** タンパク (**sLCN2**) を生成して用いた。**LCN2** 高発現 **EMC** 細胞株 **RL95-2**、**HHUA** の Control 細胞 (**scramble-shRNA** 導入) と、**shRNA** 導入による **LCN2** 発現抑制細胞 (**LCN2-shRNA**)、さらに **sLCN2** 500 ng/mL を培養液に添加した細胞で、24 時間後の細胞内グルタチオン (**GSH**) 濃度を測定し、比較した[6]。また **RL95-2** を 24 時間培養して得られた conditioned medium を用いて、**LCN2-shRNA** 細胞を培養し、**GSH** 濃度を測定した。

(2) LCN2 の癌幹細胞マーカー発現への影響の検討

LCN2 高発現 **EMC** 細胞株 **RL95-2**、**HHUA** の Control 細胞と **LCN2** 発現抑制細胞 (**LCN2-shRNA**)、さらに **sLCN2** 500 ng/mL を添加し、48 時間後の **CD44v8-10**、**CD133** 発現を RT-PCR、Western blotting で検討した。

(3) LCN2 の足場非依存性増殖能への影響の検討

HHUA の Control 細胞と **LCN2-shRNA** 細胞、**sLCN2** 添加により、幹細胞性の指標とされる足場非依存性増殖について検討した。まず 12000 細胞/60mm dish を軟寒天培地で 2 週間培養し、コロニー数を計測した。また、非接着プレートで 2 週間培養し、形成された Sphere 数を計測した。

(4) LCN2 の side population (SP) 細胞割合への影響の検討

HHUA Control 細胞、および **LCN2-shRNA** 細胞を Hoechst33342 にて染色して Flowcytometry で分析を行い、Hoechst33342 の高い排出能を有する SP 細胞割合を算出した。

4. 研究成果

(1) LCN2 は細胞内 GSH 濃度を増加させる

LCN2 高発現 **EMC** 細胞株 **HHUA**、**RL95-2** の **LCN2** 発現抑制により、細胞内 **GSH** 濃度は **HHUA** で約 30%、**RL95-2** は約 60%低下した。この **GSH** 低下は、**HHUA** では **sLCN2** 添加により、ほぼ完全に相殺されたが、**RL95-2** では回復を認めなかった。蛋白合成後の修飾など無細胞合成系では再現できない **LCN2** の機能が **RL95-2** では重要である可能性が考えられたため、**RL95-2** の **LCN2-shRNA** 細胞を、**LCN2** を高濃度を含む conditioned medium で培養したところ、**GSH** 濃度は **RL95-2** の 45%低下、**RL95-2 LCN2-shRNA** より 35%上昇まで相殺された。これらのことから、**LCN2** は細胞内 **GSH** 濃度を上昇させる作用を有すると考えられる。

(2) LCN2 は癌幹細胞マーカーCD44v8-10、CD133発現を上昇させる

LCN2 高発現 **EMC** 細胞株 **HHUA**、**RL95-2** において、癌幹細胞マーカー **CD44v8-10**、および **CD133** 蛋白発現は、**LCN2** 発現抑制 (**LCN2-shRNA**) により明らかな低下を認めた (図 1)。またこの発現低下は **sLCN2** 添加により回復傾向を認めた。さらに、**HHUA** では **CD44v8-10** と複合体を形成するシスチントランスポーター **xCT** も **LCN2-shRNA** で発現が低下し、**sLCN2** 添加で発現が回復した。このことから、**LCN2** はこれらの因子の蛋白発現を増強していると考えられる。また、**OCCC** 細胞株と同様に[6]、**CD44v8-10** と **xCT** との協調から細胞内 **GSH** 濃度上昇に関与すると考えられる。一方で、**CD44v8-10** の mRNA 発現は、**LCN2-shRNA** や **sLCN2** 添加では変化を認めなかった (図 1)。このことから、**LCN2** は **CD44v8-10** タンパクの安定化など翻訳後の調節に影響していると考えられる。

これら以外の幹細胞マーカーとして知られる **ALDH1A1** や **OCT4** の mRNA 発現は、**LCN2** 発現抑制

や sLCN2 添加による変化は観察されなかった。

(3) LCN2 は足場非依存性増殖を増強する

軟寒天培地上のコロニー形成や浮遊培地での Sphere 形成能といった足場非依存性増殖能は癌細胞の重要な特徴の一つであるが、これらには幹細胞が多く含まれることが報告されており、幹細胞性の指標としても重要である。まず、HHUA の軟寒天培地でのコロニー数であるが、Control 細胞に比較して LCN2-shRNA では有意にコロニー数が減少したが、sLCN2 添加により、相殺された。Sphere 形成数は、Control に比較して、LCN2-shRNA では約 75%低下し、形成された Sphere も Control に比較して小さめであった。sLCN2 により LCN2-shRNA 細胞の Sphere 数は 2.5 倍まで増加した。これらのことから LCN2 は幹細胞性の指標の一つである足場非以前性増殖能を亢進すると考えられる。

(4) LCN2 発現抑制は SP 細胞を減少させる

細胞を DNA 蛍光色素 Hoechst33342 にて染色した場合、癌幹細胞は高い排出能を有することから、Flowcytometry では特に蛍光の弱い SP 細胞に分画される。前述の CD44 や CD133 は一般的な幹細胞マーカーとされるが、婦人科癌の癌幹細胞を明確に分類するマーカーは明らかになっていないため、SP 細胞分画についても検討を行った。Control 細胞では SP 細胞分画は 15.4%であったが、LCN2-shRNA 細胞では 6.7%にまで低下した。

婦人科癌での明確な癌幹細胞およびそれを示すマーカーは同定されていない。また、我々の検討では癌幹細胞としての多分化能については検討されていない。しかし、本研究より、LCN2 は足場非依存性増殖などの幹細胞様の性質の維持に関与していると考えられる。また LCN2 は一般的な癌幹細胞マーカーである CD44v8-10 発現増強および xCT 経路の増強から細胞内 GSH 濃度を高め、酸化ストレス耐性に関与している。さらに CD133 増強は Akt/PKB 経路増強を介し、抗癌剤耐性に関与することが報告されており、我々が既に報告している LCN2 によるリン酸化 Akt 発現上昇に関連して、抗癌剤耐性増強に関与している可能性が考えられる [5]。LCN2 はこれら幹細胞様の性質の維持・増強から悪性度上昇や抗癌剤耐性に関与している可能性が考えられ、今後の治療標的として有望である。

<引用文献>

1. Flo TH, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*. 2004; 432: 917-921.
2. Devireddy LR, et al. A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell*. 2005; 123: 1293-1305.
3. Miyamoto T, et al. Laser-captured microdissection/microarray analysis of the genes involved in endometrial carcinogenesis: stepwise up-regulation of lipocalin2 expression in normal and neoplastic endometria and its functional relevance. *Hum Pathol*. 2011; 42: 1265-1274.
4. Miyamoto T, et al. Immunohistochemical detection of a specific receptor for lipocalin2 (solute carrier family 22 member 17, SLC22A17) and its prognostic significance in endometrial carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2011; 91: 563-568.
5. Miyamoto T, et al. Lipocalin 2 Enhances Migration and Resistance against Cisplatin in Endometrial Carcinoma Cells. *PLoS One*. 2016; 11: e0155220
6. Yamada Y, Miyamoto T, et al. Lipocalin 2 attenuates iron-related oxidative stress and prolongs the survival of ovarian clear cell carcinoma cells by up-regulating

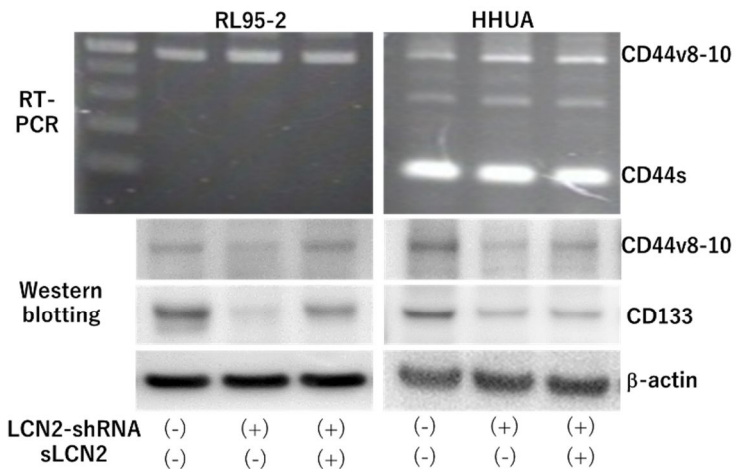


図1：合成LCN2 (sLCN2) 500ng/mL添加48時間後。Western blottingでは両細胞でLCN2発現抑制 (LCN2-shRNA) によりCD44v8-10、およびCD133蛋白発現が減弱し、sLCN2添加で発現の回復傾向が観察された。一方でRT-PCRではmRNAレベルでのCD44v8-10発現変化は明らかではない。RL95-2ではCD44s発現はない。

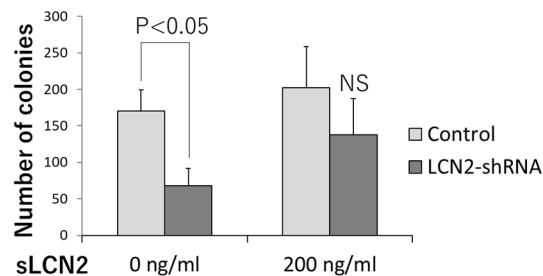


図2：軟寒天培地上での足場非依存性コロニー形成数。コロニー数はLCN2発現抑制 (LCN2-shRNA) により有意に減少するが、sLCN2添加により回復する。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

the CD44 variant. *Free Radic Res.* 2016; 50: 414-25.

7. Ishimoto T, et al. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell.* 2011; 19: 387-400.
8. Mai TT, et al. Salinomycin kills cancer stem cells by sequestering iron in lysosomes. *Nat Chem.* 2017;9:1025-1033

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyamoto Tsutomu, Shiozawa Tanri	4. 巻 35
2. 論文標題 Two-sided role of estrogen on endometrial carcinogenesis: stimulator or suppressor?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gynecological Endocrinology	6. 最初と最後の頁 370 ~ 375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09513590.2018.1549219	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮本 強
2. 発表標題 1. 子宮頸部嚢胞の取り扱い 2. 当科における手術手技の工夫
3. 学会等名 平成30年度冬季山梨産科婦人科学会・山梨県産婦人科医会（招待講演）
4. 発表年 2019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	竹内 穂高 (TAKEUCHI Hodaka) (30816351)	信州大学・医学部附属病院・医員 (13601)	
研究分担者	鹿島 大靖 (KASHIMA Hiroyasu) (70464089)	信州大学・学術研究院医学系（医学部附属病院）・講師 (13601)	
研究分担者	山田 靖 (YAMADA Yasushi) (60646652)	信州大学・学術研究院医学系（医学部附属病院）・助教 (13601)	

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