

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591852

研究課題名（和文）子宮内膜癌におけるlipocalin2発現の機能解析と分子標的治療法

研究課題名（英文）The functional analysis of lipocalin2 and novel molecular targeted therapy for endometrial carcinoma

研究代表者

鹿島 大靖（KASHIMA HIROYASU）

信州大学・医学部・助教

研究者番号：70464089

研究成果の概要（和文）：

lipocalin2 (LCN2) 高発現子宮内膜癌細胞株HHUAのLCN2発現をshRNAで抑制すると、紫外線（UV）感受性およびシスプラチン（CDDP）感受性の増強と、アポトーシスの有意な増加を認めた。鉄イオンキレートによりコントロールHHUAでもUV感受性が増強し、LCN2発現抑制によりリン酸化Akt発現が減弱することから、LCN2は鉄イオンを介してAktリン酸化を誘導し、細胞の生存能力を高めていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The expression of lipocalin2 (LCN2) was silenced using shRNA in HHUA, an endometrial carcinoma cell line over-expressing LCN2. The cell viability was significantly reduced and the apoptotic cells were significantly increased in this LCN2-silenced HHUA after ultraviolet (UV) irradiation or cisplatin (CDDP) treatment. The iron-chelating also reduced cell viability similar to LCN2-suppression. The expression of phosphorylated Akt was reduced in LCN2-silenced HHUA. These findings suggested that LCN2 enhanced cell survival via iron and Akt phosphorylation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：癌、核酸、タンパク質、発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌は、近年わが国において急速な増加が認められることから、癌発生・進展の病態の解明が急務である。正常内膜腺上皮が前癌病変である増殖症を経て内膜癌に至る過程では、PTEN、K-ras、p53など種々の遺伝子異常が加重されると想像されるが、内膜

癌全体で何らかの遺伝子異常が報告されているものは約5割にとどまり、まだ多くの重要な遺伝子異常が不明のままである。内膜における腫瘍性病変の遺伝子変異の研究の困難さは、腫瘍の発生母体となる子宮内膜腺上皮をはじめ初期病変である増殖症や初期癌は豊富な間質細胞によって取り囲ま

れているという組織学的特性に由来する。従ってこれら初期病変の遺伝子変異を組織塊として採取した組織を用いて解析しても、詳細な遺伝子変異の検討はできない。このため特に初期病変の遺伝子変異の解析のためには、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った。これを可能にしたのが顕微鏡観察下で、レーザーによって標的細胞のみを採取しうる laser captured microdissection (LCM)法である。加えて近年 DNA マイクロアレイ法により、異なる試料間での遺伝子発現の相違の検出が可能になった。我々は病変部の遺伝子発現変化を特異的に検出するために、遺伝子背景の影響を受けない同一内膜癌患者の凍結切片より LCM によって正常腺管部、増殖症部、内膜癌部組織を間質細胞を含みぬ様に正確に採取し、これを用いて、正常-増殖症、正常-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包括的に解析した。マイクロアレイによって同定された遺伝子について、LCM で採取した微量 RNA を用いて、real-time RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 法で確認したところ、最も発現差の大きい遺伝子として LCN2(lipocalin2)を見出した。そこで我々は LCN2 タンパク発現を実際の組織で免疫染色を用いて検討したところ、正常、増殖症、内膜癌と病変が進展するに従って染色性が増強し、癌では分泌タンパクであるにも関わらず、核染色を認める症例もあった。また内膜癌において LCN2 高発現は予後不良因子であることも示された。培養子宮内膜癌細胞においても核でのタンパク発現の増強が確認され、さらに発現増強によって細胞増殖能や浸潤能の増強も確認された。また発現低下細胞に関してはメチル化が関与していることが考えられた (Hum Pathol 2011)。これまで、乳癌や食道癌では LCN2 により、浸潤能や増殖能が増強されることや予後不良因子であることが報告されているが (J Exp Clin Oncol 2008, PNAS 2009, Prog Biochem Biophys 2001)、子宮内膜癌での報告はなく、我々が初めて確認した分子である。また核内発現および核内での LCN2 機能に関する報告もない。この LCN2 機能を解析することは、子宮内膜癌の発癌・進展過程をより明らかにするだけでなく、新規分子標的治療樹立の可能性がある。

## 2. 研究の目的

我々はマイクロダイセクション法とマイクロアレイ解析を用いて子宮内膜癌で発現が増強し、増殖能や浸潤能を増強させる因子として lipocalin2 (LCN2) を見出した。本研究では LCN2 のさらなる機能解析と、分子標的治療の可能性について検討することを目

的とする。

①LCN2 受容体発現：近年、分泌タンパクである LCN2 の受容体が発見された (Cell 2005)。この受容体の子宮内膜および子宮内膜癌での発現状況を確認する。

②子宮内膜癌細胞における LCN2 の in vitro での機能解析：LCN2 発現亢進および siRNA あるいは short hairpin RNA を用いた LCN2 発現低下による細胞機能の変化を検討する。特に増殖能、遊走能や細胞の生存能に対する作用を検討する。

## 3. 研究の方法

①子宮内膜癌における SLC22A17 発現の検討：手術で摘出された子宮内膜癌 69 例のホルマリン固定組織における LCN2 受容体 SLC22A17 発現を免疫染色で検討した。一次抗体として抗 SLC22A17 多クローン性ウサギ抗体 (ABbiotec 社) を用い、2次抗体は Histofine MAX-PO kit (ニチレイ社) を用いた。500 細胞中の陽性細胞の割合を positivity index で表し、各臨床病理学的因子と比較した。

②LCN2 発現抑制 HHUA (HHUA-shLCN2) の樹立：LCN2 および SLC22A17 高発現子宮内膜癌細胞株 HHUA に LCN2 に対する short hairpin RNA (shRNA) を産生する LCN2 shRNA pCMV4 (Origene) を導入し、安定的に LCN2 発現が抑制された HHUA (HHUA-shLCN2) を樹立した。また対照として遺伝子発現を抑制しない shRNA を産生する scrambled shRNA pCMV4 (Origene) を導入した HHUA-cont を樹立した。

③SLC22A17 高発現 Ishikawa (SLC-Ishi) の樹立：LCN2 高発現 SLC22A17 低発現子宮内膜癌細胞株 Ishikawa に SLC22A17 全長 cDNA (Origene 社) を導入し、SLC22A17 高発現 Ishikawa (Ishi-SLC) を樹立した。また対照として empty vector を導入した Ishikawa (Ishi-cont) を樹立した。

④WST-1 assay：96well マイクロプレート上で細胞を培養し、10 倍希釈 WST-1 試薬 (ロシュ社) を含んだ medium100  $\mu$ l を各 well に入れて 2.5 時間後にマイクロプレートリーダーで 450nm 波長光を測定し、生存細胞数の指標とする。

⑤Wound-healing assay：HHUA-shLCN2, HHUA-cont をそれぞれ 500000 細胞を 60mm シャーレ上で培養し、表面を直線状に擦過し、幅 500  $\mu$ m の wound を形成した。24 時間後の wound 部分への細胞の遊走を観察した。

⑥CDDP 感受性試験：②③の細胞を 96well マイクロプレートに 2,000 細胞/well で培養開始し、 $1 \times 10^{-5}M \sim 1 \times 10^{-4}M$  の CDDP 添加 72 時間後に④の WST-1 assay を行い、CDDP 投与後の細胞生存能を検討した。さら

に鉄キレート剤 deferroxamine (DFO)を 100  $\mu$ M で添加した。

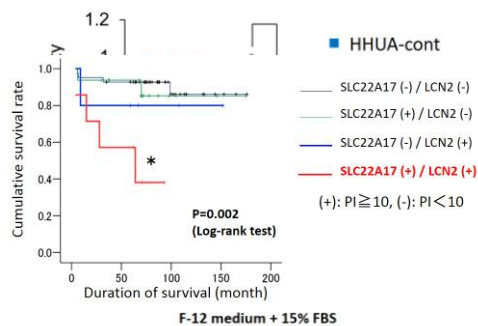
⑦UV感受性試験:②の細胞を 96well マイクロプレートに 50,000 細胞/well で培養し、60cm の距離から UV 灯で UV 照射を 15 分間行った。UV 照射 10 時間後に④の WST-1 assay を行い、UV 照射後の細胞生存能を検討した。さらに DFO を 100  $\mu$ M で添加した。

⑧apoptosis の検討:②の細胞を 4 チャンバー スライド上で 50,000 細胞/chamber で培養し、UV 照射後 8 時間後に In Situ Cell Death Detection Kit (ロシュ社)を用いて TUNEL 染色を行い、apoptosis 細胞を観察した。

⑨Western blotting:②の細胞を 60mm シャーレ上で 500,000 細胞を培養し、UV 照射後 8 時間後にタンパクを回収し Western blotting を施行し、リン酸化 Akt 発現を検討した。

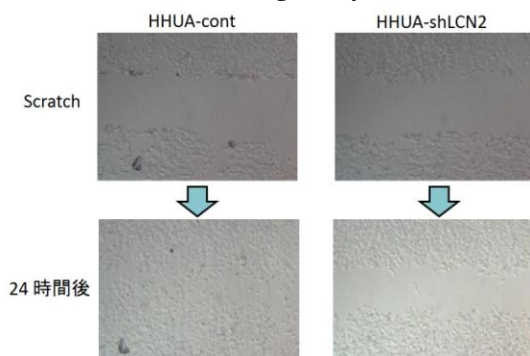
#### 4. 研究成果

①子宮内膜癌における LCN2 受容体 SLC22A17 発現: SLC22A17 は正常子宮内膜に比較し、内膜癌組織で高発現症例が認められたが、特に進行癌や高グレード、深い筋層浸潤や脈管侵襲、腹腔内細胞診陽性例で有意に高発現していた。また LCN2 発現と SLC22A17 発現には正の相関関係が認められ、特に深い筋層浸潤部や脈管侵襲部で両タンパクの高発現が観察された。また両タンパクの高発現は予後不良の傾向を示した。



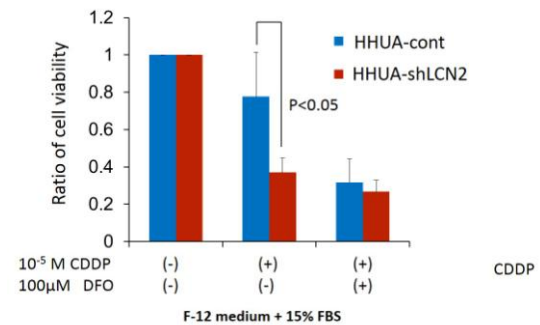
②LCN2の遊走能に対する作用: Wound healing assay では 24 時間後の wound 部位への遊走は HHUA-cont に比較して、明らかに HHUA-shLCN2 で不良であった。LCN2 は細胞の遊走能を高めると考えられた。

(図 2 : Wound healing assay)

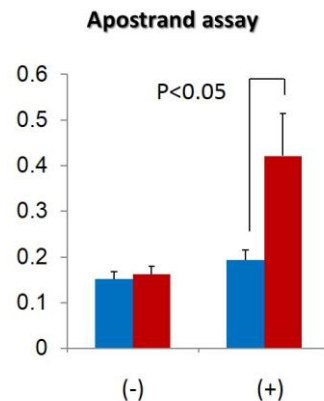


③LCN2 の CDDP 感受性に対する作用: HHUA-cont に比較して、HHUA-shLCN2 では有意に CDDP 投与後の細胞生存能が不良であり、apoptosis も増加し、CDDP 感受性の亢進が認められた。また、Ishi-Cont に比較して Ishi-SLC では有意に CDDP 投与後の細胞生存能が高く、CDDP 感受性が低下した。これらの LCN2 による CDDP 投与後の細胞生存能増強効果は鉄イオンキレート剤 DFO 添加で打ち消された。

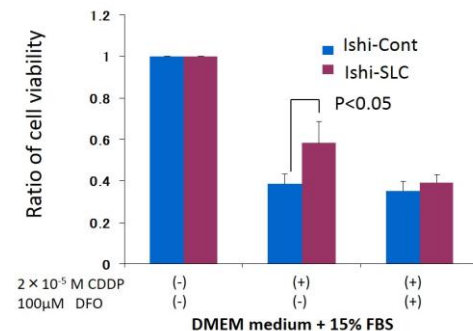
(図 3 a : WST-1 assay)



(図 3 b : Apostrand assay)

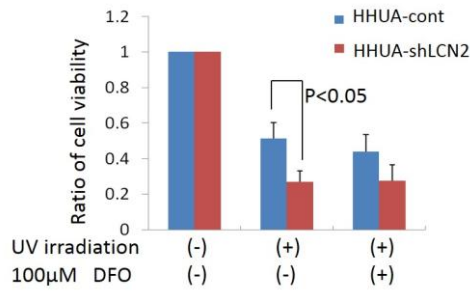


(図 3 c : WST-1 assay)



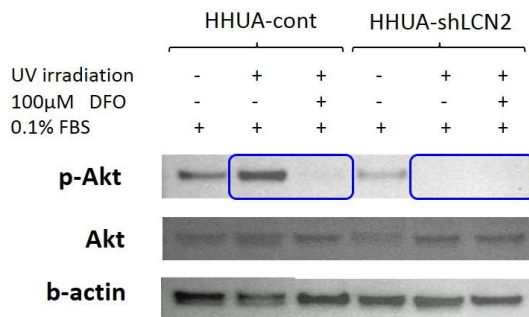
④ LCN2 の UV 感受性に対する作用: HHUA-cont に比較して、HHUA-shLCN2 では有意に UV 照射後の細胞生存能が不良であり、apoptosis も増加し、UV 感受性の亢進が認められた。これらの LCN2 による CDDP 投与後の細胞生存能増強効果は鉄イオンキレート剤 DFO 添加で減弱した。

(図 4a : WST-1 assay)



また、Western blotting では、HHUA-shLCN2 では UV 照射後にリン酸化 Akt 発現上昇を認めないが、HHUA-cont では発現が著明に増強していた。LCN2 によるこのリン酸化 Akt 発現増強作用は DFO 投与により打ち消された。

(図 4 b : Western blotting)



以上をまとめると、LCN2 は細胞の浸潤能や遊走能を増強し、さらに鉄イオンを介してリン酸化 Akt 発現を増強させ、apoptosis を抑制することにより、UV 照射後や CDDP 投与後の細胞生存能を亢進していると考えられる。このように LCN2 は癌細胞の生存に有利に作用し、子宮内膜癌進行に関与していると考えられ、新たな分子標的となる可能性が考えられた。

##### 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 8 件)

1. Mitsuhashi Y, Horiuchi A, Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, Shiozawa T. Prognostic significance of Notch signalling molecules and their involvement in the invasiveness of endometrial carcinoma cells. *Histopathology*. 2012; 60: 826-37. (査読あり)
2. Fuseya C, Horiuchi A, Hayashi A, Suzuki A, Miyamoto T, Hayashi T, Shiozawa T. Involvement of pelvic inflammation-related mismatch repair abnormalities and microsatellite

instability in the malignant transformation of ovarian endometriosis. *Hum Pathol*. 2012; 43: 1964-72. (査読あり)

3. Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, Kikuchi N, Konishi I, Seki N, Shiozawa T. 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: 1265-74. (査読あり)
4. Takatsu A, Shiozawa T, Miyamoto T, Kurosawa K, Kashima H, Yamada T, Kaku T, Mikami Y, Kiyokawa T, Tsuda H, Ishii K, Togashi K, Koyama T, Fujinaga Y, Kadoya M, Hashi A, Susumu N, Konishi I. Preoperative differential diagnosis of minimal deviation adenocarcinoma and lobular endocervical glandular hyperplasia of the uterine cervix: a multicenter study of clinicopathology and magnetic resonance imaging findings. *Int J Gynecol Cancer*. 2011; 21: 1287-96. (査読あり)
5. Miyamoto T, Asaka R, Suzuki A, Takatsu A, Kashima H, Shiozawa T. 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: 563-8. (査読あり)
6. Miyamoto T, Ishii K, Asaka R, Suzuki A, Takatsu A, Kashima H, Shiozawa T. Immunohistochemical expression of keratan sulfate: a possible diagnostic marker for carcinomas of the female genital tract. *J Clin Pathol*. 2011; 64: 1058-63. (査読あり)
7. Suzuki A, Horiuchi A, Oka K, Miyamoto T, Kashima H, Shiozawa T. Immunohistochemical detection of steroid receptor cofactors in ovarian endometriosis: involvement of down-regulated SRC-1 expression in the limited growth activity of the endometriotic epithelium. *Virchows Arch*. 2010; 456: 433-41. (査読あり)
8. Fakhry H, Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, Ke H, Konishi I, Shiozawa T. Immunohistochemical detection of histone deacetylases in endometrial carcinoma: involvement of histone

deacetylase 2 in the proliferation of endometrial carcinoma cells. Hum Pathol. 2010; 41: 848-58. (査読あり)

[学会発表] (計 19 件)

1. Asaka R, Miyamoto T, Suzuki A, Ishikawa K, Yamada Y, Kobara H, Shiozawa T : Sirtuin1(SIRT1), a longevity gene, is over-expressed in endometrial carcinoma. 14th International Gynecologic Cancer Society(IGCS) 2012年10月13日~10月16日 Oral Vancouver Canada
2. Yamada Y, Miyamoto T, Asaka R, Ishikawa K, Kobara H, Suzuki A, Shiozawa T : The expression of lipocalin2 in ovarian carcinoma and endometriosis. 14th International Gynecologic Cancer Society(IGCS) 2012年10月13日~10月16日 Poster Vancouver Canada
3. Miyamoto T, Asaka R, Yamada Y, Ishikawa K, Kobara H, Suzuki A, Kashima H, Shiozawa T : Lipocalin2 enhances the proliferation of endometrial carcinoma cells in nude mice. 14th International Gynecologic Cancer Society(IGCS) 2012年10月13日~10月16日 Poster Vancouver Canada
4. 山田 靖、宮本 強、浅香亮一、石川香織、小原久典、鈴木昭久、鹿島大靖、塩沢丹里 : Lipocalin2 は子宮内膜症から発生する卵巣癌で高発現している. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日~9月21日 ポスター 札幌
5. 宮本 強、浅香亮一、山田 靖、石川香織、小原久典、鈴木昭久、鹿島大靖、塩沢丹里 : Lipocalin2 はヌードマウスでの子宮内膜癌細胞の腫瘍増大を促進する. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日~9月21日 口演 札幌
6. 浅香亮一、宮本 強、石川香織、山田 靖、小原久典、鈴木昭久、塩沢丹里 : 正常内膜および子宮内膜癌における Sirtuin1(SIRT1)の発現と機能の検討. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日~9月21日 ポスター 札幌
7. 宮本 強、橘 涼太、近藤沙織、鹿島大靖、浅香志保、藤永康成、塩沢丹里 : 早期卵巣癌におけるリンパ節郭清不要症例の抽出に Multidetector CT および MRI は有用か. 第123回関東連合産科婦人科学会学術集会 2012年6月17日 ワークショップ 東京
8. 宮本 強、浅香亮一、鈴木昭久、鹿島大靖、塩沢丹里 : Lipocalin2 は紫外線照射後およびシスプラチン処理後の子宮内膜癌細胞の生存を促進する. 第64回日本産科婦人科学会学術講演会 2012年4月13日~4月15日 一般講演 神戸
9. 浅香亮一、宮本 強、鈴木昭久、鹿島大靖、塩沢丹里 : 正常子宮内膜および子宮内膜癌における sirtuin1 発現の検討. 2012年4月13日~4月15日 一般講演 神戸
10. Asaka R, Miyamoto T, Suzuki A, Takatsu A, Kashima H, Nakayama J, Shiozawa T : Immunohistochemical expression of Core2  $\beta$ 1-6 N-acetylglucosaminyl transferase 1 in the endometrial carcinoma; a novel potential prognostic factor. Asian Society of Gynecologic Oncology 2011年11月3日~11月5日 Poster korea
11. Miyamoto T, Asaka R, Imanishi T, Kashima H, Shiozawa T : 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. Asian Society of Gynecologic Oncology 2011年11月3日~11月5日 Oral korea
12. 浅香亮一、宮本 強、鈴木昭久、高津亜希子、鹿島大靖、中山 淳、塩沢丹里 : 子宮内膜癌の新規予後因子としての糖転移酵素 C2GnT1 発現. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月3日~10月6日 ポスター 名古屋
13. 宮本 強、浅香亮一、鈴木昭久、高津亜希子、鹿島大靖、塩沢丹里 : Lipocalin2 は、紫外線照射に対する子宮内膜癌細胞の生存能力を上昇させる. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月3日~10月6日 ポスター 名古屋
14. 宮本 強、浅香亮一、鈴木昭久、高津亜希子、鹿島大靖、塩沢丹里 : 子宮内膜癌における lipocalin2 受容体 SLC22A17 発現の検討. 第63回日本産科婦人科学会・総会・学術講演会 2011年8月29日~8月31日 口演 大阪
15. 宮本 強 : 子宮内膜癌発癌に関する基礎的研究、および婦人科悪性腫瘍手術の新たな展開. 松本市・塩筑合同産科婦人科医会 2011年1月19日 講演 松本
16. 宮本 強、石井恵子、小原久典、浅香亮一、高津亜希子、鈴木昭久、鹿島大靖、中山 淳、塩沢丹里 : 子宮内膜腺上皮におけるケラタン硫酸および C2GnT1 発現とその診断への応用. 第49回日本臨床細胞学会秋期大会 2010年11月21日~11月22日 ワークショップ 神戸
17. Takatsu A, Fuseya C, Miyamoto T, Horiuchi A, Shiozawa T : Pre-operative diagnosis and the management of minimal deviation adenocarcinoma (MDA) and lobular endocervical glandular

hyperplasia(LEGH):a  
multi-center, retrospective study .  
International Gynecologic Cancer  
Society(IGCS 2010) 2010年10月23日  
～10月26日 poster Praha Česká  
republika

18. Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, Kikuchi N, Takatsu A, Konishi I, Seki N, Shiozawa T: Microarray analysis of the genes involved in endometrial carcinogenesis: up-regulation of lipocalin2 in neoplastic endometria, and its functional relevance. International Gynecologic Cancer Society(IGCS 2010) 2010年10月23日～10月26日 Oral presentation Praha Česká republika
19. 宮本 強、浅香亮一、鈴木昭久、高津亜希子、堀内晶子、塩沢丹里: 子宮内膜癌における lipocalin2 受容体発現. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010年9月22日～9月24日 一般講演 大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鹿島 大靖 (KASHIMA HIROYASU)  
信州大学・医学部・助教  
研究者番号: 70464089

### (2) 研究分担者

宮本 強 (MIYAMOTO TSUTOMU)  
信州大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 70418721

塩沢 丹里 (SHIOZAWA TANRI)  
信州大学・医学部・教授  
研究者番号: 20235493

### (3) 連携研究者: なし