

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861484

研究課題名(和文) 子宮内膜症由来の卵巣癌発癌進展過程における lipocalin2 の発現と機能の解析

研究課題名(英文) Study for the expression and function of lipocalin 2 in the development of ovarian carcinoma arising from endometriosis

研究代表者

山田 靖 (YAMADA, Yasushi)

信州大学・医学部附属病院・助教(特定雇用)

研究者番号：60646652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)：LCN2免疫染色では、LCN2は子宮内膜症や子宮内膜症との関連が知られている明細胞癌や類内膜癌において高発現していたが、封入嚢胞や漿液性癌ではほとんど発現を認めなかった。またLCN2高発現卵巣癌症例は優位に生存期間が短縮していることを見出した。そこで卵巣明細胞癌細胞株を用いてLCN2の機能解析を行った。LCN2は細胞内の鉄濃度を上昇させたが、活性酸素種ROSや酸化ストレスを上昇させずむしろ軽減し、LCN2は酸化ストレス耐性を増強し、アポトーシスを軽減させていた。その機序としてはCD44バリエーションやxCT発現上昇を介してグルタチオン濃度を上昇させるためと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression of LCN2 in ovarian carcinoma, ovarian endometriosis (OEM) and inclusion cyst (IC) by immunohistochemical staining for LCN2. LCN2 was strongly expressed in OEM, clear cell carcinoma (CCC), and endometrioid carcinoma. In contrast, the expression of LCN2 was weak or negative in IC and serous adenocarcinoma. The patients who were strongly positive for LCN2 had a significantly shorter survival. Therefore, we examined the roles of LCN2 using CCC cell lines. It was indicated that the up-regulated expression of LCN2 correlated with increases intracellular iron concentrations. However, LCN2 reduced intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) and DNA damage. Furthermore, the expression of LCN2 suppressed oxidative stress-induced apoptosis and prolonged cell survival. It was indicated that the mechanisms was related with increasing intracellular glutathione concentration through the up-regulated expression of xCT and CD44 variant by LCN2.

研究分野：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮内膜症性嚢胞 ROS CD44v xCT 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌には主に漿液性癌、粘液性癌、明細胞癌、類内膜癌の4つの組織型があるが、このうち明細胞癌、類内膜癌は子宮内膜症と関連して発生することが知られている。欧米では漿液性癌の頻度が半数以上を占めるの比べ、日本では40%と低く、明細胞癌は欧米の8.4%に対し、日本では24.2%と非常に高いことが特徴的である。この卵巣明細胞癌は期症例が多いにも関わらず、抗癌剤抵抗性で予後不良であるといった特徴があり、我々日本人にとって、その発癌や進行のメカニズムを明らかにすることは重要な課題となっている。

卵巣明細胞癌の発生母地となる子宮内膜症性嚢胞は、内部に鉄が豊富に蓄積した環境であり、鉄はフェントン反応により容易にヒドロキシラジカル等の活性酸素種ROSを発生させるため、子宮内膜症性嚢胞内は、過剰な酸化ストレス状態になっており、子宮内膜症上皮細胞は細胞死が誘導されやすい状態となっている。子宮内膜症性嚢胞の癌化にはまずこの酸化ストレスに耐えて生存し続けることが必要で、生存し続けた細胞に遺伝子変異が生じ、癌化が引き起こされると考えられている。我々は子宮内膜症上皮細胞の生存能力を高める因子として、鉄運搬蛋白であるリポカリン2(LCN2)に注目した。

LCN2は鉄と結合し、細胞内への鉄の取り込みや排出により細胞内の遊離鉄プールを調節し、様々な作用を示すと考えられている。我々はこれまでに子宮内膜症症例においてLCN2が高発現し、予後不良因子となることを報告してきた。本研究では子宮内膜症や卵巣癌におけるLCN2発現や、卵巣明細胞癌細胞株におけるLCN2機能解析を行った。

2. 研究の目的

- (1)子宮内膜症や卵巣癌における LCN2 発現を調べる。
- (2)卵巣明細胞癌細胞株における LCN2 の機能解析(特に LCN2 と酸化ストレスとの関係について)を行う

3. 研究の方法

(1)LCN2 免疫染色：
同意を得て採取した子宮内膜症嚢胞 26 例、正常卵巣の封入嚢胞 17 例、卵巣癌 71 例(明細胞癌 20 例、類内膜癌 19 例、粘液性癌 16 例、漿液性癌 16 例)において免疫染色を行い、LCN2 発現を検討する。評価は 500 細胞中の養成細胞数の割合(%)を示す positivity index(以下 PI)を用いて評価した。

(2)卵巣明細胞癌細胞株を用いた LCN2 機能解析：

卵巣明細胞癌細胞株のうち、LCN2 低発現株である ES2、TOV21G に LCN2 cDNA を導入して LCN2 強制発現した細胞(ES2-LCN2、TOV21G-LCN2)を作成した。LCN2 高発現株で

ある RMG1、OVISE に特異的 shRNA、siRNA 導入により LCN2 発現抑制(RMG1-shRNA、OVISE-siRNA)を行い、それぞれの対照細胞(Control)と共に実験に用いた。細胞内の鉄濃度をカルセイン蛍光で、細胞内の ROS を DCFH-DA 蛍光で、酸化ストレスを 8OHdG 染色、apoptosis を flowcytometry、酸化ストレス耐性、抗癌剤耐性を WST1 assay により評価した。また LCN2 による各種の抗酸化酵素発現を real-time RT-PCR、Western blot(WB)で比較した。さらに抗酸化物質であるグルタチオン(GSH)量を Luciferin-NT を用いた発光アッセイで評価し、CD44 variant isoform(以下 CD44v)xCT 発現を WB にて評価した。酸化ストレスとして過酸化水素を用いた。

4. 研究成果

(1)LCN2 免疫染色結果

正常卵巣の封入嚢胞では PI=0 と LCN2 発現を認めなかったが、子宮内膜症上皮細胞においては、PI=72.3 と強い LCN2 発現を認めた(P<0.05)。卵巣癌においては、子宮内膜症に関連する明細胞癌(平均 PI=62.3)、類内膜癌(平均 PI=50.0)において強い LCN2 発現を認めた。粘液性癌においても平均 PI=24.3 と LCN2 発現を認めたが、漿液性癌においては PI=1.7 と LCN2 発現をほとんど認めなかった(図1)。LCN2 発現を認める明細胞癌、類内膜癌、粘液性癌において、PI 50 の症例は有意に生存期間が短縮していることを見出した(図2)。

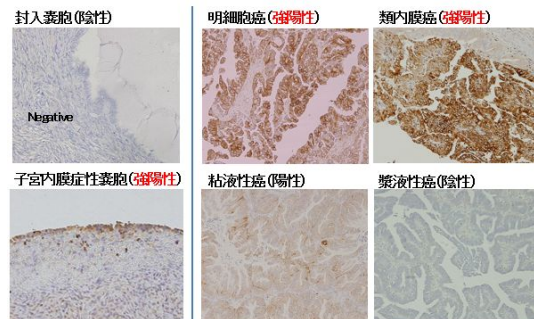


図1：LCN2 免疫染色結果

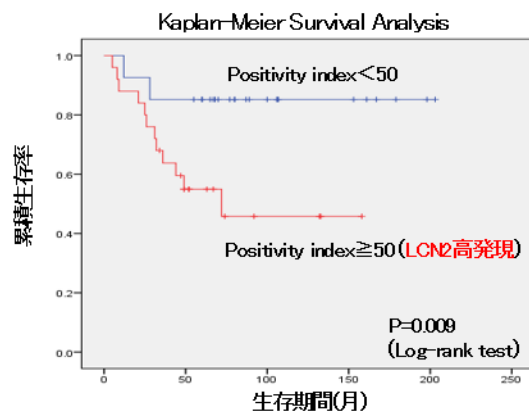


図2：非漿液性卵巣癌の LCN2 発現と累積生存率 (Kaplan-Meier 法)

(2) LCN2 機能解析

(a) LCN2 による細胞内鉄イオン濃度変化

細胞内の鉄イオン濃度をカルセイン蛍光で検討した。この方法では細胞内鉄イオン濃度が増加すると蛍光が减弱する。ES2 細胞のカルセイン蛍光ではコントロール細胞 (ES2-mock) と比べ遺伝子組み換え LCN2 (rLCN2) 添加や ES2-LCN2 では蛍光量が减弱し、LCN2 は細胞内鉄濃度をを上昇させると考えられた (図 3)。

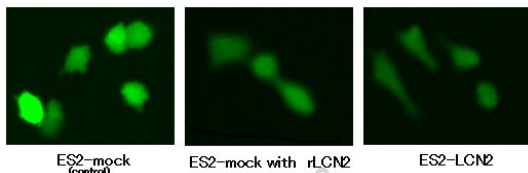


図 3 : ES2 細胞のカルセイン蛍光染色結果

(b) LCN2 による細胞内 ROS 産生変化

細胞内の ROS 産生を DCFH-DA 蛍光で検討した。この方法では ROS 産生が増加すると蛍光が増強する。ROS 産生誘導のため H₂O₂ 添加を行うと、DCFH-DA 蛍光量増加が ES2-mock の 3.33 倍に対し、rLCN2 添加や ES2-LCN2 ではそれぞれ 1.06 倍 (P<0.05) 1.25 倍 (P<0.05) であり (図 4) 8OHdG 染色でも ES2-mock に比べ、rLCN2 添加や ES2-LCN2 で減弱が認められ、予想に反して LCN2 は ROS 産生および酸化ストレスを軽減すると考えられた。

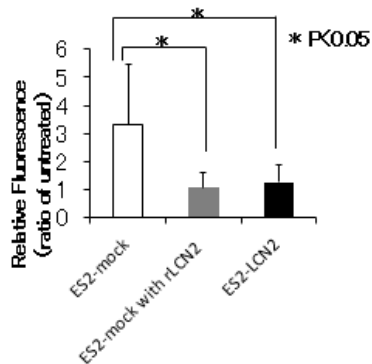


図 4 : DCFH-DA 蛍光量測定結果

(c) LCN2 による酸化ストレス耐性変化

Apoptosis を annexin V/ propidium iodide (PI) 染色による flowcytometry で検討すると、ES2-mock においては H₂O₂ 添加により apoptosis の増加を認めたが、ES2-LCN2 では認めなかった。H₂O₂ 添加の酸化ストレスに対する細胞生存率 (酸化ストレス耐性) を WST-1 アッセイで評価すると、ES2-mock に比し ES2-LCN2 では有意に耐性の増強を認めた。

(d) LCN2 による抗癌剤耐性変化

抗癌剤 (シスプラチン、パクリタキセル) に対しては、ES2 細胞と TOV21G 細胞とも LCN2 発現増強により有意に耐性が増強し、RMG1 細

胞では LCN2 発現抑制により耐性が减弱した。

(e) LCN2 による細胞内グルタチオン (GSH) 濃度変化

LCN2 による酸化ストレス耐性増強機序として細胞内 GSH 濃度に注目した。細胞内 GSH 濃度は ES2、TOV21G 細胞とも LCN2 発現増強により有意に濃度が上昇し、RMG1、OVISE 細胞では LCN2 発現抑制により低下した。

(f) LCN2 による CD44v、xCT 発現変化

ES2 細胞では、Control 細胞 (ES2-mock) 比べ、rLCN2 添加、ES2-LCN2 細胞で CD44v、xCT 発現が増強することが確認された (図 5)。

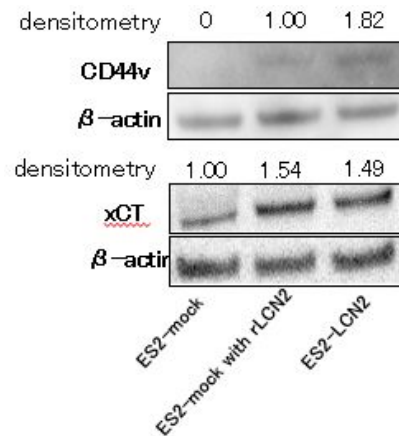


図 5 : ES2 細胞の CD44v、xCT 発現 (ウェスタンブロット)

以上より LCN2 は子宮内膜症性嚢胞内の過剰な酸化ストレス環境下で、CD44v、xCT 発現増強を介してグルタチオン濃度を上昇させ、明細胞癌の酸化ストレス耐性を増強し、その生存を促進すると考えられた。

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 11 件)

1. Yasushi Yamada, Tsutomu Miyamoto, Hiroyasu Kashima, Hiroyasu Kobara, Ryoichi Asaka, Hirofumi Ando, Shotaro Higuchi, Koichi Ida & Tanri Shiozawa. Lipocalin 2 attenuates iron-related oxidative stress and prolongs the survival of ovarian clear cell carcinoma cells by up-regulating the CD44 variant. FREE RADICAL RESERCH. 2016;50:414-25 doi:10.3109/10715762.2015.1134795(査読有)

2. Yamada Y, Miyamoto T, Horiuchi A, Ohya A, Shiozawa T. Polypoid endometriosis of the ovary mimicking ovarian carcinoma dissemination: a case report

and
literature review. J Obstet Gynaecol
Res. 2014; 40:
1426-30.doi:10.1111/jog.12358(査読
有)

3. Kobara H, Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R, Yamada Y, Ishikawa K, Kikuchi N, Ohira S, Shiozawa T. Lipocalin2 enhances the matrix metalloproteinase-9 activity and invasion of extravillous trophoblasts under hypoxia. Placenta. 2013 Nov;34(11):1036-43. doi:10.1016/j.placenta.2013.08.004. Epub 2013 Aug 20.(査読有)

[学会発表](計 9 件)

1. Yasushi Yamada, The 4th Biennial Meeting Asian Society Gynecologic Oncology 2015.11.12 ~ 11.14 Seoul(Korea)
2. 山田 靖, 転写補助因子 nuclear protein1 は lipocalin2 の新規標的候補遺伝子である 第 74 回日本癌学会学術総会 2015.10.8 ~ 10.10 名古屋国際会議場(名古屋)
3. 山田 靖, Lipocalin2 は CD44Variant 発現を介して卵巣明細胞腺癌細胞の酸化ストレス耐性を増強する 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会 2015.4.9 ~ 4.12 パシフィコ横浜(横浜)
4. Yamada Y, Lipocalin2 enhances invasion and survival against oxidative stress of ovarian clear cell carcinoma. 15th International Gynecologic Cancer Society(IGCS) 2014.11.8 ~ 11.11 Melbourne(Australia)
5. 山田 靖, Lipocalin2 は卵巣明細胞腺癌細胞の酸化ストレス耐性を増強する 第 73 回日本癌学会学術総会 2014.9.25 ~ 9.27 パシフィコ横浜(横浜)
6. 山田 靖, Lipocalin2 は卵巣明細胞腺癌細胞の遊走・浸潤を刺激し、酸化ストレス耐性を高める 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 2014.4.18 ~ 4.20 東京国際フォーラム(東京)
7. 山田 靖, Lipocalin2 は卵巣明細胞腺癌細胞の浸潤能を促進し、酸化ストレス耐

性を高める 第 13 回日本婦人科がん分子標的研究会 2014.3.14 ~ 3.15 皆生グランドホテル天水(鳥取)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 靖 (YAMADA Yasushi)
信州大学・医学部附属病院・助教(特定雇用)
研究者番号: 60646652