

# 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	山 田 靖
論文審査担当者	主 査 中 山 淳 副 査 田 中 榮 司・石 塚 修
論文題目	
Lipocalin 2 attenuates iron-related oxidative stress and prolongs the survival of ovarian clear cell carcinoma cells by up-regulating the CD44 variant (リポカリン2は変異型CD44の発現亢進を介して卵巣明細胞癌細胞の鉄関連酸化ストレスを減弱し、生存を促進する)	
<p>【目的】子宮内膜症は子宮外に子宮内膜が増殖する疾患で、卵巣の子宮内膜症では内部に血液が貯留した子宮内膜症性嚢胞(OEM)がしばしば形成される。OEMの約0.7%は癌化し明細胞癌(CCC)や類内膜癌(EC)が発生するが、特に日本人では、抗癌剤抵抗性で予後不良であるCCCの発生頻度が高いことが問題である。OEMの癌化では鉄イオンの関与が注目されている。すなわち、ヘモグロビンから遊離しOEM内に豊富に蓄積した鉄イオンは、フェントン反応から活性酸素種(ROS: reactive oxygen species)を発生させ、酸化ストレスを誘導することで発癌に寄与すると考えられている。</p> <p>Lipocalin 2 (LCN2)は鉄輸送蛋白の1つで、炎症や種々の癌で高発現が報告されており、細胞内鉄濃度の調節から様々な機能を発現すると考えられている。LCN2はその機能上とOEMとの関連が強く示唆されたため、OEMや卵巣癌におけるLCN2の関与を免疫組織染色にて検討したところ、LCN2はOEMやOEMから発生するCCCやECにおいて高発現し、LCN2高発現卵巣癌症例は有意に予後不良であった。そこで今回我々は、LCN2の機能解析を行うために、卵巣CCC細胞株を用いてLCN2と特に鉄イオン、ROSや酸化ストレスとの関係を検討した。</p> <p>【方法】卵巣CCC細胞株であるES2、TOV21G、RMG1、OVISEを用いた。LCN2低発現株であるES2、TOV21GにLCN2 cDNAを導入してLCN2強制発現株(ES2-LCN2、TOV21G-LCN2)を樹立した。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)を行った。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(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を用いた。</p> <p>【結果】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では蛍光量が減弱し、LCN2は細胞内鉄濃度を上昇させると考えられた。一方ROS産生では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加による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&lt;0.05)、1.25倍(P&lt;0.05)であり、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。ES2-mockにおいてはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるapoptosisの増加を認めたが、ES2-LCN2では認めなかった。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加による酸化ストレスに対する耐性のWST-1アッセイによる評価では、ES2-mockに比しES2-LCN2では耐性の増強を認めた。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発現増強により耐性が増強し、RMG1細胞ではLCN2発現抑制により耐性が減弱した。</p>	

ROS の産生抑制機序として細胞内の GSH 濃度に注目した。ES2、TOV21G 細胞とも LCN2 発現増強により GSH 濃度が上昇し、RMG1、OVISE 細胞では LCN2 発現抑制により GSH 濃度が低下することが判明した。そこで GSH 産生促進に作用する CD44v および xCT の蛋白発現を検討したところ、ES2 細胞において rLCN2 添加および LCN2 強制発現により発現が亢進し、また RMG1 細胞においては LCN2 発現抑制により発現が低下し、rLCN2 添加により発現が回復した。この結果から LCN2 は CD44v と xCT の発現亢進を介して細胞内 GSH 濃度を上昇させ、これが ROS の産生を低下させたと考えられた。

**【結論】** LCN2 は卵巣 CCC 細胞において細胞内鉄濃度を上昇させたが ROS 産生はむしろ抑制した。LCN2 は CD44v および xCT の発現上昇を介して細胞内 GSH 濃度を上昇させ ROS 産生を抑制することにより、酸化ストレス耐性増強や抗癌剤耐性増強に関与すると考えられた。