

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：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293339

研究課題名(和文) 子宮内膜癌における新規癌遺伝子 lipocalin2 を標的とした治療法の開発

研究課題名(英文) Study for development of the therapy targeting the novel oncogene lipocalin2 in endometrial carcinoma

研究代表者

宮本 強 (MIYAMOTO, Tsutomu)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：70418721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000 円

研究成果の概要(和文)：HHUA細胞のLCN2発現にはNF- κ Bや鉄イオンは影響していないと考えられた。HHUA、RL95-2、HEC1B細胞では、LCN2はシスプラチン(CDDP)耐性を増強するが、その作用には鉄イオンが関与するもののPI3K経路やMAPK経路は関与しないと考えられた。またLCN2は足場非依存性コロニー形成能を亢進し、癌幹細胞マーカーであるCD44v9やCD133を増強した。このことはLCN2が癌幹細胞性の維持・増強に関与し、それにより抗癌剤耐性を増強している可能性が考えられた。また、これらのLCN2作用における下流因子の候補として、マイクロアレイ解析によりNUPR1を見出した。

研究成果の概要(英文)：Using luciferase-reporter assay, we demonstrated that NF- κ B and Ferric ion did not affect to the control of the LCN2 expression in HHUA cells. We also demonstrated that LCN2 significantly enhanced the cisplatin (CDDP) resistance by WST-1 assay using HHUA, RL95-2 and HEC1B cells. This effect was depend on ferric ion, but was independent from PI3K pathway and MAPK pathway. LCN2 significantly enhanced the anchorage-independent colony-formation ability, and enhanced the protein expression of CD44v9 and CD133, which is known as cancer stem cell markers. These results suggested that LCN2 might be involved in the maintenance and enhancement of the cancer stem cell properties, which might be inducing chemo-resistance. In addition, we found NUPR1 as a candidate for the downstream factors of LCN2 effects by microarray analysis.

研究分野：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：lipocalin2 子宮内膜癌 抗癌剤耐性 癌幹細胞マーカー マイクロアレイ 造腫瘍能

1. 研究開始当初の背景

わが国の子宮内膜癌罹患数は急速に増加しており、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、ミスマッチ修復異常 (Miyamoto T, et al. *Endocrinology*. 2006; Peiró G, et al. *Hum Pathol*. 2002)、PTEN-PI3K (Hayes MP, et al. *Clin Cancer Res*. 2006)、K-ras (Mizuuchi H, et al. *Cancer Res*. 1992)、p53 (Feng YZ, et al. *Virchows Arch*. 2005)など種々の遺伝子異常が加重されると想像されるが、これらの遺伝子異常が報告されているものは約6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。しかもこれらの遺伝子の単独の異常で癌化を引き起こすことは困難でもあり、まだ見出されていない重要な遺伝子が存在することが予想される。

このため、我々は子宮内膜癌発癌・進展に関わる新規遺伝子を探索する目的で、laser captured microdissection (LCM)法を用い、同一症例の新鮮凍結組織切片から正常子宮内膜腺上皮、異型増殖症、内膜癌部分のみを正確に採取し、microarray および real-time RT-PCR による定量的解析を経て、内膜癌で発現が著明に亢進する分子として lipocalin2 (LCN2)を見出した (Miyamoto T, et al. *Hum Pathol*. 2011)。

LCN2 は 25kD の分泌蛋白で、近年では特に細胞外の鉄イオンを細胞内に取り込み、局所の鉄イオン濃度を調節することにより細胞の増殖・浸潤・遊走・生存等の種々の効果を示すことが注目されている。(Devireddy LR, et al. *Cell*. 2005、Chakraborty S, et al. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012)。さらに LCN2 は乳癌、食道癌、膵臓癌などでも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 (Bauer M, et al. *Breast Cancer Res Treat*. 2008; Chakraborty S, et al. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012)。

まず我々は免疫染色で LCN2 蛋白発現を検討し、mRNA 同様に正常、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、内膜癌においては高い組織学的 Grade、進行期癌症例、脈管侵襲陽性例などで発現が亢進していた。また LCN2 を強制発現させた内膜癌細胞では浸潤能の亢進がみられた (Miyamoto T, et al. *Hum Pathol*. 2011)。LCN2 の細胞表面受容体である SLC22A17 蛋白発現も有意に内膜癌で亢進しており、LCN2、SLC22A17 両因子の同時高発現は、独立した予後不良因子であった (Miyamoto T, et al. *Exp Mol Pathol*. 2011)。このように LCN2 は内膜癌の悪性度の獲得に関与すると考えられた。さらに LCN2 遺伝子導入により NIH3T3 細胞の形質転換を引き起こすことを見出しており、LCN2 が内膜癌の新規癌遺伝子である可能性が強く示唆された。また、これまでの我々の検討から LCN2 は低酸素

や紫外線などのストレスに対して内膜癌細胞の生存能力を高めること、その作用には鉄イオン依存性の Akt 経路の活性化が関与すること、また LCN2 がヌードマウスでの腫瘍形成能を増強させることなどを見出した。これらのことから LCN2 は内膜癌の新規治療標的となる可能性があり、その機能解析を行う意義は大きい。

2. 研究の目的

本研究では、子宮内膜癌における LCN2 の発癌をはじめとする生物学的機能をさらに明らかにし、子宮内膜癌の新たな分子標的とした治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) ルシフェラーゼレポーターアッセイ
LCN2 プロモーター領域の配列を用い、ルシフェラーゼレポーターアッセイで LCN2 転写活性を検討した。

(2) LCN2 発現抑制および強制発現子宮内膜癌細胞の作成

子宮内膜癌細胞株のうち、LCN2 高発現である HHUA, RL95-2 細胞では shRNA 法で LCN2 発現を抑制し (LCN2 shRNA)、LCN2 低発現である HEC1B 細胞では cDNA 導入により LCN2 を強制発現させた細胞 (LCN2 cDNA) を作成し (図 1)、以下の実験に用いた。それぞれの対象細胞を Control とした。

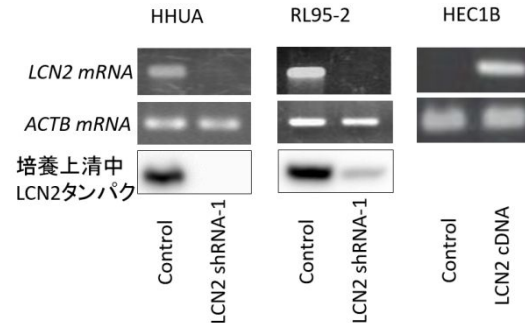


図 1 : 作成した細胞の LCN2 発現 (*PLoS One*. 2016; 11:e0155220.)

(3) 抗がん剤耐性実験

シスプラチン (CDDP) 添加 72 時間後の細胞生存率 (= 抗がん剤耐性) を、WST-1 アッセイによって検討した。

(4) 腫瘍形成能アッセイ

HHUA Control および LCN2 shRNA 細胞の足場非依存性コロニー形成能を測定するため、それぞれの細胞を軟寒天中に 1200 細胞ずつまき、4 週間後のコロニー数を測定した。また、非接着性 dish (6 well) を用いた Sphere 形成アッセイでは、12000 細胞ずつまき、2 週間後の Sphere 形成数を計測した。

(5) ウェスタンブロット

rLCN2 添加下に 10 日間培養し、各細胞を回収し、蛋白抽出した。CD44v9 抗体は variant exon9 を認識するが、バンドの出現位置および RT-PCR 結果から、CD44v9 抗体で認識されるタンパクが CD44v8-10 であることを確認している。

(6) マイクロアレイ解析

HHUA control と LCN2 shRNA 細胞において定常培養状態と CDDP 添加 48 時間後の細胞を回収し、RNA 抽出し、マイクロアレイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) LCN2 発現における NF κ B の関与

LCN2 発現の制御には NF κ B が関与していることが報告されている。しかし HHUA 細胞における LCN2 転写活性は NF κ B 結合領域を持たない場合でも残存しており、NF κ B 阻害薬 (SN50) 添加によっても転写活性は低下しなかった。さらに FeCl₃ や鉄キレート剤 (DFO) 添加も転写活性に影響しなかった。このことから HHUA 細胞の LCN2 発現には NF κ B や鉄イオンは影響していないと考えられた。

(2) LCN2 発現変化の CDDP 耐性への影響

HHUA および RL95-2 細胞では、LCN2 発現抑制 (LCN2-shRNA) により CDDP 耐性の有意な減弱が観察された。一方、HEC1B では LCN2 発現増強によりシスプラチン耐性が有意に増強した (図 2)。

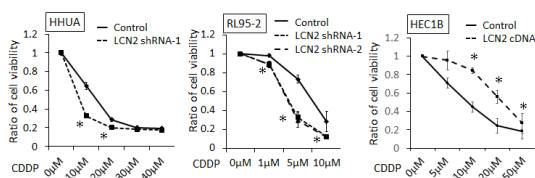


図 2 : 各細胞の CDDP 添加 72 時間後の細胞生存率 (CDDP 耐性) (WST-1 アッセイ) (PLoS One. 2016; 11:e0155220.)

HHUA-Control の CDDP 耐性は、鉄キレート剤 DFO を添加すると LCN2 shRNA 細胞と同レベルまで低下した (図 3a)。一方、PI3K 経路の阻害薬である wortmannin (Wort) や MAPK 経路阻害薬 U0126 の添加では HHUA-Control の CDDP 耐性減弱は確認できなかった (図 3b)。このことから LCN2 による CDDP 耐性は鉄依存的であるが PI3K 経路や MAPK 経路には依らないものと考えられた。

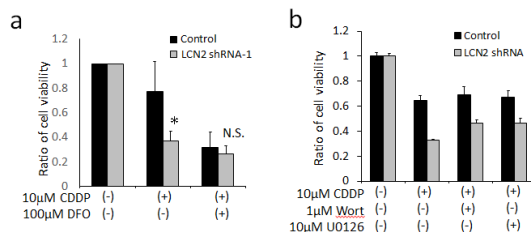


図 3 : HHUA 細胞の抗がん剤耐性 (WST-1 アッセイ) への各種薬剤の影響 (PLoS One. 2016; 11:e0155220.)

(3) LCN2 の癌幹細胞性への影響

(a) 腫瘍形成能

腫瘍形成能は癌幹細胞性の重要な指標であり、これを検討するために軟寒天培地を用いた足場非依存性コロニー形成アッセイを行った。HHUA では Control に比較し LCN2 shRNA 細胞でコロニー数が有意に減少したが、recombinant LCN2 (rLCN2) の添加によりコロニー数が回復することが観察された (図 4)。

さらに Sphere 形成アッセイにおいても LCN2 shRNA 細胞では有意に Sphere 数が減少していた。これらのことから LCN2 は癌幹細胞性の維持や増強に関与し、腫瘍形成能を増強している可能性が考えられた。また、このことは先行したマウスでの腫瘍形成実験の結果とも矛盾しない。

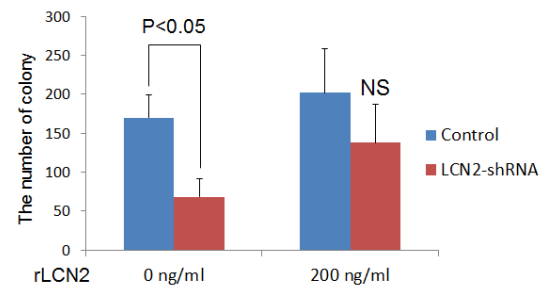


図 4 : HHUA 細胞の足場非依存性コロニー形成アッセイ

(b) 癌幹細胞マーカー発現

CD44 variant isoform (CD44v9) および CD133 は癌幹細胞マーカーとして知られ、またこれらの高発現は抗癌剤耐性に関与するとの報告がある。HHUA, RL95-2 細胞のいずれも LCN2 shRNA 細胞で CD44v9 および CD133 蛋白発現が減弱し、rLCN2 添加によりそれらの発現が回復することが観察された (図 5)。興味深いことに mRNA 発現は CD44 および CD133 とも変化はなく、これらの蛋白発現増強は転写後の調節によると考えられた。

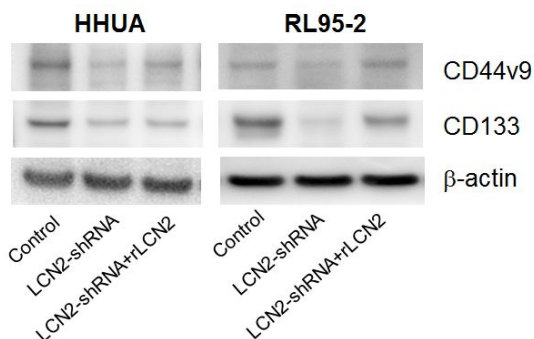


図 5 : HHUA, RL95-2 細胞における CD44v9, CD133 蛋白発現 (ウェスタンブロット)

さらに HHUA 細胞では CD44v9 と協調して作用するシスチントランスポーター-xCT の発現やシスチンを基質として合成される抗酸化物質グルタチオンの細胞内濃度が、CD44v9 同様に LCN2 shRNA 細胞で減少し、rLCN2 添加により回復することが観察された。このことは抗癌剤耐性に関与することが報告されており、LCN2 は癌幹細胞性を維持・増強し、癌幹細胞マーカー発現を増強させることにより、抗癌剤耐性や、細胞障害性ストレスに対する生存能を増強する可能性が考えられた。

(4) LCN2 下流経路の検索

以上のような LCN2 の作用を示すための下流の経路が不明である。そこで、HHUA control と LCN2 shRNA 細胞で遺伝子発現差を網羅的に解析した。また、同様に卵巣癌細胞株 RMG-1, ES2 の結果と合わせて検討を行った。その結果 3 細胞株に共通して、LCN2 高発現時に発現増強する因子として、Nuclear protein-1 (NUPR1)が見出された。また CDDP 添加時に HHUA LCN2 shRNA 細胞に比べ control 細胞で 3 倍以上発現が増強する因子として ZNF491、DQX1、LINC00638、NPIPA5 の 4 遺伝子が見出された。これらは LCN2 による抗癌剤耐性増強に係る候補因子と考えている。

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. Miyamoto T, Kashima H, Yamada Y, Kobara H, Asaka R, Ando H, Higuchi S, Ida K, Mvunta DH, Shiozawa T. Lipocalin 2 Enhances Migration and Resistance against Cisplatin in Endometrial Carcinoma Cells. *PLoS One*. 2016 May 11; 11(5):e0155220. doi: 10.1371/journal.pone.0155220. eCollection 2016. (査読有)
2. Mvunta DH, Miyamoto T, Asaka R, Yamada Y, Ando H, Higuchi S, Ida K, Kashima H, Shiozawa T. Overexpression of SIRT1 is Associated With Poor Outcomes in Patients With Ovarian Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016 Feb 9. [Epub ahead of print] (査読有)
3. Yamada Y, Miyamoto T, Kashima H, Kobara H, Asaka R, Ando H, Higuchi S, Ida K, Shiozawa T. Lipocalin 2 attenuates iron-related oxidative stress and prolongs the survival of ovarian clear cell carcinoma cells by up-regulating the CD44 variant. *Free Radic Res*. 2016; 50: 414-25. doi: 10.3109/10715762.2015.1134795. (査読有)
4. Asaka R, Miyamoto T, Yamada Y, Ando H, Mvunta DH, Kobara H, Shiozawa T. Sirtuin 1 promotes the growth and cisplatin resistance of endometrial carcinoma cells: a novel therapeutic target. *Lab Invest*. 2015; 95: 1363-73. doi: 10.1038/labinvest.2015.119. (査読有)
5. Kashima H, Wu RC, Wang Y, Sinno AK, Miyamoto T, Shiozawa T, Wang TL, Fader AN, Shih IeM. Laminin C1 expression by uterine carcinoma cells is associated with tumor progression. *Gynecol Oncol*. 2015; 139: 338-44. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.08.025. (査読有)
6. Ke H, Suzuki A, Miyamoto T, Kashima H, Shiozawa T. 4-hydroxy estrogen induces DNA damage on codon 130/131 of PTEN in endometrial carcinoma cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2015; 400: 71-7. doi: 10.1016/j.mce.2014.10.027. (査読有)
7. Utsuno H, Miyamoto T, Oka K, Shiozawa T. Morphological alterations in protamine-deficient spermatozoa. *Hum Reprod*. 2014; 29: 2374-81. doi: 10.1093/humrep/deu225. (査読有)
8. 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)
9. 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; 34: 1036-43. doi: 10.1016/j.placenta.2013.08.004. (査読有)
10. Takatsu A, Miyamoto T, Fuseya C, Suzuki A, Kashima H, Horiuchi A, Ishii K, Shiozawa T. Clonality analysis suggests that STK11 gene mutations are involved in progression of lobular endocervical glandular hyperplasia (LEGH) to minimal deviation adenocarcinoma (MDA). *Virchows Arch*. 2013; 462: 645-51. doi: 10.1007/s00428-013-1417-1. (査読有)
11. Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R, Ishikawa K, Yamada Y, Kobara H, Nakayama J, Shiozawa T. Immunohistochemical expression of core 2 1,6-N-acetylglucosaminyl transferase 1 (C2GnT1) in

endometrioid-type endometrial carcinoma: a novel potential prognostic factor. Histopathology. 2013; 62: 986-93. doi: 10.1111/his.12107. (査読有)

[学会発表](計 8件)

1. **Tsutomu Miyamoto, Yasushi Yamada, Hisanori Kobara, Hirofumi Ando, David Hamisi Mvunta, Shotaro Higuchi, Koichi Ida, Hiroyasu Kashima, Tanri Shiozawa.** Identification of genes involved in lipocalin2-mediated cisplatin-resistance of endometrial carcinoma cells. 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)
2. **宮本 強, 山田靖, 小原久典, 浅香亮一, 安藤大史, 樋口正太郎, 鹿島大靖, 塩沢丹里.** 鉄輸送蛋白 Lipocalin2 は子宮内膜癌細胞において癌幹細胞マーカーCD44v および CD133 の発現を増強する. 第67回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 2015.4.9~4.12 パシフィコ横浜(横浜)
3. **Tsutomu Miyamoto, Yasushi Yamada, Hirofumi Ando, Hisanori Kobara, Akiko Takatsu, Shotaro Higuchi, Hiroyasu Kashima, Tanri Shiozawa.** Lipocalin2 increases cisplatin resistance via elevated expression of CD44v8-10 and CD133. 15th International Gynecologic Cancer Society(IGCS)2014.11.8 ~ 11.11 Melbourne(Australia)
4. **Tsutomu Miyamoto, Yasushi Yamada, Hirofumi Ando, Hisanori Kobara, Akiko Takatsu, Shotaro Higuchi, Hiroyasu Kashima, Tanri Shiozawa.** Lipocalin2 increases the chemo-resistance via elevated expression of CD44V8-10 and CD133 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)
5. **宮本 強, 山田靖, 小原久典, 浅香亮一, 安藤大史, 石川香織, 鈴木昭久, 鹿島大靖, 塩沢丹里.** Lipocalin2 はPI3K 経路非依存性にシスプラチン投与後の細胞生存を上昇させる 第66回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 2014.4.18~20 東京国際フォーラム(東京)
6. Tsutomu Miyamoto, Yasushi Yamada, Hisanori Kobara, Ryoichi Asaka, Hirofumi Ando, Kaori Ishikawa, David Hamisi Mvunta, Akihisa Suzuki, Tanri Shiozawa. Lipocalin2 accelerates tumor growth and functions as a novel oncovene in endometrial carcinoma cell. ASGO 2013.12.13~12.15 ウェスティンホテル京都(京都)
7. **宮本 強, 浅香亮一, 山田靖, 小原久典, 石川香織, 鈴木昭久, 塩沢丹里.** 鉄運搬に関わる Lipocalin2 は子宮内膜癌で新規がん遺伝子として機能する 第65回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 2013.5.10~5.12 ロイトン札幌(札幌)
8. **Tsutomu Miyamoto, Yasushi Yamada, Ryoichi Asaka, Hirofumi Ando, Kaori Ishikawa, Hisanori Kobara, Akihisa Suzuki, Tanri Shiozawa.** Lipocalin2, an iron transporter, functions as a novel oncogene and enhances the proliferation and survival of endometrial carcinoma cell American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013.4.7 Washington, DC(USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 強 (MIYAMOTO, Tsutomu)
信州大学・学術研究院医学系(医学部
附属病院)・講師
研究者番号: 70418721

(2) 研究分担者

塩沢 丹里 (SHIOZAWA, Tanri)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号: 20235493

小原 久典 (KOBARA, Hisanori)
信州大学・学術研究院医学系・助教
研究者番号: 30598818

山田 靖 (YAMADA, Yasushi)
信州大学・学術研究院医学系(医学部
附属病院)・助教(特定雇用)
研究者番号: 60646652