



Title	L1CAM発現が子宮体癌の悪性形質に及ぼす影響に関する検討
Author(s)	黒須, 博之
Description	配架番号 : 2988
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16895号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16895
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99740
Type	doctoral thesis
File Information	KUROSU_Hiroyuki.pdf, 全文



学 位 論 文

L1CAM 発現が子宮体癌の悪性形質に及ぼす影響に 関する検討

(Study on the Effects of L1CAM Expression on the Malignant
Phenotype of Endometrial Cancer)

2026 年 3 月

北 海 道 大 学

黒 須 博 之

学 位 論 文

L1CAM 発現が子宮体癌の悪性形質に及ぼす影響に 関する検討

(Study on the Effects of L1CAM Expression on the Malignant
Phenotype of Endometrial Cancer)

2026 年 3 月

北 海 道 大 学

黒 須 博 之

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	6 頁
緒言	9 頁
実験方法	16 頁
結果	28 頁
考察	45 頁
結論	48 頁
謝辞	50 頁
利益相反	51 頁
引用文献	52 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Hiroyuki Kurosu, Hiroshi Asano, Alaa-eldin Salah-eldin, Kazuya Hamada, Shugo Tanaka, Asuka Ishii, Issei Kawakita, Kentaro Kumagai, Kensuke Nakazono, Yuko Katayama, Rino Saito, Chihiro Terasaka, Sari Iwasaki, Satoshi Tanaka, Atsushi Niida, Hidemichi Watari, Koji Taniguchi
L1CAM promotes human endometrial cancer via NF- κ B activation
Cancers (Basel), 18(2), 198, (2026)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 黒須博之、浜田和也、田中秀五、河北一誠、熊谷健太郎、中園謙介、渡利英道、谷口浩二
子宮体癌における L1CAM の機能解析
第 103 回北海道医学大会病理分科会（第 56 回北海道病理談話会）2023 年 9 月 16 日・札幌
2. 黒須博之、谷口浩二、浜田和也、田中秀五、河北一誠、熊谷健太郎、渡利英道
子宮体癌における L1CAM の発現が及ぼす影響（Effect of L1CAM expression in endometrial cancer）
第 82 回日本癌学会学術総会 2023 年 9 月 21 日-23 日・横浜
3. 黒須博之、朝野拓史、谷口浩二、渡利英道
L1CAM の発現が子宮体癌に及ぼす影響に関する検討
第 22 回日本婦人科がん分子標的研究会 2023 年 11 月 17 日-18 日・山形
4. 黒須博之、朝野拓史、櫻井愛美、松宮寛子、山崎博之、遠藤大介、井平圭、三田村卓、金野陽輔、谷口浩二、渡利英道
子宮体癌において L1CAM が予後不良因子となりうる機序に関する検討
第 76 回日本産科婦人科学会学術講演会 2024 年 4 月 19 日-21 日・横浜
5. 黒須博之、朝野拓史、櫻井愛美、松宮寛子、山崎博之、遠藤大介、井平圭、三田村卓、金野陽輔、谷口浩二、渡利英道
子宮体癌細胞株を用いた L1CAM 発現変動に伴う分子生物学的変化の検討
第 66 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 2024 年 7 月 18 日-20 日・鹿児島
6. 黒須博之、朝野拓史、田中秀五、河北一誠、熊谷健太郎、中園謙介、齋藤梨乃、寺坂千尋、浜田和也、岩崎沙理、田中敏、山本早姫、渡利英道、谷口浩二
子宮体癌における L1CAM-NF- κ B 経路の役割の解明（Elucidation of the role of L1CAM-NF- κ B pathway in human endometrial cancer）
第 84 回日本癌学会学術総会 2025 年 9 月 25 日-27 日・金沢

7. 黒須博之、朝野拓史、谷口浩二、渡利英道

子宮体癌予後不良因子としての L1CAM の機能

第 24 回日本婦人科がん分子標的研究会 2025 年 11 月 28 日-29 日・唐津

要旨

【背景と目的】

子宮体癌は婦人科悪性腫瘍の中で最も罹患数の多い疾患であり、特に先進国においてその発生率と死亡率が増加傾向にある。子宮体癌の約 70%は早期癌として診断され、I 期の 5 年生存率は 90%以上と良好である。一方で進行癌や漿液性癌、明細胞癌といった組織型では予後が不良である。本邦における 2001 年治療開始症例と 2017 年治療開始症例の 5 年生存率を比較すると III 期および IV 期では 16 年を経ても予後の改善が見られていない。これらの予後不良症例に対する新規治療開発が課題となっている。L1 cell adhesion molecule (L1CAM) はイムノグロブリンスーパーファミリーに属する 200-220kDa の膜貫通型糖タンパク質である。神経発達における細胞接着分子として同定された L1CAM は、その後、子宮体癌、卵巣癌、膠芽腫など、多くの悪性腫瘍において過剰発現していることが報告されている。L1CAM の高発現は、腫瘍の進行期、転移および予後不良との関連が示唆されており、上皮間葉転換や悪性度の高い腫瘍表現型、化学療法抵抗性との関与も報告されている。子宮体癌においても、L1CAM の高発現は全生存期間の短縮、再発リスク上昇、遠隔転移やリンパ節転移の増加、化学療法抵抗性といった予後不良因子として報告されているが、腫瘍進行における分子メカニズムはいまだに明らかではない。本研究では子宮体癌の悪性形質に及ぼす L1CAM の役割とその分子機構を明らかとすることを目的とした。

【材料と方法】

本研究では、複数のヒト子宮体癌細胞株を用いて L1CAM の生物学的意義を検討した。まず、レンチウイルスベクターを用いて short hairpin RNA (shRNA) または発現プラスミドを導入し、L1CAM をノックダウンあるいは過剰発現させた細胞株を作製した。これらの細胞株を用いて、real-time PCR や Western blotting による発現解析を行い、さらに細胞増殖や細胞周期、アポトーシスに関する機能解析を実施した。RNA sequence (RNA-seq) 解析の結果、L1CAM の発現変化が nuclear factor kappa B (NF- κ B) 経路に影響を及ぼすことが示唆されたため、その下流シグナルについて詳細な解析を行った。L1CAM ノックダウン下で NF- κ B を活性化することで、増殖抑制が回復するか否かを、細胞増殖アッセイや細胞周期解析で検証した。さらに、シスプラチン (CDDP) や I kappa B kinase (IKK) 阻害薬を用いた薬剤感受性試験を行い、L1CAM の治療抵抗性への関与を検討した。また、北海道大学病院婦人科で手術療法を施行した子宮体癌症例から作製した tissue microarray (TMA) を用いて免疫組織化

学染色を行い、臨床検体における L1CAM 発現と NF- κ B の核内局在との関連を評価した。

【結果】

ヒト子宮体癌細胞株に対して *L1CAM* shRNA や *L1CAM* 発現ベクターを導入した結果、*L1CAM* の messenger RNA (mRNA) とタンパク質発現の変化が確認された。*L1CAM* をノックダウンすると、細胞増殖は有意に抑制された。また、細胞周期解析により G0/G1 期からの進行が抑制されていることが明らかとなった。一方で、アポトーシスには有意な変化は認められなかった。一方、*L1CAM* を過剰発現させると、細胞増殖は促進され、G0/G1 期から S 期への移行が亢進した。*L1CAM* のノックダウンにより NF- κ B (p65) のリン酸化が低下し、NF- κ B シグナル経路が阻害され、*tumor necrosis factor* (*TNF*) や *lymphotoxin beta* (*LTB*) などの下流標的遺伝子の発現も抑制された。これに対し、*L1CAM* の過剰発現により NF- κ B (p65) のリン酸化が促進され、*TNF* 発現が上昇した。さらに、*L1CAM* ノックダウン下で、恒常的活性型 IKK β を発現させると、*L1CAM* のノックダウンによる増殖低下が回復した。子宮体癌患者サンプルの TMA 検体の免疫組織化学染色では、*L1CAM* 発現と NF- κ B (p65) 核内陽性率の間に有意な相関が認められた。また、ヒト子宮体癌細胞株において *L1CAM* をノックダウンするとシスプラチン感受性が増強され、シスプラチンと IKK 阻害薬の併用は、より強い細胞増殖抑制効果を示した。

【考察】

本研究により、ヒト子宮体癌において *L1CAM* は細胞増殖を促進し、高悪性形質の獲得に寄与することが明らかとなった。ヒト子宮体癌細胞株において *L1CAM* をノックダウンすると増殖能が低下し、*L1CAM* を過剰発現すると増殖が促進されたことから、臨床データから提示されているように、子宮体癌において *L1CAM* が悪性度を規定する重要な分子であることが示唆された。また、*L1CAM* ノックダウンによる増殖抑制が恒常的活性型 IKK β の導入により回復したことから、NF- κ B が *L1CAM* の主要な下流エフェクターとして機能することが示された。さらに *L1CAM* の発現変化に伴い、NF- κ B 活性や *TNF*、*LTB* の発現が変化したことから、*L1CAM*-NF- κ B 経路における正のフィードバック機構の存在が示唆された。シスプラチンと IKK 阻害薬の併用が細胞増殖に対してより強い抑制効果を示したことから、*L1CAM*-NF- κ B 経路が *L1CAM* 高発現子宮体癌における薬剤耐性に関与している可能性が示唆された。一方で、*L1CAM*-NF- κ B 経路に関与する分子の有無などに対する検証や、本研究で示した *in vitro* 解析の結果が *in vivo* でも同様に機能しているのかの検証は、今後の課題である。ヒト TMA 検体解析では、*L1CAM* 発現と NF- κ B の核内局在の相関が示されたが、治療効果予測マーカーとしての有用性については、腫瘍内不均一性を考慮した手

術検体を用いた評価や、腫瘍へのリンパ球浸潤の有無など、さらなる検証が必要であると考えられる。

【結論】

L1CAM は子宮体癌において細胞周期進行を亢進させることで細胞増殖を促進し、腫瘍の悪性形質の獲得に関与することが明らかとなった。その作用機序として、L1CAM の下流における NF- κ B 経路の活性化が中心的役割を果たしていることが示された。さらに、L1CAM-NF- κ B 経路は、子宮体癌における予後不良および薬剤抵抗性に関与しており、本経路を標的とした治療戦略は、L1CAM 高発現子宮体癌に対する新たな治療選択肢となる可能性がある。

略語表

本文中および図表で使用した略語は以下のとおりである。

7-AAD, 7-amino-actinomycin D

ADC, antibody-drug conjugate

AMP, adenosine monophosphate

AP 療法, adriamycin/cisplatin combination therapy

cAMP, cyclic AMP

CDDP, cisplatin

cDNA, complementary DNA

Ctrl, control

DAVID, Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery

DNA, deoxyribonucleic acid

DEG, differentially expressed genes

DMSO, dimethyl sulfoxide

DUSP, dual specificity phosphatase

EGF, epidermal growth factor

EPFL, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne

ERBT, external beam radiotherapy

ERK, extracellular signal-regulated kinase

FAK, focal adhesion kinase

FBS, fetal bovine serum

FGF, fibroblast growth factors

FIGO, the International Federation of Gynecology and Obstetrics

FITC, fluorescein isothiocyanate

GAPDH, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase

GEO, Gene Expression Omnibus

HEK293T, Human Embryonic Kidney 293T

HRP, horseradish peroxidase

IC50, half maximal Inhibitory Concentration

IKK, I kappa B kinase

IKKi, I kappa B kinase inhibitor

JAK, janus kinase

KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

L1CAM, L1 cell adhesion molecule
LTB, lymphotoxin beta
LTBR, lymphotoxin beta receptor
MAPK, mitogen-activated protein kinase
MMR, mismatch repair
MSI, microsatellite instability
mRNA, messenger RNA
Na₃VO₄, Sodium Orthovanadate
NEMO, NF-κB essential modulator
NF-κB, nuclear factor kappa B
OE, over expression
ORF, open reading frame
PBS, phosphate-buffered saline
PBST, phosphate-buffered saline with Tween 20
PCR, polymerase chain reaction
PGE2, prostaglandin E2
PI, propidium iodide
PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase
POLE, DNA polymerase epsilon
ProMisE, Proactive Molecular Risk Classifier for Endometrial Cancer
PVDF, Poly Vinylidene Di Fluoride
RCT, randomized controlled trial
RIN, RNA integrity number
RNA, ribonucleic acid
RNA-seq, RNA sequence
SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
SEM, standard error of the mean
shRNA, short hairpin RNA
STAT, signal transducer and activator of transcription
TCGA, The Cancer Genome Atlas
TC 療法, paclitaxel/carboplatin combination therapy
TMA, tissue microarray
TMB, tumor mutational burden
TNF, tumor necrosis factor

TNFR, tumor necrosis factor receptor

緒言

1. 子宮体癌とは

子宮体癌は、世界的に最も一般的な婦人科悪性腫瘍の一つであり、特に先進国において、加齢、肥満、メタボリックシンドロームなどの生活習慣要因により発生率が増加しており、女性では6番目に多い癌となっている（Yang *et al.*, 2023; Bray *et al.*, 2024）。本邦においても、2021年の罹患数は19,071例と婦人科悪性腫瘍の中で最多である（国立がん研究センター, 2026）（図1A）。一方で子宮体癌は早期癌で診断されることが多く、2024年の死亡数は3,126人となっており、婦人科系悪性腫瘍の中では最少である（図1B）。子宮体癌はI期症例が70%以上を占め、I期の5年生存率は94.9%と予後良好であるが、III、IV期症例では5年生存率がそれぞれ72.7%、28.9%と低い（図1C）。また組織型別にみると、類内膜癌G1およびG2の5年生存率はそれぞれ95.9%、90.3%と良好なのに対して、類内膜癌G3では76.7%、漿液性癌および明細胞癌では60.9%、71%と不良であり、予後不良例に対する治療開発が課題となっている（日本産科婦人科学会, 2010; 日本産科婦人科学会, 2025）。

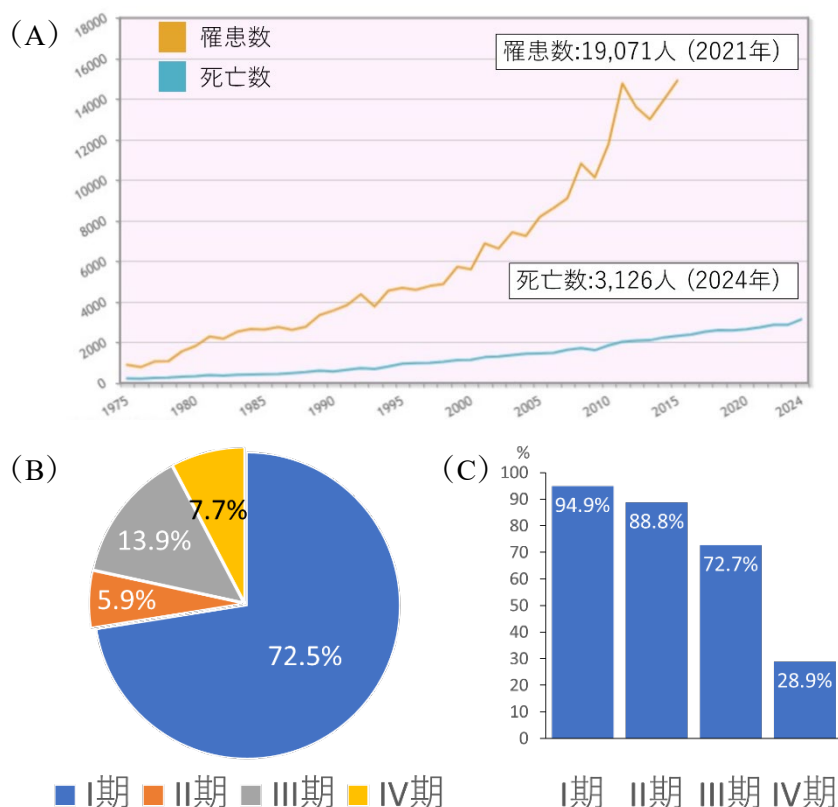


図1 本邦における子宮体癌の現状

(A) 子宮体癌の罹患数と死亡数の年次推移（国立がん研究センター, 2026より改変）
(B) 子宮体癌の進行期割合（日本産科婦人科学会, 2025より作成）
(C) 5年生存率（日本産科婦人科学会, 2025より作成）

2. 子宮体癌の分類

子宮体癌は、高分化類内膜癌に代表されるエストロゲン依存性の Type I と、漿液性癌および明細胞癌に代表される非依存性の Type II に大別されてきた (Bokhman, 1983) (表 1)。

表 1 従来の子宮体癌分類 (Bokhman, 1983 より作成)

	Type1	Type2
エストロゲン依存性	あり	なし
主な組織型	類内膜癌	漿液性癌、明細胞癌
分化度	高、中分化	低分化
予後	比較的良好	不良
前駆病変	異型増殖症	不明 (de novo)
患者年齢	閉経前～閉経周辺期	高齢
主な遺伝子異常	<i>PTEN, PIK3CA, KRAS, CTNNB1</i>	<i>TP53</i>
頻度	90%	10%

近年、The Cancer Genome Atlas (TCGA) による全エクソームシーケンス解析により、子宮体癌は 4 つの新たなクラスター (*polymerase-epsilon (POLE) ultramutated, microsatellite instability (MSI) hypermutated, copy-number low, copy-number high*) に分類されるようになった (Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, 2013) (図 2A)。2023 年には、the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) の子宮体癌病期分類が TCGA 分類に基づき改訂された (Berek *et al.*, 2023)。これらの 4 型は予後とも良く相関し、*POLE* 症例は予後良好であり、*copy-number high* 症例は最も予後不良で、*MSI-high, copy-number low* 症例はその中間の予後を示す。TCGA 分類をそのまま臨床現場で適応しようとする *POLE* の変異の有無、tumor mutational burden (TMB)、MSI、*copy* 数変化を検査する必要がある、日常診療で実施するのは困難であった。そこで MSI については mismatch repair (MMR) 関連蛋白の免疫組織化学染色で MLH1、PMS2、MSH2、MSH6 のいずれかが陰性になることを用い、*copy-number high* については p53 の免疫組織化学染色による変異パターンを用いる Proactive Molecular Risk Classifier for Endometrial Cancer (ProMisE) 分類が提唱され、本邦でもその導入に向けて検討が進められている (Alexa *et al.*, 2021) (図 2B)。

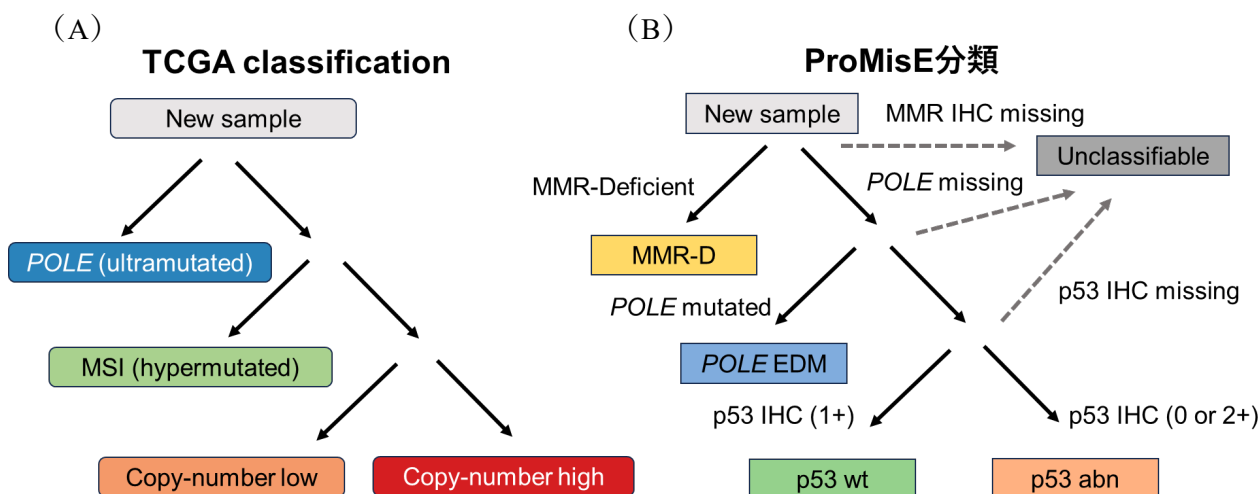


図 2 新たな子宮体癌の分子遺伝学的分類

(A) TCGA 分類に従った子宮体癌分類アルゴリズム (Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, 2013 より改変) (B) ProMisE 分類に基づいた子宮体癌分類アルゴリズム (Alexa *et al.*, 2021 より改変)

3. 子宮体癌に対する治療

子宮体癌の治療の第一選択は手術療法であり、摘出標本による組織学的検索が行われた後で進行期が決定される。その後、術後再発リスク評価に基づいてリスク分類され、術後補助療法が考慮される。薬物療法は術後補助療法または切除不能や残存病巣を有する進行・再発症例に対して選択される。薬物療法としては長年 AP 療法（アドリアマイシン＋シスプラチン）または TC 療法（パクリタキセル＋カルボプラチン）が標準治療として行われてきたが、2025 年に進行・再発子宮体癌に対して免疫チェックポイント阻害薬併用での化学療法が本邦でも保険承認された。TCGA 分類の登場と合わせて、個別化医療の必要性がより求められている。2001 年治療開始症例と 2017 年治療開始症例の 5 年生存率を比較すると Stage III で 71.5%、72.7%、Stage IV で 29.5%、28.9%と 16 年を経ても予後の改善が見られておらず、新規治療ターゲット、新規薬剤の開発が必要とされている（日本産科婦人科学会, 2010; 日本産科婦人科学会, 2025）（図 3）。

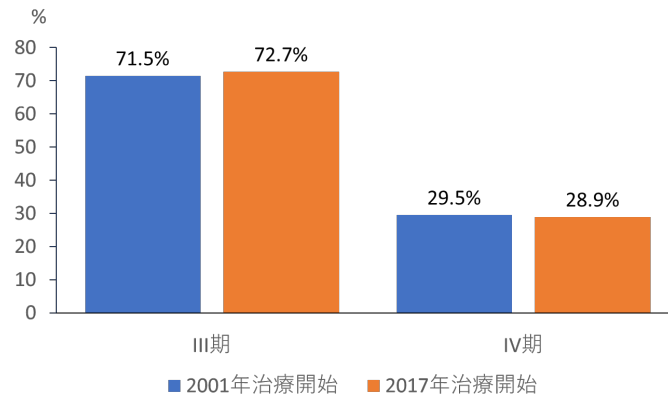


図3 子宮体癌の5年生存率の年次比較（日本産科婦人科学会, 2010 および日本産科婦人科学会, 2025 より作成）

4. L1CAM とは

L1 cell adhesion molecule (L1CAM) は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型糖タンパク質であり、6つの免疫グロブリン様ドメインと5つのフィブロネクチン III 型様反復ドメインを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達を媒介する細胞質ドメインで構成される（図4）。

神経突起の伸長、筋膜形成、細胞接着など神経発達における重要な分子として同定され、その後、神経系における細胞の運動性と可塑性の役割が明らかとされるにつれ、腫瘍関連プロセスにおける L1CAM の機能に焦点を当てた研究がなされるようになった。子宮体癌をはじめとして、卵巣癌、膵臓癌、悪性黒色腫、膠芽腫など種々の癌で L1CAM が過剰発現していることが報告された（Gavert *et al.*, 2008）。種々の癌において腫瘍浸潤や転移、進展および化学療法抵抗性など予後不良因子として関与することが報告されている（Kiefel *et al.*, 2011; Kiefel *et al.*, 2012; Dellinger *et al.*, 2016; van der Putten *et al.*, 2016; Maten *et al.*, 2019）。また、L1CAM は細胞内シグナル伝達機能を有し、下流の経路として extracellular signal-regulated kinase (ERK)、focal adhesion kinase (FAK) - Src、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) - Akt 経路の存在が報告されている（Kiefel *et al.*, 2012）。

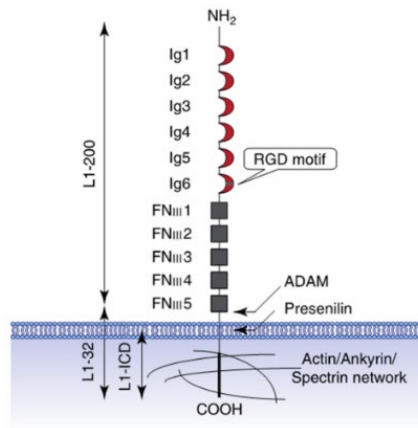


図 4 L1CAM の構造 (Kiefel *et al.*, 2011 より引用)

5. 子宮体癌と L1CAM

正常子宮内膜上皮の増殖期および分泌期に対する検索ではいずれにおいても、L1CAM は検出されていない (Finas *et al.*, 2008)。一部の子宮体癌では L1CAM の発現が認められ、L1CAM 高発現症例では遠隔転移やリンパ節転移を増加させ、化学療法抵抗性を示すといった予後不良因子としての報告がなされている (Dellinger *et al.*, 2016; van der Putten *et al.*, 2016; Giordano and Cavallaro, 2020) (図 5)。ProMisE 分類に L1CAM を追加することでより正確な予後予測が可能となるという報告も散見され、臨床試験に組み込まれているものもある (van den Heerik *et al.*, 2020)。

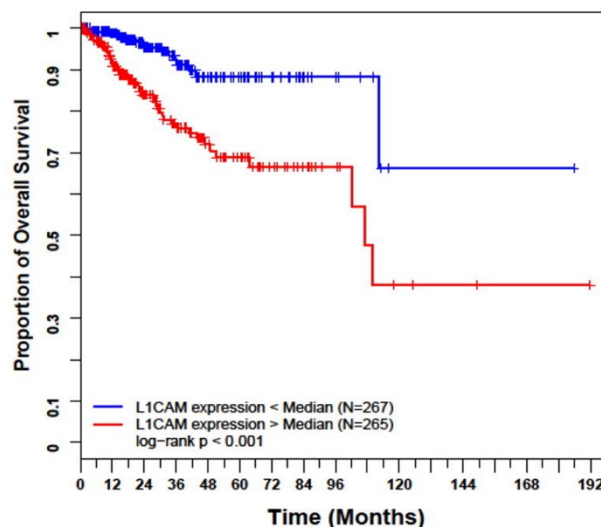


図 5 L1CAM mRNA 発現中央値で層別化した子宮体癌患者の生存曲線 (Dellinger *et al.*, 2016 より引用)

6. 北海道大学産婦人科学教室での L1CAM と子宮体癌の検討

L1CAM についてはこれまでも北海道大学大学院医学研究院産婦人科学教室で検討を行ってきた。朝野らはステージング手術まで施行された子宮体癌のうち再発中・高リスク群かつ補助化学療法を施行した症例のうち L1CAM 陽性群で L1CAM 陰性群と比較し、無再発期間、生存期間ともに有意に短いことを報告した (Asano *et al.*, 2020) (図 6A)。山崎らはステージング手術まで施行された子宮体癌に対して L1CAM の免疫組織化学染色を施行し、ProMisE 分類に L1CAM の評価を加えることでより正確に予後予測ができる可能性について報告した (Yamazaki *et al.*, 2022) (図 6B)。

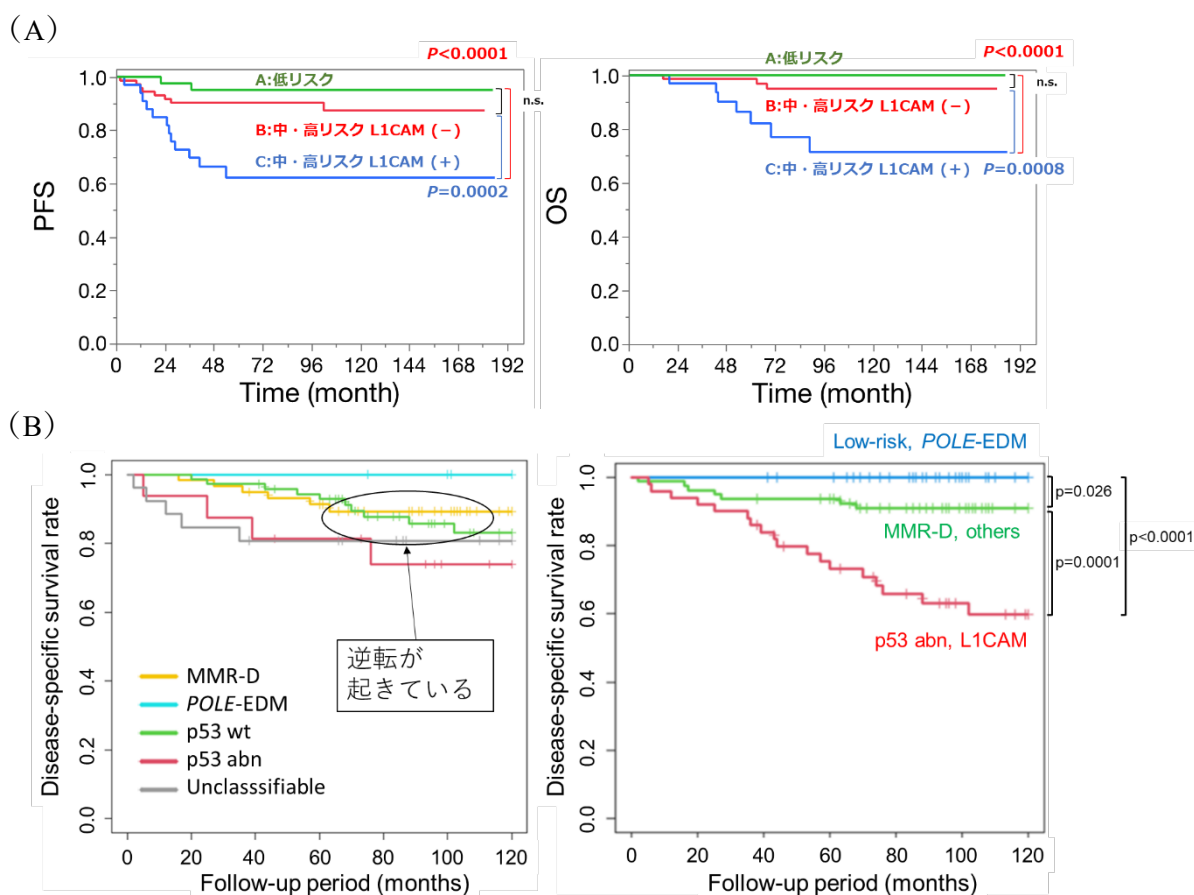


図 6 北海道大学産婦人科学教室においてこれまでに報告してきた L1CAM と子宮体癌に関する研究

(A) L1CAM 発現と補助化学療法の有効性との関連 (Asano *et al.*, 2020 より改変)

(B) ProMisE 分類に L1CAM を追加することによる予後予測の変化 (Yamazaki *et al.*, 2022 より改変)

7. 本研究の目的

複数の臨床報告から、L1CAM が子宮体癌において予後不良因子であることが示されているが、どのような機序で予後不良因子となりうるかは依然として不明である。本研究では子宮体癌における L1CAM の機能に焦点を当て、悪性形質に及ぼす影響について解明することを目的とした。

実験方法

1. 細胞培養

ヒト子宮体癌細胞株 HHUA および HOUA は理化学研究所（埼玉県）、SPAC-1-L および SPAC-1-S は癌研究会附属病院（東京都）平井康夫博士、HEC-1 は国立医薬品食品衛生研究所（神奈川県）、Ishikawa は筑波大学（茨城県）西田正人博士より譲受した。Human Embryonic Kidney (HEK) 293T は American Type Culture Collection (ATCC, 米国) より入手した。SPAC-1-L、SPAC-1-S、HEC-1、Ishikawa、HEK293T は、10% fetal bovine serum (FBS) および 1% penicillin/streptomycin（ナカライテスク, 日本）を添加した DMEM（ナカライテスク）で培養した。HHUA および HOUA は、15% FBS および 1% penicillin/streptomycin を添加した L-Gln を含む Ham's F-12（富士フイルム和光純薬, 日本）で培養した。マイコプラズマ検査は、MycoAlert マイコプラズマ検出キット（Lonza, スイス）または BioMycoX マイコプラズマ polymerase chain reaction (PCR) 検出キット（CellSafe, 韓国）を用いて実施し、本研究で利用したすべての細胞株はマイコプラズマ陰性であることが確認された。細胞株は 10 回の細胞継代以内に使用し、各アッセイは凍結保存していた細胞株を融解後 2 ヶ月以内の細胞を用いて実施した。細胞観察は BZ-X800（KEYENCE, 日本）を用いて行った。公開されているヒト子宮体癌細胞株に関する変異を以下に記載する（表 2）。Ishikawa で報告されている *POLE* の変異は図 2A で示した TCGA 分類の *POLE* (ultramutated) に該当する hot spot とは異なる部位の変異であり、予後良好群には該当しない。記載の組織型は細胞株樹立時の病理診断に基づいている。

表 2 使用したヒト子宮体癌細胞株の遺伝子変異情報

Cell line name	Histology	Mutation
Ishikawa	Endometrial adenocarcinoma	<i>PIK3R1</i> , <i>POLE</i> , <i>PTEN</i> , <i>TP53</i>
HEC-1	Endometrial adenocarcinoma	<i>KRAS</i> , <i>MSH6</i> , <i>PMS2</i> , <i>TP53</i>
HHUA	Endometrial adenocarcinoma	<i>TP53</i>
SPAC-1-L, SPAC-1-S	Serous papillary endometrial adenocarcinoma	<i>PTEN</i>
HOUA	Endometrial adenocarcinoma	<i>KRAS</i> , <i>TP53</i>

2. 蛍光免疫組織染色

カバーガラスを 3.5cm ディッシュ内に配置し、その上で細胞を 24 時間培養し接着させた。培地を除去後、0.05% phosphate-buffered saline with Tween 20 (PBST) で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドにより室温で 20 分間固定した。0.05% PBST で洗浄後、0.1% Triton X-100 で 5 分間処理し、細胞膜透過処理化を行った。再度 0.05% PBST で洗浄後、75%メタノールで固定した。0.05% PBST で洗浄後、10%ヤギ血清を含む 0.05% PBST を用いて室温で 30 分間ブロッキングを行った。0.05% PBST で洗浄し、一次抗体として L1CAM clone 14.10 (BioLegend, 米国) を 0.05% PBST で 200 倍希釈しカバーガラス上に添加し、4°Cで一晩反応させた。一次抗体を除去後、0.05% PBST で洗浄し、二次抗体として Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher Scientific, 米国) を 0.05% PBST で 500 倍希釈し添加し、遮光下、室温で 30 分間反応させた。0.05% PBST で洗浄後、Hoechst 33342 solution (Dojindo, 日本) で核染色を 20 分間行い、再度 0.05% PBST で洗浄した。最後にカバーガラスをスライドガラス上に封入し、BZ-X800 (KEYENCE) で観察した。

3. 大腸菌への形質転換

実験に必要なプラスミドを増幅するため、自作した化学的形質転換用 *Escherichia coli* (*E.coli*) コンピテントセルを氷上で解凍した後、*E.coli* 5 μ L とプラスミド deoxyribonucleic acid (DNA) 1 μ g をチューブに加え、軽くタッピングして混和した。氷上で 10 分間静置後、42°Cで 45 秒間のヒートショックを行い、直ちに氷上に 3 分間静置した。あらかじめ 37°Cに温めた LB 培地 200 μ L を加え、37°Cで 30 分間振盪培養した。培養液を LB 寒天上に塗布し、37°Cのインキュベーター内で 12~14 時間培養した。培養後に形成されたコロニーを爪楊枝で採取し、100 μ g/mL のアンピシリン添加 LB 培地 3 mL に接種し、37°C、180 rpm で 12 時間振盪して形質転換した *E.coli* を増殖させた。培養後、NucleoSpin® Plasmid EasyPure (Takara Bio, 日本) を用いた mini prep、または 12~14 時間の midi culture 後に QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit (Qiagen, オランダ) を用いた midi prep によりプラスミド DNA を回収した。本研究における遺伝子組換え実験は、北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程に基づき、学内承認（承認番号：22-0006）を受けて実施した。

4. FLAG タグ付き発現ベクターの作製

FLAG-tagged L1CAM 発現ベクターは、human CA171/L1CAM transcript variant 2 の open reading frame (ORF) を含む cDNA クローン (Sino Biological, 中国) を鋳型として PCR を行い、PCR 産物を EcoRI で線状化した 3xFLAG-CMV-14 ベクター (Sigma-

Aldrich, 米国) に In-Fusion® Snap Assembly Master Mix (Takara Bio) を用いてクローニングし作製した。

作製した C 末 FLAG 付加 *LICAM* プラスミド 50 ng を、KOD One® PCR Master Mix (東洋紡, 日本) 25 µL、forward primer (10 µM) 1.5 µL、reverse primer (10 µM) 1.5 µL と混合し、サーマルサイクラーにて、変性 98°C 10 秒、アニーリング 58°C 5 秒、伸長 68°C 5 秒を 1 サイクルとして 35 サイクルの PCR を行った。PCR 産物は 1%アガロースゲル電気泳動後、目的バンドを切り出し、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Takara Bio) を用いて精製した。得られた DNA 断片は、In-Fusion® Snap Assembly Master Mix を用いて pLVSIN-CMV pur (Takara Bio) ベクターに組み込み、pLVSIN-CMV pur-LICAM 発現ベクターを作製した。使用したプライマーは Online Primer Design Tools for In-Fusion® Cloning を用いて設計した。作製したベクターは大腸菌に形質転換して増幅した。

得られたプラスミドを *EcoRI* 以外の制限酵素で切断し、線状化した空の pLVSIN-CMV pur をコントロールとして 1%アガロースゲル電気泳動を行い、インサート DNA の挿入を確認した。さらに、シーケンスベクター N-CMV30 (Sigma-Aldrich) を用いてユーロフィンジェネティックラボ (Eurofins Genomics, 日本) にシーケンス解析を依頼し、Chromas ソフトウェア (version 2.6.6) (Technelysium Pty Ltd., オーストラリア) を用いて塩基配列を解析した結果、目的配列が正しく組み込まれていることを確認した。

I kappa B kinase (IKKβ) (EE) プラスミドは北海道大学 (北海道) 谷口浩二博士より供与を受け、同様の方法により 3xFLAG-CMV-14 ベクターを用いて C 末端に FLAG タグを付加し、その後 pLVSIN-CMV pur ベクターに組み換えて pLVSIN-CMV pur-IKKβ (EE) 発現ベクターを作製した。使用した各プライマーの配列を下記に示す (表 3)。

表 3 使用したプライマーの配列

ベクター	プラスミド	方向	配列	Tm 値	%GC
3xFLAG-CMV-14	<i>LICAM</i>	Forward	TTGCGGCCGCGAATTCGGGC CATGGTCGTGGCG	112	69.7
3xFLAG-CMV-14	<i>LICAM</i>	Reverse	ATCTATCGATGAATTTTCTAGG GCCACGGCAGG	98	48.5
pLVSIN-CMV pur	<i>LICAM</i>	Forward	TATTTCCGGTGAATTCGGGCC ATGGTCGTGGCG	100	51

pLVSIN-CMV pur	<i>L1CAM</i>	Reverse	TAGTCTCGAGGAATTCTACTT GTCATCGTCATCC	98	44.1
3xFLAG-CMV-14	IKK β (EE)	Forward	TTGCGGCCGCGAATTCGGGC CATGAGCTGGTCA	108	63.6
3xFLAG-CMV-14	IKK β (EE)	Reverse	ATCTATCGATGAATTTTCATGA GGCCTGCTCCAG	96	45.5
pLVSIN-CMV pur	IKK β (EE)	Forward	TATTTCCGGTGAATTCGGGCC ATGAGCTGGTCA	100	51.5
pLVSIN-CMV pur	IKK β (EE)	Reverse	TAGTCTCGAGGAATTCTACTT GTCATCGTCATCC	98	44.1

IKK β (EE): I kappa B kinase inhibitor (EE), L1CAM: L1 cell adhesion molecule

5. トランスダクションのためのレンチウイルス作製

レンチウイルスパッケージングプラスミド psPAX2 (Addgene, 米国; #12260) および pMD2.G (Addgene; #12259) は、Didier Trono 博士 (Ecole Polytechnique Federale de Lausanne (EPFL)、スイス) より譲受した。レンチウイルス産生のため、psPAX2 および pMD2.G を、ヒト *L1CAM* 特異的 pLKO_005 short hairpin RNA (shRNA) プラスミド、FLAG-tagged ヒト *L1CAM* 発現プラスミド、および FLAG-tagged IKK β (EE) 発現プラスミドと共トランスフェクションした。FLAG 配列はターゲット遺伝子の C 末に配列されている。*L1CAM* 特異的 shRNA (shL1CAM) は MISSION shRNA ライブラリー (Merck、ドイツ) より複数を入手し、良好な mRNA 発現低下の得られた 2 つを選択した。使用した shRNA の各配列を以下に示す (表 4)。

表 4 使用した shRNA の配列

	Target Sequence	Target location	Clone ID
shL1CAM #1	GCCAATGCCTACATCTACGTT	1351-1371	TRCN0000299624
shL1CAM #2	GTCTCCGAAATGCTGTCTTTC	4173-4193	TRCN0000310751

L1CAM: L1 cell adhesion molecule

非標的 shRNA として shRNA sequence targeting luciferase (shCtrl) を用いた。HEK293T 細胞へのトランスフェクションは Polyethylenimine “MAX” (PEI MAX; Polysciences, 米国) を用いて実施した。トランスフェクション後 24 時間以内に培地を交換し、PEI MAX を除去した。ウイルス含有培地は、初回トランスフェクション

後 48 時間および 72 時間に回収した。回収したウイルス含有培地を室温で 800×G、10 分間遠心分離し、上清を慎重に回収し、細胞へのトランスダクションに用いた。過剰発現に関する実験ではウイルス液を濃縮して用いた。ウイルス濃縮試薬は、80 mL の Milli-Q® と 20 mL の 10×phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) に PEG-8000 80 g および NaCl 14.0 g を溶解し、最終 pH を 7.0~7.2 に調整し、121°C で 15 分間オートクレーブ処理により滅菌して作製した。ウイルスの濃縮は、ウイルス液を室温で 800×G、10 分間遠心分離後、上清と濃縮試薬を 3:1 の比で十分に混合した。続いて 4°C で 4 時間以上インキュベートした後、4°C で 1,600×G、60 分間遠心分離した。上清を除去し、得られたウイルス沈殿物を血清および抗生物質を含まない培地により、元の体積の 1/10 量でピペティングにより穏やかに再懸濁した。細胞株へのトランスフェクション時には、8 µg/mL の polybrene (ナカライテスク) を添加した。FLAG-tagged ヒト *L1CAM* 過剰発現細胞株の使用にあたっては導入効率が低かったため、puromycin (InvivoGen, 米国) による薬剤選択を行った後、各種アッセイを行った。

6. mRNA 調整と real-time PCR

6 ウェルプレートで細胞を培養後、PBS で洗浄し、RNAiso Plus (Takara Bio) 500 µL を加えて細胞を溶解し回収した。室温で 5 分間静置後、クロロホルム 100 µL を加え、乳白状になるまで十分に振盪した。さらに室温で 5 分間静置した後、4°C に設定した遠心機で 12,000×G、15 分間遠心分離した。得られた上層（水相）を回収し、イソプロパノール 300 µL を加えてボルテックス混和後、室温で 10 分間静置した。続いて 4°C、12,000×G で 10 分間遠心分離し、RNA を沈殿させた。上清を除去後、75% 冷エタノール 500 µL を加え、4°C、7,500×G で 5 分間遠心分離した。上清を除去し沈殿を乾燥させた後、nuclease-free water に溶解して total RNA を抽出した。RNA 濃度は Nanodrop one (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、250 ng/µL に調整した。

抽出した total RNA は、GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega, 米国) を用いて逆転写および real-time PCR を行った。濃度調整した RNA 溶液 2.5 µL に Oligo (dT) primer 0.5 µL、Random primer 0.5 µL、Nuclease-free water 1.5 µL を加えて総量 5 µL とし、70°C で 5 分間反応させた後、直ちに 4°C で 5 分以上冷却した。次に Nuclease-free water 0.75 µL、GoScript™ 5X Reaction Buffer 2 µL、MgCl₂ 1 µL、PCR Nuclease Mix 0.5 µL、Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor 0.25 µL、Reverse Transcriptase 0.5 µL を加え、25°C で 5 分、42°C で 60 分、70°C で 15 分反応させて逆転写を行い、complementary DNA (cDNA) を作製した。Real-time PCR は、作製した cDNA 2 µL に GoTaq® qPCR Master Mix 5 µL、forward primer および reverse primer を等量混合し 1 µM に調整した primer mix 0.2 µL、nuclease-free water 2.8 µL を加え、総量 10 µL の反応液で実施した。

反応条件は、95°C 2 分間（1 サイクル）を初期変性とし、95°C 15 秒および 60°C 1 分を 40 サイクル、最後に 95°C 15 秒（1 サイクル）とした。

Real-time PCR 解析は、CFX Opus 96 Real-time PCR system（Bio-Rad, 米国）および CFX Connect Real-time PCR system（Bio-Rad）を用いて実施した。遺伝子発現量は glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）を内在性コントロールとして正規化し、相対発現レベルとして算出した。相対 messenger RNA（mRNA）発現レベルは以下の式で計算した。 $\text{Fold Change} = 2^{-[(\text{CT}_{\text{target, sample}} - \text{CT}_{\text{ref, sample}}) - (\text{CT}_{\text{target, control}} - \text{CT}_{\text{ref, control}})]}$ 。本研究で使用したプライマーの配列を以下に示す(表 5)。

表 5 プライマー配列

Gene name	Forward primer	Reverse primer
<i>L1CAM</i>	5'-ACCGTGTACCTACCAGAAC-3'	5'-CAGCGGTACTCGCCATCAT-3'
<i>TNF</i>	5'-GTAGCCCATGTTGTAGCAAAC-3'	5'-GGTTATCTCTCAGCTCCACG-3'
<i>LTB</i>	5'-GGAGACGACGAAGGAACAGG-3'	5'-GTAGAGGTAATAGAGGCCGTCC-3'
<i>GAPDH</i>	5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA-3'	5'-AATGAAGGGGTCATTGATGG-3'

GAPDH: glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, L1CAM: L1 cell adhesion molecule, LTB: lymphotoxin beta, TNF: tumor necrosis factor

7. Western blotting

7.1 タンパク質抽出と濃度調整

CellLytic™ MT Cell Lysis Reagent（Sigma-Aldrich）47.5 μL、protease inhibitor cocktail cOmplete™（Sigma-Aldrich）2 μL、および Sodium Orthovanadate（Na₃VO₄）0.5 μL を混合した総量 50 μL の Lysis buffer を用いてタンパク質を抽出した。細胞を PBS で洗浄後、Lysis buffer を添加しスクレーパーを用いて細胞を剥離した。懸濁液をピペットにより回収し、4°C、20,000×G で 10 分間遠心分離した後、上清を回収した。タンパク質濃度の測定には、Takara BCA Protein Assay kit（Takara Bio）を用いた。96 ウェルプレートに 0～150 μg/mL の範囲で調整した BSA standard solution 標準溶液および各サンプルをセットし、反応液（BCA reagent A および B）を添加後、37°C で 60 分間反応させた。吸光度は Infinite 200 PRO M Plex（TECAN, スイス）を用いて 562 nm で測定し、標準曲線より各サンプルのタンパク質濃度を算出した。得られた濃度に基づき、Lysis buffer で希釈してタンパク質濃度を調整した。

7.2 電気泳動および免疫検出

各サンプルから 20 μ g のタンパク質を用い、Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) により電気泳動し分離後、Poly Vinylidene Di Fluoride (PVDF) 膜へ転写した。膜は、後述の一次抗体と 4°C で一晩反応させた後、各一次抗体に対する horseradish peroxidase (HRP) 標識二次抗体 (抗マウス IgG または抗ラビット IgG) を添加し、室温で 1 時間インキュベーションした。化学発光検出には Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク) または Chemi-Lumi One Ultra (ナカライテスク) を用い、Amersham™ Imager 680 (GE Healthcare Life Science, 米国) によりシグナルを検出した。全タンパク質量のローディングコントロールとして GAPDH を用いた。使用した抗体を下記の表に示す (表 6)。

表 6 使用した抗体および希釈倍率

抗体	正式名称	メーカー	型番	希釈倍率
L1CAM	Purified anti-CD171 (L1) [14.10]	BioLegend	#826701	1:1,000
pNF- κ B (p65)	Phospho-NF-kappaB p65 (Ser536) (93H1) Rabbit Monoclonal Antibody	Cell Signaling Technology, 米国	#3033	1:1,000
NF- κ B (p65)	NF-kappaB p65 (D14E12) Rabbit Monoclonal Antibody	Cell Signaling Technology	#8242	1:1,000
pERK 1/2	Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody	Cell Signaling Technology	#9101	1:1,000
ERK 2	ERK 2 (D-2)	Santa Cruz Biotechnology, 米国	sc-1647	1:1,000
FLAG	OctA-Probe (H-5)	Santa Cruz Biotechnology	sc-166355	1:1,000
GAPDH	Anti GAPDH, Monoclonal Antibody	富士フイルム 和光純薬	#015-25473	1:10,000

Mouse IgG (二次抗体)	Peroxidase AffiniPure® F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, h, 米国	AB_2307346	1:10,000
Rabbit IgG (二次抗体)	Peroxidase AffiniPure® Goat Anti-Rabbit IgG, Fc fragment specific	Jackson ImmunoResearch, h	AB_2337937	1:10,000

ERK: extracellular signal-regulated kinase, GAPDH: glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, L1CAM: L1 cell adhesion molecule, MAPK: mitogen-activated protein kinase, NF-κB: nuclear factor kappa B

8. 細胞増殖アッセイ

細胞増殖能の評価は、96 ウェルプレートを用いて実施した。細胞は1ウェルあたり2,000細胞の初期密度で播種した。播種後、4日間にわたり、24時間ごとにCell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて細胞増殖を評価した。各測定時に、Cell Counting Kit-8 試薬 10 μL を培養培地に添加し、37°Cで2時間インキュベーションした後、Infinite 200 PRO M Plex (TECAN) を用いて、450 nmにおける吸光度をウェル毎に測定した。背景補正のため、細胞を播種していない培地のみのウェルを同時に設定し、得られた吸光度を各測定値から差し引いて補正を行った。

9. 細胞周期アッセイ

細胞をトリプシン処理により剥離し、PBSで2回洗浄した後、Cell Cycle Assay Solution Blue (C549, Dojindo) と混合した。遮光下、37°Cで15分間インキュベーションした後、染色細胞をSpectral Analyzer SA3800 (SONY) を用いて解析した。L1CAMをノックダウンした細胞株はshRNA導入48時間後に回収して測定を行った。過剰発現細胞株についてはpuromycinによる薬剤選択後に6ウェルプレートへ再播種し、48時間後に回収して解析した。データ解析はFlowJo™ソフトウェア (version10.10) (BD Biosciences, 米国) を用いて実施した。

10. アポトーシスアッセイ

アポトーシスの評価は、Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) アポトーシス検出キット (ナカライテスク) を用いて実施した。回収した細胞をPBSで2回洗浄後、Annexin V結合溶液に懸濁し、FITC標識Annexin Vおよびプロピジウムヨウ化物 (PI) を添加した。遮光下、室温で15分間反応させた後、染色細胞をSpectral

Analyzer SA3800 (SONY) を用いて測定した。データ解析は FlowJo™ ソフトウェア (version10.10) (BD Biosciences) を用いて行った。

11. RNA-seq 解析

RNAiso Plus (Takara Bio) を用いて、total RNA を抽出した。抽出 RNA の品質は、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, 米国) により評価し、RNA Integrity Number (RIN) ≥ 9 のサンプルのみを解析に用いた。

RNA sequence (RNA-seq) ライブラリ調製およびシーケンスは、Rhelixa Inc. (日本) に委託した。poly (A) 依存的 mRNA 濃縮は、NEBNext Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module (Cat No. E7490, New England Biolabs, 米国) を用いて行い、Strand 特異的ライブラリは、NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (Cat No. E7760, New England Biolabs) を用いて調製した。シーケンスは、Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, 米国) を用い、ペアエンド 150 bp リード (PE150) で実施した。各サンプルあたり約 4 Gbp のシーケンスデータが取得され、1 サンプルあたり平均 2,670 万リード (1,330 万リードペア) に相当した。シーケンスリードは、Rhelixa Inc. の解析パイプラインを用いてヒト参照ゲノム (hg38) にマッピングされた。品質管理、遺伝子発現定量、差次的発現遺伝子 (DEG) 解析およびデータ正規化を含む下流解析も Rhelixa Inc. により実施された。

HHUA 由来の *LICAM* ノックダウン細胞株において shCtrl と比較し log2 fold change < -1 の遺伝子について、Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID, v6.8) を用いて機能的エンリッチメント解析を行った。Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 経路解析の結果を基に、有意にエンリッチされた経路を同定した。

RNA-seq データは Gene Expression Omnibus (GEO) に登録しており、アクセッション番号 GSE299250 から取得可能である。

12. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

NF- κ B 応答性ルシフェラーゼレポータープラスミド pGL4.32[luc2P/NF- κ B-RE/Hygro]は、Promega より購入した。ヒト *TNF* プロモーター領域 (-2,000~0 bp) はゲノム DNA を鋳型として PCR 増幅し、pGL4.10[luc2]ベクター (Promega) にクローニングした。1 μ g のレポータープラスミド、1 μ g のヒト *LICAM* 発現プラスミド、および 1 μ g の β -ガラクトシダーゼ発現プラスミドを、PEI MAX (Polysciences) を用いて細胞に共トランスフェクションした。72 時間培養後、Reporter Lysis Buffer (Promega) で細胞を溶解した。ルシフェラーゼ活性は、Luciferase Assay System

(Promega) を用い、Infinite 200 PRO M Plex (TECAN) で測定した。 β -ガラクトシダーゼ活性は、基質として 2-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (富士フィルム和光純薬) を用いて測定した。ルシフェラーゼ活性は、トランスフェクション効率の内部コントロールである β -ガラクトシダーゼ酵素活性で正規化した。本研究で使用したプラスミド配列を以下に記載する (表 7)。

表 7 プラスミド配列

Gene name	insert promoter region
<i>TNF</i>	CTGCACTCGATGTACCACGGGGCTGCGTTCCAGCTCACCCAGGGAGACCAGCTATCCA CCACACAGATGGCATCCCCACCTAGTCCTCAGCCCTAGTACTGTCTTCTTTGGAGCC TTCGCTCTGTAGAACTTGGAAAAATCCAGAAAGAAAAATAATTGATTTCAAGACCTTC TCCCCATTCTGCCTCCATTCTGACCATTTCAGGGGTCTGTCACCACCTCTCCTTTGGCCAT TCCAACAGCTCAAGTCTTCCCTGATCAAGTCACCGGAGCTTTCAAAGAAGGAATTCTA GGCATCCCAGGGGACCACACCTCCCTGAACCATCCCTGATGTCTGTCTGGCTGAGGATT TCAAGCCTGCCTAGGAATTCCCAGCCCAAAGCTGTTGGTCTGTCCCACCAGCTAGGTG GGGCCTAGATCCACACACAGAGGAAGAGCAGGCACATGGAGGAGCTTGGGGGATGAC TAGAGGCAGGGAGGGGACTATTTATGAAGGCAAAAAAATTAAATTATTTATTTATGGAG GATGGAGAGAGGGGAATAATAGAAGAACATCCAAGGAGAAACAGAGACAGGCCCAAG AGATGAAGAGTGAGAGGGCATGCGCACAAGGCTGACCAAGAGAGAAAGAAGTAGGCA TGAGGGATCACAGGGCCCCAGAAGGCAGGGAAAGGCTCTGAAAGCCAGCTGCCGACC AGAGCCCCACACGGAGGCATCTGCACCCTCGATGAAGCCCAATAAACCTCTTTTCTCTG AAATGCTGTCTGCTTGTGTGTGTGTGTCTGGGAGTGAGAACTTCCCAGTCTATCTAAGG AATGGAGGGAGGGACAGAGGGCTCAAAGGGAGCAAGAGCTGTGGGGAGAACAAAAG GATAAGGGCTCAGAGAGCTTCAGGGATATGTGATGGACTCACCAGGTGAGGCCGCCAG ACTGCTGCAGGGGAAGCAAAGGAGAAGCTGAGAAGATGAAGGAAAAGTCAGGGTCTG GAGGGGCGGGGGTCAGGGAGCTCCTGGGAGATATGGCCACATGTAGCGGCTCTGAGGA ATGGGTTACAGGAGACCTCTGGGGAGATGTGACCACAGCAATGGGTAGGAGAATGTCC AGGGCTATGGAAGTCGAGTATGGGGACCCCCCTTAACGAAGACAGGGCCATGTAGAG GGCCCCAGGGAGTGAAAGAGCCTCCAGGACCTCCAGGTATGGAATACAGGGGACGTTT AAGAAGATATGGCCACACACTGGGGCCCTGAGAAGTGAGAGCTTCATGAAAAAATCA GGGACCCCAGAGTTCCTTGGAAGCCAAGACTGAAACCAGCATTATGAGTCTCCGGGTC AGAATGAAAGAAGAAGGCCTGCCCCAGTGGGGTCTGTGAATTCCCGGGGGTGATTTC CTCCCCGGGGCTGTCCCAGGCTTGTCCCTGCTACCCCCACCCAGCCTTTCCTGAGGCCT CAAGCCTGCCACCAAGCCCCAGCTCCTTCTCCCCGCAGGGACCCAAACACAGGCCTC

	AGGACTCAACACAGCTTTTCCCTCCAACCCCGTTTCTCTCCCTCAAGGACTCAGCTTT CTGAAGCCCCCTCCAGTTCTAGTTCTATCTTTTCTCCTGCATCCTGTCTGGAAGTTAGAAG GAAACAGACCACAGACCTGGTCCCCAAAAGAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGC ATGGGGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTCCTACACACAAATCAGTCAGTGGCCCAGAAG ACCCCCCTCGGAATCGGAGCAGGGAGGATGGGGAGTGTGAGGGGTATCCTTGATGCTT GTGTGTCCCCAACTTTCCAAATCCCCGCCCCGCGATGGAGAAGAAACCGAGACAGAA GGTGCAGGGCCCCACTACCGCTTCCTCCAGATGAGCTCATGGGTTTCTCCACCAAGGAA GTTTTCCGCTGGTTGAATGATTCTTTCCCCGCCCTCCTCTCGCCCCAGGGACATATAAAG GCAGTTGTTGGCACACCCAGCC
--	--

TNF: tumor necrosis factor

13. 薬剤添加実験

細胞生存率への影響を評価するため、IKK 阻害薬（Selleck, 日本; S2882）およびシスプラチン（CDDP）（Selleck; S1166）を用いた。IKK 阻害薬は PBS で溶解し、シスプラチンは Dimethyl Sulfoxide（DMSO）で溶解した。IKK 阻害薬のコントロールとしては PBS を使い、シスプラチンのコントロールには DMSO を用いた。細胞は 6 ウェルプレートまたは 96 ウェルプレートに播種し、薬剤処理前に一晩接着させた。タンパク質抽出は薬剤処理 48 時間後に細胞を回収して行った。

14. 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色に用いた組織マイクロアレイ（TMA）標本は、2003 年から 2015 年までに北海道大学病院婦人科でリンパ節郭清を含む手術療法を受け、進行期決定された癌肉腫を含む子宮体がん 190 症例の検体から作製した。各症例につき 2 スポットを評価対象とした。抗 L1CAM 抗体（clone 14.10, BioLegend）を 1:50 で使い、染色領域が 10% 以上の場合を L1CAM 陽性と判定した。抗 NF-κB p65（D14E12）XP®抗体（Cell Signaling Technology, #8242）を 1:1,200 で使用し、核染色を示したものを陽性と判定した。評価は NDP.view2（Version 2.9.29）（浜松ホトニクス株式会社, 日本）を用いたデジタル病理画像で行い、組織量が不十分であった 20 スポットは評価対象から除外した。カイ二乗検定を用いて統計解析を行った。

本研究における TMA 検体を用いた検討は、「ヘルシンキ宣言」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」（平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号）を遵守して実施された。また、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会にて 2018 年 1 月 17 日に承認（自主臨床研究 017-0269）され実施した。文書による同意

あるいは研究参加の同意を得ることが困難な場合は、オプトアウトにて拒否する機会を設けるため北海道大学病院ホームページにて情報公開を行った。

15. 統計解析

全ての統計解析、データ処理は R (version 4.4.0) (R Foundation for Statistical Computing, オーストリア) を用いて実施した。データは平均値 $\pm$ Standard Error of the Mean (SEM) として表示した。正規性および分散の等質性を確認したうえで統計解析を行い、2 群間の比較には Student's t 検定を用い、3 群以上の比較には Dunnett の多重比較検定を適用した。p 値 0.05 未満の場合を統計学的に有意と判定した。

結果

1. 各種ヒト子宮体癌細胞株における L1CAM 発現解析

まずヒト子宮体癌細胞株における L1CAM の発現を評価した。L1CAM mRNA は HHUA および SPAC-1-S で発現が高く、Ishikawa、HOUA では低発現であった (図 7A)。SPAC-1-L、HEC-1 ではその中間の発現を示した (図 7A)。Western blotting でも同様の発現傾向を示し、L1CAM の mRNA 発現とタンパク質発現は相関することが確認された (図 7B)。Western blotting では SPAC-1-S で L1CAM の発現が確認されたものの、doubling time が長く、細胞増殖が極めて遅かったため SPAC-1-S、HOUA は本研究には不適と判断し用いないこととした。HHUA、SPAC-1-L、Ishikawa に対して蛍光免疫組織染色を行い、L1CAM 高発現の HHUA では細胞膜に L1CAM が発現していることを確認した (図 7C)。

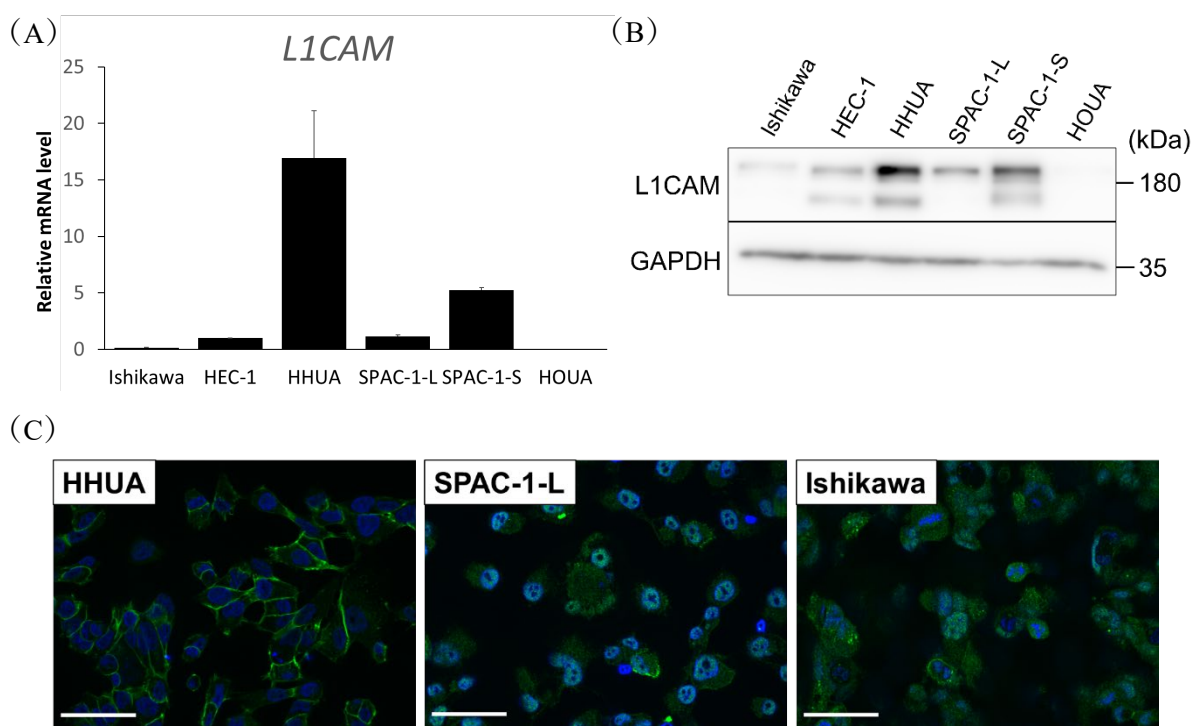


図 7 各種ヒト子宮体癌細胞株における L1CAM 発現解析

(A) Ishikawa、HEC-1、HHUA、SPAC-1-L、SPAC-1-S、HOUA における L1CAM の mRNA 発現レベルを示す。GAPDH を内部対照として用いた。グラフは HEC-1 での発現値を 1 として示している。(B) Ishikawa、HEC-1、HHUA、SPAC-1-L、SPAC-1-S、HOUA における L1CAM の Western blotting を示す。GAPDH をローディングコントロールとして用いた。(C) HHUA、SPAC-1-L、Ishikawa の蛍光免疫組織染色での L1CAM 発現を示す。緑色シグナルは L1CAM、青色シグナルは Hoechst 33342 での染色を示す。Scale bar = 50 μ m。

2. L1CAM 発現変動ヒト子宮体癌細胞株の作製とその影響

2.1 L1CAM ノックダウンヒト子宮体癌細胞株の作製とその表現型

ヒト子宮体癌細胞における L1CAM の機能を評価するため、HHUA、SPAC-1-L、HEC-1 において *L1CAM* に対する shRNA を用いた L1CAM ノックダウン細胞株を作製した。L1CAM のノックダウンは、real-time PCR および Western blotting で確認した (図 8A, B)。蛍光免疫組織染色においても L1CAM をノックダウンすると細胞膜への発現が低下することが確認された (図 8C)。

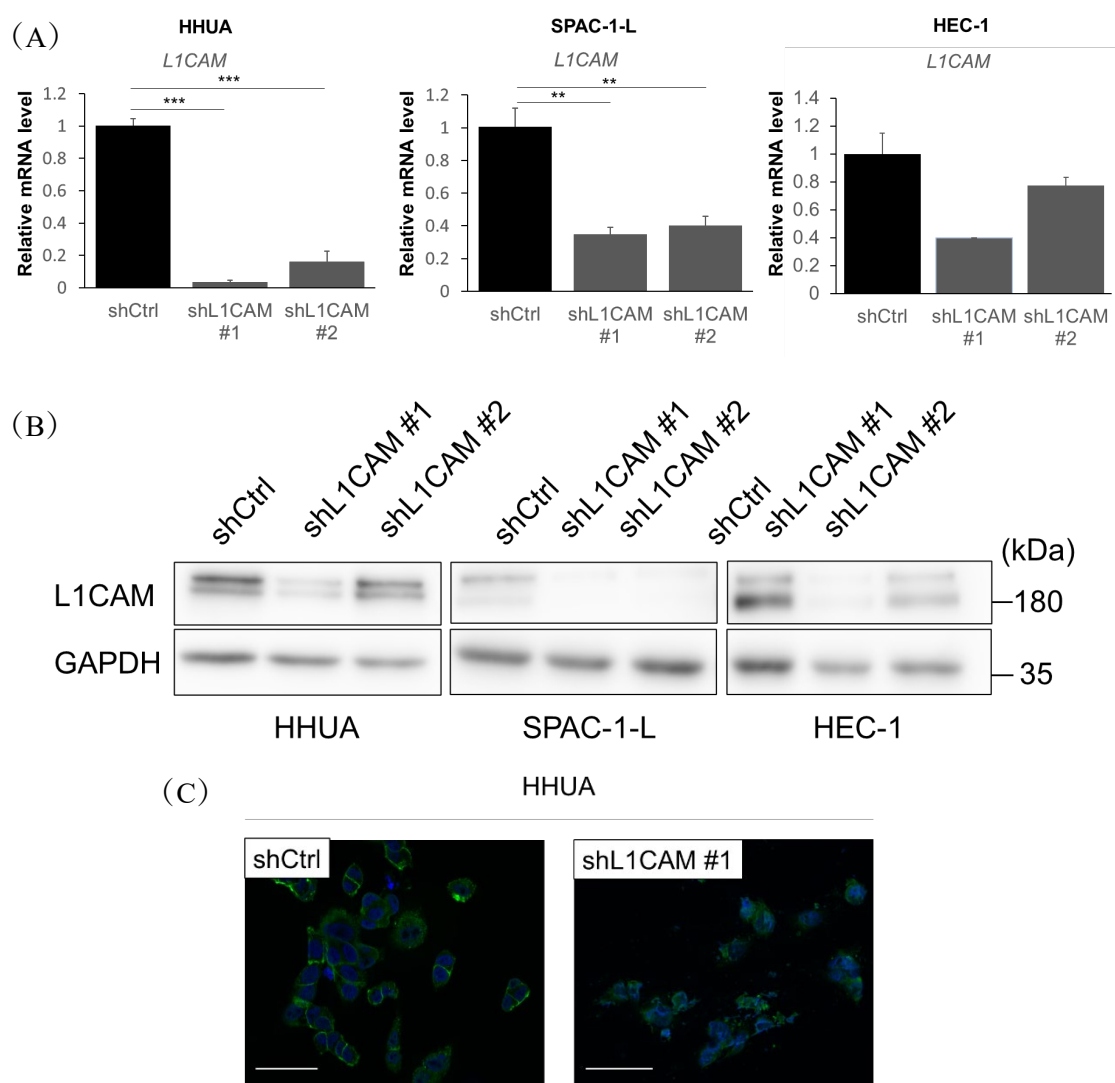


図 8 shRNA を用いた L1CAM ノックダウンヒト子宮体癌細胞株の評価

(A) HHUA、SPAC-1-L および HEC-1 における *L1CAM* mRNA 発現量の低下を示す。*GAPDH* を内部対照として用いた。統計学的有意差は Dunnet 検定で評価した ($n = 3$) ($p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***). HEC-1 は doublet での検証のため統計解析は行っていない。(B) HHUA、SPAC-1-L および HEC-1 における L1CAM および GAPDH の Western blotting を示す。GAPDH をローディングコントロールとして用いた。(C) 対

照群および shL1CAM #1 での L1CAM ノックダウン群における HHUA での L1CAM の細胞膜発現変化を示す。緑色シグナルは L1CAM、青色シグナルは Hoechst 33342 での染色を示す。Scale bar = 50 μ m。

細胞増殖アッセイでは、HHUA および SPAC-1-L において L1CAM をノックダウンすると 4 日目の時点で有意な増殖低下が認められ、L1CAM がヒト子宮体癌細胞の増殖を促進することが示唆された (図 9)。

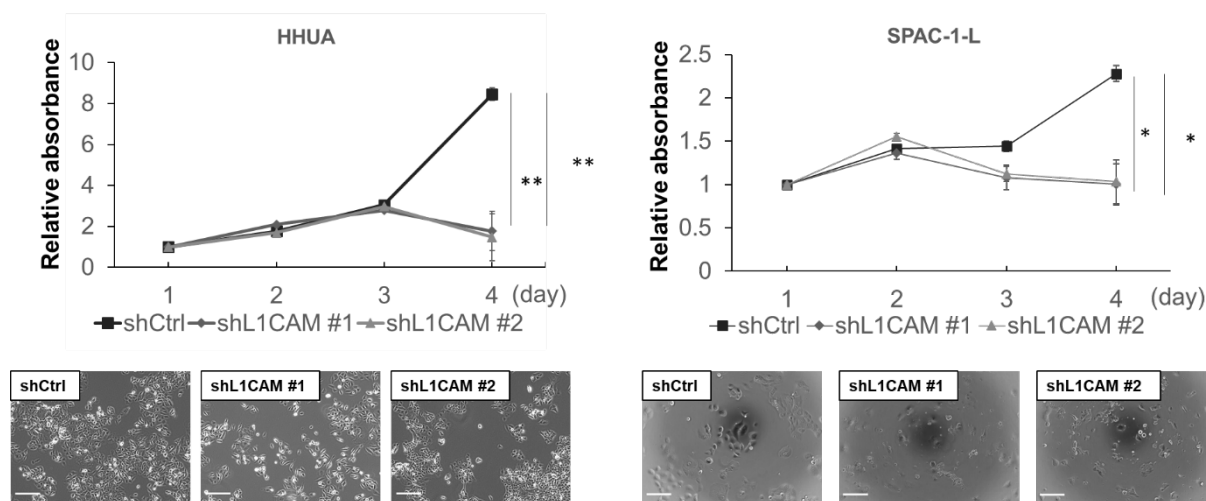


図 9 L1CAM ノックダウンヒト子宮体癌細胞株を用いた細胞増殖アッセイ

対照群および L1CAM ノックダウン群における HHUA および SPAC-1-L での細胞増殖を示す。統計学的有意差は Dunnet 検定で評価した ($n = 3$) ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **). 折れ線グラフの下に day4 での各々の細胞像を示す。Scale bar = 100 μ m。

2.2 L1CAM 過剰発現ヒト子宮体癌細胞株の作製とその表現型

次に、L1CAM を発現するレンチウイルスベクターを用いて、HHUA、SPAC-1-L、Ishikawa の 3 つの細胞株に対して FLAG-tagged L1CAM を過剰発現する細胞株を作製した。mRNA およびタンパク質の過剰発現は real-time PCR、Western blotting を用いて確認した (図 10A, B)。

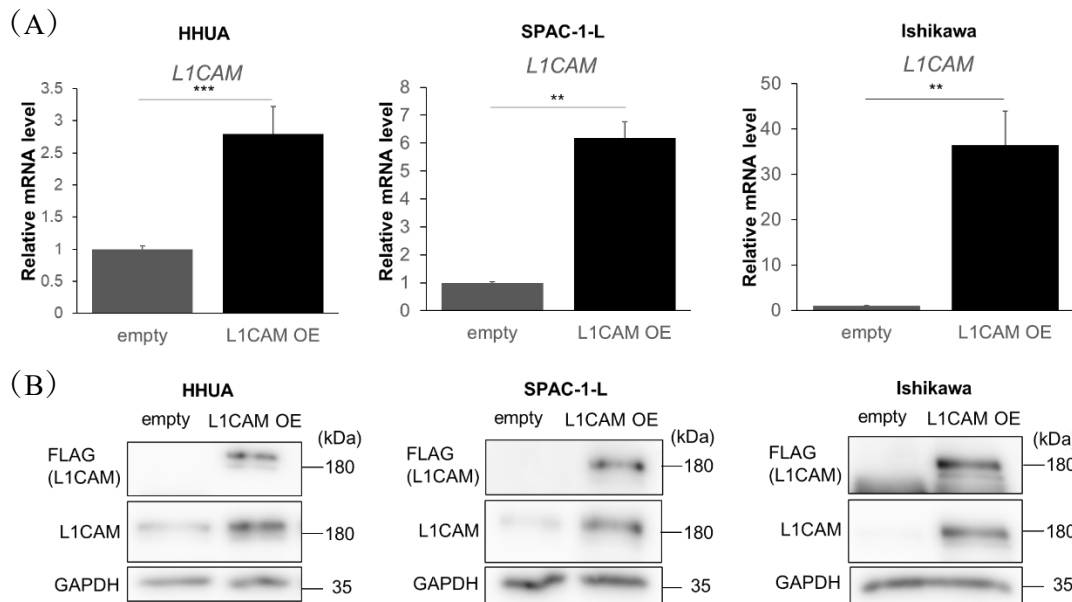


図 10 過剰発現ベクターを用いた L1CAM 過剰発現ヒト子宮体癌細胞株の評価

(empty: 対照群, L1CAM OE: L1CAM 過剰発現群)

(A) HHUA、SPAC-1-L および Ishikawa における L1CAM の mRNA 発現量の上昇を示す。GAPDH を内部対照として用いた。統計学的有意差は Dunnet 検定で評価した ($n = 3$) ($p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***). (B) HHUA、SPAC-1-L および Ishikawa における L1CAM および GAPDH の Western blotting を示す。GAPDH をローディングコントロールとして用いた。

L1CAM の過剰発現は HHUA および Ishikawa において細胞増殖を促進し、HHUA では 3 日目、Ishikawa では 4 日目に有意差が認められた (図 11)。

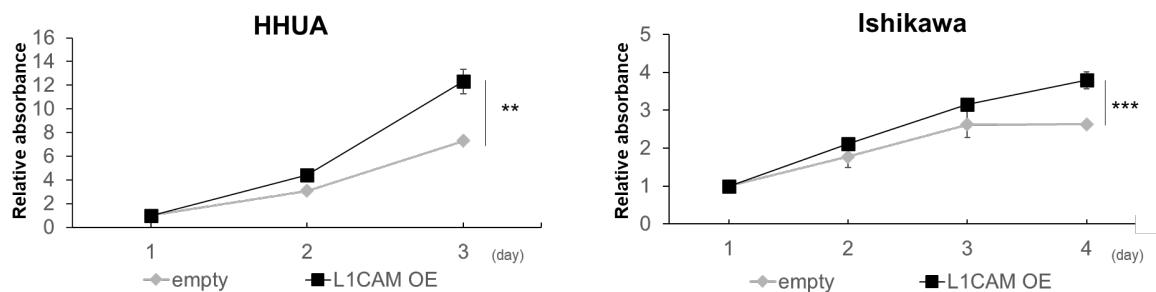


図 11 L1CAM 過剰発現ヒト子宮体癌細胞株を用いた細胞増殖アッセイ

対照群または L1CAM 過剰発現群における HHUA および Ishikawa の細胞増殖を示す。統計学的有意差は Dunnet 検定で評価した ($n = 3$) ($p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***).

2.3 L1CAM 発現変動ヒト子宮体癌細胞株における細胞周期アッセイとアポトーシスアッセイ

MTT アッセイにより細胞増殖に差が出ることが明らかとなったため、そのメカニズム解明のためフローサイトメトリーを用いた細胞周期アッセイを行った（図 12）。

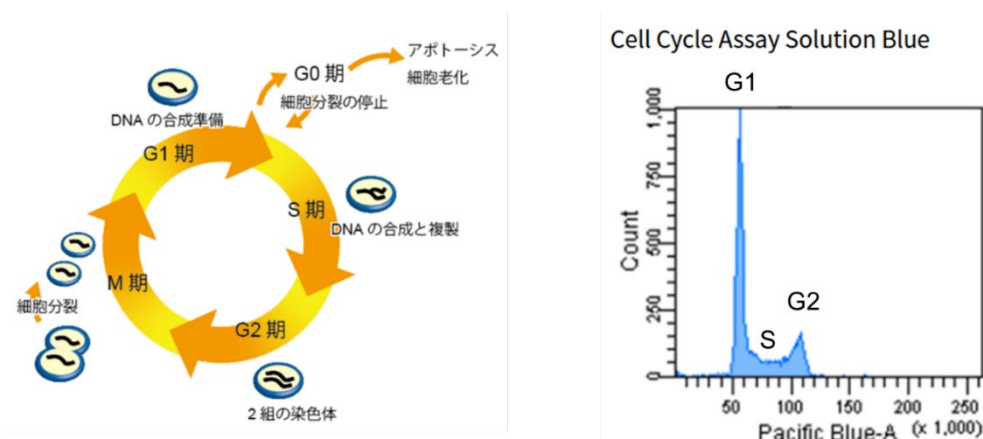


図 12 細胞周期アッセイの概要（Cell cycle assay Solution Blue（Dojindo）製品パンフレットおよび取扱説明書より抜粋）

L1CAM を過剰発現させると G0/G1 期からの進行が促進された。HHUA では対象群で 32.2%に対して過剰発現群では 26.3%、Ishikawa では対象群で 10.1%に対して過剰発現群で 7.6%と G0/G1 期にとどまる細胞数割合の低下が見られた（図 13）。

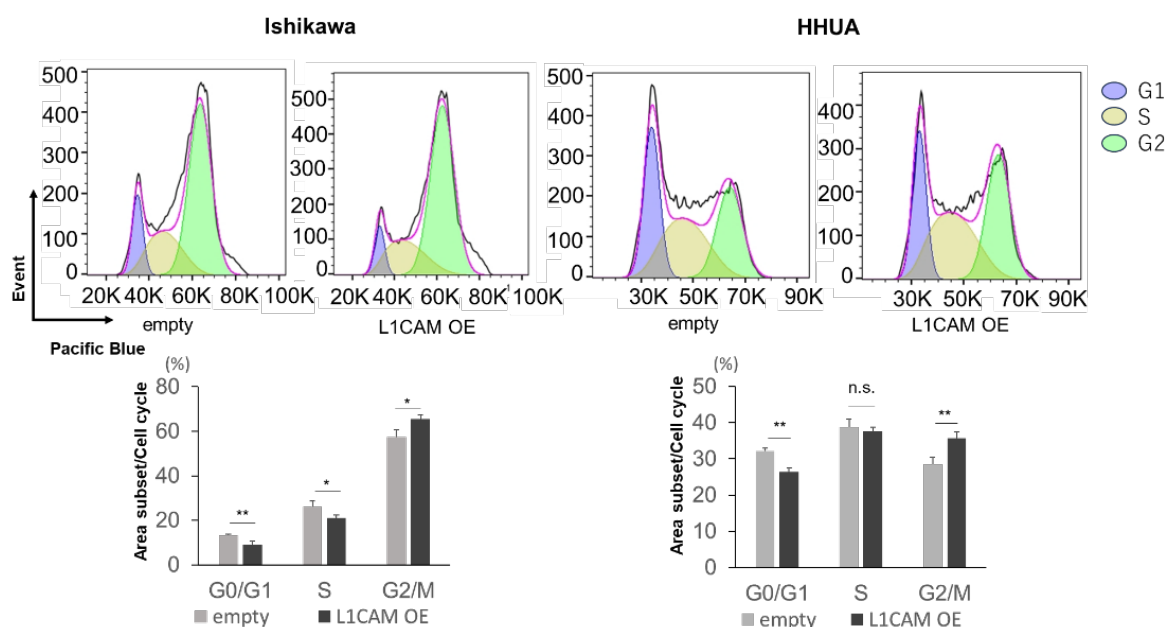


図 13 L1CAM 過剰発現ヒト子宮体癌細胞株を用いた細胞周期アッセイ

対照群および L1CAM 過剰発現群における HHUA および Ishikawa での Pacific Blue 染色を用いた細胞周期アッセイと各周期における細胞数の割合を示す。統計学的有意差は Dunnett 検定で評価した ($n = 3$) ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, n.s.=not significant)。

SPAC-1-L においては L1CAM ノックダウンにより G0/G1 期の蓄積が認められた (図 14A)。対照群における G0/G1 期の細胞の割合は 23.2%であったのに対し、L1CAM ノックダウン群では 33.4%に増加した。L1CAM 過剰発現時の変化、L1CAM ノックダウン時の変化から、L1CAM がヒト子宮体癌細胞の細胞周期に影響を与え、細胞増殖を変化させることが示唆された。HHUA では G2/M 期の減少傾向は見られたものの、G0/G1 期の細胞数割合に於いての有意差は得られなかった (図 14B)。

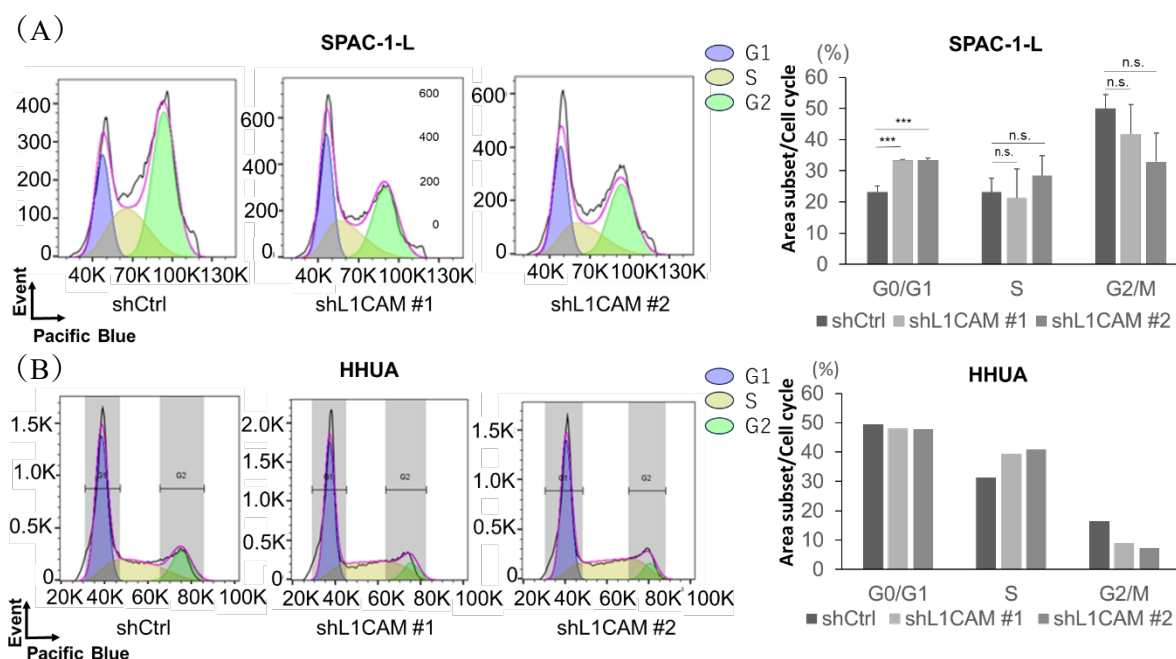


図 14 L1CAM ノックダウンヒト子宮体癌細胞株を用いた細胞周期アッセイ

対照群および L1CAM ノックダウン群における Pacific Blue 染色を用いた細胞周期アッセイと各周期における細胞数の割合を示す。(A) SPAC-1-L での結果を示す。統計学的有意差は Dunnett 検定で評価した ($n = 3$) ($p < 0.001$ ***, n.s.=not significant)。(B) HHUA での結果を示す ($n = 1$)。

アポトーシスについてもフローサイトメトリーを用いて評価を行ったが、HHUA および SPAC-1-L のいずれにおいても、L1CAM ノックダウンによるアポトーシス細胞の増加は認められなかった (図 15)。これらの結果からヒト子宮体癌細胞における L1CAM の発現が、アポトーシスではなく細胞周期に影響を与えることで細胞増殖能を亢進させることが示された。

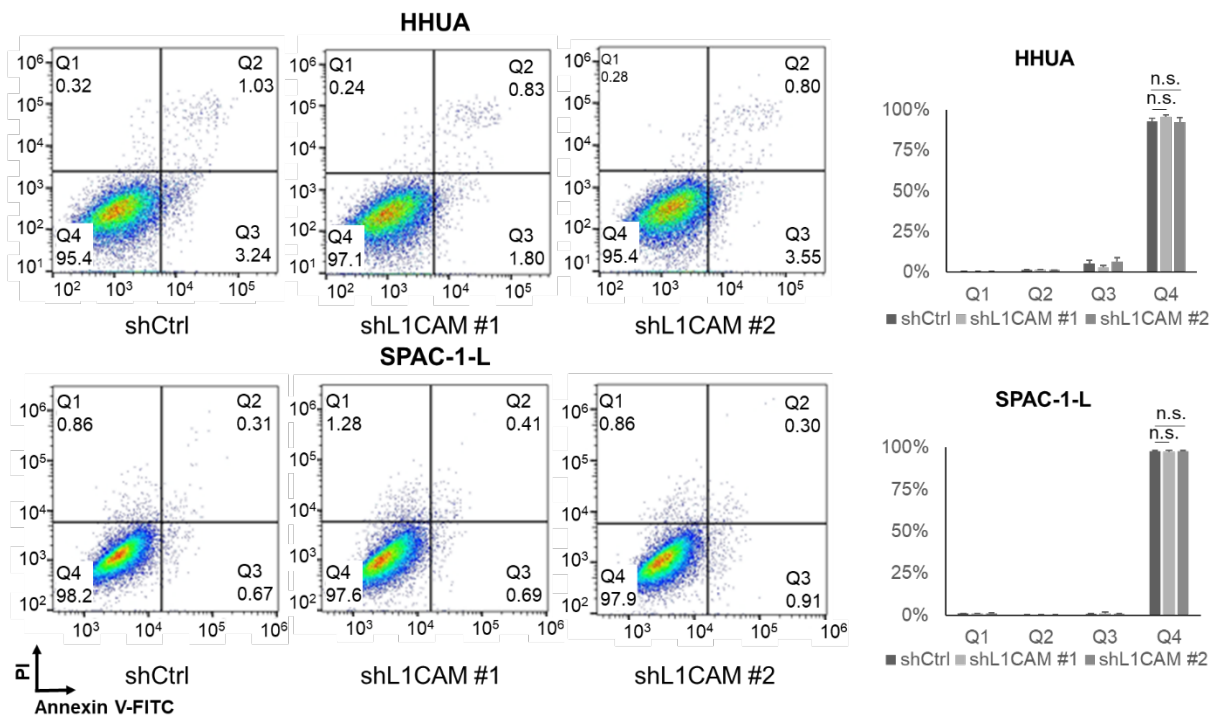


図 15 L1CAM ノックダウンヒト子宮体癌細胞株を用いたアポトーシスアッセイ
HHUA および SPAC-1-L における対照群および L1CAM ノックダウン群でのアポトーシスアッセイを示す。統計学的有意差は Dunnet 検定で評価した ($n = 3$) (n.s.=not significant)。

3. Bulk-RNA-seq による L1CAM 発現変動での遺伝子発現変化への影響の解析

L1CAM をノックダウンした HHUA の RNA を用いて bulk RNA-seq を実施した。提出前に Bioanalyzer を用いて抽出 RNA サンプルの RIN 値を計測しいずれも 9 以上であることを確認した (図 16)。

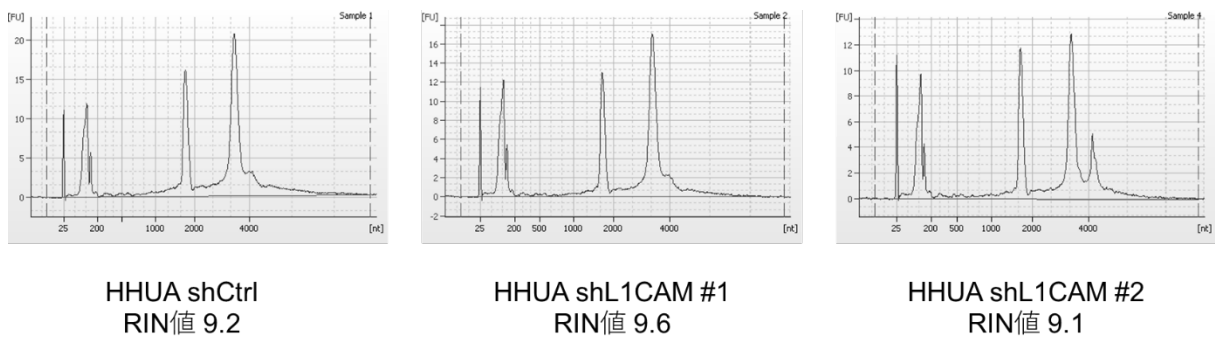


図 16 Bioanalyzer による抽出した RNA の品質評価の結果

L1CAM ノックダウン HHUA とコントロール HHUA を比較して log2 fold change で 1 未満のものを抽出し、データベースサイトの DAVID を用いて、機能的エンリッチメント解析を行った。抽出された 3,344 個の ENSEMBL Gene ID を入力し、使用する

リストとして Gene list を選択し、解析処理を行った。入力した遺伝子のうち 57.48% が DAVID 内でマッピングされた。生物種で Homo sapiens (human) を選択し 解析結果を確認した。得られた結果から KEGG pathway 解析により影響を受けると考えられるシグナル伝達経路を抽出した。抽出された Term を p 値の小さい順に並べたドットプロットを示す (図 17)。NF- κ B 経路、MAPK 経路、TNF 経路、JAK-STAT 経路、Ras 経路など複数のシグナル伝達経路で活性低下を認めた。抽出されたパスウェイの中では、NF- κ B 経路が最も活性低下が強かった。

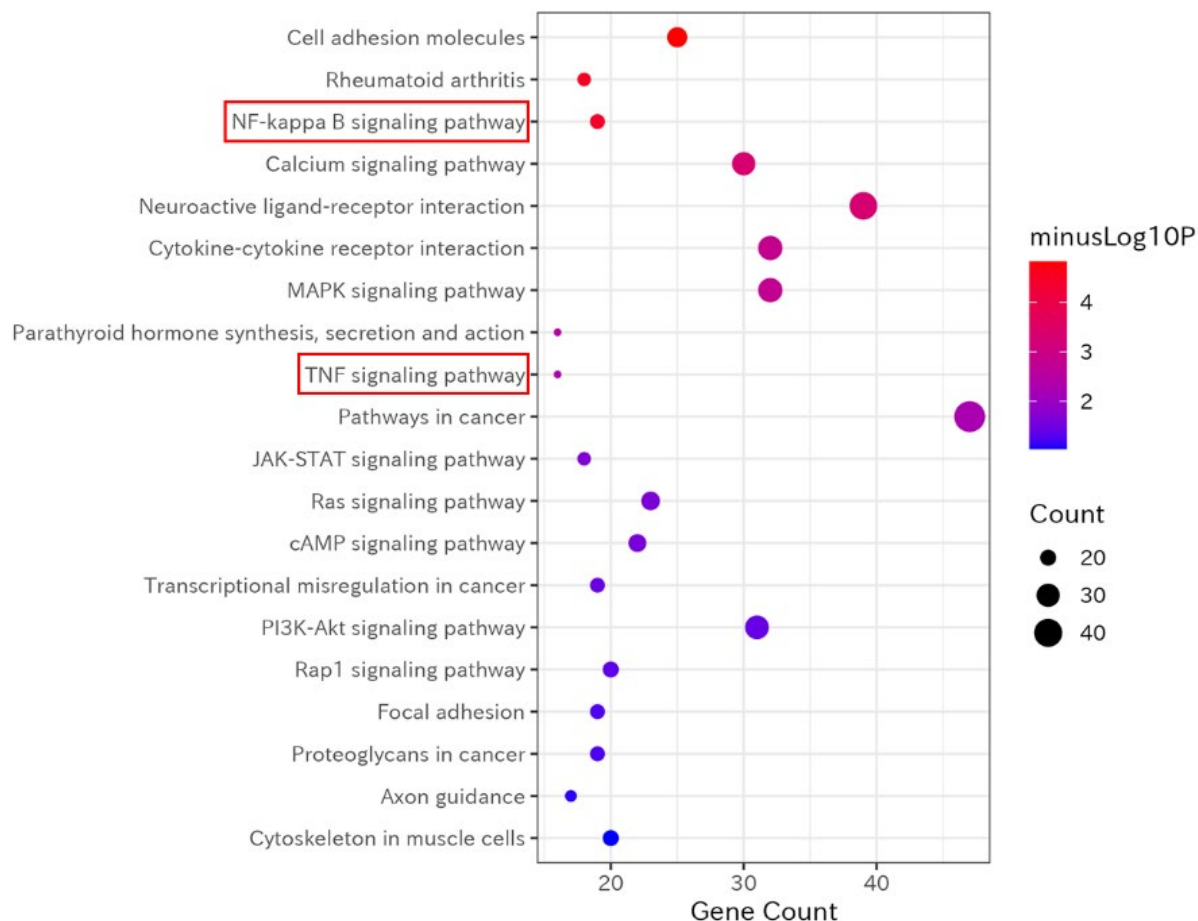


図 17 *L1CAM* ノックダウン HHUA の RNA-seq データに対する KEGG pathway 解析
ドットの大きさは Term 内の抽出された遺伝子数を示す。赤は該当する Term の p 値
がより小さいことを示す。

MAPK: mitogen-activated protein kinase, PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase, cAMP: cyclic AMP, JAK: janus kinase, STAT: signal transducer and activator of transcription

この RNA-seq データと他の癌種で行われた先行研究 (Kiefel *et al.*, 2010; Kiefel *et al.*, 2011; Bondong *et al.*, 2012) の結果に基づき、NF- κ B シグナル伝達経路に焦点を当てて以降の実験を進めた。NF- κ B の活性化はがん細胞内およびほとんどの固形がん

の腫瘍微小環境で起こるとされており、NF- κ B と炎症はがん細胞の増殖と生存の促進、遺伝的およびエピジェネティックな変化、細胞代謝の変化、がん幹細胞性の獲得、上皮間葉転換などに影響しているとされている (Taniguchi and Karin, 2018)。また活性化した NF- κ B は細胞周期の調節に関与しているとの報告もあり、NF- κ B が G1/S 期移行を促進できるとの報告もなされている (Ledoux and Perkins, 2014)。その効果はサイクリン D1 発現の調節に依存しているとされており、図 17 で示した DAVID に入力した遺伝子としては抽出されなかったが、HHUA で *L1CAM* をノックダウンした RNA-seq データでも *CCND1* の低下傾向が確認された。

Western blotting を行い、HHUA, SPAC-1-L では *L1CAM* ノックダウンにおいて NF- κ B (p65) のリン酸化が減少することを確認した (図 18)。一方、膵臓癌細胞株を用いた *L1CAM* ノックダウン実験で ERK1/2 のリン酸化が低下した先行報告 (Ben *et al.*, 2014) とは異なり、ERK1/2 のリン酸化は上昇した (図 18)。

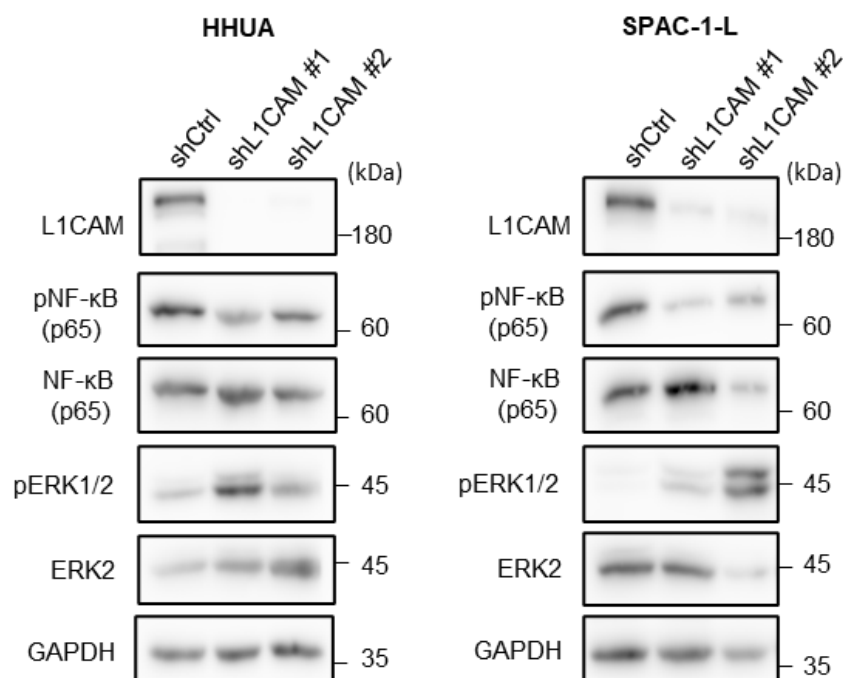


図 18 *L1CAM* ノックダウンヒト子宮体癌細胞株における NF- κ B (p65) のリン酸化の低下

HHUA および SPAC-1-L における *L1CAM*、pNF- κ B (p65)、NF- κ B (p65)、pERK1/2、ERK2、GAPDH の Western blotting を示す。GAPDH をローディングコントロールとして用いた。

対照的に L1CAM を過剰発現させると、HHUA および Ishikawa の両細胞株において NF- κ B (p65) のリン酸化が亢進することを確認した (図 19)。

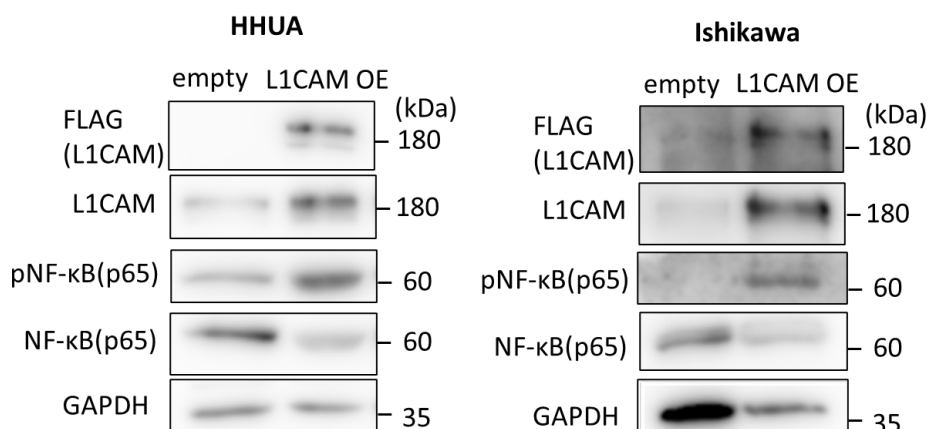


図 19 L1CAM 過剰発現ヒト子宮体癌細胞株における NF- κ B (p65) リン酸化の亢進
HHUA および Ishikawa における FLAG、L1CAM、pNF- κ B (p65)、NF- κ B (p65)、
GAPDH の Western blotting を示す。GAPDH をローディングコントロールとして用いた。

次にルシフェラーゼレポーターアッセイにより、NF- κ B プロモーター活性の変化を評価した。

L1CAM をノックダウンすると NF- κ B プロモーター活性が低下することが HHUA で確認された (図 20A)。逆に L1CAM を過剰発現させると、NF- κ B プロモーター活性が上昇することが HHUA、Ishikawa で確認された (図 20B)。

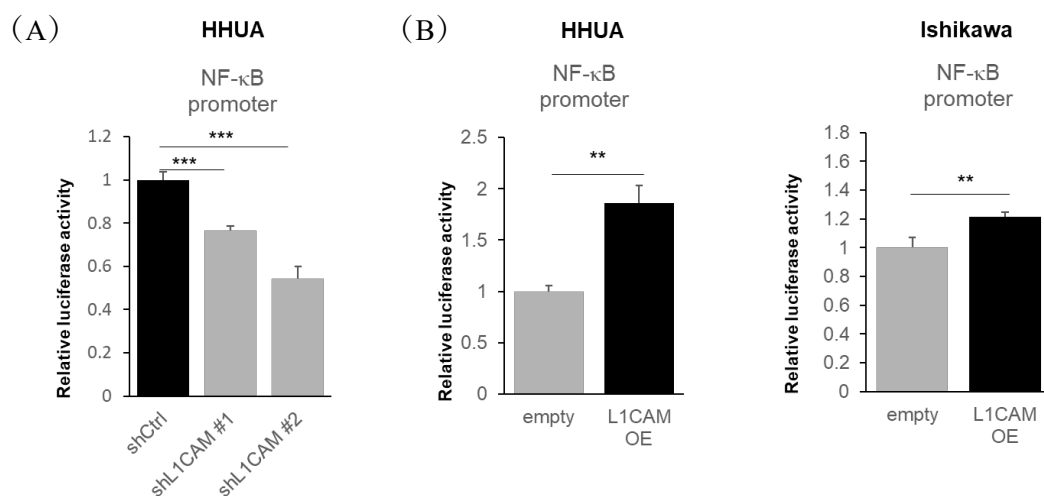


図 20 L1CAM 発現変動時の NF- κ B プロモーター活性変化

(A) L1CAM ノックダウン群における HHUA 細胞での NF- κ B プロモーター活性 (ルシフェラーゼ発現) の低下を示す。 β -ガラクトシダーゼを内部対照として用いた。統計学的有意差は Dunnett 検定で評価した ($n = 3$) ($p < 0.001$ ***). (B) L1CAM 過剰発

現群での HHUA および Ishikawa での NF- κ B プロモーター活性（ルシフェラーゼ発現）の上昇を示す。 β -ガラクトシダーゼを内部対照として用いた。統計学的有意差は Dunnet 検定で評価した ($n = 3$) ($p < 0.01$ **).

L1CAM と NF- κ B シグナル伝達経路の関係を調べるため、real-time PCR により NF- κ B 経路に関連する mRNA を評価し、HHUA および SPAC-1-L において、L1CAM のノックダウンは NF- κ B の標的遺伝子である *TNF* および *LTB* の mRNA 発現を低下させることが確認された (図 21A)。L1CAM を過剰発現させた HHUA では real-time PCR により *TNF* mRNA の上昇が確認された (図 21B)。TNF signaling pathway は図 17 の RNA-seq 解析においても抽出されていた。これらの結果は、L1CAM が NF- κ B 経路を活性化し、ヒト子宮体癌細胞株において *TNF* mRNA 発現を誘導することを示している。

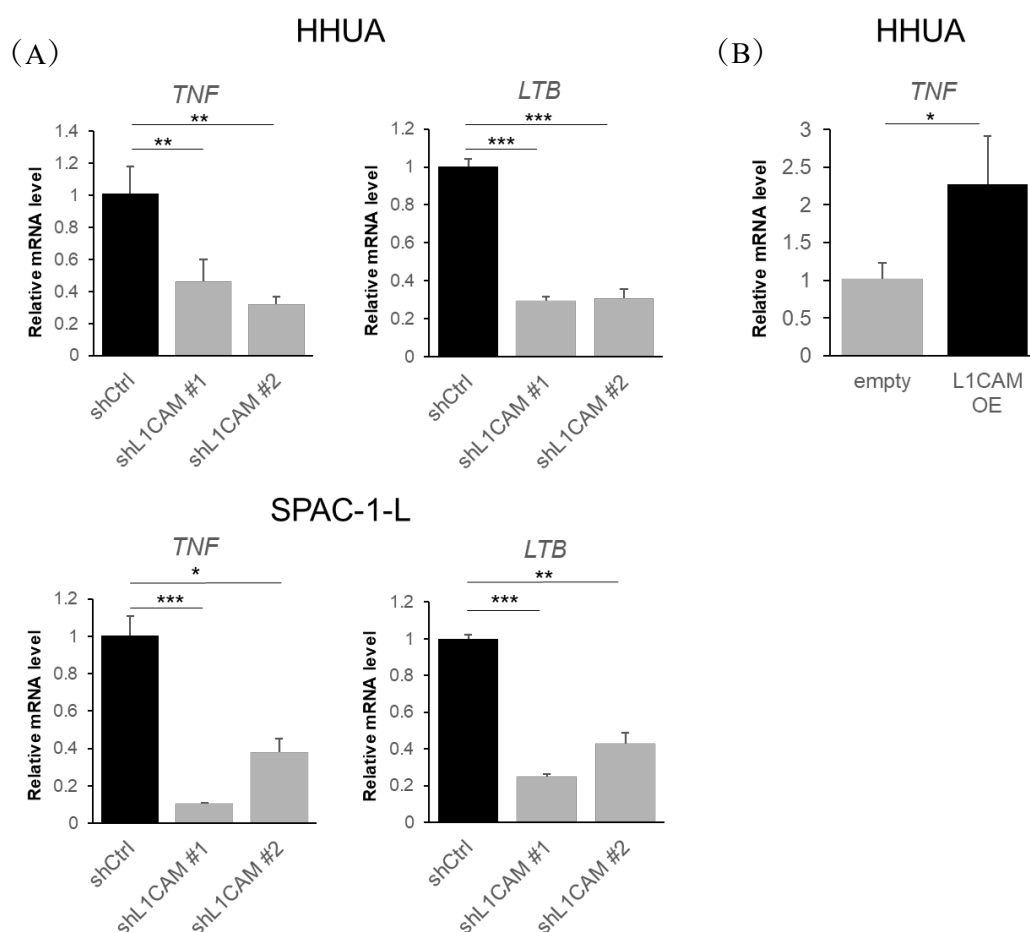


図 21 L1CAM 変動時の内在性 *TNF* と *LTB* mRNA の発現変化

(A) L1CAM ノックダウン群における HHUA および SPAC-1-L における *TNF* および *LTB* の相対的 mRNA 発現量の低下を示す。*GAPDH* を内部対照として用いた。統計学的有意差は Dunnet 検定で評価した ($n = 3$) ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***).

(B) HHUA の L1CAM 過剰発現群における *TNF* の相対的 mRNA 発現量の増加を示す。*GAPDH* を内部対照として用いた。統計学的有意差は Dunnet 検定で評価した ($n = 3$) ($p < 0.05 *$)。

4. L1CAM-NF- κ B 経路を介した子宮体癌細胞株への影響

ヒト子宮体癌細胞株における影響が L1CAM-NF- κ B 経路によるものかを確認するために、L1CAM ノックダウン状態下での NF- κ B 活性化による救済実験を行った。

NF- κ B の恒常的活性化は IKK β (EE) を過剰発現させて誘導した。IKK β (EE) は NF- κ B 活性化キナーゼである IKK β の 177 番目と 181 番目のセリンをグルタミン酸に置換した変異体で IKK β が常に活性化している状態となる。恒常的活性化状態である IKK β (EE) は I κ B α を常にリン酸化することで分解し続けるため、NF- κ B を細胞質内に拘束できなくし、常時核内への移行を引き起こすことで NF- κ B の恒常的活性化を誘導する。

HHUA および SPAC-1-L において、IKK β (EE) を発現するレンチウイルスベクターを用いて、L1CAM ノックダウン状態下で NF- κ B のリン酸化を誘導した (図 22)。

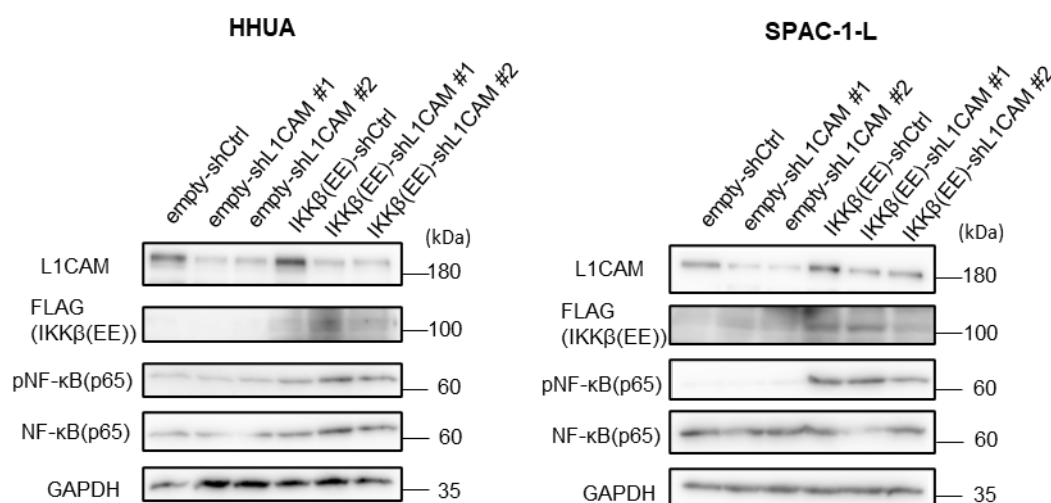


図 22 L1CAM ノックダウン状態下における IKK β (EE) 発現時の NF- κ B リン酸化の誘導

HHUA および SPAC-1-L における FLAG、L1CAM、pNF- κ B (p65)、NF- κ B (p65)、GAPDH の Western blotting を示す。対照群または L1CAM ノックダウン群で IKK β (EE) 過剰発現のない群 (左 3 列) と有る群 (右 3 列) を示す。GAPDH をローディングコントロールとして用いた。

HHUA を用いて細胞増殖を評価した (図 23A)。IKK β (EE) による NF- κ B の活性化は細胞増殖を促進した (図 23B 左)。L1CAM をノックダウンした場合でも IKK β

(EE) を発現させ NF- κ B を活性化させることで増殖の回復が見られた (図 23B 中央、右)。有意な差となった 4 日目の相対吸光度を棒グラフで示す (図 23C)。以上の結果より、IKK β (EE) による NF- κ B 活性化は細胞増殖を促進し、L1CAM ノックダウン状態下でも細胞増殖能を回復させることが確認された。

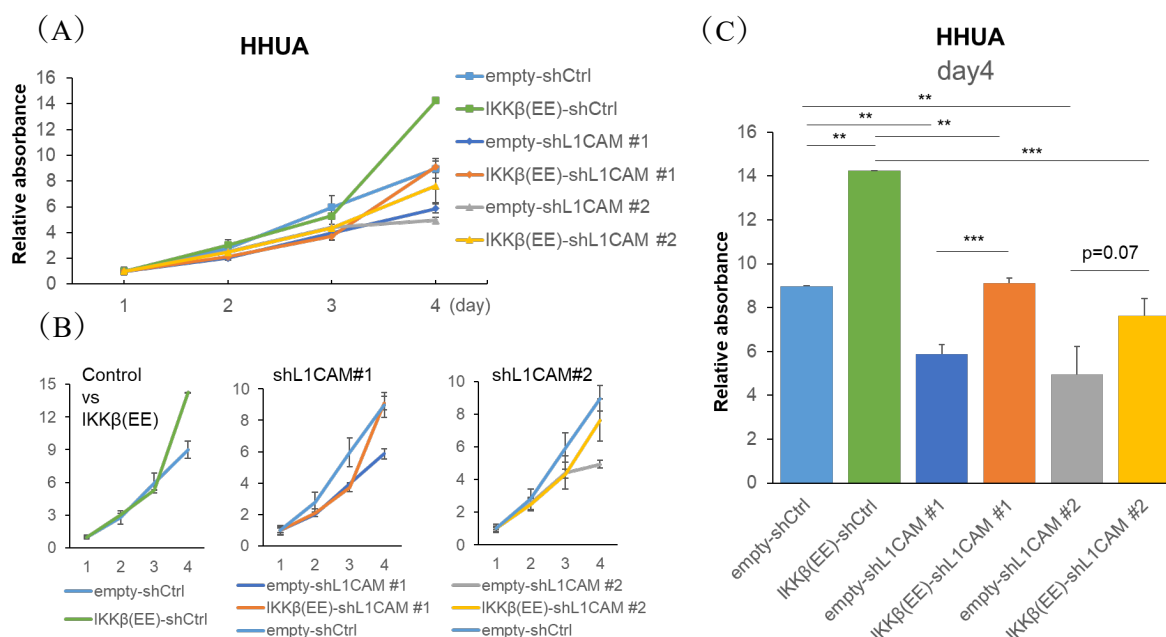


図 23 L1CAM ノックダウン状態下における IKK β (EE) 発現時の細胞増殖アッセイ

(A) HHUA の対照群、L1CAM ノックダウン群における IKK β (EE) 過剰発現の有無による細胞増殖を示す。(B) A から一部の細胞株を抽出して示す。(C) day4 での相対吸光度を示す。統計学的有意差は Dunnett 検定で評価した ($n = 3$) ($p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***).

細胞周期アッセイは L1CAM ノックダウン実験で結果の得られていた SPAC-1-L を用いて行った。IKK β (EE) による NF- κ B の活性化は、対照群において G0/G1 期の割合を減少させた (図 24A 左)。IKK β (EE) に対するコントロール群 (図 24B 青)、IKK β (EE) 過剰発現群 (図 24B 緑) のいずれにおいても L1CAM ノックダウンによって G0/G1 期の蓄積が見られた。L1CAM ノックダウン群における IKK β (EE) 過剰発現は G0/G1 期の割合を減少させた (図 24A 中央、右)。以上より IKK β (EE) による NF- κ B の活性化は L1CAM ノックダウン状態下でも細胞周期の進行を促進させることが示された。

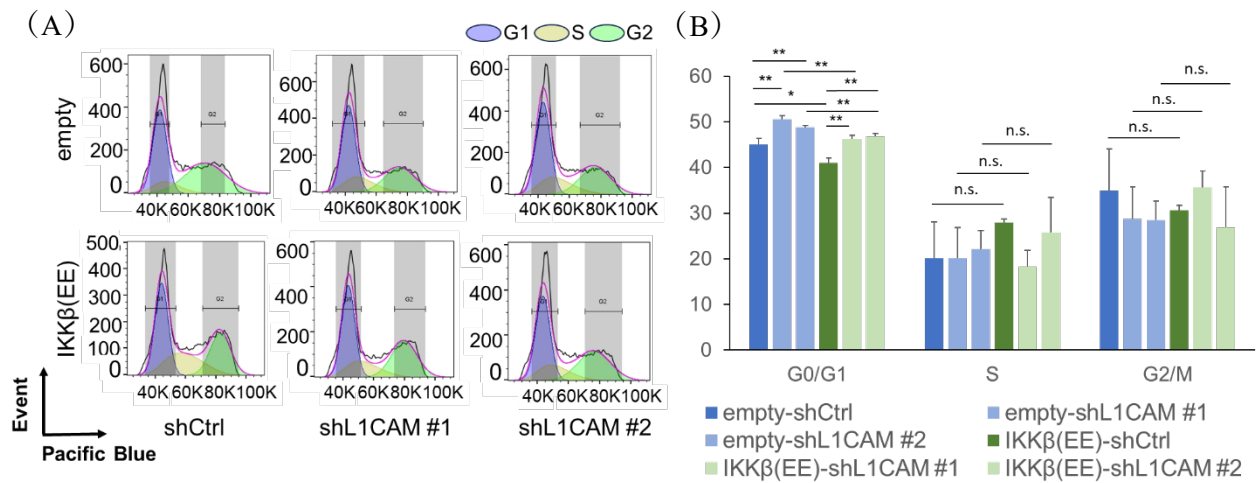


図 24 L1CAM ノックダウン状態下における IKKβ (EE) 発現時の細胞周期アッセイ

(A) (B) SPAC-1-L の対照群、L1CAM ノックダウン群における IKKβ (EE) 発現の有無による細胞周期アッセイを示す。統計学的有意差は Dunnet 検定で評価した ($n = 3$) ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, n.s.= not significant)。

これらの結果は、ヒト子宮体癌細胞に対する L1CAM の作用が NF-κB 経路の活性化に依存していることをさらに裏付けるものと考えられた。

5. ヒト子宮体癌細胞株における L1CAM 発現の薬剤反応への影響

次に L1CAM 発現と化学療法耐性の関連性を確認するために、ヒト子宮体癌細胞株に薬物を添加しその影響を評価した。CDDP は子宮体癌治療に用いられる中心的薬剤の一つである。IKK 阻害薬は IKK の活性を阻害することで IκBα のリン酸化を抑制し、NF-κB を細胞質内にとどめることで活性化を抑制する低分子化合物である。HHUA、SPAC-1-L に CDDP、IKK 阻害薬を単独で添加した際の half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) 曲線を示す (図 25)。48 時間での半数阻害濃度は HHUA では CDDP が 8.27 μM、IKK 阻害薬が 6.28 μM であった。SPAC-1-L では 7.66 μM、IKK 阻害薬が 6.03 μM であった。

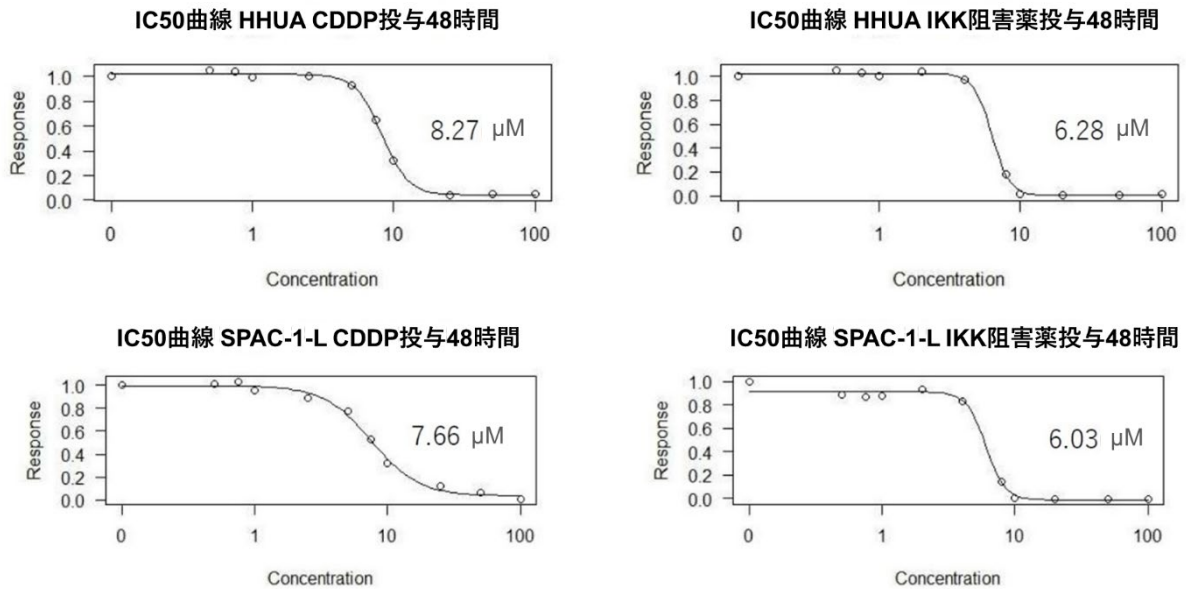


図 25 HHUA および SPAC-1-L での CDDP、IKK 阻害薬単独添加後 48 時間における IC₅₀ 曲線と半数阻害濃度

HHUA および SPAC-1-L に薬剤を添加し、48 時間経過した時点でタンパク質を回収した。CDDP 単独での処理は NF-κB リン酸化を亢進することが明らかとなった（図 26）。一方でこの効果は IKK 阻害薬の併用により抑制された（図 26）。

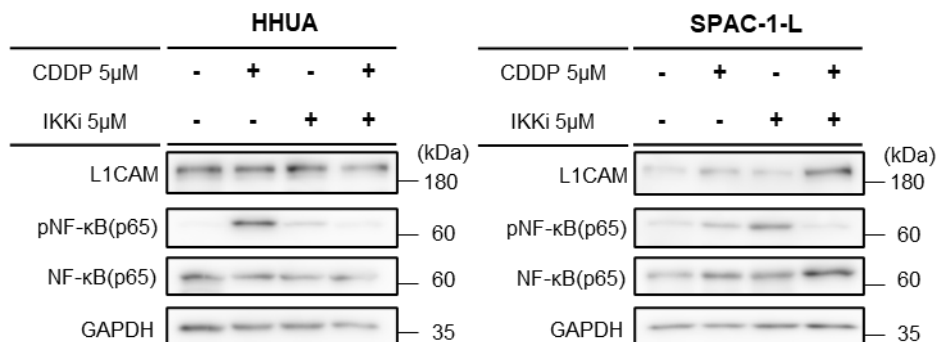


図 26 薬剤添加による NF-κB (p65) のリン酸化の変化

薬剤添加した HHUA および SPAC-1-L における L1CAM、pNF-κB (p65)、NF-κB (p65)、GAPDH の Western blotting を示す。GAPDH をローディングコントロールとして用いた。

HHUA および SPAC-1-L を用いた薬剤感受性試験において、薬剤添加 48 時間後の時点で、CDDP と IKK 阻害薬の併用は、CDDP 単独処理または IKK 阻害薬単独処理よりも強い細胞増殖抑制を示した（図 27A）。この結果は NF-κB を抑制することが

CDDP の効果を増強する可能性を示唆している。この効果は L1CAM をノックダウンした SPAC-1-L すなわち NF- κ B の活性化が抑制されている SPAC-1-L で CDDP 単独処理による増殖抑制効果が強くなることによって裏付けられている (図 27B)。一方、L1CAM を過剰発現した Ishikawa すなわち NF- κ B が活性化されている Ishikawa では、IKK 阻害薬添加による増殖抑制効果が対照群よりも弱くなった (図 27C)。CDDP 処理群では差が見られなかった (図 27C)。これらの結果は、L1CAM の発現増加が NF- κ B の活性化を促進し、薬剤耐性に寄与していること、また NF- κ B を抑制することがヒト子宮体癌に対する化学療法に有効である可能性を示唆している。

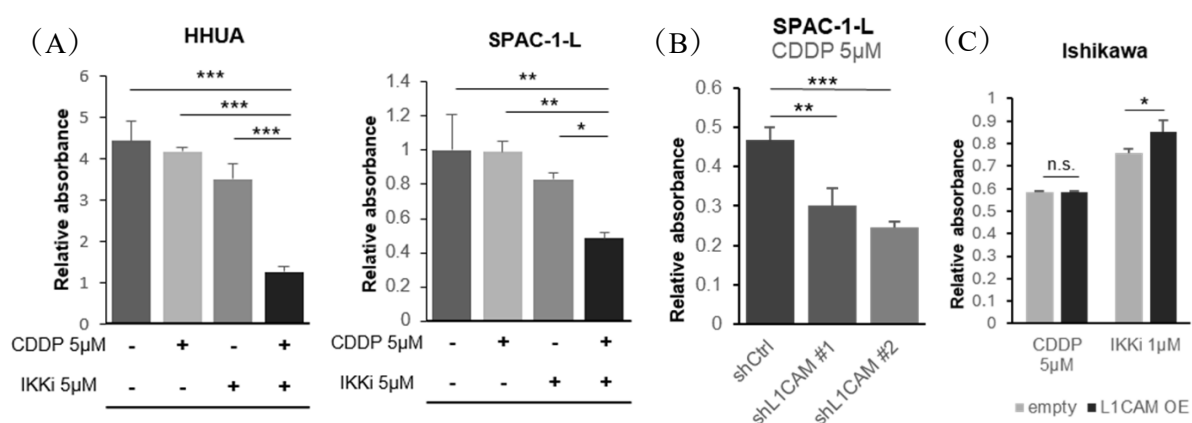


図 27 ヒト子宮体癌細胞株に対する CDDP と IKK 阻害薬併用の効果

(A) HHUA および SPAC-1-L における細胞増殖アッセイを示す。CDDP、IKK 阻害薬、またはその併用添加 48 時間後に計測を行った。統計学的有意差は Dunnet 検定で評価した ($n=3$) ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***). (B) SPAC-1-L の L1CAM ノックダウン群における CDDP 単独添加から 48 時間時点での細胞増殖抑制効果の増強を CDDP 添加開始時の吸光度を 1 とした相対吸光度で示す。統計学的有意差は Dunnet 検定で評価した ($n=3$) ($p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***). (C) Ishikawa での L1CAM 過剰発現群における CDDP および IKK 阻害薬単独添加後 48 時間での細胞増殖アッセイを示す。CDDP および IKK 阻害薬を添加していないウェルでの 48 時間後の吸光度を 1 とした相対吸光度で示す。統計学的有意差は Dunnet 検定で評価した ($n=3$) ($p < 0.05$ *, n.s.=not significant)。

6. ヒト子宮体癌における L1CAM 発現と NF- κ B 活性化の相関関係

L1CAM と NF- κ B 経路の関係をさらに確認するため、ヒト臨床検体を用いた評価を行った。子宮体癌の手術標本から作製した TMA 標本を用いて、L1CAM および NF- κ B (p65) の免疫組織化学染色を行った (図 28)。カイ二乗検定を行い、 $p < 0.01$ で L1CAM 陽性症例での NF- κ B (p65) の核内陽性率が有意に高いことが示された

(表 8)。この結果は、L1CAM 発現による NF- κ B の活性化がヒト子宮体癌組織でも生じていることを示唆している。

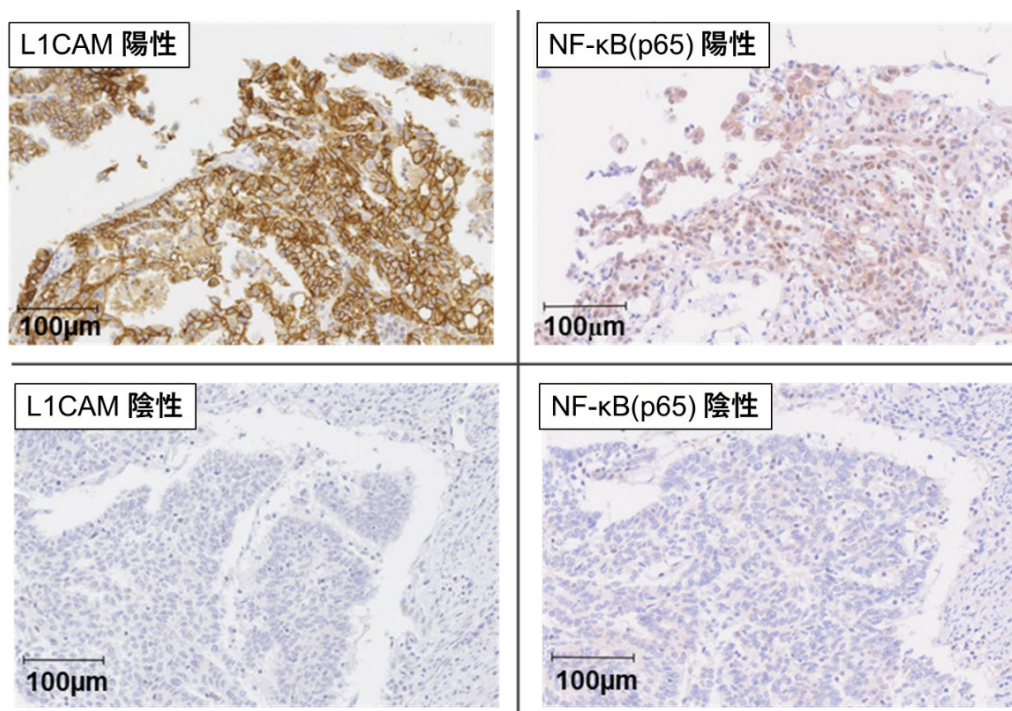


図 28 子宮体癌患者検体における L1CAM と NF- κ B (p65) の免疫組織化学染色

TMA における L1CAM および NF- κ B (p65) の免疫組織化学染色を示す。上段の左右パネル (L1CAM と NF- κ B (p65) の二重陽性) および下段の左右パネル (L1CAM と NF- κ B (p65) の二重陰性) は、同一患者由来の対をなす切片を示す。褐色シグナルは DAB 染色、青色シグナルはヘマトキシリン染色に対応する。Scale bar = 100 μ m。

表 8 子宮体癌患者検体における L1CAM 発現と NF- κ B (p65) 活性化の相関

カイ二乗検定を行い、 $p < 0.01$ で共陽性群に統計学的有意差を認めた。

	NF- κ B (p65) 陽性	NF- κ B (p65) 陰性	合計
L1CAM 陽性	45	135	180
L1CAM 陰性	21	159	180
合計	66	294	360

考察

L1CAM は子宮体癌における予後不良因子であり、多くの臨床研究で L1CAM 発現が薬剤耐性と関連することが報告されている (Dellinger *et al.*, 2016; van der Putten *et al.*, 2016; Asano *et al.*, 2020; Yamazaki *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2023; Kim *et al.*, 2024)。しかし、その基盤となるメカニズムは依然として不明である。本研究では、L1CAM 発現を低下させたヒト子宮体癌細胞株を用いて、L1CAM が細胞増殖を有意に抑制し、G0/G1 期からの進行を抑制していることを示した。逆に、L1CAM を過剰発現させた場合には、反対の変化として細胞増殖の促進と G0/G1 期から S 期への移行の亢進が観察された。これらの変化は、L1CAM がヒト子宮体癌において G0/G1 チェックポイントに作用することで細胞増殖を制御する役割を果たしていることを示唆している。次に、RNA-seq 結果に基づき、NF- κ B に焦点を当てた。本研究では、NF- κ B シグナル伝達の下流エフェクターとして主に RelA (p65) に着目した。RelA はがん生物学において機能的に優位な NF- κ B サブユニットとして広く認識されており、NF- κ B 活性化の主要な媒介体として機能し、腫瘍増殖、生存、炎症、化学療法抵抗性に関わる転写プログラムを調節するとされている (Taniguchi and Karin, 2018)。本研究において、ヒト子宮体癌細胞において L1CAM が NF- κ B (p65) のリン酸化を促進することを明らかにし、NF- κ B リン酸化自体がヒト子宮体癌細胞における G0/G1 期からの移行に正の影響を与えることを示した。TNF および LTB mRNA レベルの上昇は、L1CAM-NF- κ B 経路の活性化が TNF-NF- κ B 経路における正のフィードバック機構、すなわちオートクライン機構を活性化し、NF- κ B 活性化を維持する可能性を示唆している (図 29)。

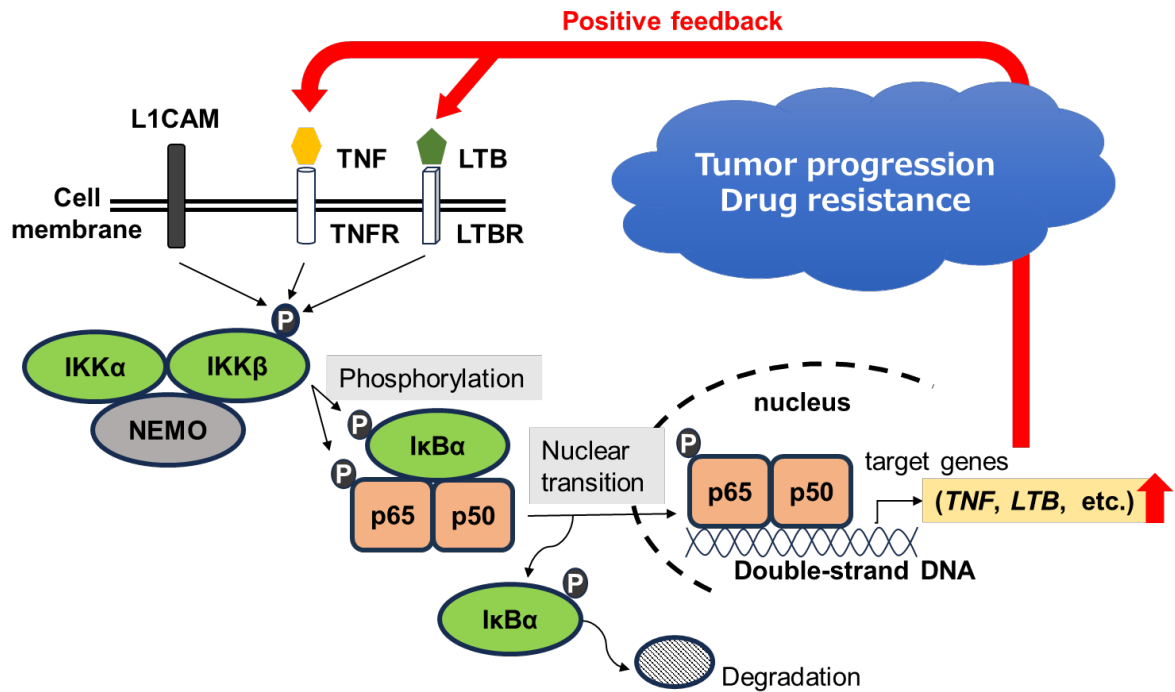


図 29 本研究から示唆される、子宮体癌細胞における L1CAM-NF-κB 経路の活性化メカニズム

IKK: I kappa B kinase, L1CAM: L1 cell adhesion molecule, LTB: lymphotoxin beta, LTBR: lymphotoxin beta receptor, NEMO: NF-κB essential modulator, TNF: tumor necrosis factor, TNFR: tumor necrosis factor receptor

これらの知見は、L1CAM-NF-κB 経路が L1CAM 高発現のヒト子宮体癌の予後不良と関連している可能性を示しており、TNF-α の高発現が予後不良と関連していることを示したこれまでの報告と一致している (Wieser *et al.*, 2020)。IκBα のリン酸化を阻害し NF-κB の活性化を抑制する IKK 阻害薬を CDDP と併用した際により強い細胞増殖抑制効果を示したことは、L1CAM-NF-κB 経路がヒト子宮体癌の薬剤耐性に関与していることを示唆している。NF-κB 自体が化学療法抵抗性、放射線抵抗性に関与し、NF-κB を阻害することで化学療法感受性が高まり、放射線増感効果もみられるとした報告がある (Li and Sethi, 2010)。子宮体癌の術後再発高リスク群には術後補助療法が勧められ、本邦においてはほとんどの施設で化学療法が施行されている (日本婦人科腫瘍学会, 2023)。L1CAM 高発現症例においては抗癌剤抵抗性を示すため、既存の殺細胞性抗癌剤では予後改善に寄与しない可能性が高い。欧州では術後補助療法に放射線治療が広く行われているが、L1CAM-NF-κB 経路の活性化という本研究の結果からは予後改善に寄与しない可能性がある。こちらに関しては PORTEC-4a 試験において既存の Vaginal brachytherapy に対して L1CAM 陽性を含む unfavorable 群に対

して external beam radiotherapy (ERBT) を施行する randomized controlled trial (RCT) が進行中であり、その結果に注視したい (van den Heerik *et al.*, 2020)。本研究から明らかになった L1CAM の分子メカニズムからは既存の化学療法、放射線療法では予後改善効果が限定的である可能性があり、新たな治療薬の開発が望まれる。本研究から明らかとなった機序である細胞周期に働きかける治療や NF- κ B 経路の分子を阻害する治療を組み合わせることが将来の L1CAM 陽性子宮体癌患者すなわち予後不良子宮体癌患者の予後改善につながる可能性がある。

子宮体癌細胞株での L1CAM ノックダウンにより、RNA-seq では MAPK 経路関連遺伝子群の発現低下が認められた一方、Western blotting では ERK1/2 のリン酸化が上昇した。RNA-seq は主に転写レベルの経路構成要素/標的遺伝子の発現量を反映するのに対し、ERK1/2 のリン酸化はシグナル活性を反映するため、両者は必ずしも一致しない。特に MAPK/ERK 経路は DUSP などの負のフィードバック制御が強く、抑制因子の低下や脱リン酸化能低下により、転写シグネチャが低下していても ERK1/2 のリン酸化が相対的に上昇する可能性がある。本研究で行った RNA-seq でも MAPK 経路の DUSP1 の低下が確認されており、ERK に対する抑制が解除されたことによる相対的 pERK1/2 の上昇が見られた可能性がある。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、使用したヒト子宮体癌細胞株の数が限られていることである。異なる変異を有するヒト子宮体癌細胞株を用いたものの、臨床的に有用なデータをより多く得るためには、TCGA 分類を組み合わせるなど更なる検証が必要である。また、TMA 評価に基づき、L1CAM による NF- κ B 活性化が *in vitro* だけでなく *in vivo* でも生じることを確認したものの、同様の変化が *in vivo* でも生じるかどうかを確定するにはさらなる検証が必要である。本研究において子宮体癌細胞での L1CAM-NF- κ B 経路の活性化について明らかとしたが、L1CAM が NF- κ B にどのようにして作用するか、すなわち直接的なのかまたは他の分子を介在して NF- κ B を活性化するかについては依然として不明であり、今後明らかにしていく必要がある。子宮体癌細胞における L1CAM の高発現が予後不良に関連することを、分子メカニズムからも明らかとしたが、これは摘出した腫瘍の免疫染色を行って初めてわかる情報である。したがって、血液検査などで L1CAM-NF- κ B 経路の活性化を同定できるバイオマーカーが存在するかを探索していくことも今後の課題と考える。

我々の結果は、ヒト子宮体癌に対する L1CAM を標的とした新規治療法の可能性を示唆するとともに、L1CAM 陽性腫瘍における NF- κ B シグナル伝達経路の阻害が予後改善に寄与する可能性を示している。

結論

1. L1CAM はヒト子宮体癌細胞株間で発現レベルが異なる
2. 子宮体癌細胞において、L1CAM は NF- κ B 経路を活性化し、G0/G1 チェックポイントを含む細胞周期制御に影響を与えることで、細胞増殖を促進する
3. L1CAM-NF- κ B 経路は、子宮体癌の予後不良と薬剤抵抗性と関連する可能性が示唆される

新知見の意義

本研究により子宮体癌細胞における L1CAM 発現による予後不良と関連する機序として、G0/G1 チェックポイントに作用して細胞増殖を促進することが明らかとなった。さらに、L1CAM-NF- κ B 経路を介して治療抵抗性に関与している可能性が示唆された。本研究は、子宮体癌の予後不良群において L1CAM 発現がバイオマーカーとなり得ることを、その分子メカニズムの側面からも示した点に意義がある。加えて、L1CAM 陽性腫瘍に対する NF- κ B シグナル経路阻害という新たな治療戦略の可能性を提示した点においても意義深いと考えられる。

今後の研究、展開

本研究は主として *in vitro* 解析に基づくものであり、L1CAM-NF- κ B 経路が *in vivo* 環境においても同様に機能しているのかを検証する必要がある。そのためには、TMA 検体のみならず、腫瘍内不均一性を考慮した手術検体を用いた詳細な病理学的解析が重要である。また、動物モデルやオルガノイドを用いた検証を行うことで、より生体に近い環境での L1CAM の機能解明が期待される。子宮体癌での治療応用の観点からは、L1CAM 自体を標的分子とするアプローチに加え、下流の NF- κ B や TNF、LTB に焦点を当てたアプローチが考えられ、それぞれを阻害または制御した際に腫瘍増殖や薬剤感受性がどのように変化するかを検証する必要がある。

今後の課題

TCGA 分類に代表されるように腫瘍の治療反応性は L1CAM のみならず、多様な遺伝子変異の影響も受けており、本研究においても、細胞株ごとに挙動が異なった要因の一つであると考えられる。NF- κ B 活性化が腫瘍免疫に対してどのような役割を果たしているかを明らかにし、L1CAM-NF- κ B 経路を阻害することが有効な子宮体癌症例を選別することが今後重要となる。本研究では、L1CAM の発現を変化させることにより、細胞内シグナル経路の変化がもたらす影響を検証した。近年、antibody-drug

conjugate (ADC) 薬 (Yamaguchi *et al.*, 2024) や抗体薬 (Kim *et al.*, 2025) など、L1CAM を標的とした治療に関する報告が見られるようになってきたが、細胞外から L1CAM を阻害した際に生じる分子学的変化および細胞機能の変化については未だ不明な点が多い。そのため、今後はこれらの点を明らかにしていく必要があると考えられる。

謝辞

本研究全般においてご指導いただきました北海道大学大学院医学研究院 生殖・発達医学分野 産婦人科学教室 渡利英道教授に深謝いたします。

本研究の計画立案、実験手技、実験結果に対する議論ならびに論文作成で直接ご指導をいただきました北海道大学大学院医学研究院 病理学講座 統合病理学教室 谷口浩二教授に深謝いたします。

研究全体にご協力いただきました北海道大学病院 産科 朝野拓史先生、婦人科 山崎博之先生、北海道大学大学院医学研究院 統合病理学教室 田中敏先生、岩崎沙理先生、統合病理学教室の大学院生の皆様に心より御礼申し上げます。

本研究の実施にあたり、ご協力いただきました北海道大学病院婦人科で治療を受けた患者様に感謝申し上げます。

本研究の一部は JSPS 科研費 JP15K21775, JP20H03758, JP23H02978, JP24K02581, JP24K22401 の助成、革新的先端研究開発支援事業（AMED-PRIME）JP18gm6210008/19gm6210008/20gm6210008/21gm6210008、創発的研究支援事業（JST FOREST）JPMJFR200Q ならびに次世代研究者挑戦的研究プログラム（JST SPRING）JPMJSP2119 の助成を受けたものである。

利益相反

この研究発表に関する開示すべき利益相反状態はありません。

引用文献

Alexa M, Hasenburg A and Battista MJ (2021) The TCGA Molecular Classification of Endometrial Cancer and Its Possible Impact on Adjuvant Treatment Decisions. *Cancers* (Basel), 13, 1478.

Asano H, Hatanaka KC, Matsuoka R, Dong P, Mitamura T, Konno Y, Kato T, Kobayashi N, Ihira K, Nozaki A, et al (2020) L1CAM Predicts Adverse Outcomes in Patients with Endometrial Cancer Undergoing Full Lymphadenectomy and Adjuvant Chemotherapy. *Ann Surg Oncol*, 27, 2159-2168.

Ben Q, An W, Fei J, Xu M, Li G, Li Z and Yuan Y (2014) Downregulation of L1CAM inhibits proliferation, invasion and arrests cell cycle progression in pancreatic cancer cells in vitro. *Exp Ther Med*, 7, 785-790.

Berek JS, Matias-Guiu X, Creutzberg C, Fotopoulou C, Gaffney D, Kehoe S, Lindemann K, Mutch D, Concin N; Endometrial Cancer Staging Subcommittee, FIGO Women's Cancer Committee (2023) FIGO staging of endometrial cancer: 2023. *Int J Gynaecol Obstet*, 162, 383-394.

Bokhman JV (1983) Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 15, 10-17.

Bondong S, Kiefel H, Hielscher T, Zeimet AG, Zeillinger R, Pils D, Schuster E, Castillo-Tong DC, Cadron I, Vergote I, et al (2012) Prognostic significance of L1CAM in ovarian cancer and its role in constitutive NF-kappaB activation. *Ann Oncol*, 23, 1795-1802.

Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I and Jemal A (2024) Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 74, 229-263.

Cancer Genome Atlas Research Network; Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, Robertson AG, Pashtan I, Shen R, et al (2013) Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*, 497, 67-73.

Dellinger TH, Smith DD, Ouyang C, Warden CD, Williams JC and Han ES (2016) L1CAM is an independent predictor of poor survival in endometrial cancer - An analysis of The Cancer Genome Atlas(TCGA). *Gynecol Oncol*, 141, 336-340.

Finas D, Huszar M, Agic A, Dogan S, Kiefel H, Riedle S, Gast D, Marcovich R, Noack F, Altevogt P, et al (2008) L1 cell adhesion molecule (L1CAM) as a pathogenetic factor in endometriosis. *Hum Reprod*, 23, 1053-1062.

Gavert N, Ben-Shmuel A, Raveh S and Ben-Ze'ev A (2008) L1-CAM in cancerous tissues. *Expert Opin Biol Ther*, 8, 1749-1757.

Giordano M and Cavallaro U (2020) Different Shades of L1CAM in the Pathophysiology of Cancer Stem Cells. *J Clin Med*, 9, 1502.

Kiefel H, Bondong S, Erbe-Hoffmann N, Hazin J, Riedle S, Wolf J, Pfeifer M, Arlt A, Schafer H, Muerkoster SS, et al (2010) L1CAM-integrin interaction induces constitutive NF-kappaB activation in pancreatic adenocarcinoma cells by enhancing IL-1beta expression. *Oncogene*, 29, 4766-4778.

Kiefel H, Pfeifer M, Bondong S, Hazin J and Altevogt P (2011) Linking L1CAM-mediated signaling to NF-kappaB activation. *Trends Mol Med*, 17, 178-187.

Kiefel H, Bondong S, Hazin J, Ridinger J, Schirmer U, Riedle S and Altevogt P (2012) L1CAM: a major driver for tumor cell invasion and motility. *Cell Adh Migr*, 6, 374-384.

Kim J, Kim SI, Kim NR, Kim H, Kim HS, Chung HH, Kim JW, Lee C and Lee M (2023) Prognostic significance of L1CAM expression in addition to ProMisE in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 174, 231-238.

Kim JC, Ahn B, Lee YJ, Nam EJ, Kim SW, Kim S, Kim YT, Park E and Lee JY (2024) Mismatch repair, p53, and L1 cell adhesion molecule status influence the response to chemotherapy in advanced and recurrent endometrial cancer. *BMC Cancer*, 24, 1586.

- Kim SH, Chae HS, Ko SM, Jeong DS, Lee JY, Shin YG, Yoon SJ and Son WC (2025) Nonclinical safety evaluation and pharmacokinetics of Ab612, a novel anti-L1CAM (CD171) therapeutic antibody candidate against solid cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 74, 348.
- Ledoux AC and Perkins ND (2014) NF-kappaB and the cell cycle. *Biochem Soc Trans*, 42, 76-81.
- Li F and Sethi G (2010) Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*, 1805, 167-180.
- Maten MV, Reijnen C, Pijnenborg JMA and Zegers MM (2019) L1 Cell Adhesion Molecule in Cancer, a Systematic Review on Domain-Specific Functions. *Int J Mol Sci*, 20, 4180.
- Taniguchi K and Karin M (2018) NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol*, 18, 309-324.
- van den Heerik ASVM, Horeweg N, Nout RA, Lutgens L, van der Steen-Banasik EM, Westerveld GH, van den Berg HA, Slot A, Koppe FLA, Kommoss S, et al (2020) PORTEC-4a: international randomized trial of molecular profile-based adjuvant treatment for women with high-intermediate risk endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 30, 2002-2007.
- van der Putten LJ, Visser NC, van de Vijver K, Santacana M, Bronsert P, Bulten J, Hirschfeld M, Colas E, Gil-Moreno A, Garcia A, et al (2016) L1CAM expression in endometrial carcinomas: an ENITEC collaboration study. *Br J Cancer*, 115, 716-724.
- Yamaguchi M, Hirai S, Idogawa M, Sumi T, Uchida H and Sakuma Y (2024) A Newly Developed Anti-L1CAM Monoclonal Antibody Targets Small Cell Lung Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci*, 25, 8748.
- Yamazaki H, Asano H, Hatanaka KC, Matsuoka R, Konno Y, Matsuno Y, Hatanaka Y and Watari H (2022) The prognosis of endometrial cancers stratified with conventional risk factors and modified molecular classification. *Cancer Sci*, 113, 3134-3147.

Yang L, Yuan Y, Zhu R and Zhang X (2023) Time trend of global uterine cancer burden: an age-period-cohort analysis from 1990 to 2019 and predictions in a 25-year period. BMC Womens Health, 23, 384.

国立がん研究センター（2026）国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」（全国がん登録）https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/data/dl/index.html#a14（2026 年 1 月 29 日閲覧）

日本産科婦人科学会婦人科腫瘍委員会（2010）第 49 回治療年報（2001 年治療開始例）<https://fa.kyorin.co.jp/jsog/readPDF.php?file=to63/62/12/KJ00006772897.pdf>（2025 年 11 月 1 日閲覧）

日本産科婦人科学会婦人科腫瘍委員会（2025）第 65 回治療年報（2017 年治療開始例）<https://fa.kyorin.co.jp/jsog/readPDF.php?file=77/3/077030466.pdf>（2025 年 11 月 1 日閲覧）

日本婦人科腫瘍学会（2023）子宮体がん治療ガイドライン 2023 年版.（金原出版，東京）.