

令和元年6月21日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10569

研究課題名(和文) 前立腺癌細胞表面糖鎖を標的としたバイオマーカーの探索と新規治療法の検討

研究課題名(英文) Establishment of prostate cancer cell surface glycan targeted-biomarker

研究代表者

飛澤 悠葵 (TOBISAWA, YUKI)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：70623768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞において細胞表面および分泌タンパク質上の糖鎖構造の変化は、癌細胞の特性やタンパク質の機能の変化を引き起こし、癌の悪性度に寄与することが明らかにされてきた。近年、急速に増加した前立腺癌罹患率により癌の悪性度を簡便にそして正確に判別することは世界的な課題となっている。本研究では、前立腺癌における高分岐型の糖鎖構造に注目し、悪性度との関連性や悪性度を術前に判別する上での有用性を検討した。その結果、前立腺癌においては高分岐型糖鎖の発現が、細胞の浸潤能を促進させ、悪性度を増強させることが明らかとなった。以上の結果から、高分岐糖鎖を利用したバイオマーカーは前立腺癌予後の予測に有効であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでの研究から前立腺癌における高分岐型の糖鎖構造に注目し、これまでに報告した分岐型糖鎖構造だけでなく、さらに高分岐型へ変換可能な酵素の発現が、細胞の浸潤能を促進させ、悪性度を増強させることを明らかにした。この結果は、高分岐型糖鎖構造を標的とするツールを用いることでより精度の高いバイオマーカーを発掘できると予想される。従って、より抗原性を高めた免疫手法を用い抗体もしくは特異的に認識可能なタンパク質を獲得することで、より正確に悪性度を反映する検査手法を構築できると予想される。

研究成果の概要(英文)：Cell surface carbohydrates reportedly play significant roles in glycoprotein function and in tumor cell proliferation and invasion. Prostate cancer (PCa) is the most common malignancy in men and the second leading cause of cancer related death in the USA and Europe. Its incidence is rapidly increasing in the Asia-Pacific region, and the associated clinical issues have attracted global research interest. Although androgen independent PCa showed changes in cell surface carbohydrate structures, the mechanisms related to aberrant glycan with PCa metastasis are yet unclear. In this study, I found relationships between branching carbohydrate structures of PCa cell surface and PCa malignancy. Although I tried establishment of the antibody against branching glycan for further pre-clinical study, no useful antibody is established. Therefore, it is necessary to establish of the anti-branching carbohydrate antibody for construction of novel PCa biomarker.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腫瘍学 抗糖鎖抗体 バイオマーカー 糖鎖生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、日本における前立腺癌の罹患率は、胃癌、肺癌、大腸癌に次いで第4位であるが、近年急激な増加傾向を見せており、数年後には男性の癌罹患率の第1位になると予測されている。すでに欧米では、前立腺癌は男性の癌罹患率の第1位である。前立腺癌は高齢者に多く、その進行は比較的マイルドであることが多いが、前立腺癌の悪性度は個々の患者によって差が大きく、過剰治療を回避して患者個別の治療計画を立案するシステムを構築することが世界的な課題となっている。

前立腺癌において分岐型糖鎖合成を担う酵素 core2 -1,6-N-acetylglucosaminyl transferase (C2GnT) および I-branching enzyme (GCNT2) 発現が大腸癌 (Shimodaira, Nakayama et al. Cancer Res. 1997)、肺癌 (Machida, Nakayama et al. Cancer Res. 2001)、乳癌 (Zhang, H., et al. Cancer Res. 2011)の悪性度と強い相関関係が認められている。さらにこれまでの研究により、分岐型糖鎖合成酵素の発現は、前立腺癌の浸潤度と密接に関連するとともに PSA 再発とも強い相関が見られた (図1)。また、膀胱癌においては C2GnT において形成されるコア 2 糖鎖構造が体内の免疫機構から癌細胞を保護していることが明らかにされた (Tsuboi, Ohyama et al. EMBO J. 2011)。

本研究ではこれまでの報告および結果を踏まえ、癌細胞表面の糖鎖変化を捉える抗体を創出し、前立腺癌悪性度の体液診断系および変化した糖鎖を標的とした新規治療法の構築に焦点を当てる。

### 2. 研究の目的

前立腺癌細胞上の糖鎖変化において、分岐型糖鎖構造は癌の悪性化に寄与している可能性が示唆されてきた。したがって本研究においても、分岐型糖鎖構造の癌悪性化への寄与を検討するとともに前立腺癌の悪性化に伴う糖鎖変化を認識するモノクローナル抗体を樹立し、泌尿器癌標本の免疫組織染色を行い、悪性度との相関を確認する。さらに、癌標本に対応した血清および尿検体を用い、体液診断系においても悪性度および再発との相関を確認し、低侵襲な悪性度診断法の構築を行う。

樹立する抗体は MUC1 などの細胞表面糖タンパク質を認識することからにすることから、市販のシスプラチン内包リポソームを抗体と結合させ、ドラッグデリバリーによる抗腫瘍効果と抗体投与による免疫細胞を介した抗腫瘍効果を検討し、新規治療法としての有効性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

これまでの研究から O-glycan の分岐を担う GCNT1 についての細胞生物学的な悪性化への寄与は検討済みであるが、本研究では O-, N-glycan および糖脂質へ分岐型糖鎖構造を形成しうる GCNT2 (図1A) の機能について検討を行った。

#### 1) GCNT2 発現と前立腺癌悪性度

前立腺癌患者のパラフィン切片を用いて、抗 GCNT2 抗体を用いた免疫染色を行い癌の悪性度と相関するかを確認した。10%以上の染色を陽性例として臨床的なデータを比較し有効性の判断をした。

#### 2) GCNT2 高発現細胞における分岐型糖鎖構造の役割

siRNA 安定発現により GCNT2 発現を抑制した前立腺癌細胞株 DU145 を用い糖鎖変化による癌細胞の増殖能、浸潤能を確認した。

本研究では分岐型糖鎖構造に特異的な抗体の獲得に向け、前立腺癌細胞を免疫源としたモノクローナル抗体の獲得と抗体ファージディスプレイを用いた抗体の選抜を行った。

#### 1) 分岐型糖鎖認識抗体の樹立

前立腺癌細胞を直接マウスに免疫し抗体作製を試みた。マウス B 細胞とミエローマ細胞を融合し、100 株の抗体産生クローンを樹立した。そのクローン中より糖鎖合成を阻害した癌細胞での反応が低下する抗体を得た。

一方、抗体ファージディスプレイによる抗体獲得のため、前立腺癌細胞を免疫したマウスの脾臓より抗体遺伝子をクローニングし、ファージドベクターに組み込むことでファージ上に抗体分子を発現させたファージ抗体ライブラリを構築した。

さらに、抗体クローン選抜のために siRNA 安定発現により C2GnT および GCNT2 発現を抑制した前立腺癌細胞株 PC3 および DU145、GCNT2 をほとんど発現していない 22RV1 に GCNT2 を安定発現させた 22RV1-GCNT2 を樹立した。

分岐型糖鎖構造による前立腺癌の悪性度への寄与を検討したのち、他の泌尿器癌における糖鎖変化の影響についても明らかにするため、まずは膀胱癌における糖鎖の機能について細胞生物学的に検討を行った。

#### 1) GCNT2 発現と膀胱癌悪性度

膀胱癌患者の TURBT パラフィン切片を用いて、抗 GCNT2 抗体を用いた免疫染色を行い癌の悪性度と相関するかを確認した。染色性が高い切片を陽性例として臨床的なデータを比較し有効性の判断をした。

#### 2) GCNT2 高発現細胞における分岐型糖鎖構造の役割

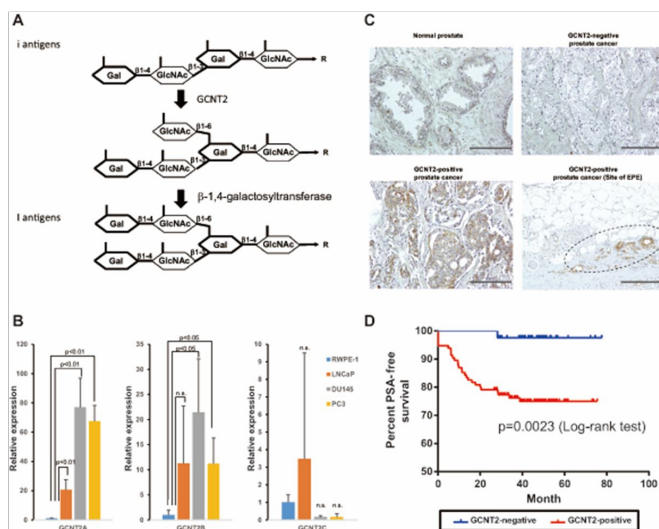
siRNA 安定発現により GCNT2 発現を抑制した膀胱癌細胞株 KK47 および GCNT2 を安定発現させた YTS1-GCNT2 を用い糖鎖変化による癌細胞の浸潤能および免疫細胞に対する抵抗性を確認した。

### 4. 研究成果

#### 前立腺癌細胞上の高分岐型糖鎖の役割

1) 前立腺癌細胞株における GCNT2 発現量を qPCR により確認したところ前立腺上皮細胞株 RWPE-1 に比べ、前立腺癌細胞株で高発現することを確認した。また、癌細胞同士の比較においても悪性度のより高い DU145 および PC3 で高発現していることが明らかとなった (図 1B)。さらに前立腺癌全摘除術症例 156 例の組織切片を用い、免疫組織染色を行った結果、GCNT2 陽性率は pT3、pT4 では 80%以上と有意に高率であり、陽性患者群は有意に術後再発率が高かった (図 1C、D)。さらに、GCNT2 発現は前立腺外浸潤部位およびリンパ節転移にも強く見られ、initial PSA、Margin status と共に独立した PSA 再発の危険因子であった (表 1)。

[図 1]



[表 1]

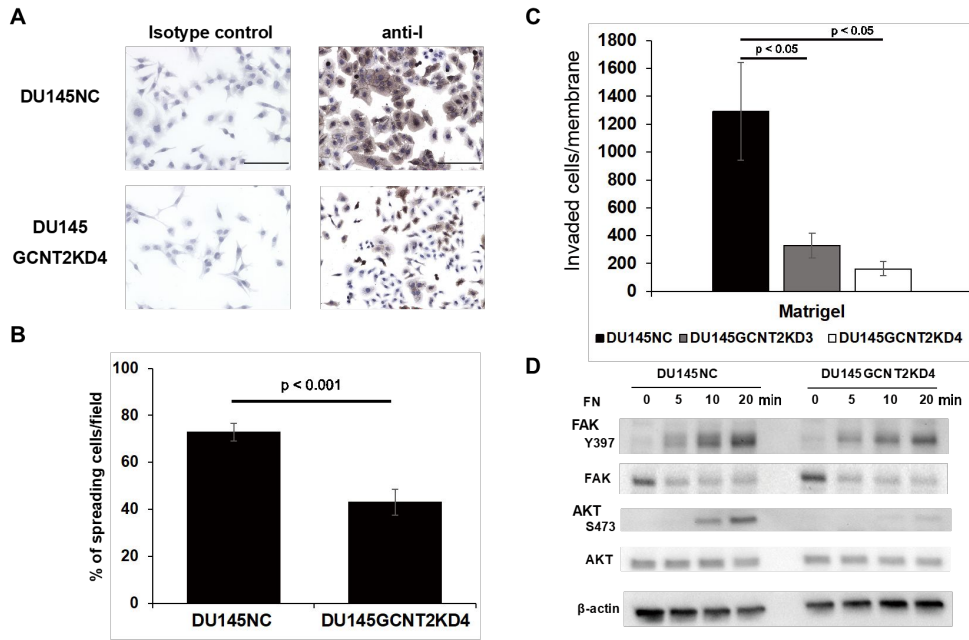
表 1 Cox proportional-hazards model for predicting prostate specific antigen-free survival

Multivariate analysis				
	p value	Exp (B)	95.0% CI	
			min	max
Age	0.759	1.012	0.940	1.089
iPSA <sup>†</sup>	0.022	1.065	1.009	1.123
cT2 <sup>‡</sup>	0.920	1.043	0.458	2.374
biopsy GS <sup>‡</sup>	0.076	2.622	0.903	7.611
post-Op <sup>‡</sup> GS <sup>‡</sup>	0.701	0.819	0.295	2.276
pT3 <sup>‡</sup>	0.446	1.534	0.510	4.612
Margin status <sup>§</sup>	0.027	0.134	0.015	0.253
perineural invasion	0.822	1.121	0.413	3.041
GCNT2 status	0.032	9.021	1.203	67.630

<sup>†</sup>pre-treatment with prostate specific antigen, <sup>‡</sup>Gleason score, <sup>§</sup>extra-capsular extension, <sup>¶</sup>cancer presence at the resected margin, GCNT2: I-branching N-acetylglucosaminyltransferase

2) GCNT2 発現抑制株である DU145-GCNT2KD は細胞表面上の分岐型糖鎖構造である I-抗原が低下し (図 2A)、癌細胞の細胞外マトリックス上での進展が抑制され (図 2B)、浸潤能が低下することが明らかとなった (図 2C)。さらに、そのメカニズムとしては細胞外マトリックスとインテグリンの相互作用により活性化される FAK および AKT のうち特に AKT の活性化が著しく抑制されているためであることを明らかにした (図 2D)。

[図2]



以上の結果から、分岐型糖鎖構造合成を担う GCNT1 だけでなく GCNT2 発現が前立腺癌悪性度の増強に寄与することが明らかとなった。

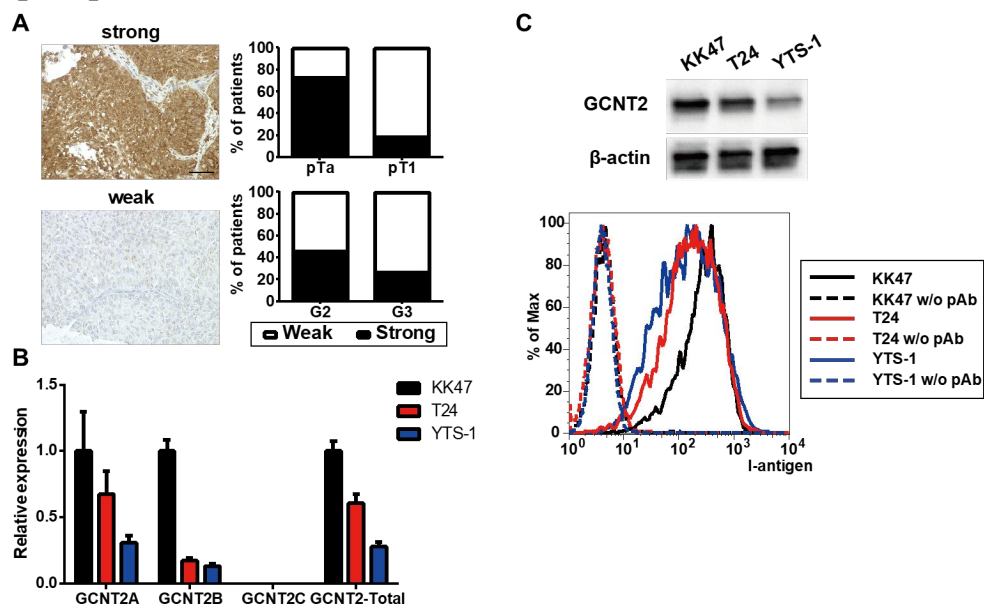
#### 高分岐型糖鎖特異的な抗糖鎖抗体の樹立

3) 分岐型糖鎖構造を認識する抗糖鎖抗体の樹立を目指し、マウスに細胞を免疫することで前立腺癌細胞糖鎖に反応するモノクローナル抗体を獲得した。しかしながら、本抗体は O-glycan 合成を阻害した前立腺癌細胞への反応性は低下するものの、高分岐型の糖鎖を直接認識するものではなかった。一方、ファージ抗体ライブラリの構築においては、 $10^9$  以上のバリエーションを持つライブラリを構築したが、糖鎖に対する抗体の獲得には至らなかった。

#### 膀胱癌細胞上の分岐型 I-抗原の役割

4) 膀胱癌 TURBT パラフィンの組織切片を用い、免疫組織染色を行った結果、GCNT2 高発現率は pTa で 72%に対し、間質浸潤がある pT1 では 18%と有意に低率であり、核異型の少ない G2 症例で高発現していることを確認した(図 3 A)。膀胱癌細胞株における GCNT2 発現量を qPCR により確認したところ悪性度のより高い T24 および YTS-1 細胞で発現が低下しており、細胞表面 I-抗原の発現量も低いことが明らかとなった(図 3 B、C)。

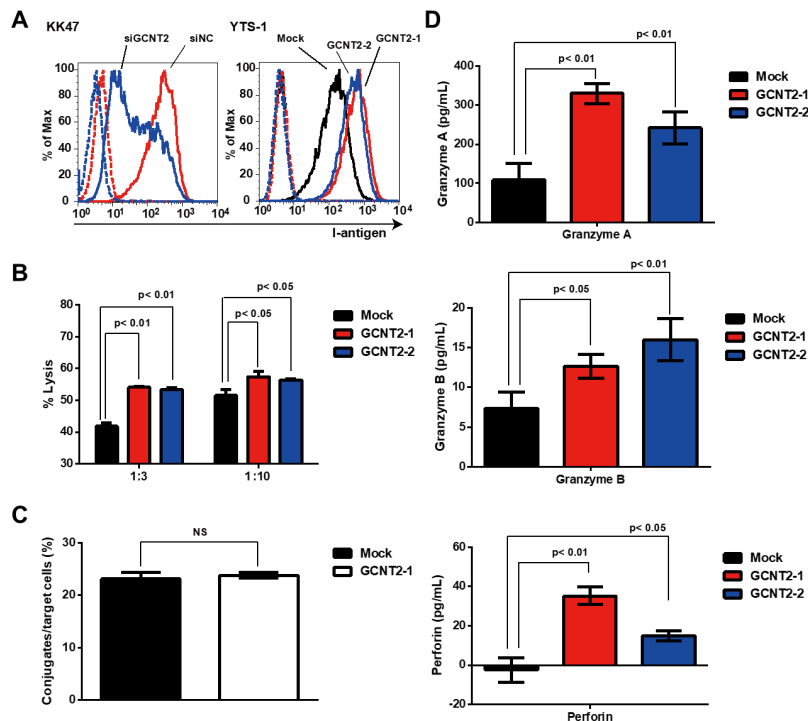
[図3]



5) GCNT2 を安定発現させた YTS1-GCNT2 株は I-抗原を高発現したため(図 4 A)、この細胞にお

ける浸潤能への影響を確認したところ、親株と比較して浸潤能に変化は認められなかった。一方で、癌免疫を担う細胞の一つであるNK細胞を用い、抗腫瘍効果に対する影響を検討したところGCNT2高発現細胞株はNK細胞による細胞溶解活性を強く受けることが明らかとなった(図4B)。さらにI-抗原の発現量の上昇は、癌細胞とNK細胞の接着には影響は無いが(図4C)、NK細胞の殺細胞因子であるグランザイムおよびパーフォリンの発現量を上昇させていることが明らかとなった(図4D)。

[図4]



以上の結果から、膀胱癌細胞においてはI-抗原の高発現は免疫細胞からの攻撃性を高め、高悪性度であるほどI-抗原の発現が低下することが明らかになった。

本研究では糖鎖の分岐様式に注目し研究を行っており、詳細な機能が報告されている糖鎖の末端構造は検討していない。そのため前立腺癌細胞においては分岐の増加により悪性度が上昇するものの、膀胱癌では逆に減少するといった結果が出たが、これは末端構造の違いによる部分も大きいと考えられる。今後、分岐糖鎖の末端構造の相違を詳細に検討することで、今回獲得には至らなかった抗糖鎖抗体のターゲットが明らかになり、より標的が絞られることで抗体の取得が容易になるものと考えられる。本研究の分子細胞学的な検討により、分岐糖鎖の数的、質的变化が悪性度と関連することが明らかになったことから、その変化を反映する抗体を獲得することで、低侵襲且つ高精度な悪性度マーカーの創出につながる事が予想される。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計1件)

1. I branching N acetylglucosaminyltransferase regulates prostate cancer invasiveness by enhancing 5 1 integrin signaling  
Jotaro Mikami, Yuki Tobisawa, Tohru Yoneyama, Shingo Hatakeyama, Kazuyuki Mori, Yasuhiro Hashimoto, Takuya Koie, Chikara Ohyama, and Minoru Fukuda.  
Cancer Sci. 2016 Mar; 107(3): 359 - 368. Published online 2016 Feb 10. doi: 10.1111/cas.12859 (査読有)

### [学会発表](計1件)

1. Mikami J, Tobisawa Y, Yoneyama T, Hatakeyama S, Mori K, Hashimoto Y, Koie T, Ohyama C, Fukuda M: I-branching glycan regulates prostate cancer invasiveness by enhancing a5b1 integrin signaling. 第31回欧州泌尿器科学会(EAU)2016年3月11-15日 ミュンヘン

### [図書](計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：米山 徹  
ローマ字氏名：YONEYAMA, Tohru  
所属研究機関名：弘前大学  
部局名：大学院医学研究科  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：50587649

研究分担者氏名：畠山 真吾  
ローマ字氏名：HATAKEYAMA, Shingo  
所属研究機関名：弘前大学  
部局名：医学部付属病院  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：10400136

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。