

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19049

研究課題名(和文) 細胆管細胞癌に特徴的な糖鎖発現プロファイルの同定

研究課題名(英文) Characterization of the glycosylation pattern in cholangiolocellular carcinoma

研究代表者

星野 瞳 (Hoshino, Hitomi)

福井大学・学術研究院医学系部門・特命助教

研究者番号：90500710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では硫酸化糖鎖が細胆管細胞癌のマーカーになるかどうかを検討した。正常肝の小径肝内胆管および細胆管細胞癌の細胆管様構造の内腔面に硫酸化糖鎖が優位に発現しており、後者では硫酸化糖鎖の発現とMUC1の発現が共局在していることを明らかにした。さらに胆管細胞における硫酸化糖鎖の生合成にN-アセチルグルコサミン-6-硫酸転移酵素(GlcNAc6ST-2)が関与していることを示した。以上の結果より、GlcNAc6ST-2依存性に生合成された硫酸化糖鎖で修飾されたMUC1が腺管の内腔面に発現することが細胆管に分化した胆管細胞の特徴であり、細胆管細胞癌のマーカーとしても利用可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：This study was undertaken to determine whether sulfated glycans could serve as a cholangiolocellular carcinoma (CoCC) marker. We showed that sulfated glycans are preferentially expressed at the apical membrane of cholangiocytes found in small-sized intrahepatic bile ducts in normal liver and in canalicular structures formed in CoCC. We also reported that apical membrane expression of sulfated glycans colocalized with that of mucin 1 (MUC1) core proteins in CoCC. We showed that N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase 2 (GlcNAc6ST-2) catalyze biosynthesis of sulfated glycans in cholangiocytes. These results indicate that apical membrane localization of MUC1 proteins decorated with GlcNAc6ST-2-dependent sulfated glycans may mark cholangiocytes with cholangiolar/ductular differentiation and could serve as a useful CoCC marker.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：細胆管細胞癌 糖鎖 MUC1

1. 研究開始当初の背景

肝原発性悪性腫瘍は元来、肝細胞に類似した上皮性悪性腫瘍である肝細胞癌 hepatocellular carcinoma (HCC)、肝内胆管上皮に類似した肝内胆管癌 intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC)、両者の組織像を示す中間型に分類されていた。肝癌取り扱い規約第5版で初めて ICC から独立して分類された細胆管細胞癌 cholangiolocellular carcinoma (CoCC) は、細胆管に類似した小腺管を形成しながら増殖する高分化管状腺癌であり、HPC のマーカー分子 (CK19、NCAM) を発現することから、毛細胆管と細胆管の間にヘリング管の肝幹細胞 (HPC) に由来する癌として注目を集めている (Komuta *et al. Hepatology* 2008)。免疫組織学的には、epithelial membrane antigen (EMA) の発現パターンに特徴があり、CoCC では腺腔の内腔面が線状に強く染まる一方、ICC では癌細胞の胞体が均質に染色される。このことから免疫組織染色による EMA の染色動態が重要視され、CoCC と ICC の鑑別に有用であるとされている。

EMA (別名 MUC1) は巨大な膜結合型糖タンパク質であり、分子量の 50~90% が糖で占められるほどの糖鎖修飾を受けており、その大部分は N 末端側サブユニットにある variable number tandem repeats (VNTR) に存在するセリン、スレオニンに富む領域における O 結合型糖鎖修飾に由来する。細胞表面の糖鎖修飾は、癌細胞の増殖や接着、転移に関与しており、大腸癌や膵臓癌、乳癌では、正常細胞と癌細胞で MUC1 の糖鎖修飾が異なると報告されていることから (Mann *et al. Int J Cancer* 1997; Burdick *et al. J Biol Chem* 1997; Whitehouse and Burchell. *J Cell Biol* 1997)、肝臓癌においても MUC1 の糖鎖修飾パターンに特徴があると予想される。

2. 研究の目的

癌細胞で特徴的な発現パターンを示す糖鎖の種類と役割を解明することを目的とし、肝原発性悪性腫瘍の中でも比較的まれで、発症機構が明らかにされていない CoCC に焦点を当て、他の肝原発性悪性腫瘍とは異なった発現パターンを示す MUC1 の糖鎖構造を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 肝原発性悪性腫瘍における MUC1 ならびに糖鎖発現パターンの解析

CoCC、ICC (peripheral type-ICC および perihilar type-ICC)、HCC の手術標本 96 例を使用し、抗 MUC1 抗体および抗硫酸化シアリルルイス X 糖鎖抗体による免疫組織染色ならびに蛍光免疫組織染色を行なった。

(2) MUC1 の糖鎖修飾の解析

硫酸化糖鎖を恒常的に発現する CHO 細胞に FLAG 標識した MUC1 を発現させ、その細胞溶解液を使用して、抗 FLAG 抗体による免疫沈

降を行ない、ポリアクリルアミド電気泳動、抗 FLAG 抗体および抗硫酸化シアリルルイス X 抗体によるウェスタンブロット法を行なった。

(3) ICC 由来の細胞株における硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の発現解析

ICC 由来の細胞株である SSP-25 細胞よりトータル RNA を抽出し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を行なった。さらに SSP-25 細胞に N-アセチルグルコサミン-6-硫酸転移酵素 (GlcNAc6ST) -1 および GlcNAc6ST-2 を発現させ、抗硫酸化シアリルルイス X 糖鎖抗体による蛍光免疫細胞染色を行なった。

(4) N-アセチルグルコサミン-6-硫酸転移酵素遺伝子欠損マウスの解析

野生型マウス、GlcNAc6ST-1 遺伝子欠損マウス、GlcNAc6ST-1 および GlcNAc6ST-2 遺伝子ダブル欠損マウスの肝組織を用いて、抗硫酸化シアリルルイス X 糖鎖抗体による蛍光免疫組織染色を行なった。

4. 研究成果

(1) 肝原発性悪性腫瘍における MUC1 ならびに糖鎖発現パターンの解析

正常肝では小径肝内胆管が抗硫酸化シアリルルイス X 糖鎖抗体に陽性であり、主として内腔側の細胞膜に硫酸化シアリルルイス X 糖鎖が発現していた。CoCC の症例の 90.0% で細胆管様構造の内腔面に硫酸化シアリルルイス X 糖鎖が発現していた。同様の抗硫酸化シアリルルイス X 糖鎖抗体による染色パターンは、peripheral type-ICC の症例の 46.2% でもみられた。一方、perihilar type-ICC の症例では内腔側の細胞膜における硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の発現はみられず、ごく一部の癌細胞の細胞質にわずかに硫酸化シアリルルイス X 糖鎖が発現していた。HCC の症例では抗硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の発現はみられなかった。蛍光免疫組織染色により、CoCC の症例において硫酸化シアリルルイス X 糖鎖と MUC1 の発現が共局在していることを明らかにした。

(2) MUC1 の糖鎖修飾の解析

免疫沈降法、ポリアクリルアミド電気泳動、ウェスタンブロット法により、MUC1 が硫酸化シアリルルイス X 糖鎖により修飾されるコアタンパク質であることを明らかにした。

(3) ICC 由来細胞株における硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の発現解析

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応により、SSP-25 細胞において GlcNAc6ST-1 および GlcNAc6ST-2 の転写産物をわずかに検出した。蛍光免疫細胞染色を実施したところ、SSP-25 細胞は硫酸化シアリルルイス X 糖鎖を発現していなかった。そこで SSP-25 細胞に GlcNAc6ST-1 または GlcNAc6ST-2 を発現させたところ、後者において、SSP-25 細胞の細胞膜に硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の発現がみられた。

(4) N-アセチルグルコサミン-6-硫酸転移酵

素遺伝子欠損マウスの解析

ヒトの正常肝ではほぼ全ての小径肝内胆管が抗硫酸化シアリルルイス X 糖鎖抗体に対して陽性であったが、野生型マウスでは 10% 以下の小葉間胆管が抗硫酸化シアリルルイス X 糖鎖抗体に対して陽性となった。GlcNAc6ST-1 遺伝子欠損マウスにおける抗硫酸化シアリルルイス X 糖鎖抗体による染色パターンは、野生型マウスのそれと同様であった。一方、GlcNAc6ST-1 および GlcNAc6ST-2 遺伝子ダブル欠損マウスでは硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の発現が完全に消失していることを明らかにした。これらの結果は、小葉間胆管における硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の生合成に GlcNAc6ST-2 が関与していることを示している。

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 4 件)

1. Inamura S, Shinagawa T, Hoshino H, Sakai Y, Imamura Y, Yokoyama O, Kobayashi M. Appearance of high endothelial venule-like vessels in benign prostatic hyperplasia is associated with lower urinary tract symptom. *Prostate* 77: 794-802, 2017. 査読有.
DOI: 10.1002/pros.23319
2. Hoshino H, Ohta M, Ito M, Uchimura K, Sakai Y, Uehara T, Low S, Fukushima M, Kobayashi M. Apical membrane expression of distinct sulfated glycans represents a novel marker of cholangiolocellular carcinoma. *Lab Invest* 96: 1246-1255, 2016. 査読有.
DOI: 10.1038/labinvest.2016.104
3. Low S, Sakai Y, Hoshino H, Hirokawa M, Kawashima H, Higuchi K, Imamura Y, Kobayashi M. High endothelial venule-like vessels and lymphocyte recruitment in diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. *Pathology* 48: 666-674, 2016. 査読有.
DOI: 10.1016/j.pathol.2016.08.002
4. Taga M, Hoshino H, Low S, Imamura Y, Ito H, Yokoyama O, Kobayashi M. A potential role for 6-sulfo sialyl Lewis X in metastasis of bladder urothelial carcinoma. *Urol Oncol* 33: 496.e1-496.e9, 2015. 査読有.
DOI: 10.1016/j.urolonc.2015.05.026

[学会発表] (計 6 件)

1. Hoshino H, Ohta M, Ito M, Uchimura K, Sakai Y, Uehara T, Low S, Fukushima M, Kobayashi M. Apical membrane

expression of distinct sulfated glycans represents a novel marker of cholangiolocellular carcinoma. 20th Annual San Diego Glycobiology Symposium. 2017. 2. 3-2. 4. San Diego, CA, USA.

2. Low S, Kanamori R, Sakai Y, Hoshino H, Hirokawa M, Kawashima H, Higuchi K, Imamura Y, Kobayashi M. High endothelial venule-like vessels and lymphocyte recruitment in diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. 20th Annual San Diego Glycobiology Symposium. 2017. 2. 3-2. 4. San Diego, CA, USA.
3. Hoshino H, Ohta M, Ito M, Uchimura K, Sakai Y, Uehara T, Low S, Fukushima M, Kobayashi M. Apical membrane expression of distinct sulfated glycans represents a novel marker of cholangiolocellular carcinoma. 26th Annual conference of the society for Glycobiology. 2016. 11. 19-11. 22. New Orleans, LA, USA.
4. Taga M, Hoshino H, Los S, Imamura Y, Ito H, Kobayashi M, Yokoyama O. A potential role for 6-sulfo sialyl Lewis X in metastasis of bladder urothelial carcinoma. American Urology Association Annual Meeting. 2016. 5. 6-5. 10. San Diego, CA, USA.
5. 多賀 峰克, 伊藤 英明, 品川 友親, 堤内 真美, 星野 瞳, 小林 基弘, 横山 修. 膀胱癌に発現する硫酸化シアリルルイス X に関する検討. 第 104 回日本泌尿器科学会総会. 2016. 4. 23-4. 25. 仙台国際センター (宮城県仙台市).
6. Hoshino H, Taga M, Low S, Kobayashi M. A potential role for 6-sulfo sialyl Lewis X in metastasis of bladder urothelial carcinoma. 25th Annual conference of the society for Glycobiology. 2015. 12. 1-12. 4. San Francisco, CA, USA.

[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 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 瞳 (HOSHINO, Hitomi)
福井大学・学術研究院医学系部門・特命助
教
研究者番号：90500710

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

小林 基弘 (KOBAYASHI, Motohiro)
福井大学・学術研究院医学系部門・教授
研究者番号：00362137