

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16572

研究課題名(和文)レクチンマイクロアレイを用いた肝細胞癌の分化に関する糖鎖プロファイリング

研究課題名(英文)Glycan profiling relation to dedifferentiation of hepatocellular carcinoma with lectin microarray

研究代表者

高山 洋臣(Takayama, Hiroomi)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：50733614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌の同一腫瘍内における脱分化に関連する糖鎖変化および糖転移酵素について、手術切除標本を用いて解析した。レクチンマイクロアレイでNPA、Con A、GNA、Calsepaの4種類のレクチンについて、脱分化に伴う有意な発現上昇を認めた。すべて高マンノース型糖鎖に結合するレクチンであり、その糖鎖変換に関連する酵素であるMGAT1について免疫染色を行ったところ、脱分化に伴い発現の減少を認めた。また、MGAT1の低発現は肝内転移を増加させ、予後不良の傾向があった。肝細胞癌の脱分化には高マンノース型糖鎖の増加と関連があり、それにはMGAT1の発現変化が関連している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、同一腫瘍内で分化度の異なる成分を有する肝細胞癌について、発現する糖鎖変化を解析することで、脱分化に伴う糖鎖変化を明らかにした。高マンノース型糖鎖が脱分化に伴い増加していると考えられ、肝内転移や予後にも影響していることが示唆された。その糖鎖変化や関連する糖転移酵素の意義や機能解明までには至らなかったが、今後それらを明らかにすることで、脱分化メカニズムの解明や、脱分化制御による悪性化の制御、肝細胞癌の治療薬開発にも繋がると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated glycosylation associated with the dedifferentiation of HCC within the same nodule, and glycosyltransferase related to the glycosylation.

We analyzed fifty HCC specimens using lectin microarray. Four lectins of NPA, Con A, GNA, and Calsepa were significantly elevated in moderately-differentiated components of HCC compared with well-differentiated components, and all lectins showed binding specificity to high-mannose glycans. Immunohistochemical staining of MGAT1, which is an essential glycosyltransferase that converts high-mannose glycans to complex- or hybrid-type N-glycans, showed significantly decreased expression in moderately-differentiated components. Low MGAT1 expression was associated with intrahepatic metastasis and had tendency for poor prognosis. Dedifferentiation of HCC is associated with an increase in high-mannose glycans, and MGAT1 may play a role in the dedifferentiation of HCC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝細胞癌 レクチン 糖鎖プロファイリング 脱分化 糖転移酵素 高マンノース型糖鎖 MGAT1

1. 研究開始当初の背景

多くのタンパク質は、糖鎖付加により糖タンパク質となることで、分化、接着、増殖、免疫維持など様々な生体機能を発揮している。癌における糖鎖構造の変化は、癌の進展や浸潤、転移などに関連しているといわれている。特定の糖鎖構造に結合するレクチンを利用したレクチンマイクロアレイによって、これまでに当科では、大腸癌で ABA が再発予測因子となりうること (Cancer Medicin, 2014)、胃癌で BPL が再発予測因子となりうることを報告した (Surg Today, 2015)。また、フコシル化が IPMN において癌化に関連することを報告した (Surg Today, 2016)。本研究で対象とする肝細胞癌は未だに予後不良の疾患であり、簡便で正確な予後予測法の確立、より良い治療法の確立が望まれる疾患の一つである。肝細胞癌の発生・発育過程の一つに多段階発育が提唱されており、脱分化により悪性度の高い組織像へと置き換わっていくとされる。脱分化に関わる因子を同定することは、発育メカニズムの解明や発生予防、さらには新たな治療法の開発につながる可能性がある。これまでに肝細胞癌の脱分化に着目し、糖鎖構造の変化について検討した報告はない。

2. 研究の目的

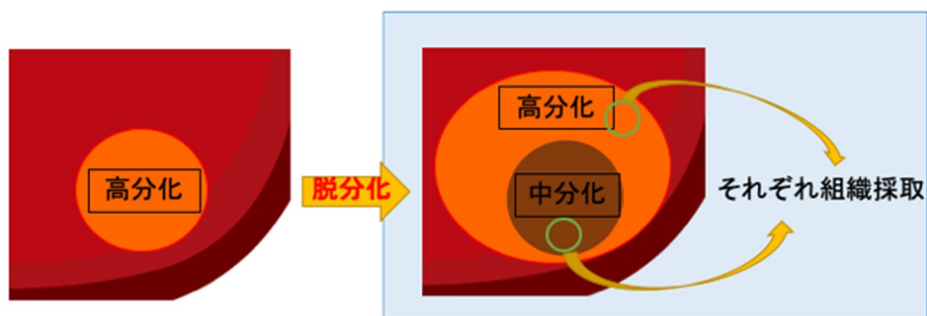
本研究では肝細胞癌を対象とし、その中でも同一腫瘍内に分化度の異なる成分を有する症例について、レクチンマイクロアレイ法にて糖鎖の発現プロファイリングを網羅的に行い、肝細胞癌の脱分化に関連のある因子を同定する。また、得られた結果と臨床病理学的因子との関連についても解析する。さらに得られた因子について機能解析を行い、コントロールすることで、肝癌の新たな治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

当科にて手術を行った肝細胞癌症例のホルマリン固定標本より組織を採取し、レクチンマイクロアレイ法による網羅的糖鎖構造解析を行った。対象は 2006 年 1 月から 2015 年 12 月までに当科で切除した、同一組織内に高分化型癌および中分化型癌の混在する 50 症例で、Laser captured microdissection を用いて癌部から高分化成分、中分化成分をそれぞれ採取し、45 種のレクチンについて発現を測定、分化度間で比較した。

有意差を認められた糖鎖構造に関連する糖転移酵素である MGAT1 について免疫組織化学染色を行なった。MGAT1 の発現と臨床病理学的因子、OS、DFS との比較検討も行なった。

Huh-7、HepG2 などの肝癌細胞株において MGAT1 をノックダウンし、細胞増殖能、浸潤能の解析を行なった。



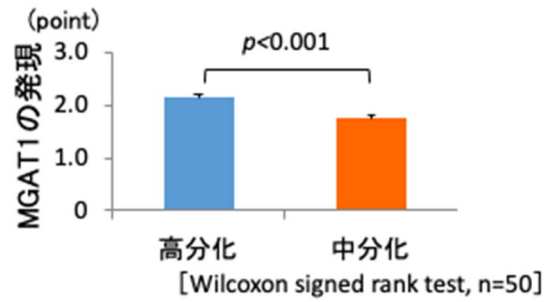
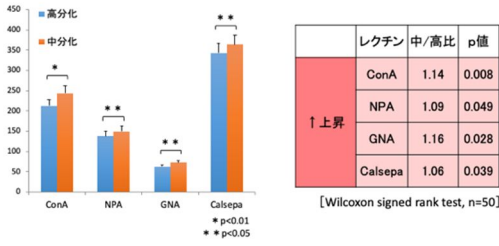
4. 研究成果

分化度間で有意差を認められたのは、ConA、NPA、GNA、Calsepa4 種のレクチンで、高分化成分と比較し、中分化成分で有意に上昇していた。これらはいずれも高マンノース型糖鎖に結合するレクチンで、脱分化により高マンノース型糖鎖が増えることが示唆された。

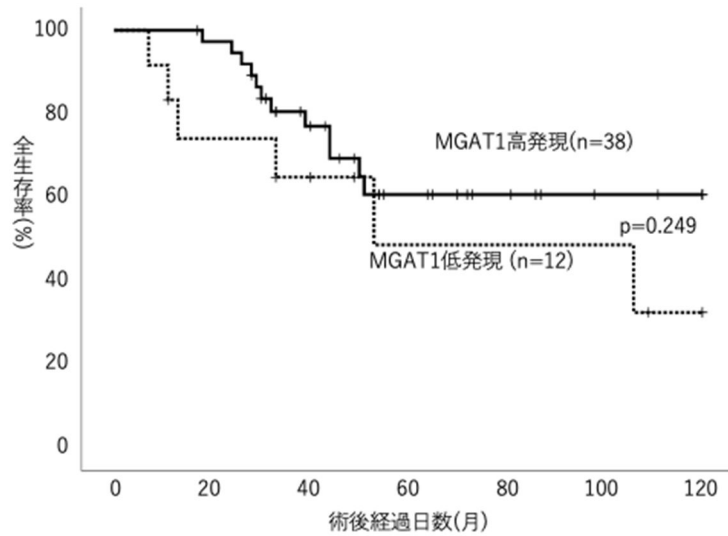
糖転移酵素の 1 種である MGAT1 が低下すると高マンノース型糖鎖が増えることが知られており、MGAT1 染色を行ったところ、中分化成分において有意に発現低下を認めた。

予後や臨床病理学的因子と MGAT1 発現低下の関連性を比較したところ、肝内転移の有無において有意差を認めた。また予後については有意差を認めなかったものの、予後不良となる傾向を認めた。

シグナル強度が有意に変化したレクチン



| | MGAT1 の発現 | | | P 値 |
|--------|-----------|-------------|------------|-------|
| | n=50 | high(n=38) | low(n=12) | |
| 肝内転移 - | 40 | 33 | 7 | 0.031 |
| 肝内転移 + | 10 | 5 | 5 | |



肝癌細胞株(Huh-7、HepG2)を用い、MGAT1をノックダウンすることで、増殖能や浸潤能にどのような影響を及ぼすか、検討を行ったが、有意差を示すことはできなかった。MGAT1は、糖鎖に多様性をもたらす際、そのカスケードの根幹に存在する糖転移酵素であり、生体機能の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。ノックダウンの程度によっては致命的な変化となり得るため、その程度については今後も検討が必要である。ノックダウンの程度の大小による変化や他の肝細胞癌細胞株を用いた実験を進める予定である。また、MAN1A1などその他の糖転移酵素が高マンノース型糖鎖の増加に関わっているとの報告もあり、今後MGAT1以外の糖転移酵素についても検討することで新たな知見が得られる可能性がある。

本研究により得られた研究成果について論文化し、BMC cancerに掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Uchida H, Iwashita Y, Tada K, Saga K, Takayama H, Hirashita T, Endo Y, Ohta M, Inomata M. | 4. 巻 403(3) |
| 2. 論文標題 Laparoscopic liver resection in cirrhotic patients with specific reference to a difficulty scoring system. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Langenbeck's Archives of Surgery | 6. 最初と最後の頁 371-377 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00423-018-1671-4 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Saga K, Iwashita Y, Hidano S, Aso Y, Isaka K, Kido Y, Tada K, Takayama H, Masuda T, Hirashita T, Endo Y, Ohta M, Kobayashi T, Inomata M. | 4. 巻 19(10) |
| 2. 論文標題 Secondary Unconjugated Bile Acids Induce Hepatic Stellate Cell Activation. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19103043. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Takayama H, Ohta M, Iwashita Y, Uchida H, Shitomi Y, Yada K, Inomata M | 4. 巻 20(3) |
| 2. 論文標題 Altered glycosylation associated with dedifferentiation of hepatocellular carcinoma: a lectin microarray-based study. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 BMC cancer | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-020-6699-5 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 高山 洋臣 |
| 2. 発表標題 肝細胞癌の脱分化に関わる糖鎖の同定-レクチンマイクロアレイを用いた網羅的解析- |
| 3. 学会等名 日本外科学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|