

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16555

研究課題名(和文) 幽門腺型粘液の糖鎖 GlcNAcの発現低下とがんの悪性化の分子機構の解明

研究課題名(英文) Significance of reduced alphaGlcNAc glycosylation in pyloric gland neoplasms

研究代表者

山ノ井 一裕 (Yamanoi, Kazuhiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80464965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト腫瘍検体を用いた組織学的検討により、諸臓器の幽門腺型粘液産生腫瘍では、前がん段階から 1,4-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc)の低下がみられ、がんの進行に伴いMUC6の発現低下がみられた。がん由来培養細胞に、MUC6遺伝子、GlcNAc糖鎖修飾を起こす唯一の酵素である 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase遺伝子を導入した。MUC6の発現により、細胞の増殖、運動、浸潤能が低下し、GlcNAc糖鎖修飾の追加で増強された。MUC6、GlcNAc低下は癌のマーカーになるだけでなく、癌の悪性化に関わることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幽門腺型粘液の産生を伴う腫瘍は、諸臓器においてみられるが、しばしば、組織学的に、細胞異型に乏しい症例が存在する。ゆえに、病理診断の現場において、その早期病変の診断が難しい場合がある。本研究によって、早期病変マーカーとして GlcNAcの低下・消失が明らかになったことで、幽門腺型粘液の産生を伴う腫瘍の早期診断の大きな一助になると考えられる。また、ヒトがん由来培養細胞株を用いた実験により、MUC6の発現、GlcNAcの糖鎖修飾低下が、直接、がん細胞の悪性化にかかわることが明らかになった。今後その機序をさらに明らかにすることで、これらの腫瘍に対する、新たな分子標的療法が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Gstric gland mucin consists core protein MUC6 with

1,4-N-acetylglucosamine (GlcNAc) glycosylation. Mice deficient in GlcNAc develop gastric adenocarcinoma. In human, GlcNAc glycosylation was frequently lost in adenocarcinoma expressing gastric mucin. We have studied MUC6 and GlcNAc expression in malignant and pre-malignant lesions with gastric mucin expression in extra-gastric organs. In all organs, decreased GlcNAc-glycosylation on MUC6 was frequently observed in not only malignant but pre-malignant lesions. Furthermore, in uterine cervix, patients with GlcNAc negative adenocarcinoma had poor prognosis. In lung, those with MUC6 negative adenocarcinoma had poor prognosis. Furthermore we studied MUC6 and GlcNAc effect in cancer cell line models. Ectopic MUC6 expression attenuated cancer malignancy, and GlcNAc glycosylation enhanced its phenotypes. These results show that phenotypic change of mucin is a malignant biomarker in various organ neoplasms with gastric mucin.

研究分野：病理学

キーワード：幽門腺型 MUC6 糖鎖修飾 多段階発がん 前がん 腫瘍マーカー 胃型形質 粘液

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

正常の胃幽門腺ならびに十二指腸ブルネル腺では、特異的な粘液が産生されている。この粘液は、コアタンパクとして、MUC6 を有し、その側鎖では、 $\alpha$ 1,4-*N*-アセチルグルコサミン ( $\alpha$ GlcNAc)の糖鎖修飾を伴う(図 1)。



図1. 幽門腺型粘液の構造

我々の研究グループでは、発現クローニング法を用いて、この糖鎖修飾を特異的に行う

$\alpha$ 1,4-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素( $\alpha$ 4GnT)の遺伝子を同定した(Nakayama ら, *Proc Natl Acad Sci USA* 96; 8991-8996, 1999)(図 2)。

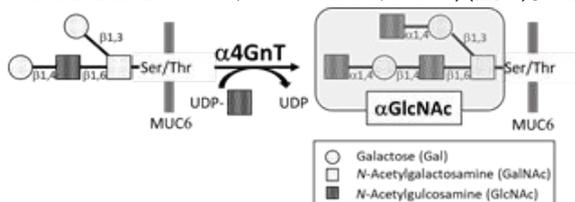


図2  $\alpha$ 4GnTは $\alpha$ GlcNAcを生合成する

さらに、本遺伝子のノックアウトマウスを作出したところ、胃において $\alpha$ GlcNAcが完全に消失し、さらにピロリ菌感染なしで高率に分化型癌が発症した。このことから、 $\alpha$ GlcNAcの発現消失は胃癌の発症に関わることが明らかになった (Karasawa ら, *J Clin Invest* 122; 923-934, 2012)。

研究代表者は、ヒトの胃の腫瘍においても同糖鎖の発現についての検討を重ね、

MUC6 陽性粘液の産生を伴う胃がんや、前がん病変とされる幽門腺型腺腫の高異型度病変において、 $\alpha$ GlcNAc の発現が低下・消失することを示した

(Shiratsu ら *Cancer Sci.* 105; 126-133, 2014)(Yamanoi ら, *Histopathology* 67; 898-904, 2015)。さらに、研究代表者は、膵臓や子宮頸部においても、胃型粘液産生腫瘍がしばしば発症することに着目し、これらの腫瘍でも $\alpha$ GlcNAc, MUC6 の発現について検討を行った。その結果、浸潤がんで MUC6 の発現低下を認め、 $\alpha$ GlcNAc はがん病変だけでなく前がん病変から発現低下することを明らかにした(Ohya ら, *Cancer Sci.* 108; 1897-1902, 2017)(Yamanoi ら, *Virchows Arch.* 473; 305-311, 2018) (図 3)

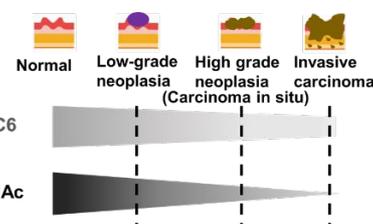


図3. 前がん～がん病変における $\alpha$ GlcNAc発現の変化(模式図)

### 2. 研究の目的

胃以外の臓器における、 $\alpha$ GlcNAc, MUC6 発現と腫瘍の悪性度についてさらに詳細に調べ、さらに、がんの臨床病理学的悪性度や症例の予後との関係を明らかにしたいと考えた。

また、ヒトがん由来培養細胞を用いた *in vitro* の実験により、 $\alpha$ GlcNAc, MUC6 発現が、直接がん細胞の悪性化に関わっているのかどうか知りたいと考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 手術検体を用いた、臨床病理学的検討

子宮頸部、肺、胆道の胃型粘液産生腫瘍病変において、 $\alpha$ GlcNAc, MUC6 を含む、粘液形質マーカー、そのほか、Ki-67、p53、TTF-1、p16 などの細胞周期、増殖、分化、細胞特性に関わるマーカーの免疫染色を行った。さらに、HE 染色では、標本ごとに多段階発癌過程の有無を確認した。免疫染色の結果を、腫瘍の多段階発癌を示す組織像ごとに対応させて、それぞれ評価した。また、臨床病理学的因子や、がんの再発、症例の予後と、免疫染色の評価の相関についても検討を行った。胃では、近年、ヘリコバクターピロリ菌の感染に関連なく発症することで、注目されている、胃底腺型胃癌における、 $\alpha$ GlcNAc, MUC6 の発現と、未分化マーカーとして知られている MIST1 の発現について検討した。

#### (2) がん由来培養細胞を用いた、分子生物学的検討

膵がんは、その多くが胃型粘液産生を伴う。我々は、ヒト膵癌由来培養細胞株として知られる PANC-1 細胞を用いた。さらに、肺では、腺癌の多くが免疫染色において TTF1 陽性、遺伝子異常として EGFR 変異を有するが、胃型粘液産生を伴う肺がんは、TTF1 陰性で、遺伝子異常としては EGFR 変異ではなく KRAS 変異を伴う症例が多いことから、TTF1 陰性で KRAS 変異を伴うヒト肺がん由来培養細胞株として知られる A549 細胞を用いた。

双方とも、もともとの細胞では、 $\alpha$ GlcNAc, MUC6 の発現が低いことが確認されたため、ウイルスベクターを用いて MUC6、 $\alpha$ 4GnT 遺伝子を導入し、細胞の挙動の変化について検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 手術検体を用いた、臨床病理学的検討

胆道癌症例における、 $\alpha$ GlcNAc, MUC6 の発現について検討したところ、前がん病変として知られる Bill-IN では、high grade になると、 $\alpha$ GlcNAc の糖鎖修飾の低下・消失が見られ、さ

らに、浸潤がんになると、MUC6 の発現も低下、消失がみられた。これまで我々が検討してきた、胃、膵臓、子宮頸部と同様の所見であり、胆道でも、 $\alpha$ GlcNAc と MUC6 はがんの診断マーカーになると考えられた(Okumura ら, *Cancer Sci.* 113; 4629-4635, 2020)。

胃底腺型胃癌では、MIST-1 のびまん性陽性像がみられ、MUC6 も広範に陽性を示すが、 $\alpha$ GlcNAc は陰性であった。本胃癌は細胞異型に乏しい症例が多く、診断が難しいことが知られているが、MIST-1 陽性と  $\alpha$ GlcNAc 陰性を確認することが、本組織型の診断に非常に有用であることが確認された(Yamada ら, *Histopathology* 77; 413-422, 2020)。

また、予後との関連を検討したところ、子宮頸部の胃型腺癌では、 $\alpha$ GlcNAc 陰性の症例は陽性症例に比べて有意に予後不良であった(Ida ら, *Sci. Rep.* 9, e13043, 2019)(図 4)。さらに肺がんでは、MUC6 陰性の粘液産生性肺がんは、陽性症例に比べて、有意に予後不良であることがわかった(Yamanoi ら, *Histochem and Cell Biol.* 157:671-684, 2022)。このように、胃型粘液産生性腫瘍において、一部の臓器では、 $\alpha$ GlcNAc, MUC6 の発現消失は、症例の予後増悪因子であることも明らかになった。

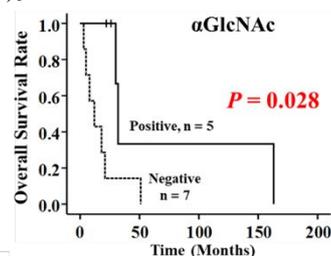


図4. 子宮頸部胃型腺癌の予後と $\alpha$ GlcNAc発現の関係

これらの成果により、諸臓器における胃型粘液産生腫瘍の診断に、 $\alpha$ GlcNAc の発現の確認が重要な指標の1つになることが示されたほか、同腫瘍の進行がん症例においても、一部の臓器では、 $\alpha$ GlcNAc, MUC6 の発現をみることで、予後予測の指標の1つになりうることを示され、今後の諸臓器における、がんの診断、予後予測のための、重要な手がかりが得られた。

## (2) がん由来培養細胞を用いた、分子生物学的検討

MUC6 遺伝子の全長について、ウイルスベクターを用いて PANC1 に導入したところ、細胞の増殖能、浸潤能、運動能はいずれも有意に低下した。さらに、同細胞に  $\alpha$ 4GnT 遺伝子を導入し、 $\alpha$ GlcNAc 糖鎖修飾を誘導したところ、さらにその効果が増強された(Yuki ら, *Cancer Sci.* 113, 576-586, 2022) (図 5)。

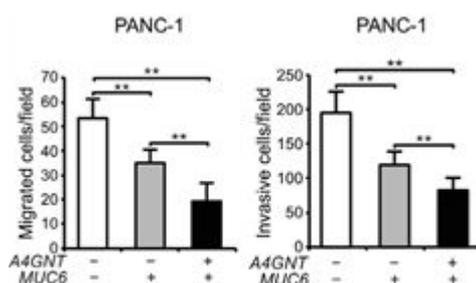


図5. 膵癌由来培養細胞(PANC-1)における、MUC6,  $\alpha$ 4GnT 導入による細胞運動能・浸潤能の変化

A246 についても、同様に、MUC6 遺伝子の全長を導入したところ、細胞の増殖能、浸潤能、運動能はいずれも有意に低下した。さらに

Actin の蛍光染色により、細胞運動に不可欠な

filopodia の低下がみられた。RT-PCR による解析にて、filopodia を形成するアクチンの伸長、架橋に重要な Fascin の転写低下がみられた(Yamanoi ら, *Histochem and Cell Biol.* 157:671-684, 2022)(図 6)。MUC6 発現によって細胞骨格蛋白の発現低下が引き起こされ、細胞運動能や浸潤能を低下させている可能性が考えられた

(1)の結果とあわせると、 $\alpha$ GlcNAc や MUC6 そのものががんの悪性を抑える効果をもち、発現低下によりその抑制が解除され、がんの悪性を引き起こしていると考えられた。また、その機序として、細胞骨格蛋白のリモデリングが関わっている可能性が示された。今後さらにその機序を詳しく解明することで、新たな治療標的が明らかになる可能性が考えられた。

## (3) 本研究の意義と今後の展望

糖鎖と癌の関連の研究は世界中で現在進められており、中でも CA19-9 や CA125 などの糖鎖抗原は血中腫瘍マーカーとして診療にも用いられている。ただし、組織像に着目した、細胞産生粘液の糖鎖の発現検討に関する癌の研究は前例がほとんどなく、本研究によって組織像との対比を基に、諸臓器における、リアルながん細胞における糖鎖修飾の変化を明らかにされたことで、病理診断に役立つマーカーとしての糖鎖の意義を明らかにした。今後、さらに、そのメカニズムまで明らかにすることで、糖鎖に注目した、新たな癌治療が可能になると考えられる。

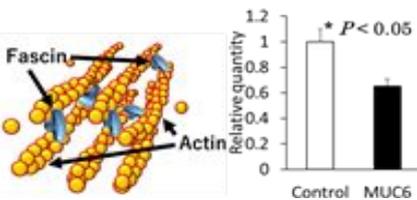


図6. Actin フィラメントを架橋する Fascin は MUC6 発現により転写が抑えられる

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yuki Atsuko, Fujii Chifumi, Yamanoi Kazuhiro, Matoba Hisanori, Harumiya Satoru, Kawakubo Masatomo, Nakayama Jun	4. 巻 113
2. 論文標題 Glycosylation of MUC6 by 1,4 linked N acetylglucosamine enhances suppression of pancreatic cancer malignancy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 576 ~ 586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15209	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 Yamanoi Kazuhiro, Fujii Chifumi, Yuzuriha Hanae, Kumazawa Mai, Shimoda Masayuki, Emoto Katsura, Asamura Hisao, Nakayama Jun	4. 巻 -
2. 論文標題 MUC6 expression is a preferable prognostic marker for invasive mucinous adenocarcinoma of the lung	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	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) 10.1007/s00418-022-02093-1	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 Okumura Motohiro, Yamanoi Kazuhiro, Uehara Takeshi, Nakayama Jun	4. 巻 111
2. 論文標題 Decreased alpha 1,4 linked N acetylglucosamine glycosylation in biliary tract cancer progression from biliary intraepithelial neoplasia to invasive adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4629 ~ 4635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14677	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 Yamada Shigenori, Yamanoi Kazuhiro, Sato Yoshiko, Nakayama Jun	4. 巻 77
2. 論文標題 Diffuse MIST1 expression and decreased 1,4 linked N acetylglucosamine (GlcNAc) glycosylation on MUC6 are distinct hallmarks for gastric neoplasms showing oxyntic gland differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 413 ~ 422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/his.14165	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 Masatomo Kawakubo, Hitomi Komura, Yukinobu Goso, Motohiro Okumura, Yoshiko Sato, Chifumi Fujii, Masaki Miyashita, Nobuhiko Arisaka, Satoru Harumiya, Kazuhiro Yamanoi, Shigenori Yamada, Shigeru Kakuta, Hiroto Kawashima, Michiko N. Fukuda, Minoru Fukuda, Jun Nakayama	4. 巻 67
2. 論文標題 Analysis of A4gnt Knockout Mice Reveals an Essential Role for Gastric Sulfolimucins in Preventing Gastritis Cystica Profunda.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry and Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 759-770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/0022155419860134.	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 該当する

1. 著者名 Ida Koichi, Yamanoi Kazuhiro, Asaka Shiho, Takeuchi Hodaka, Miyamoto Tsutomu, Shiozawa Tanri, Nakayama Jun	4. 巻 9
2. 論文標題 GlcNAc and its catalyst 4GnT are diagnostic and prognostic markers in uterine cervical tumor, gastric type	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-019-49376-7	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 山ノ井 一裕, 山田 重徳, 中山 淳
2. 発表標題 胃底腺型胃癌は、GlcNAc糖鎖修飾の不十分な未熟腺頸部粘液細胞の形質を主に有する腫瘍である
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuhiro Yamanoi, Chifumi Fujii, Jun Nakayama, Masayuki Shimoda
2. 発表標題 MUC6 expression is a novel preferable prognostic marker for invasive mucinous adenocarcinoma of the lung.
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuhiro Yamanoi
2. 発表標題 Phenotypic change of gastric gland mucin is a malignant potential biomarker for stomach, pancreas, bile duct and uterine cervix neoplasms.
3. 学会等名 Manchester Pathology 2021, 13th Joint meeting of the BDIAP and The Pathological Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山ノ井 一裕, 奥村 征大, 上原 剛, 尾島 英知, 中山 淳
2. 発表標題 Significance of aGlcNAc expression in biliary ductal cancer progression
3. 学会等名 第109回 日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山ノ井 一裕, 井田 耕一, 浅香 志穂, 竹内 穂高, 宮本 強, 塩沢 丹里, 中山 淳
2. 発表標題 胃腺粘液産生子宮頸部腫瘍における GlcNAcと 4GnTの発現意義
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部 守恭, 藤井 真一, 山ノ井 一裕, 中山 淳, 福島 万奈, 的場 久典
2. 発表標題 子宮頸部細胞診で胃型粘液性癌が疑われた通常型内頸部腺癌の一例
3. 学会等名 第58回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motohiro Okumura, Kazuhiro Yamanoi, Jun Nakayama
2. 発表標題 Significance of GlcNAc expression during progression of cholangiocarcinoma
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究協力者	中山 淳  (Nakayama Jun)		
研究協力者	藤井 千文  (Fujii Chifumi)		
研究協力者	奥村 征大  (Okumura Motohiro)		
研究協力者	山田 重徳  (Yamada shigenori)		
研究協力者	井田 耕一  (Ida Koichi)		

## 6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	佐藤 佳子  (Sato Yoshiko)		
研究協力者	結城 淳子  (Yuki Atsuko)		
研究協力者	川久保 雅友  (Kawakubo Masatomo)		
研究協力者	宮本 強  (Miyamoto Tsutomu)		
研究協力者	塩沢 丹里  (Shiozawa Tanri)		
研究協力者	上原 剛  (Uehara Takeshi)		
研究協力者	的場 久典  (Matoba Hisanori)		
研究協力者	小村 仁美  (Komura Hitomi)		

## 6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	春宮 覚  (Harumiya Satoru)		
研究協力者	杠 華絵  (Yuzuriha Hanae)		
研究協力者	熊沢 舞  (Kumazawa Mai)		
研究協力者	下田 将之  (Shimoda Masayuki)		
研究協力者	江本 桂  (Emoto Katsura)		
研究協力者	浅村 尚生  (Asamura Hisao)		
研究協力者	浅香 志穂  (Asaka Shiho)		
研究協力者	竹内 穂高  (Takeuchi Hodaka)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Sanford Burnham Prebys			