

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K07587  
研究課題名(和文) 癌の増殖・浸潤・転移におけるグリコカリックスの機能的な役割の解明  
  
研究課題名(英文) Role of glycoalyx in cancer  
  
研究代表者  
富田 弘之 (Tomita, Hiroyuki)  
  
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授  
  
研究者番号：50509510  
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)：グリコカリックスの主成分のヘパラン硫酸を血管内皮細胞特異的に減少したコンディショナルノックアウトマウスを作製した(EXT1-VE-CreERマウス)。このマウスにマウス大腸癌細胞を移植し、腫瘍形成を経時的に観察した。すると、野生型マウスと比較して、ノックアウトマウス(EXT1-VE-CreERマウス)では大腸腫瘍の増殖速度は促進していた(統計学的有意差はみられなかったものの)。この結果より、宿主における血管内皮でのグリコカリックス減少状態は、腫瘍の増大に関与することが示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、初めて血管内皮グリコカリックスと癌の関連を調べた研究である。本研究計画には、ヒトでみられる実体を基礎にした構造的研究を進展させるだけでなく、新たな構造物と認識されたグリコカリックスと癌におけるその機能を明らかとし、新たな治療抵抗性のメカニズムの解明とそれに基づく今後のドラッグ・デリバリーの改善や革新が期待できる。また、癌血管とグリコカリックスを結びつけた点は今までになく、オリジナルティがあると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Conditional knockout mice with a vascular endothelial cell-specific reduction of heparan sulfate, the main component of glycoalyx, were generated (EXT1-VE-CreER mice). Mouse colon cancer cells were transplanted into these mice and tumor formation was observed over time. Compared to wild-type mice, the knockout mice (EXT1-VE-CreER mice) showed an accelerated colon tumor growth rate (although the difference was not statistically significant). These results suggest that a glycoalyx-depleted state in the vascular endothelium in the host is responsible for tumor growth.

研究分野：Pathology

キーワード：glycoalyx cancer

### 1. 研究開始当初の背景

グリコカリックスは、プロテオグリカンやグリコサミノグリカンなどからなる糖蛋白で構成され、不安定で、壊れやすい。厚さは数十 nm で、電子顕微鏡でようやく見える程度の大きさである。歴史的に血管内皮細胞や消化管上皮細胞の最表面に帯状に分布する糖蛋白として存在していることは、1960 年代に電子顕微鏡で描出されていた。しかし、その後、医学的に電子顕微鏡の役割が低下し、グリコカリックスの解析は下火となった。しかし、近年、麻酔救急領域の血流動態の分子生物学的研究が進むにつれて、血管内皮細胞の表面のグリコカリックスに注目が集まり始め、その性質や多彩な機能がわかってきた。

現在、癌におけるグリコカリックスの研究報告は増加傾向にあるものの、世界的に未だ少ない。しかし、米国の 2-3 のグループが中心となって、機能的な報告が高インパクトの雑誌に報告されつつある(Nature, 2014:PMID 25030168; Nature Cell biology, 2018:PMID 30202050; Cell, 2019:PMID 31056282)。これらの成果として、“癌細胞は、正常細胞よりも自ら分厚いグリコカリックスをまとう。癌細胞表面のグリコカリックスが、メカノセンサーとして働く(機械的刺激を生化学的シグナルに変換)ことで、浸潤や転移を促進する生化学的シグナル(チャンネルの開閉、酵素活性の制御、タンパク質との結合など)を活性化させている”ことがわかってきたものの、癌腫による違いや周囲微小環境でのその機能は未だ着手されていない(現在は行われている最中であろう)。

しかし、これらの報告には大きな問題点がある。どの報告も、癌患者さんの癌とその周囲組織の環境や形態を見ずして、細胞培養やマウス実験を行った結果である。前述の血管グリコカリックスで示したように、グリコカリックス自体が糖蛋白で構成され、物理的、温度的など極めて不安定なものである。

そこで、申請者は、世界に先駆けて走査型電子顕微鏡(SEM)により、ヒト大腸癌手術検体で、血管の穴(内皮細胞のスキマ)に交通するグリコカリックスの網目状の 3 次元超微細構造を初めて可視化した。(2019 年 Journal of Clinical Medicine 誌で発表)。本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、グリコカリックスによる cancer infrastructure 構造において、グリコカリックスの機能的な役割は何か?である。この成果は、癌治療抵抗性を新たな発想で打破することにつながると考える。

### 2. 研究の目的

グリコカリックスによる cancer infrastructure 構造において、グリコカリックスの機能的な役割は何か?の一端を明らかにすることである。本研究計画には、ヒトでみられる実体を基礎にした構造的研究を進展させるだけでなく、新たな構造物と認識されたグリコカリックスと癌におけるその機能を明らかとし、新たな治療抵抗性のメカニズムの解明とそれに基づく今後のドラッグ・デリバリーの改善や革新が期待できる。

### 3. 研究の方法

大腸癌細胞をマウスに移植することで、生体環境における変化を解析する。

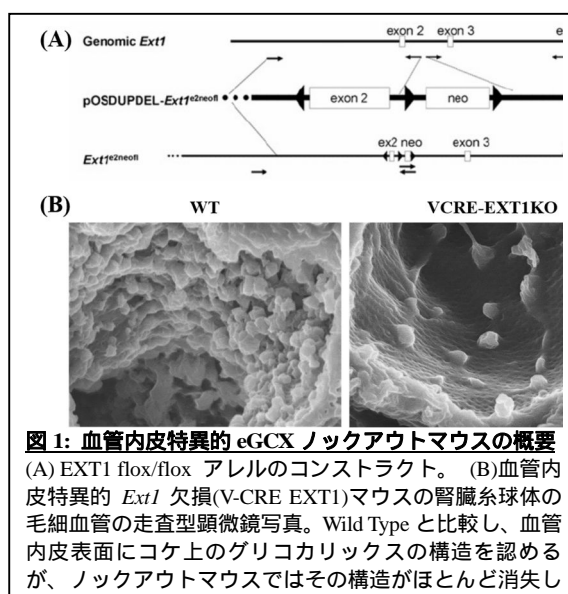
(a) 異所(皮下移植) 同所(大腸)移植モデル: 遺伝子組換えによるグリコカリックスの欠損・減少と増加した大腸癌細胞(の(b)で作製した)をマウス皮下・大腸に移植し、腫瘍形成と周囲微小環境を病理組織学的に解析する。

(b) 肝転移モデル: 遺伝子組換えによるグリコカリックスの欠損・減少と増加した大腸癌細胞(の(b)で作製した)を脾臓に移植し、肝転移モデルを作製する。そして、腫瘍形成の数、大きさや周囲微小環境を病理組織学的に解析する。

### 4. 研究成果

まず、ヘパラン硫酸伸長酵素(Ext1)血管内皮特異的欠損マウスを作製した(Ext1 flox/flox; VE-Cre or VE-CreER マウス)。このマウスを用いて下記の実験を行った。

(a) 異所(皮下移植)移植モデル: マウス大腸癌 MC38 細胞を皮下に移植にその増殖を調べたところ、統計学的有意差はみられなかったものの、血管内皮特異的 Ext1 欠損(xt1 flox/flox; VE-CreER)マウスでは、大腸癌の増殖が Wild type コントロールマウスより



**図 1: 血管内皮特異的 eGCX ノックアウトマウスの概要**  
 (A) EXT1 flox/flox アレルのコンストラクト。(B)血管内皮特異的 Ext1 欠損(V-CRE EXT1)マウスの腎臓系球体の毛細血管の走査型顕微鏡写真。Wild Type と比較し、血管内皮表面にコケ上のグリコカリックスの構造を認めるが、ノックアウトマウスではその構造がほとんど消失し

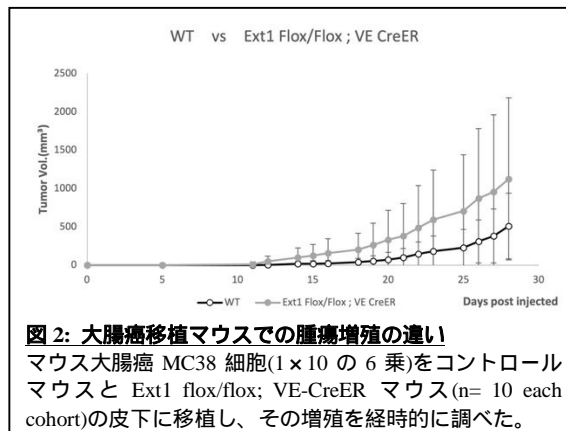
も、促進されていた(図 2)。

この結果より、宿主における血管内皮でのグリコカリックス減少状態は、腫瘍の増大に関与することが示唆された。

(b)肝転移モデル: マウス大腸癌 MC38 細胞( $1 \times 10^6$  乗)をコントロールマウスと Ext1 flox/flox; VE-CreER マウスの門脈中に移植し、1 ヶ月後に肝転移を調べた。Ext1 flox/flox; VE-CreER マウスは、麻酔や手術侵襲に弱く、十分な n 数を確保することができなかった。現在も継続して取り組み中。

この結果より、宿主における血管内皮でのグリコカリックス減少状態は、腫瘍の増大に関与することが示唆された。

(b)肝転移モデル: マウス大腸癌 MC38 細胞( $1 \times 10^6$  乗)をコントロールマウスと Ext1 flox/flox; VE-CreER マウスの門脈中に移植し、1 ヶ月後に肝転移を調べた。Ext1 flox/flox; VE-CreER マウスは、麻酔や手術侵襲に弱く、十分な n 数を確保することができなかった。現在も継続して取り組み中である。



**図 2: 大腸癌移植マウスでの腫瘍増殖の違い**

マウス大腸癌 MC38 細胞( $1 \times 10^6$  乗)をコントロールマウスと Ext1 flox/flox; VE-CreER マウス(n= 10 each cohort)の皮下に移植し、その増殖を経時的に調べた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 富田 弘之, 岡田 英志	4. 巻 49
2. 論文標題 【グリコカリックス】グリコカリックスとがん その接点とグリコカリックスの役割	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床化学	6. 最初と最後の頁 23-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Matsuhashi Nobuhisa, Tomita Hiroyuki, Tanaka Hidenori, Iwata Yoshinori, Matsui Satoshi, Imai Hisashi, Fukada Masahiro, Mizutani Chika, Takahashi Takao, Yasufuku Itaru, Suetsugu Tomonari, Mori Ryutaro, Tanaka Yoshihiro, Okumura Naoki, Futamura Manabu, Yoshida Kazuhiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Evaluation of histopathological heterogeneity of colorectal cancer liver metastasis sites after preoperative chemotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2022.2494	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 Niwa Ayumi, Taniguchi Toshiaki, Tomita Hiroyuki, Okada Hideshi, Kinoshita Takamasa, Mizutani Chika, Matsuo Mikiko, Imaizumi Yuko, Kuroda Takahito, Ichihashi Koki, Sugiyama Takaaki, Kanayama Tomohiro, Yamaguchi Yu, Sugie Shigeyuki, Matsuhashi Nobuhisa, Hara Akira	4. 巻 18
2. 論文標題 Conditional ablation of heparan sulfate expression in stromal fibroblasts promotes tumor growth in vivo	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0281820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0281820	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岡田 英志、富田 弘之	4. 発行年 2020年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 268
3. 書名 New Strategy! 超微形態生理学 ICU輸液がみえるグリコカリックス×アトラス	

〔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 分担 者	岡田 英志  (OKADA HIDESHI)  (30402176)	岐阜大学・医学部附属病院・准教授   (13701)	

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
---------	---------