

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17190

研究課題名（和文）肺癌特異的な糖鎖を標的とした新規診断マーカー・治療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of novel diagnostic markers and therapy targeting lung cancer specific glycans

研究代表者

増澤 啓太（Masuzawa, Keita）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：80772459

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞表面に発現する糖鎖は、癌の進展において重要な役割をはたしている。しかし、肺癌における糖鎖の制御機構及び機能は十分明らかにされていない。本研究では、肺癌における糖鎖の制御機構・機能を明らかにする為、肺癌バイオバンクを用いて肺癌組織・正常肺組織のメタボローム解析・糖鎖プロファイリングを行った。肺癌組織ではフコース転移酵素のFUT3発現及びGDP-L-fucose de novo経路が細胞表面のフコシル化を制御する事を明らかにした。また、ITGB1等の細胞接着分子のフコシル化を介して、肺癌細胞の浸潤能・転移能が制御される事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌バイオバンク検体を用いて、肺癌特異的な糖鎖及び、その制御機構・肺癌進展における機能・臨床的意義を明らかにした。FUT3を含むフコース糖鎖合成経路が肺癌に対する新規治療標的になりうる事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Aberrant glycosylation is often observed as one of the hallmarks of cancer.

However, the regulation of glycosylation in cancer has not been well elucidated, hampering the identification of rationale therapeutic target in cancer including lung cancer. In this study, lectin array and quantitative RT-PCR for lung cancer samples identified FUT3 as key regulator of fucosylation in lung cancer cells. Prospective induction of FUT3 in lung cancer cells promoted invasion and metastasis capacity in vitro and in vivo, respectively, partly due to fucosylation of cell surface proteins including ITGB1. Tissue microarray analysis confirmed the robust and cancer-specific expressions of FUT3 in 141 patient-derived lung cancer samples, associated with poor clinical prognosis.

These data highlight the important roles of FUT3-mediated fucosylation in lung cancer progression.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 フコース糖鎖 FUT3 GDP-L-fucose 転移

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な抗がん剤が開発され肺癌患者の予後は改善しつつあるが、依然として多くの肺癌患者が癌の進行により生命を失っている。肺癌患者の予後を改善させるためには新たな治療標的の解明が必須である。

細胞表面に発現する糖鎖は、発癌過程において大きく変化するのみならず、癌の進展において重要な役割をはたしており、古くから CEA などの腫瘍マーカーが診断マーカーとして注目されてきた。しかし、糖鎖解析は技術的に困難であり、多検体を用いた詳細解析はほとんど検討されてこなかった。申請者らは、本邦で開発された糖鎖発現を網羅的に解析できるレクチンマイクロアレイを用いる事で、肺癌バイオバンク検体(癌組織、非癌組織)の糖鎖プロファイリングを行い、肺癌特異的な糖鎖を同定し、その機能を明らかにする事を目的とした。

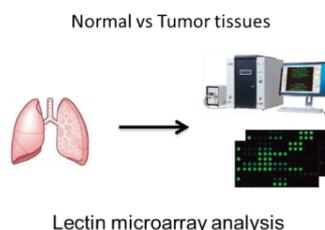
2. 研究の目的

本研究は上述の実験基盤をもとに肺癌特異的な糖鎖修飾とその機能及び臨床的意義を明らかにすることを目的とした。具体的には(1) 肺癌の進行に伴う糖鎖変化、(2) その糖鎖変化が肺癌の進展に与える影響及び臨床的意義を明らかにする事で肺癌における糖鎖を標的とした新規診断マーカー・治療法を解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) バイオバンク検体を用いた比較糖鎖プロファイリング (右図)

肺癌バイオバンクの検体(癌部組織、非癌組織)より Lysate を抽出しレクチンマイクロアレイを用いてそれぞれの癌部組織及び非癌組織の糖鎖プロファイリングを行った。また糖転移酵素の発現を評価する為に検体から RNA を抽出し定量 RT-PCR を行った。得られたデータから癌部と非癌部を比較する事により、肺癌における糖鎖プロファイルを明らかにした。



(2) 肺癌糖鎖の機能解析 (*in vitro*, *in vivo*)

(1)で明らかにした肺癌特異的な糖鎖の機能を明らかにする為、肺癌細胞株に対して特定の糖転移酵素のノックアウト及び過剰発現株を樹立しフェノタイプに与える影響を生物学的に検証する (*in vitro*, *in vivo* 実験)。また選択的なフコシル化糖鎖の合成阻害剤 (6-アルキニルフコース) の肺癌細胞株に対する効果を *in vitro* で検証した。

i) 増殖能・浸潤能に与える影響を *in vitro* で評価。

ii) 肺癌細胞株を免疫不全マウスに皮下移植する Xenograft モデルを用いて *in vivo* における腫瘍形成能、増殖能を評価。

iii) tail vein に投与する肺転移モデルを用いて転移能を評価。

iv) フコース糖鎖のキャリア蛋白の解析

(3) Tissue Micro Array (TMA) を用いた免疫染色

肺癌 TMA を用いてフコース転移酵素 FUT3 の発現を免疫組織学的に評価し、予後との関係を解析した。

4. 研究成果

(1) バイオバンク検体を用いた比較糖鎖プロファイリング

バイオバンク検体から抽出したライセートに蛍光標識してレクチンアレイ反応を行い、ライセートと各レクチンとの結合能を半定量化し、同一症例の癌部組織と非癌部組織を比較し肺癌組織で特異的に上昇している糖鎖を推定した。癌組織ではフコースの結合を認識するレクチンである AOL, AAL との結合能が有意に高かった (図1)。また、肺癌組織では正常肺組織と比較し、FUT3 の発現が有意に上昇しており、FUT3 の発現は AOL, AAL との結合能と相関した (図2)。

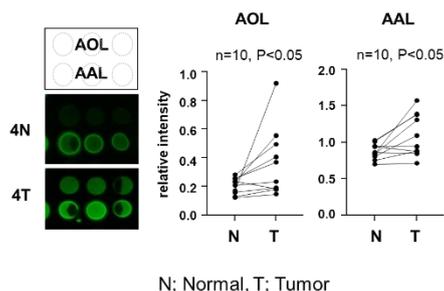


図1. レクチンアレイ (AOL, AAL)

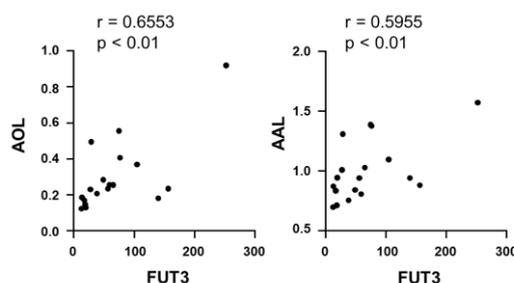


図2. FUT3発現とAOL, AALの結合能は相関する

(2) 肺癌細胞株では, FUT3 によりフコース糖鎖は制御される

FUT3 の過剰発現株及びノックアウト株を樹立し, フコース糖鎖の発現を westernblotting で評価した. まず, FUT3 発現のない A549 に FUT3 を過剰発現させた所, フコース糖鎖である Sialyl Lewis(x) (SLX), Sialyl Lewis(a) (SLA) の発現が上昇し, 6 アルキニルフコース (6-AF) で治療すると, 発現が低下した (図 3). 逆に, FUT3 高発現株である H322 を用いて FUT3 をノックアウトした所, SLX の発現が低下した (図 4). 以上より, 肺癌細胞では, 主に FUT3 によりフコース糖鎖が合成される事が示唆された.

図3. FUT3過剰発現によりSLX, SLA上昇

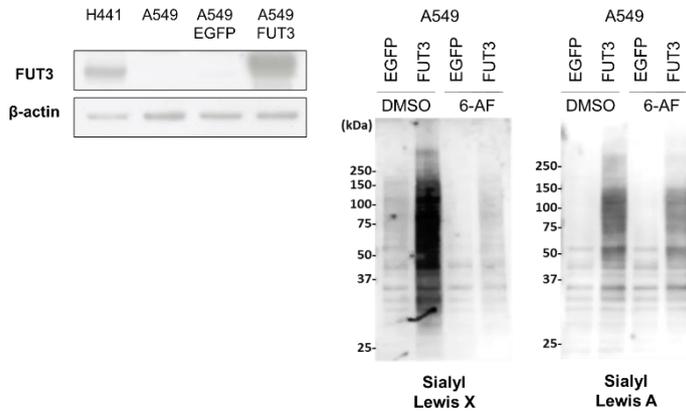
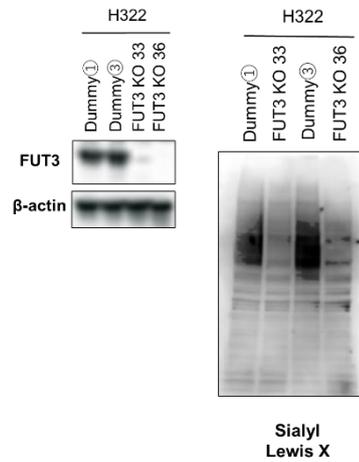


図4. FUT3ノックアウトによりSLX低下



(3) FUT3 は, 肺癌細胞株の浸潤能・転移能を制御する

A549 に FUT3 を過剰発現させた所, mock と比較して FUT3 発現により増殖能には有意な差を認めなかったが, 浸潤能が有意に増大した (図 5). 一方で, CRISPR/Cas9 により H322 で FUT3 をノックアウトした所, コントロールと比較して浸潤能が有意に低下した (図 6).

続いて, *in vivo* での検証を行った. 肺癌細胞株を免疫不全マウスに皮下移植する Xenograft モデルでは, A549 (mock)と FUT3 過剰発現株で腫瘍径に有意な差は認めなかったが, nudo mouse の尾静脈から注入する肺転移モデルで評価を行った所, FUT3 過剰発現群で肺転移数の増大を認められた (図 7).

図5. FUT3過剰発現により浸潤能亢進

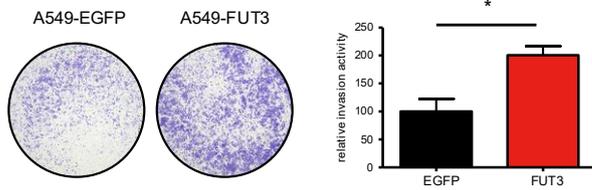


図7. FUT3過剰発現により転移能亢進

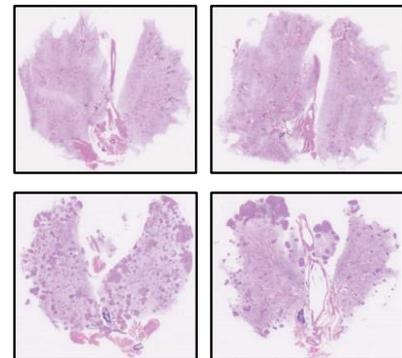
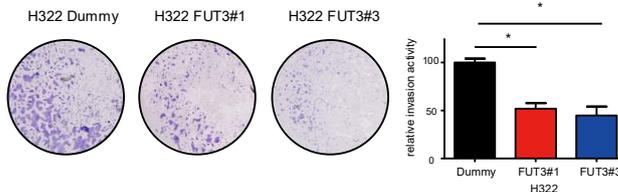


図6. FUT3ノックアウトにより浸潤能低下



(4) ITGB1, CEA 等の細胞接着因子がフコース糖鎖のキャリア蛋白である

浸潤能・転移能に関わる膜蛋白に注目し, フコース糖鎖のキャリア蛋白の解析を行った. A549 に FUT3 を過剰発現させた細胞株を用いて, SLX で免疫沈降後, ウェスタンブロッティングを行った所, 細胞接着分子である ITGB1, ALCAM, CEA の発現が見られ (図 8), SLX のキャリア蛋白である事が示唆された. 続いて, ヒト肺癌組織と正常肺組織から得られた Lysate を用いて同様の検証を行った所, 肺癌組織のみに ITGB1, CEA の発現が見られた (図 9).

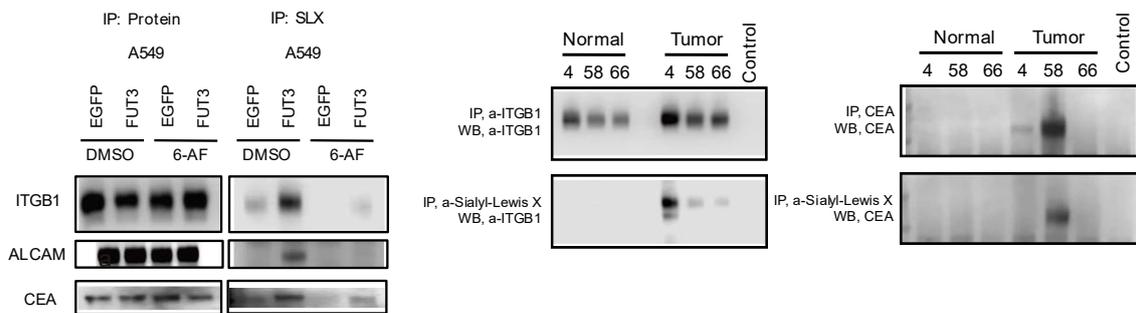


図8, 9. 細胞接着分子はフコース糖鎖のキャリア蛋白である

(5) FUT3 の高発現は非小細胞肺癌の予後不良因子である

非小細胞肺癌患者 126 例の TMA を用いて FUT3 の免疫染色を行い、予後との関係を解析した。病理学的に FUT3 の染色強度をスコア化して score0,1 の低発現群、score2,3 の高発現群に分類をした所、FUT3 低発現群と比較して FUT3 高発現群で生存期間の有意な減少を認めた (図 10)。

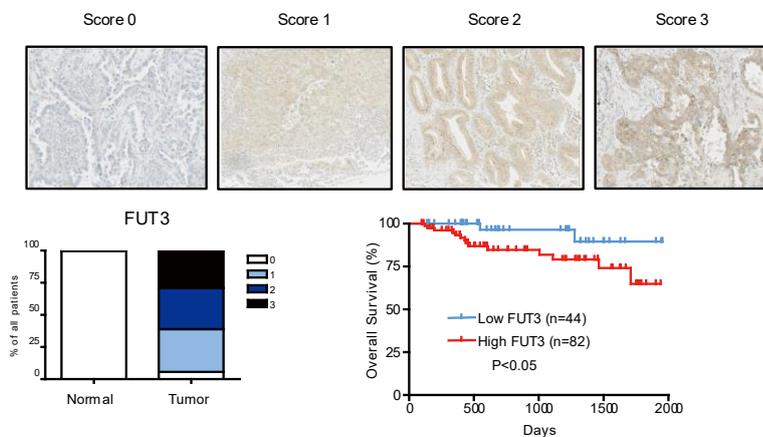


図10. 肺癌TMA. FUT3免疫染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohgino Keiko, Terai Hideki, Yasuda Hiroyuki, Nukaga Shigenari, Hamamoto Junko, Tani Tetsuo, Kuroda Aoi, Arai Daisuke, Ishioka Kota, Masuzawa Keita, Ikemura Shinnosuke, Kawada Ichiro, Naoki Katsuhiko, Fukunaga Koichi, Soejima Kenzo	4. 巻 111
2. 論文標題 Intracellular levels of reactive oxygen species correlate with ABT 263 sensitivity in non small cell lung cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3793 ~ 3801
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14569	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 Masuzawa Keita, Asakura Takanori, Ikemura Shinnosuke, Yasuda Hiroyuki, Kawada Ichiro, Takaoka Sosuke, Hayashi Yuichiro, Nakajima Takeshi, Arai Masami, Fukunaga Koichi, Soejima Kenzo	4. 巻 4
2. 論文標題 Long-Lasting Response to Nivolumab for a Patient With Lynch Syndrome-Associated Lung Adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCO Precision Oncology	6. 最初と最後の頁 74 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1200/P0.19.00156	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 Kakimi Kazuhiro, Matsushita Hirokazu, Masuzawa Keita, et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 Adoptive transfer of zoledronate-expanded autologous V β 9 γ 2 T-cells in patients with treatment-refractory non-small-cell lung cancer: a multicenter, open-label, single-arm, phase 2 study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e001185 ~ e001185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2020-001185	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 Terai Hideki, Hamamoto Junko, Emoto Katsura, Masuda Takeshi, Manabe Tadashi, Kuronuma Satoshi, Kobayashi Keigo, Masuzawa Keita, Ikemura Shinnosuke, Nakayama Sohei, Kawada Ichiro, Suzuki Yusuke, Takeuchi Osamu, Suzuki Yukio, Ohtsuki Sumio, Yasuda Hiroyuki, Soejima Kenzo, Fukunaga Koichi	4. 巻 19
2. 論文標題 SHOC2 Is a Critical Modulator of Sensitivity to EGFR-TKIs in Non-Small Cell Lung Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 317 ~ 328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-20-0664	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 Kobayashi Keigo, Terai Hideki, Yasuda Hiroyuki, Hamamoto Junko, Hayashi Yuichiro, Takeuchi Osamu, Mitsuishi Yoichiro, Masuzawa Keita, Manabe Tadashi, Ikemura Shinnosuke, Kawada Ichiro, Suzuki Yukio, Soejima Kenzo, Fukunaga Koichi	4. 巻 534
2. 論文標題 Functional dissection of the KRAS G12C mutation by comparison among multiple oncogenic driver mutations in a lung cancer cell line model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.110	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 Ishioka Kota, Yasuda Hiroyuki, Hamamoto Junko, Terai Hideki, Emoto Katsura, Kim Tae-Jung, Hirose Shigemichi, Kamatani Takashi, Mimaki Sachiyo, Arai Daisuke, Ohgino Keiko, Tani Tetsuo, Masuzawa Keita, et al.	4. 巻 81
2. 論文標題 Upregulation of FGF9 in Lung Adenocarcinoma Transdifferentiation to Small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3916 ~ 3929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-20-4048	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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