

令和 7 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2024

課題番号：21K07210

研究課題名(和文) 切除検体を基にした網羅的糖鎖解析による肝細胞癌悪性度解析と新規バイオマーカー開発

研究課題名(英文) Comprehensive glycan analysis based on resected specimens of hepatocellular carcinoma

研究代表者

神山 俊哉 (Kamiyama, Toshiya)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：80322816

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)：2001年から2006年の肝細胞癌切除例48例の凍結検体の全自動血清糖鎖プロファイル解析で網羅的解析を行い、1325.55m/zから3336.24m/zまでの39個のN型糖鎖プロファイルを解析でき、肝細胞癌の門脈侵襲に関連するものは4個、分化度には2個、大きさには3個の糖鎖が有意に関連する傾向があった。腫瘍個数には2個、AFPに3個、肝静脈侵襲に2個の糖鎖の有意な関連性が認められ、うち2個(仮称G2201、G2666)が単変量解析で有意に無再発生存率に関連性があり、G2666は多変量解析でも有意因子で、既報でもAFPとの関連性が報告され、当研究でもAFP、腫瘍個数、肝静脈侵襲に関連があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者血清の糖鎖解析研究では、患者背景：併存する疾患、人種などの影響があり、癌細胞上で行われる糖鎖修飾がどのように癌細胞の生物学的悪性度に関連性があるかは未解決であったため、実際の切除検体である癌細胞組織での検討が必要であるとの考えに至り、本研究を進めた。肝細胞癌切除後予後因子となる病理組織学的因子である腫瘍分化度(高分化、中分化、低分化)、門脈浸潤の有無、肝静脈浸潤の有無、個数：単発、多発、大きさ、予後、再発に関連する特異的な糖鎖発現を探索した結果、切除検体から新規バイオマーカーとして最低2個が検出され、これまでにない視点からの肝細胞癌の生物学的悪性度を知る可能性を秘める糖鎖と思われる。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive analysis of frozen specimens from 48 resected cases of hepatocellular carcinoma from 2001 to 2006 by fully automated serum glycan profile analysis allowed us to analyze 39 N-type glycan profiles ranging from 1325.55 m/z to 3336.24 m/z, with 4 related to portal vein invasion of hepatocellular carcinoma, 2 to the degree of differentiation, and size There was a significant trend for 3 glycans to be related to the number of tumors, 2 to the number of tumors, 2 to the number of AFP, and two with hepatic vein invasion, two of which (tentatively named G2201 and G2666) were significantly associated with recurrence-free survival in univariate analysis, and G2666 was also a significant factor in multivariate analysis, and its association with AFP has been reported in previous reports and AFP in our study, It was associated with AFP, number of tumors, and hepatic vein invasion in our study.

研究分野：外科腫瘍学

キーワード：糖鎖 肝細胞癌 生物学的悪性度 予後因子 再発因子

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

患者血清を用いる癌に関する糖鎖解析研究では、患者背景：併存する疾患、人種などの影響があり、癌細胞上で行われる糖鎖修飾がどのように癌細胞の生物学的な悪性度に関連性があるかは未解決である。肝癌細胞株での実験で、これまで報告された患者血清から検出された糖鎖と異なるものの浸潤能関与が分かったため、実際の切除検体である癌細胞組織での検討が必要であるとの考えに至った。

2. 研究の目的

2002年に西村が発明したグライコプロッティング法(特願2002-378733、PCT/JP2003/016841「糖鎖捕捉分子を用いた糖鎖濃縮法および糖鎖構造解析法」、西村ら、*Angew. Chem. Int. Ed.*2005, 44,91-96)による全自動血清糖鎖プロファイル解析装置により糖鎖の精製と構造解析が行うことができるようになり、多様な糖鎖情報を失うことなく網羅的に取得することができるようになった。これまでに血清タンパク質に結合している糖鎖の網羅的定量解析により肝細胞癌(HCC)に特異的糖鎖(仮称：G3560、G2890)が存在し、それらが悪性度ならびに予後予測に関与すると報告してきた(Kamiyama T, *Hepatology*.2013 Jun;57(6):2314-25)。しかし、これら検出された糖鎖は、患者血清を用いた研究であり、患者背景：人種などにより、結果に影響があることがわかってきた(PLoS One. 2018 Dec28;13(12):e0209515)。そこで我々は肝癌細胞株を用いて、癌細胞特異的な糖鎖発現と浸潤能に関して研究した。肝癌の浸潤能・増殖能に関して、セリンプロテアーゼの一つである urokinase type plasminogen activator (u-PA)が関与し、癌細胞からの産生と浸潤能とが相関することが報告されていることから(*Int J Oncol.* 1998 Mar;12(3):655-9)(*CancerGene Ther.* 2003 Feb;10(2):112-20.)この u-PA 発現により肝癌細胞株の浸潤能を制御し、それに伴う糖鎖修飾の変化を検討したところ、特異的な糖鎖発現(m/z 1892)が u-PA を介する肝癌細胞の浸潤能に関与し、さらに MGAT5 でエンコードされる糖転移酵素 GnT-V(N-アセチルグルコサミン転移酵素 V)の発現の有無による糖鎖修飾の変化で糖鎖発現(m/z 1892)が変化し、浸潤能も変わることがわかった(*Oncology Reports*. 202)。また、網羅的糖鎖解析により、肝癌細胞株で、抗癌剤の耐性に関与する特異的な糖鎖構造や、白血病細胞表面の糖鎖構造を解析し、抗癌剤耐性獲得で変化する糖鎖構造も明らかになっている(*Mol Cancer*. 2007 May 9;6:32.)。これらのことから、癌細胞自体での糖鎖発現が、癌の浸潤・転移、抗癌剤耐性に関与することから、癌細胞の発現糖鎖から浸潤・転移能を予測することが可能となれば、癌治療法選択に利するのみならず、癌転移、薬剤耐性の本態に近づくことを目的とした。

3. 研究の方法

2001年から2006年までの肝細胞癌切除例を study cohort とし、肝癌切除例の網羅的糖鎖解析による糖鎖発現を全自動血清糖鎖プロファイル解析装置によりを行う。これら糖鎖解析結果と臨床病理学的所見・組織病理学的所見、切除後の予後・再発との関連性を検討する。

4. 研究成果

2001年から2006年までの肝細胞癌切除例48例の凍結検体の全自動血清糖鎖プロファイル解析で網羅的解析を行い、1325.55m/z から3336.24m/z までの39個の糖鎖を検出でき肝癌組織のN型糖鎖プロファイルを解析できた。凍結保存された肝細胞癌切除標本の糖鎖解析が普遍的に可能であることが検証された。検出された糖鎖を陽性、陰性の2群に分け、門脈侵襲vp、分化度、大きさ、個数、AFP値、PIVKA-II、肝静脈侵襲vvとの相関を二条検定で検討したところ、肝細胞癌の門脈侵襲に関連するものは4個、分化度には2個、大きさには3個の糖鎖が有意に関連する傾向があり、特筆すべきは、肝細胞癌の生物学的悪性度に関連する項目である腫瘍個数、AFP、肝静脈侵襲に関連する特定の糖鎖が見つかり、腫瘍個数には2個、AFP値に3個、肝静脈侵襲には2個の糖鎖の有意な関連性が認められた。また糖鎖側から見た場合、各糖鎖が、肝細胞癌の病理学的悪性度の一つに関連しているだけでなく、複数の因子に関連していることが分かり、肝細胞癌の悪性度を規定するには複数の糖鎖変異が相互に関連する必要であり、関連する糖鎖が多くなるに従い悪性度が上昇する可能性があると考えられた(表1)。検出糖鎖の内、同じ糖鎖が肝細胞癌の門脈侵襲、分化度、大きさと相互に有意に関連する傾向があった。腫瘍個数、AFP値、肝静脈侵襲に有意な関連性があった糖鎖で無再発生存率を検討したところ、このうち2個(仮称G2201、G2666)が単変量解析で有意に無再発生存率に関連性があり(generalized Wilcoxon test=0.0216、0.0061)(図1、図2)G2666はCox比例ハザードモデルによる多変量解析でも有意因子(p=0.0211, CI:-18452-18430.4, Risk Ratio: 3.5203e+9)であった。この糖

鎖は、既報でも AFP との関連性が報告され、当研究においても AFP、腫瘍個数、肝静脈侵襲に関連があった。

組織糖鎖	vp	分化度	大きさ	個数	AFP	PIVKA-II	wv
1325G	0.9395	0.0583	0.1027	0.3023	0.8281	0.4135	0.897
1471G	0.0806	0.9119	0.0647	0.5745	0.1916	0.2462	0.2498
1487G	0.148	0.487	0.0599	0.2446	0.1149	0.2676	0.5005
1836G	0.7983	0.3328	0.132	0.8036	0.2653	0.3485	0.8893
2135G	0.0853	0.4176	0.4976	0.4875	0.4572	0.8031	0.6673
2198G	0.3434	0.1168	0.2408	0.2939	0.6017	0.1733	0.4609
2201G	0.0711	0.3412	0.0966	0.4976	0.027	0.4611	0.3404
2242G	0.0534	0.3964	0.5931	0.599	0.0778	0.249	0.7078
2344G	0.1815	0.0806	0.6171	0.5006	0.0432	0.2211	0.0399
2360G	0.1443	0.2779	0.1963	0.0254	0.0581	0.2854	0.2072
2420G	0.4347	0.4515	0.4173	0.9828	0.5018	0.6366	0.9171
2666G	0.1123	0.6537	0.1857	0.0423	0.0169	0.2259	0.0495
再発Logrank	0.4267	0.006	0.0283	<0.0001	0.1052	0.0337	0.0001

有意傾向あり
有意差あり

表 1 肝細胞癌組織から検出された糖鎖と臨床・病理学的因子との関連

図 1 G2101 無再発生存率 単変量解析 generalized Wilcoxon test=0.0216

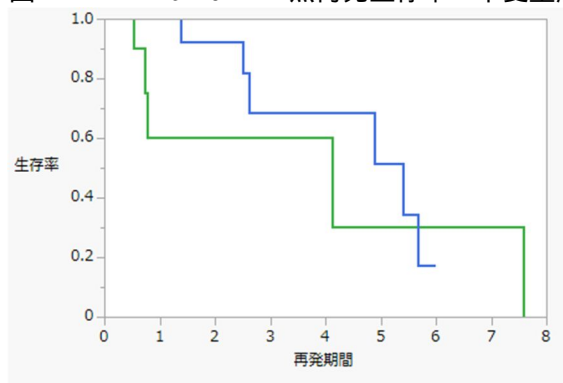
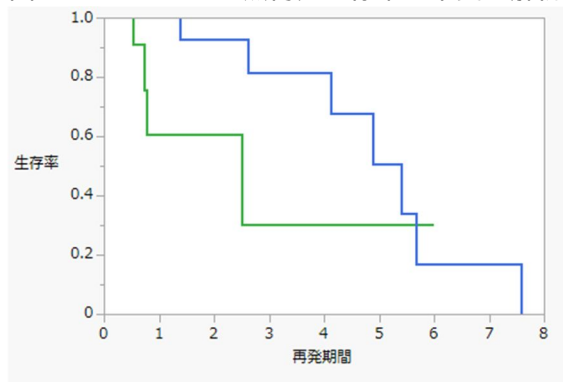


図 2 G2666 無再発生存率 単変量解析 generalized Wilcoxon test=0.0061



解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	西村 紳一郎 (Nishimura Shin-ichiro) (00183898)	北海道大学・先端生命科学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	旭 火華 (Asahi Yoh) (10876246)	北海道大学・大学病院・医員 (10101)	
研究分担者	坂本 譲 (Sakamoto Yuzuru) (20876247)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	
研究分担者	柿坂 達彦 (Kakisaka Tatsuhiko) (40583092)	北海道大学・医学研究院・講師 (10101)	
研究分担者	折茂 達也 (Orimo Tatsuya) (80711861)	北海道大学・医学研究院・客員准教授 (10101)	
研究分担者	長津 明久 (Nagatsu Akihisa) (90782631)	北海道大学・医学研究院・特任助教 (10101)	

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