

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592445

研究課題名(和文)絨毛癌におけるhCG過剰糖鎖付加酵素の機能と絨毛癌発症機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism of carcinogenesis of choriocarcinoma with glycosyltransferases for hyperglycosylated hCG

研究代表者

山本 英子(Yamamoto, Eiko)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10432262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：human chorionic gonadotropin(hCG)の糖鎖構造が境界悪性以上(侵入奇胎、絨毛癌)では異なる原因となるN-アセチルグルコサミン転移酵素IV(GnT-IV)およびコア2型O-グリカン合成酵素(C2GnT-1)の2つの糖転移酵素は、正常絨毛や胞状奇胎に比べ絨毛性腫瘍では発現が強かった。GnT-IVaは、beta1 integrinおよびhCGへの糖鎖修飾を介して接着能を促進することにより、癌の浸潤を促進することが解明された。絨毛癌細胞株JarにおいてC2GnTも浸潤促進に関与することが明らかとなった。転写因子cRelのGnT-IVa転写制御への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The structures of sugar chains of hCG are quite different in trophoblastic neoplasia compared with normal pregnancy and hydatidiform mole, and it is because of N-acetylglucosaminyltransferase IVa (GnT-IVa) and core 2 beta-1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT). The expression of GnT-IVa and C2GnT was strong in choriocarcinoma and invasive mole, but very weak in normal placenta and hydatidiform mole. The two glycosyltransferases involved in promoting of invasion ability in choriocarcinoma. The result of immunoprecipitation suggested that GnT-IVa promotes invasion ability via glycosylation of beta1 integrin. Luciferase assay suggested that cRel may regulate transcription of GnT-IVa via binding to the promoter of GnT-IVa.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：絨毛癌 糖転移酵素 GnT-IVa C2GnT-1

1. 研究開始当初の背景

絨毛癌はすべての妊娠後に発症しうる悪性腫瘍で、肺、肝臓、脳などの遠隔転移を来しやすい。胞状奇胎後管理や抗癌剤、支持療法の発達により、日本における絨毛癌患者の発症率および予後は飛躍的に改善した。現在でも治癒率は約90%であるが、早期に発見できれば100%の完寛が望める疾患である。

胎盤栄養膜細胞から発生する絨毛性疾患は、胞状奇胎(良性)から侵入奇胎(境界悪性)を経て絨毛癌(悪性)になると考えられる。hCGはalphaおよびbetaサブユニットから構成される二量体で、全ての絨毛性疾患および正常胎盤はhCGを分泌する。アスパラギン(N)結合糖鎖およびセリン(O)結合糖鎖が付加されるが、正常胎盤から分泌されるhCGと侵入奇胎・絨毛癌から分泌されるhCGの糖鎖の相違について報告されている。

患者尿中hCGのN結合糖鎖解析では、正常妊娠および胞状奇胎では認めない異所性糖鎖beta1-4GlcNAcが侵入奇胎および絨毛癌で認められた。beta1-4GlcNAcを付加するN-アセチルグルコサミン転移酵素IV(GnT-IV)の活性およびmRNAレベルでの発現は、正常胎盤に比べて絨毛癌細胞株で非常に高かったが、組織における発現やその機能については検討されていない。

一方、Coleらは、正常妊娠と絨毛癌患者の尿中hCGのO結合糖鎖の違いを明らかにし、O結合糖鎖を抗体として用いた研究により絨毛細胞の浸潤促進に参与すると報告している。この糖鎖を付加する糖転移酵素はコア2型O-グリカン合成酵素(C2GnT-1)であるが、胎盤および絨毛細胞における発現および機能を検討した報告はこれまでに認めない。

我々は、胎盤および絨毛性疾患における免疫組織染色や、細胞株を含めたRT-PCRおよびWestern blotを行い、GnT-IVaは正常胎盤や胞状奇胎では発現を認めないが、侵入奇胎や絨毛癌組織では強く発現していることを明らかにした。以上の結果は患者尿中hCGのN結合糖鎖解析結果と同様で、悪性化に伴いGnT-IVaの発現は明らかに強くなった。絨毛細胞におけるGnT-IVaの発現が、細胞増殖や分化、浸潤など悪性化と関与する可能性が考えられるが、解明されていない。

絨毛細胞の癌化は、他の癌と同様に、癌遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の欠損を含む、多段階遺伝変化の蓄積により、細胞増殖や、分化、アポトーシス、浸潤などの機能変化を起こすことによると考えられるが、解明されていない。GnT-IVaの転写制御因子の解明や、全胞状奇胎由来細胞株への遺伝子導入による機能変化の検討により、絨毛癌発症メカニズムが解明されることが期待される。

2. 研究の目的

胎盤栄養膜細胞(絨毛細胞)から発生する絨毛性疾患には、胞状奇胎(良性)侵入奇胎(境界悪性)絨毛癌(悪性)がある。絨毛性疾患の栄養膜細胞が分泌するhuman chorionic gonadotropin(hCG)は優れた腫瘍マーカーであるが、正常妊娠時にも分泌されるため、絨毛癌をその他の妊娠と鑑別するために用いることはできない。しかし、hCGの糖鎖構造が境界悪性以上では変化することが知られているため、これを応用することにより、絨毛癌の早期診断に有用な腫瘍マーカーの発見および治癒率100%を目指す。また、世界で初めての樹立となる胞状奇胎由来細胞株を用い、絨毛細胞癌化メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1)絨毛癌細胞におけるGnT-IVaの機能解明:絨毛癌細胞株Jarへの遺伝子導入により、GnT-IVa発現抑制絨毛癌細胞モデルを作成し、細胞増殖、浸潤および遊走能、ホルモン分泌や細胞外基質への接着など細胞機能変化を検討する。

(2)GnT-IVaプロモーター領域の解析:悪性化に伴いmRNAレベルでのGnT-IVa発現が明らかに増加するため、絨毛細胞癌化メカニズム解明を目的とし、GnT-IVaのプロモーター領域における発現調節因子を明らかにする。ルシフェラーゼアッセイおよび候補となる転写因子に対する抗体を用いたChIPアッセイを行う。

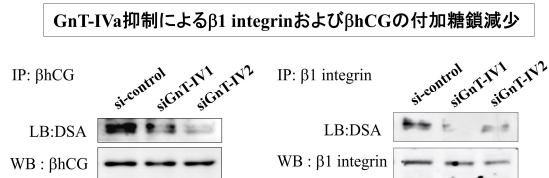
(3)C2GnT-1の絨毛性疾患における発現:正常胎盤、絨毛性疾患組織や絨毛癌細胞株を用いた免疫組織染色、RT-PCR、Western blotにより、悪性化に伴うC2GnT-1の発現変化を検討する。C2GnT-1の高発現絨毛癌細胞株にshRNAベクターを導入し、C2GnT-1発現抑制絨毛癌細胞モデルを作成し、機能変化について検討を行う。

(4)胞状奇胎不死化細胞および絨毛癌細胞株へのGnT-IVa過剰発現による機能変化:過去に樹立した胞状奇胎細胞株(HMol-1およびHMol-2)および絨毛癌細胞株Jarに、GnT-IVaの遺伝子導入を行い、悪性化に関わる機能変化を検討する。

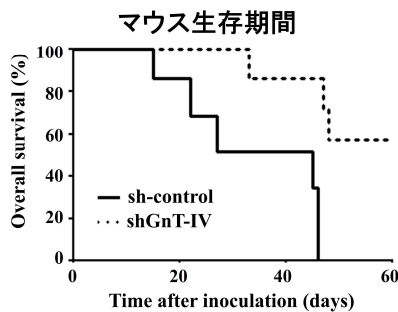
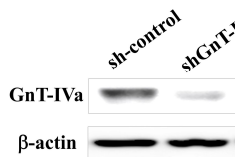
4. 研究成果

(1)絨毛癌細胞におけるGnT-IVaの機能解明:絨毛癌細胞株JarにおけるGnT-IVa発現抑制により、増殖能は96時間後まで変化を認めなかった。遊走能は約40%、浸潤能は約30%の低下を認めた。ゼイモグラフィーでは、MMP-2およびMMP-9の活性に変化を認めなかったが、細胞外基質(フィブロネクチン、コラーゲンIおよびIV)への接着能の低下を認めた。beta hCGおよびbeta1 integrin抗体を用いた免疫沈降およびレクチンプロットにより、GnT-IVa発現抑制によるbeta1-4GlcNAc

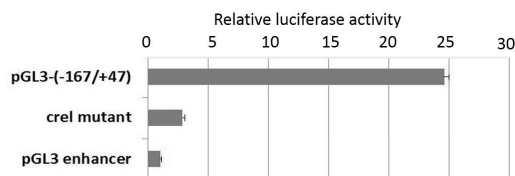
鎖の減少が明らかとなった。



ヌードマウスへの皮下接種では、親株細胞投与群 (n=7) の平均生存日数が30日であったのに対し、GnT-IVa 発現抑制群 (n=7) では腫瘍生着は3匹のみであった。GnT-IVa 発現抑制により、絨毛癌細胞の生着が抑制され死亡予後が明らかに改善された。以上より、GnT-IVa は beta1 integrin への beta1-4 GlcNAc 鎖付加を介して、細胞外基質への接着を亢進し癌の浸潤を促進することが明らかとなった。



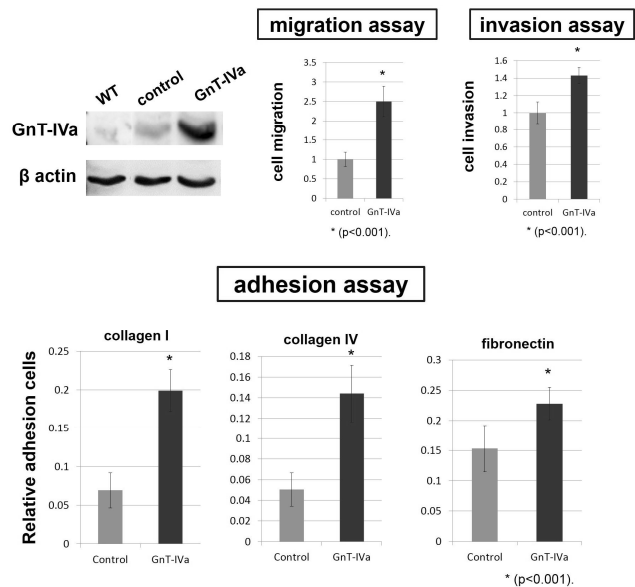
(2)GnT-IVa プロモーター領域の解析: 絨毛癌細胞株 Jar を用いたルシフェラーゼアッセイにより、-167 ~ -151 の promoter 領域が転写制御に関与する可能性が示唆された。cRel の結合配列が存在し、cRel の mutant ベクター導入によりルシフェラーゼ活性が抑制されたことと ChIP assay の結果より、NFκB2 が cRel と二量体を形成して GnT-IVa のプロモーターに結合し GnT-IVa の転写制御に関与する可能性が強く示唆された。



(3)C2GnT-1 の絨毛性疾患における発現: 免疫組織染色により、C2GnT-1 発現は正常絨毛および胞状奇胎において弱い、侵入奇胎や絨毛癌では非常に強かった。Western blot、RT-PCR でも免疫組織染色と同様に、正常胎盤や胞状奇胎では C2GnT-1 の発現は弱い、侵入奇胎や絨毛癌では強かった。絨毛癌細胞株

Jar に C2GnT-1 shRNA を導入し、C2GnT-1 発現抑制モデル (C2GnT-1 KD) を作成した。C2GnT-1 KD はコントロールベクター導入細胞 (mock) に比べて、増殖能には影響が認められなかったが、細胞外基質 (フィブロネクチン、コラーゲン I およびコラーゲン IV) への接着低下、遊走能および浸潤能の抑制を認めた。C2GnT-1 KD 細胞では、培養上清中の N 型 hyperglycosylated hCG の分泌が mock と比べて低下していた。

(4)胞状奇胎不活化細胞への GnT-IVa 過剰発現による機能変化: 全胞状奇胎細胞株 HMO1-1 および HMO1-2 における GnT-IVa 発現を



Western blot にて確認したところ、発現をほとんど認めなかった。レンチウイルスによる GnT-IVa 遺伝子導入を HMO1-1 および HMO1-2 に行ったところ、遊走能および浸潤能が促進した。絨毛癌細胞株 Jar への GnT-IVa 発現促進モデルにおいても、遊走能、浸潤能、接着能に関して、同様の結果が得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 29 件)

Yamamoto E, Niimi K, Shinjo K, Yamamoto T, Fukunaga M, Kikkawa F. Identification of causative pregnancy of gestational trophoblastic neoplasia diagnosed during pregnancy by short tandem repeat analysis. *Gynecol Oncol Case Rep.* in press. 2014. 査読有。

Kondo S, Demachi-Okamura A, Hirotsawa T, Maki H, Fujita M, Uemura Y, Akatsuka Y, Yamamoto E, Shibata K, Ino K, Kikkawa F, Kuzushima K. An HLA-modified ovarian cancer cell line induced CTL responses specific to an epitope derived from

claudin-1 presented by HLA-A*24:02 molecules. Hum Immunol.2013.74.1103-1110. 査読有.

Mitsui H, Shibata K, Mano Y, Suzuki S, Umezu T, Mizuno M, Yamamoto E, Kajiyama H, Kotani T, Senga T, Kikkawa F. The expression and characterization of endoglin in uterine leiomyosarcoma. Clin Exp Metastasis. 2013.30.731-740. 査読有.

Iwase A, Sugita A, Hirokawa W, Goto M, Yamamoto E, Takikawa S, Nakahara T, Nakamura T, Kondo M, Kikkawa F. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian reserve following chemotherapy in patients with gestational trophoblastic neoplasia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.2013.167.194-198. 査読有.

Kajiyama H, Shibata K, Umezu T, Mizuno M, Suzuki S, Yamamoto E, Fujiwara S, Kikkawa F. Expression of Twist enhances risk of poor oncologic outcome in patients with stage Ib to II cervical carcinoma with lymphovascular space involvement. Hum Pathol.2013.44.181-188. 査読有.

Niimi K, Yamamoto E, Fujiwara S, Shinjo K, Kotani T, Umezu T, Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Kikkawa F. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase IVa promotes invasion of choriocarcinoma. Br J Cancer.2012.107.1969-1977. 査読有.

Kizaki S, Matsui H, Usui H, Shozu M, Hanawa S, Yamamoto E, Kikkawa F. Normal human chorionic gonadotropin regression curves in uneventful postmolar patients. J Reprod Med.2012.57.243-248. 査読有.

Mano Y, Kotani T, Shibata K, Matsumura H, Tsuda H, Sumigama S, Yamamoto E, Iwase A, Senga T, Kikkawa F. The loss of endoglin promotes the invasion of extravillous trophoblasts. Endocrinology.2011.152.4386-4394. 査読有.

〔学会発表〕(計 34 件)

K Niimi, E Yamamoto, K Shinjo, S Fujiwara, T Kotani and F Kikkawa. Role of N-acetylglucosaminyltransferase IVa in choriocarcinoma. IFPA meeting 2012.9.19. Hiroshima. Japan.

S Fujiwara, E Yamamoto, K Niimi, H Tsuda, Y Mano, S Sumigama, T Kotani, K Ino, and F Kikkawa. Molecular genetic diagnosis of two rare cases of gestational trophoblastic neoplasia. IFPA meeting 2012.9.19. Hiroshima. Japan.

新美薫、山本英子、藤原多子、新城加奈子、菅もも、東真規子、近藤紳司、吉川史隆. 妊娠絨毛癌における N アセチルグルコサミン転移酵素 IVa (GnTIVa) の発現と浸潤への関与. 第 52 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会. 2012 年 7 月 1 9 日. グランドプリンスホテル新高

輪. 東京.

藤原多子、菅もも、新美薫、新城加奈子、東真規子、近藤紳司、山本英子、井籠一彦、吉川史隆. 当院における最近 20 年間の絨毛性腫瘍の治療と予後. 第 29 回日本絨毛性疾患研究会. 2011 年 9 月 30 日. 東京ステーションコンファレンス. 東京.

E Yamamoto, K Niimi, K Shinjo, S Fujiwara, Y Mano, T Kotani and F Kikkawa. Establishment of immortalized human hydatidiform mole cell lines. IFPA meeting 2011.9.15. Geilo. Norway.

K Niimi, E Yamamoto, K Shinjo, S Fujiwara, T Kotani and F Kikkawa. N-acetylglucosaminyltransferase IVa (GnT-IVa) may regulate cell invasion in choriocarcinoma. IFPA meeting 2011.9.15. Geilo. Norway.

山本英子、新城加奈子、新美薫、近藤紳司、東真規子、炭竈誠二、小谷友美、井籠一彦、吉川史隆. 全胎状奇胎不死化細胞の樹立. 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2011 年 8 月 29 日. 大阪国際会議場. 大阪.

新城加奈子、山本英子、新美薫、近藤紳司、東真規子、吉川史隆. 当院における low-risk GTN に対する MA 療法の検討. 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2011 年 8 月 29 日. 大阪国際会議場. 大阪.

新美薫、山本英子、新城加奈子、近藤紳司、東真規子、吉川史隆. 絨毛細胞浸潤における N- アセチルグルコサミン転移酵素 IVa (GnT-IVa) の関与. 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2011 年 8 月 29 日. 大阪国際会議場. 大阪.

山本英子、藤原多子、新城加奈子、近藤紳司、東真規子、新美薫、水野昌彦、加藤省一、福永真治、吉川史隆. 妊娠に合併した胎盤部トロホプラスト腫瘍. 第 49 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会. 2011 年 7 月 22 日. 札幌コンベンションセンター. 札幌.

K Niimi, E Yamamoto, K Shinjo, M Higashi, S Kondo and F Kikkawa. N-acetylglucosaminyltransferase IVa regulates cell invasiveness of choriocarcinoma cells. Taiwan Association of Obstetrics and Gynecology. 2011.4.11. Kaohsiung. Taiwan.

〔図書〕(計 1 件)

山本英子、三輪陽子、新美薫: 侵入奇胎、絨毛癌の化学療法後の生殖機能、妊娠、分娩に与える影響について教えてください. 婦人科癌診療 Q&A (鈴木直、岡本愛光、井籠一彦編). 2014. 中外医学社. 4 ページ (306-309).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 英子 (YAMAMOTO EIKO)

名古屋大学医学部附属病院・講師

研究者番号: 10432262

(2)研究分担者

柴田 清住 (SHIBATA KIYOSUMI)

名古屋大学医学系研究科・准教授

研究者番号： 90335026

(3)連携研究者

なし