

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592465

研究課題名(和文) 子宮腫瘍(体癌・頸癌)及び子宮内膜における糖鎖発現・機能とその臨床応用

研究課題名(英文) Expression and Bio-function of Sugar chains in uterine endometrial adenocarcinoma, cervical carcinoma and uterine endometrium

研究代表者

三上 幹男(MIKAMI, Mikio)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：30190606

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)：本研究では、子宮体癌については硫酸基転移酵素遺伝子を導入し sulfatide を強発現させることで細胞の形態変化を示すこと、頸癌については各組織型培養細胞には GM2 ガングリオシドが共通発現していること、卵巣癌については、Paclitaxel 耐性細胞には MDR1 が高発現し、糖脂質 Gb3Cer および GM3 が高発現し、その変化により薬剤耐性を変化させ得ること、卵巣がん患者血清中の糖タンパクを糖ペプチドに分解し、その糖ペプチドを正常人血清中糖ペプチドと質量分析器を用いて比較解析することで卵巣癌に特異的な糖鎖腫瘍マーカーを見出したこと、以上の4点について新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Carbohydrate chains on cell membranes contributes to the mutual recognition of various cells and cell differentiation, and the structure of carbohydrate chains changes with oncogenesis. In this study, we have clarified that the transfection of sulfotransferase genes to endometrial cancer cells changes the cell characters such as cell morphology and response to the trypsin treatment, and that all the uterine cervical cancer cells express GM2 ganglioside, and that ovarian cancer cells resistant to Paclitaxel strongly express Gb3Cer and ganglioside, and that with analysis of glycopeptides in serum of ovarian cancer patients and healthy women by mass spectrometer, a new biomarker for ovarian cancers was found.

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：子宮体癌 子宮頸癌 子宮内膜 卵巣癌 分化度 腺腔形成 糖脂質 硫酸化糖脂質

1. 研究開始当初の背景

細胞膜上の糖脂質・糖蛋白質は細胞、組織の癌化・分化・増殖に伴いその組成が変化し、糖鎖だけでなくその糖鎖を合成する糖転移酵素も生理活性を有していることが報告されている。糖鎖は翻訳後修飾によって始めて付加されるものでありポストゲノム研究としては避けておれないもので、事実、増殖因子、その受容体、酵素、及び抗体などに関して、糖鎖付加がなされなくてはその機能発現もないとの報告が数多くなされている。つまり、蛋白あるいは脂質の機能発現には糖鎖伸長が必要不可欠であり、その糖鎖に関する研究は婦人科領域では全くなされていないのが現状である。

申請者らはすでに子宮体癌の分化に伴う硫酸化糖脂質(sulfatide)の発現増加、子宮内膜の内分泌環境の変化に伴う sulfatide の増量・新たな発現、頸部腺癌における sulfatide の特徴的な発現、卵巣粘液性腺癌における sulfatide の発現について報告してきている。申請者の研究をさらに発展させ臨床応用の可能性を探る上での大切な着眼点は、「(1) 高分化型体癌に発現する sulfatide の分化誘導剤としての可能性を探る」、「(2) 子宮頸癌由来細胞での糖脂質糖鎖の発現とその機能の探索」、「(3) 卵巣癌における薬剤耐性と糖脂質発現との関係」、「(4) 卵巣癌における糖たんぱく腫瘍マーカーの探索」の4点であった。本研究ではこれらの点に着目して研究計画を立て実行に移した。

2. 研究の目的

(1) 高分化型体癌に発現する sulfatide の分化誘導剤としての可能性を探る
sulfatide 発現のない低分化型体癌由来培養細胞に硫酸基転移酵素遺伝子を導入し、sulfatide を高発現する細胞株を樹立して細胞特性に変化がないかを検討する。

(2) 子宮頸癌培養細胞における糖脂質の発現とその機能の探索

各組織型の頸癌由来培養細胞の糖脂質組成を分析して糖脂質糖鎖と癌の浸潤・転移などの特性との関連性を追及する。

(3) Paclitaxel および cisplatin 耐性卵巣癌株とその親株の糖脂質組成を分析して薬剤耐性との関係を探る。

(4) 卵巣癌患者と健常人血清を用いて糖ペプチドをターゲットとした新たな腫瘍マーカーを見出す。

3. 研究の方法

(1) 我々はすでに硫酸基転移酵素 cDNA を組み込んだ発現ベクターを作成しており、本ベクターを用いて sulfatide 高発現体癌由来培養細胞を作成した。親株との比較解析を行った。

(2) 各種組織型の頸癌由来培養細胞株を所有しており、生化学的手法を用いて各細胞株の糖脂質発現を解析した。

(3) 我々はすでに Paclitaxel および cisplatin

耐性卵巣癌株とその親株を所有しており、(2)と同様に生化学的手法を用いて糖脂質発現を分析した。

(4) 患者血清より糖蛋白を抽出後、蛋白分解酵素処理、特殊フィルター、レクチンカラムを用いて糖ペプチドを濃縮。その資料を質量分析器にかけ、健常人データとの比較より卵巣癌に特徴的なピークを同定した。

4. 研究成果

(1) 子宮体癌における硫酸化糖脂質発現とその機能

硫酸基転移酵素遺伝子を導入した細胞株には下記のような形態学的な変化が観察された。



つまり sulfatide を高発現させた体癌培養細胞はドーム形成を示している。これは細胞がシャーレに接着しコンフルエントになった状態からシート状に持ち上がる現象である。シャーレと細胞の間に細胞から分泌物が分泌され空間ができ持ち上がると推測され、細胞が極性を持ち腺癌に特徴的な粘液の分泌という分化が誘導された可能性が示唆される。今後は移植腫瘍を用いた実験系に発展させる予定である。

(2) 子宮頸癌培養細胞における糖脂質の発現とその機能の探索

各組織型の頸癌培養細胞株の糖脂質組成を分析した。

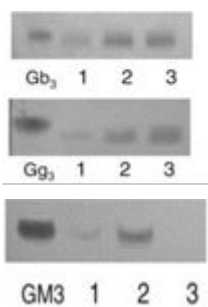
Amounts of gangliosides in cancerous cells of the uterine cervix (µg/mg dry weight)

	Triglyceride	Cholesterol sulfate	II'SO ₂ -LacCer	GM3	GM2	GM1	GalNAc-GM1b	GD1a	GalNAc-GD1a
SKG-IIIb	-	-	tr	0.09	0.65	1.73	-	1.71	-
Squamous cell carcinoma									
Boku	-	-	0.04	0.12	0.07	0.25	0.02	0.26	0.17
HKUSP	-	-	0.14	0.19	0.04	0.15	tr	-	-
Adenocarcinoma									
OMC-4	-	-	-	3.03	0.92	0.19	0.11	1.16	0.32
HCA-1	31.6	0.53	-	0.11	2.21	0.43	0.04	0.04	0.49
Adenosquamous carcinoma									
HeLa	-	-	-	0.37	0.07	0.14	-	-	-
Small cell carcinoma									
HCSC-1	-	-	-	-	0.98	-	0.26	-	-

低分化型腺癌由来 HCA-1、高分化型腺癌由来 OMC-4、小細胞癌由来 HCSC-1、非角化型扁平上皮癌由来 SKG-3b、Boku、HKUSP、HeLa である。上表に示すようにすべての細胞に共通にみられる特徴として GM2 の発現があり、さらに糖鎖末端に GM2 構造を持つ GalNAc-GM1b および GalNAc-GD1a が Boku、HKUSP、OMC-1、HCA-1、HCSC-1 に検出できた。a 経路ガングリオシドの発現は外胚葉性組織の特徴の 1 つであり、

また、GalNAc 転移酵素の高発現はウイルス感染と関係があるとの指摘もある。その他の特徴として、コレステロール硫酸は HCA-1 に高発現し、sulfatide は SKG-3b、Boku、HKUSP のみに発現していた。今後、各細胞の性質を解析する上で有用な指標になると思われる。今後は頸癌での sulfatide 機能に迫ってきたい。

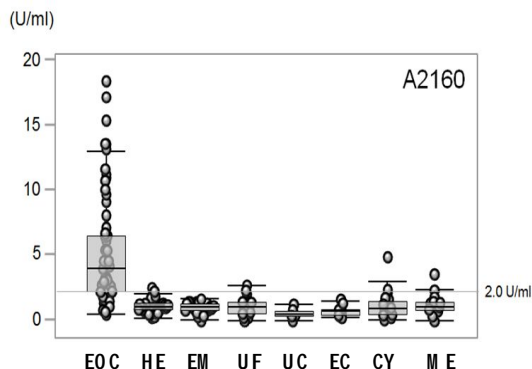
(3) Paclitaxel および cisplatin 耐性卵巣癌株とその親株の糖脂質組成を分析して薬剤耐性との関係を探る。



レーン 1 は卵巣癌親株で、レーン 2 は Paclitaxel 耐性株、レーン 3 は cisplatin 耐性株である。パクリタキセル耐性細胞には ABC トランスポーター MDR1 が高発現し、糖脂質 Gb3Cer および GM3 が高濃度に含まれていた。しかし cisplatin 耐性株には GM3 の発現は観察されなかった。糖脂質合成の代謝阻害剤 PDMP を添加するとパクリタキセル耐性細胞を感受性に、GM3 を添加するとシスプラチン耐性細胞を感受性細胞に変化させることができた。糖脂質は細胞膜の性質を変化させ、トランスポーターとともに、抗がん剤の取り込みと排出に関与していると思われる。

(4) 卵巣癌患者と健常人血清を用いて糖ペプチドをターゲットとした新たな腫瘍マーカーを見出す。

血清から糖タンパクを抽出後にトリプシン処理・特殊カラムにて糖ペプチドを単離し、質量分析器にて分析する。健常人との比較から統計学的手法を用いて糖ペプチドマーカーを抽出する。



上図に示すように卵巣癌 (EOC) で高値を示し、内膜症 (EM)、体癌 (UC)、ME (月経中) では偽陽性を示さない CA125 の弱点を補い得るマーカーを見出した。今後の構造解析・測定キットの開発が期待される

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 24 件)

Goto Y, Mikami M (他 9 名, 11 番目) Defect of tropomyosin-related kinase B isotype expression in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Bio Science Trends*, 査読有 2014. 8(2) 93-100

Ikeda M, Mikami M (他 7 名, 9 番目) Predicting perioperative venous thromboembolism in Japanese gynecological patients. *PLoS One*. 査読有 2014. 26;9(2):e89206.

Sogabe M, Mikami M (他 13 名, 11 番目) Novel glycomarker for ovarian cancer that detects clear cell carcinoma, *Journal of Proteome Research*, 査読有 2014. 1624-1635

Mikami M, Aoki Y, Sakamoto M (他 5 名, 1 番目) Current surgical principle for uterine cervical cancer of stages Ia2, Ib1, and IIa1 in Japan: A survey of the Japanese Gynecologic Oncology Group. *International Journal of Gynecological Cancer*. 査読有 2013. 23(9):1655-60

Togo A, Izumi S, Mikami M (他 5 名, 8 番目). Isolated Tubal Torsion in Adolescence: Case Report and Review. *Journal of Gynecologic Surgery*. 査読有. 2013. 29:39-44.

Hirasawa T, Ikeda M, Mikami M (他 7 名, 10 番目) Alterations of Hypoxia-Induced Factor Signaling Pathway Due to Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Suppression in Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer*. 査読有. 2013. 23:1210-1218.

Iwamori M, Iwamori Y (他 2 名, 1 番目) Changes in bacterial glycolipids as an index of intestinal lactobacilli and epithelial glycolipids in the digestive tracts of mice after administration of penicillin and streptomycin. *Glycoconjugate Journal*. 査読有. 2013. 30(9):889-97

Kuwata S, Ohkubo K, Iwamori M (他 6 名, 8 番目) Extracellular lipid metabolism influences the survival of ovarian cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 査読有. 2013. 439:280-284.

Miyazaki C, Saitoh M, Iwamori M (他 6 名, 8 番目) Altered phospholipid molecular species and glycolipid composition in brain, liver and fibroblasts of Zellweger syndrome. *Neuroscience Letters*. 査読

有.2013.552:71-75.

Yoshihara K, Tsunoda T, Mikami M(他 27 名,24 番目) High-Risk Ovarian Cancer Based on 126-Gene Expression Signature Is Uniquely Characterized by Downregulation of Antigen Presentation Pathway.. Clinical Cancer Research.査読有.2012. 18:1374-1385.

Sugiyama T, Ikeda M, Mikami M, Iwamori M(他 6 名,3 番目) Enhanced Expression of Sulfatide, a Sulfated Glycolipid, in Well-Differentiated Endometrial Adenocarcinoma..International Journal of Gynecological Cancer.査読有.2012. 22:1192-1197

Tanaka K, Mikami M, Iwamori M(他 4 名,5 番目) Possible involvement of glycolipids in anticancer drug resistance of human ovarian serous carcinoma-derived cells. Journal of Biochemistry.査読有.2012.152:587-594.

Nishijima Y, Toyoda M, Mikami M(他 7 名,10 番目) Glycan profiling of endometrial cancers using lectin microarray. Genes to Cells.査読有.2012. 17:826-836.

Toita T, Kitagawa R, Mikami M(他 6 名,8 番目) Phase II study of concurrent chemoradiotherapy with high-dose-rate intracavitary brachytherapy in patients with locally advanced uterine cervical cancer: Efficacy and toxicity of a low cumulative radiation dose schedule. Gynecologic Oncology.査読有.2012. 126:211-216.

Tsukada H, Ikeda M, Mikami M(他 8 名,11 番目) Long Term Prognostic Implications of Expression of Glucose Transporter-1 and Hexokinase in Patients with Stage Uterine Leiomyosarcoma. 査読有.2012.45:147-154.

Iwamori M, Nakasa M, Yamazaki K(他 5 名,1 番目) Bacterial species-characteristic profiles of molecular species, and the antigenicity of phospholipids and glycolipids in symbiotic Lactobacillus, Staphylococcus and Streptococcus species. Glycoconjugate Journal.査読有.2012. 29:199-209.

Liu D, Liu J, Iwamori M(他 6 名,9 番目) Lewis y Regulate Cell Cycle Related Factors in Ovarian Carcinoma Cell RMG-I in Vitro via ERK and Akt Signaling Pathways. International Journal of Molecular Sciences.査読有.2012. 13:828-839.

Li FF, Liu JJ, Iwamori M(他 7 名,10 番目) Lewis Y regulates signaling molecules of the transforming growth factor pathway in ovarian carcinoma-derived RMG-I cells. International Journal of Oncology.査読

有.2012. 40:1196-1202.

Wang ST, Liu JJ, Iwamori M(他 7 名,10 番目) Expression and correlation of Lewis y antigen and TGF- 1 in ovarian epithelial carcinoma. Oncology Reports.査読有.2012. 27:1065-1071.

. Harasawa M, Yasuda M, Mikami M(他 9 名,12 番目) Analysis of mTOR Inhibition-Involved Pathway in Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma. Acta Histochemica et Cytochemica.査読有.2011. 44:113-118.

②Iwamori M, Sakai A, Minamoto N(他 5 名,1 番目) Characterization of novel glycolipid antigens with an -galactose epitope in lactobacilli detected with rabbit anti-Lactobacillus antisera and occurrence of antibodies against them in human sera. Journal of Biochemistry.査読有.2011. 150:515-523.

②Zhang F, Liu J, Iwamori M(他 6 名,9 番目) Increase in Docetaxel-Resistance of Ovarian Carcinoma-Derived RMG-1 Cells with Enhanced Expression of Lewis Y Antigen. International Journal of Molecular Sciences.査読有.2011. 12:7323-7334.

③Liu D, Liu J, Iwamori M(他 5 名,8 番目) The Stimulation of IGF-1R Expression by Lewis(y) Antigen Provides a Powerful Development Mechanism of Epithelial Ovarian Carcinoma. International Journal of Molecular Sciences.査読有.2011. 12:6781-6795.

④Wang Y, Liu J, Iwamori M(他 6 名,9 番目) Study on the Expression and Clinical Significances of Lewis y Antigen and Integrin v, 3 in Epithelial Ovarian Tumors. International Journal of Molecular Sciences.査読有.2011. 12:3409-3421.

〔学会発表〕(計 14 件)

田中京子、Change in the phenotype of human endometrial carcinoma cells by transfection with glycolipid sulfotransferase gene、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日-5 日 パシフィコ横浜

後藤優美子、Unique expression profile of tropomyosin-related kinase B variants in ovarian clear cell adenocarcinoma、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日-5 日 パシフィコ横浜

宮澤昌樹、Enhanced Expression of Sulfatide, a Sulfated Glycolipid, In Uterine Cervical Adenocarcinomas、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日-5 日 パシフィコ横浜

曾我部万紀、Novel glyco-biomarker for

epithelial ovarian cancer sensitive to clear cell adenocarcinoma、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日-21日、ロイトン札幌

宮澤昌樹、An orthotopic uterine cervical cancer model in rats to determine the role of glycolipids fore lymph node metastasis 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日-21日、ロイトン札幌

田中京子、Possible involvement of glycolipids in anticancer drug resistance of human ovarian serous carcinoma-derived cells、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日-21日、ロイトン札幌

宮澤昌樹、Overexpression of Sulfatide in Uterine cervical adenocarcinomas、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日-5日、名古屋国際会議場

田中京子、ヒト漿液性卵巣癌由来細胞における抗がん剤耐性糖脂質の変化、第63回日本産科婦人科学会学術講演会、2011年8月29日-31日、大阪国際会議場

西島義博、レクチンアレイを用いた子宮内膜・子宮体癌(高分化型・低分化型)に発現する糖蛋白質鎖の検索、第63回日本産科婦人科学会学術講演会、2011年8月29日-31日、大阪国際会議場

Mikami, Predicting Paraaortic Node (PAN) Recurrence of Cervical Cancer After Radical Hysterectomy (RH) : Indications for Treatment of Pan After RH 14th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS) 2012.10.13-10.16 Canada

Y.Goto, Analysis on The Expression of Bdnf and its Receptor TRKB in Ovarian Cancers 14th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS) 2012. 10.13-10.16 Canada

Yoshihiro Nishijima, Detection of sugar chains of glycoproteins expressed by normal endometrium and uterine endometrial cancer with the lectin arrays、2nd Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology、2011. 11.3-11.5 Seoul

M.Mikami, Surgical Indication of Para-Aortic Lymph Node Dissection in Addition to Radical Hysterectomy The 17th International Meeting of The European Society of Gynaecological Oncology (ESGO) 2011.11-9.14 Italy

M.Ikeda, Complete Resection of The Cardinal Ligament and Parametrial Tissue at Pelvic Side-Wall in Uterine Cervical Cancer with High risk of Recurrence 2011.9.11-9.14 Italy

〔図書〕(計4件)

三上幹男、他、メジカルビュー社出版、OGS

NOW No.6、2011、70-81

三上幹男、株式会社ヴァン メディカル、オンコロジストはこう治療している 婦人科がん診療と化学療法 全面改訂第2版 2012

三上幹男、他、メジカルビュー社出版、OGS NOW No.14、2013、134-145

三上幹男、他、メジカルビュー社出版、OGS NOW No.16 2013、18-25

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 卵巣癌マーカー及び卵巣癌検出方法
発明者: 三上幹男、田辺和弘、宮崎祐子、小島望

権利者: 東海大学、三菱化学

種類: 特許

番号: 2013271047

出願年月日: 2013年12月27日

国内外の別: 日本国

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-tokai.ac.jp/daigakuin/pdf/mikami.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上 幹男 (MIKAMI MIKIO)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 30190606

(2) 研究分担者

岩森 正男 (IWAMORI MASAO)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号: 90110022

(3) 連携研究者

梅澤 明弘 (IWAMORI MASAO)

国立成育医療センター研究所・研究部・部長

研究者番号: 70213486

宮澤 昌樹 (MIYAZAWA MASAKI)

東海大学・医学部・研究員

研究者番号: 30624572

田辺 和弘 (TANABE KAZUHIRO)

(株)三菱化学科学技術研究センター
・バイオ技術研究所

後藤 優美子 (GOTO YUMIKO)

東海大学・医学部・助教

研究者番号: 50624574

杉山 太郎 (SUGIYAMA TARO)

東海大学・医学部・助教

研究者番号: 90439696

池田 仁恵 (IKEDA MASAE)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：20365993

信田 政子 (SHIDA MASAKO)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：10338717

平澤 猛 (HIRASAWA TAKESHI)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：70307289

村松 俊成 (MURAMATSU TOSHINARI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：90266437