

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462610

研究課題名(和文) 卵巣癌細胞の抗がん剤耐性における糖脂質の役割の解明

研究課題名(英文) Investigation of the role of glycolipids in anticancer drug resistance of ovarian carcinoma derived cells

研究代表者

田中 京子 (tanaka, kyoko)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10286536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜癌と卵巣癌における糖脂質発現を検討した。子宮内膜癌ではスルファチドが低分化型腺癌には発現せず、高分化型腺癌に発現していた。卵巣癌においては粘液性癌に発現していて、その濃度は高分化型内膜癌の5倍以上の高濃度であった。硫酸化糖脂質を含まないSNG-II細胞に硫酸基転移酵素遺伝子導入した検討では抗がん剤に対して耐性を示すようになり、スルファチドは抗がん剤感受性・耐性の指標になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We determine the glycolipid expressions in endometrial carcinoma and ovarian carcinoma tissues. Sulfatide did not expressed in endometrial carcinoma in poorly differentiated type, but it expressed in well-differentiated type. Ovarian mucinous adenocarcinoma tissues preferentially contained sulfatide which was more than 5 times of high concentration of well-differentiated endometrial carcinoma. Sulfotransferase gene was transfected in SNG-II cells, which did not contain sulfated glycolipid. The transfected cells revealed more resistant properties toward anticancer drugs than SNG-II cells. It indicated that Sulfatide is concerned with sensitivity or resistance in an anticancer drugs.

研究分野：産婦人科

キーワード：硫酸化糖脂質 子宮内膜癌 高分化・低分化型 粘液性卵巣癌 抗がん剤感受性 抗がん剤耐性 遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

ヒト子宮内膜はステロイドホルモン刺激下、増殖と分化を周期的に繰り返している。内膜は卵巣ホルモンエストロゲン刺激下で活発に増殖する増殖期と黄体ホルモンプログステロン刺激により増殖停止と分化が誘導される分泌期に分類される。子宮内膜癌の多くはエストロゲンによって発癌するとともに活発な増殖が維持されている。癌組織の病的分類では、高分化型、中等度分化型、低分化型の3型に区別され、臨床的には高分化型は抗がん剤感受性、低転移性であり、低分化型は抗がん剤耐性、高転移性の性質を示し、低分化型癌の方が悪性度が高いとされている。癌組織の高分化型と低分化型、およびそれぞれの型の癌組織から樹立された培養細胞株を用い、糖脂質組織を解析すると、高分化型癌は硫酸化糖脂質を含むという特徴を持っていることを明らかにした。正常内膜においては、硫酸化糖脂質はプロゲステロン刺激下の分泌期に選択的に発現し、分泌期特異的な腺構造の形成と相関していることから、内膜癌においても腺構造を形成する高分化型形質と関係していると予想した。糖脂質組成の顕著な違いは転移性や抗がん剤感受性などの癌細胞の性質にも関わっていると予想される。また、組織型の異なる卵巣癌各種、粘液性、漿液性、類内膜、明細胞癌についても糖脂質組成は異なっており、その違いが癌細胞の性質とどのように関わっているのかに興味をもたれる。糖脂質は腫瘍マーカーとして癌の診断のみならず、転移性や予後の判断にも利用されていることから、糖脂質を指標に、癌診断治療の改善を図ることが求められている。

2. 研究の目的

(1) 組織型の異なる卵巣癌の糖脂質: 粘液性、漿液性、類内膜、明細胞卵巣癌の組織および培養細胞について、糖脂質組織を体系的に分析する。主として、TLC、TLC免疫染色を用い解析を進め、未知構造については精製後、FABMS、NMR等の機器分析を行って構造を明らかにする。

(2) 漿液性卵巣癌 KF28 の抗がん剤耐性細胞の糖脂質: 漿液性卵巣癌は卵巣癌で最も患者数が多く、抗がん剤治療が第一選択として行われているが、治療効果は約3割の患者に限られている。また、当初感受性であった患者の耐性化も大きな問題である。治療に汎用される抗がん剤パクリタキセルとシスプラチンを KF28 培養培地に添加することで耐性化した細胞について上記(1)のように分析を行う。

(3) 抗がん剤耐性卵巣癌細胞の遺伝子発現: パクリタキセル耐性化に関わっている MDR1、MRP2 などの ABC トランスポーター遺伝子と糖転移酵素遺伝子の発現を RT-PCR 法で解析する。ハウスキーピング遺伝子である GAPDH の遺伝子発現を基準とし、KF28、

パクリタキセル耐性 KF28TX、シスプラチン耐性 KFr13、パクリタキセル、シスプラチン耐性 KFr13TX について分析し、各抗がん剤耐性とトランスポーターおよび糖転移酵素遺伝子の関係を明らかにする。

(4) 抗がん剤耐性化した細胞を感受性化する試み: 抗がん剤排出トランスポータータンパク質は糖脂質、コレステロール、スフィンゴミエリンから成るラフトに分布し、その活性は糖脂質によって調節されていると考えられている。すでに予備実験によって、パクリタキセル耐性 KF28TX 細胞では LacCer、Gb₃Cer の濃度が感受性細胞の 20 倍以上になっていることを明らかにしていることから、これら糖脂質合成の最初のステップであるセラミドグルコース転移酵素の阻害剤 PDMP を培地に添加する。PDMP による糖脂質の低下率を測定した後、パクリタキセルに対する LC₅₀ を求める。同様に、シスプラチン耐性となる細胞では酸性糖脂質 GM3 が欠損していることから、耐性細胞の培地に GM3 を添加し、GM3 の取り込み量を抗 GM3 抗体を用いて測定した後、シスプラチンに対する LC₅₀ を求める。

(5) スルファチドと高分化形質: 正常子宮内膜分泌期の腺構造形成時、および高分化型子宮内膜癌をヌードマウス皮下移植した時のいずれにおいてもスルファチドの発現が見られる。このことは、腺構造形成を判断基準とする高分化形質とスルファチドの発現が密接に関わっていることを示している。高分化型子宮内膜癌細胞 HE108 より糖脂質硫酸基転移酵素(GST)遺伝子をクローニングし、発現ベクターに組み込み低分化型内膜癌細胞 SNG-2 に導入する。遺伝子導入細胞 SNG-2-GST と元の細胞の糖脂質組成を比較する。

3. 研究の方法

(1) 組織および細胞の糖脂質分析: 組織および細胞を凍結乾燥後、全脂質成分をクロロホルム(C)メタノール(M)混合溶媒を用いて抽出した。0.01-0.02 mg 乾燥重量相当の脂質抽出液と 0.5-1.2 μg コレステロールを TLC にスポットし、ヘキサン-エーテル-酢酸展開溶媒を用いて展開し、酢酸銅-リン酸試薬で発色した。コレステロールの発色スポットの濃度を測定し、標準コレステロールの検量線を用いて各組織、各細胞のコレステロール量を求めた。コレステロールは脂質二分子膜の基本構成成分であり、糖脂質組成を比較するための基本数値である。次に、0.5-1.0 mg 乾燥重量相当の脂質抽出液と 0.5-1.2 μg 標準糖脂質を TLC にスポットし、C/M/水(W), 65:35:8 (v/v), C/M/0.5% CaCl₂-W, 55/45/10 (v/v)で展開後、オルシノール硫酸試薬で発色した。同様に、各スポットの R_f 値を比較し、糖脂質の同定を行った後、スポット濃度を測定した。また、プラスチック TLC プレートにスポット後、展開し、プレートを乾燥後、1%ポリビニルピロ

リドン(PVP)1%卵白アルブミン-生理食塩水(PBS)溶液でブロック、3%PVP/PBSで希釈したモノクローナル抗糖脂質抗体(1:500)およびパーオキシダーゼ標識抗マウス IgGAM 抗体(1:1000)を作用させた。TLC上の糖脂質に結合したパーオキシダーゼ活性を4クロロ1ナフトール過酸化水素で発色し、スポット濃度を測定して糖脂質濃度を求めた。TLC免疫染色法による各糖脂質の検量線は5-200 ngであった。

(2) 糖脂質の構造:脂質抽出液は陰イオン交換(DEAE-Sephadex)カラムにより中性と酸性脂質に分離後、シリカゲル(Iatrobeds)カラムのグラジエント溶出C/M/W₁ 7:-30:5(v/v)から40:6:-10(v/v)を行った。中性脂質画分からは1糖から5糖糖脂質、酸性脂質画分からは硫酸化糖脂質およびガングリオシドを分離した。精製糖脂質は陰イオン高速中性粒子イオン化質量分析(FABMS)を行い、分子イオンおよびフラグメントイオンから糖鎖構造と疎水性鎖の分子種を解析した。

(3) RT-PCR:癌組織と培養細胞にIsogenを加えてホモゲナイズし、クロロホルム添加後遠心して上層を集めた。上層にイソプロパノールを加え、RNAを沈殿させ、さらに70%エタノールでリンスして全RNAを得た。続いて逆転写酵素でcDNAを作製し、PCR法により遺伝子発現を調べた。グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素GAPDHを基準遺伝子として、糖転移酵素、トランスポーター、エストロゲン受容体の遺伝子発現を調べた。

(4) 抗がん剤感受性:培養細胞のパクリタキセル、シスプラチン感受性を調べるために、96穴マイクロタイタープレートに 1×10^4 個/穴の細胞を入れ、抗がん剤を0-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で作用させ、MTT試薬を加えて生細胞数を測定した。相対生存率曲線を基にLC50を求めた。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌組織および細胞の糖脂質:各種卵巣癌、粘液性、漿液性、類内膜、明細胞について糖脂質組成を比較したところ、顕著な特徴は硫酸化糖脂質の発現量に見られた。RT-PCR法により糖脂質硫酸基転移酵素遺伝子の発現を調べると、すべての種類の卵巣癌に遺伝子は検出できた。粘液性卵巣癌には例外なくスルファチド I^3SO_3 -Galcerが含まれており、その濃度は1 mg乾燥重量当り0.61-1.13 μg と高濃度であった。他の種類の卵巣癌においては、約60%の発現率であった。含有量も粘液性卵巣癌の10分の1以下であった。明細胞と類内膜卵巣癌では約30%に I^3SO_3 -LacCerが含まれており、セラミドガラクトース転移酵素を持たない場合、LacCerが基質として用いられていることを示していた。ガングリオシドの90%はGM3が占めており、卵巣癌の種類によらず、0.4-1.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 乾燥重量であった。中性糖脂質については、ヒト組織の特徴としてグロブ系列の糖脂質

が全例に発現しているが、GlcCer、LacCer、Gb₃Cer、Gb₄Cer各成分の相対濃度比は異なっていた。卵巣癌の種類と相対濃度には相関関係は見られなかった。一方、GalCerとGlcCerの比をGC-MSで調べると、粘液性卵巣癌のGalCerはGlcCerの100倍以上の濃度で含まれていて、LacCerの1.5倍に達していたが、その他の癌ではGlcCerの方が多い傾向にあり粘液性卵巣癌でスルファチドが多い理由はGalCerの合成が亢進しているためであった。また、ルイス血液型抗原は培養細胞として株化後も組織における表現形質が維持されていることが分かった。

(2) 子宮内膜癌組織および細胞の糖脂質:子宮内膜癌組織の糖脂質は卵巣癌組織と類似していた。高分化型と低分化型内膜癌について比較すると、スルファチド I^3SO_3 -GalCerは高分化型にのみ含まれていて、その濃度は0.07-0.34 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 乾燥重量であった。糖脂質硫酸基転移酵素遺伝子は高分化型にのみ発現していてスルファチドの発現と一致していた。一方、ルイス血液型はすべての癌組織に発現しており、高分化型と低分化型間の優位差は認められなかった。子宮内膜癌由来細胞の基本成分も卵巣癌由来培養細胞と類似であり、高分化型癌特徴的に硫酸化糖脂質 I^3SO_3 -LacCerの発現が見られた。

(3) 抗がん剤耐性卵巣癌細胞:パクリタキセル耐性KF28TX、KFr13TXでは疎水性抗がん剤排出ABCトランスポーターMDR1が発現し、糖脂質LacCer、Gb₃Cer、GM3の濃度が感受性細胞の5倍以上になっていた。RT-PCRではMDR1、LacCer α ガラクトース転移酵素、シアル酸転移酵素SAT-1の遺伝子発現が亢進していて、表現形質の高発現と一致していた。従って、パクリタキセル耐性化にはラフト構造に分布する糖脂質とトランスポーターによる抗がん剤排出促進が関わっていた。一方、シスプラチン耐性細胞KFr13、KFr13TXにはGM3が欠損していた。同様に、RT-PCRにより、耐性細胞にはシアル酸転移酵素遺伝子が発現していないことが示された。従って、シスプラチン耐性細胞ではシアル酸の欠損により塩基性抗がん剤シスプラチンが結合できないことが耐性化の原因であった。

(4) 抗がん剤耐性細胞の感受性化:パクリタキセル耐性細胞にセラミドグルコース転移酵素阻害剤PDMPを添加し、糖脂質含有量を約5分の1に低下させると感受性になることから、糖脂質が耐性化に関わっていることが分かった。糖脂質の作用の仕組みは不明である。一方、シスプラチン耐性細胞にGM3を添加すると感受性化した。GM3が付加されることにより感受性になったと思われる。

(5) 低分化型子宮内膜癌細胞への硫酸基転移酵素の導入:硫酸基転移酵素遺伝子を導入したSNG-II-GST細胞を元のSNG-II細胞と比較すると、SNG-II-GSTにのみ I^3SO_3 -LacCerと I^3SO_3 -Gg₃Cerが含まれていた。ガングリオシド含有量も約半分に低下していたが、これ

は硫酸基とシアル酸起転移酵素が同じ基質を用いて代謝的に競合しているためである。SNG-II-GST の酸性脂質の 30%が硫酸化糖脂質であった。SNG-II-GST はドーム状構造を形成し、ヌードマウス皮下に移植すると腺構造を形成したことから高分化形質を保持していることが分かった。硫酸化糖脂質の発現は高分化形質と密接に関わっていることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Kasuga Y, Nishio H, Miyakoshi K, Sato S, Sugiyama J, Matsumoto T, Tanaka K, Ochiai D, Minegishi K, Hamatani T, Iwata T, Morisada T, Nakamura M, Fujii T, Kuji N, Aoki D, Tanaka M. Pregnancy Outcomes After Abdominal Radical Trachelectomy for Early-Stage Cervical Cancer: A 13-Year Experience in a Single Tertiary-Care Center. *Int J Gynecol Cancer*. 2016 Jan;26(1):163-8. doi: 10.1097/IGC.0000000000000571. 査読有

Iwamori M, Tanaka K, Adachi S, Aoki D, Nomura T. Absence of lactobacilli containing glycolipids with the α -galactose epitope and the enhanced fucosylation of a receptor glycolipid GA1 in the digestive tracts of immune-deficient scid mice. *J Biochem*. 2015;158(1):73-82. doi: 10.1093/jb/mvv021. 査読有

Tanaka K, Mikami M, Aoki D, Kiguchi K, Ishiwata I, Iwamori M. Expression of sulfatide and sulfated lactosylceramide among histological types of human ovarian carcinomas. *Hum Cell*. 2015;28(1):37-43. doi: 10.1007/s13577-014-0100-4. 査読有

Nishio H, Fujii T, Sugiyama J, Kuji N, Tanaka M, Hamatani T, Miyakoshi K, Minegishi K, Tsuda H, Iwata T, Tanaka K, Fukuchi T, Takehara Y, Yoshimura Y, Aoki D. Reproductive and obstetric outcomes after radical abdominal trachelectomy for early-stage cervical cancer in a series of 31 pregnancies. *Hum Reprod*. 2013;28(7):1793-8. doi: 10.1093/humrep/det118. 査読有

Oikawa F, Kojima-Aikawa K, Inoue F, Suzuki A, Tanaka K, Tominaga E, Aoki D. HMMC-1, a human monoclonal antibody to fucosylated core 1 O-glycan, suppresses growth of uterine endometrial cancer cells. *Cancer Sci*. 2013 Jan;104(1):62-9. doi: 10.1111/cas.12038. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

田中京子、宮澤昌樹、三上幹男、青木大輔、木口一成、岩森正男 ヒト子宮頸癌由来細胞の GM2 糖鎖を持つガングリオシドの合成酵素遺伝子 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8~10 日 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

本田葵、田中京子、青木大輔、岩森正男 糖脂質硫酸基転移酵素遺伝子の導入によるヒト子宮内膜癌細胞の表現形質の変化 第 62 回日本生化学会近畿支部例会 2015 年 5 月 16 日 立命館大学 (滋賀県草津市)

田中京子、宮澤昌樹、三上幹男、青木大輔、木口一成、岩森正男 ヒト子宮頸癌細胞における GM2 糖鎖を持つガングリオシドの発現 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25~27 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

田中京子、石渡勇、久布白兼行、青木大輔、三上幹男、木口一成、岩森正男 糖脂質硫酸基転移酵素遺伝子の導入によるヒト子宮内膜癌細胞の形質変化 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3~5 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 京子 (TANAKA, Kyoko)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10286536

(2) 研究分担者

岩森 正男 (IWAMORI, Masao)

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号：90110022