

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460417

研究課題名(和文) 前立腺癌の神経周囲浸潤におけるジストログリカン糖鎖の発現意義

研究課題名(英文) Significance of glycosylation of alpha-dystroglycan in perineural invasion of prostate cancer

研究代表者

下条 久志 (SHIMOJO, HISASHI)

信州大学・学術研究院医学系・講師

研究者番号：40324248

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)：本研究では、 α -ジストログリカン(α -DG)の機能に重要なコア蛋白の糖鎖修飾(DG糖鎖)に着目し、ヒト前立腺癌の神経周囲浸潤(PNI)におけるDG糖鎖の変化とその意義を検討した。結果、PNIにおけるDG糖鎖発現は、1)半数以上の症例で背景の癌組織とは異なり、発現増加と減少の両者が含まれる、2)背景の癌組織とは異なり、癌組織の増殖パターン(Gleason pattern)とは相関しない、3)より浸潤性の増殖パターン(Gleason pattern 4)に限っては、背景の癌組織のDG糖鎖発現と相関を認めるが、Gleason pattern 3以下では相関がないことを示した。

研究成果の概要(英文)：We examined the significance of α -dystroglycan (α -DG) glycosylation in perineural invasion (PNI) of human prostate carcinoma. In PNI region, we found that the expression level of α -DG glycosylation in carcinoma cells was different from that of non-PNI area. Although, either reduced or increased expression was observed in more than half of the cases, these changes were not associated with particular histological pattern of carcinoma, as assessed by Gleason grading. In addition, we also found that expression level of α -DG glycosylation in PNI correlated with that of non-PNI area only in higher Gleason grade group (\geq Gleason pattern 4).

研究分野：病理学

キーワード：前立腺癌 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

ジストログリカン (DG) は細胞外基質蛋白の受容体で、 α (細胞外; α -DG) と β (膜貫通部; β -DG) の2つのサブユニットからなり、 α -DG は高度な糖鎖修飾を持つ。 α -DG はラミニンなどの細胞外基質と結合し、 β -DG は細胞内蛋白と結合する。その結果 DG は細胞外基質と細胞骨格を結合し、シグナル伝達の制御にも関わっている。

癌においては、細胞—細胞外基質の相互作用は腫瘍の発生と進展に関する重要な因子であり、乳癌や前立腺癌、大腸癌では DG の発現低下や構造変化が報告されている。本研究の研究分担者の小林らは、前立腺癌の腫瘍形成能・浸潤能・転移能は、 α -DG コア蛋白上に提示される糖鎖 (DG 糖鎖) により抑制されることを実験的に証明し、この糖鎖発現には糖転移酵素 LARGE と β 3GlcNAcT-1 との複合体形成が必須であることを明らかにし報告している。これは *in vitro* および *in vivo* (マウス) のレベルで、 α -DG 全体の機能における DG 糖鎖の重要性を示したものである。さらに、我々はヒト前立腺癌組織において、1) 癌では α -DG コア蛋白と DG 糖鎖の両者とも減少するが、コア蛋白の減少と比較して糖鎖の減少がより高度である、2) DG 糖鎖の減少は Gleason パターンと逆相関し、より浸潤性の増殖パターンを示す腫瘍ほど DG 糖鎖の減少程度が大きいことを報告した。これらは、ヒトにおいても糖鎖修飾が α -DG の機能に対して重要であることを示している。一方、前立腺癌は神経周囲浸潤 (PNI) がよくみられ、これは癌の前立外進展経路として重要と考えられる。PNI 部分の癌細胞は非 PNI 部分の癌細胞と比較して、増殖能の増加やアポトーシスの減少、増殖因子受容体の発現増加などを示すことが報告されているが、PNI と DG 糖鎖の関連は明らかではない。

2. 研究の目的

前立腺癌で知られている α -DG 発現の減少には、 α -DG コア蛋白と DG 糖鎖の両者が含まれ、DG 糖鎖の減少程度は腫瘍の悪性度や浸潤様式と関連する。一方、前立腺癌における神経周囲浸潤 (PNI) は癌進展の危険因子として重要で、PNI 部分の癌細胞は背景の癌細胞とは性質が異なることが報告されている。そこで、背景の癌組織の DG 糖鎖発現に加えて、糖鎖発現からみた PNI の癌細胞の特徴を捉えることが、予後予測や治療法選択において有用な手段になると考えた。今回は前立腺癌の PNI における癌細胞の DG 糖鎖発現の特徴を調べ、その意義について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

前立腺癌の PNI における DG 糖鎖発現の程度が、癌の組織型や浸潤能・進展度・予後等と関連するとの仮説を検証するため、以下の項目について解析を行う。

1) 前立腺癌組織の PNI における α -DG および DG 糖鎖発現の解析：前立腺癌の生検 / 手術検体のパラフィン切片を用い、DG 糖鎖と α -DG コア蛋白の免疫染色を行い、PNI 部分と非 PNI 部分における発現を調べ、組織型 (Gleason パターンに基づいて分類) との関連を検討する。

2) DG 糖鎖発現に関わる制御因子、糖転移酵素の発現と分布の解析： α -DG コア蛋白への糖鎖付加に関連する糖転移酵素 LARGE の発現を免疫染色、RT-PCR 法で検索し、さらに、*in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法により発現の局在を調べ、PNI 部分と非 PNI 部分 (癌組織) で比較し、PNI における α -DG 糖鎖発現制御の特徴を検討する。また、DG 糖鎖発現制御に関わる因子である Fer チロシンキナーゼの免疫染色による検索を行う。

3) in vitro 神経周囲浸潤モデルを用いた前立腺癌細胞の α -DG 糖鎖発現と神経周囲浸潤能の解析：マウス後根神経節と前立腺癌細胞との共培養により、神経周囲での癌細胞増殖の特徴を調べる。DG 糖鎖の発現を siRNA により低下させ、神経周囲での増殖能の変化を in vitro で検討する。

4. 研究成果

1) 前立腺癌組織の PNI における α -DG および DG 糖鎖発現：種々の Gleason パターンを含むヒト前立腺癌組織のホルマリン固定パラフィン切片を用いて免疫組織化学的検討を行った。対象症例は生検および手術材料 209 例で、このうち約 25%に PNI が認められた。PNI 部分の癌組織では DG 糖鎖発現が背景の癌組織と異なる症例が約 45%存在していた（発現増加 21.9%、減少 21.9%）(図 1)。

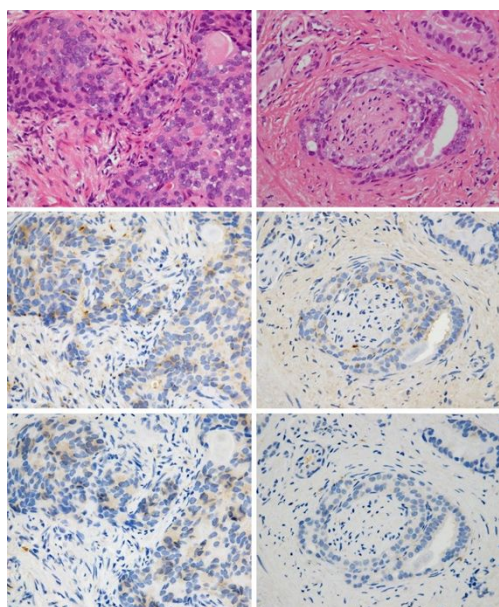


図 1. ヒト前立腺癌における DG 糖鎖発現の変化：左、非 PNI 部；右、PNI 部 .上段 HE 染色，中段 α -DG コア蛋白，下段 DG 糖鎖

一方、 α -DG コア蛋白については、6.9%で増加、40.6%で減少を認めており、 α -DG コア蛋白が不変または減少を示すにもかかわらず糖鎖発現が増加したものが存在した。糖鎖発現からみた場合、PNI の癌細胞には背景の癌

組織と異なる性質のものが含まれることが示唆された。なお、免疫染色においては、手術検体の標本を用いた場合には、生検検体に比較して癌組織内の部位により DG 糖鎖発現の程度に強弱がみられ、PNI 部分においても病巣の大きさや症例による染色性の違いが目立ち、評価が困難な場合がみられた。次に、PNI での DG 糖鎖発現について、癌組織の増殖パターン (Gleason pattern) や背景の癌組織での DG 糖鎖発現の程度との関連について解析した。PNI の DG 糖鎖の増減は、症例全体では癌組織の増殖パターンとは相関がみられなかった。また、より浸潤性の増殖パターン (Gleason pattern 4) のグループにおいては、PNI の DG 糖鎖発現の変化は背景の癌組織の変化と相関が認められたが、Gleason pattern 3 の癌ではこれを認めなかった (表 1)。

表 1. PNI と背景癌組織での DG 糖鎖発現の関連

Gleason pattern/score	相関係数 r =
Gleason pattern 4 and 5	0.43
Gleason pattern 3	0.09
Gleason score $\geq (4+3=7)$	0.42
Gleason score $\leq (3+4=7)$	0.17

2) DG 糖鎖発現に関わる制御因子、糖転移酵素の発現と分布の解析：上で用いたヒト前立腺癌組織に対し、DG 発現の制御因子として報告されている Fer チロシンキナーゼについて免疫染色で検討したところ、現在までに報告された所見とは異なる結果であった。培養細胞系と組織標本の抗原状態の相違を含め複数の因子の関連が考えられたが、原因の絞り込みが困難なためさらなる検討は行わなかった。糖転移酵素に関しては、RT-PCR 法および ISH 法による我々の以前の検討にて、癌部では 3GlcNAcT-1 の減少が示唆されていたが、PNI 部分は面積が小さく、比較は困難と判断した。

3) *in vitro* 神経周囲浸潤モデルを用いた前立腺癌細胞の -DG 糖鎖発現と神経周囲浸潤能の解析: DG 糖鎖発現をヒト前立腺癌の培養細胞で免疫染色を用いて確認した後、糖鎖発現と浸潤能の関連について調べるため、DG 糖鎖を減少させる細胞の作製を行った。当初の計画通り DG 糖鎖発現の減少に siRNA を用いた場合、観察期間内に DG 糖鎖発現低下を維持できない可能性が考えられたため、Crispr/Cas9 システムを用いた遺伝子編集による糖転移酵素 LARGE のノックアウトを試みたが、これについては研究期間中に目的の細胞を得るに至らなかった。

以上、今回の研究では、前立腺癌における DG 糖鎖発現の変化は腫瘍内の部位によって異なることが示され、PNI の癌細胞に一定の傾向は見いだせなかった。前立腺癌ではこれまでに DG 糖鎖の減少程度と癌の悪性度や浸潤形態との関連が報告されているが、糖鎖発現は未だ一定の悪性度指標として利用されるに至っていない。これには前立腺癌の不均一性が一因となっている可能性があり、今回の結果もこれを支持するものと考えた。DG 糖鎖発現が客観的な悪性度指標となり得るかについては、癌組織局所の微小環境との関連も含めたさらなる研究が必要と考えられる。

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〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

下条 久志 (SHIMOJO HISASHI)

信州大学・学術研究院医学系・講師

研究者番号: 40324248

(2)研究分担者

小林 基弘 (KOBAYASHI MOTOHIRO)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号: 00362137

(4)研究協力者

中山 淳 (NAKAYAMA JUN)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号: 10221459