

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861323

研究課題名(和文)糖転移酵素C2GnTによる絨毛細胞の浸潤機序の解明と治療への応用

研究課題名(英文)Mechanism analysis of C2GnT in trophoblasts invasion

研究代表者

新美 薫(Niimi, Kaoru)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20571334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖転移酵素C2GnTは、絨毛癌細胞株、絨毛癌及び侵入奇胎組織では強発現していたが、胞状奇胎では低発現であった。次に、絨毛癌細胞を用いてsiRNAを遺伝子導入することによりC2GnTの発現を抑制して実験を行った。C2GnT発現抑制により、遊走能及び浸潤能が抑制された。さらにC2GnTの発現抑制により、細胞外基質であるfibronectin, Collagen I, Collagen IVへの接着も抑制された。また、血管内皮細胞HUVECへの接着も抑制された。糖転移酵素C2GnTの機能の究明は、絨毛細胞悪性化メカニズムの解明につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemistry revealed that C2GnT was highly expressed in trophoblasts of choriocarcinoma but not in hydatidiform mole. Expression level of C2GnT protein in siRNA transfectants were significantly reduced compared to WT and controls at 24 hours after transfection. MTS assay showed no effect on cell proliferation in Jar for 72 hours after C2GnT siRNA transfection. Suppression of C2GnT expression reduced migration and invasive abilities significantly. The rate of cell attachment to fibronectin, collagen type I, and collagen type IV were decreased by C2GnT knockdown. These findings suggest that C2GnT may be involved in regulating malignant potential of trophoblasts by intracellular expression.

研究分野：婦人科腫瘍 絨毛性疾患

キーワード：絨毛性腫瘍 絨毛癌 hCG 糖転移酵素 C2GnT

1. 研究開始当初の背景

絨毛癌はあらゆる妊娠後に発症しうる悪性腫瘍で、患者は20歳～40歳の比較的若い成人女性が多い。肺、肝臓、脳などへの遠隔転移を来しやすく、発見時に多発遠隔転移を伴う場合の予後は不良である。胞状奇胎患者のフォロー、hCG値測定及び化学療法の進歩により、絨毛癌患者の発症率及び予後は改善したが、現在でも治癒率は約85%で、治療に難渋して死亡する例も経験している。現在はhCGが唯一のマーカーであるが、hCGは正常妊娠や流産でも検出されるため、授乳中や月経不順である女性の場合は診断が遅れることも多い。早期発見により100%の寛解が望める疾患であるため絨毛癌に特異的な腫瘍マーカーの開発が必要である。また、化学療法や手術療法でも治療困難な絨毛癌は浸潤転移能が高く、そのメカニズムに関与する分子を抑制することで治療成績の向上が期待できる。

絨毛細胞から発生する絨毛性疾患は、胞状奇胎から侵入奇胎を経て絨毛癌へと悪性化すると考えられる。正常妊娠後からも絨毛癌は発症するが、発症率は胞状奇胎後からの発症が明らかに高い。全ての絨毛性疾患及び正常胎盤はhCGを分泌するが、悪性化すると正常胎盤や胞状奇胎では認めない異常糖鎖付加hCG(hyperglycosylated hCG:H-hCG)が血中で検出される。生体内で生合成された蛋白質は、細胞内で修飾及びプロセッシングを受けて初めて機能を発揮するため、生命現象を分子レベルで理解するには、ゲノム研究だけでは不十分である。細胞内修飾で最も多いのは、糖転移酵素による糖鎖修飾である。悪性化のメカニズムの解明や新しい診断方法に、H-hCGの原因となる糖転移酵素の機能解明は重要と考えられる。

H-hCGには、アスパラギン結合型(N型)とセリン結合型(O型)がある。N型H-hCGを生成する糖転移酵素GnT-IVaは、絨毛細胞においてintegrin 1の糖鎖修飾を介して浸潤・転移を促進することを我々は明らかにした(Niimi, K, et al. *Br J Cancer*, 2012)。一方、O型H-hCGは米国の研究者らが絨毛癌の活動性の指標になることや絨毛細胞の浸潤に関与することを報告しているが、O型H-hCGを生成する糖転移酵素Core2-1,6-Nアセチルグルコサミン転移酵素(C2GnT)についての絨毛細胞における機能は解明されていない。C2GnTに関して、大腸癌、前立腺癌などの他の癌腫においてその予後や浸潤・転移能と関連する報告がある。そのメカニズムとしてC2GnTが付加するコア2構造にさらに糖鎖が付加されたPolylactosamine鎖が、癌細胞とNK細胞の相互作用を抑制し、転移能を増強させることなどが証明されている。絨毛癌細胞におけるC2GnTの役割を調べることで、絨毛細胞癌化及び浸潤転移のメカニズムを解

明が期待される。

2. 研究の目的

異常糖鎖修飾されたH-hCGについてはすでに絨毛細胞の浸潤や絨毛癌の悪性度と関連があることが報告されている。我々はそのH-hCGの異常糖鎖修飾の原因となる糖転移酵素Core2-1,6-Nアセチルグルコサミン転移酵素(C2GnT)に着目した。C2GnTが絨毛性腫瘍においてどのように発現し、存在しているのかを確認し、絨毛細胞の機能にどのような影響を与えているのかを分子レベルで明らかにすることを目的とした。この研究が、絨毛細胞の悪性化メカニズムの解明に役立つと考える。

3. 研究の方法

(1) 絨毛性疾患及び胎盤組織におけるC2GnTの発現解析

患者からのインフォームドコンセントを得て集めた絨毛性疾患(胞状奇胎、侵入奇胎、絨毛癌、PSTT)と胎盤組織を用いて、パラフィン包埋ブロックより組織切片を作成する。抗C2GnT抗体を用いて免疫組織染色を施行する。絨毛性疾患では疾患別に、胎盤組織では妊娠週数ごとに平均発現強度を比較する。また、C2GnTが付加するコア2構造にさらに糖鎖が付加されたPoly N-acetyl lactosamine鎖を認識するトマトレクチンを用いたレクチン免疫組織染色も併せて行う。

7種類の絨毛癌細胞株Jar, Bewo, JEG-3, CC1, CC3, CC4, CC6およびEVT細胞株HTR-8/SVneo、さらに上記(1)で得た絨毛性疾患組織と胎盤検体の一部から蛋白およびmRNAを抽出し、それぞれウエスタンブロットおよびRT-PCRにて発現量を評価する。また、細胞株の培養上清におけるregular hCGとセリン結合型H-hCG値を測定する。その結果をC2GnTの発現量と比較する。相関があれば、H-hCGが糖転移酵素であるC2GnTにより生成されていることを確認できる。

(2) 絨毛癌細胞株JarにおけるC2GnTの機能解析

C2GnTの機能解析を行うために発現抑制モデルが必要である。絨毛癌細胞株JarにC2GnT siRNAを導入する。これらのsiRNA導入細胞株におけるC2GnTの発現量のスクリーニングをウエスタンブロットで解析し、発現抑制の確認を行う。得られた細胞モデルの*in vitro*における増殖能及び浸潤能をルーチンの増殖アッセイ(MTT法およびBrdU uptake法)、浸潤アッセイ(トランスウエルチャンパー法、又はwound healing法)にて評価し、コントロールsiRNA導入細胞と比較する。

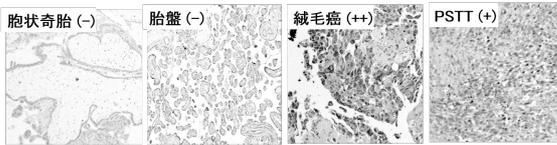
(3) 浸潤能変化におけるメカニズムの解析

C2GnT発現抑制絨毛癌細胞を用いた*in vitro*での実験結果を受けて、そのメカニズムを追求する。MMPの変化について

zymography を用いて調べる。さらに Fibronectin, Collagen I, Collagen IV 及び Laminin がコーティングされた 96 well plate を用いて接着能を評価する。ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて血管内皮への接着能の変化を検討する。C2GnT 発現抑制絨毛癌細胞とコントロール細胞の上清を用いた transwell assay により、絨毛癌細胞からの分泌タンパクの autocrine 作用に及ぼす C2GnT の影響を調べる。

4. 研究成果

(1) 絨毛性疾患 (胞状奇胎、侵入奇胎、絨毛癌、PSTT) と胎盤組織を用いて、C2GnT の免疫組織染色を施行したところ、胞状奇胎、胎盤組織では発現が弱く、絨毛癌、侵入奇胎、PSTT の絨毛性腫瘍では発現が増強していた。胎盤組織では、EVT に部分的に発現が増強し

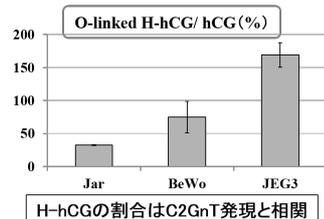
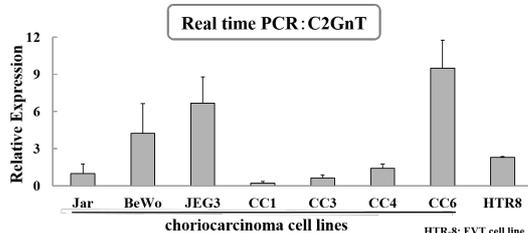


絨毛性腫瘍では C2GnT 発現が増強

ていた。

C2GnT が付加する糖鎖である Poly N-acetyl lactosamine 鎖を認識するトマトレクチン (LEL) で免疫組織染色を行ったところ、すべての絨毛性疾患及び胎盤で発現を認めた。C2GnT が付加する糖鎖は広範囲に発現しており、C2GnT の発現している細胞以外にも発現していた。LEL の認識する糖鎖は C2GnT 以外の酵素によっても付加される可能性がある。C2GnT のターゲット分子はさまざまであると考えられる。また、paracrine に C2GnT を発現していない細胞のタンパクを糖鎖修飾する可能性などが考えられた。

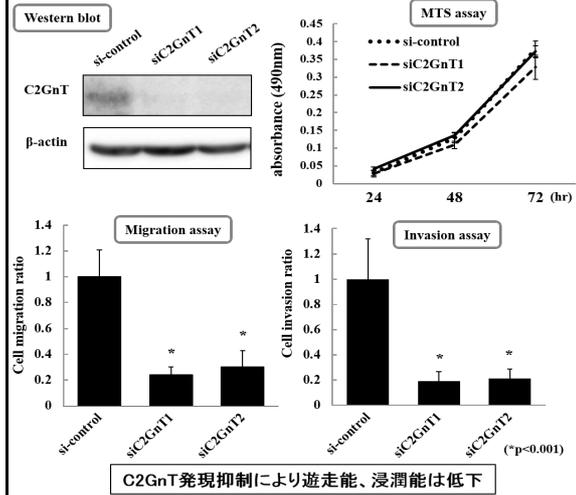
7 種類の絨毛癌細胞株と絨毛癌細胞株 HTR-8/SVneo、胞状奇胎検体、胎盤検体において、C2GnT の発現量を検討したところ、タンパクおよび mRNA の発現は絨毛癌で増加していた。また、HTR-8/SVneo でも発現は認められ、胞状奇胎、胎盤組織では発現が低下していた。細胞株の培養上清における regular hCG に対する H-hCG 値の割合は C2GnT の発現



H-hCG の割合は C2GnT 発現と相関

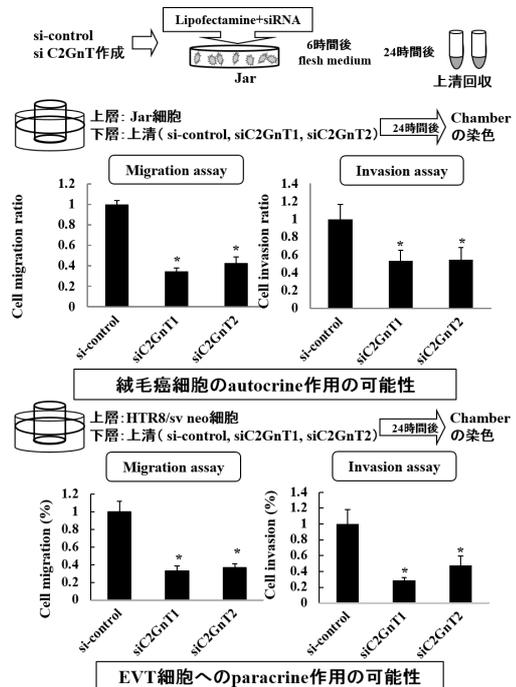
量と相関していた。H-hCG が糖転移酵素である C2GnT により生成されていることを示唆された。

(2) 絨毛癌細胞株 Jar に C2GnT siRNA を導入し、ウエスタンブロットでタンパク発現が抑制されたことを確認した。増殖能に変化はなく、遊走能及び浸潤能は、コントロール siRNA 導入細胞に比較して、C2GnT 発現抑制



細胞では有意に低下していた。

(3) C2GnT 発現抑制は MMP 活性に影響を与えなかった。また、細胞外基質 (Fibronectin, Collagen I, Collagen IV) への接着能は C2GnT 発現を抑制すると有意に低下した。HUVEC への接着も有意に低下した。C2GnT 発現抑制絨毛癌細胞の上清を transwell の下層に入れて上層の絨毛癌細胞または EVT 細胞を誘導させるとコントロール細胞の上清と比較して優位に浸潤が抑制された。このことから、C2GnT は絨毛癌細胞の分泌タンパクにも影響を与え、autocrine 及び paracrine に作用する可能



EVT 細胞への paracrine 作用の可能性

性が示唆された。

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8件)

Sekiya Y, Yamamoto E, Niimi K, Nishino K, Nakamura K, Kotani T, Kajiyama H, Shibata K, Kikkawa F. c-Rel Promotes Invasion of Choriocarcinoma Cells via PI3K/AKT Signaling. *Oncology*. 2017;92(5). 査読有.

Yamamoto E, Niimi K, Fujikake K, Nishida T, Murata M, Mitsuma A, Ando Y, Kikkawa F. High-dose chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation for choriocarcinoma: A case report and literature review. *Mol Clin Oncol*. 2016;5(5):660-664. 査読有.

Kan M, Yamamoto E, Niimi K, Tamakoshi K, Sekiya Y, Nishino K, Ino K, Kikkawa F. Gestational Trophoblastic Neoplasia and Pregnancy Outcome After Routine Second Curettage for Hydatidiform Mole: A Retrospective Observational Study. *J Reprod Med*. 2016;61(4):373-9. 査読有.

Utsumi F, Kajiyama H, Sakata J, Higashi M, Niimi K, Sekiya R, Mitsui H, Suzuki S, Umezu T, Mizuno M, Yamamoto E, Shibata K, Kikkawa F. Opioid needs of terminally ill patients with gynecologic malignancies. *Int J Clin Oncol*. 2015;20(2):405-10. 査読有.

Niimi K, Murakumo Y, Watanabe N, Kato T, Mii S, Enomoto A, Asai M, Asai N, Yamamoto E, Kajiyama H, Shibata K, Kikkawa F, Takahashi M. Suppression of REV7 enhances cisplatin sensitivity in ovarian clear cell carcinoma cells. *Cancer Sci*. 2014;105(5):545-52. 査読有.
DOI: 10.1002/ijc.28692

Kajiyama H, Utsumi F, Higashi M, Sakata J, Sekiya R, Mizuno M, Umezu T, Suzuki S, Yamamoto E, Mitsui H, Niimi K, Shibata K, Kikkawa F. Is there any association between where patients spend the end of life and survival after anticancer treatment for gynecologic malignancy? *J Palliat Med*. 2014;17(3):325-30. 査読有.
DOI: 10.1089/jpm.2013.0366
DOI: 10.1007/s10147-014-0708-0

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*. 2014;9:3-6. 査読有.

DOI: 10.1016/j.gynor.2014.04.001

Kajiyama H, Mizuno M, Shibata K, Umezu T, Suzuki S, Yamamoto E, Mitsui H, Sekiya R, Niimi K, Kawai M, Nagasaka T, Kikkawa F. Oncologic outcome after recurrence in patients with stage I epithelial ovarian cancer: are clear-cell and mucinous histological types a different entities? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014;181:305-10. 査読有.

DOI: 10.1016/j.ejogrb.2014.07.046

[学会発表](計10件)

新美 薫、中村 謙一、佐藤 静香、西野 公博、山本 英子、吉川 史隆. 絨毛性腫瘍における絨毛癌診断スコアと FIGO2000 リスク分類の比較と治療成績. 第 58 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会. 2016 年 7 月 8 日. 米子コンベンションセンター、米子市末広町

新美 薫、中村 謙一、佐藤 静香、西野 公博、山本 英子、吉川 史隆. 寛解に至らなかった高齢発症の臨床的絨毛癌の 1 例. 第 68 回日本産婦人科学会学術講演会. 2016 年 4 月 21 日. 東京国際フォーラム、東京都千代田区

新美 薫、山本 英子、西野 公博、三輪 陽子、中村 謙一、佐藤 静香、吉川 史隆. 糖転移酵素 C2GnT と絨毛細胞の悪性化について. 第 33 回日本絨毛性疾患研究会. 2015 年 11 月 5 日. JA 共済ビル、東京都千代田区

三輪 陽子、山本 英子、西野 公博、中村 謙一、佐藤 静香、新美 薫、吉川 史隆. 絨毛癌細胞における c-Rel の発現と機能. 第 22 回日本胎盤学会学術集会. 2015 年 11 月 5 日. JA 共済ビル、東京都千代田区

山本 英子、藤掛 佳代、新美 薫、三輪 陽子、西野 公博、吉川 史隆. 難治性絨毛癌に対する自己末梢血幹細胞移植併用化学療法. 第 67 回日本産婦人科学会学術講演会. 2015 年 4 月 9 日. パシフィコ横浜、横浜市西区

三輪 陽子、山本 英子、西野 公博、新美 薫、井籠 一彦、吉川 史隆. 当院で行った絨毛癌に対する Modified MEA 療法の検討. 第 32 回日本絨毛性疾患研究会. 2014 年 10 月 3 日. 京都大学、京都市左京区

Niimi K, Yamamoto E, Miwa Y, Nishino K, Mano Y, Sumigama S, Kotani T, Kikkawa F. Core 2 1, 6-N acetylglucosaminyl transferase may regulate cell invasion in choriocarcinoma. IFPA Meeting 2014. 2014 年 9 月 10 日. パリ、フランス

新美 薫、山本 英子、西野 公博、三輪 陽子、藤原 多子、井籠 一彦、吉川 史隆. 自然寛解した絨毛性腫瘍の 3 例. 第 56 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会. 2014 年 7 月 17 日. 栃木県総合文化センター、宇都宮市本町

Nishino K, Yamamoto E, Miwa Y, Niimi K, Kikkawa F. The expression of N-acetylglucosaminyltransferase IVa in gestational trophoblastic diseases and its function in a choriocarcinoma cell line, Jar cell. ACOG Annual Clinical

Meeting . 2014 年 4 月 26 日 . シカゴ、アメリカ

新美 薫、山本 英子、西野 公博、三輪 陽子、吉川 史隆. 絨毛癌における糖転移酵素 C2GnT の発現について. 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 . 2014 年 4 月 18 日 . 東京国際フォーラム、東京都千代田区

〔図書〕(計 3 件)

新美 薫、山本 英子: 子宮の腫瘍・類腫瘍. 産科婦人科疾患、最新の治療 2016-2018. 南江堂、2016 年、291-294

新美 薫、山本 英子、吉川 史隆. 産婦人科処方実践マニュアル(第 2 章): 婦人科腫瘍分野 絨毛性疾患 非絨毛癌群. 産科と婦人科、診断と治療社、2016 年、83 巻 Suppl. 179-181

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 一つ上を行く診療の実践. 中外医学社、2014 年、306-309

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

新美 薫 (NIIMI, Kaoru)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 20571334

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

中村 謙一 (NAKAMURA, Kenichi)
名古屋大学・医学系研究科・大学院生