

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10643

研究課題名(和文) ミスマッチ修復欠損・BRAF変異型大腸癌におけるフコース転移酵素発現異常の意義

研究課題名(英文) Altered expression of fucosyltransferases in colorectal cancer

研究代表者

野田 勝 (Noda, Masaru)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50769643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではFUT8遺伝子にコードされるフコース転移酵素、 $\alpha$ -1-6 fucosyltransferaseの発現について検討した。FUT8は野生型TP53の直接的な転写標的遺伝子であることが示されている。本研究では、大腸癌におけるFUT8遺伝子発現をTP53変異と関連させ検討したところ、FUT8 mRNAはTP53変異型腫瘍において有意に低下していた。免疫染色ではFUT8タンパク発現は多くの臨床病理学的因子との関連を認めなかったが、FUT8発現低下はp53染色陰性症例においてのみ予後不良と関連していた。BRAF変異と糖転移酵素ppGALNACTの関連についても検討したが、結論には到達しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌において、 $\alpha$ -1-6 fucosyltransferase発現のゲノム異常との関連、臨床的意義を解明することは、大腸癌の発癌、進展における生物学的機構を理解する一助となり得るとともに、大腸癌治療の個別化にも寄与しうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The present study focused on  $\alpha$ 1-6 fucosyltransferase, an enzyme responsible for core fucosylation encoded by FUT8. As the FUT8 gene has recently been identified as a direct transcriptional target of wild-type p53, we specifically investigated the expression of FUT8 in conjunction with p53 alterations in colorectal cancer. FUT8 mRNA levels were significantly decreased in tumors harboring mutant TP53, compared to those of wild-type TP53. Using immunohistochemistry, positive expression of FUT8 protein was associated with survival only in tumors with negative p53, while it had no prognostic impact in tumors with positive p53. Although we also found that the expression of polypeptide N-acetylgalactosamine (GalNAc) transferase 6 was significantly decreased in BRAF mutant tumors compared to those of wild-type, the in vitro role of mutant BRAF in regulation of this enzyme remains inconclusive.

研究分野：大腸癌

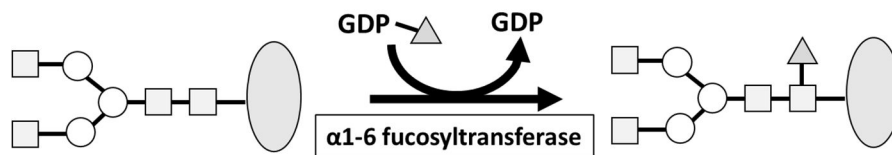
キーワード：大腸癌 フコース転移酵素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖鎖は核酸、タンパク質に次ぐ第三の生命鎖として、古くから癌における生物学的意義、臨床的意義が着目されてきた。糖鎖はタンパク質の翻訳後修飾に関わる最も重要な因子で、シアル酸付加やフコシル化が癌に関わるとされる。癌細胞表面には特徴的な糖鎖修飾が生じており、現在臨床現場で使われている血清腫瘍マーカーの多くは癌特異的な糖鎖抗原をモノクローナル抗体で認識するものである (CA19-9、CA15-3、CA72-4 など)。これらは細胞機能の点からも重要であり、例えばシアリルLewis A (CA19-9) は、細胞間接着を介して転移を促進するとされる。糖鎖は単一の遺伝子にコードされるわけではなく、多数の糖鎖関連遺伝子がコードする糖転移酵素群による複雑な生合成の過程があり、さらに細胞表面のタンパク質などのキャリア上で多彩な分枝構造をとるため、その配列や制御機構の解析は至難である。

癌細胞表面の糖鎖プロファイルの癌の機能的特徴を規定し得るため、糖鎖遺伝子の発現プロファイルが、大腸癌細胞の機能、個々の大腸癌の臨床的特徴や腫瘍学的転帰に直接関連すると考えている。大腸癌の多段階発癌経路として、多くは APC 変異、KRAS 変異、TP53 不活化、染色体 18q 欠失、TGF $\beta$  経路異常などのゲノム異常を蓄積していくことが知られ、この経路のいずれかの段階において糖鎖異常が付加されていくと考えられる。このような背景から、申請者らは近年、4000 症例に迫る大腸癌・大腸腺腫サンプルのオミクスデータを収集し、糖鎖遺伝子群のプロファイリングを試み、特徴的なサブグループの抽出に成功した。この新規サブグループは、特定の病理組織型や予後不良と関連しており、本研究が対象とするフコース転移酵素のひとつ、1-6 fucosyltransferase 発現により特徴づけられる。1-6 fucosyltransferase は、肝癌で高発現していることが知られ、肝癌細胞において癌胎児性タンパク AFP を高フコシル化する。フコースが 1-6 結合したフコシル化 AFP は AFP-L3 分画と称され保険収載されており、肝癌特異的腫瘍マーカーとして日常臨床で利用可能であり予後不良因子とされる。大腸癌における同酵素が制御する糖鎖構造や機能、ゲノム異常に関連する機構は全く未知であるが、同酵素が研究対象として極めて有望と考えられる。この検討では、O 型糖鎖の伸長を制御する polypeptide N-acetylgalactosamine (GalNAc) transferase 6 (ppGalNAcT-6) についても特定のゲノム異常に関連する糖転移酵素として抽出している。



### 2. 研究の目的

本研究ではバイオインフォマティクスや免疫染色を最大限活用し、1-6 fucosyltransferase の発現と臨床的意義、特に大腸癌に特徴的なゲノム異常との関連について検討し、糖鎖遺伝子バイオマーカーとして確立を目指す。種々のゲノム異常を伴う大腸癌培養細胞株を用いて、1-6 fucosyltransferase の機能的解析を行う。1-6 fucosyltransferase に加え、前述の解析では polypeptide N-acetylgalactosamine (GalNAc) transferase 6 (ppGalNAcT-6) も抽出している。同酵素についてもゲノム異常との関連、制御機構など同様に検討を行う。

### 3. 研究の方法

本研究では下記のような方法を用いる (詳細は研究成果の欄に述べる)。

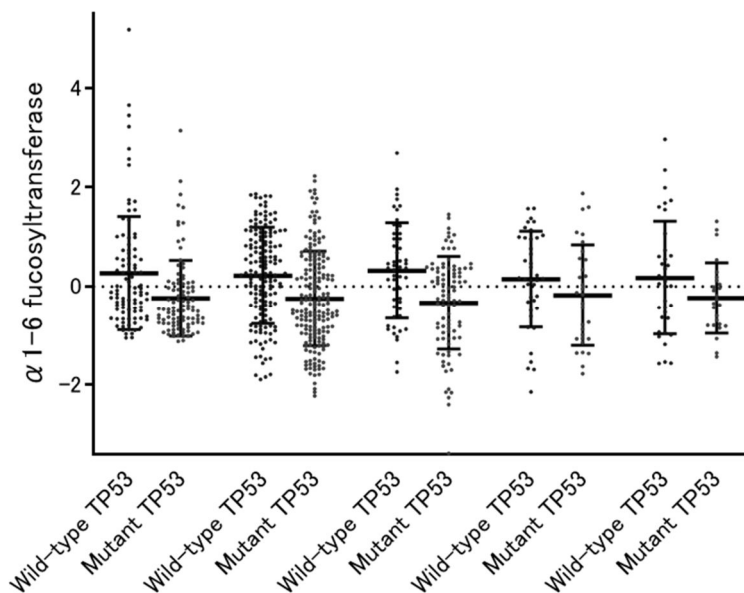
- ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) を用いた免疫組織学的検討
- 網羅的遺伝子発現解析
- 臨床病理学的情報やゲノム異常との関連について検討
- 各種統計学的解析

- 大腸癌細胞株を用いた細胞表面糖鎖の検討（免疫染色、フローサイトメトリー）
- 各種機能的検討（in vitro）

#### 4. 研究成果

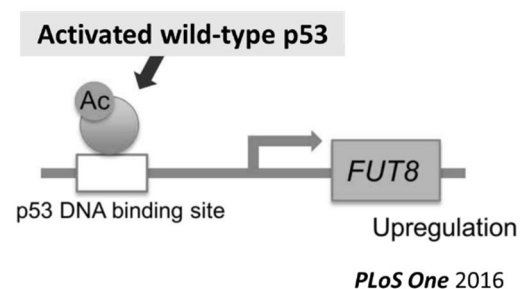
##### （1） 1-6 fucosyltransferase 遺伝子発現と TP53 変異

本研究課題の予備的な位置づけである当研究者らの先行研究において、網羅的な遺伝子発現プロファイルから糖転移酵素をコードする複数の候補遺伝子を抽出している（Noda et al. Clin Cancer Res 2018）。同研究では、1-6 fucosyltransferase をコードする FUT8 遺伝子発現低下と TP53 変異を伴う大腸癌との関連が示唆された。



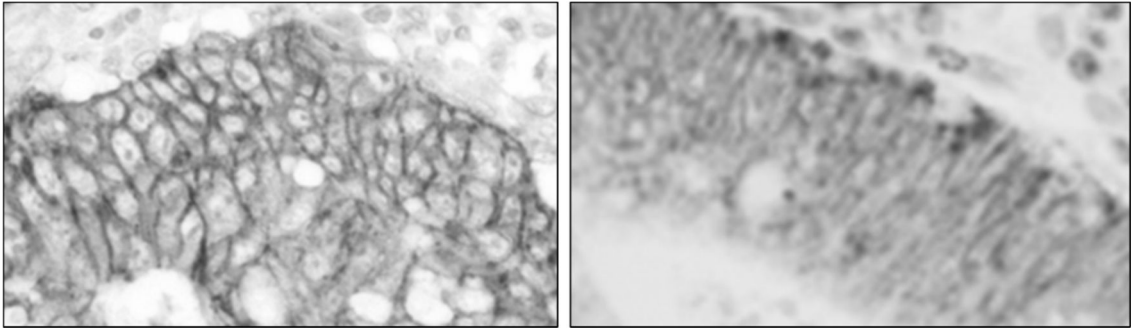
本研究では 1-6 fucosyltransferase と TP53 の臨床的意義を拡張・追及することとした。5つの独立した大腸癌手術検体の RNA シークエンスおよびマイクロアレイコホート、総計 800 症例超を用いて、1-6 fucosyltransferase の mRNA 発現レベルと TP53 変異の有無を検討した。5つのコホートいずれにおいても、1-6 fucosyltransferase 発現は、TP53 野生型に比較して TP53 変異型の腫瘍で低値を示し、これは多くのコホートで統計学的に有意であった。

一方、FUT8 遺伝子は転写因子である野生型 TP53 の直接の転写標的であることが近年明らかになっている（PLOS ONE 2016）。これは本研究において示された TP53 変異/野生型によって FUT8 発現が異なるという臨床的な知見を分子生物学的側面から補完するものであった。



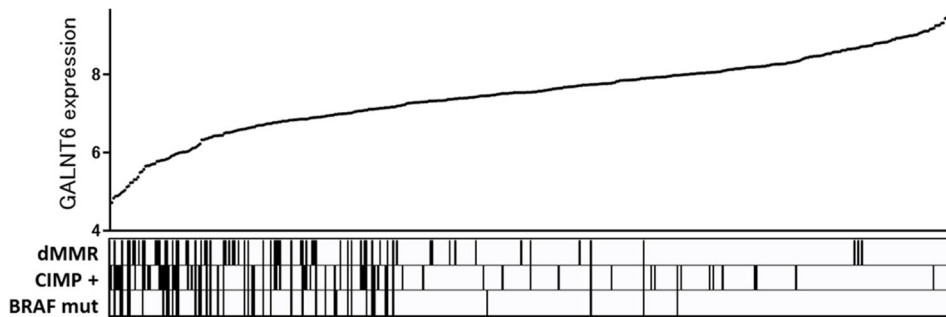
##### （2） 1-6 fucosyltransferase タンパク発現

大腸癌における 1-6 fucosyltransferase タンパク発現について、300 例超の大腸癌手術標本を用いて、免疫組織学的染色により検討した。1-6 fucosyltransferase タンパクは非腫瘍大腸粘膜や腫瘍間質には発現せず、腫瘍細胞に特異的に発現する。今回の検討では 78%が 1-6 fucosyltransferase タンパク染色陽性であったが、年齢、性別、腫瘍の主座、組織型、TNM ステージなどの臨床病理学的因子との有意な関連を見出すことはできなかった。免疫染色による p53 発現との関連も見られなかった。一方、1-6 fucosyltransferase タンパク発現低下は p53 染色陰性症例においてのみ予後不良と関連しており、p53 染色陽性症例においては予後との関連はみられなかった。

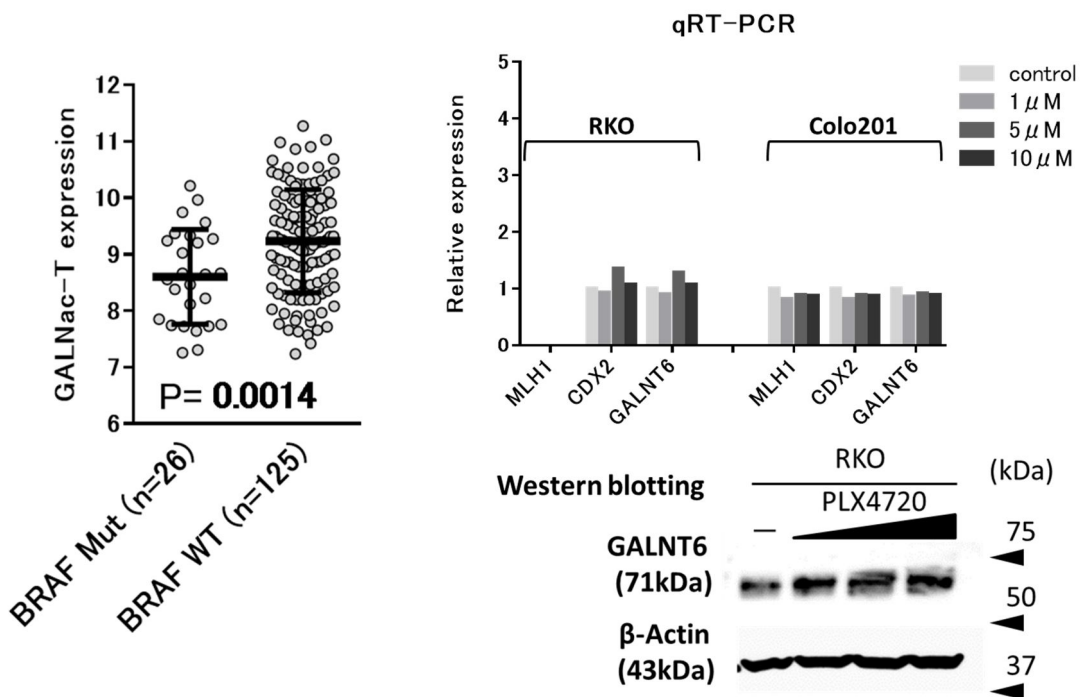


( 3 ) ppGalNAcT-6 ( GALNT6 ) と BRAF 変異

上述の当研究者らの先行研究では、網羅的な遺伝子発現プロファイルから糖転移酵素をコードする複数の候補遺伝子を抽出したが、上記ともうひとつは ppGalNAcT-6 である (Noda et al. Clin Cancer Res 2018)。この糖転移酵素は O 型糖鎖の伸長を開始時点を制御するが、同遺伝子 GALNT6 は BRAF 変異の有無により発現に大きな差が見られた。500 例超のマイクロアレイ解析において、BRAF 変異を伴う大腸癌において GALNT6 は有意に低下していた。151 株の大腸細胞株を用いた解析においても、GALNT6 は BRAF 野生型に比較し、BRAF 変異型で有意に低下していた。



BRAF 変異はそれ自体が癌細胞の特性に直接関連しており、過去の知見から BRAF 変異が GALNT6 発現調整を担う可能性を検討した。BRAF 変異型大腸癌細胞株を用いて、BRAF 阻害剤 PLX4720 処理を行い、qRT-PCR により同遺伝子発現を解析したが、BRAF 阻害によって GALNT6 発現上昇はみられなかった。同様に、western blotting により、GALNT6 タンパク発現を解析したが BRAF 阻害による変化は確認できなかった。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Noda Masaru, Okayama Hirokazu, Kofunato Yasuhide, Chida Shun, Saito Katsuharu, Tada Takeshi, Ashizawa Mai, Nakajima Takahiro, Aoto Keita, Kikuchi Tomohiro, Sakamoto Wataru, Endo Hisahito, Fujita Shotaro, Saito Motonobu, Momma Tomoyuki, Ohki Shinji, Kono Koji	4. 巻 13
2. 論文標題 Prognostic role of FUT8 expression in relation to p53 status in stage II and III colorectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0200315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0200315	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Noda Masaru, Okayama Hirokazu, Tachibana Kazunoshin, Sakamoto Wataru, Saito Katsuharu, Thar Min Aung Kyi, Ashizawa Mai, Nakajima Takahiro, Aoto Keita, Momma Tomoyuki, Katakura Kyoko, Ohki Shinji, Kono Koji	4. 巻 24
2. 論文標題 Glycosyltransferase Gene Expression Identifies a Poor Prognostic Colorectal Cancer Subtype Associated with Mismatch Repair Deficiency and Incomplete Glycan Synthesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4468 ~ 4481
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-17-3533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakajima Takahiro, Okayama Hirokazu, Ashizawa Mai, Noda Masaru, Aoto Keita, Saito Motonobu, Momma Tomoyuki, Ohki Shinji, Shibata Masahiko, Takenoshita Seiichi, Kono Koji	4. 巻 15
2. 論文標題 Augmentation of antibody-dependent cellular cytotoxicity with defucosylated monoclonal antibodies in patients with GI-tract cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 2604-2610
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2017.7556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ashizawa Mai, Okayama Hirokazu, Ishigame Teruhide, Thar Min Aung Kyi, Saito Katsuharu, Ujiie Daisuke, Murakami Yuko, Kikuchi Tomohiro, Nakayama Yuko, Noda Masaru, Tada Takeshi, Endo Hisahito, Fujita Shotaro, Sakamoto Wataru, Saito Motonobu, Saze Zenichiro, Momma Tomoyuki, Ohki Shinji, Mimura Kosaku, Kono Koji	4. 巻 17
2. 論文標題 microRNA-148a-3p regulates immunosuppression in DNA mismatch repair-deficient colorectal cancer by targeting PD-L1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1403-1413
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-18-0831	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okayama Hirokazu, Noda Masaru, Kono Koji	4. 巻 9
2. 論文標題 Aberrant glycosylation in colorectal cancer with genomic and epigenomic alterations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 35609 ~ 35610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松本拓朗, 岡山洋和, 加瀬晃志, 仲野宏, 遠藤英成, 伊藤美郷, 山田玲央, 小野澤寿志, 藤田正太郎, 坂本渉, 齋藤元伸, 三村耕作, 佐瀬善一郎, 門馬智之, 河野浩二.
2. 発表標題 大腸癌におけるTn 抗原の発現
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡山洋和, 野田勝, 立花和之進, 坂本渉, 芦澤舞, 中島隆宏, 青砥慶太, 門馬智之, 大木進司, 河野浩二
2. 発表標題 糖鎖酵素遺伝子によるステージIII大腸癌の予後バイオマーカー
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島 隆宏, 河野 浩二, 芦澤 舞, 千田 峻, 野田 勝, 青砥 慶太, 立花 和之進, 岡山 洋和, 早瀬 傑, 坂本 渉, 石亀 輝英, 齋藤 元伸, 志村 龍男, 大竹 徹, 竹之下 誠一
2. 発表標題 脱フコシル化抗体を用いたADCCの検討
3. 学会等名 第117回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡山 洋和,野田 勝,芦澤 舞,中島 隆宏,青砥 慶太,千田 峻,小船戸 康英,大木 進司,丸橋 繁,河野 浩二
2. 発表標題 大腸癌における 1-6フコース転移酵素とp53
3. 学会等名 第72回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 PROGNOSTIC BIOMARKER FOR COLON CANCER	発明者 Okayama H, Noda M, Kono K	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/032628	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 大腸がんの予後バイオマーカー	発明者 岡山洋和、野田勝、 河野浩二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許6833226	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡山 洋和  (Okayama Hirokazu)  (20583397)	福島県立医科大学・医学部・講師   (21601)	
研究分担者	門馬 智之  (Momma Tomoyuki)  (20622335)	福島県立医科大学・医学部・准教授   (21601)	
研究分担者	坂本 渉  (Sakamoto Wataru)  (40622337)	福島県立医科大学・医学部・講師   (21601)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------