

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17445

研究課題名(和文)尿を用いた非侵襲性肝細胞がん腫瘍マーカーの開発 ビクニン上の糖鎖構造を標的として

研究課題名(英文) Development of a Noninvasive Hepatocellular Carcinoma Tumor Marker Using Urine-Targeting Glycan Structures on Bikunin-

研究代表者

土本 純 (Tsuchimoto, Jun)

愛知医科大学・付置研究所・助教

研究者番号：70632868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞由来タンパク質であるビクニンの糖鎖構造が、正常肝細胞由来のものと肝細胞がん由来細胞株に由来するものとは異なることを見出している。ビクニンは血液中から尿中に移行し体外に排出されることから、尿を用いた肝細胞がん腫瘍マーカーの開発を行った。研究期間中に新型コロナウイルス感染症が流行し、患者検体の使用を中止したため、腫瘍マーカーとしての検討は十分にできていない。一方で、この糖鎖構造の違いを生じさせるメカニズムに注目し研究を行った結果、肝細胞がんでは糖鎖合成に関与する特定の酵素の発現が亢進していることを見出した。今後、新たな非侵襲性肝細胞がん腫瘍マーカーとしての開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞がんの早期発見には、定期的に検査をすることが容易な腫瘍マーカーが必須である。本研究では尿に含まれるビクニンタンパク質に結合している糖鎖を腫瘍マーカーとして利用可能か否かを検討したが、十分な検証はできていない。一方で、がん化した肝細胞が糖鎖構造の異なるビクニンを産生するメカニズムの一端を明らかにできたことは、今後の新規非侵襲性腫瘍マーカー開発を後押しするものである。

研究成果の概要(英文)：I have found that the glycan structures of bikunin, a hepatocyte-derived protein, are different between those derived from normal hepatocytes and those derived from hepatocellular carcinoma-derived cell lines. Since bikunin is transferred from the blood to the urine and excreted from the body, we developed a tumor marker for hepatocellular carcinoma using urine. During the study period, there was an outbreak of COVID-19, and the use of patient samples was discontinued; therefore, it has not been sufficiently investigated as a tumor marker. On the other hand, I focused on the mechanism that causes the difference in glycan structures, and found that the expression of a specific enzyme involved in glycan synthesis is upregulated in hepatocellular carcinoma. The development of new non-invasive tumor markers for hepatocellular carcinoma is expected in the future.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：肝細胞がん 腫瘍マーカー コンドロイチン硫酸 ビクニン 硫酸基転移酵素

1. 研究開始当初の背景

肝細胞がんは世界的にみて5番目に多いがんであり、がん関連死において死因第2位である。多くの場合、肝細胞がん患者は肝炎や肝硬変を併発している。そのため、診断が難しく、患者の60%以上は他臓器への転移後の発見であり、5年生存率は20%未満である。一方で、早期発見の場合、5年生存率が70%以上に飛躍的に上昇する。この統計データは、早期発見がいかに重要であるかを示している。肝細胞がんの診断は超音波検査やCT、MRIなどの画像診断が主であり、 α -フェトプロテイン (AFP) やPIVKA-II、AFP-L3などの血清腫瘍マーカーも用いられている。日本は、肝硬変患者などの高危険群への定期的な診察によって、肝細胞がんの早期発見に取り組んでいるが、それでも早期発見は60%程度にとどまり、現在の診断方法は早期発見には十分とはいえない。そのため、新たな肝細胞がん腫瘍マーカーの開発が急務となっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、定期的な検査が容易な非侵襲性腫瘍マーカーの開発である。肝細胞がん腫瘍マーカー候補分子としては、肝細胞が合成・分泌する分子群の中から探索する方法が常套手段といえる。これらの分子群の中で、ビクニン (Bikunin) はトリプシン阻害活性をもつタンパク質で、安定性が高く、血液中から尿中に移行し、体外へと排泄される。また、ビクニンにはコンドロイチン硫酸鎖が1本共有結合しており、このコンドロイチン硫酸鎖が本研究の標的である。

コンドロイチン硫酸鎖はグルクロン酸とN-アセチルガラクトサミンが交互に結合し、さらに硫酸基が複雑に転移された直鎖状の糖鎖である (図1)。本申請者はこれまでにヒト肝細胞がん由来培養細胞株 Huh7 および HepG2 の培養上清からビクニンを分離し、コンドロイチン硫酸鎖の組成を分析している。この結果、健康人尿由来ビクニンのコンドロイチン硫酸鎖と比較して、N-アセチルガラクトサミンの6位への硫酸基の転移が増加していることを見出した (図2)。この結果から、尿に含まれるビクニンにおけるコンドロイチン硫酸鎖組成を分析することによって、肝細胞がんの有無を検出できるのではないかと着想した。

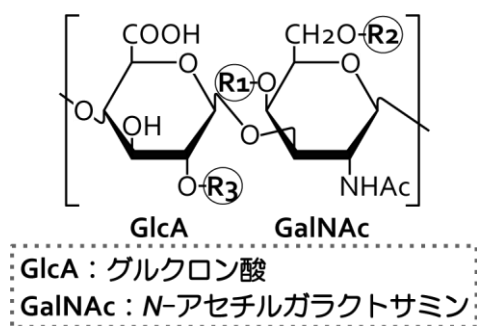


図1. コンドロイチン硫酸の構造
硫酸基はGalNAcの4位 (R1)、6位 (R2) およびGlcAの2位 (R3) に転移される。

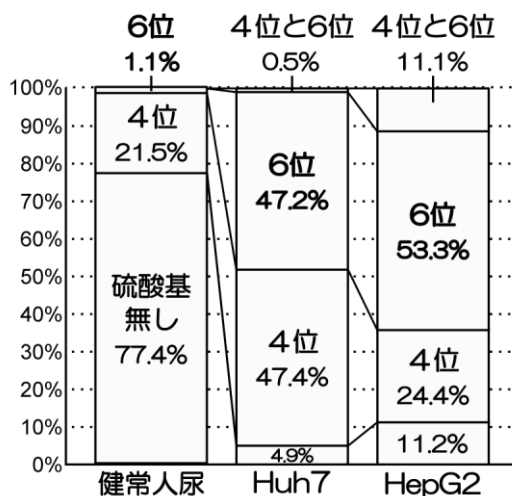


図2. ビクニンのコンドロイチン硫酸鎖におけるN-アセチルガラクトサミンの硫酸化修飾の割合

Huh7およびHepG2では、6位への硫酸基の転移が顕著に増加している

3. 研究の方法

①尿試料の分析

提供された尿試料からトリプシン結合セファロースゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって、ビクニンを抽出する。水酸化ナトリウムを用いてアルカリけん化し、ビクニンからコンドロイチン硫酸鎖を分離する。分離したコンドロイチン硫酸をコンドロイチン硫酸分解酵素によって二糖に分解する。この分解によって様々な位置に硫酸基が転移された二糖が生じ、得られた二糖を硫酸基の転移されている位置および数に応じて逆相クロマトグラフィー

によって分離する。その後、2-シアノアセトアミドで蛍光標識し、検出する。本研究所は、様々な位置に硫酸基を付加したグルクロン酸と N-アセチルガラクトサミンが結合した二糖の標準品を所有しているため、各種構造をもつ二糖をすべて定量でき、この二糖の定量結果からコンドロイチン硫酸鎖の組成を算出する。

②硫酸基転移酵素群の発現解析

遺伝子発現データベース Expression Atlas を用いて、正常肝細胞、がん化した肝細胞および肝細胞がん由来細胞株 Huh7, HepG2 のコンドロイチン硫酸の産生に関与する硫酸基転移酵素群の mRNA 発現解析を行う。また、質量分析計を用いて硫酸基転移酵素タンパク質の発現解析を行う。

4. 研究成果

①尿から抽出したビクニンのコンドロイチン硫酸鎖組成

本研究期間内に、健常人由来試料 2 検体、肝細胞がん患者由来尿試料 4 検体、他の肝疾患患者由来尿試料 3 検体の解析を行った。この結果、健常人と肝細胞がん患者由来ビクニンのコンドロイチン硫酸二糖組成を比較したところ、2 検体では N-アセチルガラクトサミンの 6 位が硫酸化修飾された二糖構造が 3 倍程度増加していた。より多くの患者検体を用いて腫瘍マーカーとして利用可能か否か検証する必要があるが、新型コロナウイルス感染症の流行のため、患者検体の使用を中止している。

②硫酸基転移酵素群の発現解析

ヒト試料の取り扱いを中止したため、コンドロイチン硫酸の糖鎖構造の違いを生じさせるメカニズムに注目し研究を行った。まず、コンドロイチン硫酸の産生に関与する硫酸基転移酵素群の mRNA 発現を Expression Atlas を用いて比較した (表 1)。正常肝臓と比較して肝細胞がん由来細胞株 HepG2 及び Huh7 では、多くの酵素の発現が亢進しており、特に N-アセチルガラクトサミンの 6 位に硫酸基を転移する C6ST-1 の発現がそれぞれ 26 倍、50 倍となっていた。この結果は、肝細胞のがん化に伴い N-アセチルガラクトサミンの 6 位に硫酸基が多く転移されることと一致する。

さらに硫酸基転移酵素群のタンパク質発現を検討するために、質量分析計を用いた定量方法の開発を行った。C4ST-1, C6ST-1, C4S6ST の過剰発現培養細胞を調製し、それぞれのタンパク質を抽出した。得られたタンパク質をトリプシン消化し、質量分析計にて測定した。この結果、それぞれの酵素の定量に適したペプチドの同定に成功した。現在は他の 3 種類の酵素についても同様に進めている。

酵素名	正常肝臓	HepG2	Huh7
C4ST-1	0.71	0	4
C4ST-2	0.93	5	5
C4ST-3	30.33	119	120
C6ST-1	1.02	27	51
C6ST-2	7.33	9	6
C4S6ST	6.75	23	5

表 1. 硫酸基転移酵素群の mRNA 発現

それぞれの数値は RNAseq 解析の

結果得られた TPM 値を示す。

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〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------