

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10561

研究課題名(和文) 肝癌細胞株における糖鎖異常と浸潤能との関連性の解析

研究課題名(英文) Analysis of alteration of N-glycan and invasiveness in hepatocellular carcinoma cell-lines

研究代表者

神山 俊哉 (Kamiyama, Toshiya)

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：80322816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌細胞株で、浸潤能と糖鎖の関連性を解析した。u-PA発現をWestern Blotで評価し、網羅的糖鎖解析を行った。HLEはu-PAの発現が高く、HepG2が最も低く、HLFはその中間であった。浸潤能はu-PA産生能順に、HLE、HLF、HepG2であった。HLE、HepG2で、E-Cadherin、N-Cadherinの発現をWestern Blotで評価した。HLEでE-Cadherin発現低下し、HepG2は高発現、N-Cadherinはともに発現していた。HLE、HLF、HepG2、u-PA発現制御下HLEでの糖鎖解析から1851m/z、2521m/zが浸潤能変化に共通糖鎖であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌培養細胞を用い、網羅的糖鎖解析を行い、u-PAと上皮間葉転換EMTに関連する浸潤能に關する特異的糖鎖1851m/z、2521m/zが浸潤能変化に検出できた。これらの糖鎖はu-PA、E-Cadherin、N-Cadherinの発現の変化に伴い変化した。これらから癌悪性度変化に関連する糖鎖が検出され、既存のAFP、AFP-L3、PIVKA-IIと違った糖鎖という視点から肝細胞癌悪性度を評価できる新規バイオマーカーとなり得、これらの糖鎖に關する糖転移酵素阻害剤を合成できれば、浸潤制御、上皮間葉転換EMT制御ができ、予後延長の可能性があり、創薬の点からも癌治療に大きく貢献できると確信する。

研究成果の概要(英文)：We investigated the correlation between alterations in N-glycans and invasiveness by u-PA and EMT. Expression of u-PA and E-glycans/N-cadherin were analyzed by Western blotting in hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines. u-PA were knocked down by RNA interference and u-PA was overexpressed in HCC cells using lentiviral vectors. We performed a glycoblotting-assisted MALDI-TOF/MS-based quantitative analysis of HCC cell lines in which invasiveness was altered. The expression of N-glycans, including a form with m/z=1851 and 2521, was changed according to invasiveness controlled by knockdown and overexpression of u-PA expression. These two N-glycans were common in the comparative analysis between HLE with low E-Cadherin expression and HepG2 with high expression. Conclusion: In HCC cells, N-glycosylation is an important factor controlling invasiveness by u-PA and EMT related with E-Cadherin and N-Cadherin. These glycomic alteration may be useful for evaluation of tumor malignancy.

研究分野：外科 腫瘍学

キーワード：糖鎖 浸潤 転移 肝細胞癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2002年に西村が発明したグライコプロッティング法(特願2002-378733、PCT/JP2003/016841「糖鎖捕捉分子を用いた糖鎖濃縮法および糖鎖構造解析法」、西村ら、*Angew. Chem. Int. Ed.*2005, 44, 91-96)による全自動血清糖鎖プロファイル解析装置により糖鎖の精製と構造解析が行うことができるようになり、多様な糖鎖情報を失うことなく網羅的に取得することができるようになった。これまでに血清タンパク質に結合している糖鎖の網羅的定量解析により肝細胞癌(HCC)に特異的糖鎖(仮称:G3560、G2890)が存在し、それらが悪性度ならびに予後予測に関与すると報告してきた(Kamiyama T, *Hepatology*. 2013 Jun;57(6):2314-25)。しかし、これら検出された糖鎖が、癌の浸潤・転移にどのように関与しているかは不明である。癌転移の開始には浸潤が必要であり、癌細胞は上皮間葉転換 EMT により E-cadherin の減少や基底膜の崩壊により、細胞接着を喪失するとともに浸潤能を増強し、全身の血流へと播種する。一方、肝癌の浸潤能・増殖能に関して、セリンプロテアーゼの一つである urokinase type plasminogen activator (u-PA) が関与し、癌細胞からの産生と浸潤能とが相関することを報告し(*Int J Oncol*. 1998 Mar;12(3):655-9)、他の論文でも報告されている(*Cancer Gene Ther*. 2003 Feb;10(2):112-20)。

2. 研究の目的

肝細胞癌の浸潤能、urokinase type plasminogen activator (u-PA) で制御される浸潤能、上皮間葉転換 EMT と関連する特異的糖鎖を検出し、肝細胞癌の生物学的悪性度と糖鎖変異との関連性を個々の癌細胞の発現糖鎖から検討する。

3. 研究の方法

(1) HLE、HLF、HepG2 の肝癌細胞株において、u-PA、E-cadherin、N-cadherin の発現に伴う癌細胞悪性度(浸潤能、遊走能)変化の検討をする。

肝癌細胞株 HLE での u-PA、E-cadherin、N-cadherin 発現状況: Western blot 法で確認する。
癌細胞悪性度(浸潤能、遊走能)の変化: Boyden chamber をもちいて浸潤能、遊走能を検討する。

(2) u-PA、E-cadherin 動態に関連した糖鎖解析

HLE、HLF、HepG2 の肝癌細胞株での糖鎖発現を解析する。全自動血清糖鎖プロファイル解析装置により糖鎖の精製と構造解析を行う。

(3) 多種の肝癌細胞株での検討

HLE のほか、HLF、低転移株として HepG2 においても以下を検討する。

各細胞株での u-PA、E-cadherin 発現状況: ELISA 法による培養上清中のタンパク量測定、Western blot 法で確認する。

u-PA 過剰発現肝癌細胞株の作成: u-PA の mRNA を Cloning し、レトロウイルスベクターである、pCX4-puro ベクター(*Proc Natl Acad Sci*; 2003) に挿入後、ウイルス感染させ、u-PA 過剰発現肝癌細胞株を作成する。

u-PA 低発現肝癌細胞株の作成: u-PA 高発現肝癌細胞株において、siRNA を用いて u-PA の発現を抑制する。Western blot 法で確認する。

癌細胞悪性度(浸潤能、遊走能)の評価: Boyden chamber をもちいて浸潤能、遊走能を検討する。

糖鎖解析: 全自動血清糖鎖プロファイル解析装置により糖鎖の精製と構造解析を行い、u-PA、E-cadherin の過剰発現群、抑制群での糖鎖変化と比較検討する。

4. 研究成果

肝癌細胞株において、細胞外マトリックスの破壊に関連する urokinase type plasminogen activator(u-PA)の産生能と糖鎖の関連性を解析した。浸潤能の異なる肝癌細胞株(HLE、HLF、HepG2)の培養細胞を用い、各細胞で、u-PA の発現を Western Blot で評価した。全自動血清糖鎖プロファイル解析装置により糖鎖の精製と構造解析を行った。その結果、HLE は u-PA の産生が高く、HepG2 は u-PA の産生が最も低く、HLF はその中間であった。浸潤能は u-PA 産生能に応じて、HLE は高浸潤能を有し、HLF、HepG2 に順であった。2種類の肝癌細胞株(HLE、HepG2)の培養細胞を用い、各細胞で、E-Cadherin、N-Cadherin の発現を Western Blot で評価した。高浸潤能肝癌細胞株 HLE では、E-Cadherin の発現低下し、低浸潤能 HepG2 の細胞株は高発現していた。N-Cadherin はともに発現していたが、低浸潤能 HepG2 の方が高発現していた。高浸潤能肝癌細胞株 HLE と低浸潤能 HepG2 の2つの細胞株における、グライコプロッティング法による糖鎖の網羅的定量解析では全 86 種類の糖鎖が検出された。HepG2 と HLE 間での糖鎖発現の比較では、浸潤能の高い HLE において 11 種類の糖鎖が増加していた。

浸潤能の変化で糖鎖変化するか検討するために高浸潤能の肝癌細胞株 HLE で、u-PA を発現抑制し、低浸潤能の HepG2 で u-PA を強制発現させ、グライコプロッティング法による糖鎖の網羅的定量解析を行い、全 86 種類の糖鎖が検出され、1851m/z、2521m/z が浸潤能変化に共通の

糖鎖であった。

今回の研究で、個々の癌細胞の発現糖鎖から転移能の予測することを目標とした。

肝癌培養細胞を用い、浸潤能、上皮間葉転換 EMT に関与する特異的糖鎖を網羅的解析を行い、1851m/z、2521m/z が浸潤能変化に共通の糖鎖検出できた。これらの糖鎖は u-PA、E-Cadherin、N-Cadherin の発現の変化に伴い変化した。これらから癌悪性度変化に関連する糖鎖が検出され、既存の AFP、AFP-L3、PIVKA-II と違った視点から肝細胞癌の生物学的悪性度を評価することができる新規バイオマーカーとなり得ることがわかり、これらの糖鎖に関与する糖転移酵素の阻害剤を化学合成できれば、これによる浸潤制御、上皮間葉転換 EMT 制御ができ、その予後延長をもたらす可能性があり、創薬の点からも癌治療に大きく貢献できると確信している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 神山俊哉
2. 発表標題 網羅的糖鎖解析による肝細胞癌の浸潤能と糖鎖異常の検討
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 秀徳, 神山 俊哉, 柿坂 達彦, 相山 健, 島田 慎吾, 若山 顕治, 永生 高弘, 折茂 達也, 蒲池 浩文, 横尾 英樹, 西村 紳一郎, 武富 紹信
2. 発表標題 網羅的糖鎖解析による肝細胞癌の浸潤能と糖鎖異常の検討
3. 学会等名 第 117回日本外科学会定期学術集会(パシフィコ横浜・神奈川県横浜市)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hidenori Takahashi, Toshiya Kamiyama
2. 発表標題 Analysis of alternation of N-glycan and invasiveness associated with u-PA expression in hepatocellular carcinoma cell-lines
3. 学会等名 International Liver Cancer Association 10th Annual Conference.
4. 発表年 2016年

〔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
研究分担者	西村 紳一郎 (Shin-ichiro Nishimura) (00183898)	北海道大学・先端生命科学研究院・教授 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	島田 慎吾 (Shingo Shimada) (40755576)	北海道大学・医学研究院・特任助教 (10101)	
研究分担者	若山 顕治 (Kenji Wakayama) (50646544)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	
研究分担者	武富 紹信 (Akinobu Taketomi) (70363364)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	横尾 英樹 (Hideki Yokoo) (70399947)	旭川医科大学・医学部・准教授 (10107)	
研究分担者	折茂 達也 (Tatsuya Orimo) (80711861)	北海道大学・医学研究院・特任助教 (10101)	