

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11295

研究課題名(和文) 婦人科癌における抗がん剤耐性癌に対する糖脂質を用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment method using glycolipids for anticancer drug-resistant cancer in gynecologic cancers

研究代表者

田中 京子 (TANAKA, KYOKO)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：10286536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：各婦人科癌組織(子宮内膜癌、子宮頸癌、卵巣癌)を用いて糖脂質組成を調べ各種癌に特徴的な組成をもつことを明らかとした。子宮内膜癌においては子宮内膜癌由来細胞にスルファチド合成酵素遺伝子を導入した実験により、スルファチドが抗癌感受性・剤耐性の指標になることを確認した。子宮頸癌においては細胞株と癌組織での比較からGM2が癌増殖のカギとなることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の癌化に伴う複合糖鎖の変化はすべての癌細胞に観察され、消化管、内分泌器官などの癌細胞では特定の糖鎖が腫瘍マーカーとして癌の臨床診断に用いられている。本研究では子宮内膜癌、子宮頸癌、卵巣癌における糖脂質の組成を解析し、癌細胞の転移、抗がん剤耐性への糖鎖の関与を明らかにしたことで癌の治療効果を高めるための基礎研究を行うことができた。

研究成果の概要(英文)：We investigated glycolipid composition in gynecological cancer tissues (endometrial cancer, cervical cancer, and ovarian cancer) and found that each cancer has a characteristic composition. In endometrial cancer, sulfatide synthase genes were introduced into endometrial cancer-derived cells, and sulfatide was found to be an indicator of anticancer sensitivity and drug resistance. In cervical cancer, GM2 was found to be a key factor for cancer growth by comparing cell lines and cancer tissues.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮内膜癌 子宮頸癌 卵巣癌 糖脂質 抗癌剤耐性 遺伝子導入

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は婦人科臓器の癌化と糖脂質について研究を行ってきた。ヒトの正常内膜はエストロゲンの刺激下で活発に増殖する増殖期と黄体ホルモンプログステロン刺激により増殖停止と分化が誘導される分泌期に分類され、増殖と分化を周期的に繰り返している。糖脂質の組成を比較すると硫酸化糖脂質は正常子宮内膜において分泌期に特異的に発現していた。硫酸化糖脂質の合成に必要な硫酸基転移酵素遺伝子の発現はステロイドホルモンの調節を受け、硫酸化糖脂質は上皮細胞の管腔側に分布していることから細胞の方向を決め、腺構造の形成や分泌機能に関わっていると予想される。子宮内膜癌の多くはエストロゲンによって発癌し、活発な増殖が維持されている。子宮内膜癌においても硫酸化糖脂質は腺構造を形成する高分化型形質と関係していると可能性がある。糖脂質組成の顕著な違いは転移性や抗がん剤感受性などの癌細胞の性質にも関わっていると予想される。また、組織型の異なる卵巣癌各種、粘液性、漿液性、類内膜、明細胞癌についても糖脂質組成の違いが癌細胞の性質とどのように関わっているのかに興味もたれる。糖脂質は腫瘍マーカーとして癌の診断のみならず、転移性や予後の判断にも利用されていることから、糖脂質を指標に、癌診断治療の改善を図ることが求められている。

### 2. 研究の目的

細胞の癌化に伴う複合糖鎖の変化はすべての癌細胞に観察されるが、正常上皮細胞と比較した複合糖鎖の変化には臓器固有と、臓器共通のものが存在する。消化管、内分泌器官などの癌細胞で共通に変化する糖鎖 CA19-9 や SLX は腫瘍マーカーとして癌の臨床診断に用いられているが、婦人科癌での発現頻度は高いとはいえない。申請者は子宮内膜癌、子宮頸癌、卵巣癌の複合糖鎖、特に糖脂質の腫瘍マーカーの解析を進めているが、これらの組織における腫瘍マーカーは癌細胞の転移、抗がん剤耐性などの細胞生物学的特性にも関わっていることが明らかになってきた。今までの独自の研究を基礎に癌化に伴う糖転移酵素遺伝子の発現調節、および抗がん剤耐性と転移への糖鎖の役割を明らかにし、癌の治療効果を高めるための基礎研究を行うことを目的とする。

(1) 各婦人科癌組織(子宮内膜癌、子宮頸癌、卵巣癌)における組織型による糖脂質組成の特徴：子宮内膜癌では高分化型類内膜腺癌および低分化型類内膜腺癌、子宮頸癌では扁平上皮癌および腺癌、卵巣癌では漿液性癌、粘液性癌、類内膜癌、明細胞癌組織および培養細胞について、糖脂質組成を体系的に分析する。

(2) 糖鎖遺伝子導入による糖鎖改変と抗がん剤耐性：正常子宮内膜分泌期の腺構造形成時、および高分化型子宮内膜癌をヌードマウス皮下移植した時のいずれにおいてもスルファチドの発現が見られる。このことは、腺構造形成を判断基準とする高分化型形質とスルファチドの発現が密接に関わっていることを示している。スルファチドを持たない子宮内膜癌由来細胞を用いて糖脂質硫酸基転移酵素 (GST) 遺伝子を導入する。遺伝子導入細胞と元の細胞の糖脂質組成を比較するとともに、抗がん剤に対する感受性、耐性について検討する。

(3) 子宮頸癌における癌の増殖・転移とガングリオシドの発現：子宮頸癌由来細胞の糖脂質組成では用いた全 7 種類の細胞から GM2 が検出されたが、子宮頸癌組織検体における検出頻度は約 3 割であった。このことは子宮頸癌由来細胞が培養中に GM2 合成を獲得した可能性を示しており、癌の増殖・転移とガングリオシドの発現について検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 各婦人科癌組織(子宮内膜癌、子宮頸癌、卵巣癌)における組織型による糖脂質組成の特徴：各婦人科癌組織を凍結乾燥後、全脂質成分をクロロホルム(C)メタノール(M)混合溶媒を用いて抽出。0.01-0.02 mg 乾燥重量相当の脂質抽出液と 0.5-1.2 μg コレステロールを TLC にスポットし、ヘキサン-エーテル-酢酸展開溶媒を用いて展開し、酢酸銅-リン酸試薬で発色する。コレステロールの発色スポットの濃度を測定し、標準コレステロールの検量線を用いて各組織、各細胞のコレステロール量を求めた。次に、0.5-1.0 mg 乾燥重量相当の脂質抽出液と 0.5-1.2 μg 標準糖脂質を TLC にスポットし、C/M/水(W), 65:35:8 (v/v), C/M/0.5% CaCl<sub>2</sub>-W, 55/45/10 (v/v) で展開後、オルシノール硫酸試薬で発色した。同様に、各スポットの R<sub>f</sub> 値を比較し、糖脂質の同定を行った後、スポット濃度を測定した。TLC、TLC 免疫染色を用い解析を進めた。

(2) 糖鎖遺伝子導入による糖鎖改変と抗がん剤耐性：スルファチドを持たない子宮体癌 SNG-II 細胞に硫酸基転移酵素 GST 遺伝子を導入し、遺伝子導入 SNG-II-GST 細胞を作成した。SNG-II と SNG-II-GST 細胞についてがん細胞の性質、糖脂質組成、抗がん剤感受性を調べた。抗がん剤はパクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチンを用いた。

(3) : 子宮頸癌における癌の増殖・転移とガングリオシドの発現 : 子宮頸癌におけるガングリオシドの発現を明らかにするために、扁平上皮由来 SKG-111b、腺癌由来 HCA-1、腺扁平上皮癌由来 HeLa、小細胞由来 HCSC-1 の細胞株をヌードマウスに表皮移植し、増殖させた。抗 GM2 (YHD-06) 抗体と、GD1a には反応せず GM3 と GM1b に反応する新規抗 GM3 (5H6) 抗体による定量的 TLC 免疫染色で、培養細胞と移植細胞との含有ガングリオシド量を比較した。

#### 4. 研究成果

(1) 各婦人科癌組織(子宮内膜癌、子宮頸癌、卵巣癌)における組織型による糖脂質組成の特徴 : 各婦人科癌組織(子宮内膜癌、子宮頸癌、卵巣癌)の組織型別の糖脂質組成を調べた。

子宮内膜癌組織の糖脂質組成は卵巣癌と類似していた。高分化型と低分化型類内膜癌の糖脂質組成の比較では中性糖脂質とガングリオシドの含有量に有意差はなかったがスルファチドは高分化型に高濃度であった。高分化型質の癌は低分化型に比べ、抗がん剤による治療効果が高いことが知られておりスルファチドが抗がん剤感受性・耐性の指標になる可能性示唆された。

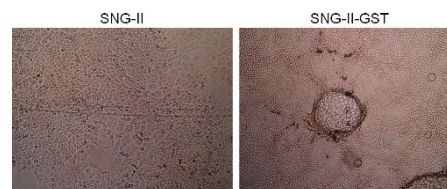
子宮頸癌(扁平上皮癌、腺癌)について糖脂質を比較すると、子宮頸癌組織のガングリオシドは GM3 がすべての組織サンプルに含まれる最大成分であり GM2 は 17 例中 6 例に含まれていたが、GalNAc-GM1b と GalNAc-GD1a は検出できなかった。スルファチドは腺癌組織に含まれていたが扁平上皮癌組織では検出されなかった。

卵巣癌組織(漿液性癌、粘液性癌、類内膜癌、明細胞癌)について糖脂質を比較すると、粘液腺癌にはスルファチド  $^{13}\text{SO}_3\text{-GalCer}$ 、 $^{11}\text{SO}_3\text{-LacCer}$  が例外なくすべてに含まれていた。漿液癌においては高分化型癌に高頻度に発現している傾向が見られた。26 シアリルパラグロポシドは漿液性卵巣癌に高発現し、相補的に各ルイス型糖脂質の発現は低かった。

(2) 糖鎖遺伝子導入による糖鎖改変と抗がん剤耐性 :

##### 1. SNG-II と SNG-II-GST 細胞

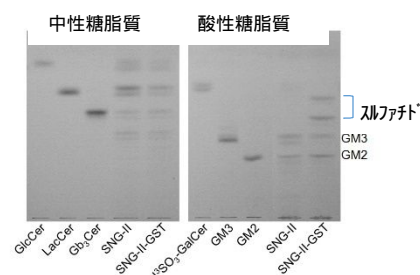
図に示すように、SNG-II は敷石状に増殖するのに対し、SNG-II-GST 細胞はコンフルエント時にドーム状構造を形成した。倍加時間は SNG-II が 24 時間、SNG-II-GST が 43 時間であり、トリプシン処理 (0.05%トリプシン、37 °C、10 分) 後の残存細胞数は SNG-II-GST が 5%、SNG-II-GST が 75%であった。ヌードマウス皮下に移植したところ、SNG-II は 15 匹中 12 匹に腫瘤が形成されるのに対し、SNG-II-GST は 15 匹中 3 匹であり、腫瘤の形態は SNG-II は未分化型、SNG-II-GST は高分化型であった。



SNG-II と SNG-II-GST の形態

##### 2. 糖脂質組成

約  $10^9$  個の細胞を集め、常法に従って中性、酸性糖脂質に分画し、両細胞の糖脂質組成を比較した。中性糖脂質は GlcCer、LacCer、Gb<sub>3</sub>Cer、Gb<sub>4</sub>Cer が主要成分であり、SNG-II-GST は SNG-II に比べ、GlcCer、LacCer が低濃度になっていた。酸性糖脂質は SNG-II が GM3、GM2 であるのに対し、SNG-II-GST は  $^{11}\text{SO}_3\text{-LacCer}$  (ラクトシルスルファチド)、 $^{11}\text{SO}_3\text{-Gg}_3\text{Cer}$ 、GM3、GM2 であった。硫酸化糖脂質が遺伝子導入によって新たに発現していることが確認できた。SNG-II-GST の GM3 濃度は SNG-II よりも低いことから、LacCer に硫酸基転

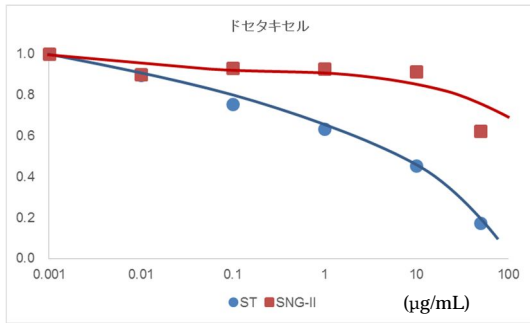
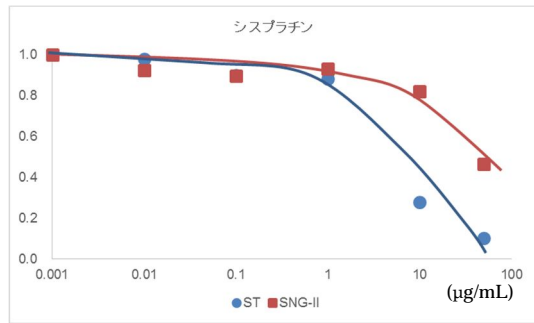
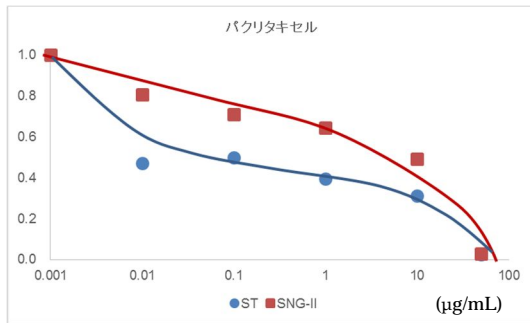


SNG-II と SNG-II-GST の糖脂質

移酵素が作用することによりシアラ酸転移酵素の見かけ上の活性低下が引き起こされていることが予想された。硫酸基転移酵素の活性が導入されることにより LacCer がラクトシルスルファチド合成に大量消費され、部分的な糖脂質組成の変化が誘導されることが分かった。SNG-II-GST の硫酸化脂質はガングリオシドの 1.5 倍となっていることが示された。

##### 3. 抗がん剤感受性

MTT 法により、異なる濃度の抗がん剤を作用させた時の生存細胞数を測定した。図に示すように、SNG-II-GST の方がいずれの抗がん剤に対しても感受性であった。SNG-II-GST 細胞の抗がん剤各濃度における生存細胞数を比較すると、シスプラチンは 10 μg/mL で急激に低下するのに対し、パクリタキセルは 0.01 μg/mL で 50%まで低下し、濃度を上げていくと徐々に生存細胞数は低下した。一方、ドセタキセルは 0.1 μg/mL からほぼ濃度依存的に低下した。



抗がん剤感受性試験 (μg/mL)

(3) : 子宮頸癌における癌の増殖・転移とガングリオシドの発現：扁平上皮由来 SKG-IIIb、腺癌由来 HCA-1、腺扁平上皮癌由来 HeLa、小細胞由来 HCSC-1 の細胞株をヌードマウスに表皮移植し、増殖させた。抗 GM2 (YHD-06) 抗体と、GD1a には反応せず GM3 と GM1b に反応する新規抗 GM3 (5H6) 抗体による定量的 TLC 免疫染色で、培養細胞と移植細胞との量を比較したところ、培養細胞と移植細胞では、GM1a と GM3、GM1b、そして GD1a に反応し、その量は減少した。HAC-1 細胞では GaINac-GD1a、HCA-1 細胞や HCSC-1 細胞では GaINac-GM1b が両細胞の主要なガングリオシドであったが、移植細胞では消失し、培養細胞では検出されなかった GM1b が検出された。ヌードマウスへの皮下移植により GaINac-GM1b を合成する GaINac 転移酵素が減弱していることが示された。同様に、すべての培養細胞に有意に高濃度で含まれていた GM2 は、その移植細胞では検出されず、GM2 の前駆体である GM3 の量が、主要なものである培養細胞よりも移植細胞 SKG-IIIb、HCA-1、HCSC-1 の方が多くなっていた。移植細胞中のガングリオシド組成は、転移細胞を含む数種類の子宮頸癌組織中のものと類似しており、細胞培養条件下で GM2 決定基を有するガングリオシドの発現が促進されることが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Tanaka K, Suzuki A, Aoki D, Iwamori M   | 4. 巻<br>36(3)         |
| 2. 論文標題<br>Characterization of a novel glycolipid with a difucosylated H-antigen in human blood group O erythrocytes with monoclonal antibody HMMC-1 and its detection in human uterine cervical carcinoma tissues                      | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Glycoconj J.  | 6. 最初と最後の頁<br>219-226 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s10719-019-09873-3   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |
| 1. 著者名<br>Tanaka K, Kiguchi K, Mikami M, A Aoki D, Iwamori M  | 4. 巻<br>32(4)         |
| 2. 論文標題<br>Involvement of the MDR1 gene and glycolipids in anticancer drug-resistance of human ovarian carcinoma-derived cells  | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Human cell  | 6. 最初と最後の頁<br>447-452 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s13577-019-00261-5   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |
| 1. 著者名<br>Tanaka K, Ishiwata I, Kubushiro K, Mikami M, Aoki D, Kiguchi K, Iwamori M   | 4. 巻<br>27(2)         |
| 2. 論文標題<br>Effective Selection of a Well-Differentiated Type of Human Uterine Endometrial Carcinoma Cells by Transfection of the Sulfotransferase Gene and Possible Association of Sulfoglycolipids with Well-Differentiated Phenotypes | 5. 発行年<br>2017年       |
| 3. 雑誌名<br>Int J Gynecol Cancer  | 6. 最初と最後の頁<br>267-273 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1097/IGC.0000000000000693.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中京子, 村上 功, 岩田 卓, 青木大輔, 岩森正男 |
| 2. 発表標題<br>卵巣癌由来細胞の糖脂質組成改変による抗腫瘍効果の変化   |
| 3. 学会等名<br>第77回日本癌学会学術総会                |
| 4. 発表年<br>2018年                         |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田中京子, 村上 功, 岩田 卓, 青木大輔, 岩森正男        |
| 2. 発表標題<br>抗HMMC-1抗体によるヒト子宮頸癌組織におけるジフコシルH抗原の検出 |
| 3. 学会等名<br>第76回日本癌学会学術総会                       |
| 4. 発表年<br>2017年                                |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 岩森 正男<br><br>(iwamori masao) |                       |    |

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 |
|---------|---------|