

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16841

研究課題名(和文) 卵巣癌における糖転移酵素C2GnT1発現と機能の解析

研究課題名(英文) The expression and function of C2GnT1 in ovarian carcinoma cells

研究代表者

山田 靖 (Yamada, Yasushi)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教

研究者番号：60646652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではO-グリカン鎖のcore2分枝構造を形成するcore 2 1-6 N-acetylglucosaminyl transferase 1 (C2GnT1)の卵巣癌細胞における発現と機能について検討した。卵巣癌組織のC2GnT1発現は治療抵抗性である明細胞癌や粘液性癌で強い傾向を認めた。細胞機能においてはC2GnT1高発現により、複数の卵巣癌細胞株で増殖能の亢進を認めた。また遊走能、浸潤能についても、複数の細胞株で機能亢進を認めた。これらの結果から、C2GnT1は卵巣癌においても悪性度上昇に関与しており、新規治療標的分子として有望であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで行われてきた卵巣癌の発癌・進展のメカニズムに関する研究は遺伝子産物である蛋白を中心になされており、糖鎖に関する研究は非常に少ない。しかし、細胞表面の糖鎖は免疫応答などで細胞同士の相互作用や接着にも実際に深く関与をしている分子であり、その構造や発現の違いで細胞機能が異なることが考えられる。本研究ではO-グリカン鎖のcore2分枝構造を形成するC2GnT1に注目しており、形成される糖鎖の構造や機能が解明できれば、これまでの蛋白をターゲットとする分子標的治療とは異なる機序での新たな治療法開発の基盤を開拓する可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the expression and function of core 2 1-6 N-acetylglucosaminyl transferase 1 (C2GnT1), which forms a core 2 branched structure on O-glycan, in ovarian cancer. Immunohistochemical staining revealed that the increased expression of C2GnT1 was observed in clear cell carcinoma and mucinous carcinoma, known as treatment-resistant types of ovarian carcinoma. The WST-1 assay demonstrated that the increased expression of C2GnT1 facilitates proliferation in several ovarian carcinoma cell lines. In addition, C2GnT1 accelerates the migration and invasion in several cell lines. These results suggest that C2GnT1 is involved in the elevation of malignant potential in ovarian carcinoma cells and is a promising molecule as a novel therapeutic target.

研究分野：産婦人科学

キーワード：C2GnT1 卵巣癌 O-グリカン鎖 遊走能

1. 研究開始当初の背景

日本の新規卵巣癌罹患患者は約 1 万人/年であり、卵巣癌死亡数は約 5000 人/年で約半数が原病死する予後不良の疾患である。卵巣癌の組織型のうち粘液性癌や、卵巣子宮内膜症性嚢胞より発生し特に日本人で発生割合の多い明細胞癌は、従来の細胞障害性抗癌剤の有効性が低いことが特徴であり、PARP 阻害薬の効果も望めない。このため新規分子標的薬・治療法の開発が必要である。

細胞表面にはタンパク質や脂質結合した糖鎖が無数に存在しており (Essentials of Glycobiology, 2nd ed.2009;p229)、核酸、蛋白につぐ第三の生命鎖として注目されている。これらの糖鎖は、細胞の成熟・分化、炎症や腫瘍形成など、多くの生物学的現象において重要な役割を果たしている (Fukuda M. Cancer Res 1996;56:p2237、Hakomori S. Cancer Res 1996;56:p5309)。糖鎖は癌の進展にも大きく関与していることが明らかになってきており、セレクチンの特異的リガンドであるシアル化ルイス x (sLex) は癌細胞で著しく発現が亢進しており、また癌細胞の内皮細胞への接着に関与して、悪性度を高めると考えられている (Kannagi et al. Cancer Sci 2004;95:p377)。

糖鎖は蛋白のような DNA に code される遺伝子産物ではなく、その構造は糖転移酵素によって決定される。これら糖鎖の形成には多数の糖転移酵素が関与しているが、Core 2 1-6 N-acetylglucosaminyl transferase 1 (C2GnT1) は O-グリカン鎖の core2 分枝構造の形成に係わり (Bierhuizen et al. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: p9326)、その分枝構造の先に sLex や poly-N-acetylglucosamine などの糖鎖構造が形成され、腫瘍細胞の悪性形質の獲得や、免疫回避に関与する可能性が考えられている (Tsuboi et al. EMBO J 2011;30:p3173)。近年、前立腺癌 (Hagisawa et al. Glycobiology 2005;15:p1016、Sato et al. Biochem Biophys Res Commun 2016; 470:p150)、精巣癌 (Hatakeyama et al. Int J Cancer 2010;127:p1052) や膀胱癌 (Tsuboi et al. EMBO J 2011;30:p3173) において、C2GnT1 高発現と悪性度上昇や生存期間短縮への関連が報告され、C2GnT1 と癌悪性度や予後不良との強い関連が明らかになりつつある。我々は、子宮内膜癌において C2GnT1 発現を検討したところ、高発現が深い筋層浸潤や予後不良と関連することを見出した (Miyamoto et al. Histopathology 2013;62:p986-93)。そこで本研究では卵巣癌における C2GnT1 発現とその機能について検討する。本研究で卵巣癌における C2GnT1 と細胞学的悪性度の関連を明らかにし、C2GnT1 で形成される糖鎖の構造や機能が解明できれば、これまでの蛋白をターゲットとする分子標的治療とは異なる機序での新たな治療法開発の基盤を開拓する可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

卵巣癌組織における C2GnT1 発現状況を明らかにし、予後や臨床病理学的因子との関連を検討する。また、卵巣癌細胞株を用いて、C2GnT1 発現の細胞機能への影響を検討することにより、卵巣癌における C2GnT1 発現の意義を明らかにすることを目的とする。そして、C2GnT1 が分子マーカーや治療標的となる可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) C2GnT1 発現の免疫染色による検討

文書での同意を得て採取された卵巣癌 16 例 (漿液性癌 4 例、粘液性癌 4 例、類内膜癌 4 例、明細胞癌 4 例) のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を用いて、抗 C2GnT1 抗体 (rabbit polyclonal, Miyamoto et al. Histopathology 2013) を一次抗体として用い、ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体ポリマーを用いた間接法による免疫染色を行った。染色強度は 500 細胞中の陽性細胞の割合で評価した。

(2) C2GnT1 遺伝子導入による C2GnT1 高発現卵巣癌細胞の作成

卵巣癌細胞株のうち、癌性腹水由来腺癌細胞株 (OVCAR3)、漿液性癌細胞株 (A2780, SKOV3)、明細胞癌細胞株 (ES-2, RMG1, OVTOKO) に C2GnT1 cDNA を組み込んだ発現 vector (pcDNA3) を導入し、C2GnT1 高発現細胞を作成した。また、empty vector 導入細胞 (mock) と遺伝子未導入細胞 (WT) をコントロールとして用いた。

(3) C2GnT1 高発現による細胞機能変化の検討

上記の細胞を用いて、細胞機能解析を行った。まず、96well plate の各 well に 1000 細胞ずつ撒き、6 時間後に細胞が接着したことを確認し、その時点をも 0 時間 (h) として 0h, 24h, 48h, 72h と経時的に生存細胞を WST-1 assay で測定することにより、細胞の増殖能を比較した。transwell migration assay を用いて 24 時間後に小孔を通じて membrane 裏側に遊走した細胞数を計測することで遊走能を比較した。また、Wound healing assay によっても遊走能を検討した。さらに細胞の浸潤能に関しては Matrigel invasion assay を用い、24 時間後に membrane 裏側に浸潤した細胞数を計測することで比較した。

4. 研究成果

(1) 組織型による C2GnT1 発現の違い

C2GnT1 は主にゴルジ体に存在することから、免疫染色では核近くの細胞質にドット状に染色される。このドット状染色を陽性として、陽性細胞の割合を計測した。C2GnT1 染色は組織型で異なり、特に漿液性癌で弱く、粘液性癌、明細胞癌で高発現が観察され (図 1)、特に明細胞癌

では漿液性癌と比較し、有意に高発現であった。(P<0.05, Mann-Whitney U test)

(2) 培養細胞における C2GnT1 発現増強の確認

C2GnT1 cDNA を導入した C2GnT1 細胞は、WT 細胞、mock 細胞と比較して 5 倍以上 C2GnT1 mRNA 発現が増強していることを、6 つの卵巣癌細胞株全てにおいて確認した。また 6 つの細胞株のうち OVTOKO 細胞では、他の細胞株と比較して、C2GnT1 発現が 1/50 程度と特に発現が低く、C2GnT1 細胞であっても他の細胞株の WT、mock より発現が低い状態であった。

(3) C2GnT1 の増殖能への影響

OVCAR3、RMG1、A2780 細胞では、C2GnT1 発現増強により増殖能の増強傾向が観察され、特に OVCAR3、RMG1 細胞では有意な細胞増殖能亢進を認めた。(図 2、P<0.05) 一方、OVTOKO、SKOV3、ES2 では、変化を認めなかった。

(4) C2GnT1 の遊走能への影響

Transwell migration assay では、C2GnT1 発現増強により OVCAR3、ES2、A2780 細胞での遊走能の増強が観察された。特に OVCAR3 細胞での membrane 毎の遊走細胞数の平均値は WT 49、mock 24、C2GnT1 113 であり、有意差を認めた。(P>0.05) (図 3) 一方、OVTOKO 細胞では遊走能に変化を認めなかった。

Wound healing assay においては、OVCAR3、ES2、SKOV3 細胞では C2GnT1 細胞で wound の狭小化が亢進していたが、OVTOKO 細胞では変化を認めなかった。

(5) C2GnT1 の浸潤能への影響

Matrigel invasion assay では、C2GnT1 発現増強により OVCAR3、ES2 細胞での浸潤能の増強が観察された。特に ES2 細胞での membrane 毎の浸潤細胞数の平均値は WT 122、mock 136、C2GnT1 209 であり、WT と C2GnT1 の間に有意差を認めた。(P>0.05) (図 4) 一方、A2780、OVTOKO 細胞では浸潤能に変化を認めなかった。

卵巣癌において C2GnT1 発現は、特に治療抵抗性である明細胞癌や粘液性癌で特に発現が強い傾向が認められた。また培養細胞による検討では、C2GnT1 発現増強により増殖・浸潤・遊走といった癌の悪性度に関わる機能の亢進が観察された。一方 OVTOKO 細胞では C2GnT1 発現増強の効果も認められなかったが、もともとの発現が非常に弱く、C2GnT1 cDNA 導入によっても十分な発現増強が得られていないことが理由として考えられた。

以上の結果から、C2GnT1 は卵巣癌治療の新規治療標的として有望であると考えられた。

C2GnT1 陽性細胞率 (%)

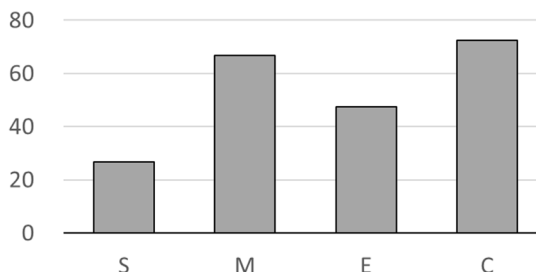


図 1 : 組織型毎の C2GnT1 免疫染色結果 漿液性 (S)、粘液性 (M)、類内膜 (E)、明細胞 (C) の各卵巣癌組織型において、腫瘍の 500 細胞中の陽性細胞の割合の平均値を示す。

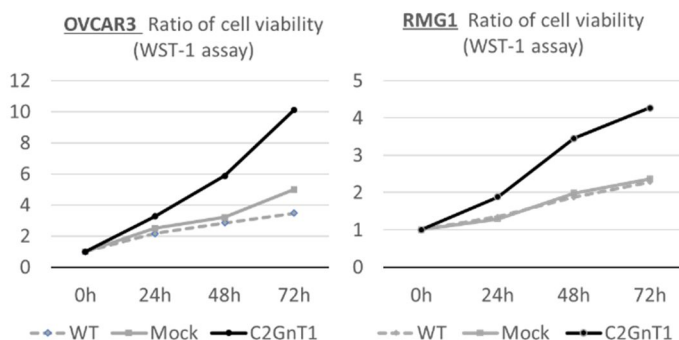


図 2 : C2GnT1 発現増強の細胞増殖 (cell viability 増加) への影響 (WST-1 assay) OVCAR3、RMG1 細胞では vector 導入なし (WT)、空 vector 導入 (Mock) に比較して C2GnT1 cDNA 導入 (C2GnT1) により細胞増殖能の増強を認める。

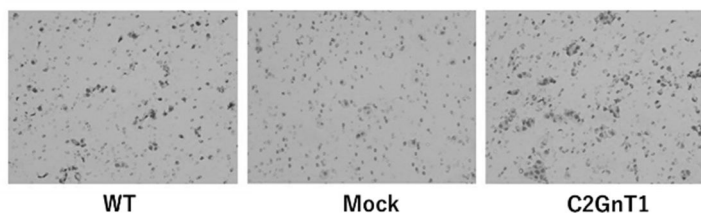


図 3 : Transwell migration assay 結果 (OVCAR3 細胞) WT、Mock に比較して、C2GnT1 導入 (C2GnT1) により細胞遊走能の増強を認める。

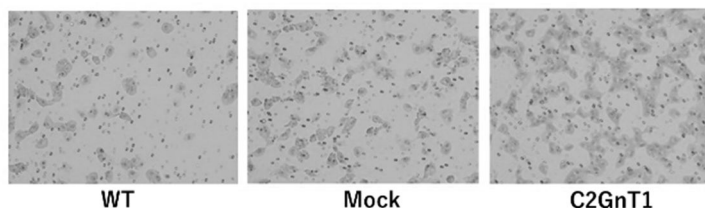


図 4 : Matrigel invasion assay 結果 (ES2 細胞) WT、Mock に比較して、C2GnT1 導入 (C2GnT1) により細胞浸潤能の増強を認める。

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