

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K19627

研究課題名（和文）ムチンプロファイル解析による粘液線維肉腫の悪性形質発現機能の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of malignant traits in myxofibrosarcoma by mucin profile analysis

研究代表者

亀山 昭彦（Akihiko, Kameyama）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：80415661

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：粘液線維肉腫は症例数が少なく1例のみの実験結果であるが、組織には大量のヒアルロン酸が含まれていることを明らかにした。この疾患の病変部位が産生する粘液はムチンに由来するものではなくヒアルロン酸であることが示唆された。一方、唾液腺の粘表皮癌ではいずれもムチンの一種であるMUC1が産生されており、そのMUC1にはシアル酸を有するコア2型の糖鎖が多く含まれていることを明らかにした。組織切片を用いた解析から、これらのMUC1は悪性腫瘍部の粘液産生細胞および非粘液産生細胞に発現されており、コア2型糖鎖を合成する遺伝子であるC2GnTの発現もMUC1陽性部と一致していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ムチンは通常のプロテオミクス的手法で分析することができず、近年のオミクス技術による進歩からも取り残された未開拓領域となっている。本研究では独自に開発した分子マトリックス電気泳動を用いて、ムチンに着目した粘液産生性腫瘍のバイオマーカー探索研究を行った。中高齢者に好発する粘液線維肉腫や唾液腺の粘表皮癌はいずれも外科的切除が現在唯一の治療法であるが、本研究で見出された特異的マーカーの研究を推し進めることによって治療用抗体の創出など新たな治療法の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：Although the number of cases of myxofibrosarcoma was small and only one case was tested, it was found that the tissue contained a large amount of hyaluronic acid. This suggests that the mucus produced by the lesions in this disease is not derived from mucin but from hyaluronic acid. On the other hand, mucoepidermoid carcinoma of salivary glands produced MUC1, which contained a large amount of sialic acid-containing core-2 glycans. Analysis of tissue sections revealed that these MUC1 were expressed in both mucus-producing and non-mucus-producing cells in the malignant areas, and the expression of C2GnT, a gene that synthesizes core-2-glycans, was also consistent with MUC1-positive areas.

研究分野：糖鎖解析学

キーワード：ムチン 粘液線維肉腫 粘表皮癌 糖鎖 ヒアルロン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ムチンは動物の粘膜や粘液に含まれる粘性の高い糖タンパク質であり、粘膜上皮の保護や潤滑物質としての役割を担うほか、体内と体外のインターフェースにおいて感染防御や免疫応答、さらには炎症や発がんに関与する分子である。ムチンの分子量は数 MDa にも及び、糖鎖部分はその分子量の 5~8 割を占めるため通常のプロテオミクス的手法で分析することができず、ムチンは近年のオミクス技術による進歩からも取り残された未開拓領域となっている。研究代表者は、独自のムチン解析法である分子マトリックス電気泳動法(SMME)を開発した(Anal Chem, 81:3816, 2009)。その後、本法の技術的な側面の改良を重ね、糖鎖解析法、化学反応を組み合わせた新規ムチン染色法(Anal Chem, 84:8461, 2012)、抗体染色法(J Immunol Methods, 394:125, 2013)、赤外イメージング(Electrophoresis Lett, 59: 97, 2015)、透明化処理法などの開発を経てムチンプロファイル解析法を確立した。今後は、この技術を活用して臨床応用へ結びつく成果を目指す段階になっている。

中高齢者の四肢に好発する粘液線維肉腫は、高齢者人口が増加していることを背景に増加傾向にある。粘液線維肉腫に対する治療では、放射線療法や化学療法の有用性は認められていないため、外科的切除が唯一の根治的治療となる。そして粘液線維肉腫の臨床上の最大の問題は、その浸潤性格による外科的切除後の高い再発率である。そのため粘液線維肉腫の予後の改善のためには、本腫瘍の高い浸潤性の分子メカニズムの解明が必須かつ急務であり、その研究成果はより精度の高い外科的切除を施行するための腫瘍浸潤性評価バイオマーカーとしての応用、さらには新規創薬治療ターゲットとしての応用が期待される。過去の報告から粘液線維肉腫が有する粘液腫瘍間質ムチンの量が本腫瘍の浸潤性や再発率に関与することが示唆されていたが(Histopathology, 62:287, 2013)、ムチンはプロテオーム解析では分析できないため研究は全く進展していなかった。

2. 研究の目的

以上のような背景と経緯から、本研究では、SMME を活用して粘液線維肉腫をはじめとする粘液産生性の腫瘍におけるムチンの解析を行い、ゲノム・プロテオーム解析などの従来の研究では得られなかった粘液産生性腫瘍に関する新たな疾患概念の確立や、その発生、浸潤性に関わる分子機構の解明、さらには新たな血清診断マーカーの発見を目指す。

3. 研究の方法

(1) 試料

粘液線維肉腫および唾液腺腫瘍の組織はそれぞれ慶應義塾大学医学部倫理委員会、東京歯科大学市川総合病院倫理審査委員会の承認を得た上で、国立研究開発法人産業技術総合研究所生命倫理委員会の承認を得て使用した。

(2) SMME による粘液成分の分離分析

凍結組織 (50-100 mg) をアセトン中でホモジネートし、上清を除去して乾燥後に得られたアセトン粉末からムチン類を抽出した。このムチン溶液を SMME に供して分離分析を行った。泳動条件は、ピリジン ギ酸緩衝液(pH 4.0)にて 1 mA/cm の定電流で 30 分間泳動した。泳動後、SMME 膜をアルシアンブルーで染色した。

(3) レクチンおよび抗体等の特異的結合分子による粘液成分の特性解析

上記の方法で泳動分離した SMME 膜に固定化処理を施しブロッキングした後、ビオチン標識した各種レクチン類または各種抗体類の溶液を SMME 膜とともにインキュベートした。その後、SMME 膜を洗浄しペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジン溶液とともにインキュベートし、化学発光基質を添加して化学発光撮影装置により発光画像を取得した。

(4) 質量分析計によるムチン糖鎖の解析

ムチン類をアルシアンブルーで染色した SMME 膜からムチンのバンドを切り取り、還元 脱離法によりムチンから O 型糖鎖を遊離させた。その後、O 型糖鎖を完全メチル化し、MALDI-TOF MS および MALDI-QIT-TOF MS を用いて糖鎖解析を行った。

(5) 組織切片における特異分子の局所発現解析

ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)切片を用いて抗シアリル Tn 抗体、抗 MUC1 抗体による免疫組織染色(IHC)を行なった。またコア 2 型糖鎖の発現についてはこの糖鎖を合成する遺伝子である C2GnT の発現を FFPE 切片を用いた In situ hybridization(ISH)にて分析した。

4. 研究成果

(1) 粘液線維肉腫の粘液成分

浸潤性粘液線維肉腫のムチンプロファイル解析を行った。浸潤性粘液線維肉腫ではムチンはほとんど分泌されておらず、一方でヒアルロン酸が大量に発現されていることを明らかにした(図1)。腫瘍組織から抽出したタンパク質を SMME で分離し、ヒアルロン酸結合タンパク質で染色したところ、ヒアルロン酸のバンドの他、試料をアプライした原点も染色された。このことから、この腫瘍組織にはヒアルロン酸のみならずヒアルロン酸に結合するタンパク質が多く含まれていることが示唆された。

Alcian blue染色 ヒアルロン酸結合蛋白による染色

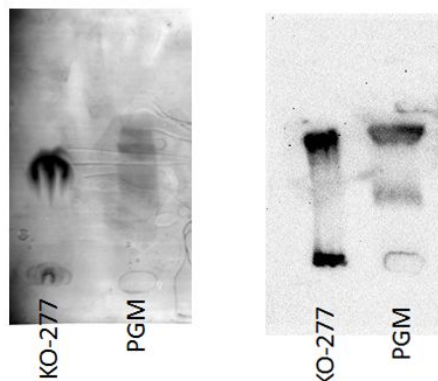


図1. SMMEで分離した粘液線維肉腫の粘液成分の染色
KO-277(粘液線維肉腫)、PGM(ブタ胃ムチン)

(2) 粘表皮癌の粘液成分

唾液腺粘表皮癌 3 例(No.1-3)および正常唾液腺 6 例(No.4-10)の凍結組織からムチンを抽出し、SMME にて分析した。抗 MUC1 抗体で SMME 膜を染色したところ、粘表皮癌全例で MUC1 の発現を認めた(図2)。Alcian blue 染色では粘表皮癌 3 例全てにおいて酸性ムチンの位置のバンドを認めた。正常唾液腺においてもいくつか Alcian blue で染色されるバンドは検出されたが、抗 MUC1 抗体で染色されるものは粘表皮癌のみであった。なお、HPAF-II は MUC1 を含有する細胞株でありポジティブコントロールとして使用した。

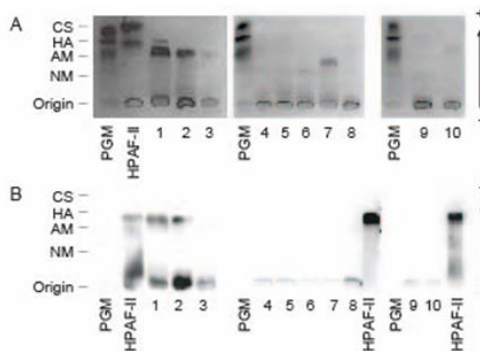


図2. SMMEによる粘表皮癌の分析
A: Alcian blue染色、B: 抗MUC1抗体染色
1-3:粘表皮癌、4-10:正常唾液腺部位

(3) 粘表皮癌の MUC1 に特徴的な糖鎖

唾液腺粘表皮癌3例の凍結組織からムチンを抽出しSMMEで分離したムチンを、シアル酸を認識するレクチン(MAL-IIおよびSSA)と、フコースを認識するレクチン(BC2LCNおよびAAL)を用いて染色した。その結果、正常唾液腺と粘表皮癌のどちらのムチンもフコース認識レクチンでは陽性となったが、2-3シアル酸を認識するMAL-IIは粘表皮癌でのみ陽性となった(図3)。一方、2-6シアル酸を認識するSSAではいずれも染色されなかった。これらの結果より、粘表皮癌の MUC1 には 2-3シアル酸が存在していることが示唆された。

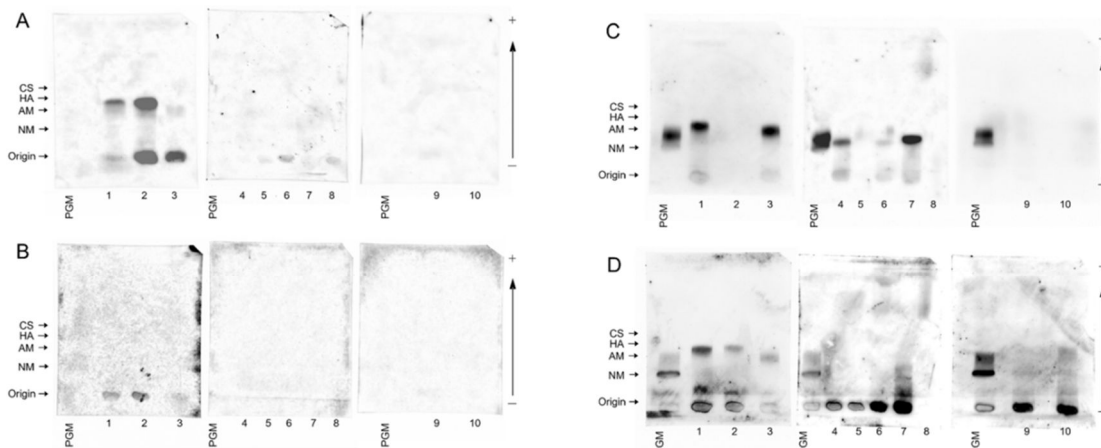


図3. SMMEによる粘表皮癌の分析(レクチン染色)
(A) MAL-II; (B) SSA; (C) BC2LCN; (D) AAL.
1-3:粘表皮癌、4-10:正常唾液腺部位

次に SMME で分離した後、Alcian blue で染色された各ムチンのバンドの糖鎖分析を行った。図 4A に示すバンドを切り取り、方法欄に記載の方法で糖鎖解析を行った。結果を図 4B のヒートマップにまとめた。検出された糖鎖の組成は表 1 にまとめた。粘表皮癌の MUC1 はほぼ全てシアル

酸を含む糖鎖(No.1-19)で構成されており、特にシアル酸を有するコア 2 型の糖鎖構造(No.8, 14)が多量に含まれることを明らかにした。一方、正常唾液腺のムチンにはシアル酸を含む糖鎖とともに中性糖鎖が多量検出された。

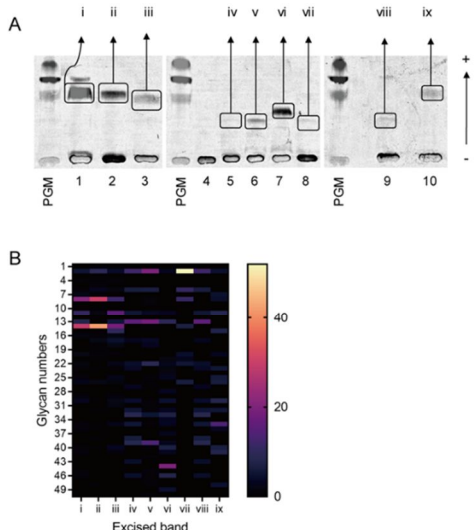


図4. SMMEにて分離したムチンの糖鎖解析
A: 解析に供したバンド、B: 検出された糖鎖のヒートマップ
1-3:粘表皮癌、4-10:正常唾液腺部位

表1. 検出された糖鎖の組成式

Glyca nNo	Composition (Acidic glycans)	Calcd		Glyca nNo	Composition (Neutral glycans)	Calcd	
		m/z	m/z			m/z	m/z
1	(HexNAc) ₁ (NeuAc)	691.36	691.37	20	(Hex) ₂ (HexNAc)	534.29	534.28
2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc)	895.46	895.49	21	(HexNAc)	575.32	575.18
3	(HexNAc) ₂ (NeuAc)	936.49	936.54	22	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	708.38	708.40
4	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc)	1069.55	1069.58	23	(Hex) ₂ (HexNAc)	779.41	779.44
5	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc)	1140.59	1140.64	24	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	912.48	912.46
6	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc)	1256.64	1256.67	25	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	953.50	953.54
7	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc)	1314.68	1314.71	26	(Hex) ₂ (HexNAc)	983.52	983.57
8	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc)	1344.69	1344.74	27	(Hex) ₂ (HexNAc)	1024.54	1024.59
9	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₂ (NeuAc)	1447.74	1447.79	28	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1086.57	1086.53
10	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc)	1501.76	1501.81	29	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1127.59	1127.63
11	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc)	1518.78	1518.82	30	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1157.60	1157.64
12	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc)	1589.82	1589.86	31	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1198.63	1198.69
13	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc)	1692.87	1692.89	32	(Hex) ₂ (HexNAc)	1228.64	1228.68
14	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc)	1705.86	1705.88	33	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1331.69	1331.75
15	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc)	1763.90	1763.94	34	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1361.70	1361.66
16	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc)	1793.92	1793.90	35	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1402.73	1402.78
17	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc)	1879.95	1880.01	36	(Hex) ₂ (HexNAc)	1432.74	1432.75
18	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc)	1937.99	1938.03	37	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1464.76	1464.69
19	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc)	1950.99	1951.06	38	(Hex) ₂ (HexNAc)	1473.77	1473.83
				39	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1505.78	1505.81
				40	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1576.82	1576.85
				41	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1606.83	1606.82
				42	(Hex) ₂ (HexNAc)	1636.84	1636.94
				43	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1647.88	1647.88
				44	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1709.88	1709.81
				45	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1730.91	1730.96
				46	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1780.92	1780.95
				47	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1821.95	1822.05
				48	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1851.96	1852.00
				49	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1935.01	1934.90
				50	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose)	1996.01	1996.10

^a All signals were calculated as [M + Na]⁺ ions.

^b The observed m/z values are the averages of the corresponding signals detected in all spectra.

(4) 粘表皮癌組織における特徴的な MUC1 の局所発現部位

特徴的な糖鎖を有する MUC1 の組織内における局在を明らかにするため、粘表皮癌 3 例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片を用いて免疫組織染色 (IHC) を行なった。その結果、悪性腫瘍部では MUC1 は 3/3 例において粘液産生細胞および非粘液産生細胞に陽性を認め、従来から知られているがん関連糖鎖抗原シアリル Tn は 1/3 例に粘液産生細胞および非粘液産生細胞での陽性、2/3 例では部分的な陽性を認めた。正常唾液腺部では MUC1 は 2/3 例に導管での陽性を認め、1/3 例に導管での弱陽性を認めた。正常唾液腺部でのシアリル Tn は 1/3 例に腺房での部分的な陽性を認めた。正常唾液腺部にてシアリル Tn の部分的な陽性を認めた症例ではシアリル Tn 陽性部に強度の炎症所見が認められ、炎症との関連が示唆された。

コア 2 型糖鎖の発現についてはこの糖鎖を合成する遺伝子である C2GnT の発現を粘表皮癌 3 例の FFPE 切片を用いた In situ hybridization (ISH) にて分析した。その結果、C2GnT は悪性腫瘍部では 3/3 例に粘液産生細胞および非粘液産生細胞に陽性を認め、正常唾液腺部では 3/3 例が腺房、導管とも陰性であった。C2GnT の発現は悪性腫瘍部において MUC1 陽性部と一致を認めた。

(5) まとめと今後の展望

粘液線維肉腫は症例数が少なく 1 例のみの実験結果であるが、組織には大量のヒアルロン酸が含まれており、この疾患の病変部位が産生する粘液はムチンに由来するものではなくヒアルロン酸であることが示唆された。ヒアルロン酸の蓄積と腫瘍の悪性度の相関については数多くの論文があり、ヒアルロン酸の分子サイズによる機能の違いも報告されている。今後は、粘液線維肉腫が産生するヒアルロン酸の分子量と、浸潤性や増殖能との関連を調べていく必要があると考えられる。

一方、唾液腺の粘表皮癌ではいずれもムチンの一種である MUC1 が産生されており、その MUC1 にはシアル酸を有するコア 2 型の糖鎖が多く含まれていた。組織切片を用いた解析からこれらの MUC1 は悪性腫瘍部の粘液産生細胞および非粘液産生細胞に発現されており、コア 2 型糖鎖を合成する遺伝子である C2GnT の発現も MUC1 陽性部と一致していた。特定の糖鎖を有する MUC1 はすい臓癌や肺腺癌、中皮腫などの血清マーカーとして利用されている。粘表皮癌についても本研究で見出された糖鎖を有する MUC1 がマーカーになる可能性があると思われる。ただし、この MUC1 が唾液中や血清中に漏出するかどうかは現時点では不明であり、今後の研究の課題の一つである。また組織マーカーとして創薬に利用することも考えられるが、いずれにしろこの糖鎖を有する MUC1 を特異的に認識する優れた抗体の開発が必須である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Isaka Eisaku, Sugiura Takanori, Hashimoto Kazuhiko, Kikuta Kazutaka, Anazawa Ukei, Nomura Takeshi, Kameyama Akihiko	4. 巻 22
2. 論文標題 Characterization of tumor-associated MUC1 and its glycans expressed in mucoepidermoid carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.12963	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 Kameyama Akihiko, Yamakoshi Kimi, Watanabe Atsushi	4. 巻 1867
2. 論文標題 A rapid separation and characterization of mucins from mouse submandibular glands by supported molecular matrix electrophoresis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 76 ~ 81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbapap.2018.05.006	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 Sugiura Takanori, Hashimoto Kazuhiko, Kikuta Kazutaka, Anazawa Ukei, Nomura Takeshi, Kameyama Akihiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Expression and localisation of MUC1 modified with sialylated core-2 O-glycans in mucoepidermoid carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-32597-2	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 Isaka Eisaku, Sugiura Takanori, Hashimoto Kazuhiko, Kikuta Kazutaka, Anazawa Ukei, Nomura Takeshi, Kameyama Akihiko	4. 巻 66
2. 論文標題 Glycan analysis of salivary gland tumor; Mucoepidermoid carcinoma and tumor associated MUC1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Electrophoresis Letters	6. 最初と最後の頁 67 ~ 70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2198/electroph.66.67	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 杉浦貴則, 井坂栄作, 橋本和彦, 菊田一貴, 穴澤卯圭, 野村武史, 亀山昭彦
2. 発表標題 分子マトリックス電気泳動を用いた粘表皮癌におけるMUC1の糖鎖解析とその局在
3. 学会等名 第45回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井坂栄作, 杉浦貴則, 橋本和彦, 菊田一貴, 穴澤卯圭, 野村武史, 亀山昭彦
2. 発表標題 粘表皮癌が発現する腫瘍関連MUC1とその糖鎖の特性
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉浦貴則, 井坂栄作, 橋本和彦, 菊田一貴, 穴澤卯圭, 野村武史, 亀山昭彦
2. 発表標題 粘表皮癌の有する特徴的な糖鎖のレクチンプロット解析とその局在
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 亀山昭彦, 山越貴水, 渡邊淳
2. 発表標題 分子マトリックス電気泳動を用いた顎下腺ムチン分析法
3. 学会等名 第68回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----

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