

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02702

研究課題名（和文）新規抗硫酸化糖鎖抗体の卵巣癌病理診断と光免疫療法への応用

研究課題名（英文）Novel anti-sulfated glycan antibodies for ovarian cancer pathology diagnosis and photoimmunotherapy

研究代表者

小林 基弘（Kobayashi, Motohiro）

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：00362137

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,900,000円

研究成果の概要（和文）：われわれは、ガラクトースが硫酸化されたN-アセチルラクトサミン構造を認識する新規抗硫酸化糖鎖抗体297-11Aを作製し、卵巣癌病理組織検体の臨床病理学的解析を行った。その結果、297-11A陽性例は漿液性癌に多く、その発生母地と考えられている正常卵管上皮分泌細胞にも発現していることを明らかにした。また、297-11A硫酸化糖鎖陽性の卵巣癌患者は、陰性の患者に比べて無増悪生存期間が有意に短いことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣漿液性癌は卵管上皮を構成する分泌細胞の過剰増殖を引き金に発生すると考えられているが、漿液性癌細胞に加えて、この分泌細胞も297-11A抗体で陽性に染色されるという今回の結果は、この考えをさらに支持するものである。また、297-11A陽性の患者は陰性の患者よりも無増悪生存期間が有意に短いことから、卵巣癌治療における予後予測や、新規治療開発の標的として有望であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We generated a novel anti-sulfated carbohydrate antibody, 297-11A, which recognizes galactose-sulfated N-acetylglucosamine structures, and performed clinicopathological analysis of ovarian cancer histopathological specimens. The results showed that 297-11A-positive cases were frequently observed in serous carcinomas, and that it was also expressed in normal fallopian tube epithelial secretory cells, which are considered to be the origin of such carcinomas. In addition, we found that progression-free survival was significantly shorter in 297-11A-sulfated glycosylation-positive ovarian cancer patients than in negative patients.

研究分野：糖鎖病理学

キーワード：卵巣癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は婦人科領域で最も死亡者数の多い疾患であり、本邦では毎年約 10,000 人が罹患し、そのほぼ半数に相当する約 4,500 人が死亡している。卵巣癌は漿液性癌、粘液性癌、類内膜癌、明細胞癌などに分類されるが、組織型ごとにその発生の分子生物学的機序が異なることに加え、抗がん剤への感受性も異なることから、組織型ごとに最適な治療戦略を立てる必要がある。

2. 研究の目的

われわれは、硫酸化糖鎖の構造を簡単に区別するツールとしての抗硫酸化糖鎖抗体の作製を試みた。ガラクトースの硫酸化に必須の酵素であるケラタン硫酸ガラクトース 6 硫酸転移酵素 (KSGal6ST) の遺伝子欠損マウスを、この遺伝子を強制発現させた HEK293T 細胞で免疫してハイブリドーマを作製し、ガラクトースの 6 位が硫酸化された *N*-アセチルラクタミン構造を特異的に認識する 297-11A 抗体を作製することに成功した。このユニークな硫酸化糖鎖は卵巣癌に選択的に発現しており、消化器癌をはじめとする他臓器の癌には発現していないことから、原発不明癌における原発の推定に有用なマーカーとなる可能性がある。さらに、卵巣癌 60 症例を対象とした予備実験では、297-11A 陽性卵巣癌は、297-11A 陰性卵巣癌に比べて無増悪生存期間、全生存期間とも有意に短いというデータが得られたことから、卵巣癌の悪性度を評価する新規マーカーとなる可能性がある。以上の仮説を検証するために、以下に述べる卵巣癌組織(および細胞株)の病理組織学的、臨床病理学的、分子生物学的解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌の臨床病理学的解析

福井大学医学部附属病院で過去に外科手術が行われ、予後追跡が可能な卵巣癌 98 症例を対象に、手術材料のパラフィン包埋組織切片を用いて、297-11A 抗体を用いた免疫染色を行った。組織型と染色性の関係を明らかにするとともに、297-11A 硫酸化糖鎖の生合成に関する KSGal6ST をはじめとする糖鎖遺伝子の発現パターンを解析した。また、卵巣癌症例を 297-11A 陽性群と陰性群に分け、この 2 群間における無増悪生存期間、および全生存期間の差を Kaplan-Meier 法で解析した。

(2) 卵巣癌細胞株の樹立とその分子生物学的解析

福井大学医学部附属病院の卵巣癌手術検体から可能な限り多くの卵巣癌細胞株を樹立し、297-11A 硫酸化糖鎖がどのようにして癌の悪性度を高めているのかを明らかにすることを目標にした。具体的には、卵巣癌細胞株における 297-11A 硫酸化糖鎖の発現を分子生物学的に解析した。卵巣癌細胞の多くは糖タンパク質腫瘍マーカーである CA125 を発現しているが、そのムチンコアタンパク質である MUC16 は 297-11A 硫酸化糖鎖による糖鎖修飾を受けている可能性が高いと考えられる。そこで、既存の卵巣癌細胞株 (OVCAR-3) に加えて、われわれの手で樹立した卵巣癌細胞株から膜タンパク質を抽出し、MUC16 をはじめとするムチンコアタンパク質上の硫酸化糖鎖の構造を、質量分析 (MALDI-TOF MS、および MS/MS) を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 297-11A 硫酸化糖鎖は主に漿液性癌と類内膜癌で発現している

図 1 に示すように、漿液性癌 (serous carcinoma; 42 例)、類内膜癌 (endometrioid carcinoma; 19 例)、粘液癌 (mucinous carcinoma; 10 例)、明細胞癌 (clear cell carcinoma; 27 例) からなる合計 98 例の卵巣癌症例を免疫組織科学的に解析した結果、各組織型において 297-11A 硫酸化糖鎖を発現している症例が占める比率は、漿液性癌と類内膜癌の二つで明細胞癌に比べて高いことが明らかになった。これ以外の組み合わせはいずれも明らかな差は認められなかった。

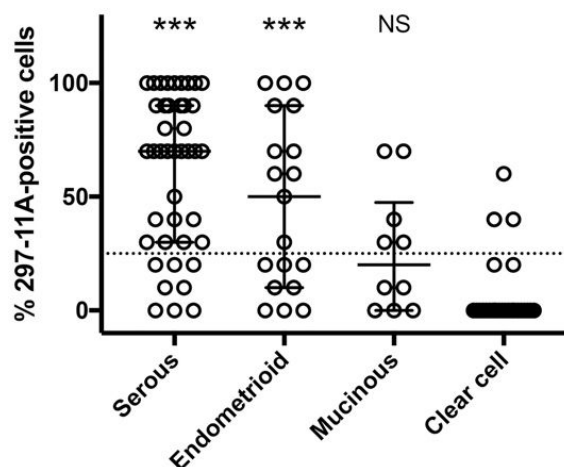


図 1 組織型による 297-11A 発現の違い

(2) 297-11A 硫酸化糖鎖は卵管上皮の分泌細胞に特異的に発現している

図2に示すように、正常卵管上皮は線毛細胞(矢印)と分泌細胞(矢頭)の2種類の細胞から構成されている。これまでの研究で、分泌細胞はBCL-2を特異的に発現していることが知られている。そこでわれわれは、正常卵管の連続組織切片で、297-11AとBCL-2の免疫染色を行った。その結果、BCL-2の染色結果と同様、297-11Aは分泌細胞のみに特異的に染色された。以上の結果は、漿液性癌に加えて、その発生母地とされている卵管分泌細胞も297-11A硫酸化糖鎖を発現しており、漿液性癌の発生母地が卵管分泌細胞であることをさらに裏付ける結果となった。

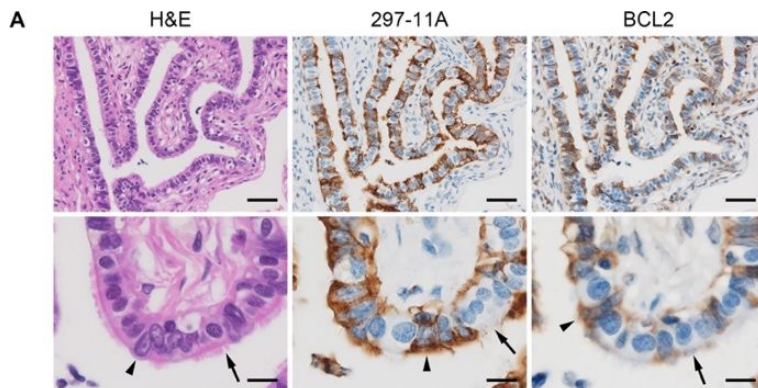


図2 分泌細胞特異的な297-11Aの発現

(3) 硫酸転移酵素 KSGal6STは卵巣癌における297-11A硫酸化糖鎖の生合成に必須である

次にわれわれは、漿液性癌および正常卵管の組織切片に対して、297-11A抗体とGalの6位の炭素に硫酸基を転移する硫酸転移酵素KSGal6STに対する抗体を用いた蛍光二重免疫染色を行った。図3に示すように、297-11A硫酸化糖鎖を発現する漿液性癌のゴルジ装置にKSGal6ST酵素タンパクが発現していた(上段)。この酵素の発現は前述の卵管上皮の分泌細胞には認められたが(下段矢頭)、297-11A硫酸化糖鎖の発現を欠いた線毛細胞には認められなかった(下段矢印)。以上から、正常卵管上皮および卵巣癌における297-11A硫酸化糖鎖の生合成には硫酸転移酵素KSGal6STの発現が必須であることが示された。

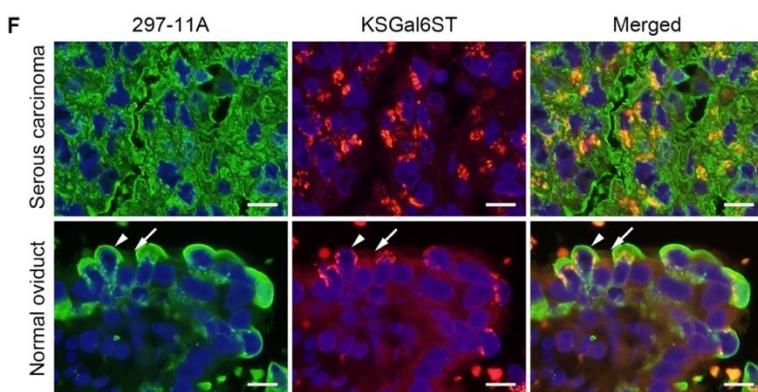


図3 297-11A陽性細胞特異的なKSGal6STの酵素発現

(4) ムチンコアタンパク質MUC16は297-11A硫酸化糖鎖のコアタンパク質の1つである

卵巣癌の腫瘍マーカーとして広く知られているCA125は、別名MUC16とよばれるムチンコアタンパク質が糖鎖修飾を受けたものである。われわれはこのMUC16が297-11Aの足場タンパク質として機能している可能性を考えた。そこで、297-11AとMUC16それぞれに対する抗体を用いた蛍光二重免疫染色を行ったところ、図4に示すように、漿液性癌(上段)、類内膜癌(中段)、そしてKSGal6STを遺伝子導入して297-11A

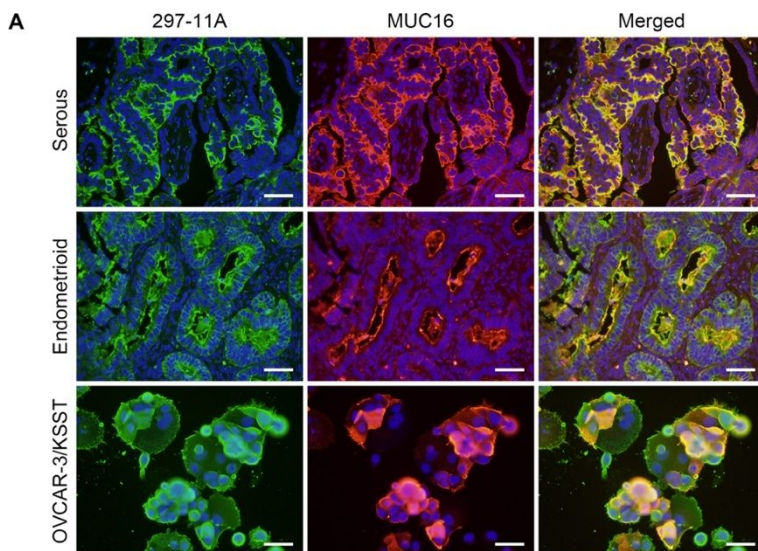


図4 297-11A糖鎖とMUC16タンパク質の共発現

硫酸化糖鎖を発現するように細胞工学的に作製した卵巣癌細胞株OVCAR-3/KSGal6ST(下段)のいずれにおいても、297-11Aの信号(左列緑色)の大部分はMUC16の信号(中列赤色)と発現部位が一致していた(右列黄色)。また、OVCAR-3/KSGal6STから産生されたMUC16タンパク質は297-11A硫酸化糖鎖で修飾されていることをウェスタンブロット法で確認した。以上から、MUC16は297-11A硫酸化糖鎖のコアタンパク質として機能していることが示された。

(5) 297-11A 硫酸化糖鎖を発現する卵巣癌患者は予後が悪い

最後にわれわれは、98 例の卵巣癌症例を適切なカットオフ値を設定して、297-11A 陽性群と 297-11A 陰性群とに分け、これら 2 群の予後に有意な差があるか否かを調べた。図 5 に示すように、297-11A 陽性群は、297-11A 陰性群に比べて無増悪生存期間が有意に短いことが明らかとなった。この結果は、297-11A 硫酸化糖鎖が、卵巣癌の予後を予測するためのバイオマーカーとして使用できる可能性を示唆している。以上(1)から(5)の研究成果は、米国カナダ病理学会の機関誌 *Laboratory Investigation* に掲載された(文献 1)。

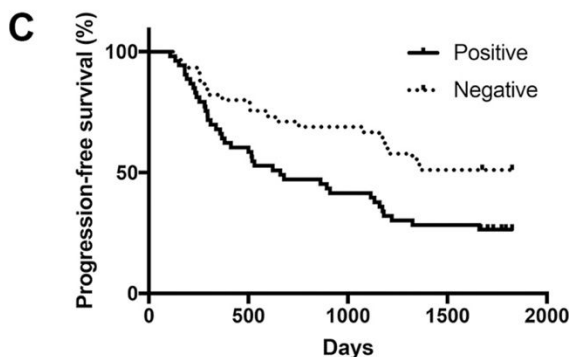


図 5 297-11A 発現の有無と予後の差

(6) 卵巣明細胞癌由来の細胞株 MTC-22 を樹立した

上記の卵巣癌組織の臨床病理組織学的解析と平行して、卵巣癌患者から硫酸化糖鎖を発現する細胞株を樹立することを試みた。図 6 に示すように、明細胞癌由来の MTC-22 の樹立に成功した。この細胞株は 297-11A 硫酸化糖鎖は発現していなかったが、R-10G および 294-1B1(文献 2) の両抗体に反応する低硫酸型ケラタン硫酸を発現しており、今後の治療標的となる可能性が考えられた。この研究成果は、日本ヒト細胞学会の機関誌である *Human Cell* に掲載された(文献 3)。

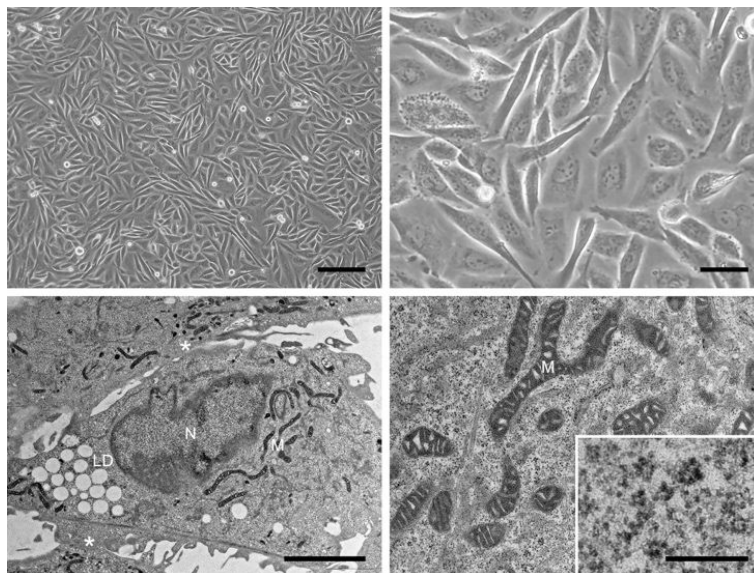


図 6 卵巣明細胞癌由来 MTC-22 の形態像

<引用文献> (研究代表者, 研究分担者, 研究協力者を下線で示す)

1. Inoue D, Hoshino H, Chen YY, Yamamoto M, Kogami A, Fukushima M, Khoo KH, Akama TO, Yoshida Y, Kobayashi M. Structural elucidation and prognostic relevance of 297-11A-sulfated glycans in ovarian carcinoma. *Lab Invest*. 2024 Apr 4;104(6):102057. doi: 10.1016/j.labinv.2024.102057. Online ahead of print.
2. Hoshino H, Chen YY, Inoue D, Yoshida Y, Khoo KH, Akama TO, Kobayashi M. Expression of low-sulfated keratan sulfate in non-mucinous ovarian carcinoma. *Glycobiology*. 2024 Mar 19;34(1):cwad056. doi: 10.1093/glycob/cwad056.
3. Hoshino H, Inoue D, Shinagawa A, Yoshida H, Shigeto S, Matsuda K, Akama TO, Yoshida Y, Kobayashi M. Establishment of a human ovarian clear cell carcinoma cell line mutant in PIK3CB but not PIK3CA. *Hum Cell*. 2024 Apr 4. doi: 10.1007/s13577-024-01058-x. Online ahead of print.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Inoue D, Hoshino H, Chen YY, Yamamoto M, Kogami A, Fukushima M, Khoo KH, Akama TO, Yoshida Y, Kobayashi M	4. 巻 104
2. 論文標題 Structural elucidation and prognostic relevance of 297-11A-sulfated glycans in ovarian carcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Lab Invest	6. 最初と最後の頁 102057-102057
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.labinv.2024.102057	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 該当する

1. 著者名 Hoshino H, Inoue D, Shinagawa A, Yoshida H, Shigeto S, Matsuda K, Akama TO, Yoshida Y, Kobayashi M	4. 巻 -
2. 論文標題 Establishment of a human ovarian clear cell carcinoma cell line mutant in PIK3CB but not PIK3CA	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Hum Cell	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） 10.1007/s13577-024-01058-x	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 Hoshino H, Chen YY, Inoue D, Yoshida Y, Khoo KH, Akama TO, Kobayashi M	4. 巻 34
2. 論文標題 Expression of low-sulfated keratan sulfate in non-mucinous ovarian carcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 cwad056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/glycob/cwad056	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 該当する

1. 著者名 Muramoto A, Inamura S, Hoshino H, Terada N, Kobayashi M	4. 巻 71
2. 論文標題 Paradoxical expression of R-10G-reactive antigen in human testicular embryonal carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 555-563
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1369/00221554231199134	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 Kato E, Tsutsumiuchi T, Muramoto A, Tokunaga T, Fujieda S, Kobayashi M	4. 巻 37
2. 論文標題 The percentage of PNAd-expressing vessels is correlated with disease severity in eosinophilic chronic rhinosinusitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Rhinol Allergy	6. 最初と最後の頁 43-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/19458924221129903	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 Murahashi M, Kogami A, Muramoto A, Hoshino H, Akama TO, Mitoma J, Goi T, Hirayama A, Okamura T, Nagaya T, Kobayashi M	4. 巻 70
2. 論文標題 Vascular E-selectin expression detected in formalin-fixed, paraffin-embedded sections with an E-selectin monoclonal antibody correlates with ulcerative colitis activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 299-310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/00221554221085336	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 Nakashima K, Sakai Y, Hoshino H, Umeda Y, Kawashima H, Sekido Y, Ishizuka T, Kobayashi M	4. 巻 200
2. 論文標題 Sulfated glycans recognized by S1 monoclonal antibody can serve as a diagnostic marker for malignant pleural mesothelioma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lung	6. 最初と最後の頁 339-346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00408-022-00531-4	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 Ariga Y, Low S, Hoshino H, Nakada T, Akama TO, Muramoto A, Fukushima M, Yamauchi T, Ohshima Y, Kobayashi M	4. 巻 70
2. 論文標題 Expression and clinical significance of Spi-B in B-cell acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 683-694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/00221554221130383	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 Hoshino H, Akama TO, Uchimura K, Fukushima M, Muramoto A, Uehara T, Nakanuma Y, Kobayashi M	4. 巻 69
2. 論文標題 Apical membrane expression of distinct sulfated glycans is a characteristic feature of ductules and their reactive and neoplastic counterparts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 555-573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/00221554211035730	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 該当する

1. 著者名 Kogami A, Fukushima M, Hoshino H, Komeno T, Okoshi T, Murahashi M, Akama TO, Mitoma J, Ohtani H, Kobayashi M	4. 巻 69
2. 論文標題 The conspicuousness of high endothelial venules in angioimmunoblastic T-cell lymphoma is due to increased cross-sectional area, not increased distribution density	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 645-657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/00221554211048551	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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Hoshino H, Chen YY, Inoue D, Yoshida Y, Khoo KH, Akama TO, Kobayashi M
2. 発表標題 Expression of low-sulfated keratan sulfate in non-mucinous ovarian carcinoma
3. 学会等名 International Symposium on Glycoconjugates, Taipei, Taiwan (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kobayashi M, Muramoto A, Inamura S, Hoshino H, Terada N
2. 発表標題 Paradoxical expression of R-10G-reactive antigen in human testicular embryonal carcinoma
3. 学会等名 Annual Conference of the Society for Glycobiology, Waikoloa, HI, USA (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 星野 瞳, 井上大輔, 吉田寿人, 重藤翔平, 松田和之, 赤間智也, 吉田好雄, 小林基弘
2. 発表標題 低硫酸化ケラタン硫酸を発現する明細胞卵巣癌細胞株の樹立
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会, 下関
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村元暁文, 稲村 聡, 星野 瞳, 寺田直樹, 小林基弘
2. 発表標題 精巣胎児性癌におけるR-10Gの逆説的発現とその他胚細胞性腫瘍における発現の検討
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会, 下関
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Inoue D, Hoshino H, Chen YY, Yamamoto M, Kogami A, Fukushima M, Khoo KH, Akama TO, Yoshida Y, Kobayashi M
2. 発表標題 Structural elucidation and prognostic relevance of 297-11A-sulfated glycans in ovarian carcinoma
3. 学会等名 26th Annual San Diego Glycobiology Symposium, San Diego, CA, USA (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kato E, Muramoto A, Natsumi Y, Fukushima M, Fujieda S, Kobayashi M
2. 発表標題 High PNAd(+)/CD34(+) vessel ratio and M2/M2 macrophage ratio observed in nasal polyp formed in allergic fungal rhinosinusitis
3. 学会等名 26th Annual San Diego Glycobiology Symposium, San Diego, CA, USA (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小上瑛也, 福島万奈, 星野 瞳, 米野琢哉, 大越忠和, 村橋将崇, 赤間智也, 三苫純也, 大谷明夫, 小林基弘
2. 発表標題 血管芽球性T細胞リンパ腫では、なぜ高内皮細静脈が目立つのか
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会, 神戸
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 星野 瞳, 井上大輔, 赤間智也, 吉田好雄, 小林基弘
2. 発表標題 ヒト卵巣癌由来細胞株の樹立
3. 学会等名 第68回日本病理学会秋期特別総会, 盛岡
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤永一, 村元暁文, 福島万奈, 小林基弘
2. 発表標題 アレルギー性真菌性副鼻腔炎の病態形成に関わる因子の解析
3. 学会等名 第68回日本病理学会秋期特別総会, 盛岡
4. 発表年 2022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	赤間 智也 (Akama Tomoya) (10548788)	関西医科大学・医学部・准教授 (34417)	

6. 研究組織（つづき）

	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	長屋 匡信 (Nagaya Tadanobu) (00718033)	信州大学・学術研究院医学系（医学部附属病院）・准教授 (13601)	

	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 協力者	邱 繼輝 (Khoo Kai-Hooi)		

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			
台湾	台湾中央研究院			