

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590311

研究課題名（和文） α -ジストログリカン糖鎖の発現からみた前立腺癌の臨床病理学的研究研究課題名（英文）Clinicopathological significance of α -Dystroglycan glycosylation in prostate cancer

研究代表者

下条 久志（SHIMOJO HISASHI）

信州大学・医学部・助教

研究者番号：40324248

研究成果の概要（和文）：本研究では α -ジストログリカン(α -DG)の機能に重要なコア蛋白の糖鎖修飾(α -DG糖鎖)に着目し、ヒト前立腺癌における α -DG糖鎖の変化とその意義を検討した。結果、1) ヒト前立腺癌では α -DGコア蛋白と α -DG糖鎖の両者とも減少するが、糖鎖の減少がより高度である、2) α -DG糖鎖の減少はGleasonパターンと逆相関し、より浸潤性の増殖パターンの腫瘍ほど α -DG糖鎖の減少が大きい、3) α -DG糖鎖は正常では前立腺腺管の基底細胞の基底側に存在しラミニンと共局在するが、癌ではこれが消失することを示した。

研究成果の概要（英文）：We examined the significance of α -dystroglycan (α -DG) glycosylation in human prostate carcinoma. In prostate carcinoma cells, we found that the reduction in the level of α -DG glycosylation was more conspicuous than reduced level of α -DG core protein. This change was associated with highly infiltrative histological patterns of the carcinoma, as assessed by Gleason grading system. We also found that laminin-binding glycans on α -DG was expressed on the basal side of basal cells, and that these glycans colocalized with laminin in the basement membrane in non-neoplastic prostate tissue. This association was absent in prostate adenocarcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：泌尿生殖器、癌、糖鎖

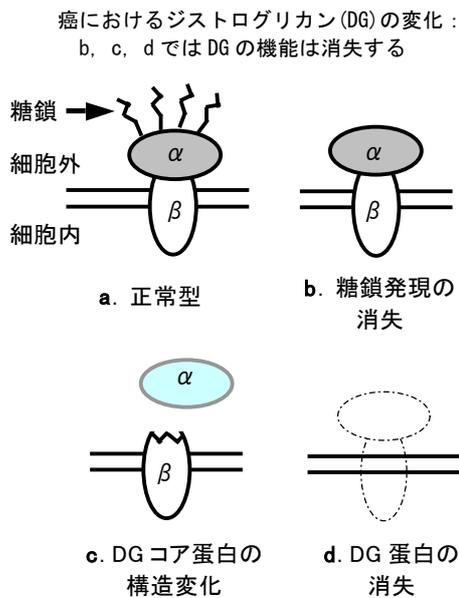
1. 研究開始当初の背景

ジストログリカン(DG)は細胞外基質蛋白の受容体で、 α (細胞外; α -DG)と β (膜貫通部; β -DG)の2つのサブユニットからなる。 α -DGはラミニンなどの細胞外基質と結合し、 β -DGは細胞内蛋白と結合する。こ

れによりDGは細胞外基質と細胞骨格を結合し、シグナル伝達の制御にも関わっている。癌においては、細胞—細胞外基質の相互作用は腫瘍の発生と進展に関する重要な因子と考えられる。乳癌や前立腺癌、大腸癌では α -DGおよび β -DGの発現低下や構造変化が

報告されており、特に α -DG 蛋白の発現低下は腫瘍の予後不良と相関するという報告もある。しかしながら、 α -DG の発現低下は個々の腫瘍により様々であり一定しないことも指摘されている。

一方、 α -DG はコア蛋白が高度に糖鎖修飾されており、この糖鎖(α -DG 糖鎖)が α -DG としての機能発現に重要である。本研究の研究分担者である小林らは、培養細胞を用いた研究で、前立腺癌細胞株の腫瘍形成能・浸潤能・転移能が α -DG コア蛋白上に提示される特異な糖鎖によって抑制され、この糖鎖発現には糖転移酵素 LARGE と β 3GlcNAcT-1 との複合体形成が必須であることを明らかにし報告している。これは、実験的に *in vitro* および *in vivo* (マウス) のレベルで、 α -DG 全体の機能における α -DG 糖鎖の重要性を示したものである。他方、ヒト前立腺癌組織では α -DG の発現変化を解析した報告は少数みられるが、 α -DG 糖鎖発現に関する解析はほとんどなされておらず、 α -DG 糖鎖の発現意義は不明である。前立腺癌における α -DG 発現低下の程度はこれまでの報告では症例により一定でなく、一見減少していないようにみえる場合もあるが、そのような状況においても α -DG 糖鎖の発現が変化していることが α -DG の機能低下を引き起こしている可能性があると考えられる。



2. 研究の目的

前立腺癌では、実験的には *in vitro* および *in vivo* (マウス) のレベルで、 α -DG コア蛋白の発現が保持されていても糖鎖修飾の低下により α -DG の機能が低下することが示されているが、ヒト前立腺癌組織における α -DG 糖鎖の発現に関する解析はほとんどない。前立腺癌は男性において罹患率の高い癌で、近年さらに罹患率が増加している。 α -DG 糖鎖の発現と前立腺癌の悪性度との関連が明らかにされたならば、ヒト組織における α -DG 糖鎖発現の検索が臨床経過や予後予測および治療法選択において有用な手段になると考えられる。そこで、ヒト前立腺癌組織における α -DG 糖鎖の減少と、前立腺癌の腫瘍組織の分化度や浸潤形態との関連を検索し、前立腺癌組織での α -DG 糖鎖発現の変化とその意義について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 前立腺癌組織における α -DG 糖鎖の発現の解析：前立腺癌の生検および手術検体のパラフィン切片を用い、 α -DG 糖鎖および α -DG コア蛋白に対する抗体でそれぞれ免疫染色を行い、その発現の変化と前立腺癌の組織型 (Gleason パターンに基づいて分類) との関連を検討する。また、各種ケラチンや細胞外基質等に対する抗体で免疫染色を行い、 α -DG 発現の局在とその変化について検討する。

(2) 前立腺癌組織における α -DG 糖鎖発現に必要な糖転移酵素の発現および分布の解析：これまでの研究で、 α -DG コア蛋白に糖鎖を付加するためには糖転移酵素 LARGE と β 3GlcNAcT-1 との複合体形成が必須であることが示されている。前立腺の組織切片を用いてこれらの糖転移酵素の発現を RT-PCR 法で検討し、さらに、*in situ* ハイブリダイゼーション法により癌および非癌組織内での発現局在を調べ、 α -DG 糖鎖の発現および Gleason パターンとの関連を検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト前立腺組織での α -DG 糖鎖発現の検討：種々の Gleason パターンの前立腺癌の生検組織 (ホルマリン固定、パラフィン包埋切片) を対象に、 α -DG 糖鎖と α -DG コア蛋白に対する抗体を用いて免疫染色を行い、糖鎖の変化について検討した。対象とした症例は特殊な組織型を除いた腺癌 146 例で、癌のグレードを表す Gleason スコアは 6~10

(score 6, 34 例 (23.3%) ; score 7, 45 例 (30.1%) ; score 8, 35 例 (24.0%) ; score 9, 29 例 (20.0%) ; score 10, 3 例 (2.1%)) であった。また、優勢な Gleason パターン (primary Gleason pattern) は 3~5 のものが含まれていた (pattern 3, 56 例 (38.4%) ; pattern 4, 78 例 (53.4%) ; pattern 5, 12 例 (8.2%))。

免疫染色の結果、 α -DG コア蛋白は非腫瘍性腺管の殆どと、癌の多くに陽性像を認めた。一方、 α -DG 糖鎖は非腫瘍性腺管の殆どが陽性だが癌は部分的に陽性を示した。癌では全く陰性の部分もあり、124/146 例 (84.9%) で発現減少を認めた。 α -DG コア蛋白と α -DG 糖鎖の両者とも、癌では陽性部分が減少するが、コア蛋白の減少と比較すると糖鎖の減少の方がより明瞭であった。さらに、Gleason パターンとの関連を検討した結果、 α -DG 糖鎖の減少は Gleason パターンと逆相関がみられた。すなわち、より浸潤性の増殖パターンを示す腫瘍ほど、 α -DG 糖鎖の減少程度が大きいことがわかった (図 2, 3)。以上から、前立腺癌では α -DG 糖鎖の減少は、高い Gleason パターンで表現されるような、より浸潤性の増殖様式に寄与する可能性が考えられた。

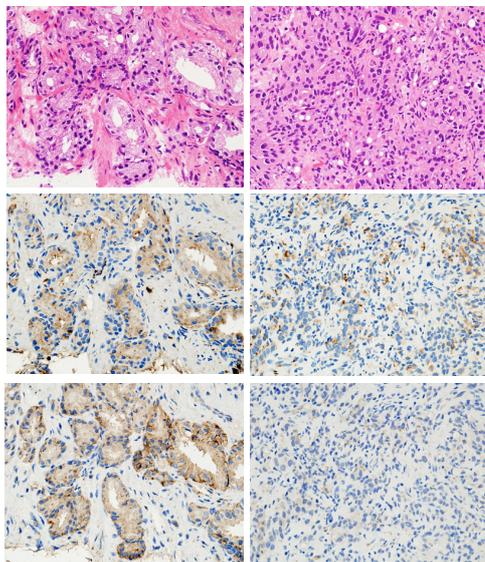


図 2. ヒト前立腺癌における α -DG 糖鎖発現の変化: 左, Gleason パターン 3 ; 右, Gleason パターン 5. 上段 HE 染色, 中段 α -DG コア蛋白, 下段 α -DG 糖鎖.

次に、蛍光抗体二重染色法により、 α -DG 糖鎖の局在と癌におけるその変化について検索を行った。 α -DG 糖鎖は正常では前立腺

腺管の基底細胞の基底側に存在しラミニンと共局在するが、癌ではこの局在が消失することが示された。

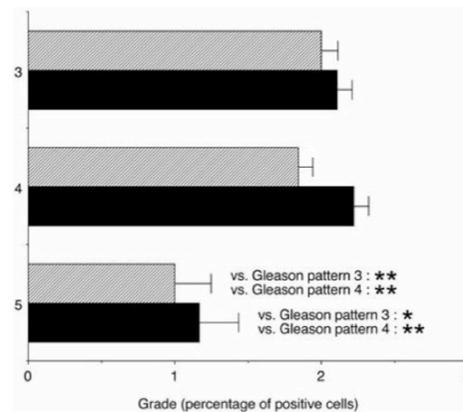


図 3. Gleason パターン別にみた α -DG コア蛋白 (灰色) およびラミニン結合性 α -DG 糖鎖 (黒) の発現: (陽性面積の割合). 上段 Gleason パターン 3, 中段 Gleason パターン 4, 下段 Gleason パターン 5, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, NS: not significant.

(2) α -DG 糖鎖発現に必要な糖転移酵素の発現の解析: ヒト前立腺癌の組織を用い、 α -DG コア蛋白に糖鎖を付加するために必要な糖転移酵素 LARGE と β 3GlcNAcT-1 の発現を RT-PCR 法で検討し、さらに、in situ ハイブリダイゼーション法により癌および非癌組織内での発現局在を調べ、Gleason パターンとの関連を検討した。

RT-PCR 法では、癌および非癌の検体の両者とも、LARGE と β 3GlcNAcT-1 の mRNA 発現が認められた。また、両者の発現量には Gleason パターン間での明瞭な差はみられなかった。一方、ISH 法では β 3GlcNAcT-1 の発現は癌組織では陰性で、非癌組織では陽性であった。RT-PCR では癌の検体における mRNA 発現は検体に含まれる非癌組織に由来する可能性があり、癌で mRNA 発現が保たれていることの確定になり得ないことを考えると、ISH 法の結果から、癌では α -DG 糖鎖の発現に必要な糖転移酵素 β 3GlcNAcT-1 の発現が低下していることが推察された。

以上、今回の研究では、ヒト前立腺癌ではラミニン結合性の α -DG 糖鎖の減少がみられ、この減少の程度は浸潤性の増殖パターンと関連があることをヒトの組織で初めて示した。この減少に際し α -DG 糖鎖とラミニンの共局在の消失を伴うことは、癌細胞と細胞外基質の結合が変化していることを示唆する

ものと考えた。将来、ヒトの前立腺癌組織を用いた α -DG糖鎖の検索が予後予測および治療法選択に有用な手段となり得るかについては、さらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Shimojo H, Kobayashi M, Kamigaito K, et al. Reduced Glycosylation of α -Dystroglycans on Carcinoma Cells Contributes to Formation of Highly Infiltrative Histological Patterns in Prostate Cancer. Prostate 71:1151-1157, 2011 (査読有)
DOI: 10.1002/pros.21330

[学会発表] (計2件)

① 下条久志、小林基弘、中山淳. 前立腺癌における α -ジストログリカン糖鎖と浸潤性増殖パターンとの関連. 第100回日本病理学会総会 2011年4月29日 横浜

② Shimojo H, Kobayashi M, Fukuda M, Nakayama J. Reduced Glycosylation of α -Dystroglycans on Carcinoma Cells Contributes to Formation of Highly Infiltrative Histological Patterns in Prostate Cancer. 2010 Annual Conference of the Society for Glycobiology (2010年糖鎖生物学会) 2010年11月9日 タンパ (フロリダ、米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下条 久志 (SHIMOJO HISASHI)
信州大学・医学部・助教
研究者番号: 40324248

(2) 研究分担者

小林 基弘 (KOBAYASHI MOTOHIRO)
信州大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 00362137
福島 万奈 (FUKUSHIMA MANA)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号: 70546225