

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15591

研究課題名（和文）MUC1修飾糖鎖における構造解析と唾液腺腫瘍の診断マーカーとしての役割

研究課題名（英文）Structural analysis of MUC1 modified glycans and role as diagnostic markers in salivary gland tumors

研究代表者

杉浦 貴則（SUGIURA, TAKANORI）

東京歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：10906366

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はMUC1修飾糖鎖における構造解析と唾液腺腫瘍の診断マーカーとしての役割の解明のため、十分な症例・検体を収集することを目的とした。我々は検体の保存、保管に最も広く使用されている手法の1つであるホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）検体に着目し、ヒドロキシルアミン（HA）によるムチン抽出法の開発をおこなった。

本研究により、ホルマリン固定パラフィン包埋検体からヒドロキシルアミンを用いてのムチン抽出は可能であり、抽出したムチンは分子マトリクス電気泳動および質量分析にて、凍結組織検体と同様であることから、HAによるFFPE検体を用いてのムチン抽出、糖鎖解析の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺悪性腫瘍は年間発生数が人口10万人あたり2.5～3.0人と稀な疾患である。そのため、十分な症例・検体を収集することは困難を極める。我々は検体の保存、保管に最も広く使用されている手法の1つであるホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）検体に着目し、

FFPE検体をもちいたムチン抽出法の開発をおこなった。

本研究より、ホルマリン固定パラフィン包埋検体からヒドロキシルアミン（HA）を用いてのムチン抽出は可能であり、抽出したムチンの糖鎖も凍結組織検体と同様であることから、FFPE検体を用いてのムチン抽出、糖鎖解析の可能性が示唆され、今後の研究に寄与するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to collect sufficient cases and specimens for structural analysis of MUC1 modified glycans and role as diagnostic markers in salivary gland tumors.

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections are used for histopathological analysis, and stored FFPE sections are considered valuable for retrospective studies. In this study, we report a novel method to extraction of mucins from FFPE sections using hydroxylamine (HA). The extracted mucins were subjected to supported molecular matrix electrophoresis (SMME) and analyzed their glycan profiles, then compared to those of the mucins extracted from the FFPE sections by other methods. This study shows that hydroxylamine treatment could dissolve FFPE section and mucins can be efficiently extracted from the lysates.

研究分野：唾液腺腫瘍

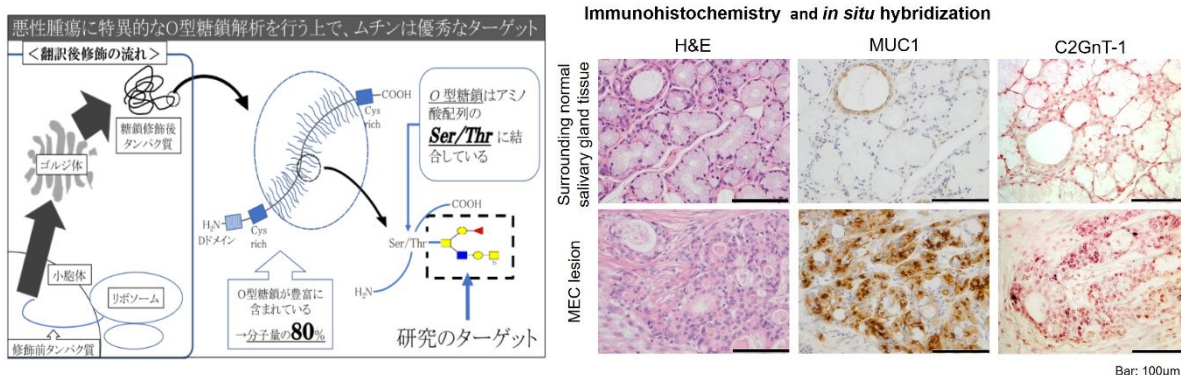
キーワード：ムチン 分子マトリクス電気泳動 糖鎖 ホルマリン固定パラフィン包埋 ヒドロキシルアミン 唾液腺腫瘍 粘表皮癌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

粘表皮癌は稀少疾患である唾液腺悪性腫瘍の中では最も発生頻度が高い疾患である。その治療法は手術が第一選択であり、放射線治療や化学療法は確立しておらず、診断や治療に関する有用なバイオマーカーも存在しない。腫瘍では細胞の悪性化に伴って、正常時には見られない異常糖鎖が発現すると考えられている。そのため古くから糖鎖は腫瘍マーカーとして利用されてきたが、悪性形質の発現にも関与することが知られるようになり、転移因子、増殖因子、予後因子としても積極的に研究されてきた。粘表皮癌には粘液を産生するという際立った特徴がある。ムチンは多数の O-型糖鎖によって修飾されているため、ムチンの糖鎖は細胞の悪性化を反映する可能性が考えられた。

私たちはこれまで粘表皮癌のムチンをターゲットに分子マトリックス電気泳動法 (SMME) を用いて、ムチンおよびムチンを修飾する糖鎖の解析を行ってきた。その結果、粘表皮癌に含まれるムチンにおいて、ムチンの一種である MUC1 が特徴的な糖鎖を持つことを明らかにし、糖鎖を有する MUC1 は粘表皮癌の新たな診断、治療におけるバイオマーカーになり得る可能性が示唆された。



2. 研究の目的

唾液腺悪性腫瘍は年間発生数が人口 10 万人あたり 2.5~3.0 人と稀な疾患である。そのため、十分な症例・検体を収集することは困難を極める。我々は検体の保存、保管に最も広く使用されている手法の一つであるホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体に着目した。臨床において FFPE 検体は病理組織学的解析に用いられるとともに、保管された FFPE 検体は、後ろ向き研究にとって価値のある試料とされるが、FFPE 検体からのムチン抽出に関して確立された手法はない。FFPE 検体からのムチン抽出法の確立は、唾液腺腫瘍における今後の研究の発展において、重要な課題であると考えられた。そのため、FFPE 検体をもちいたムチン抽出法の開発をおこなった。

3. 研究の方法

ブタ顎下腺をモデルとして FFPE 検体からのヒドロキシルアミン (HA) を用いたムチン抽出法の検討および、抽出したムチンの糖鎖を分析した。抽出したムチンの分析および糖鎖解析は SMME、MALDI-TOF 型質量分析計により分析した。

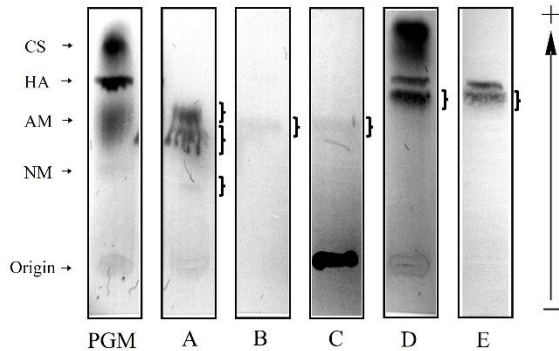
4. 研究成果

SMME 分析にて HA 処理と未処理の FFPE 検体を比較し、HA 処理にて FFPE 検体から水溶性ムチン

を抽出可能であると考えられた。凍結組織検体のムチン分画とは異なる位置にアルシアンブルー陽性スポットが出現したことはHAはアスパラギン、グリシン間のペプチド結合を切断することが知られており、その影響が考えられた。

■分子マトリックス電気泳動(SMME)

ムチンのアルシアンブルー染色



コントロール：PGM

A：PSM凍結組織を従来法にて処理¹⁾

B：PSMのFFPE検体を脱パラフィンし従来法にて処理

C：PSMのFFPE検体を脱パラフィンしDTTにて処理²⁾

D：PSMのFFPE検体を脱パラフィンしHAにて処理

E：PSM凍結組織をHAにて処理

・PGM: Porcine gastric mucin, CS: Chondroitin sulfate, HA: Hyaluronic acid, AM: Acidic mucin, NM: Neutral mucin, } Mucin band
DTT: dithiothreitol

1) Kameyama, A. et al. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **1867**, 76–81 (2019)

2) Hannes H. et al. *Molecular & Cellular Proteomics* **16**(4), 524–536 (2017)

糖鎖解析にて凍結組織検体とHA処理を行ったFFPE検体のムチンの糖鎖を比較し、同様の糖鎖を認めた。

本結果より、ホルマリン固定パラフィン包埋検体からHAを用いてのムチン抽出は可能であり、抽出したムチンの糖鎖も凍結組織検体と同様であることから、FFPE検体を用いてのムチン抽出、糖鎖解析の可能性が示唆された。

■質量分析によるムチンの糖鎖解析

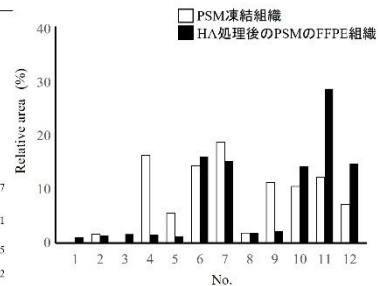
PSM凍結組織

HA処理後のPSMのFFPE検体

発現糖鎖の相対面積による比較

No.	Composition	Calcd m/z ^a	Obsd m/z ^b
2	(Hex) ₁ (NeuAc) ₁	650.336	650.284
4	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₁	708.3767	708.3297
5	(HexNAc) ₁ (NeuGe) ₁	721.373	721.332
6	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₁	895.4617	895.4027
7	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (NeuGe) ₁	925.4717	925.4147
8	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁	1069.551	1069.474
9	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₁ (NeuGe) ₁ (Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₁	1099.562	1099.496
10	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₁	1256.636	1256.555
11	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₁ (NeuGe) ₁	1286.646	1286.561
12	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (NeuGe) ₂	1316.657	1316.572

No.	Composition	Calcd m/z ^a	Obsd m/z ^b
1	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁	534.289	534.317
2	(Hex) ₁ (NeuAc) ₁	650.337	650.365
3	(Hex) ₁ (NeuGe) ₁	680.347	680.379
4	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₁	708.378	708.412
5	(HexNAc) ₁ (NeuGe) ₁	721.374	721.412
6	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₁	895.463	895.503
7	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (NeuGe) ₁	925.473	925.521
8	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁	1069.552	1069.587
9	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (Deoxyhexose) ₁ (NeuGe) ₁ (Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₁	1099.563	1099.621
10	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₂	1256.637	1256.685
11	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₁ (NeuGe) ₁	1286.647	1286.702
12	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (NeuGe) ₂	1316.658	1316.723



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

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

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

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 -

〔学会発表〕 計1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
2. 発表標題 ホルマリン固定パラフィン包埋検体からヒドロキシルアミンを用いて抽出したムチンの 分子マトリックス電気泳動を用いた糖鎖解析
3. 学会等名 日本電気泳動学会
4. 発表年 2023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
---------	---------