

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792307

研究課題名（和文）口腔がんの発症・進展における糖転移酵素 GnT-V の影響と PET による評価

研究課題名（英文） The effect of glycosyltransferase GnT-V in the development and progression of oral cancer and evaluation by PET.

研究代表者

小野寺 麻記子（ONODERA MAKIKO）

北海道大学・大学院歯学研究科・専門研究員

研究者番号：20443963

研究成果の概要（和文）：細胞表面の糖鎖は癌化に伴い大きく変化し、腫瘍の進展に重要な役割を果たす。本研究では、口腔癌における糖転移酵素 GnT-V の発現、さらに悪性度評価のため分子イメージングである PET 検査との関連性を検討し、癌の進展における GnT-V の影響を調べた。口腔癌では正常組織と比較して有意な GnT-V mRNA およびタンパクの発現亢進を認めた。また、FDG-PET および hypoxia imaging である FMISO-PET における SUV 値が高いと、GnT-V および HIF-1 α の発現も高い傾向を示し、低酸素状態では GnT-V の発現や機能が亢進している可能性が示唆された。さらに、ヒト口腔癌細胞株 SAS 細胞に swainsonine 処理を施し GnT-V の機能を阻害すると細胞運動能と細胞浸潤能が低下した。GnT-V による糖鎖修飾は細胞運動能および浸潤能亢進させ、癌の進展に関与すると思われた。

研究成果の概要（英文）：The pattern and expression of cell surface sugar chains greatly alter during the carcinogenesis and play important role in tumor progression. To clarify the role of glycosyltransferase GnT-V in cancer development we examined the expression of GnT-V in the oral cancer association with the PET scan. Both GnT-V mRNA and protein are strongly enhanced in oral cancer compared with normal oral mucosa tissue. In the group with high SUV on FDG-PET and FMISO-PET hypoxia imaging, GnT-V and HIF-1 α had tendency to express higher. The expression and function of GnT-V may increase in hypoxia condition. By treatment the human oral squamous cell carcinoma cell line SAS with swainsonine, an inhibitor of N-glycan processing, cell motility was reduced significantly. These results showed that the glycosylation by GnT-V is associate with cell motility and invasion enhancement in oral cancer and related in oral cancer progression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：口腔病理学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：GnT-V、PET、HIF-1

1. 研究開始当初の背景

N-アセチルグルコサミン転移酵素（GnT-V）は、細胞のゴルジ装置に局在する膜貫通型糖

タンパクであり、UDP-N-アセチルグルコサミンを基質として、N-結合型糖鎖に β 1-6 結合する分岐鎖を転移し、3 本鎖の高分岐糖鎖を

合成する酵素である。細胞表面に発現する糖鎖は、細胞の癌化に伴って質的・量的に大きく変化するだけでなく、癌の浸潤・転移機構に関与する種々の因子に対する糖鎖修飾を介して、腫瘍の進展に重要な役割を果たすことから、治療への応用に関心が高まってきた。これまでに大腸癌、乳癌、肺癌などで GnT-V の発現が腫瘍の浸潤転移に強く関係することが報告されてきた。しかし、GnT-V の発現は腫瘍の種類や組織型によって異なるといわれており、現在まで口腔癌における発現検索や GnT-V 遺伝子抑制に関する研究は申請者の参画する研究室以外で報告されていない。

一方、一般に ^{18}F -Fluoro-2-deoxyglucose (FDG) を用いる PET 検査は今や癌の診断に PET はかかせない診断ツールとなり、口腔癌においても治療前の病期診断に利用されるのみでなく、治療効果判定や治療後の再発の評価にも利用されている。

また、以前から低酸素状態 (hypoxia) は各種固形癌の重要な予後因子のひとつと考えられており、癌は低酸素状態 (hypoxia) では放射線感受性の低下および化学療法抵抗性を示すと言われ、癌組織内の低酸素状態 (hypoxia) の評価は重要である。 ^{18}F -Fluoromisonidazole (FMISO) -PET は癌組織内の低酸素状態の評価を非侵襲的に検出できる方法であり、申請者の参画する研究室では、北海道大学病院核医学診療科の協力のもとに口腔癌患者に FMISO-PET 検査を行い低酸素状態の評価を行ってきた。

2. 研究の目的

頭頸部悪性腫瘍における糖鎖の意義についてはこれまで研究が進んでいなかった。本研究では、N-アセチルグルコサミン転移酵素である GnT-V の発現が、口腔癌における生物学的悪性度や分子イメージングである PET データとどのように関わっているかを明らかにし、口腔癌の早期診断、予後予測や個々の腫瘍特性に応じた治療法の選択に役立てることを目的とする。

さらにヒト口腔癌細胞株を用いて、GnT-V が腫瘍の浸潤・転移に関与するメカニズムを分子レベルで解明する。申請者はこれまでにヒト舌扁平上皮癌における GnT-V の発現と臨床病理学的所見との関連を検討し、GnT-V の発現が舌癌の浸潤転移に深く関与し、その悪性度を反映、予後規定因子となりうることを見出した。本研究ではさらにヒト口腔癌細胞株を用いて GnT-V の発現および細胞運動・接着、浸潤に及ぼす影響を検索し、口腔癌の進展機構における GnT-V 合成糖鎖による糖鎖修

飾の重要性を示す。

3. 研究の方法

(1) FDG-PET および FMISO-PET 検査

北大病院歯科診療センターで根治的手術療法を受けた口腔扁平上皮癌患者23例(男/女:15/8、年齢42-84歳)を対象に、術前にFDG-PETとFMISO-PET検査を行った。PET検査は3D・PET/CTスキャナー (True Point-Biograph 64: 朝日シーメンス社製) を用いて、FMISOは注射4時間後、FDGは注射1時間後に撮像した。画像の評価は、Standardized Uptake Value (SUV) を測定して、腫瘍内のSUVの最高値: SUV maxを求めて行った。病理組織学的評価は手術材料を用いて行った。なお、本研究は北海道大学病院の自主臨床研究審査会の承認を得て行われた。

(2) GnT-V および HIF-1 α の免疫組織化学的発現検索

対象症例の手術検体組織を用いて、GnT-V および HIF-1 α のタンパク発現を免疫組織学的に検索した。ホルマリン固定パラフィン包埋された試料より、4 μm の薄切標本を作製し、一次抗体として rabbit polyclonal antibody to MGAT5 (1:50 dilution, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、mouse monoclonal antibody to HIF-1 α (1:100 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を使用し、通法に従い免疫組織化学染色を行った。GnT-V は全上皮細胞のうち、核周囲の細胞質にドット状に染色を認めたものを (+)、染色を示さなかったものを (-) とし、HIF-1 α は核に染色を認めたものを (+)、核の染色を認めない、又は細胞質に染色を認めたものは (-) と評価した。

(3) 細胞培養

ヒト口腔癌細胞株 SAS 細胞を用いた。細胞は 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO $_2$ 下において 10%牛胎子血清 (FBS) 含有 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) を用いて培養した。なお SAS 細胞は理化学研究所 (Tsukuba, Japan) から分与された。

(4) scratch wound healing assay

SAS 細胞を 6 穴プレートに播種し、100% confluency の状態で、無血清培地培地または 1 $\mu\text{g/ml}$ の swainsonine を添加した無血清培地で 24 時間培養した後、イエローチップで傷をつけた。その間隔を顕微鏡下で計測した。

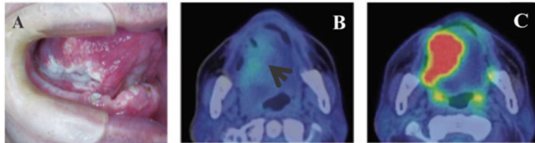
(5) invasion assay

1 $\mu\text{g/ml}$ の swainsonine で 24 時間処理した

SAS 細胞を 2.5×10^4 /chamber で BD biocoat Matrigel Invasion Chamber (BD, USA) に播種し、添書に従って細胞浸潤能を調べた。なお、浸潤した細胞は Crystal violet で染色を行い、顕微鏡下で観察した。

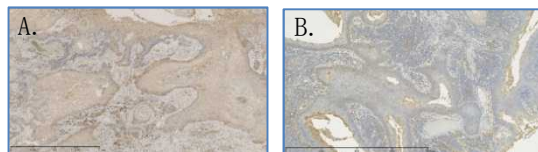
4. 研究成果

(1) FMISO は 14/23 例 (61%)、FDG は全例に集積が認められた。SUV max の中央値は FMISO: 1.83 (0.8-2.7)、FDG: 16.5 (1.0-32.3) であった。



- 図 1 症例 (舌扁平上皮癌) の臨床所見
- 臨床所見: 右舌縁部に浸潤性の癌を認める。
 - FMISO-PET 所見: 舌癌の部位に一致して FMISO の集積が認められる。SUV max は 2.06 であった。
 - FDG-PET 所見: 舌癌の部位に一致して FDG の集積が認められる。SUV max は 17.9 であった。

(2) HIF-1 α (+) 症例群における FMISO の SUV max は、HIF-1 α (-) 症例群と比較して有意に高かった (中央値 2.1 vs. 1.6, $p=0.002$)。FDG と HIF-1 α の間には有意な関連はなかった。GnT-V (+) 症例群において、FMISO および FDG の SUV max は、GnT-V (-) 症例群と比較して高い傾向を認めたが有意な差はなかった。また、FMISO および FDG の SUV max が高い症例群では、GnT-V および HIF-1 α の発現も高い傾向を示した。



- 図 2 GnT-V および HIF-1 α の免疫染色像
- GnT-V; 核周囲の細胞質にドット状の染色像を認める。
 - HIF-1 α ; 核に染色を認める。

(3) (4) 腫瘍の浸潤・転移に関する GnT-V の分子メカニズムを解析するために、ヒト口腔癌細胞株 SAS 細胞を用いて実験を行った。swainsonine は mannosidase 阻害剤で

GnT-V 活性の上流に位置する β 1-6 分岐糖鎖の発現を阻害する薬剤である。SAS 細胞に swainsonine を加えたところ、細胞形態的な変化はみられなかった (図 3)。

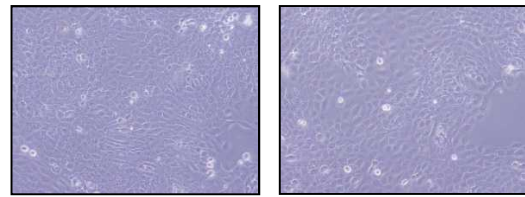


図 3 swainsonine による形態学的変化
SAS 細胞に $1 \mu\text{g/ml}$ の swainsonine を加え 24 時間培養した (右)。コントロール (左) に比べ、明らかな形態的な変化はみられなかった。

次に口腔癌細胞株の遊走能を調べるため、scratch wound healing assay を行った (図 4)。コントロールに比べ $1 \mu\text{g/ml}$ の swainsonine で処理した SAS 細胞は有意に遊走能が減少していた。

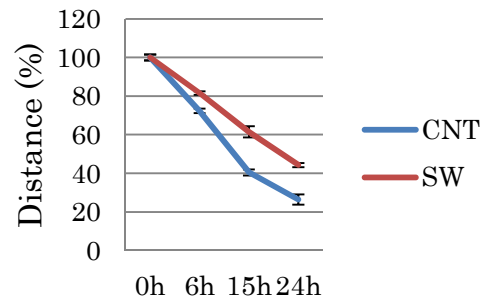
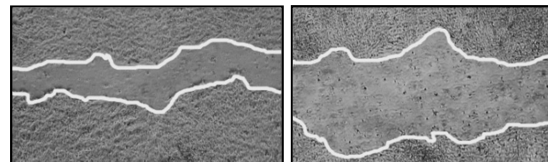


図 4 細胞遊走能の検討
SAS 細胞に $1 \mu\text{g/ml}$ の swainsonine (SW) を加え scratch wound healing assay を行った。
(上左) 24 時間後のコントロール細胞
(上右) swainsonine を加えた細胞
(上グラフ) 6, 15, 24 時間後の細胞の移動度。
細胞の遊走能は swainsonine によって有意に減少した。

次に口腔癌細胞の浸潤能を検討するため、BD biocoat Matrigel Invasion Chamber を用いた。コントロールに比べ $1 \mu\text{g/ml}$ の

swainsonine で処理した SAS 細胞は浸潤能が減少していた。

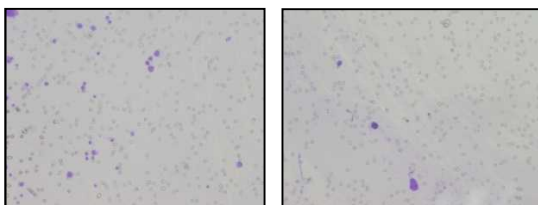


図5 細胞浸潤能の検討

SAS 細胞に $1\mu\text{g/ml}$ の swainsonine を加え細胞浸潤能の検討を行った。22 時間後のコントロール細胞 (左) と、swainsonine で処理した細胞 (右) を示す。ECM を破壊して浸潤した細胞は、swainsonine 処理によって減少した

これらの結果から、GnT-V は細胞の遊走能、浸潤・転移能を上昇させていると考えられた。また GnT-V の機能を阻害すると、癌細胞の遊走、浸潤および転移を抑制できる可能性が示唆された。

免疫組織学的検討において、HIF-1 α 陽性の腫瘍は GnT-V にも陽性を示す傾向がみられたことから、細胞の低酸素状態と GnT-V の発現や機能にも関連があることが考えられる。また FMISO-PET で高値を示す腫瘍では、GnT-V の機能を抑制できる swainsonine が癌の浸潤転移をコントロールできる薬剤として有用である可能性が考えられた。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Y. Kitagawa, Makiko Kyan-Onodera. Role of FDG-PET in evaluating different 4 types of chronic osteomyelitis of jaws in combination with 3-phase bone scintigraphy. 2012 SNM Annual meeting. 2012 年 6 月 13 日. Miami Beach Convention Center フロリダ, アメリカ.
- ② Y. Kitagawa, Makiko Kyan-Onodera. FDG-PET in combination with serum-soluble interleukin-2 receptor to predict prognosis in patients with head and neck malignant lymphoma. 2011 SNM Annual meeting. 2011 年 6 月 7 日. San Antonio Convention Center, サンアントニオ, アメリカ.

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 麻記子 (ONODERA MAKIKO)
北海道大学大学院歯学研究科・専門研究員
研究者番号：20443963

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし