

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462879

研究課題名(和文) 口腔前癌病変に対する新規グライコバイオマーカーの確立

研究課題名(英文) Potential for using lectin sugar chains as diagnostic markers in oral precancerous lesions

研究代表者

江原 道子 (Ehara, Michiko)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：10425308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖研究は口腔病変においても以前からレクチン染色を用いた比較解析や、癌の浸潤・転移に関する研究が行われてきたが、前癌病変における糖鎖構造解析や機能解析について詳細な解析は未だ報告されていない。そこで我々は、舌前癌病変における糖鎖改変現象についてレクチンマイクロアレイによる網羅的な糖鎖構造解析、14種類のレクチン組織化学的染色およびCK10/13, 17免疫染色および糖鎖インフォマティクス解析により解析を行った。その結果、MGAT3とB4GALT1は、口腔粘膜前癌病変および扁平上皮癌の発現に強く関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Comparative studies on glycans have been performed using lectin histochemical analysis of oral lesions. However, structures and functions of glycans in precancerous lesions including oral epithelial dysplasia, have not been thoroughly analyzed. In this study, we performed the following three analyses of precancerous lesions of the tongue: (i) lectin microarray; (ii) histochemical analysis of glycans using 14 lectins; (iii) immunohistochemical analysis of the expression of cytokeratin 10/13 and 17. In addition, the Glycan Kernel Tool in RINGS (Resource for Informatics of Glycomes at Soka), was used to analyze the results obtained from (i)-(ii). Furthermore, we analyzed the detailed expression pattern of MGAT3 and B4GALT1 using immunofluorescent microscopy. MGAT3 and B4GALT1 were associated with accurate change of carbohydrate chain component for precancerous transformation and may develop the establishment of disease-associated novel glyco-markers.

研究分野：口腔病理学

キーワード：前癌病変 糖鎖 レクチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の糖鎖研究

タンパク質は成熟した機能をもつようになるまで、リン酸化、メチル化、硫酸化、糖鎖付加などの翻訳後修飾を受けるが、その中でも最も複雑な過程が糖鎖修飾である。近年、微量解析技術の進歩によって糖鎖合成技術、糖鎖構造解析技術の開発が可能となったことで、バイオマーカーとしての糖鎖が再び見直されてきている。新たに開発された糖鎖微量解析技術の中でも、レクチンマイクロアレイは高感度でかつ簡便に解析を行えるため、再生医療、癌バイオマーカーなどで特に注目されている技術である。このような最新の糖鎖解析技術を駆使すれば、糖鎖構造のもつ種特異性、細胞特異性、細胞の分化段階特異性という特長を、癌、免疫、再生医療、生殖医療に応用可能な糖鎖研究となる。特に癌化による糖鎖変化は診断や癌のメカニズム解明と密接に関係するため臨床的にも大きな意味を持っている。このように糖鎖変化が癌で血中あるいは病理組織標本の特定糖タンパク質上に生じれば、その分子は有用な癌マーカー(グライコバイオマーカー)になりうると思われる。

(2) 口腔癌を取り巻く問題点

口腔癌(扁平上皮癌)の前癌病変および境界病変の病理診断は、WHO 分類の指針を基準として細胞異型度を中心に診断されているが、口腔粘膜の部位特異性を考慮したものではないため、病理医の病理診断基準にも大きな差異がみられることが問題となっている。各学会等では口腔の前癌病変における病理組織学的な診断基準策定を検討しており、多分野での研究も進められているが、前癌状態を規定する有力な候補遺伝子・診断マーカー・抗体に関しての報告は未だほとんどされていないのが現状である。

(3) 口腔病変における糖鎖研究

口腔病変の糖鎖研究についても、癌の浸潤・転移に関する研究が主体で、以前はレクチン染色を用いた比較解析がなされていたが、糖鎖機能および構造解析について詳細な解析を行えるだけの研究技術が確立されていなかったため、レクチン染色のみの報告がほとんどである。

2. 研究の目的

研究の背景に記述した通り、近年の糖鎖構造解析技術を用いることにより、口腔粘膜前癌病変における糖鎖構造改変現象の詳細を明らかにすることができ、診断や治療に結びつくような糖鎖構造改変現象を明らかにすることが期待出来ると考えた。そこで、申請者は、糖鎖がもつ種特異性、細胞特異性、細胞分化段階特異性に着目し、口腔粘膜前癌病変および口腔扁平上皮癌の発症、進展に関連する糖鎖構造を明らかにし、診断に有用なグラ

イコバイオマーカーの開発および薬物治療につながる基礎的研究として、前癌病変の診断に有用な糖鎖構造および糖鎖関連遺伝子の解析研究を立案した。

3. 研究の方法

(1) レクチン染色と CK10/13、CK17 免疫染色

朝日大学歯学部附属病院病理診断科において軽度～中等度異形成、上皮内癌、扁平上皮癌と診断した 32 症例について、14 種類のレクチン(Con-A, SBA, WGA, DBA, UEA-I, RCA-120, PNA, GSJ-I, PSA, LCA, PHA-E, PHA-L, SJA, sWGA)を用いてレクチン染色を行った。対照群として用いた正常部粘膜上皮は、他の良性病変や手術により切除された病変の断端部に存在する舌粘膜上皮を用いた。また、いずれの標本においても、近年上皮異形成や上皮内癌の診断に用いられている CK10/13 と CK17 について、免疫染色を行った。

(2) レクチンマイクロアレイ解析

舌前癌病変における糖鎖改変現象についてレクチンマイクロアレイによる網羅的な糖鎖構造解析を行った。パラフィン切片を作製し、顕微鏡下で病変部をダイゼクションして解析試料とした。

レクチンマイクロアレイは、2005 年、独立行政法人産業技術総合研究所糖鎖構造解析チームの平林らが、(株)モリテックスとの共同研究により世界で初めて開発され、エバネッセント波励起型蛍光検出法をもとにしたスキャナーである GlycoStation™ Reader1200 とスライドガラス上にレクチンをアレイ化した LecChip™ よりなる糖鎖プロファイリングシステムである。本研究では、開発元の(株)モリテックスから糖鎖研究に特化して発足した(株)GP バイオサイエンス社に依頼し、GlycoStation™ Reader1200 を用いた受託解析を利用した。

(3) グライコインフォマティクス解析

レクチンマイクロアレイ解析結果およびレクチン染色結果を用いた糖鎖インフォマティクス解析により、正常部より前癌病変部および上皮内癌部で多く含まれている糖鎖構造を解析した。

(4) MGAT3 および B4GALT1 蛍光免疫染色

糖鎖インフォマティクス解析により前癌病変発生および癌化に関与することが強く示唆された糖鎖構造について、その改変に関与すると考えられる糖転移酵素(MGAT3 と B4GALT1)について、組織における発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) レクチン染色と CK10/13、17 免疫染色

14 種類のレクチン染色および CK10/13、17 の免疫染色結果を表 1 に示す。正常で陰性を示したが、上皮異形成および上皮内癌で陽性

へ染色性が変化した群、正常では陽性であったが、上皮異形成および上皮内癌で陰性へ変化した群、いずれの病変においても染色性に変化を認めなかった群の3群に分けられた。また、これらの染色性は、CK10/13およびCK17の免疫染色での染色性とほぼ同様の所見を示していた。

表1：レクチン染色およびCK10/13、17免疫染色結果

| | Nor | Dys | CIS |
|---------|-----|-----|-----|
| Con A | + | + | + |
| SBA | + | + | + |
| PHA-E | + | + | + |
| PHA-L | + | + | + |
| PSA | - | - | - |
| SJA | - | - | - |
| s WGA | - | - | - |
| RCA120 | + | - | - |
| DBA | + | - | - |
| GSL I | + | - | - |
| WGA | + | - | - |
| CK10/13 | + | - | - |
| UEA-1 | - | + | ++ |
| PNA | - | + | ++ |
| LCA | - | ± | + |
| CK17 | - | + | + |

(2) レクチンマイクロアレイ解析

レクチンマイクロアレイ解析結果をグラフで示す(図1)。レクチン染色の結果と同様に、正常から扁平上皮癌へ移行するに従って高値を示すレクチン群、逆に低値になるレクチン群、発現強度の差はあるものの、ほぼ変化を示さないレクチン群に分かれていた。

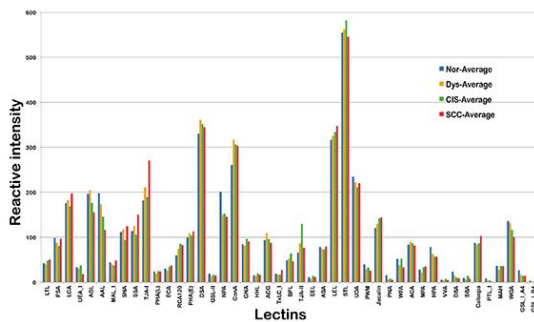


図1：レクチンマイクロアレイ解析結果

(3) グライコインフォマティクス解析

レクチンマイクロアレイ結果とレクチン染色結果を元に、the Glycan Kernel Tool in RINGS (Resource for Informatics of Glycomes at Soka)によりインフォマティクス解析を行った結果、上皮異形成の組織では、正常部に比べて4分岐したN型糖鎖構造が強く出現しており、上皮内癌および扁平上皮癌では、N型糖鎖にコアフコースおよびバイセクティング GlcNAc が強く出現していた。

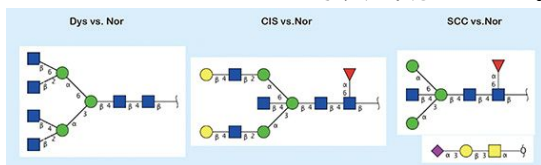


図2：グライコインフォマティクス解析結果

(4) MGAT3 および B4GALT1 蛍光免疫染色

MGAT3 および B4GALT1 免疫染色結果を図3に示す。MGAT3 免疫染色において、正常(Nor)では陰性であったが、上皮異形成(Dys)では細胞膜に強陽性、細胞質内にはびまん性に陽性を示し、上皮内癌(CIS)では細胞質内に陽性像を示す領域が変化していた。扁平上皮癌(SCC)では、陽性を示す領域が細胞質内、核周囲が主体となり、一部核にも陽性を示した。

B4GALT1 免疫染色では、MGAT3 と同様に正常(Nor)で陰性、上皮異形成(Dys)では細胞質にびまん性・微細顆粒状に陽性を示した。上皮内癌(CIS)で微細な顆粒状と粗大な顆粒状の陽性像が混在しており、陽性領域は核周囲へ移行していた。扁平上皮癌(SCC)では、粗大~やや大型の顆粒状に陽性像がみられ、核周囲および核内へ移行していた。

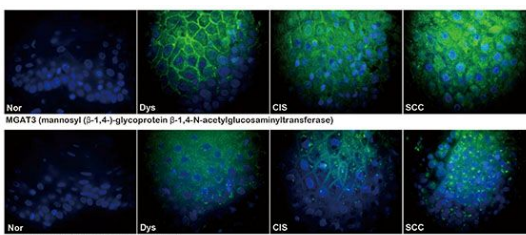


図3：MGAT3 および B4GALT1 蛍光免疫染色結果

(5) 研究成果のまとめ

以上の結果より、舌前癌病変における糖鎖改変現象にはMGAT3 および B4GALT1 が深く関与していることが明らかになった。MGAT3 は上皮異形成で細胞膜に発現し、病変の進行に伴い細胞質および核方向へ陽性像が移行していたことより、糖鎖構造を改変するために核へアプローチし、異型細胞発現の翻訳・転写に関与していることが示唆された。また B4GALT1 は、陽性像が微細顆粒状から粗大顆粒状に凝集した後に核へ移動するため、いずれかの細胞小器官と関連し異型細胞発現の翻訳・転写に関与していることが示唆された。異型細胞発現に関与する糖鎖構造改変現象がコントロール出来れば、舌をはじめ、口腔に発生する前癌病変および扁平上皮癌の発症をコントロール出来るため、今後は創薬による糖鎖構造改変現象に対する治療薬開発につながる研究であったと考える。

口腔に発生する前癌病変および扁平上皮癌は、切除により患者のQOL低下に強く関与しており、早期発見はもとより、薬物療法により病変の発症および進行をコントロールできることが重要である。本研究課題の研究成果は、今後の口腔前癌病変および口腔癌の画期的な治療へ結びつくものと考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 9 件)

江原道子、永山元彦、村木智則、田沼順一、
口腔前癌病変診断マーカーとしての糖鎖の可能性、第73回日本癌学会学術総会、2013年10月5日、(横浜)

江原道子、永山元彦、中尾寿奈、田沼順一、
口腔病変における糖鎖の役割、第25回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2014年8月29日、メディアシップ日報ホール(新潟)

江原道子、中尾寿奈、永山元彦、田沼順一、
口腔前癌病変診断マーカーとしての糖鎖の可能性、第56回歯科基礎医学会学術大会・総会2014年9月27日、福岡国際会議場(福岡)

Michiko Ehara、Motohiko Nagayama、Juna Nakao、Jun-ichi Tanuma、Potential for using lectin sugar chains as diagnostic markers in oral precancerous lesions, Society For Glycobiology & Japanese Society of Carbohydrate Research 2014 Joint Annual Meeting, 19 Nov. 2014, Hilton Hawaiian Village (Honolulu, USA)

Masaaki Shiota、Michiko Ehara、Kiyoko Aoki-Kinoshita、Analysis of lectin array data using the Glycan Kernel Tool, GIW/ISCB-Asia The 25th Anniversary of GIW-International Conference on Genome Informatics, 15 Dec. 2014, Tokyo International Exchange Center (Tokyo, Japan)

江原道子、永山元彦、中尾寿奈、塩田正明、青木フローラ聖子[木下]、田沼順一、口腔前癌病変診断マーカーとしての糖鎖の可能性、第104回日本病理学会総会・学術大会、2015年5月2日、名古屋国際会議場(名古屋)

江原道子、永山元彦、中尾寿奈、金子裕康、田沼順一、レクチンマイクロアレイを用いた口腔粘膜前癌病変の糖鎖プロファイリング、第26回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2015年7月31日、北海道大学(札幌)

塩田正明、江原道子、木下聖子、糖鎖インフォマティクスを用いたレクチンアレイ実験データの解析、第2回 FCCA シンポジウム FCCA グライコサイエンス若手フォーラム 2015、2015年7月、お茶の水女子大学(東京)

Michiko Ehara、Kiyoko F. Aoki-Kinoshita、Masaaki Shiota、Motohiko Nagayama、Juna Nakao、Hiroyasu Kaneko、Jun-ichi Tanuma、Glycan profiling of oral precancerous lesions using a lectin microarray, 6th Charle Warren Workshop 2016 Finding meaning in the ambiguity of glycan structures, 24-26 Aug. 2016, Hokkaido University (Sapporo, Japan)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江原道子 (EHARA, Michiko)
朝日大学・歯学部・講師
研究者番号：10425308

(2) 研究分担者

田沼順一 (TANUMA, Jun-ichi)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号：20305139

永山元彦 (NAGAYAMA, Motohiko)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号：50298436

木下聖子 (AOKI-KINOSHITA, Kiyoko F.)
創価大学・理工学部・教授
研究者番号：50440236

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

()