

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861405

研究課題名(和文)糖転移酵素を分子標的とする膀胱癌治療法の実験的研究

研究課題名(英文) Experimental study of the glycosyltransferase as a drug target of bladder cancer

研究代表者

鈴木 裕一郎 (Suzuki, Yuichiro)

弘前大学・医学研究科・研究員

研究者番号：50647344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖構造変化は種々の癌の悪性度と関連し、本研究で注目した膀胱癌細胞においてもコア2分岐型糖鎖を有する細胞の悪性度が高いことを報告してきた。本研究では糖鎖構造変化による新規抗腫瘍薬の可能性について検討を行い、RNA干渉作用による糖転移酵素の遺伝子発現制御を利用した抗腫瘍効果を検討したが良好な結果は得られなかった。一方で、疑似糖を用いた糖転移酵素阻害効果による抗腫瘍効果については培養細胞株においては抗腫瘍効果が認められた。以上の結果から今後の検討により糖鎖修飾を標的とした新規の抗腫瘍薬開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)： Cell surface carbohydrates expressed on epithelial cells are thought to play an important role in tumor progression. We previously showed Core2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase expression in bladder cancer correlated with tumor progression. In this study, we tried to inhibit the glycosyltransferase using imitation glucose. The imitation glucose showed specifically inhibition of tumor growth in vitro. Therefore, although further study is necessary to determine the glycosyltransferase as a drug target of cancer, imitation glucose has a potential of novel therapeutic agent.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：糖転移酵素 糖鎖生物学

### 1. 研究開始当初の背景

Core2 beta-1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT) は糖転移酵素であり、*O*-結合型糖鎖にコア2構造を付加する酵素であり、その後引き続き poly-*N*-acetylactosamine (Poly-lac) の生成に關与する重要な酵素である。この酵素の発現は大腸癌 (Shimodaira, Nakayama et al. Cancer Res. 1997)、肺癌 (Machida, Nakayama et al. Cancer Res. 2001)の悪性度および前立腺癌の再発率 (Hagisawa, Ohyama et al. Glycobiology 2005)と強い相関関係が認められている。また、膀胱癌においても C2GnT の発現が転移と生命予後に密接に関連し、そのメカニズムとして Poly-lac 上に galectin-3 が結合し、生体内において NK 細胞からの攻撃に対する回避機構に重要な役割を有することを報告してきた (Tsuboi, Ohyama et al. EMBO J. 2011, Suzuki, Tsuboi, Ohyama et al. Int. J. Oncol. 2012)。このことから C2GnT が癌の悪性度および再発に関連していることは明らかである。

### 2. 研究の目的

膀胱癌血行性転移の分子機構は不明な点が多いが、これまでに細胞表面糖鎖に注目し研究を行ってきた。その結果、膀胱癌細胞に発現する糖転移酵素 C2GnT が転移と生命予後に密接に関連し、C2GnT を発現する細胞は NK 細胞からの攻撃を回避する能力を持つことを明らかにしてきた。

本研究では、膀胱癌細胞における siRNA を用いた糖転移酵素の発現抑制、疑似糖を用いた酵素の活性抑制を利用し、癌細胞表面糖鎖の調節を目的とした新規の抗癌剤ターゲットとして糖転移酵素発現抑制の有用性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

マウス膀胱癌移植モデルにおいて siRNA による膀胱癌細胞の C2GnT 発現抑制が NK 細胞感受性を増幅させ、抗腫瘍効果を示すかを明らかにする。膀胱癌移植マウスモデルにはヌードマウスに対し、腰背部にヒト膀胱癌細胞 YTS-1 および KK47 細胞株を移植する、もしくは C3H マウスにマウス膀胱癌細胞株 MBT-2 を移植したシンジェニック系を用いて腫瘍抑制効果について検討を行う。

疑似糖をヌードマウス膀胱癌移植マウスに投与し、糖転移酵素活性抑制による抗腫瘍効果の有無を明らかにする。疑似糖は生理食塩水およびリン酸緩衝液 (PBS) に懸濁し腹腔内投与により腫瘍抑制効果の検討を行う。

腫瘍サイズの測定はキャリパーにより長径および短径の長さを測定し、以下の計算式により腫瘍体積を算出する。

$$(\text{短径})^2 \times (\text{長径}) / 2.$$

### 4. 研究成果

siRNA による C2GnT 発現抑制による抗腫瘍効果について検討を行ったが、siRNA の生体内安定性が低いためか、腫瘍内での siRNA の遺伝子抑制効果が見られず、結果が得られなかった。

疑似糖を用いた抗腫瘍効果の検討においては、まずは腎細胞癌細胞、および正常細胞として血管内皮細胞への増殖阻害効果について *in vitro*での検討を行った。

腎細胞癌 RCC826 株への疑似糖による増殖抑制効果に濃度依存性があるかを検討した。癌細胞株 RCC826 細胞を 96 well plate に播種したのち疑似糖 0.025%、0.05%、0.1%、0.2% 含有液体培地にて培養を行い、通常培地においてコンフルエントに達した 6 日目に CCK-8 細胞カウントキットにより細胞数を算出した。その結果、疑似糖 0.2%含有培地において有意に増殖抑制効果を示すことが明らかとなった (図 1)。

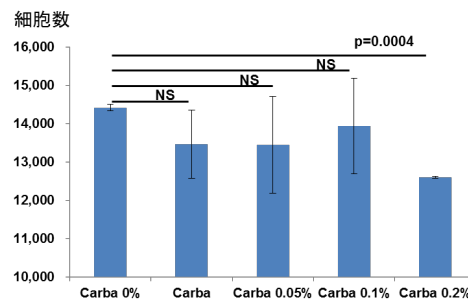


図1

次に 0.2%疑似糖鎖含有培地での増殖能を経時的に確認した。癌細胞数 5000 を 96 well plate に播種し疑似糖含有培地および通常培地により培養を行い 24 時間ごとに CCK-8 細胞カウントキットにて細胞数を算出した。その結果、4 日目 (96 時間後)において有意に細胞増殖を抑制することが明らかとなった (図 2)。

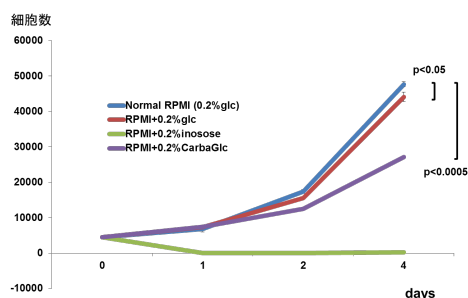


図2

正常細胞への影響と癌細胞への影響を比較するため、癌細胞株 ACHN、RCC6、RCC23 および血管内皮細胞株 HUGMEC および HUVEC に対する増殖抑制効果比較した。癌細胞株およ

び正常細胞株を 5000 細胞数で播種し 0.2%疑似糖含有培地にて 4 日間培養し細胞カウントキットにより細胞数を算出した。その結果、正常細胞株には増殖抑制効果を示さず、癌細胞の増殖が抑制されていることが明らかとなった(図3)。また、この増殖抑制効果の濃度依存性および他の癌細胞株にも効果があるかを検証した。その結果、疑似糖による腫瘍細胞増殖抑制効果は濃度依存的であり、腎細胞癌細胞株だけでなく前立腺癌細胞株 LNCaP、DU145、PC3、膀胱癌細胞株 YTS-1 にも効果を示すことが明らかとなった(図4)。

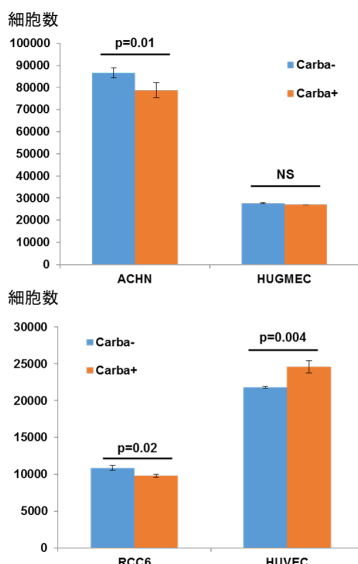


図3

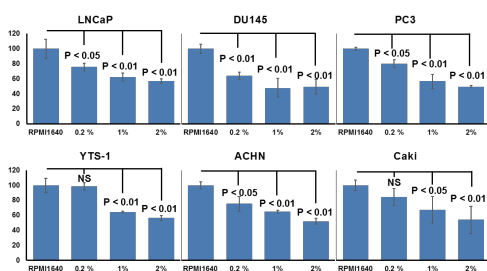


図4

以上の結果をもとに *in vivo* での腫瘍抑制効果について検討を行った。ヌードマウスの腰背部に膀胱癌細胞株 YTS-1 を移植し 3 日目より疑似糖を 0.5 mg/day および 2mg/day で週 2 回投与し腫瘍サイズを経時的に測定した。検討で行った 3 週間の期間では有意な腫瘍抑制効果は認められなかった(図5)。

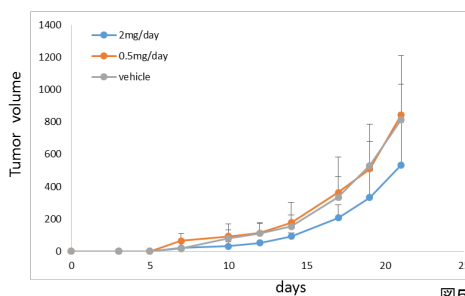


図5

生体内においては、癌の排除に免疫担当細胞も関わっており、疑似糖による糖鎖合成の阻害は免疫細胞の機能を弱めている可能性も考えられるため、糖鎖合成阻害経路を明らかにし癌細胞に対する特異性の高い疑似糖を合成することで新規の抗癌剤ターゲットとして有用となることが予想される。

## 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 1 件)

- Hatakeyama S, Fujita T, Murakami R, Suzuki Y, Sugiyama N, Yamamoto H, Okamoto A, Imai A, Tobisawa Y, Yoneyama T, Mori K, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Narumi S, Ohyama C. Outcome comparison of ABO-incompatible kidney transplantation with low-dose rituximab and ABO-compatible kidney transplantation: a single-center experience. *Transplant Proc.* 2014;46(2):445-8. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.09.036. PMID: 24655984 (査読有)

[学会発表](計 0 件)

[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 鈴木裕一郎 (Suzuki, Yuichiro)

弘前大学医学研究科・研究員  
研究者番号：50647344

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
( )