

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462520

研究課題名(和文) 絨毛性腫瘍に特異的なhCG糖鎖構造をベースにした新規腫瘍マーカーの確立

研究課題名(英文) Establishment of a new tumor marker for trophoblastic neoplasia based on specific sugar chains of hCG

研究代表者

山本 英子 (Yamamoto, Eiko)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10432262

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)：絨毛癌細胞Jar用いGnT-IVa過剰発現細胞Jar/GnT-IVaとGnT-III発現抑制shRNAベクターを作成した。Jar/GnT-IVaにGnT-III shRNAを導入しGnT-IVa過剰発現/GnT-III発現抑制絨毛癌細胞を樹立した。GnT-IIIによる糖鎖変化は認めなかった。GnT-IVa発現抑制細胞GnT-IVa KDとJarの培養上清を用い、GSL-IIレクチン、マウス2次抗体を用いたサンドイッチELISAを行った。Jar/GnT-IVaとコントロール細胞の細胞蛋白と培養上清蛋白を用いたNano-LC/MS/MS解析を行いLAMP-2がGnT-IVaの標的分子であった。

研究成果の概要(英文)：Choriocarcinoma cell line with GnT-IVa overexpression (Jar/GnT-IVa) was established and shRNA vectors were made for knockdown of GnT-III expression. GnT-III shRNA vectors were introduced into Jar/GnT-IVa. The levels of sugar chains were not changed by knockdown of GnT-III. Sandwich ELISA was performed using conditioned medium of Jar and GnT-IVa KD (Jar with knockdown of GnT-IVa expression), GSL-II lectin and a mouse antibody. Whole cell lysate and conditioned medium were collected from Jar/GnT-IVa and control cells. Nano-LC/MS/MS analysis using the proteins showed that LAMP-2 was a target molecule of GnT-IVa.

研究分野：絨毛性疾患

キーワード：絨毛性腫瘍 糖鎖 hCG

1. 研究開始当初の背景

絨毛癌はすべての妊娠後に発症しうる悪性腫瘍で、肺、肝臓、脳などの遠隔転移を来しやすい。胞状奇胎後管理や抗癌剤、支持療法の発達により、日本における絨毛癌患者の発症率および予後は飛躍的に改善した。現在でも治癒率は約90%であるが、早期に発見できれば100%の完寛が望める疾患である。

胎盤栄養膜細胞から発生する絨毛性疾患は、胞状奇胎(良性)から侵入奇胎(境界悪性)を経て絨毛癌(悪性)になると考えられる。hCGはalphaおよびbetaサブユニットから構成される二量体で、全ての絨毛性疾患および正常胎盤はhCGを分泌する。アスパラギン(N)結合糖鎖およびセリン(O)結合糖鎖が付加されるが、正常胎盤から分泌されるhCGと侵入奇胎・絨毛癌から分泌されるhCGの糖鎖の相違について報告されている。

患者尿中hCGのN結合糖鎖解析では、正常妊娠および胞状奇胎では認めない異所性糖鎖beta1-4GlcNAcが侵入奇胎および絨毛癌で認められた。beta1-4GlcNAcを付加するN-アセチルグルコサミン転移酵素IV(GnT-IV)の活性およびmRNAレベルでの発現は、正常胎盤に比べて絨毛癌細胞株で非常に高かったが、組織における発現やその機能については検討されていない。

我々は、胎盤および絨毛性疾患における免疫組織染色や、細胞株を含めたRT-PCRおよびWestern blotを行い、GnT-IVaは正常胎盤や胞状奇胎では発現を認めないが、侵入奇胎や絨毛癌組織では強く発現していることを明らかにした。以上の結果は患者尿中hCGのN結合糖鎖解析結果と同様で、悪性化に伴いGnT-IVaの発現は明らかに強くなった。絨毛細胞におけるGnT-IVaの発現が、細胞増殖や分化、浸潤など悪性化と関与する可能性が考えられるが、解明されていない。

絨毛細胞の癌化は、他の癌と同様に、癌遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の欠損を含む、多段階遺伝変化の蓄積により、細胞増殖や分化、アポトーシス、浸潤などの機能変化を起こすことによると考えられるが、解明されていない。GnT-IVaの転写制御因子の解明や、全胞状奇胎由来細胞株への遺伝子導入による機能変化の検討により、絨毛癌発症メカニズムが解明されることが期待される。

2. 研究の目的

胎盤栄養膜細胞(絨毛細胞)から発生する絨毛性疾患には、胞状奇胎(良性)、侵入奇胎(境界悪性)、絨毛癌(悪性)がある。絨毛性疾患の栄養膜細胞が分泌するhuman chorionic gonadotropin(hCG)は優れた腫瘍マーカーであるが、正常妊娠時にも分泌されるため、絨毛癌をその他の妊娠と鑑別するために用いることはできない。hCGのN型糖鎖解析により絨毛性腫瘍では三分岐鎖や異常二分岐鎖を特異的に認め、糖転移酵素GnT-IVaが絨毛性腫瘍では特異的発現する

ことが原因であることが明らかにされた。絨毛性腫瘍の特異的マーカーとして、GnT-IVaによる三分岐鎖・異常二分岐鎖hCG測定が可能になれば早期診断が可能になり、特に絨毛癌の治療成績向上につながる。特異的N型異常糖鎖付加hCG抗体作成および特異的レクチンを用いたサンドイッチELISA法による測定法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養上清を用いたhCGおよびGSL-IIによるサンドイッチELISA法の確立

GnT-IVaによる三分岐鎖hCGを定量的に測定するための、抗hCG抗体およびGSL-IIレクチン(グリフォニアマメレクチン)を用いたサンドイッチELISA法確立のため、抗体濃度、GSL-II濃度、検体量や反応時間などの条件設定が必要である。絨毛癌細胞株Jarの培養上清を用い条件設定を行う。JarにGnT-IVa shRNAを導入した細胞株(Jar/shGnT-IVa)とGnT-IVa過剰発現株(Jar/GnT-IVa)から、それぞれの培養上清を0:10~10:0の割合で混合すれば、蛋白としてのhCG濃度は同じだが三分岐鎖の濃度勾配のあるサンプルとなる。培養上清を1:1~1:10000の希釈で96wellプレート(Thermo Scientific社イムロン2HB)にコートし、抗体を添加し洗浄後、二次抗体での反応後にStreptavidin-alkali phosphatase(SA-AP)を用いて405nmの吸光度で測定する。

(2) Jar/GnT-IVa/shGnT-III細胞へのrecombinant hCG導入

前年度に同定された絨毛癌組織におけるドミナントサブタイプのCGB遺伝子にHis-tagを付けた、hCG過剰発現用のレンチウイルスベクターを作成し、Jar/GnT-IVa/shGnT-III細胞に遺伝子導入する。細胞培養上清を回収し、ニッケルビーズにHis-tagを吸着させて回収するNi-NTA Agarose(QIAGEN社)を用いてhCGを抽出し、濃度を測定する(山本担当)。

(3) GnT-IVa発現に関わるcRelの絨毛癌における機能解析

GnT-IVaのプロモーター解析において転写因子cRelが絨毛癌の悪性化に関与する可能性が示唆されたため、絨毛癌細胞株を用いたNFkBファミリーの発現および免疫沈降を行う。Jarに遺伝子導入を行いcRel発現抑制モデルおよびcRel過剰発現モデル(SC-29857、サンタクルズ社を使用)を作成する。両モデルを用い、増殖能、接着能、遊走能、浸潤能についてcRel発現による機能変化を検討する。培養上清を用いたMMP-2、MMP-9活性はザイモグラフィにより検討する。アポトーシスや細胞遊走に関わるシグナル伝達分子の発現変化を検討する。

(4) GnT-IVaの新規ターゲット分子の検索

Jar/GnT-IVaとコントロール細胞より細胞蛋白と培養上清タンパクを回収し、DSAレクチンプロットとGSL-IIレクチンプロットを行

糖鎖が変化した分子の候補を挙げる。候補分子のバンドを切り出し、Nano-LC/MS/MS解析を行う。両方に検出できたタンパクの抗体を用いた免疫沈降法により、絨毛癌細胞において発現し GnT-IVa による糖鎖が付着しているかを確認する。そのタンパクの絨毛癌細胞における局在を免疫組織染色または細胞株を用いた FACS により検討する。

4. 研究成果

(1) 培養上清を用いた hCG および GSL-II によるサンドイッチ ELISA 法の確立

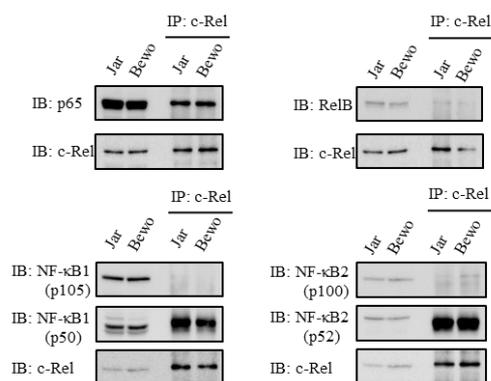
GnT-IVa 発現抑制絨毛癌細胞株 (GnT-IVa KD) と親株 Jar の培養上清を回収し、1/1 ~ 1/1000 の濃度の hCG 抗体と Jar 培養上清 (親株:GnT-IVa KD=1:0 ~ 1:100) をプレート下面接着と反応液とする 2 方法を行い、GSL-II レクチン、マウス 2 次抗体を用いたサンドイッチ ELISA を行った。いずれにおいても反応は認めなかった。

(2) Jar/GnT-IVa/shGnT-III 細胞への recombinant hCG 導入

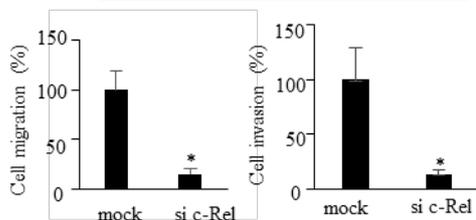
GnT-III 発現抑制を行うため、Murin Stem Cell Virus プロモーター型レンチウイルスベクターを用いて shRNA ベクターを 3 種類作成した (pSI-MSCV-CLXPuro-H1R-GnT-III sh1, 2, 3)。絨毛癌細胞 Jar に遺伝子導入、ピュロマイシンにてセレクションを行った細胞を Western blot 法にて発現抑制を確認した。さらに GnT-IVa 発現過剰絨毛癌細胞株 (Jar/GnT-IVa) に GnT-III shRNA ベクターを導入し、GnT-IVa 過剰発現/GnT-III 発現抑制絨毛癌細胞を樹立した。

(3) GnT-IVa 発現に関わる cRel の絨毛癌における機能解析

絨毛癌細胞株から抽出したタンパクを用いた Western blot 法および免疫沈降法 (IP) の



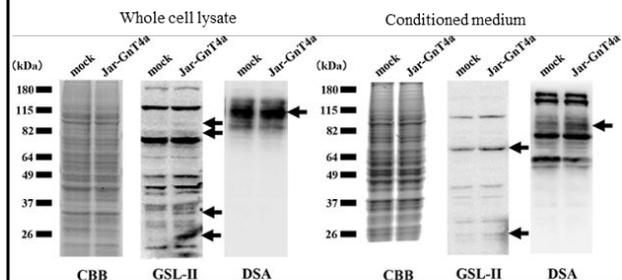
絨毛癌細胞におけるNF-κBファミリーの発現



c-Rel発現抑制により遊走能・浸潤能は低下

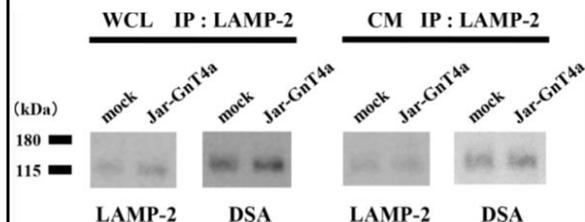
結果、c-Rel と p65 (RelA) が 2 量体を形成して絨毛癌で機能することが明らかとなった。絨毛癌細胞において c-Rel を発現抑制すると遊走能と浸潤能は低下した。過剰発現株では亢進した。PI3K/Akt シグナル経路を関して浸潤促進することが明らかとなった。

(4) GnT-IVa の新規ターゲット分子の検索
細胞より抽出したタンパク (Whole cell lysate) および培養上清タンパクを用いた



GnT-IVa過剰発現により糖鎖付加された分子(矢印)

GSL-II および DSA レクチンプロットにより、絨毛癌細胞 Jar と比較して GnT-IVa 過剰発現細胞 Jar-GnT4a 細胞で糖鎖レベルが増加した分子をゲルより抽出し、Nano-LC/MS/MS 解析を行った結果、両方の蛋白より LAMP-2 が検出された。絨毛癌細胞および培養上清での発現は免疫沈降およびファックスにて確認し、細胞膜および分泌タンパクとしても存在することを明らかにした。本研究の結果、LAMP-2 が GnT-IVa の新たな標的分子であり、絨毛癌細胞より分泌されるタンパクであることも明らかとなった。



LAMP-2は細胞内および培養上清中に存在しGnT-IVaによる糖鎖修飾を受ける

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 18 件)

Sekiya Y, Yamamoto E, Niimi K, Nishino K, Nakamura K, Kotani T, Kajiyama H, Shibata K, Kikkawa F. c-Rel Promotes Invasion of Choriocarcinoma Cells via PI3K/AKT Signaling. *Oncology*. 2017;92(5). 査読有。

Ushida T, Kotani T, Tsuda H, Imai K, Nakano T, Hirako S, Ito Y, Li H, Mano Y, Wang J, Miki R, Yamamoto E, Iwase A, Bando YK, Hirayama M, Ohno K, Toyokuni S, Kikkawa F. Molecular hydrogen ameliorates several characteristics of preeclampsia in the Reduced Uterine Perfusion Pressure (RUPP) rat model. *Free Radic Biol Med*.

2016;101:524-533. 査読有.

Yamamoto E, Niimi K, Fujikake K, Nishida T, Murata M, Mitsuma A, Ando Y, Kikkawa F. High-dose chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation for choriocarcinoma: A case report and literature review. *Mol Clin Oncol*. 2016;5(5):660-664. 査読有.

Utsumi F, Kajiyama H, Sakata J, Higashi M, Niimi K, Sekiya R, Mitsui H, Suzuki S, Umezu T, Mizuno M, Yamamoto E, Shibata K, Kikkawa F. Opioid needs of terminally ill patients with gynecologic malignancies. *Int J Clin Oncol*. 2015;20(2):405-10. 査読有.

Kajiyama H, Mizuno M, Shibata K, Yamamoto E, Kawai M, Nagasaka T, Kikkawa F. Recurrence-predicting prognostic factors for patients with early-stage epithelial ovarian cancer undergoing fertility-sparing surgery: a multi-institutional study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014;175:97-102. 査読有.

Niimi K, Murakumo Y, Watanabe N, Kato T, Mii S, Enomoto A, Asai M, Asai N, Yamamoto E, Kajiyama H, Shibata K, Kikkawa F, Takahashi M. Suppression of REV7 enhances cisplatin sensitivity in ovarian clear cell carcinoma cells. *Cancer Sci*. 2014;105(5):545-52. 査読有.

Kajiyama H, Utsumi F, Higashi M, Sakata J, Sekiya R, Mizuno M, Umezu T, Suzuki S, Yamamoto E, Mitsui H, Niimi K, Shibata K, Kikkawa F. Is there any association between where patients spend the end of life and survival after anticancer treatment for gynecologic malignancy? *J Palliat Med*. 2014;17(3):325-30. 査読有.

Kumazawa S, Kajiyama H, Umezu T, Mizuno M, Suzuki S, Yamamoto E, Mitsui H, Sekiya R, Shibata K, Kikkawa F. Possible association between stem-like hallmark and radioresistance in human cervical carcinoma cells. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014;40(5):1389-98. 査読有.

Yamamoto E, Niimi K, Shinjo K, Yamamoto T, Fukunaga M, Kikkawa F. Identification of causative pregnancy of gestational trophoblastic neoplasia diagnosed during pregnancy by short tandem repeat analysis. *Gynecol Oncol Case Rep*. 2014;9:3-6. 査読有.

Kajiyama H, Mizuno M, Shibata K, Umezu T, Suzuki S, Yamamoto E, Mitsui H, Sekiya R, Niimi K, Kawai M, Nagasaka T, Kikkawa F. Oncologic outcome after recurrence in patients with stage I epithelial ovarian cancer: are clear-cell and mucinous histological types a different entities?

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2014;181:305-10. 査読有.

Kan M, Yamamoto E, Niimi K, Tamakoshi K, Sekiya Y, Nishino K, Ino K, Kikkawa F. Gestational Trophoblastic Neoplasia and Pregnancy Outcome After Routine Second Curettage for Hydatidiform Mole: A Retrospective Observational Study. *J Reprod Med*. 2016;61(4):373-9. 査読有.

〔学会発表〕(計 34 件)

Kimihiro Nishino, Naoya Kataoka, Shinji Takamatsu, Miyako Nakano, Shun Ikeda, Sayaka Koda, Eiko Yamamoto, Fumitaka Kikkawa, Yasuhiko Tomita, Yoshihiro Kamada, Eiji Miyoshi. Establishment of an antibody specific for cancer-associated haptoglobin and its clinical investigation. 第 75 回日本癌学会学術総会. 2016 年 10 月 6 日. パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

佐藤静香、新美 薫、山本英子、藤掛佳代、鈴木史朗、中村謙一、西野公博、三輪陽子、吉川史隆. 絨毛性腫瘍の治療中に生じた肺障害の診断と治療. 第 68 回日本産婦人科学会学術講演会. 2016 年 4 月 21 日. 東京国際フォーラム、東京都千代田区

新美 薫、山本英子、西野公博、三輪陽子、中村謙一、佐藤静香、吉川史隆. 糖転移酵素 C2GnT と絨毛細胞の悪性化について. 第 33 回日本絨毛性疾患研究会. 2015 年 11 月 5 日. JA 共済ビル、東京都千代田区

三輪陽子、山本英子、西野公博、中村謙一、佐藤静香、新美薫、吉川史隆. 絨毛癌細胞における c-Rel の発現と機能. 第 33 回日本絨毛性疾患研究会. 2015 年 11 月 5 日. JA 共済ビル、東京都千代田区

山本英子、藤掛佳代、新美 薫、三輪陽子、西野公博、吉川史隆. 難治性絨毛癌に対する自己末梢血幹細胞移植併用化学療法. 第 67 回日本産婦人科学会学術講演会. 2015 年 4 月 9 日. パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

山本英子. PSTT の最新情報. 第 22 回日本胎盤学会学術集会/第 32 回日本絨毛性疾患研究会. 2014 年 10 月 3 日. 京都大学、京都府京都市

山本英子. 糖鎖生物学を用いた絨毛細胞の悪性化機構と機能変化の解明. 第 56 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会. 2014 年 7 月 17 日. 栃木県総合文化センター、栃木県宇都宮市

Nishino K, Yamamoto E, Miwa Y, Niimi K, Kikkawa F. The expression of N-acetylglucosaminyltransferase IVa in gestational trophoblastic diseases and its function in a choriocarcinoma cell line, Jar cell. *ACOG Annual Clinical*

Meeting . 2014 年 4 月 26 日 . シカゴ (アメリカ)

山本 英子、新美 薫、三輪 陽子、西野 公博、吉川 史隆. 絨毛癌の治療成績向上を目的とした後方視的検討. 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 . 2014 年 4 月 18 日. 東京国際フォーラム、東京都千代田区

〔図書〕(計 5 件)

山本英子 . 絨毛性疾患 . 今日の治療指針 . 医学書院 . 2016 年 . 2192 (1329-1330)

新美薫、山本英子、吉川史隆 . 産婦人科処方実践マニュアル (第 2 章): 婦人科腫瘍分野 絨毛性疾患 非絨毛癌群 . 産科と婦人科 . 2016 年: 83 巻 Suppl. 425 (179-181)

山本英子 . 化学療法による妊孕性への影響 . 外来化学療法室 がん薬物療法カンファレンス . 南山堂 . 2015 年 . 232 (192-195)

井籠 一彦、馬淵 泰士、山本 英子 . がん妊孕性温存治療の適応と注意点-腫瘍学と生殖医学の接点: 婦人科腫瘍学 絨毛性疾患 絨毛性疾患に対する妊孕性温存治療 . 臨床婦人科産科 . 2015 年: 69 巻 9 号 1212 (884-889)

山本英子、三輪陽子、新美薫 . 侵入奇胎、絨毛癌の化学療法後の生殖機能、妊娠、分娩に与える影響について教えてください . 婦人科癌診療 Q&A 一つ上に行く診療の実践 . 中外医学社 . 2014 年 . 339 (306-309)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山本 英子 (YAMAMOTO EIKO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 10432262

(2) 研究分担者

柴田 清住 (SHIBATA KIYOSUMI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 90335026