

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659724

研究課題名(和文)子宮内膜癌細胞における C2GnT1 機能の検討

研究課題名(英文) Study of the expression and function of C2GnT1 in endometrial carcinoma

研究代表者

鈴木 昭久 (SUZUKI, Akihisa)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：10547095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000 円、(間接経費) 780,000 円

研究成果の概要(和文)：糖転移酵素であるヒト C2GnT1 に対するウサギ polyclonal 抗体(以下 C2GnT1 抗体)の特異性を、ヒト C2GnT1 cDNA 導入 COS7 細胞の Western blot で確認し、この抗体を用いて正常子宮内膜、子宮内膜癌組織における C2GnT1 発現を検討した。正常子宮内膜腺上皮に比較して、子宮内膜癌組織で有意に発現が増強しており、癌においては深い筋層浸潤、脈管侵襲など、悪性度上昇に関連して発現が増強する傾向が認められた。また、C2GnT1 高発現症例は有意に生存期間の短縮を認め、多変量解析から C2GnT1 高発現が独立した予後不良因子であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Anti-human C2GnT1 rabbit polyclonal antibody were supplied from Prof. Nakayama (Shinshu Univ. Molecular Pathology) and confirmed its specificity by western blotting and immunofluorescent staining using COS7 cells transfected human C2GnT1 cDNA. Using this anti-C2GnT1 antibody, the expression of C2GnT1 was examined in normal endometrium, atypical endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma, immunohistochemically. The expression of C2GnT1 was significantly stronger in endometrial carcinoma than that in normal endometrium ($P<0.05$). In endometrial carcinomas, the stronger expression of C2GnT1 seemed to be involved in aggressiveness including higher histological grade, deep myometrial invasion, and lymph-vascular space invasion. Kaplan-Meier method revealed that the cases with C2GnT1 overexpression were associated with shorter survival periods ($P<0.05$). In addition, multi-variable analysis revealed that C2GnT1 overexpression was an independent prognostic factor.

研究分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：C2GnT1 子宮内膜癌 予後因子 コア 2 分枝糖鎖

1. 研究開始当初の背景

細胞表面のタンパク質には糖鎖が結合して糖タンパク質を形成しており、そのため、例えば血液型抗原などの多数の糖鎖が細胞表面に発現している (Essentials of Glycobiology, 2nd ed.2009:p229)。これらの細胞表面の糖鎖は、細胞の成熟・分化、炎症や腫瘍形成など、多くの生物学的現象において重要な役割を果たしていると考えられている (Cancer Res 1996;56:p2237, Cancer Res 1996; 56: p5309)。これらの糖鎖の形成には多数の糖転移酵素が関与しているが、その内、Core 2 1-6 N-acetylglucosaminyl transferase 1 (以下、C2GnT1)はO-グリカン鎖の core2 分枝構造の形成に係わる酵素であり (Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: p9326) 腫瘍細胞の悪性形質の獲得に重要な役割をもつと考えられている。実際にこれまで複数種類の癌において、C2GnT1 発現が腫瘍の悪性度上昇や生存期間短縮に関連することが報告されている (Glycobiology 2005;15:p1016、Int J Cancer 2010;127:p1052)。しかしながら、子宮内膜癌における我々もこれまでに子宮内膜癌における C2GnT1 発現は明らかになっていない。C2GnT1 発現を免疫染色で観察したところ、正常に比して内膜癌で発現が亢進すること、脈管侵襲部位や、深い筋層浸潤部位で特に発現が増強すること、高発現は生存期間短縮に関連し、独立した予後因子となることを見出した (投稿中)。

子宮内膜癌は、近年わが国において罹患数・死亡数ともに急速に増加しており、癌発生・進展の病態の解明は急務であり、新規治療法や予防法の確立も望まれる。そこで子宮内膜癌における C2GnT1 とそれにより形成される糖鎖構造の機能を解析し、新規治療ターゲットとなる可能性を検討することを目的として、本研究を計画した。

2. 研究の目的

子宮内膜癌における C2GnT1 の発現と機能を解析することを目的とする。それにより子宮内膜癌の新規治療ターゲットとなる可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 抗体の特異性の確認

抗ヒト C2GnT1 ウサギ polyclonal 抗体(以下 C2GnT1 抗体)の特異性はアフリカミドリザル由来の細胞である、COS7 細胞にヒト C2GnT1 発現ベクターを導入し、Western blotting で C2GnT1 の特異的バンドを確認した。また同細胞を用いて、C2GnT1 抗体での蛍光免疫染色を施行した。

(2) 組織サンプル

組織切片は、あらかじめ術前・生検前にインフォームドコンセントを得た後、摘出されたホルマリン固定パラフィン包埋組織検体

を用いた。子宮内膜癌組織 (84 例)、子宮内膜異型増殖症 (15 例) 正常子宮内膜組織 (30 例) を検討に用いた。正常子宮内膜のうち 20 例と子宮内膜異型増殖症のうちの 5 例は、内膜癌を伴う症例であった。

(3) C2GnT1 発現の免疫組織学的検討

C2GnT1 抗体を一次抗体として 100 倍希釈で用いた。間接的酵素抗体法で免疫染色を行った。染色強度は、500 細胞中の陽性細胞率を Positivity Index (PI) で表し、PI < 1 を陰性、1 ≤ PI < 5 を部分陽性、5 ≤ PI < 10 を陽性、10 ≤ PI を強陽性として評価した。

(4) 各種病理学的因子と C2GnT1 発現

組織学的 Grade、病期、深い筋層浸潤、脈管侵襲、リンパ節転移、頸部浸潤、腹水細胞診、卵巣転移の各病理学的因子と C2GnT1 発現 (PI) との関連を Mann-Whitney U-test で検討した。

(5) C2GnT1 発現と生存期間

PI 10 の強陽性例を高発現群とし、それ以外を非高発現群として、生存期間を Kaplan-Mayer 法で検討した。他の病理学的因子とともに Cox-regression analysis による多変量解析で、予後因子となりえるか検討した。

(6) 子宮内膜癌細胞株への C2GnT1 遺伝導入

前述の C2GnT1 発現ベクターを用いて、子宮内膜癌細胞 Ishikawa に C2GnT1 を高発現させた。浸潤能を Matrigel invasion assay、遊走能を scratch wound healing assay で検討した。

(7) 卵巣癌組織での C2GnT1 発現

あらかじめ術前・生検前にインフォームドコンセントを得た後、摘出されたホルマリン固定パラフィン包埋組織検体の卵巣癌 20 例に対して、同様に C2GnT1 免疫染色・評価を行った。

4. 研究成果

(1) C2GnT1 抗体の特異性

C2GnT1 cDNA 導入前および後の COS7 細胞の Western blotting において、C2GnT1 抗体が C2GnT1 特異的バンドを認識することを確認した。また、蛍光免疫染色においても C2GnT1 cDNA 導入により COS7 細胞の蛍光が著明に増強した。これらから、作成された C2GnT1 抗体はヒト C2GnT1 を特異的に認識することが確認された。

(2) 正常子宮内膜腺上皮、子宮内膜癌における C2GnT1 発現

正常子宮内膜腺上皮では殆ど C2GnT1 発現を認めなかったが (mean PI ± SD = 0.52 ± 1.24) これに比較して子宮内膜癌では有意

に C2GnT1 発現が増強していた (mean PI \pm SD= 8.31 \pm 15.29)。(図 1、2)

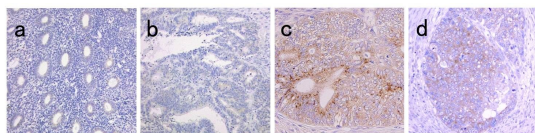


図 1 .C2GnT1 免疫染色結果 a:正常子宮内膜 (陰性) b:類内膜腺癌 Grade1 (陰性) c:類内膜腺癌 Grade1 (強陽性) d:類内膜腺癌 Grade3 (強陽性)

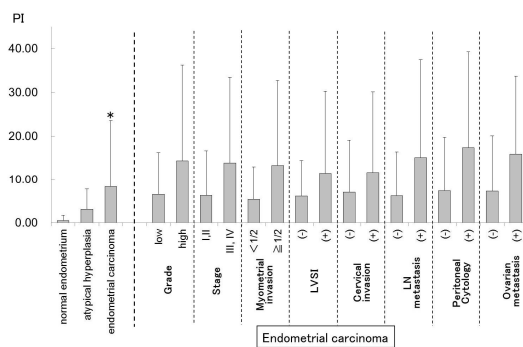


図 2 .PI 平均値と各病理学的因子
*: 正常との間に有意差あり。

(3) 各種病理学的因子と C2GnT1 発現

C2GnT1 の PI は高 Grade、進行癌、深い筋層浸潤、脈管侵襲、腹腔細胞診陽性などで高い傾向を示したが、有意差は認めなかった。(図 2) また免疫染色の詳細な検討でも深い浸潤部位や浸潤の先端で発現の増強が観察され、C2GnT1 発現が子宮内膜癌の悪性度増強と関連する可能性が考えられた。

(4) C2GnT1 発現と生存期間

PI 10 の強陽性症例は 84 例中 20 例あり、これらを C2GnT1 高発現群とし、残り 64 例の非高発現群と比較した。Kaplan-Mayer 法では、C2GnT1 高発現群は有意に全生存期間 ($P < 0.0005$)、無進行生存期間 ($P = 0.009$) が有意に短縮していた。(図 3) さらに多変量解析の結果、Hazard ratio 1.008 - 1.079, $P = 0.017$ で C2GnT1 高発現は独立した予後不良因子と考えられた。

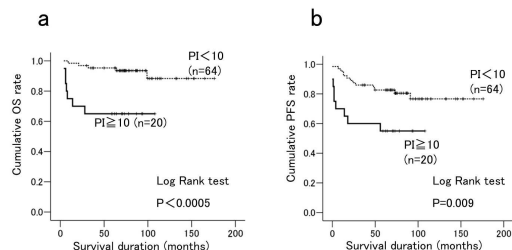


図 3 : 累積生存率曲線 a: 全生存率 (OS) b: 無進行生存率 (PFS)

(5) 子宮内膜癌細胞株への C2GnT1 遺伝導入

C2GnT1 発現ベクターを導入した Ishikawa 細胞 (Ishikawa-C2GnT1) と空ベクターを導入した Ishikawa-mock で検討した。浸潤能、遊走能に関して Ishikawa-C2GnT1 では有意な変化は観察されなかった。これは、Ishikawa 細胞がもともと殆ど動かない細胞であることに起因する可能性も考えられ、現在、他の細胞株でも検討中である。

(6) 卵巣癌組織での C2GnT1 発現

卵巣癌では子宮内膜癌と異なり 81% と高頻度に強発現 (PI 10) が認められた。これは卵巣癌において血清 SLX 上昇例が多いこととの関連があるかもしれない。一方、子宮内膜癌では一般に SLX 高発現は知られておらず、C2GnT1 は他の糖鎖抗原生成に参与している可能性が考えられる。

以上より、子宮内膜癌において C2GnT1 発現は悪性度上昇と関連すると考えられ、独立した予後不良因子となると考えられた。

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)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Kobara H, Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R, Yamada Y, Ishikawa K, Kikuchi N, Ohira S, Shiozawa T. Lipocalin2 enhances the matrix metalloproteinase-9 activity and invasion of extravillous trophoblasts under hypoxia. *Placenta*. 2013; 34: 1036-43. (査読あり)
2. Takatsu A, Miyamoto T, Fuseya C, Suzuki A, Kashima H, Horiuchi A, Ishii K, Shiozawa T. Clonality analysis suggests that STK11 gene mutations are involved in progression of lobular endocervical glandular hyperplasia (LEGH) to minimal deviation adenocarcinoma (MDA). *Virchows Arch*. 2013; 462: 645-51. (査読あり)
3. Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R, Ishikawa K, Yamada Y, Kobara H, Nakayama J, Shiozawa T. Immunohistochemical expression of core 2 β 1,6-N-acetylglucosaminyl transferase 1 (C2GnT1) in endometrioid-type endometrial carcinoma: a novel potential prognostic factor. *Histopathology*. 2013 Jun;62(7):986-93. (査読あり)
4. Fuseya C, Horiuchi A, Hayashi A, Suzuki A, Miyamoto T, Hayashi T, Shiozawa T. Involvement of pelvic inflammation-related mismatch repair

abnormalities and microsatellite instability in the malignant transformation of ovarian endometriosis. Hum Pathol. 2012; 43: 1964-72. (査読あり)

5. Mitsuhashi Y, Horiuchi A, Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, Shiozawa T. Prognostic significance of Notch signalling molecules and their involvement in the invasiveness of endometrial carcinoma cells. Histopathology. 2012; 60: 826-37. (査読あり)

[学会発表](計 11 件)

1. 石川香織、宮本 強、鈴木昭久、山田 靖、浅香亮一、塩沢丹里：子宮内膜癌におけるポリコム遺伝子群発現とその臨床病理学的意義の検討 .第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会 2013 年 5 月 10 日～12 日 札幌
2. 鈴木昭久、宮本 強、内川順子、小原久典、山田 靖、石川香織、塩沢丹里：レトロウイルスを用いた cDNA 発現ライブラリーによる卵巣明細胞腺癌原因遺伝子の機能的スクリーニングの試み .第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会 2013 年 5 月 10 日～12 日 札幌
3. Asaka R,Miyamoto T,Suzuki A,Ishikawa K,Yamada Y,Kobara H,Shiozawa T : Sirtuin1(SIRT1),a longevity gene,is over-expressed in endometrial carcinoma. 14th International Gynecologic Cancer Society(IGCS) 2012 年 10 月 13 日～16 日 バンクーバー
4. Yamada Y,Miyamoto T,Asaka R,Ishikawa k,Kobara H,Suzuki A,Shiozawa T : The expression of lipocalin2 in ovarian carcinoma and endometriosis. 14th International Gynecologic Cancer Society(IGCS) 2012 年 10 月 13 日～16 日 バンクーバー
5. Miyamoto T,Asaka R,Yamada Y,Ishikawa K,Kobara H,Suzuki A,Kashima H,Shiozawa T : Lipocalin2 enhances the proliferation of endometrial carcinoma cells in nude mice . 14th International Gynecologic Cancer Society(IGCS) 2012 年 10 月 13 日～16 日 バンクーバー
6. 鈴木昭久、宮本 強、小原久典、山田 靖、石川香織、浅香亮一、塩沢丹里：卵巣明細胞腺癌におけるレトロウイルス cDNA ライブラリーを用いた機能的スクリーニングの試み . 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日～21 日 札幌
7. 浅香亮一、宮本 強、石川香織、山田 靖、小原久典、鈴木昭久、塩沢丹里：正常内膜および子宮内膜癌における Sirtuin1(SIRT1)の発現と機能の検討 .第

71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日～21 日 札幌

8. 石川香織、宮本 強、鈴木昭久、山田 靖、浅香亮一、塩沢丹里：子宮内膜癌におけるポリコム遺伝子 mRNA 発現と臨床病理学的意義の検討 .第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日～21 日 札幌
9. 山田 靖、宮本 強、浅香亮一、石川香織、小原久典、鈴木昭久、鹿島大靖、塩沢丹里：Lipocalin2 は子宮内膜症から発生する卵巣癌で高発現している .第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日～21 日 札幌
10. 宮本 強、浅香亮一、山田 靖、石川香織、小原久典、鈴木昭久、鹿島大靖、塩沢丹里：Lipocalin2 はヌードマウスでの子宮内膜癌細胞の腫瘍増大を促進する . 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日～21 日 札幌
11. 宮本 強、浅香亮一、鈴木昭久、鹿島大靖、塩沢丹里：Lipocalin2 は紫外線照射後およびシスプラチン処理後の子宮内膜癌細胞の生存を促進する . 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 2012 年 4 月 13～15 日 神戸

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 昭久 (SUZUKI,Akihisa)
信州大学・医学部附属病院・特任研究員
研究者番号：10547095

(2)研究分担者

塩沢 丹里 (SHIOZAWA,Tanri)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：20235493

(3)研究分担者

宮本 強 (MIYAMOTO,Tsutomu)
信州大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70418721