

東海大学大学院平成 28 年度博士論文

レクチン・マイクロアレイを用いた婦人科
系癌（子宮体癌、卵巣癌）の糖鎖解析

指導 三上 幹男教授

東海大学大学院医学研究科

先端医科学専攻

西島 義博

学位論文の要約

- ・この学位申請論文は、Genes to Cells に掲載された主要公刊論文を基に作成された。
- ・Genes to Cells に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ[電子書庫システム]で公開することの承諾を得ている。

① レクチン・マイクロアレイを用いた婦人科系癌（子宮体癌、卵巣癌）の糖鎖解析

②Summary

細胞表面の糖鎖は、悪性形質転換〔癌化〕のプロセスの間に様々な変化をすることが知られている。一方で、婦人科癌をはじめ癌化における糖鎖変化のメカニズムはほとんど知られていない。近年、婦人科領域においては、我々の研究室より婦人科癌の中でも腺癌を有する悪性腫瘍では、その腺腔の維持・形成などには様々な糖鎖や糖脂質が関与していることを報告してきている。そこで今回我々は、婦人科癌の中でも腺癌を有し、同一の組織型で多様な分化を認める子宮体癌における細胞の糖鎖変化を迅速かつ正確に捉えることを目的に、網羅的糖鎖解析が可能な新技術であるレクチン・マイクロアレイ技術を用いてこれらの腫瘍の細胞表面の糖鎖の解析を行った。

基礎的解析として、正常子宮内膜由来培養細胞株と分化度の異なる2種類の子宮体癌〔高分化型(G1)と低分化型(G3)〕由来培養細胞株の糖鎖構造を比較解析した結果、各細胞において異なる発現プロファイリングを認めた。さらに癌細胞群においては、G1とG3の間に明らかな差を認め、測定した45種類のレクチンのうち6種類のレクチン *Ulex europaeus* agglutinin I [ハリエンシダ凝集素 I] (UEA-I)、*Sambucus sieboldiana* agglutinin [ニホンニワトコ凝集素](SSA)、*Sambucus nigra* agglutinin [セイヨウニワトコ凝集素](SNA)、*Trichosanthes japonica* agglutinin I [キカラスウリレクチン-I] (TJA-I)、*Amaranthus caudatus* agglutinin [ヒモゲイトウ凝集素] (ACA)、および *Bauhinia purpurea* lectin [ムラサキシソシンカレクチン] (BPL)により認識される糖鎖構造でこれらの分化度を規定できることを明らかにした。そこで我々は、本技術の臨床診断への応用を視野に、当科で外科的に切除された腫瘍組織片を用い、培養細胞と同様の結果が得られるか検討した。その結果、興味深いことに、G3症例の中でも、進行期によって、糖鎖構造は3種類のレクチン、*Dolichos biflorus* agglutinin [ドリコスマメ凝集素] (DBA)、BPL、およびACAにより、識別された。さらに、臨床においてしばしば問題となる術後の抗癌剤感受性と糖鎖の発現についても着目し解析したところ、抗癌剤感受性細胞株のみが3種類のレクチンに対して活性を認め

なかった。これらの結果から、レクチン・マイクロアレイによる網羅的糖鎖解析が細胞・組織での腫瘍の特性を評価するのに有効である可能性が示唆された。今後臨床においてレクチン・マイクロアレイ技術が新しい診断方法になることで、個々の患者に即した治療、すなわち治療の個別化が実現できることが期待された。

③ Introduction

子宮体癌は、女性生殖器系の中で最も一般的な悪性腫瘍の一つであり、本邦において罹患率・死亡率ともに上昇傾向であり、日本産婦人科学会婦人科腫瘍委員会への登録ではⅠ期～Ⅳ期の子宮体癌症例は2008年には子宮頸癌を上回り、2009年には子宮頸癌5,906例に比し、子宮体癌は6,113例と報告されている。子宮体癌の発生リスクとしては、肥満、生活習慣、食生活、晩婚、少子化に伴う未産婦の増加さらには糖尿病、月経不順など様々な要因が報告されている。子宮体癌は、TypeⅠ・Ⅱ体癌に分類され、TypeⅠ体癌はエストロゲン依存性で子宮内膜増殖症を背景に多段階発癌してくることが知られている。TypeⅠ体癌の組織型は類内膜腺癌であり、組織分化度に応じてG1・G2に分類される。一方、TypeⅡ体癌は、高齢の萎縮した内膜から *de novo* で発癌し、組織型は類内膜腺癌G3もしくは漿液性・明細胞腺癌、未分化癌がほとんどである。子宮体癌は比較的早期に発見されることが多く、他の婦人科腫瘍に比して予後は良好であるが、G3以上もしくは漿液性・明細胞腺癌などのTypeⅡ体癌は極めて予後不良である。

子宮体癌の発見には、子宮頸癌検診受診者の中から問診にて子宮体癌の高危険因子を有する者、すなわち直近6ヵ月以内に不正性器出血を訴えたことのある者で、とりわけ年齢が50歳以上、閉経以後、未妊婦にあつて月経不規則の場合は高リスクで子宮体癌の可能性のあるものと考えられている。しかし、一般的に普及している子宮頸癌検診に比して子宮内膜細胞診はあまり普及しておらず、早期診断法の開発が望まれている。

卵巣癌はその発生母地の特徴から、多種多様な腫瘍が発生することが知られている。とりわけ近年、卵管上皮を発生母地とした上皮性卵巣癌(漿液性・明細胞・類内膜・粘液性腺癌)がその発生の多くを占めている[5]。上皮性卵巣癌は、主にⅢ～Ⅳ期で発見されることが多く、全体的に予後不良である。卵巣癌は早期診断が難しいことから、発見後の治療が予後を大きく左右している。上皮性卵巣癌の治療は第1に手術療法であり、Optimal surgeryが完遂できるか、さらにその後のAdjuvant chemotherapyの奏功が要である。現在の術後化学療法はパクリタキセル+カルボプラチン(TC療法)が主流であり、近年では本邦においてJGOG3016試験により weekly パクリタキセルとカルボプラチンの併用療法(dose dense TC)が有意に無増悪生存期間の延長を認めたことが注目を集めているものの、飛躍的な治療

法の確立には至っていない。すなわち、卵巣癌の予後改善には、卵巣癌の早期診断法の開発が急務であると考えられる。

糖鎖の付加 [糖鎖形成／グリコシル化] は、最も一般的な真核生物のタンパク質の翻訳後修飾および翻訳時修飾の一つであり、生物学的プロセスにおいて相互細胞認識に重要な機能を有することが知られている。細胞膜上に発現している糖鎖は、特に細胞のタイプにより異なり発生、分化、活性化、炎症過程、また悪性形質転換 [癌化] 過程で、細胞の状態を反映する。それ故、糖鎖解析は我々に細胞と組織についての多くの情報を提供し、生殖医学および腫瘍学の分野において注目を集めている。

これまでに癌における診断マーカーとして抗体があるが、その中には糖鎖構造を認識するものも少なくない。一方、レクチンは、血液や組織染色、レクチンブロッキングおよびフローサイトメトリーに用いられ、癌などの疾患特異的マーカーとして使われてきている。こうしたマーカーに加え、糖鎖機能を調べていくことが新たなマーカーの開発にもつながっていくと考えられている。しかしながら、糖鎖構造は非常に複雑かつ多様であり、それを簡便で高感度に解析する方法はこれまでに報告されていなかった。近年、レクチン・マイクロアレイ技術という、独自の原理に基づいた複合レクチン - 糖鎖結合の超感度検出を可能にする技術が開発され、注目されている。この技術はエバネッセント場蛍光検出原理であり、もともとガラススライドの表面でのリアルタイム結合イベントを研究するためのバイオセンサーにおいて広く用いられてきたものである。こうしたエバネッセント場法は、平衡時の液相におけるレクチンと糖鎖の間の相対的に弱い結合を解析するためにより大きな利点を有している。その非常に高い感度と正確さ故に、レクチン・マイクロアレイ・システムは、癌を識別するための「細胞特性解析 [細胞プロファイラー]」のもっとも良いツールとなりうる可能性があり、癌の特異的レクチンの選択に応用できると期待されている。

これまでに我々は、子宮体癌の糖脂質解析を行ってきており、硫酸化糖脂質が高分化型子宮体癌において特異的に発現していることを報告しており、腺癌の分化機構には、糖タンパク質や糖脂質などが、複雑に絡み合い腺腔の維持形成に深く関与していることが推察される。本研究では、レクチン・マイクロアレイ技術により子宮体癌における糖タンパク質のオリゴ糖解析を行うとともに、細胞表面の糖鎖を通じた抗癌剤感受性を解析するため抗癌剤感受性細胞株と耐性細胞株を含む各種細胞株を用いてレクチン・マイクロアレイを行い、これらの細胞株の間で糖鎖構造の差を解析した。これらの解析を通じ、今後の診断技術、診断手法の向上が本研究の目的である。

④ Discussion

細胞膜を構成する脂質やタンパク質の多くが糖鎖修飾されており、発生や疾患発症などにおいて細胞間相互作用、細胞移動、感染などに関与し機能していることが知られている。とりわけ癌化に伴う細胞の変化は細胞表面糖鎖の変化と相関しており、これまで臨床診断として用いられる癌マーカーの多くが糖鎖を認識するレクチンや糖鎖構造を認識する抗体である。一方、近年の癌研究の進展は目覚ましく、早期発見・早期治療が求められ、新たなマーカーの探索が必要になってきている。しかし、糖鎖は従来その解析ツールとして、抗体やレクチンによる免疫染色、液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動法および質量分析法が一般的で、臨床診断としての簡便性、感度や特異性が高くないなどの問題があった。そうした中で新たな糖鎖構造解析技術としてエバネッセント場蛍光検出を用いたレクチン・マイクロアレイ技術が報告された。これによりわずかな数の細胞から膜タンパク質を抽出し、蛍光ラベル化して、45種類のレクチンがのったチップ上で反応させることで、感度よく特異的糖鎖構造を認識するレクチンと相互作用するタンパク質の蛍光が得られ、それらを統計的に解析することで細胞のもつ糖鎖プロファイリングが得られるようになった。本技術が開発されてから、多くの種類の癌細胞や癌患者由来の血清に対してマーカーの探索が進められ報告もされてきた。さらに、最近では本技術を幹細胞の特性評価としても利用されつつある。

子宮体癌は大きく分けると高分化と低分化から構成され、組織は組織学的所見により G1 から G3 に分類される。この組織学的な違いが、細胞の糖鎖構造とどの程度相関があるかレクチン・マイクロアレイ解析を行った。その結果、子宮体癌では、AOL、TJA-II、AAL、Jacalin、および ConA のシグナルが高い傾向が認められた。AOL、AAL および TJA-II は、非還元型末端フコースを認識するレクチンであり、フコースは N 型糖鎖やムチン型 O 型糖鎖を含む糖鎖の多くの異なるクラスの構成成分であり、O-結合型糖鎖としてセリンおよびチロシン残基の水酸基と直接結合することができる。このフコシル化は、典型的には N 型糖鎖または O 型糖鎖の末端修飾として見出され、これまでに結腸癌や膵臓癌における特徴として見られ、腫瘍マーカーとして用いられている。今回のアレイ解析から、子宮体癌においても非還元型末端フコースの変化、すなわちコア・フコシル化または O-フコシル化が起きていることが示唆され、これらを認識するレクチンシグナルを指標とした診断マーカー候補として考えられた。

さらに今回の我々の検討から 6 種類のレクチン(SSA、SNA、TJA-I、ACA、BPL、および UEA-I)が子宮体癌の悪性度分類と相関していた。一方、子宮体癌の悪性度分類は予後と相関していることが臨床的に知られていることから、本レクチンは予後予測マーカーとしても有用である可能性が示唆された。この 6 種類のレクチンの中では、SSA、SNA、および

TJA-I が末端シアル酸(Sia α 2-6Gal/GalNAc)を認識するレクチンであり、N-アセチルガラクトサミンに結合したシアル酸 α 2-6 結合と同様に、これらのレクチンの特異性には、 α 2-6 シアル化ラクトサミンの構造が含まれる。この構造は、特異的な酵素 β -ガラクトシド α 2-6-シアル酸転移酵素により産生される生成物である(ST6Gal. I)。この酵素は、Gal β 1-4GlcNAc 二糖類への α -2-6 結合シアル酸添加を行う主要な酵素の一つであり、結腸腫瘍、乳腺腫、卵巣腫瘍、胃腫瘍、口腔腫瘍、頸部腫瘍、絨毛癌、白血病、および脳腫瘍を含む、多くの型のヒトの癌において過剰発現している。これは ST6Gal.I の高発現を伴う末端シアル酸構造は、腫瘍侵襲性、転移性、分化状態および予後不良と正に相関しているといえる。今回我々が解析した子宮体癌においてもその悪性度により糖タンパク質に付加する末端シアル酸構造が変化していることが示唆され、癌の悪性度の診断とそれに伴う治療法の選択につながる可能性があると考えられた。癌の悪性度の分類は、現在でも難しく、術後摘出された組織の中にどの程度悪性度の高い細胞が含まれているかを完全に把握して診断することは事実上困難であり、それゆえ確実な治療が施行できず、しばしば難治性を来す。レクチン・マイクロアレイは、組織そのものからも、また血清などからも測定が可能であることから、今後さらに感度、精度とも高くなるよう検討を進めていくことが必要である。

癌は悪性度分類に加えて、治療方法が病期の決定に依存していることが多く、臨床病期決定は重要である。とりわけ子宮体癌においては悪性度に加え、筋層浸潤度、組織型、リンパ節転移の有無、遠隔転移などが病期の決定に重要である。今回の結果からこれを鑑みると、3種類のレクチン、即ち ACA、BPL、および DBA が病期特異的レクチンとして同定された。ACA および BPL は Gal β 1-3GalNAc を認識するレクチンであり、DBA は α 結合型 GalNAc を認識するレクチンである。これまで糖脂質の特徴的な発現が本研究にも使用した卵巢癌細胞の予後と関連していると報告されている。糖鎖構造における変化と癌の病期の間の因果関係は不明確なままであるが、今回の結果からレクチン反応性と子宮体癌病期の間の緊密な相関関係は、より適正な治療計画と病期判定、予後予測として新たなマーカーとなる可能性が示唆された。

さらに我々は、化学療法の感受性にも着目し解析したところ、卵巢癌に対する化学療法感受性特異的レクチンの一つとして DBA が同定された。レクチン・マイクロアレイ技術は検体の細胞膜抽出物を用いて使用されるため、病期特異的および化学療法感受性特異的レクチンを用いた免疫組織化学的検査が今後、化学療法の感受性を予測するマーカーとなる可能性が推察された。

昨今、癌研究は遺伝子発現、エピジェネティクス、およびゲノム解析による包括的に研究が進められてきている。実際に簡便かつ精度高い診断を裏付ける結果もでてきているが、臨床

の場で使用できるようになっているものはそれほど多くはない。糖鎖は癌による細胞変化を最も緻密に反映していると推察されるが、これまでそれを簡単に測定する技術や機器が存在しなかったが、レクチン・マイクロアレイ技術の登場でこの状況は少しずつ変わりつつある。本研究では、婦人科腫瘍において糖〔糖鎖〕構造を解析したが、従来、フローサイトメトリーと免疫組織化学が、子宮体癌における糖〔糖鎖〕構造を解析するために一般的に用いられてきた。一方で、今回使用したレクチン・マイクロアレイの登場が今後の糖鎖解析識別のための細胞プロファイラーであり、今回の結果から、これらの技術は、より高感度、かつ正確に診断補助となることが示唆され、今後、さらに他の癌に特異的なレクチンを選択するために適用できるものと考えられた。

⑤ Conclusion

本研究から、レクチン・マイクロアレイ技術は、細胞表面の糖鎖を速やかに識別した。また子宮体癌においては、組織分化度、病期を、卵巣癌においては化学療法感受性を推測するマーカーを得ることができたことから、今後これらの技術を臨床に応用することで、患者に適した最適治療、すなわち個別化治療が可能になるものと考えられた。今後は、さらに診断の正確性を上げるために、目的細胞をレーザーマイクロダイセクションや液状細胞診とも連動し、より純粋に抽出してレクチン・マイクロアレイを行う手法を検討していきたいと考えている。