

Partial silencing of fucosyltransferase 8 gene expression inhibits proliferation of Ishikawa cells, a cell line of endometrial cancer

著者	下山 華
発行年	2020-10-16
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003775

博士（医学） 下山 華

論文題目

Partial silencing of fucosyltransferase 8 gene expression inhibits proliferation of Ishikawa cells, a cell line of endometrial cancer

(フコシルトランスフェラーゼ 8 遺伝子発現の部分的抑制は子宮体がんの細胞株である Ishikawa 細胞の増殖を阻害する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

子宮体がんは子宮体部に発生する子宮がんであり、婦人科悪性腫瘍の中で最も罹患数が多く、さらに年々増加傾向を示している疾患である。エストロゲン依存性であることなどは知られているが、その分子生物学的機構は十分に解明されていない。一方、糖鎖生物学領域において、異常なグリコシル化とがんは密接に関係することが知られており、特にフコシル化は最も重要なグリコシル化の1つである。その機能を司る糖転移酵素フコシルトランスフェラーゼ(FUT)は現在までに機能が解析されているものが9種類あり、そのうちフコシルトランスフェラーゼ8(FUT8)は、N型糖鎖の還元末端ではなく最も内側のN-アセチルグルコサミン残基にフコースを付加する「コアフコシル化」を担う唯一の酵素である。近年、他がん腫においてFUT8によるコアフコシル化が「がん」の悪性度変化に重要な役割を果たしているという報告が散見される。そこで本研究では、「FUT8の発現が子宮体がんにおける機能変化に関与している」との仮説を立て実証を試みた。具体的に、1)子宮体がん組織においてFUT8遺伝子とタンパクおよびフコースに特異的に結合するレクチンである*Ulex europaeus* Agglutinin 1(UEA-1)の発現の確認、2)子宮体がん細胞株であるIshikawa細胞においてFUT8遺伝子およびタンパクの発現の確認、3)FUT8遺伝子発現抑制によるIshikawa細胞の増殖および浸潤能変化を探索、4)FUT8遺伝子発現抑制されたIshikawa細胞のパスウェイ解析を行った。

[患者、材料ならびに方法]

正常子宮内膜および子宮体がん組織を浜松医科大学附属病院産婦人科で子宮摘出を受けた患者20名より得た。正常子宮内膜および子宮体がん組織におけるFUT8遺伝子発現は定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)にて評価した。また、正常子宮内膜および子宮体がん組織におけるFUT8タンパク質およびUEA-1の発現については免疫組織化学染色法にて評価した。染色標本はNanoZoomer 2.0 HTスライドスキャナーとNDP.Viewerを使用して画像化し、UEA-1の発現は画像解析ソフトウェア(WinROOF ver 7.4)によって定量化した。次にIshikawa細胞におけるFUT8遺伝子およびタンパク質の発現をqRT-PCR、ウェスタンブロット法および免疫細胞化学染色法にて評価した。Ishikawa細胞に

における FUT8 遺伝子を低分子干渉 RNA により部分的に抑制するとともに Ishikawa 細胞に FUT8 発現プラスミドを導入し過剰発現させ、それらの増殖をリアルタイム細胞アナライザー(xCELLigence システム)にて観察した。また、FUT8 遺伝子発現抑制 Ishikawa 細胞における浸潤を、細胞浸潤活性測定キット(CytoSelect Cell Invasion Assay)を用い観察した。さらに、FUT8 遺伝子発現抑制 Ishikawa 細胞とコントロールの細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的分析およびパスウェイ解析を行った。0.05 未満の P 値を統計学的有意とみなした。本研究は浜松医科大学臨床研究倫理委員会(承認番号 15-309)および組換え DNA 実験安全委員会(承認番号 28-26)の承諾を得て行われた。

[結果]

FUT8 遺伝子の発現は正常子宮内膜と比較し、子宮体がん組織で有意に増加していた($P<0.05$)。また、FUT8 タンパク質は子宮体がんの腺管部分で特異的に同定された。一方、UEA-1 は子宮体がん組織の腺管および充実部分で同定され、その発現は正常子宮内膜組織と比較し有意に増加していた($P<0.01$)。FUT8 遺伝子およびタンパク質は、Ishikawa 細胞においても同定された。Ishikawa 細胞における FUT8 遺伝子発現抑制によりその細胞増殖は抑制され、測定開始 20 から 30 時間における細胞倍加時間はコントロールの細胞と比較し有意に延長した($P<0.01$)。一方、FUT8 遺伝子を過剰発現させた Ishikawa 細胞では、細胞増殖変化は認めなかった。Ishikawa 細胞における FUT8 遺伝子発現抑制により、その浸潤細胞数は一見有意に抑制されたが($P<0.01$)、浸潤細胞数を増殖細胞数で調整すると統計学的有意差を認めなかった。FUT8 遺伝子発現抑制細胞におけるパスウェイ解析では、ユビキチン特異的プロテアーゼ 17 (USP17) 関連、アスピリン誘因性関連、間葉上皮転換関連を含む 39 経路が有意に活性化され、20 経路が有意に抑制されていた。

[考察]

過去の報告や human protein atlas の記載と同様に、FUT8 遺伝子、UEA-1 の発現は、正常子宮内膜と比較し子宮体がん組織で亢進していた。これにより、子宮体がん組織において FUT8 遺伝子の発現によりフコースの結合が促進されていることが示唆された。しかしながら、レクチン染色によりコアフコース特異的に結合が促進されていることは示せなかった。また、Ishikawa 細胞の FUT8 遺伝子発現を抑制することでその細胞増殖が有意に抑制されたことにより、FUT8 は子宮体がんの細胞機能へ影響を与えることが示された。他がん腫では、FUT8 の発現はがん浸潤および転移能に関わるとの報告もあるが、本研究では Ishikawa 細胞における FUT8 の浸潤能への関与は検出されなかった。本研究では FUT8 の抑制により、USP17 関連、アスピリン誘因性関連のパスウェイが有意に変動しており、それらの活性を介して Ishikawa 細胞の増殖が抑制されている可能性が示唆された。

[結論]

FUT8 遺伝子は子宮体がんで有意に増加していた。FUT8 タンパク質は主に子宮体がんの腺管部分に発現していた。FUT8 遺伝子の発現抑制は、Ishikawa 細胞の増殖を有意に抑制し、それには USP17 関連、アスピリン誘因性関連などのパスウェイの活性が関連している可能性が示唆された。