

2025年度東京慈恵会医科大学大学間共同プロジェクト研究費成果概要

代表者氏名 小林 賢司
部署名 病理学講座

1. 共同研究テーマ名

タンパク修飾因子に基づくがん関連線維芽細胞の細胞特性・多様性解析

2. 共同研究の連携先機関名

東京理科大学薬学部 病態分析化学研究室

3. 研究成果の概要

【背景・目的】糖鎖などのタンパク修飾因子は細胞間相互作用の制御やがん微小環境形成機序に寄与していることが報告されている^{1,2}。しかし、これらの観点から腫瘍進展に与える影響や腫瘍間質の特性を明らかにした報告はほとんどなされていない。本研究では、当院の乳房全摘出術検体から分離培養した cancer-associated fibroblast (CAF) と normal tissue-associated fibroblast (NAF)、癌部・非癌部よりそれぞれ採取した凍結組織片とホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、がん細胞や CAF でのタンパク修飾因子の発現・組成やその機能解析を行い、臨床情報、生物学的腫瘍促進能、網羅的遺伝子プロファイルなどと統合的に解析することによりタンパク修飾因子の観点からがん細胞や CAF の細胞特性や多様性を明らかにしていく。また、腫瘍微小環境におけるタンパク修飾因子の観点から新規バイオマーカーや治療法開発につながる基礎研究に貢献することを目指している。

【試料・方法】タンパク修飾因子の組成・発現解析を行うため、東京理科大学薬学部 病態分析化学研究室において高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたタンパク修飾因子解析を行った。パラフィン包埋切片の検体ではヘマトキシリン・エオジン染色で組織学的に癌部・非癌部を同定し、それぞれの領域のパラフィン切片を回収した。その後、キシレンを用いた脱パラフィン後にエタノールで脱キシレンを行い、乾燥後に HPLC 試料を作製した。また、凍結組織片の検体は乾燥重量測定後にアセトンで脱脂を行い、乾燥させてから同様に HPLC 試料を作製した。HPLC による解析から、コンドロイチン硫酸 (CS) 不飽和二糖、ヘパラン硫酸 (HS) 不飽和二糖、ヒアルロン酸 (HA) 不飽和二糖のクロマトグラムを作成した。CS, HS, HA それぞれの含有量と不飽和二糖組成を算出し、NAF・CAF および癌部・非癌部で比較検討を行った。

【結果】まず、8 症例の乳癌症例において凍結組織検体とパラフィン包埋切片の癌部・非癌部での解析を行い結果の整合性を確認した所、いずれの試料においても CS, HS, HA 全てのグルコサミノグリカン (GAG) 含有量は非癌部より癌部で著明に多い傾向であった。特に、凍結組織検体よりもパラフィン包埋切片の方で有意な差が認められた。また、上記 8 症例のうちの 5 症例で NAF・CAF を用いた解析を行った所、同様に CS, HS, HA 全ての GAG 含有量は NAF より CAF で多い傾向であったが、いずれも統計学的な有意差は認められなかった。一方、凍結組織片、パラフィン包埋切片を用いて CS, HS の硫酸化二糖組成を解析した所、GAG の産生増加の有無に関わらず、癌部では非癌部よりも 6-硫酸化が亢進していた。特に、HS では NAF より CAF で 6-硫酸化が亢進していたことから、腫瘍間質の HS 産生は CAF に依存している可能性が示唆された。

4. 今後の展望、成果発表の計画について

従来、GAG の解析には凍結組織切片を用いて行われることが多く、キシレンによる脱パラフィン操作を要するホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた解析法に関しては未だ一定のプロトコールが確立されていないのが現状である。今回、同一症例の凍結組織検体とパラフィン包埋切片を用いて解析結果を比較検討した所、一定の整合性を得ることができた。パラフィン包埋切片を用いた GAG の新規解析法の確立が期待され、今後論文発表を視野に検討を進めていく予定である。同時に、より汎用性の高いパラフィン包埋切片を用いた解析が可能になることで、より多くの乳癌症例で GAG 解析を行い、GAG の発現解析結果を臨床病理学的に検討していく。また、膵癌や大腸癌などの多臓器の癌腫でも解析を行うことで、臓器間での GAG 発現・組成様式の特性や腫瘍微小環境に与える影響を検証していく予定である。

これまでも腫瘍微小環境における GAG の発現や硫酸化修飾が腫瘍進展に関与していることが報告されている^{3,4}。また、近年では腫瘍由来ヘパラン硫酸が樹状細胞を介して制御性 T 細胞を誘導し、免疫抑制的な腫瘍微小免疫環境を形成していることが示されている⁵。今後、乳癌症例において癌部・非癌部での GAG 発現の局在を確認すると共に、GAG の発現量や硫酸基の構造多様性のがん細胞ないし CAF の腫瘍微小免疫環境、生物学的腫瘍促進能などに与える影響に関して更に検証を行っていく予定である。

当プロジェクトの成果は今後国内外での学会発表および論文発表を計画している。

【参考文献】

1. Deling Shi, et al. *Front Mol Biosci.* 2021;8:639666.
2. Wieboldt R, Läubli H. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022 Jun 1;322(6):C1187-C1200.
3. Pudelko A, et al. *FEBS J.* 2019;286(10):1815-1837.
4. Al-Nakouzi N, et al. *Nat Commun.* 2022;13(1):4760.
5. Zhang Y, et al. *Cellular & Molecular Immunology* (2023) 20:1499–1512.