

令和 3 年 4 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06115

研究課題名(和文) グライコミクスのアプローチによる腫瘍マーカー探索

研究課題名(英文) Explore for tumor markers using glycomics approach

研究代表者

中の 三弥子 (Nakano, Miyako)

広島大学・統合生命科学研究科(先)・准教授

研究者番号：40397724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：予後が非常に悪い癌、つまり早期診断や病型分類ができる有用な腫瘍マーカーが存在しない3つの癌(膵臓癌、胆道癌、トリプルネガティブ乳癌)の新規腫瘍マーカーを、癌細胞表面の糖鎖に着目して探索した。膵臓癌と胆道癌においては、フコシル化ハプトグロビンを発見し、その産生機序なども解明した。トリプルネガティブ乳癌においては、糖鎖が変化するキャリアタンパク質を発見することができた。今後は、これらの腫瘍マーカー候補の汎用性の有無を多くの検体を用いて調べる必要がある。さらに、簡便迅速な測定法の開発も必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体の奥深くに潜むため発見が非常に困難な癌(膵臓癌と胆道癌)および標的分子が存在しないため治療薬が無く予後が非常に悪い癌(トリプルネガティブ乳癌)の新規腫瘍マーカーが開発されれば、腫瘍の早期発見および標的治療が可能になり、医療費の削減および国民の健康増進が期待される。

研究成果の概要(英文)：We explored novel tumor markers for cancers with a very poor prognosis, that is, three cancers (pancreatic cancer, biliary tract cancer and triple negative breast cancer) for which there are no useful tumor markers that can be diagnosed early or classified correctly. We focused on the glycans on the surface of tumor cells as novel and useful tumor markers. For pancreatic and biliary tract cancers, we found fucosylated haptoglobin. Moreover, we elucidated its production mechanism. For triple negative breast cancer, we found a carrier protein with altered glycan structure. In the future, it will be necessary to investigate the versatility of this tumor marker candidate using a lot of samples. Furthermore, it will be very important to develop a simple and quick measurement method.

研究分野：糖鎖分析

キーワード：グライコミクス 糖鎖分析 質量分析 腫瘍マーカー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

糖鎖は細胞の表面を覆い、血清中の8割のタンパク質上にも存在する。糖鎖の構造は遺伝子によって決定するのではなく、遺伝子によって作られた様々な糖転移酵素と糖分解酵素の協奏的作業の結果産物である。そのため炎症や癌などにより生体内の生理的状況が変化すると、これらの酵素群の協奏的な作業が狂い、変わった糖鎖構造が出現することが知られていた。このことを利用して、癌種特異的に変化した糖鎖構造を腫瘍マーカーにできるのではないかと考え、特に予後の悪い3つの癌(膵臓癌、胆道癌、トリプルネガティブ乳癌)において、この糖鎖構造に着目して、新規腫瘍マーカーの探索を行うことにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、予後が非常に悪い癌、つまり早期診断や病型分類ができる有用な腫瘍マーカーが存在しない3つの癌(膵臓癌、胆道癌、トリプルネガティブ乳癌)の腫瘍マーカーの探索を行う。癌細胞そのものを抗原として得られた多くのモノクローナル抗体のエピトープが糖鎖であったことより、現在、臨床現場で用いられている腫瘍マーカーの多くは糖鎖を認識する抗体を用いて測定されている。しかし、それらの抗体が認識する糖鎖の詳細構造や、その糖鎖を持つタンパク質(キャリアタンパク質)は不明なものがほとんどである。癌や炎症などの疾患により細胞表面や血清タンパク質の糖鎖の構造が変化すること、およびこれまでに私が確立してきた高感度かつ詳細に構造解析できる糖鎖分析技術(糖鎖結合部位特異的に単糖間の結合様式もわかる方法)を利用して、予後の悪い3つの癌の腫瘍マーカーを、グライコミクス的アプローチ(糖鎖を網羅的に解析しそこから異常糖鎖を見つけ出し何らかの機能や役割に関連づける手法)により探索し同定することを目的とする。

(1) 全ての癌の「5年生存率」の平均が62.1%であるのに対し、膵臓癌は、7.7%と最も低い。次に低いのが胆道癌である。膵臓と胆道は体の深部にあり他の臓器に囲まれているため、癌が発生してもレントゲン検査などでは発見しにくい。また、膵管と胆管はリンパ管や血液とつながっているため周辺の臓器に癌細胞が転移しやすい。さらに、特徴的な自覚症状がないため医療機関を受診した時にはすでに手術ができない末期の状態であることが多い。したがって、レントゲンや腹部超音波(エコー)などの画像診断に頼らない血清中で早期に出現する腫瘍マーカーの探索は必要である。

(2) 乳癌は、女性の罹患率トップの癌であり、その罹患率は増加し続けている。乳癌による死亡者数も年々増加傾向にあり、現在、年間約13,000人が亡くなっている。これは乳癌に罹患した人の約30%にあたり、その中で最も多くを占めるのが「トリプルネガティブ乳癌(TN乳癌)」と分類され治療後に再発した人である。トリプルネガティブ乳癌(TN乳癌)は腫瘍マーカーとなり得る標的分子が見つからないため予後が悪い。したがって、細胞診などで病型分類ができるTN乳癌の腫瘍マーカーの探索も急務である。

## 3. 研究の方法

(1) 血清中の腫瘍マーカーの開発：膵臓癌と胆道癌の早期診断マーカー：

我々は2006年に、膵臓癌患者血清中において、タンパク質そのものの量は変化しないが、そのタンパク質が持っている糖鎖の構造が変化しているタンパク質を発見した。そのタンパク質は1分子あたり糖鎖の結合部位を4つ(184、207、211、241番目のアスパラギン)持っている血清中の主要タンパク質の1つであるハプトグロビン(Hpt)であった。2008年には、膵臓癌患者血清中のHptの糖鎖構造を糖鎖結合部位特異的に解析し、211番目のアスパラギンにおいて、健康者と慢性膵炎患者と比べて有意に構造が異なっている糖鎖を発見した。2016年には、他の消化器癌(食道癌、胃癌、大腸癌)の患者血清中のHptの糖鎖を結合部位特異的に解析し、癌の転移の有無でフコシル化の度合いが異なること、および原発臓器の間においてHptの糖鎖構造に違いがあることを示唆した。本研究では、未分析の癌である胆道癌において、腫瘍が発生した部位の違い(胆嚢、肝内胆管、肝外胆管、総胆管)に分けて糖鎖を結合部位特異的に解析する( )。膵臓癌においてもデータの信頼性をあげるために追加検体を同様に解析する( )。との解析が終了後、消化器癌と膵臓癌においてHpt糖鎖に違いがあるかを調べる( )。現在、膵臓癌を主とする消化器癌全般の腫瘍マーカーとしてCA19-9(シリアルⅡ<sup>a</sup>、SLe<sup>a</sup>)が使われている。しかし、CA19-9は末期にならないと検出されないばかりか、Le酵素を遺伝的に持たない人(Lewis(-)血液型、日本人の約10%)は癌になってもCA19-9は検出されないといった問題点がある。Hpt糖鎖がLewis(-)血液型の人にも使用できるかも検討する( )。また、膵臓癌においてHpt糖鎖の構造が異なる原因は癌細胞自身がHptを作るようになったためなのかを知る( )のために、膵臓癌患者の癌細胞組織中のHptの発現および糖鎖構造も調べる( )。膵臓癌のHpt糖鎖( )と組織表面糖鎖( )および組織中のHptのmRNAとタンパク質の定量( )が完了後、Hpt糖鎖の腫瘍マーカーとしての有用性( )を検討する。また、癌血清中のHptはヘモグロビン(Hb)と強く結合している可能性があるため、Hptと結合しているHbの定量(ELISAとWB、 )およびHpt糖鎖構造とHb結合能の関係解明(表面プラズモン共鳴法と等温滴定型カロリメトリー、 )を行う。Hbは自身のヘムが腎から排泄されるのを防ぐためにHptと結合している。癌細胞の血管

新生により多くの酸素が必要となるため、Hpt の糖鎖構造を変えて Hb が離れないように、つまり酸素を多く運べるようにしているのではないかと推測する。Hb がユニークな腫瘍マーカーになるのではないかと考える。

(2) 組織中の腫瘍マーカーの開発：TN 乳癌の病型分類マーカー

乳癌は、エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PgR)、ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2 型 (HER2) の 3 つのタンパク質の発現量の違いにより 4 つの病型 (Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, Basal-like) に分類される。ER と PgR が陽性である型を Luminal 型とし、その内 HER2 が陰性であれば A 型、陽性であれば B 型とする。ER と PgR が陰性で HER2 のみが陽性であれば HER2-enriched 型となる。Basal-like 型は、ER、PgR、HER2 の 3 分子全てが陰性であることから「トリプルネガティブ乳癌 (TN 乳癌)」と呼ばれており、エストロゲンやプロゲステロンなどのホルモン治療や抗 HER2 抗体医薬品による分子標的治療がないため、最も予後が悪い病型として知られている。TN 乳癌を対象とした分子標的治療薬の開発研究が盛んに行われているが、未だ標的分子の発見には至っていない。癌部と非癌部に分けられた組織の細胞膜から糖鎖を N 型と O 型に分けて遊離し、質量分析 (LC-ESI MS) により詳細な糖鎖構造解析を行う。本研究では、各 n=20 になるまで検体を分析する ( )。全検体終了後、病型特異的な糖鎖構造、特に TN 乳癌に特異的な糖鎖構造の同定を行う ( )。糖鎖のみを抗原とした抗体の作製は困難であることや、標的治療のためにキャリアタンパク質がわかった方が良いので、細胞膜表面の全タンパク質から TN 乳癌特異的な糖鎖構造を認識するレクチンを用いて濃縮し、プロテアーゼ消化後 LC-ESI MS に注入し、網羅的に糖ペプチドの糖鎖構造を解析することによりキャリアタンパク質の同定も行う ( )。

#### 4. 研究成果

本研究の研究期間全体 (1 年目：平成 30 年度、2 年目：平成 31 年度、3 年目：令和 2 年度の 3 年間) を通じて実施した研究成果を、先に記した「研究方法」の項目 ~ に照らし、以下、1 つずつ説明する。膵臓癌患者の血清中のハプログロビン (Hpt) の糖鎖の構造解析：1 年目に追加サンプルの解析を行い、これまでに報告している結果と同様であることを確認した。胆道癌患者の血清中のハプログロビンの糖鎖の構造解析：胆道中の原発部位別に糖鎖の構造解析を行い、異なっていることがわかり、その機序も 1 年目で推測できるデータが集まった。膵臓癌患者の癌部と非癌部組織中の細胞膜上の糖鎖の構造解析：1 年目で約 20 検体解析した。大変興味深い結果が O 型糖鎖において観察された。膵臓癌患者の癌部と非癌部組織中の細胞膜上の Hpt の mRNA と WB 解析：様々な糖転移酵素と糖分解酵素の mRNA は検出することができたが、Hpt の mRNA は微量のためもしくは実際に発現していないため検出することができなかった。Hpt のタンパク質も同様の理由で WB においても検出できなかった。胆道癌患者の癌部と非癌部組織中の細胞膜上の糖鎖の構造解析：1 年目で解析を終える予定だったが、2 年目および 3 年目においても検体が集まらず解析できなかった。胆道癌患者の癌部と非癌部組織中の細胞膜上の Hpt の mRNA とウエスタンブロッティング (WB) 解析：と同様の理由で解析することができなかった。乳癌の癌部と非癌部組織中の細胞膜上の糖鎖の構造解析：1 年目に乳癌の 4 つの病型別に n=6 で解析を行ったが、大きな差が観察されなかった。そのため 2,3 年目では、糖鎖ではなく、タンパク質に焦点を絞り、4 つの病型別に n=6 で解析を行った結果、1 つのタンパク質が TN 乳癌において存在することがわかった。これをキャリアタンパク質として、その糖鎖構造を調べたが、大きな差は観察されなかった。他の消化器癌との Hpt 糖鎖構造の比較：膵臓癌、胃癌、大腸癌、食道癌の患者血清中のハプログロビン (Hpt) の糖鎖の構造解析は、1,2 年目で完了した。消化器癌か非消化器癌かの違いで、フコースの結合様式が異なっていることがわかった。Lewis 血液型と Hpt 糖鎖構造の比較：2 年目に試みたが各患者の Lewis 血液型の情報は、診療記録 (カルテなど) からは得られなかったためこの比較は行わない事にした。その代わりに、Hpt の対立遺伝子による表現型の違いとその糖鎖構造の違いを比較することを 2 年目に行った。表現型に特異的な糖鎖構造があることがわかった。Hpt 糖鎖の構造は、癌細胞の場所、臓器の種類で異なることがわかった。また、癌細胞が転移する前後でフコースの結合様式が異なっていた。さらに、フコシル化 Hpt の生産機構の解明のための実験は 3 年目で行ったが、通常の産生臓器でもなく、癌原発臓器でもなく、外因分子により肝臓で産生が促されていることを発見した。Hpt と結合しているヘモグロビン (Hb) の量を測定：3 年目に、フコシル化レベルを調整できる Hpt 発現細胞株を作成し、Hpt と Hb の結合能を WB により調べ、Hpt のフコシル化糖鎖と関係していることがわかった。

研究期間全体を通して、膵臓癌と胆道癌においては、新規の腫瘍マーカー候補となりえる糖鎖を発見することができた。TN 乳癌においては、新規の腫瘍マーカー候補となりえるキャリアタンパク質を発見することができた。今後は、これらの腫瘍マーカー候補の汎用性の有無を多くの検体を用いて調べる必要がある。さらに、簡便迅速な測定法の開発も必要である。これらのことが確立すれば、腫瘍の早期発見が可能になり、医療費の削減および国民の健康増進が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hanaoka K, Takahagi S, Ishii K, Nakano M, Chinuki Y, Tanaka A, Yanase Y, Hide M.	4. 巻 69
2. 論文標題 Type-I-hypersensitivity to 15 kDa, 28 kDa and 54 kDa proteins in vitellogenin specific to <i>Gadus chalcogrammus roe</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergol Int.	6. 最初と最後の頁 253-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2019.09.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomida S, Takata M, Hirata T, Nagae M, Nakano M, Kizuka Y.	4. 巻 295
2. 論文標題 The SH3 domain in the fucosyltransferase FUT8 controls FUT8 activity and localization and is essential for core fucosylation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 7992-8004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takamiya R, Takahashi M, Maeno T, Saito A, Kato M, Shibata T, Uchida K, Ariki S, Nakano M.	4. 巻 1864
2. 論文標題 Acrolein in cigarette smoke attenuates the innate immune responses mediated by surfactant protein D.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Gen Subj.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2020.129699	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rodriguez-Gallardo S, Kurokawa K, Sabido-Bozo S, Cortes-Gomez A, Ikeda A, Zoni V, Aguilera-Romero A, Perez-Linero AM, Lopez S, Waga M, Araki M, Nakano M, Riezman H, Funato K, Vanni S, Nakano A, Muniz M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Ceramide chain length-dependent protein sorting into selective endoplasmic reticulum exit sites.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Adv.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aba8237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kitano M, Kizuka Y, Sobajima T, Nakano M, Nakajima K, Misaki R, Itoyama S, Harada Y, Harada A, Miyoshi E, Taniguchi N.	4. 巻 296
2. 論文標題 Rab11-mediated post-Golgi transport of the sialyltransferase ST3GAL4 suggests a new mechanism for regulating glycosylation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 MALDI-TOF mass spectrometry imaging for N-glycans on FFPE tissue sections of mouse NASH liver through Sialic acid Benzylamidation.	4. 巻 38
2. 論文標題 Saito T, Watanabe A, Nakano M, Matsuo K.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Glycoconj J.	6. 最初と最後の頁 162-175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10719-021-09984-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chatterjee S, Lee LY, Kawahara R, Abrahams JL, Adamczyk B, Anugraham M, Ashwood C, Sumer-Bayraktar Z, Briggs MT, Chik JHL, Everest-Dass A, F&ouml;rster S, Hinneburg H, Leite KRM, Loke I, M&ouml;nginger U, Moh ESX, Nakano M, その他16名	4. 巻 19
2. 論文標題 Protein Paucimannosylation Is an Enriched N-Glycosylation Signature of Human Cancers.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proteomics	6. 最初と最後の頁 21-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pmic.201900010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakano M, Mishra SK, Tokoro Y, Sato K, Nakajima K, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Kizuka Y.	4. 巻 18(10)
2. 論文標題 Bisecting GlcNAc Is a General Suppressor of Terminal Modification of N-glycan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Cell Proteomics	6. 最初と最後の頁 2044-2057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/mcp.RA119.001534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 De Leoz MLA, Duerwer DL, Fung A, Liu L, Yau HK, Potter O, Staples GO, Furuki K, Frenkel R, Hu Y, Sosic Z, Zhang P, Altmann F, Gru Nwald-Grube C, Shao C, Zaia J, Evers W, Pengelley S, Suckau D, Wiechmann A, NakanoM, その他141名	4. 巻 19(1)
2. 論文標題 NIST Interlaboratory Study on Glycosylation Analysis of Monoclonal Antibodies: Comparison of Results from Diverse Analytical Methods	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Cell Proteomics	6. 最初と最後の頁 11-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/mcp.RA119.001677	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 中の三弥子
2. 発表標題 Bisecting GlcNAcはN型糖鎖末端のさらなる修飾を抑制する
3. 学会等名 日本糖質学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中の三弥子
2. 発表標題 がん細胞の有無・位置・状態が解る糖鎖マーカー
3. 学会等名 第38回日本糖質学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyako Nakano, Soya Usui, Taiki Sugiyama, Shiro Takahashi, Eiji Miyoshi
2. 発表標題 Development of Cancer Biomarker for Biliary Tract Cancer and Pancreatic Cancer with Serum Haptoglobin Glycan Analyses
3. 学会等名 2nd Australasian Glycoscience Symposium as pre congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiromu Kawaguchi, Shinji Takamatsu, Eiji Miyoshi, Miyako Nakano
2. 発表標題 Elucidation of the biosynthetic mechanism of fucosylated haptoglobin
3. 学会等名 18th Human Proteome Organization World Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中の三弥子
2. 発表標題 Development of biomarker for biliary tract cancer and cholelithiasis using serum haptoglobin glycan.
3. 学会等名 Human Proteome Organization 17th Annual World Congres (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Eiji Miyoshi, Koichi Morishita, Tatsuya Asuka, Tomoya Fukuoka, Shinji Takamatsu, Yoshihiro Kamada, Miyako Nakano	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 9842
3. 書名 Glycan Biomarkers in Pancreatic Cancer, In book: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	東 祥実  (Higashi Yoshimi)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	納家 あさか  (Naya Asaka)		
研究協力者	臼井 颯哉  (Usui Soya)		
研究協力者	河口 大夢  (Kawaguchi Hiromu)		
連携研究者	三善 英知  (Miyoshi Eiji)  (20322183)	大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授   (14401)	
連携研究者	有廣 光司  (Arihiro Koji)  (70232064)	広島大学・大学病院・教授   (15401)	
連携研究者	尾田 三世  (Oda Miyo)  (50770286)	広島大学・大学病院・診療支援部 病理検査部門 副部門長   (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関