

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18078

研究課題名（和文）糖鎖-レクチン反応に着目したリキッドバイオプシーを用いた食道癌早期診断法の開発

研究課題名（英文）Development of an early diagnosis method for esophageal cancer using liquid biopsy based on glycan-lectin reaction

研究代表者

小川 光一（Ogawa, Koichi）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：20733637

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：食道癌の早期診断法としてリキッドバイオプシーに着目し、糖鎖レクチン反応が応用可能であるかを検証した。食道扁平上皮癌症例の手術検体24例を用いて癌特異的糖鎖-レクチンの組み合わせを網羅的に探索したところ、1-2FUC(糖鎖)と結合するUAE1が候補レクチンとして同定できた。ついで食道癌患者および健常者の血清を用いてUAE1レクチンによるレクチンブロットを行なったところ、食道癌に特異的な反応を検出することは出来なかった。UAE1が食道癌特異的なレクチンである可能性は高いが、治療バイオマーカーおよび治療ターゲットとなり得ることを検証するためさらなる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌は難治性癌の代表例であり、早期診断・早期治療に勝る治療法はない。癌細胞表面には特徴的な修飾を受けた癌特異的な糖鎖が発現しており、発癌初期から血中や唾液中に糖鎖の構造物が遊離している可能性が高いと考えた。本研究では食道癌に特異的な1-2FUC(糖鎖)-UAE1(レクチン)を同定することができたが、癌患者の血清中の発現を確認することは出来なかった。検出力を高めるため、またより特異性の高い候補レクチンの探索などさらなる検討を要するが、糖鎖レクチン反応を用いたリキッドバイオプシー臨床応用への足掛かりを得ることができた。

研究成果の概要（英文）：We focused on liquid biopsy as an early diagnosis method for esophageal cancer and examined the applicability of glycan-lectin reaction. Using 24 surgical specimens of esophageal squamous cell carcinoma, we comprehensively searched for cancer-specific glycan-lectin combinations and identified UAE1, which binds to 1-2FUC (glycan), as a candidate lectin. Then, we performed lectin blotting with UAE1 lectin using sera from esophageal cancer patients and healthy subjects, and could not detect any specific reaction to esophageal cancer. Although it is highly likely that UAE1 is an esophageal cancer-specific lectin, further studies are needed to validate it as a potential therapeutic biomarker and target.

研究分野：消化器外科学

キーワード：食道癌 レクチン リキッドバイオプシー

1. 研究開始当初の背景

難治性癌の1つである食道癌は、早期癌と進行癌で治療後の生存率が大きく異なり、治療成績向上のために早期発見・早期治療が重要である。既存マーカーとして血清 SCC抗原やCYFRAがあるが、早期癌での陽性率は低くスクリーニングに利用可能なバイオマーカーの開発が求められており、近年、血液や唾液などを用いた低侵襲なリキッドバイオプシーが注目されている。糖鎖は細胞膜の最外層を覆うように存在しglycocalyxを形成している。糖鎖は分化度や悪性度に伴い特徴的な修飾を受けており、各癌種の癌細胞には特異的な糖鎖が発現しており、実際に腫瘍マーカーとして臨床で使用されるCA19-9などの腫瘍マーカーは糖鎖変化を検出したものである。我々はこれまで膵癌に特異的に表出する糖鎖(H type 3)とそれに反応するレクチン(rBC2)の同定に成功し、(Shimomura S, Oda T. Mol Cancer Ther, 2018)、レクチンを治療担体キャリアとする新規治療および、糖鎖を検出する新たな診断法開発を行ってきた。食道癌は粘膜下層までの浸潤に留まる早期癌でも高率にリンパ節転移をきたす脈管浸潤性の高い癌種である。そのため発がん過程の早期から血中に標的糖鎖を有する構造物(糖鎖単独、コア蛋白の断片、糖脂質など)が遊離し、血中に遊離される糖鎖や糖タンパクが検出される可能性が高いと考えられた。食道癌由来の遊離糖鎖を高感度に検出する手法が開発できれば、これまでにない臨床応用性を秘めた新規バイオマーカーとなり得る。

2. 研究の目的

本研究ではまず、食道扁平上皮癌に特異的に発現する糖鎖とそれに特異的に結合するレクチンを同定することを目的とした。得られた特異的糖鎖-レクチンの組み合わせを検出プローブとして用い、臨床食道癌検体で同定可能であるかを検討する。さらに担癌患者の血中および唾液中の遊離糖鎖の検出が可能か、すなわちリキッドバイオプシーマーカーとして応用可能か検証することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 食道癌組織からの3次元腫瘍オルガノイド作成

我々はこれまでの研究から2次元状態と3次元状態では糖鎖発現パターンが大きく異なることを把握している。オルガノイドは幹細胞集団を含んでおり、臓器特異的な細胞へ分化し臓器の微小構造や機能を反映するとされる。より臨床に近い糖鎖発現を解析するため、食道癌組織を用いた腫瘍オルガノイドの作成を目指した。

(2) 食道癌臨床検体を用いた網羅的糖鎖発現解析、レクチン同定

レクチンマイクロアレイおよびレクチン染色を用いて食道癌に特異的に表出する糖鎖およびそれに特異的に結合するレクチンの組み合わせを網羅的に探索した。

(3) 食道癌患者血清における糖鎖の検出

(2)で選出したレクチンを用いて、食道癌患者及び健常者血清のレクチンブロットを行い、患者血清中に遊離する糖鎖および糖タンパクの検出を試みた。

4. 研究成果

- (1) 我々は膵癌検体からの 3 次元腫瘍オルガノイド作成に成功していたため、同様の方法で食道癌組織からのオルガノイド作成を試みた。しかし、膵癌検体と同様の方法では作成が困難であった。理由としてオルガノイドの増殖維持に必要な Niche や腫瘍細胞増殖速度などが癌種毎に異なる可能性が考えられた。また膵癌オルガノイドの培養確立まで約 50 日と時間がかかること、増殖速度が既報に比べて遅いこと、試薬が極めて高価であることなどの問題もあり、作成を断念せざるを得なかった。
- (2) 食道扁平上皮癌症例の手術検体 24 例を用いて、組織アレイを作成し、レクチンマイクロアレイ法および標識レクチンによる免疫組織染色で糖鎖-レクチンの組み合わせを網羅的に探索した。各検体の癌部および非癌部の反応を比較検討した。レクチンおよび特異的結合糖鎖の候補として、BC2LCN をはじめとする 14 種類について解析した (表 1)。癌部での陽性率が高く、かつ非癌部との陽性率の差が大きいもの (Signal/Noise ratio が大きいもの) が望ましく、 α 1-2FUC(糖鎖) と結合する Ulex Europaeus Lectin 1(以下 UEA1)が候補レクチンとして選出された (図 1,2)。
- (3) 食道癌組織の網羅的レクチン染色の結果、炙り出された UEA1 レクチンを用いて、リキッドバイオプシーへの足がかりとして血清中の糖鎖 (α 1-2FUC を含む糖タンパクを含む) の検出を試みた。食道癌患者及び健常者血清を用いて、血清中の α 1-2FUC 陽性の糖鎖の検出を、UEA1 レクチンによるレクチンブロットで確認した。これまでの結果として、レクチンを用いた組織染色では陽性と確認されたが、患者血清中には特異的なバンドを検出することはできなかった (図 3)。要因として① α 1-2FUC を含む糖鎖、および糖タンパクが検出される十分量が血中に分泌されていない、②レクチンブロットによる検出感度が十分でない、③解析検体数が少ない、④選出した UEA1 レクチンの特異性が不十分、などが考えられた。これらを克服するための展望として、組織ライセートを用いたレクチンブロットを現在解析中であり、特異的糖鎖が発現する糖蛋白を同定してレクチン-抗体によるサンドイッチ ELISA 系による 2 重検出を検討している。今回の検証から、今後解析症例数を増やし、かつ進行度の高い症例も含む、食道癌由来血中糖鎖および糖タンパクのさらなる探索を行う予定である。

表 1 網羅的探索に用いた糖鎖-レクチン一覧

候補レクチン	略称	特異的結合糖鎖
Burkholderia cenocepacia lectin	BC2LCN	Fuca1-2Gal β 1-3GlcNAc(GalNAc)
Trichosanthes japonica agglutinin	TJAI	α 1-2FUC
Ulex Europaeus Lectin 1	UEA1	α 1-2FUC
Aleuria aurantia lectin	AAL	α 1-6,2,3FUC
Agrocycbe cylindracea galectin	ACG	α 2-3Sia
Sambucus nigra lectin	SNA	α 2-6Sia
Allomyrina dichotoma agglutinin	ADA	α 2-6Sia
Polyporus squamosus lectin	PSL1a	α 2-6Sia, Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc
Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin	PHA-L	D-GalNAc
Wisteria floribunda Agglutinin	WFA	Terminal GalNAc
Clitocybe nebularis lectin	CNL	$\alpha\beta$ GalNAc
Bauhinia purpurea alba lectin	BPL	Gal β 1-3GlcNAc(GalNAc), α/β GalNAc
Sambucus sieboldiana	SSA	Sia α 2-6Gal / GalNAc
Peanut Agglutinin	PNA	Gal β 1-3 GalNAc

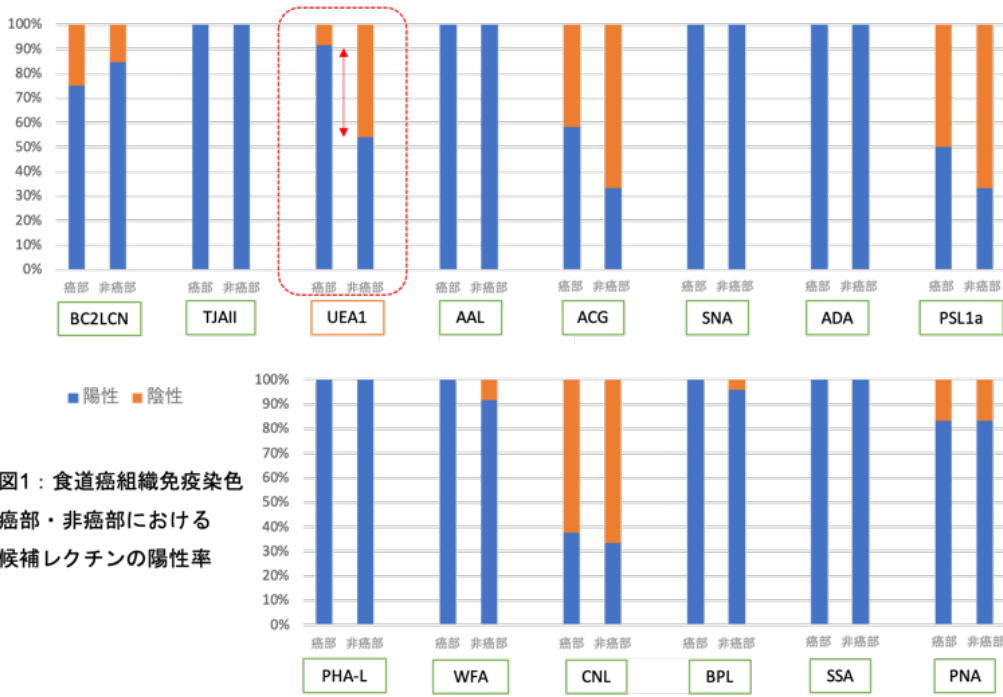


図1：食道癌組織免疫染色
癌部・非癌部における
候補レクチンの陽性率

図2：UEA1レクチン 免疫染色

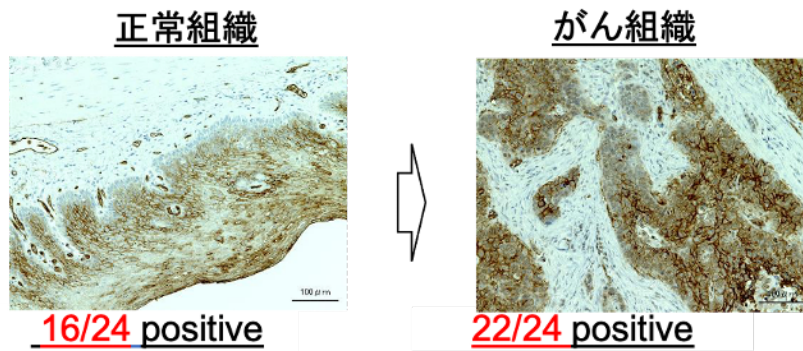
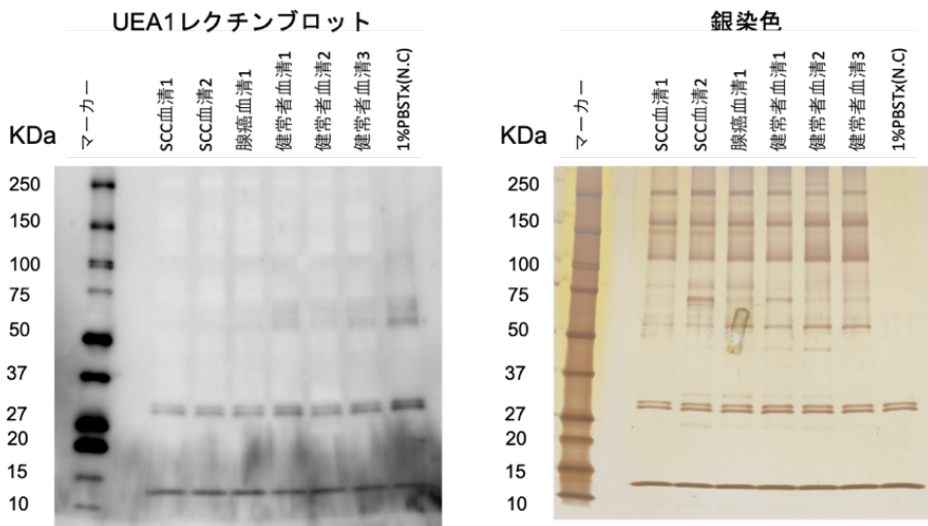


図3：UEA1レクチンを用いた食道癌患者・健常者血清のレクチンブロット



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ogawa Koichi, Honda Michitaka, Akashi Yoshimasa, Inagawa Satoshi, Kaneda Akinao, Hori Soshi, Owada Yohei, Ohara Yusuke, Hisakura Katsuji, Enomoto Tsuyoshi, Shimomura Osamu, Takahashi Kazuhiro, Oda Tatsuya	4. 巻 25
2. 論文標題 Comparison of 2- and 4-week S-1 administration as adjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1807 ~ 1813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-020-01719-5	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 Kitaguchi Daichi, Enomoto Tsuyoshi, Ohara Yusuke, Owada Yohei, Hisakura Katsuji, Akashi Yoshimasa, Takahashi Kazuhiro, Ogawa Koichi, Shimomura Osamu, Oda Tatsuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Laparoscopic surgery for diverticular colovesical fistula: single-center experience of 11 cases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	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) 10.1186/s13104-020-05022-4	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 Kimura Sota, Oda Tatsuya, Shimomura Osamu, Enomoto Tsuyoshi, Hashimoto Shinji, Kuroda Yukihito, Yu Yang, Kurimori Ko, Furuta Tomoaki, Miyazaki Yoshihiro, Tateno Hiroaki	4. 巻 61
2. 論文標題 Novel Pancreatic Cancer Therapy Targeting Cell Surface Glycans by Liposomes Modified with rBC2LCN Lectin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Surgical Research	6. 最初と最後の頁 113 ~ 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000513430	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 Kitaguchi Daichi, Enomoto Tsuyoshi, Ohara Yusuke, Owada Yohei, Hisakura Katsuji, Akashi Yoshimasa, Takahashi Kazuhiro, Ogawa Koichi, Shimomura Osamu, Oda Tatsuya	4. 巻 20
2. 論文標題 Exploring optimal examination to detect occult anastomotic leakage after rectal resection in patients with diverting stoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Surgery	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) 10.1186/s12893-020-00706-x	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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	下村 治 (Shimomura Osamu)		
研究協力者	荒木 一寿 (Araki Kazuhisa)		
研究協力者	舘野 浩章 (Tateno Hiroaki)		
研究協力者	小田 竜也 (Oda Tatsuya)		

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
---------	---------