

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18132

研究課題名(和文) レクチンアレイを用いたエクソソーム糖鎖解析による新規膵癌バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of new pancreatic cancer marker by using Lectin Microarray

研究代表者

中野 容 (Nakano, Yutaka)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70770832

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)：レクチンマイクロアレイを用いた血清エクソソームの比較糖鎖解析を行い、ABA (Agaricus bisporus agglutinin)とACA(Amaranthus caudatus agglutinin)というO-型糖鎖を認識し結合するレクチンを同定した。同被験者の膵癌切除検体のパラフィン包埋切片をABA、ACAのレクチンを用いて染色したところ、膵癌の病変部および前癌病変部で染色陽性、正常膵組織は染色陰性であり膵癌特異的であることが確認され、新たな診断マーカーとなる可能性がある。本研究では予後が明らかになっている症例が膵癌68名のみであり、追跡期間も不十分であるため予後解析が行えていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで膵癌由来エクソソーム表面の糖鎖解析やレクチンを用いたエクソソーム数の測定については報告がなく、本研究が初めての報告である。さらに本研究方法は他疾患に応用可能であるため、癌研究領域のみならず様々な分野でのバイオマーカー探索にインパクトを与えたと考える。そして今回確立したエクソソーム数計測系はわずか12.5µLの検体から合計3時間半で解析可能である点で実用的である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the differential glycomic profiling of extracellular vesicles (EVs) derived from serum using lectin microarray. The glyco-candidates of PC-specific EVs were quantified using a high-sensitive exosome-counting system, ExoCounter. An absolute quantification system for altered glycan-containing EVs elevated in PC serum was established. EVs recognized by O-glycan-binding lectins ABA or ACA were identified as candidate markers by lectin microarray. Quantitative analyses using ExoCounter revealed that the ABA- or ACA-positive EVs were significantly increased in the culture of PC cell lines or in the serum of PC patients including carbohydrate antigen 19-9 negative patients with high area under curve values. Histological examination confirmed that the tumors stained with ABA/ACA. These specific EVs with O-glycans recognized by ABA/ACA are elevated in PC sera and can act as potential biomarkers in a liquid biopsy for PC patients screening.

研究分野：膵癌Liquid Biopsy

キーワード：膵癌 レクチン バイオマーカー エクソソーム マイクロアレイ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌による死亡数は年々増加し、2018年の統計では癌による死因のうち、膵癌は33475人で4位と上位を占めている。近年、手術手技自体の改良のみならず、術前治療（化学療法や放射線治療）や術後補助療法といった集学的治療戦略が開発され、以前と比較し長期成績の改善を認めるものの、悪性新生物全体で見れば未だ課題は多い。この理由として、膵癌は画像診断の発展にもかかわらず進行癌で診断されることが多く診断時の切除率は30%程度と報告されていること、高難度な外科手術により根治切除を得たとしても高率に再発をきたす性質を有すること、また既存の化学療法や放射線療法に対し治療抵抗性を有することが挙げられる。

膵癌の早期診断が難しい理由の一つに、膵臓は他癌腫と比較して直接的な検体の採取が困難であるという臓器の特殊性がある。画像検査の解像度の向上により診断精度は向上したが、有効なスクリーニング方法として確立したものはない。また組織を採取する際に超音波内視鏡下穿刺吸引法(EUS-FNA)が普及し、診断能は向上したものの、穿刺による播種の可能性や侵襲性の課題があり、より簡便で低侵襲な検査手法が求められている。以上の理由から、リキッド・バイオプシーという、体液（血液など）サンプルを用いて癌由来の分子を調べることで癌の診断や治療効果判定を行う検査法が膵癌において注目を集めている。リキッド・バイオプシーによる簡便な癌の早期診断法が開発されれば、スクリーニングでの早期発見が可能になり、また病勢と鋭敏に相関するマーカーを計測できれば治療効果判定など治療戦略のモニタリングとしても応用可能であり、これにより患者個人に最適な治療を行っていくことができると考える。

リキッド・バイオプシーで計測する対象は主に癌特異的なDNAもしくはRNAであるが、これらの分子は体液中に豊富に含まれる分解酵素の影響を受けやすいため、再現性が乏しく、実用化は困難な可能性がある。そこで申請者は近年測定技術の向上したエクソソームに注目した。エクソソームとは様々な細胞から分泌される直径50~150nm程度の脂質二重膜で囲まれた膜小胞であり、血液などほとんどの体液中に安定し存在している。さらに、採取後長期保存された体液中でも比較的安定であるため、臨床検査での有用性が注目されている。以前は不要な細胞内容物の放出に関与すると考えられていたが、近年では、分泌細胞のエンドソームや細胞膜由来の蛋白質やmRNA、miRNAが含まれ、表面には分泌細胞の細胞膜やエンドソーム膜由来の脂質や糖鎖、糖蛋白質などが存在することがわかっており、細胞間での情報伝達として脂質・蛋白質を運ぶだけでなく、遺伝子発現情報の水平伝播に関与している可能性が注目されている(Valadi H, et al. *Nat Cell Biol*, 9, 654, 2007. Colombo M, et al. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 255, 2014)。故に様々な疾患においてエクソソームが注目されているが、特に癌領域において診断や治療のためのバイオマーカーとしての開発が急速に展開され下記のような先行研究が報告されている。(1) 癌細胞由来のエクソソームを健常細胞由来と比較し、構成分子の違いから癌進展との相関関係が調べられ早期診断のツールとして報告されている(Thind A, et al. *J Extracell Vesicles*, 5, 31292, 2016)。(2) 癌細胞由来のエクソソームには、血管新生や免疫逃避に関連する分子が多数含まれており、適切な微小環境を構築し癌の進展促進に寄与していると考えられている(Tkach M, et al. *Cell*, 164, 1226, 2016)。(3) 癌細胞由来のエクソソーム表面の接着分子の発現様式により、どの臓器へと転移するかが決められていることが明らかになっている(Hoshino A, et al. *Nature*, 527, 329, 2015)。(4) 膵癌では約40年前から臨床で使用されている腫瘍マーカーのCA19-9は糖鎖構造を認識する抗原だが、癌化により細胞の極性が変化して表面に脂質型CA19-9を有するエクソソームが血液中に放出されていると考えられている(Uozumi N, et al. *J Proteome Res*, 12, 6345, 2010)。また、糖鎖は癌性変化に伴い、その構造が著しく変化することがよく知られている。以上より、本研究では、癌領域においても注目されているエクソソーム上糖鎖に着目した。

タンパク質翻訳後修飾の一つである糖鎖は、あらゆる細胞膜・分泌タンパク質上に存在し、細胞の分化や癌化によりその構造が変化していくとされており、現在診断に応用されている腫瘍マーカーの多くがこの糖鎖構造変化を捉えたものである。膵癌において汎用されるCA19-9は、そのエピトープはシアリル Lea という四糖構造の糖鎖であり、この増加をバイオマーカーとして活用している(Magnani JL, et al. *J Biol Chem*. 257, 14365, 1982)。また、ハプトグロビンの中でも特にフコシル化されたフコシル化ハプトグロビンが膵癌特異的に増加することが報告されている(Okuyama N, et al. *Int J Cancer*, 118, 2803, 2006)。従って、糖鎖の変化を調べることで、有用な癌の早期診断マーカーの開発につながると期待されている。さらに転移の制御や増殖因子の受容体、接着分子の機能調節など様々な機能をもつとされており、糖鎖は単に腫瘍マーカーとしてだけでなく、腫瘍生物学を理解する上で重要な解析ターゲットである。しかしながら、このような糖鎖マーカー解析の成功例は限られており、特に血中エクソソーム糖鎖解析例はなく、グライコムアプローチによるエクソソーム糖鎖マーカーの開発が期待される。

レクチンとは、糖鎖を構造特異的に認識し結合するタンパク質の総称で、糖鎖解析ツールとして活用されている。このレクチン数十種類をガラス基板上にアレイ化し、高感度・スループットで糖鎖解析可能なデバイスがレクチンマイクロアレイである。研究協力者である慶應義塾大学医学部医化学教室 松田厚志助教は膵・胆管癌を中心にレクチンマイクロアレイ解析により、腫瘍特異的な糖鎖構造変化を見出し、疾患特異的糖鎖構造をもつ糖蛋白質をレクチン-抗体で同時

検出することで、いくつかの診断に有用なバイオマーカーを報告した(Matsuda A, et al. Hepatology, (2010), Anal Chem (2015))。膵癌では、Glypican-1という細胞表面の糖蛋白質を用いて膵癌由来のエクソソームを認識することでバイオマーカーとなりうる可能性が報告されている(Melo SA, et al. Nature. 523, 177, 2015)が、血液中エクソソームの糖鎖解析例はこれまで報告がない。

2. 研究の目的

本研究ではレクチンマイクロアレイを用いて、血液中を安定して循環しているエクソソーム上の癌化の過程で変化する糖鎖構造を識別するレクチンを比較糖鎖プロファイリングによって同定し、そのレクチンと結合する糖鎖からグリコпротеオミクス解析にて膵癌に特異的に発現している糖蛋白質を同定し、レクチンと抗体による疾患特異的血中エクソソームを同時検出することで、早期診断や治療効果判定を可能とするバイオマーカーを開発することを目的とした。これにより画像診断も難しい早期膵癌を非侵襲的に診断し、治療介入を早めて切除可能性を高めることで膵癌の治療成績の向上を目指す。また、当院保存血清検体の強みを活かし、手術や化学療法といった治療の前後で採取された血清を用い、その変化を調べることで治療効果判定の予測因子となるバイオマーカーを開発する。切除検体の凍結組織やホルマリン固定パラフィン包埋検体をレクチンを用いて染色することで癌特異的な糖鎖構造の発現を腫瘍本体でも確認することができる。

3. 研究の方法

本研究では進行膵癌、早期膵癌を対象とし、臨床研究に同意が得られている被験者の検体を用いた。本研究では術前治療を受けた被験者は除外し、治療切除手術前後での検体の比較や正常健常者との比較を行った。

慶應義塾大学の検体のうち、膵癌患者と正常健常者の血清からエクソソームを抽出してレクチンマイクロアレイによる比較糖鎖プロファイリングを実施し、45種類のレクチンから膵癌特異的に結合するプローブレクチンを同定した(図 1A)。そして同被験者の切除検体のパラフィン包埋切片を、同定されたレクチンを用いて染色することで膵癌特異的に結合していることを確認した。血清中のエクソソームを抗体で検出することでエクソソーム数を計測するエクソカウンターという機械を用いて、プローブレクチンによるエクソソーム数測定の実験系を確立した(図 1B)。慶應義塾大学と、国立がん研究センターの2つの検証コホートで新規膵癌バイオマーカーとしての有用性を確認した。

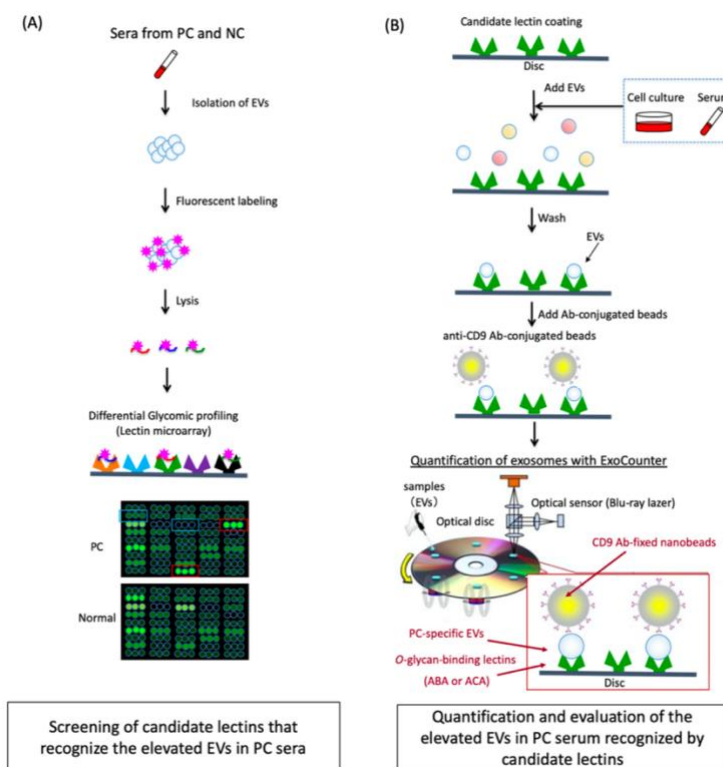


図 1. 研究概要 (A)レクチンアレイによる比較糖鎖解析 (B)エクソカウンターによるレクチン結合エクソソームの定量評価

4. 研究成果

レクチンマイクロアレイを用いた血清エクソソームの比較糖鎖解析では慶應義塾大学の膵癌患者 21 名（治癒切除手術施行 15 名、治癒切除非施行 6 名）と正常健常者 10 名の検体を解析し（図 2A, B）、さらに治癒切除症例 5 名の術前術後検体を比較解析した（図 2C）。その結果、膵癌に特異的に結合する ABA (*Agaricus bisporus agglutinin*) と ACA (*Amaranthus caudatus agglutinin*) という O-型糖鎖を認識し結合するレクチンを同定した。同被験者の膵癌切除検体のパラフィン包埋切片を ABA、ACA の 2 つのレクチンを用いて染色したところ、膵癌の病変部および前癌病変部で染色陽性、正常膵組織は染色陰性であり膵癌特異的であることが確認された。同レクチンを用いたエクソカウンターによる血清中エクソソーム数計測の測定系を確立した。2 つの検証コホート（コホート 1：慶應義塾大学の膵癌患者の術前検体 68 名および術後検体 22 名、正常健常者 27 名、東北メディカル・メガバンク機構の正常健常者 50 名、コホート 2：国立がん研究センターとナショナルセンターバイオバンクネットワークの膵癌患者 49 名、正常健常者 21 名）において膵癌特異的なエクソソーム数を定量化したところ、ABA と ACA 陽性エクソソームが膵癌患者血清中に有意に上昇していることを同定した（図 3A, B）。ABA と ACA とともに早期膵癌であるステージ 1 の 24 名の検体で正常健常者 98 名と比較し有意に上昇していたが、進行度の上昇との関連はみられなかった（図 3C）。診断精度の指標として用いられる ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線の AUC (Area under the curve) は、それぞれ ABA が 0.838、ACA が 0.810 であった（図 4）。また膵癌の診断に広く使われている CA19-9 が偽陰性となるルイス抗原陰性の患者でも ABA および ACA 陽性エクソソーム数は上昇しており、散布図からも ABA と ACA は CA19-9 とは相関がないことが明らかとなった。これは CA19-9 とは異なる糖鎖構造を認識していることを示唆しており、新たな診断マーカーとなる可能性がある。本研究では術後血清中の ABA および ACA 陽性エクソソーム数は術前血清と比較し低下していたが、膵癌 117 名のうち術後血清が 22 名からしか得られなかったため結果は限定的である。また、本研究では予後が明らかになっている症例が膵癌 68 名のみであり、さらに追跡期間も不十分であるため予後解析が行えていない。以上の結果を論文投稿し *Cancers* に掲載された。(Yokose T, et al. O-Glycan-Altered Extracellular Vesicles: A Specific Serum Marker Elevated in Pancreatic Cancer. *Cancers*. 2020; 12(9):2469.)

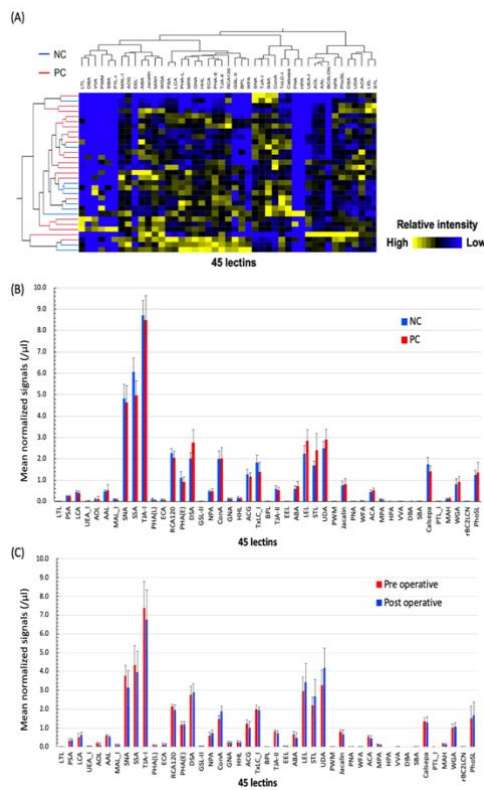


図 2. レクチンマイクロアレイによる比較糖鎖解析 (A) クラスター解析 (B)膵癌と正常健常者の比較 (C)術前術後の比較

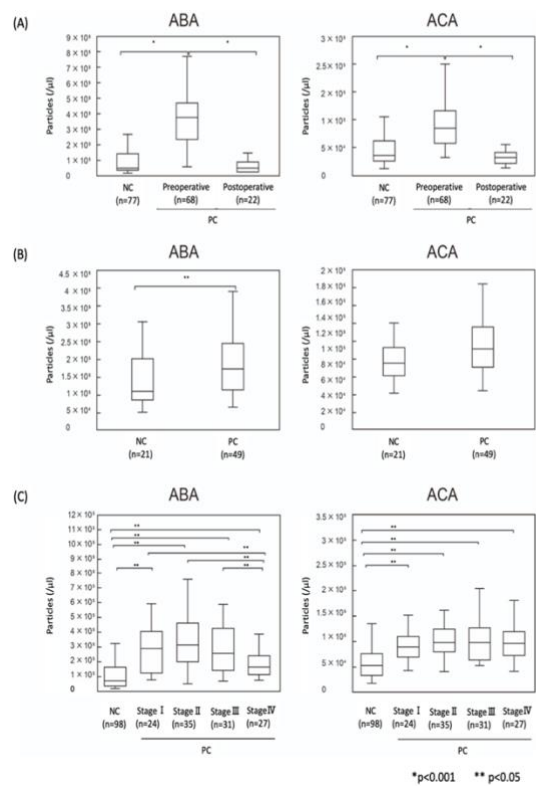
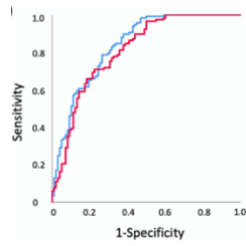


図 3. エクソカウンターによるレクチン結合エクソソーム測定 (A)コホート 1 (B)コホート 2 (C)コホート 1+2



	AUC	Cut-off (particles / μL)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
ABA	0.838	140,000	77.8	73.5
ACA	0.810	77,000	70.1	77.6

図 4. 膵癌の診断に関する ROC 曲線と各指標

これまで膵癌由来エクソソーム表面の糖鎖解析やレクチンを用いたエクソソーム数の測定については報告がなく、本研究が初めての報告である。さらに本研究方法は他疾患に応用可能であるため、癌研究領域のみならず様々な分野でのバイオマーカー探索にインパクトを与えたと考える。そして今回確立したエクソソーム数計測系はわずか $12.5 \mu\text{L}$ の検体から合計 3 時間半で解析可能である点で実用的である。

今後の展望としては手術だけでなく化学療法の治療前後の検体を用いて比較検討をすることで、様々な治療効果予測マーカーとしての有用性を検討する。また追跡期間を延長して予後予測マーカーとしての有用性を検討する。上述したように本研究方法は膵癌のみならず他疾患にも応用可能であるため、胆道癌や肝細胞癌、他の癌種での研究を検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yokose T, Kabe Y, Matsuda A, Kitago M, Matsuda S, Hirai M, Nakagawa T, Masugi Y, Hishiki T, Nakamura Y, Shinoda M, Yagi H, Abe Y, Oshima G, Hori S, Nakano Y, Honda K, Kashiro A, Morizane C, Nara S, Kikuchi S, Shibahara T, Itonaga M, Ono M, Minegishi N, Koshiba S, Yamamoto M, Kuno A, Handa H, Sakamoto M, Suematsu M, Kitagawa Y	4. 巻 12
2. 論文標題 O-Glycan-Altered Extracellular Vesicles: A Specific Serum Marker Elevated in Pancreatic Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2469 ~ 2469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12092469	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

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 膵臓がん検出方法及び膵臓がん検出キット	発明者 糸長誠小野雅之横瀬 崇寛松田厚志加部泰 明松田祐子平井美和	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-147108	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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