

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22712

研究課題名(和文)臨床0-グリコペプチドミクスによる大腸がん治療標的候補分子の探索的研究

研究課題名(英文)Clinical 0-glycopeptidomics for the exploration of therapeutic targets for colorectal cancer

研究代表者

高倉 大輔 (Takakura, Daisuke)

横浜市立大学・生命医科学研究科・特任教員

研究者番号：90760231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がん腫瘍部および非腫瘍部間における糖鎖プロファイルの比較により、一部のムチン型糖鎖認識レクチンのシグナル強度の腫瘍部における増加が認められた。このムチン型糖鎖認識レクチンによる捕集画分のLC/MS/MSにより、400を超える0-グリコフォームが同定された。また、従来法に比べ、定量性と網羅性に優れたデータ非依存型取得法を用いた定量0-グリコプロテオミクス/プロテオミクスにより、腫瘍部で有意に増加した0-型グリコフォーム/0-型糖タンパク質を明らかにした。さらに、ムチン型糖鎖付加の責任酵素アイソザイムの一部の合成が腫瘍部で亢進していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体医薬品や診断薬の標的となり得る糖ペプチドエピトープとして0-型糖ペプチドが注目されているものの、臨床試料からの細胞表面0-型糖タンパク質における糖鎖部分の組成や構造、付加位置に関する情報は殆ど得られていなかった。本研究では、独自に確立された0-グリコプロテオミクス技術により、大腸がん腫瘍細胞表面上で亢進している0-型糖鎖修飾とそのキャリアタンパク質を同定することができた。本研究の成果をさらに展開・応用することで、さまざまな腫瘍組織における0-型糖タンパク質の変化が明らかになり、将来的に、抗悪性腫瘍治療薬としての抗体医薬品の標的分子候補や病理診断マーカー開発へと繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：A comparison of the glycan profile between tumor and normal tissue adjacent to the tumor (NAT) of colorectal cancer revealed an increase in the signal intensity of some mucin-type glycan-recognizing lectins in the tumor. LC/MS/MS of the fraction captured by this mucin-type glycan-recognizing lectin gave us over 400 0-glycoforms. In addition, quantitative 0-glycoproteomics/proteomics using a data-independent acquisition method revealed significantly increased 0-glycoforms/0-glycoproteins in tumors. Furthermore, it was clarified that the synthesis of some isozymes responsible for mucin-type glycosylation was enhanced in the tumor.

研究分野：グリコプロテオミクス

キーワード：グリコプロテオミクス がん LC/MS/MS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦における大腸がんの罹患数は最も多く、年間約 15 万人が発症している。

(2) 大腸がん治療においては、分子標的薬である抗 VEGF 抗体ベバシズマブや抗 EGFR 抗体セツキシマブ/パニツムマブが一定の成果を上げているものの、それらの費用対効果は低く、新たな創薬標的に期待が集まっている。

(3) 細胞の悪性化が進むと、糖タンパク質の糖鎖部分が選択的に変化することから、糖鎖を含むペプチド配列は、新たな創薬標的“糖ペプチドエピトープ”として注目されている。

(4) 創薬標的としての 0-型糖鎖に注目が集まっているものの、0-型糖ペプチドの網羅解析は容易ではなく、0-グリコペプチドミクスは進展しなかった。

2. 研究の目的

応募者が確立した 0-グリコプロテオミクス技術を用いて、大腸がん組織検体において特異的に発現する細胞表面 0-型糖タンパク質を同定し、付加位置を含めた糖鎖不均一性の変化を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 凍結組織検体(腫瘍部, 非腫瘍部: 各 n=5)より全タンパク質を抽出し、レクチンマイクロアレイを用いて糖鎖プロファイルの違いを明らかにする。

(2) 腫瘍部で反応性が上昇したレクチンを用いて 0-型タンパク質を捕集し、トリプシン/リシルエンドペプチダーゼで消化した後、LC/MS/MS によりレクチン結合タンパク質を網羅的に同定する。並行して、0-型糖ペプチド濃縮物の LC/MS/MS により、腫瘍部および非腫瘍部におけるレクチン結合 0-型糖タンパク質を同定する。

(3) データ非依存的データ取得法を用いた非ラベル化定量法により、大腸がん関連 0-型グリコフォームを同定する。

4. 研究成果

(1) レクチンマイクロアレイにより、凍結組織検体(腫瘍部, 非腫瘍部: 各 n=5)から抽出したタンパク質の糖鎖プロファイルを比較した。クラスタリング解析から、高マンノース型認識レクチン及び 0-型糖鎖認識レクチンシグナルの腫瘍部における増加が明らかとなった(図 1)。また、得られた各レクチンのシグナル値を用いた主成分分析により、腫瘍部で特徴的な 0-型糖鎖認識レクチンが同定された(図 2)。

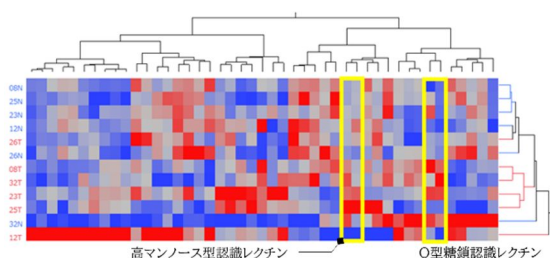


図 1. クラスタリング解析による主要なブローレクチンの推定

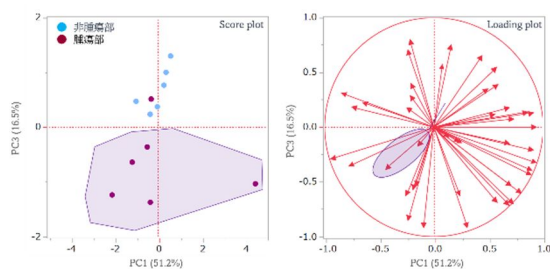


図 2. 主成分分析によるブローレクチンの同定

(2) 同定された腫瘍部で特徴的な 0-型糖鎖認識レクチンを用いて、組織由来全タンパク質から 0-型糖タンパク質を捕集し、トリプシン/リシルエンドペプチダーゼで消化した。消化物の LC/MS/MS により、合計 4549 種のタンパク質が同定され、その内 1117 種は腫瘍部で特徴的であった(図 3)。並行して、消化物から 0-型糖ペプチドを濃縮し、LC/MS/MS に供した。検索エンジン Byonic による解析の結果、合計 415 種の 0-型グリコフォームが同定され、254 種は腫瘍部特異的に同定された。その中には、腫瘍部で特徴的なレクチンが認識する 89 種のタンパク質に由来する 170 種の 0-型

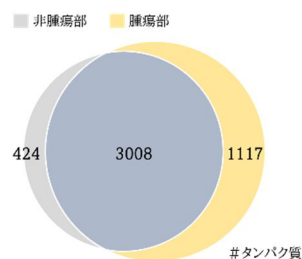


図 3. 同定されたタンパク質の比較

グリコフォームが含まれていた(図4)。さらに、TMHMM 及び SOSUI ツールを用いたトポロジー予測の結果、23種の膜関連タンパク質を抽出することができた。

(3)従来のデータ依存的取得法に比べて定量性・網羅性に優れたデータ非依存取得法を用いた定量グライコプロテオミクスにより、腫瘍部で有意に増加した0-型グリコフォーム/0-型糖タンパク質を抽出できた。

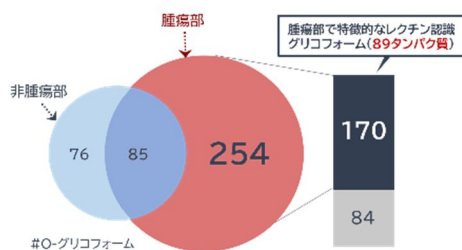


図4. 同定された0-グリコフォームの比較

(4)データ非依存取得法を用いた定量プロテオミクスにより、大腸がん患者腫瘍部において、0-型糖鎖付加に関与する一部の糖転移酵素の合成が亢進していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高倉大輔、我妻孝則、大橋祥子、小林規俊、廣島幸彦、徳久元彦、市川靖史、川崎ナナ
2. 発表標題 臨床0-糖鎖プロテオミクスによる大腸がん0-型糖鎖修飾タンパク質の探索
3. 学会等名 第40回日本糖質学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高倉大輔
2. 発表標題 糖鎖プロテオーム解析プラットフォームの開発と大腸がん診断・治療標的の探索
3. 学会等名 JCGG2021（招待講演）
4. 発表年 2021年

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

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