

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03009

研究課題名(和文) 高密度レクチンアレイを用いた腫瘍抗原における糖鎖構造の解明

研究課題名(英文) Elucidation of glycan structures in tumor antigens using high-density lectin arrays

研究代表者

和田 聡 (WADA, SATOSHI)

昭和大学・大学共同利用機関等の部局等・教授

研究者番号：30420102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓がん腫瘍組織検体(90症例)を用いたPIGRの免疫染色の解析結果から、膵臓がん腫瘍組織11検体分において正常腸管細胞と腫瘍細胞の両方にPIGR分子の発現を認めた。この膵臓がん腫瘍組織11検体を用いて正常腸管細胞及び腫瘍細胞をレーザーマイクロディセクション法を用いて分離した。分離した細胞のPIGR分子を免疫沈降にて単離してレクチンアレイ解析を行った。その解析により一部正常細胞と腫瘍細胞上の糖鎖を認識するレクチンの相違を認めた。抗体とレクチンを用いた二重免疫染色により、正常細胞と腫瘍細胞における発現の相違が確認でき、同定したレクチンを搭載したCAR-T細胞の作製及び機能解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年がん治療においてCAR-T療法が注目されている。CAR-T療法はこれまでの治療法を遥かに凌駕するほどの強力な治療効果を有する反面副作用が強く、より高い腫瘍特異性が求められている。我々の研究成果は、糖鎖構造を識別することで、腫瘍細胞と正常細胞とを区別出来る事であり、究極の腫瘍特異的抗原の創出となり学術的意義は大きい。また、これまで臨床で使用されているCAR-T療法が、我々の成果により腫瘍細胞のみを完全に標的にすることができ、より副作用の少ない治療薬の開発に繋がるとも大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Based on the results of immunostaining analysis of PIGR using pancreatic cancer tumor tissue samples (90 cases), expression of PIGR molecules was observed in both normal intestinal cells and tumor cells for 11 pancreatic cancer tumor tissue samples. Using these 11 pancreatic cancer tumor tissue samples, normal intestinal cells and tumor cells were separated using a laser microdissection method. PIGR molecules in the isolated cells were isolated by immunoprecipitation and subjected to lectin array analysis. The analysis revealed differences in lectins recognizing carbohydrate chains on some normal cells and tumor cells. Double immunostaining using antibodies and lectins confirmed the differences in expression between normal cells and tumor cells, and we are now preparing CAR-T cells carrying the identified lectins and analyzing their functions.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：CAR-T療法 腫瘍特異的抗原 糖鎖構造 レクチン

1. 研究開始当初の背景

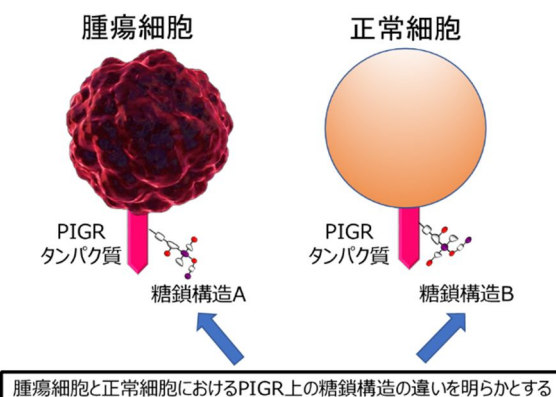
近年、CAR-T療法が注目され、血液がんにおいて臨床的有用性が認められた(N Engl J Med 2018;378:449-459)。一方、固形がんでは臨床的有用性が認められた報告例はまだなく、世界中で研究開発が行われている。研究の進展により、強力な細胞障害活性を示すCAR-T細胞が開発されているが、強力であるがゆえの副作用によって開発が進まない現実もある。これまでも、上皮成長因子受容体2(ERBB2)に対するCAR-T療法において、ERBB2を僅かに発現する正常肺への障害による死亡例が報告されている(Mol Ther. 2010;18:843-851)。このように、CAR-T療法における理想の標的抗原は、正常細胞には全く発現を認めず腫瘍細胞にのみ強く発現する、がん重要な分子である。しかし、そうした理想の標的抗原は現実的には少ない。特にタンパク質抗原に至ってはほぼ探索し尽くされており、今後大きな発展は望みにくい状況である。そこで、同じタンパク質抗原を発現している正常細胞と腫瘍細胞とを見分ける手法が今後のCAR-T療法の発展においては重要であり、また学術的にも重要である。

正常細胞と腫瘍細胞の両方に発現を認めるタンパク質抗原の違いの一つとして翻訳後修飾である糖鎖が挙げられる。糖鎖は、遺伝子(第一生命鎖)、タンパク質(第二生命鎖)に次ぐ第三生命鎖と呼ばれ、ポストゲノム研究において多くの研究が行われている。がん細胞の目印になる腫瘍マーカーのうち、消化器がんや膵臓がんの腫瘍マーカーであるCA19-9や肺がんにおけるSLXなどが糖鎖抗原の腫瘍マーカーとして知られている。また、正常細胞ががん化することにより細胞表面の糖鎖が変化することは既に多くの報告例がある。我々は、共同研究による糖鎖解析により、前立腺肥大症と前立腺がんにおける特定タンパク質抗原(PSA)の糖鎖構造の違いを明らかにしてきた(Anal Chem. 2015; 87:1797-803)。このことは、他のがん種においても糖鎖の違いを利用して見分けることが可能であることを意味している。

レクチンは糖鎖の認識に関わるタンパク質であり、日本は世界に先駆けてレクチンの研究が進められており、世界最先端の解析ツールが開発されている。我々はこうした世界最先端の解析ツール(高密度レクチンアレイ法: 独自の糖鎖解析技術)にアクセスできる研究グループである。研究分担者の館野は、本解析ツールを用いて膵臓がんに関与する糖鎖とそれに特異的に結合するレクチンを同定してきた(Mol Cancer Ther, 2018;17(1);183-95)。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでにPIGR(多量体免疫グロブリン受容体)に対する抗体を用いて、膵臓がん腫瘍組織検体(90症例)における免疫染色を施行し、一部の腫瘍組織検体では、同じレパート内の腫瘍細胞と共に正常腸管細胞にもPIGR分子の発現を認めた(11/90症例)。一方、数種類のレクチンを用いた膵臓がん腫瘍組織検体における免疫染色解析では、レクチン毎に免疫染色が異なることが判明した。このことは、レクチンが糖鎖の違いを認識して、正常細胞と腫瘍細胞を区別できる可能性を意味しており、これを利用することで新たな腫瘍細胞の識別方法を確立できると考えられた。こうしたことから、「糖鎖を識別することで、腫瘍細胞と正常細胞を区別できるか?」を研究課題の核心をなす学術的問いとして設定した。



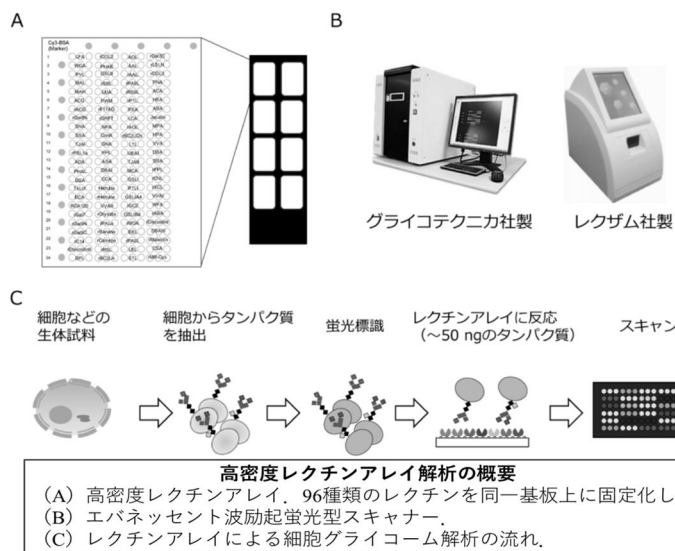
糖鎖解析は非常に複雑であり、遺伝子解析にける次世代シーケンサーのような手軽に解析できるツールがないため開発が進んでいない。本研究では世界最先端のグライコム解析を用いて、正常細胞と腫瘍細胞に発現を認めるPIGRタンパク質の糖鎖構造の違いを明らかとすることを目的とする（右上図）。

3. 研究の方法

本研究では腫瘍細胞と正常腸管細胞の両方に PIGR 分子の発現を認める膵臓がん腫瘍組織 11 検体を使用して高密度レクチンアレイ解析を行い、腫瘍細胞上の PIGR 分子に特異的な糖鎖及びそれを認識するレクチンを同定する。

(1) 正常細胞・腫瘍細胞に発現するPIGR分子の糖鎖構造を認識するレクチンの同定

これまでの膵臓がん腫瘍組織検体（90症例）を用いたPIGRの免疫染色の研究結果から、膵臓がん腫瘍組織11検体分において正常腸管細胞と腫瘍細胞の両方にPIGR分子の発現を認めた。本研究ではこの膵臓がん腫瘍組織11検体を用いてレクチン解析を行う。レクチン解析は産業技術総合研究所における96種類のレクチン解析が可能な高密度レクチンアレイ法にて解析。



膵臓がん腫瘍組織11検体の腫瘍細胞と正常腸管細胞をそれぞれレーザーマイクロダイゼクション(LMD)法を用いて、別々に採取する。

採取した腫瘍細胞と正常腸管細胞を溶解して抗原を抽出し、それぞれ抗PIGR抗体を加えて免疫複合体を形成後、免疫沈降してPIGR分子を分離する。

分離したPIGR分子の高密度レクチンアレイ解析（上図）を行い、11検体において発現解析を施行し、正常腸管細胞よりも腫瘍細胞上のPIGR分子に発現の高い糖鎖を認識するレクチンを同定する。

(2) 同定したレクチン及び抗PIGR抗体を用いた免疫染色解析

同定したレクチン及び抗PIGR抗体を用いて、膵臓がん腫瘍組織検体90例分の二重免疫染色を行い、腫瘍細胞にのみ発現を認め正常細胞には発現を認めない事を確認する。同定したレクチン及びPIGR分子に対する抗体を用いて、正常組織アレイにおける発現解析を行い、他の正常組織は認識しないことを確認する。

(3) 同定したレクチンによる糖鎖構造決定

糖鎖構造決定には多量の検体を必要とするため、ここでは細胞株を用いて解析を行う。同定したレクチンを用いてPIGR発現細胞株との結合実験を行い、結合を認める細胞株を同定する。その際に共焦点レーザー顕微鏡を用いて三次元構造解析を行い、PIGR分子上にレクチンが結合している事を確認する。同定した細胞株を溶解して抗原を抽出し、抗PIGR抗体を加えてPIGR分子を分離する。分離し精製したPIGR分子を液体クロマトグラフィーと質量分析計を用いて糖鎖構造を明らかにする。

特定した糖鎖を合成する遺伝子（糖転移酵素遺伝子）及びPIGRを強制発現させた細胞株を作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて三次元構造解析を行い、PIGR分子上に特

定糖鎖が発現している事を確認する。

上記実験により、正常細胞と腫瘍細胞に発現を認める PIGR 分子の糖鎖構造を識別できる糖鎖・レクチンを同定する。

4. 研究成果

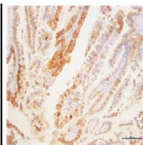
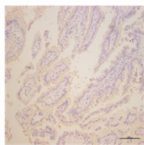
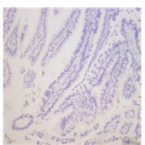
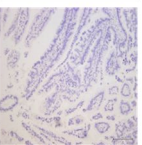
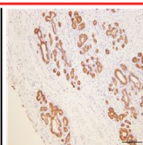
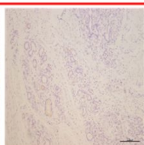
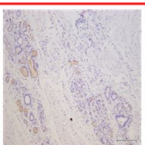
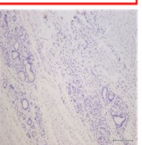
キメラ抗原受容体遺伝子導入T細胞療法（CAR-T療法）は有望ながん免疫療法として注目され、血液がんにおいて高い抗腫瘍効果が認められた。一方、固形がんでは明らかな抗腫瘍効果はまだ認めていない。その原因として標的抗原が少ないことが挙げられる。申請者はこれまでに固形がんの根幹に関わる分子としてPIGRを同定した。PIGRは腫瘍細胞で強い発現が見られるが、一方で一部の正常細胞でも発現が認められる。そこで本研究では、正常細胞と腫瘍細胞を究極的に見分ける方法を確立するために、正常細胞と腫瘍細胞でのPIGR上の糖鎖構造の相違について検討を行った。

糖鎖解析は非常に複雑であり、遺伝子解析における次世代シーケンサーのような手軽に解析できるツールがないため開発が進んでいないが、本研究では世界最先端のグリコーム解析を用いて、正常細胞と腫瘍細胞におけるPIGR上の糖鎖構造について解析を行った。

膵臓がん腫瘍組織検体（90症例）を用いたPIGRの免疫染色の解析結果から、膵臓がん腫瘍組織11検体分において正常腸管細胞と腫瘍細胞の両方にPIGR分子の発現を認めた。そこで、この膵臓がん腫瘍組織11検体を用いて正常腸管細胞及び腫瘍細胞をレーザーマイクロダイゼクション法(LMD法)を用いて分離した。次に分

離した細胞のPIGR分子を免疫沈降にて単離してそれぞれレクチンアレイ解析を行った。その解析により一部正常細胞と腫瘍細胞上の糖鎖を認識するレクチンの相違を認めた。抗体とレクチンを用いた二重免疫染色により、正常細胞と腫瘍細胞とにおける発現の相違が確認できた（右図）。この結果から、腫瘍細胞上のPIGR

糖鎖と正常細胞におけるPIGR糖鎖は異なることが判明し、今後この違いを用いた診断薬及び治療薬の開発につなげたい。

| | 抗PIGR抗体 | レクチン(WFA) | レクチン(SSA) | レクチン(UDA) |
|------|---|--|---|---|
| 腫瘍組織 |  |  |  |  |
| 発現: | ++ | + | - | - |
| 正常組織 |  |  |  |  |
| 発現: | ++ | - | + | - |

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 館野 浩章 (TATENO HIROAKI) (30450670) | 国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長 (82626) | |

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 |
|---------|---------|
| | |