

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19542

研究課題名（和文）免疫チェックポイント分子の糖鎖構造の解析及び個別化治療への挑戦

研究課題名（英文）Analysis of Glycan Structures of Immune Checkpoint Molecules and Challenges for Personalized Therapy

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、各がん種の腫瘍組織を使用し、レーザーマイクロディセクション（LMD）法を用いて腫瘍細胞を分離して、腫瘍細胞に発現するPD-L1上の糖鎖修飾を高密度レクチンアレイ法にて解析する。まず患者腫瘍組織（肺がん・胃がん・大腸がん・膵臓がん）を準備し、LMD法にて各がん種の腫瘍細胞を分離した。次に、分離した腫瘍細胞を抗PD-L1抗体を用いて免疫沈降し、PD-L1分子を単離した。単離したPD-L1分子を高密度レクチンアレイ法にて解析を行い、がん種により糖鎖を認識するレクチン構造が異なる事が判明した。また腫瘍細胞株を使用した高密度レクチンアレイ解析も行い同様の結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖修飾は種々の生命現象において重要な役割を果たしている。しかしその重要性にも関わらず、遺伝子による直接制御を受けない「翻訳後修飾」であるため研究開発が遅れている。我々は、網羅的かつ定量的な糖鎖解析技術である「高密度レクチンアレイ法」を開発し、生体試料を簡単迅速に解析することを可能とした。本研究結果より、PD-L1上の糖鎖修飾が明らかとなれば、意図的に糖鎖修飾を認識する抗体、更には特定の糖鎖を持つ糖蛋白を標的とした低分子化合物・ペプチド治療薬開発への発展が期待される。将来的には、個々のPD-L1上の糖鎖を標的とした個別化医療へとつながり、学術的・社会的に大変意義の高い研究と考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, tumor tissues of each cancer type are used to isolate tumor cells using the laser microdissection (LMD) method, and glycosylation on PD-L1 expressed on tumor cells is analyzed by the high-density lectin array method. First, patient tumor tissues (lung, stomach, colon, and pancreatic cancer) were prepared, and tumor cells of each cancer type were isolated by the LMD method. Next, the isolated tumor cells were immunoprecipitated with anti-PD-L1 antibody to isolate PD-L1 molecules. The isolated PD-L1 molecules were analyzed by high-density lectin array method, and it was found that the lectin structures that recognize carbohydrate chains differ depending on the cancer type. The same results were obtained by high-density lectin array analysis using tumor cell lines.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：免疫チェックポイント PD-L1 糖鎖構造 レクチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

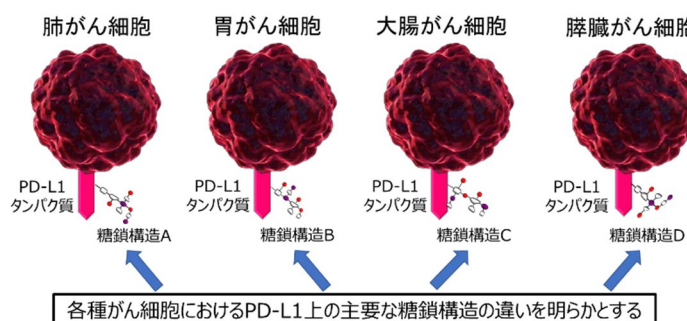
### 1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤(ICI)は、治癒切除できない固形がん患者も治癒する事が出来る優れた治療法である。しかしその効果が得られる患者は一部に限られる。このことはがん患者を治癒させる治療において、免疫チェックポイント分子は単独標的として十分であるが、一方でICIによるその阻害効果が十分でないために効果が得られない患者がいると考えられる。これは抗体医薬の抗原認識の限界であり、現在用いられている抗体は主に蛋白質を認識する抗体であり、翻訳後修飾を意図的に考慮したものは少ない。

近年のハイスpek的なゲノム解析により、人類のゲノムがほぼ解明されつつある。また臨床においては、ゲノム診断が保険診療にて可能となり一部の患者に福音をもたらした。このような時代背景から研究領域ではポストゲノム解析が盛んに行われ、蛋白質に翻訳される遺伝子の機能解析やnon-coding RNAの機能解析等多くの研究が行われている。我々はポストゲノム解析の中で特に翻訳後修飾に着目し、蛋白質の翻訳後修飾において一番多い糖鎖について研究を行う事とした。糖鎖修飾は、老化や疾患など種々の生命現象において重要な役割を果たしていることが知られている。しかしその重要性にも関わらず、遺伝子による直接制御を受けない「翻訳後修飾」であるため、PCR法による増幅や、リコンビナントの作成が難しく研究開発が遅れている。また、生体試料から糖鎖だけを精製する簡単で迅速な方法がないため、糖鎖の網羅的な解析はこれまであまり行われていない。申請者らは、網羅的かつ定量的で、しかもハイスループットな糖鎖解析技術である「高密度レクチンアレイ法」を開発し、生体試料を簡単迅速に解析することを可能とした。

### 2. 研究の目的

免疫チェックポイント阻害剤(ICI)は、がん治療に強いインパクトを与えた。一方、単剤における治療効果はがんの種類により異なり、治療効果が得られるがん種(肺がん・胃がん等)と得られないがん種(大腸がん・膵臓がん等)が判明している。また治療効果が得られるがん種においても効果が得られる患者と得られない患者が存在する。同じPD1/PD-L1の結合を阻害する治療薬においてなぜそのような違いがあるのか。申請者らはその原因の一つとして抗体医薬が認識できないPD-L1蛋白質の翻訳後修飾に着目した。翻訳後修飾で一番多いのが糖鎖修飾であり、PD-L1分子の糖鎖修飾はPD1との結合に重要であることが報告された(Lee HH. Cancer Cell. 2019;36(2):168-178)。しかし、PD-L1上の特定糖鎖についてこれまでに報告はなく、またがんの種類によるPD-L1上の糖鎖の違いについても報告はない。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のが現状である。申請者らは世界最先端の糖鎖解析ツール(高密度レクチンアレイ法)にアクセスできる研究グループであり、糖鎖解析を網羅的に簡便で迅速に行う事ができる。本研究では、この高密度レクチンアレイ法を用いて患者腫瘍組織におけるPDL1分子上の糖鎖修飾について網羅的解析を行い、がんの種類によるPD-L1分子上の主要な糖鎖修飾の相違を明らかにすることを目的とする(右図)。



### 3. 研究の方法

#### (1) 腫瘍組織におけるPD-L1分子の糖鎖修飾及びそれを認識するレクチンの探索

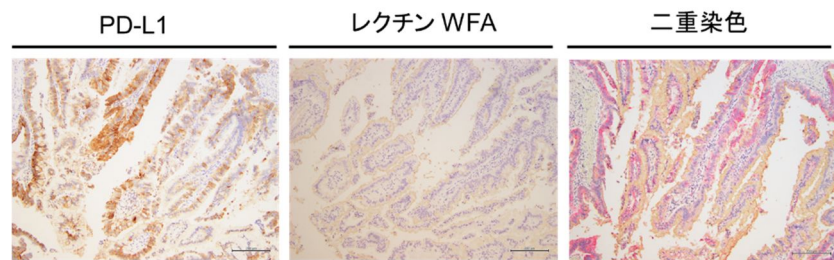
本研究では、各がん種の腫瘍組織を使用し、レーザーマイクロダイゼクション(LMD)法を用いて腫瘍細胞を分離して、腫瘍細胞に発現するPD-L1上の糖鎖修飾を高密度レクチンアレイ法にて解析する。

患者腫瘍組織(肺がん・胃がん・大腸がん・膵臓がん)を準備し、LMD法にて各がん種の腫瘍細胞を分離する。

分離した腫瘍細胞を抗PD-L1抗体を用いて免疫沈降し、PD-L1分子を分離する。

分離したPD-L1分子を高密度レクチンアレイ法にて解析を行い、PD-L1分子に発現の高い糖鎖を認識するレクチンを同定する。

同定したレクチン及び抗PD-L1抗体を用いて腫瘍組織の免疫染色を行う。これまでの膵臓がん腫瘍組織検体を用いた予備的実験では、抗PD-L1抗体とレクチン(WFA)を用いた二重染色を行うことに成功している(右図)。



本研究で行う高密度レクチンアレイ解析は、少量の検体で解析可能であるため研究遂行の可能性は高い。ただし万が一腫瘍組織からの検体量が足りない場合には、腫瘍細胞株(肺がん:A549, 胃がん:KATO-3, 大腸がん:SW480, 膵臓がん:MIAPaCa-2)を使用して解析する。

#### (2) PD-L1分子の糖鎖修飾による生物学的意義についての検討

PD-L1分子の糖鎖修飾がPD1との結合及びICIとの結合にどのように関わるのか解析する。

PD-L1分子の糖鎖修飾が異なる細胞株を用いて、PD1分子との結合解析を行う。

免疫チェックポイント阻害剤(アベルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ)及び免疫染色に用いられる抗体(22C3、28-8、SP142、SP263)を用いて細胞株との結合解析を行う。

特定した糖鎖を合成する遺伝子(糖転移酵素遺伝子)を強制発現させた細胞株を作製し、PD1分子及び免疫チェックポイント阻害剤との結合を解析する。さらにT細胞との共培養による生物学的活性についても解析を行う。

### 4. 研究成果

本研究では、各がん種の腫瘍組織を使用し、レーザーマイクロダイゼクション(LMD)法を用いて腫瘍細胞を分離して、腫瘍細胞に発現するPD-L1上の糖鎖修飾を高密度レクチンアレイ法にて解析した。まず患者腫瘍組織(肺がん・胃がん・大腸がん・膵臓がん)を準備し、LMD法にて各がん種の腫瘍細胞を分離した。次に、分離した腫瘍細胞を抗PD-L1抗体を用いて免疫沈降し、PD-L1分子を単離した。単離したPD-L1分子を高密度レクチンアレイ法にて解析を行い、がん種により糖鎖を認識するレクチン構造が異なる事が判明した。腫瘍細胞株を使用した高密度レクチンアレイ解析も行い同様の結果が得られた。本研究成果より、がん種毎のPD-L1上の糖鎖に違いがあることが見いだされ、現在有効性が証明できていないがん種(大腸がん、膵臓がん等)における治療開発の発展へと繋がる可能性がある。またICI投与患者においては、その有効性を判別するバイオマーカーの開発にも繋がる。更には特定の糖鎖を持つ糖蛋白を標的とした低分子化合物・ペプチド治療薬開発への発展が期待される。究極的には、個々のがん患者のPD-L1上の糖鎖を解析し、免疫チェックポイント阻害剤の使い分け(個別化医療)へと発展させたい。



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

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