

令和元年6月20日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10563

研究課題名(和文) 消化器癌に特異的な糖鎖暗号(sugar code)の解読

研究課題名(英文) Deciphering the specific sugar code of the gastro-intestinal cancer

研究代表者

橋本 真治(hashimoto, shinji)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：60624666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞の表面糖鎖は、癌化により変化が起こる。我々は複数のレクチンを用いて、正常部、癌部とで糖鎖修飾の違いが無いかを網羅的に解析することを目指した。標識した20種類のレクチンを用い、複数の消化器癌の手術検体の標本から組織アレイを作成し、網羅的なレクチン染色の結果、大腸癌ではUEA1レクチンが癌部で15/24陽性、非癌部で9/24と癌部で有意に反応性が高く、レクチンZにおいては、肺腺癌6/12例、大腸癌9/24例、胃癌16/24例、膵癌12/24例、胆管癌18/24例と腺癌と中心に高い陽性率を確認し、正常組織と比較した変化率では、膵癌及び、前癌病変であるIPMNで最も高い変化率を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はレクチン工学の技術を応用し、様々な標識レクチンを用いて直接染色することにより、消化器癌における網羅的な糖鎖変化を解析した研究である。我々の解析により、特に腺癌系で正常部と比較し、優位に癌部において反応性が上昇するレクチンが複数同定された。これらは、今後更に解析が進むと糖鎖プローブとして用いることで、これまで用いられてきた腫瘍マーカーに代わって有用な血清マーカーとなったり、特に膵臓癌などでは予後不良患者の割出にも有効となる可能性がある。また現在開発中である、レクチン薬剤複合体による癌治療の新たなターゲットとなる可能性もあり、今後、創薬や診断薬へ繋がることが期待される研究である。

研究成果の概要(英文)：Lectins are proteins that specifically recognize and bind glycans, helpful indication of glycosylation patterns. We performed histochemical staining by 20 types of lectins for cancer and normal tissues. Method: we used a panel of 20 types of lectins histochemical staining for various cancer and normal tissues. The staining patterns were firstly classified according to the ratio between cancer cells and stromal cells. The staining in cancer cell were compared with that of non cancerous pancreatic ductal epithelial cells. Result: Among 20 lectins, lectin Z showed cancer cell staining higher than normal tissue especially in pancreatic cancer. Pancreatic cancer cell 71% were positive for lectin Z, but normal pancreatic duct cells 4% were positive in patients of pancreatic cancer. Conclusion: Our result indicated that specific affinity of lectin Z would be a potential candidate of novel tumor in pancreatic cancer.

研究分野：癌の病態生理

キーワード：膵癌マーカー 糖鎖 レクチン 早期診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ジェノミクス解析、プロテオーム解析が網羅的に行なえるようになり、癌に対する診断的、治療的マーカーが積極的に探索されているが、期待程には有効な成果に繋がっていない。ここで注目すべきは蛋白質に対する糖鎖修飾である。全ての細胞表面のタンパク質はリボソームで合成された後、小胞体・ゴルジ体で糖鎖付加を受ける。従って、細胞表面は糖鎖で覆われており、細胞を攻撃する標的治療の候補は蛋白ではなく、実は糖鎖であるべきである。さらに、糖タンパク質の糖鎖レパートリー(グリコフォーム)は細胞の種類や、発生・分化プロセス等で異なるため、同じタンパク質であってもグリコフォームによって機能は大きく変化する。従って、癌の進展度、転移・再発を反映した糖鎖構造の把握と、これをキャリアーする最適なタンパク質の選別が治療マーカー選別の決め手となる。実際、肝細胞癌のタンパクマーカーである AFP の中でも AFP-L3 という LCA と呼ばれるレクチンで修飾された AFP が特に特異性の高い腫瘍マーカーとして利用されている。糖鎖解析を通じて新たな標的マーカーの模索、また薬剤開発が行われている。

糖鎖付加にはアスパラギン(Asn)側鎖のアミドの N 原子への付加:N-結合型グリコシル化と、セリン(Ser)とトレオニン(Thr)側鎖のヒドロキシ基の O 原子への付加:O-結合型グリコシル化の2つがある。糖鎖結合部位はこれら Asn, Ser, Thr の3箇所が主な部位だが、そこに結合しているオリゴ糖鎖の数は1から30以上までに変わり得るので、糖鎖付加は非常に多彩でいまままで捉えようの無いものであった。特に、O型糖鎖は蛋白質から外す事が技術的に困難で、効率的に糖鎖解析を出来ないままだった。

2005年に産総研のチームが世界に先駆けて開発した「レクチンマイクロアレイ」は糖鎖・糖タンパク質の解析を飛躍的に進歩させた独自の解析技術である。抗原に対する抗体の様に、糖鎖には特異的に結合するレクチンが明らかにされ、現在は48グループに分類される数千のレクチンが知られている。96種類のレクチンをアレイにプロットしてがん細胞や癌幹細胞などの蛋白抽出液をふりかけると、癌に特異的な糖鎖修飾パターン(グリコフォーム)が見えて来る。実際、様々な疾病に特異的な糖鎖発現を網羅的に解析する事を可能にして、既に大腸癌、肝内胆管癌の解析で一定の成果を上げ始めている。

<着想に至った経緯>

我々は、難治性癌の代表である膵癌、及びその癌幹細胞の研究を進めている。つくば国際総合特区の枠組みで産業技術総合研究所創薬基盤部門糖鎖工学チーム(以下、産総研)と共同研究を行っており、産総研が独自に開発した高密度レクチンマイクロアレイを用いた網羅的な糖鎖修飾解析が可能である。膵癌細胞株に発現する糖鎖の網羅的解析を行い、癌特異的に発現する糖鎖、及びそれに反応するレクチンAの特定に至った。レクチンAに毒素を結合させた薬剤レクチンを開発、担癌マウスに投与することで、抗腫瘍効果が得られることを確認した。96種類のレクチンが載ったレクチンアレイの解析で、レクチンA以外にも膵癌細胞株に特異的に表出しているレクチンを10程度選別した。レクチンアレイは糖鎖発現を網羅的に解析する強力なツールであるが、細胞を粉碎、蛋白抽出を行う手技であり、病理形態情報と糖鎖発現の対比は困難であった。

2. 研究の目的

細胞表面の蛋白質は様々な翻訳後修飾を受けて初めて各種細胞に適した機能を発揮する。同じ蛋白質であっても糖鎖修飾によって機能は大きく変化する。癌の進展度、転移・再発を反映した糖鎖構造は特徴的である。糖鎖にはN型とO型の2つがあるが、特に、O型糖鎖は蛋白質から外す事が困難で解析が技術的に困難であった。我々は最新のレクチンマイクロアレイを用いて膵癌に特異的なO型糖鎖を同定したが、各種消化器癌の形態情報と関連づけた癌糖鎖発現プロファイルは手付かずの研究分野である。本研究では消化器癌(食道、胃、大腸、肝臓、膵臓、胆道)における細胞表面の糖鎖修飾を、レクチン染色法を導入して病理組織形態、病期進展と対比のある形で包括的に把握する。組織アレイを作成する事で、複数のレクチンを用いた組織レクチン染色を行うことで、網羅的な糖鎖発現パターンを提示することを目指す。

3. 研究の方法

3-1. 対象検体

臨床検体は、2015年までに筑波大学附属病院で行われた手術症例を対象とした。五大癌、及び消化器外科が治療対象とする消化器癌を中心に臓器を選択した。各症例数は食道癌24例、胃癌24例、結腸癌12例、直腸癌12例、膵癌68例、IPMN24例、膵内分泌腫瘍24例、胆管癌24例、乳癌24例、肺腺癌12例、肺扁平上皮癌12例とした。研究開始にあたり、筑波大学附属病院臨床研究倫理審査の承認を得て検体利用とした。

3-2. 組織アレイブロックの作成

各症例について手術摘出検体の病理組織診を参考とし、筑波大学病理部に保存された病理組織を観察し、組織内の観察部位を設定した。癌部、非癌部を顕微鏡下にそれぞれ確認し、5mm大の対象部位をマーキングした。対応するパラフィンブロックを円柱状に切抜き1スポットとした。5mm大スポット12組織を1スライドに乗せ組織アレイブロックを作成、3µmに薄切し

観察スライドを作成した。

3-3. レクチン染色

O型糖鎖の短縮認識レクチン5種類、シアル酸修飾認識レクチン4種類、フコース修飾認識レクチン4種類、N型糖鎖の分岐異常認識レクチン1種類を使用した。レクチンの選択は、筑波大学消化器外科研究室で行った膵癌細胞株6種類を対象とした96種類のレクチンによる高密度レクチンアレイの結果を参考とした。膵癌細胞株と比較すると腺構造の形成に違いを認め、腺構造を有する細胞株がより臨床像に近い細胞株であると想定し、他の細胞株と比較し優位に発現を認めたレクチンを使用レクチンとした。また、これまでにO型糖鎖の短縮、シアル酸修飾、フコース修飾、N型糖鎖の分岐異常が癌細胞に特徴的な糖鎖変化であることが報告されている。既報により報告されたレクチンに加え、計14種類のレクチンを染色に用いた。本実験で用いたレクチン以外の代表的なレクチンは、小症例の染色結果により組織内が全体に強く反応するか、全く反応性を示さなかったため、全症例での染色には使用しなかった。また、同一組織内での反応性は違いを示さないことが多く、染色割合に関しては糖鎖発現解析に有用ではないため結果の評価には含めなかった。使用したレクチンは、産業総合研究所にてHRPを結合したものを利用した。

レクチン染色方法は以下の通りに行った。脱パラフィン処理を加えたスライドを10mM Citrate-Na buffer (pH6.0) に浸透後、オートクレーブ(121℃, 20min) で抗原の賦活化を行い、15分間3%過酸化水素にて内因性ペルオキシダーゼブロックを行った。1%BSAに10分浸透させブロッキングを行った。1次抗体は、PBSで1µg/mlに希釈したレクチンを使用し、反応条件は室温1時間で反応させた。レクチン濃度、及び反応時間については染色結果に応じて調整を行い検討した。希釈濃度では相関性が得られたが、反応時間では相関が得られず、最終的な評価は上記記載の条件での染色結果とした。ヒストファイン DAB 基質キット (Nichirei, cat#425011, 日本) で発色させた後にヘマトキシリン染色を行った。

3-4. 染色結果の評価、判定

染色結果について、各検体における癌組織、及び対応する正常構造を評価対象とした。膵臓については、膵癌に対応する正常組織は膵管上皮であり、他の組織型については評価より除外し検討した。癌組織では、管腔構造を呈する癌細胞を対象とし、周囲間質組織は対象より除外した。また、正常組織では正常膵管を対象とし、aciner cell は評価より除外した。各症例において顕微鏡 (KEYENCE BZ-9000®, 大阪) を使用し、200倍視野の組織学的所見で、対象組織を手動で抽出した。1切片あたり5カ所を抽出した。染色の有無により+、-での判定とした。また、同一症例において正常組織と比較し、癌で染色強度の増強が得られた症例を変化率ありと評価した。染色強度の強弱は各染色において認めたが、各レクチンの染色方法における条件の均一化に伴い生じることも考慮し、分類は行わず反応性の有無のみでの評価とした。

3-5. 染色強度の違いによる生存曲線解析

膵癌における lectinZ の染色結果を用いて、臨床所見との検討を行った。術後生存期間について、染色陽性群、陰性群の2群間での比較検討を行った。統計解析は GraphPad Prism を用いて行った。

4. 研究成果

4-1 膵癌におけるレクチン染色結果

1、O型糖鎖の短縮認識レクチン染色結果

WFA、レクチンZ、BPL、SSA、PNAを用いて染色を行った。癌部の各染色陽性率は、WFA22/24、レクチンZ15/24、BPL22/24、SSA24/24、PNA15/24であった。正常組織の陽性率と比較した変化率では、レクチンZが50%と高く、他レクチンについては20%以下であった。各染色では、SSAは組織全体が染色された。WFA、レクチンZ、BPL、PNAについては、間質と癌組織にコントラストを示した。

2、シアル酸修飾認識レクチン染色結果

ACG、SNA、ADA、PSL1aを用いて染色を行った。癌部の各染色陽性率は、ACG(7/24)、SNA(16/24)、ADA(19/24)、PSL1a(9/24)であった。正常組織の陽性率と比較した変化率では、いずれのレクチン染色においても20%以下であった。各染色では、間質と癌組織にコントラストを示した。

3、フコース修飾認識レクチン染色結果

BC2LCN、TJAI、UEAI、AALを用いて染色を行った。癌部の各染色陽性率は、BC2LCN 23/24、

TJAI 24/24、UEAI19/24、AAL25/25 と多くの症例で陽性を示した。正常組織の陽性率と比較した変化率では、ほとんどの症例で認めなかった。各染色では、AAL が癌部、間質ともに陽性を示したが、他レクチンについては癌部、間質でのコントラストを認めた。

4、N 型糖鎖の分岐異常認識レクチン染色結果

癌部の各染色陽性率は PHA-L 24/24。正常組織との陽性率は変化を認めなかった。正常、癌部ともに強陽性を認めたが、間質は染色陰性であった。

膵癌組織に対する各レクチン染色では、ある一定の陽性率を示すものの、正常組織との陽性変化率は 20%以下であった。しかし、O 型糖鎖の短縮認識レクチンである lectin Z において、正常から癌細胞への陽性変化率が 50%と高い変化率を認めた。この lectin Z に対する検討を進めるため、膵癌症例を 44 症例追加し検討した。追加した 44 症例を加えた 68 症例においても同様に 50%の症例で正常部で陰性、癌部で陽性となることを確認した。さらに lectin Z の陽性、陰性の 2 群間で術後の生存期間について評価し、lectin Z 陽性症例において、生存期間の短縮 (P=0.0448)を認め、予後予測因子となりうる可能性が示唆された。

4-2 多臓器組織におけるレクチン染色結果

特徴的な染色結果として、大腸における lectin Y 染色で、癌部の陽性率 15/24、正常組織での陽性率 9/24 と癌部での高い陽性率を示した。また、同一糖鎖を認識するとされるレクチンでも、組織反応性が異なることが示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Yusuke Ozawa, Tatsuya Oda, Osamu Shimomura, Shinji Hashimoto, Hiroaki Tateno, Jun Hirabayashi, Nobuhiro Ohkohchi:Pancreatic cancer specific glycosylation survey by a panel of lectin staining; Tn antigen exposure as a result of o-glycan truncation. 米国癌学会 (AACR), 2017

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：小田 竜也
ローマ字氏名：Tatsuya Oda
所属研究機関名：筑波大学
部局名：医学医療系
職名：教授
研究者番号(8桁)：20282353

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：館野 浩章
ローマ字氏名：Tateno Hiroaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。