

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19471

研究課題名（和文）シングルセルグライコムクスによる膵がん幹細胞糖鎖マーカーの探索

研究課題名（英文）Discovery of glycan markers of pancreatic cancer stem cells by single-cell glycomics

研究代表者

舘野 浩章 (Tateno, Hiroaki)

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

研究者番号：30450670

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）：ドロップレット技術をscGR-seqに導入することで、1万個の単一細胞を一斉解析する技術を構築し、論文発表した。構築したドロップレット型scGR-seqを用いて膵癌オルガノイド、及び膵癌患者検体(n=6)の解析を行った。個々の細胞型分類を行うとともに、それぞれの細胞型ごとの糖鎖プロファイルを取得した。そして膵癌サブタイプのBasalからClassicalに移行する過程における糖鎖プロファイル変化を解析した。さらに各細胞型の糖鎖遺伝子やヒトレクチン受容体遺伝子の発現情報を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の5年生存率は未だ10%未満であり、新たな治療診断技術の開発が世界中で切望されている。本研究ではまずドロップレット技術を導入することで、1細胞ごとの糖鎖と遺伝子の発現情報、1万個分を一斉取得するための技術、ドロップレット型scGR-seqを開発した。そして本技術を用いて膵癌患者腫瘍組織を解析することで、膵癌患者腫瘍組織中に存在する癌サブタイプ（Basal, Intermediate, Classical）、間質細胞、免疫細胞などの糖鎖プロファイルを一斉取得した。得られたデータを用いることで、膵癌の新たな創薬標的の同定が可能となり、標的医薬品や早期診断技術の開発への展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：By introducing droplet technology into scGR-seq, we constructed a technology for simultaneous analysis of 10,000 single cells and published a paper (Keisham et al. Small Methods 2024). We then analyzed pancreatic cancer cell lines and normal pancreatic duct cells, and compared the obtained data with those obtained by flow cytometry. The results showed that the data obtained by scGR-seq correlated well with those obtained by flow cytometry. The constructed droplet scGR-seq was used to analyze pancreatic cancer organoids and pancreatic cancer patient samples (n=6). Individual cell type classification was performed, and glycan profiles were obtained for each cell type. The changes in glycan profiles of pancreatic cancer subtypes during the transition from Basal to Classical were analyzed. In addition, we obtained information on the expression of glycogenes and human lectin receptor genes in each cell type.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：シングルセルグライコムクス 膵癌 糖鎖マーカー

※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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

膵癌は難治性癌の代表であり、5年生存率は依然として癌の中で最低の10%未満である。現在臨床で使用されている膵癌治療薬の効果も限定的であり、抗癌剤で治療しても尚、治療抵抗性の膵癌幹細胞が残存し、再増殖してしまうことが課題となっている。

糖鎖は全ての細胞の最外層を覆い、その構造はがん化などの細胞の状態に応じて変化する。そのため細胞表面糖鎖は新たな治療標的として期待されている。最近申請者らは DNA バーコードを導入した複数の糖鎖結合タンパク質（レクチン）を用いることで、個々の細胞に発現する糖鎖と RNA を同時計測する世界初の技術（scGR-seq）を開発した（Minoshima, Tateno（責任著者） et al. iScience 2021）。

2. 研究の目的

本研究では scGR-seq を用いて患者由来膵がん腫瘍組織を解析することで、膵がん腫瘍組織を構成する個々の細胞に発現する糖鎖と RNA の情報を取得するとともに、膵がん幹細胞に発現する糖鎖マーカーを同定する。

3. 研究の方法

本研究計画では多様な細胞で構成される膵がん腫瘍組織を、申請者らが独自に開発した 1 細胞糖鎖・RNA 同時解析法（scGR-seq）で解析することで、がん幹細胞の新たな糖鎖マーカーを探索する。研究の進め方は以下の通りである。

1. 下村（筑波大消化器外科）が膵がん患者もしくは患者由来膵がん移植マウスより腫瘍組織及び正常組織を採取する。
2. 舘野（産総研）が膵がん腫瘍組織を scGR-seq で解析する。
3. 尾崎（筑波大バイオインフォ）が scGR-seq のデータ解析を行い、個々の細胞の糖鎖と遺伝子の発現情報を取得する。そして膵がん幹細胞で高発現している糖鎖エピトープとそれに反応するレクチンを探索する。
4. 舘野（産総研）がフローサイトメトリー、免疫染色、ウェスタンブロットを用いて糖鎖マーカー候補を検証する。

4. 研究成果

(1) ドロップレット型 scGR-seq 法の開発: 今回、ドロップレット技術を導入した scGR-seq 法を考案し、1 細胞ごとの糖鎖と RNA の発現データ、約 1 万個分を 1 回の実験で取得するドロップレット型 scGR-seq 法を開発した（図 1）。さまざまな糖結合特異性を有する 30 種のレクチンを選抜し、それぞれに固有の短い塩

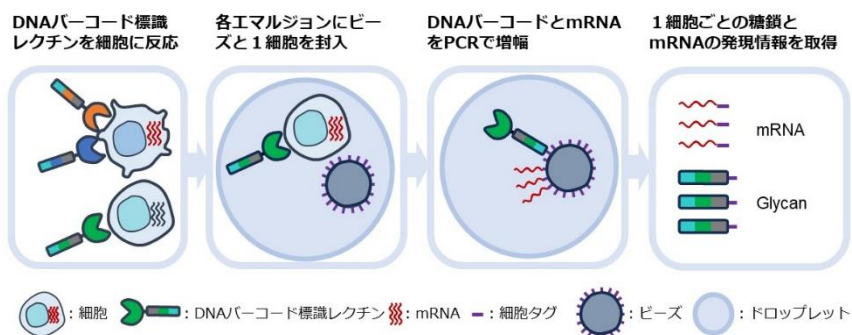


図1 ドロップレット型 1 細胞糖鎖・RNA シーケンス法 (scGR-seq) の流れ

基配列の目印（DNA バーコード）を結合させた DNA バーコード標識レクチンを作製した。そしてドロップレット技術を用いて、マイクロ流路により 1 個のエマルジョンに 1 個の細胞と 1 個のビーズを封入した。ビーズには異なる DNA バーコードが細胞の目印（細胞タグ）として含まれており、それぞれの細胞で得られる情報を識別できるようにしてある。細胞タグには、レクチンに修飾されている DNA バーコードと mRNA に結合する塩基配列が含まれています。細胞タグが結合した DNA バーコードと mRNA の情報を PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）で増幅することで、1 個の細胞に結合したレクチンの種類と相対分子数、および mRNA を次世代シーケンサーで解析した。これにより 1 細胞ごとの糖鎖と遺伝子の発現情報を同時に取得した。

(2) ドロップレット型 scGR-seq 法による末梢血単核細胞の解析：

本技術を用いてヒト血液中の末梢血単核細胞、約 1 万個の 1 細胞ごとの糖鎖と RNA の発現を解析した。得られた 1 細胞ごとの糖鎖と RNA の統合データ（最終的に約 8000 細胞分のデータ）を用いて UMAP（Uniform Manifold Approximation and Projection）と呼ばれる統計解析手法を用いて細胞を分類した結果、リンパ球系と骨髄系で二つの大きなクラスターに分類されることがわかった。すなわち、リンパ球系と骨髄系で大きく糖鎖と RNA の発現が異なっていることを示

している。さらに糖鎖と RNA の二つのオミクス情報を用いることで、T 細胞 (CD4⁺T, CD8⁺T)、メモリー B 細胞、単球 (古典的、中間、非古典的)、樹状細胞 (DC, pDC)、血小板など、細胞型ごとに細胞を明確に分類できました。糖鎖の情報を加えることにより、RNA 情報だけでは同定できなかった、血液中にわずかしかな含まれない希少な細胞である pDC (形質細胞様樹状細胞) を識別することができた。さらに 1 細胞ごとの糖鎖プロファイル (レクチンの反応パターン) を解析すると、細胞型ごとに異なっていることがわかった。すなわち、それぞれの細胞型は異なる糖鎖を発現していることを示している。さらに同じ細胞型内でも、1 細胞ごとに糖鎖プロファイルの多様性があることがわかった。

それぞれの細胞型に特異的に反応するレクチンを探索しました (図 3)。TJAI II と呼ばれる $\alpha 1,2$ フコース特異的レクチンは、他の細胞型と比べて血小板に強く反応しました。細胞を解析するための一般的な手法であるフローサイトメトリー法でも同様の結果が得られました。TJAI II が血小板上のどのような糖タンパク質に反応しているのかについて調べたところ、GPIb α という血小板特異的な糖タンパク質に強く反応することがわかりました。GPIb α は障害を受けた血管壁に集積したフォンビルブランド因子 (vWF) と結合することで血液凝固を引き起こすことが知られています。血小板上の $\alpha 1,2$ フコースをフコシダーゼと呼ばれる糖加水分解酵素で除去すると、血小板の vWF への反応性が増強されました (図 3 B)。すなわち血小板上の $\alpha 1,2$ フコースは血液凝固において重要な役割をもつことが示唆されました。

(3) ドロップレット型 scGR-seq 法による膵癌患者腫瘍組織の解析

ドロップレット型 scGR-seq 法を用いて膵癌患者腫瘍組織 (n=5) を解析した。得られた糖鎖と遺伝子発現の統合データを UMAP で解析して細胞型を分類したところ、癌細胞、間質細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、各種免疫細胞が検出された (図 4)。膵癌細胞は患者ごとに大きく 3 つの異なるクラスターに分類された。このことは患者ごとで癌細胞の性質が異なることを示している。さらに各癌細胞は 3 種の癌サブタイプ (Classical, Intermediate, Basal) を分類できることがわかった。それぞれの細胞型ごとの糖鎖プロファイル (レクチンの反応パターン) を明らかにしたとともに、癌サブタイプの特徴的な糖鎖プロファイルを明らかにした。さらに Classical から Basal に転換する過程における糖鎖プロファイル変化を解明した。糖鎖遺伝子発現の変化も解析し、他の細胞型には存在せず、癌サブタイプにのみ発現する糖鎖マーカーの同定に成功した。

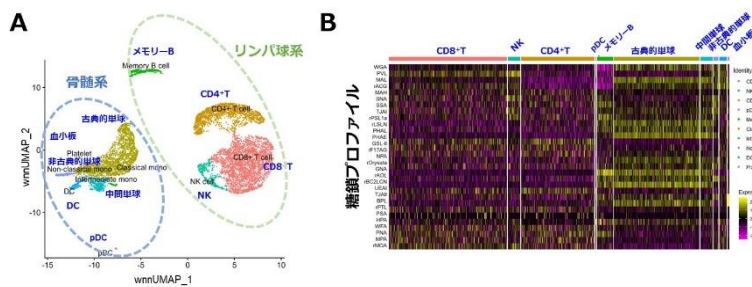


図 2 末梢血単核細胞の解析。A: 糖鎖と RNA の統合データによる細胞の分類。B: 1 細胞ごとの糖鎖プロファイル (レクチンの反応性) のヒートマップ図。黄: 強い反応性、黒: 中間の反応性、紫: 弱い反応性。

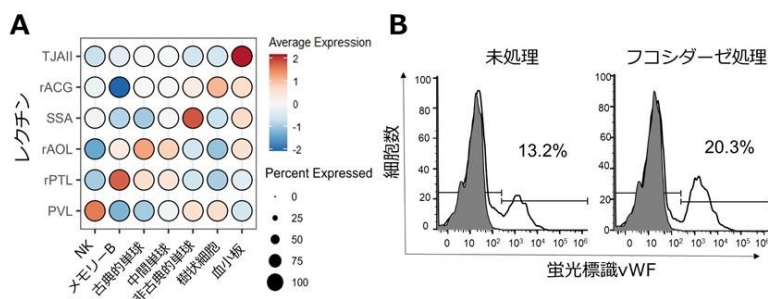


図 3 細胞型ごとに特異的に反応するレクチンの同定と機能解析。A: 各細胞型に強く反応するレクチンの同定。赤: 強い反応性、白: 中間の反応性、青: 弱い反応性。B: フコシダーゼ処理、未処理の血小板への vWF の反応性。

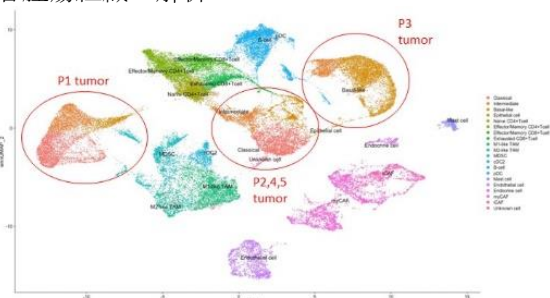


図 4 膵癌患者腫瘍組織の糖鎖と RNA の統合データによる UMAP 解析

Droplet-Based Glycan and RNA Sequencing for Profiling the Distinct Cellular Glyco-States in Single Cells. Keisham S, Saito S, Kowashi S, Tateno H.
Small Methods. 2024 May;8(5):e2301338. doi: 10.1002/smt.202301338.

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 0件）

1. 著者名 Keisham Sunanda, Saito Sayoko, Kowashi Satori, Tateno Hiroaki	4. 巻 8
2. 論文標題 DropIet - Based Glycan and RNA Sequencing for Profiling the Distinct Cellular Glyco - States in Single Cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Small Methods	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/smtd.202301338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 —

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 5件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 館野浩章
2. 発表標題 シングルセルグライコミクスによる糖鎖研究の加速
3. 学会等名 第16回東北糖鎖研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 館野浩章
2. 発表標題 Integrated analysis of glycan and RNA in single cells
3. 学会等名 Sialoglyco2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 館野浩章
2. 発表標題 早期睪癌の診断を実現する新規糖タンパク質マーカーの開発
3. 学会等名 第41回日本糖質学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 館野浩章
2. 発表標題 シングルセルグライコミクスを実現する新技術scGR-seqの開発
3. 学会等名 第19回日本糖鎖科学コンソーシアム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 館野浩章
2. 発表標題 創薬/再生医療に貢献するシングルセル糖鎖解析技術の開発
3. 学会等名 2022年度東日本スク립ス会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 館野浩章
2. 発表標題 シングルセルグライコミクスによる創薬・再生医療の加速
3. 学会等名 発酵と代謝研究会（招待講演）
4. 発表年 2022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
研究 分 担 者	下村 治	筑波大学・医学医療系・講師	
	(Shiomomura Osamu)		
	(60808070)	(12102)	

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