

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14955

研究課題名(和文)新規抗糖鎖抗体を用いたがん悪性化における糖鎖の機能解明と糖鎖バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Novel anti-carbohydrate antibodies reveal the role of glycans in tumor malignancy and their use as tumor biomarkers

研究代表者

川島 博人 (Kawashima, Hiroto)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：50260336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：独自に樹立した抗糖鎖抗体のがんバイオマーカーとしての有用性を検証するとともに、がん転移における糖鎖の機能を解明することを目的として、以下の研究を行った。はじめに、抗糖鎖抗体を用いた組織学的検討の結果、大腸がん組織において90%以上の高頻度でF2抗体反応性のシアリルルイスX糖鎖抗原が発現することを見出した。そこで、シアリルルイスXを効率よく検出する糖鎖バイオマーカー検出系の樹立を行うとともに、シアリルルイスXを過剰発現するマウス大腸がん細胞株を樹立し、同糖鎖抗原のがん転移における機能解明を行った。本研究の成果は、がんの早期診断・早期治療に寄与することが期待される。

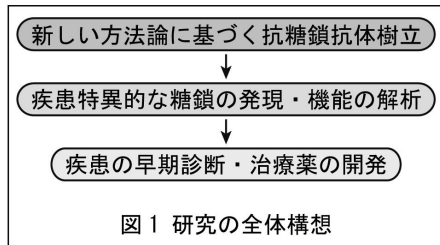
研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the possibility of our newly generated anti-carbohydrate antibodies as tumor biomarkers as well as the function of glycans in tumor metastasis. We first performed immunohistochemical analysis and found that F2 antibody-reactive sialyl Lewis X carbohydrate antigen is expressed in more than 90% of the colon carcinoma tissues. We also established an assay system to efficiently detect a carbohydrate biomarker, sialyl Lewis X, and determined the function of this carbohydrate antigen in tumor metastasis. It is expected that the results of the present study should be useful for the early diagnosis and treatment of tumors.

研究分野：免疫学、生化学

キーワード：抗糖鎖抗体 シアリルルイスX 大腸がん がん転移 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

我々は、独自に開発した新しい方法論に基づいて様々な新規抗糖鎖抗体を樹立し、種々の疾患における糖鎖発現とその病理学的機能を解明し、疾患の早期診断および新規治療薬の開発に寄与することを全体構想として研究を推進している(図1)。



2. 研究の目的

本研究では、独自に樹立した抗フコシル化糖鎖抗体 F2 および抗硫酸化糖鎖抗体 S1 の併用により、糖鎖のがんバイオマーカーとしての有用性を検討するとともに、がん転移における糖鎖の機能を解明し、がんの早期診断・早期治療に向けた分子基盤を整備することを目的とする。具体的には、独自に樹立した抗糖鎖抗体 F2 および S1 を用いて、ヒト大腸がん細胞株およびヒト大腸がん組織における糖鎖抗原の発現を解明するとともに、がん関連糖鎖バイオマーカーの検出系を樹立する。さらにがん関連糖鎖抗原を過剰発現するマウスがん細胞株を糖転移酵素遺伝子の導入により樹立し、親株との比較により同糖鎖抗原の転移等のがん悪性形質発現との関連を解明する。

3. 研究の方法

(1) ヒト大腸がん細胞株における糖鎖発現の解析

ヒト大腸がん細胞株 (LS-174T, HT-29, HCT-116) を、抗フコシル化糖鎖抗体 F2 (mouse IgG₁) もしくは抗硫酸化糖鎖抗体 S1 (mouse IgM)、および蛍光標識 2 次抗体と反応させ、フローサイトメトリーにより糖鎖発現の解析を行った。

(2) ヒトがん組織の免疫染色

F2 抗体および S1 抗体を用いて、常法に従ってヒト大腸がん組織のパラフィン切片の免疫組織染色を行った。染色強度に応じて、0~3 に分類し、グラフに表示した。

(3) 大腸がん細胞の培養上清を用いた糖鎖バイオマーカーの検出系の樹立

シアリルルイス X 糖鎖抗原を発現する大腸がん細胞株 LS-174T の培養上清を用いて、2 種類の抗糖鎖抗体 F1 および F2 を利用したサンドイッチ ELISA 法による糖鎖バイオマーカー検出系の樹立を行った。

(4) マウスがん細胞への糖転移酵素遺伝子の導入と転移実験

病理組織染色の結果に基づいて、大腸がんの発症に伴って発現することの確認されたシアリルルイス X 糖鎖抗原の合成に与

るフコース転移酵素遺伝子を、BALB/c マウス由来大腸がん細胞株 CT26 に導入し、安定発現株を得た。同細胞株および親株を同系マウスの脾臓内に移植し、3 週間後に肝臓に形成される転移巣の比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト大腸がん細胞株における糖鎖発現の解析

3 種類の大腸がん細胞株 LS-174T、HT-29、HCT-116 を用いて、シアリルルイス X 糖鎖特異的な F2 抗体および 6-スルホシアリル LacNAc 特異的な S1 抗体を用いたフローサイトメトリー解析を行った。各抗体の認識糖鎖の構造は、図2に示す。その結果、F2 抗体は LS-174T、HT-29 と結合し、S1 抗体は HT-29、HCT-116 と結合することが分かった(表1)。

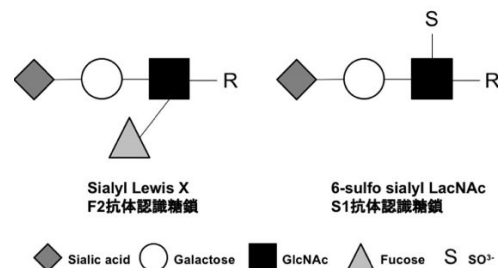


図2 F2 抗体および S1 抗体の認識糖鎖の構造

Cell line	Stage	F2 抗体反応性	S1 抗体反応性
LS-174T	2	+	-
HT-29	3	+	+
HCT-116	4	-	+

表1 ヒト大腸がん細胞の抗糖鎖抗体との反応性

(2) ヒトがん組織の免疫染色

ヒト大腸がん臨床サンプル 40 検体およびヒト正常大腸組織 8 検体を用いて、F2 抗体と S1 抗体による免疫組織染色を行った。その結果、正常組織では全く染色されないか弱い染色しか認められなかったが、各ステージの大腸がん組織 40 検体のうち 38 検体が F2 抗体により染色された(図3)。S1 抗体は大腸がんにおける陽性率は 50% 程度であったが、F2 抗体で全く染色されなかった大腸がん 2 検体はいずれも S1 抗体で染色された。以上から、F2 抗体の認識するシアリルルイス X 糖鎖抗原は大腸がんを高頻度で検出できることが分かった。

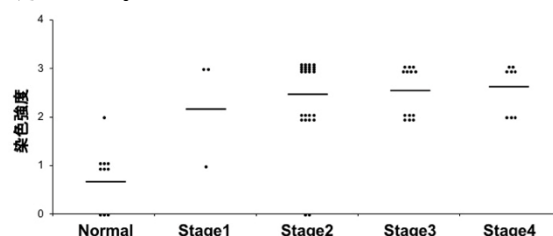


図3 F2 抗体による大腸がん組織の染色強度

(3) 大腸がん細胞の培養上清を用いた糖鎖バイオマーカーの検出系の樹立

大腸がん組織において 90% 以上の高頻度で F2 抗体反応性のシアリルルイス X の発現が認められたことから、F2 抗体は腫瘍マーカーとして有用である可能性が考えられた。そこで、F2 抗体および当研究室で樹立したもう一つの抗シアリルルイス X 抗体 F1 を用いたサンドイッチ ELISA 法により、大腸がん細胞 LS-174T の培養上清中のシアリルルイス X を検出する系の確立を試みた。その結果、濃度依存的な反応が認められた (図 4)。以上より、二種類の抗シアリルルイス X 抗体を用いた糖鎖バイオマーカーの検出系が確立した。このサンドイッチ ELISA の系は簡便かつ高感度であることから、臨床検体に適用することが可能であると考えられる。

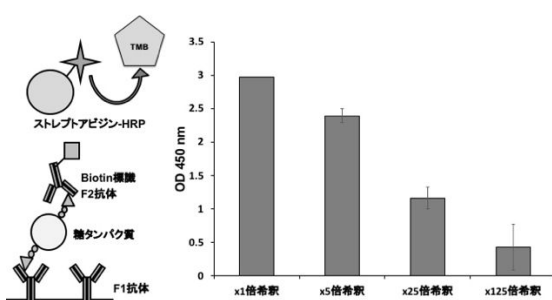


図4 サンドイッチ ELISA 法による LS174T 細胞培養上清中のシアリルルイス X の検出

(4) マウスがん細胞への糖転移酵素遺伝子の導入と転移実験

マウス大腸がん細胞株 CT26 の親株 (CT26-WT) およびシアリルルイス X 強制発現株 (CT26-F7) をマウスに脾内投与して、門脈経路で肝臓に形成される転移巣を観察した。その結果、CT26-F7 において CT-26-WT よりも転移巣が縮小することを見出した。CT26-F7 で発現するシアリルルイス X 糖鎖抗原は、セレクチンのリガンドとなりがん細胞の転移に有利に働くと考えられてきたが、この実験結果は予想に反する結果であった。そこで、細胞の増殖性等に影響する可能性を考慮して CT26-WT および CT26-F7 の培養シャーレ内における増殖試験を行ったところ、両細胞株で増殖性に有意な差は認められなかった。以上より、生体内にはシアリルルイス X 糖鎖発現細胞の転移もしくは増殖を制御する機構が備わっている可能性が示唆された。この糖鎖抗原が大腸がん組織で高発現することの意義については、今後さらなる研究が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Uchida T, Ueta H, Xu XD, Hirakawa J, Tahara

K, Zhou S, Sawanobori Y, Simmons S, Kitazawa Y, Kawashima H, Matsuno K. Rapid immunosurveillance by recirculating lymphocytes in the rat intestine: critical role of unsulfated sialyl-Lewis X on high endothelial venules of the Peyer's patches. *Int. Immunol.*, 30:23-33, 2018. doi: 10.1093/intimm/dxx072.

2. Low S, Hirakawa J, Hoshino H, Uchimura K, Kawashima H and Kobayashi M. Role of MAdCAM-1-expressing high endothelial venule-like vessels in colitis induced in mice lacking sulfotransferases catalyzing L-selectin ligand biosynthesis. *J. Histochem. Cytochem.*, 1:22155417753363, 2018. doi: 10.1369/0022155417753363.

3. Low S, Sakai Y., Hoshino H, Hirokawa M, Kawashima H, Higuchi K, Imamura Y and Kobayashi M. High endothelial venule-like vessels and lymphocyte recruitment in diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. *Pathology*, 48:666-674, 2016.

4. Tsuboi K, Nishitani M, Takakura A, Imai Y, Komatsu M and Kawashima H. Autophagy protects against colitis by the maintenance of normal gut microflora and secretion of mucus. *J. Biol. Chem.*, 290:20511-20526, 2015.

5. Matsumura R, Hirakawa J, Sato K, Ikeda T, Nagai M, Fukuda M, Imai Y and Kawashima H. Novel antibodies reactive with sialyl Lewis X in both humans and mice define its critical role in leukocyte trafficking and contact hypersensitivity responses. *J. Biol. Chem.*, 290:15313-15326, 2015.

[学会発表] (計 23 件)

1. 佐藤裕之、松浦寛明、小林純子、榎谷内晶、成松久、Kay-Hooi Khoo、川島博人 フコシル化糖鎖 sialyl Lewis X の新規生合成経路の解析 日本薬学会第 138 年会、2018.3.25-28、金沢

2. 竹添智宏、松村龍志、関根成隆、平川城太郎、川島博人 マウス B 細胞におけるフコシル化糖鎖抗原シアリルルイス X の発現解析 日本薬学会第 138 年会、2018.3.25-28、金沢

3. 川島博人 リンパ球ホーミングにおける硫酸化糖鎖の機能解明 糖鎖免疫研究会 Glyco-immunology 2018、2018.2.19、東京

4. 佐藤裕之、松浦寛明、小林純子、榎谷内晶、成松久、Kay-Hooi Khoo、川島博人 マウス卵管における sialyl Lewis X 生合成経路の解析 グローバルプロミネント研究基幹シンポジウム (若手研究者によるポスタープレゼンテーション) 2017.11.7、千葉

5. 泉水友洋、岩崎藍花、大八木真浩、山崎郁弥、平川城太郎、川島博人 中枢神経系における硫酸化糖鎖の発現解析 グローバルプロミネント研究基幹シンポジウム (若手研究者によるポスタープレゼンテーション) 2017.11.7、千葉

6. 竹添智宏、松村龍志、関根成隆、平川城太

朗、川島博人 マウス B 細胞におけるフコシル化糖鎖抗原シアリルルイス X の発現解析 グローバルプロミネント研究基幹シンポジウム (若手研究者によるポスタープレゼンテーション) 2017.11.7, 千葉

7. 佐藤裕之、松浦寛明、小林純子、梶谷内晶、成松久、Kay-Hooi Khoo、川島博人 マウス卵管におけるフコシル化糖鎖 sialyl Lewis X の生合成経路の解析 第 61 回日本薬学会関東支部大会、2017.9.16、東京 優秀発表賞受賞

8. 竹添智宏、松村龍志、関根成隆、平川城太郎、川島博人 マウス B 細胞におけるフコシル化糖鎖抗原シアリルルイス X の発現解析 第 61 回日本薬学会関東支部大会、2017.9.16、東京

9. Matsumura R, Hirakawa J, Fukuda M, Imai Y and Kawashima H. Detection and functional characterization of sialyl Lewis X antigen in mice using novel anti-carbohydrate monoclonal antibodies. 24th International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO XXIV), 2017.8.27-9.1, Jeju Island, Korea.

10. Hirakawa J and Kawashima H. Inhibition of allergic rhinitis by anti-sulfated-glycan monoclonal antibodies. 24th International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO XXIV), 2017.8.27-9.1, Jeju Island, Korea.

11. 平川城太郎、川島博人 抗糖鎖モノクローナル抗体によるアレルギー性免疫応答の抑制 第 36 回日本糖質学会年会、2017.7.19-21、旭川

12. 佐藤裕之、松浦寛明、小林純子、梶谷内晶、成松久、Kay-Hooi Khoo、川島博人 マウス卵管におけるフコシル化糖鎖 sialyl Lewis X の生合成経路の解析 第 36 回日本糖質学会年会、2017.7.19-21、旭川

13. 高屋明子、山崎禪、Christian Manne、川島博人、常世田好司、山本友子 サルモネラ菌体外成分による骨髄内 IgG プラズマ細胞障害 第 90 回日本細菌学会総会、2017.3.19-3.21、仙台

14. 川島博人 硫酸化糖鎖の機能阻害に基づくアレルギー応答の制御 糖鎖免疫研究会 Glyco-immunology 2017、2017.1.26、東京

15. 川島博人 抗糖鎖抗体の開発と利用 順天堂大学難病の診断と治療研究センター糖鎖創薬研究室開設記念シンポジウム「糖鎖創薬：臨床からの期待」、2016.11.17、東京

16. 川島博人 硫酸化糖鎖の機能阻害に基づくアレルギー応答の制御 第 60 回日本薬学会関東支部大会、2016.9.17、東京

17. 川島博人 リンパ球ホーミングにおける硫酸化糖鎖の役割 再生システムと疾患・癌 エピゲノム公開シンポジウム、2016.9.16

18. Kawashima H. Detection and functional characterization of sialyl Lewis X antigen in mice using novel anti-carbohydrate monoclonal antibodies. 6th Charles Warren Workshop 2016, 2016.8.24-26, Sapporo

19. Kawashima H. Role of sulfated glycans in lymphocyte homing to nasal-associated lymphoid tissues and allergic immune responses. Glycoscience Japan-The Netherlands Joint Seminar 2016 “Glycobiology in health and disease”, 2016.4.20, Leiden, the Netherlands

20. 平川城太郎、今井康之、川島博人 リンパ球ホーミング阻害に基づくアレルギー性鼻炎抑制、日本薬学会第 136 年会、2016.3.27、横浜

21. 平川城太郎、今井康之、川島博人 抗糖鎖抗体 S2 は鼻咽頭関連リンパ組織へのリンパ球ホーミングを阻害しアレルギー性鼻炎を抑制する 第 34 回日本糖質学会年会、2015.7.31, 東京

22. 川島博人 マウスシアリルルイス X 糖鎖と結合性を持つ新規モノクローナル抗体の開発とその応用 糖鎖免疫研究会 Glyco-immunology 2015、2015.8.19, 東京

23. 川島博人 マウスシアリルルイス X 糖鎖と結合性を持つ新規モノクローナル抗体の開発とその応用 第 34 回日本糖質学会年会、2015.7.31, 東京

〔図書〕(計 1 件)

1. 川島博人 (分担執筆) 第 2 章 糖鎖と生命 第 7 節 リンパ球ホーミング 糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック-創薬・医療から食品開発まで (株式会社 エヌ・ティー・エス (NTS); 秋吉一成監修、津本浩平編集委員長、加藤晃一、鷹羽武史、深瀬浩一、古川鋼一編集委員; ISBN978-4-86043-409-0) pp. 136-139 (2015)

〔産業財産権〕
該当なし。

〔その他〕
ホームページ
<http://www.p.chiba-u.jp/lab/bisei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 博人 (KAWASHIMA, Hiroto)
千葉大学大学院薬学研究院・教授
研究者番号：50260336

(2) 連携研究者

平岡 伸介 (HIRAOKA, Nobuyoshi)
国立がん研究センター・ユニット長
研究者番号：40276217

(3) 連携研究者

平川 城太郎 (HIRAKAWA, Jotaro)
千葉大学大学院薬学研究院・助教
研究者番号：30609160