

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21667

研究課題名(和文)膵胆管系腫瘍産生MUC1の比較糖鎖プロファイリング

研究課題名(英文)Differential glycan profiling of MUC1 from pancreatic ductal adenocarcinoma and cholangiocarcinoma

研究代表者

松田 厚志(Matsuda, Atsushi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：30722590

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、微量な生体試料(組織切片)由来ムチン上の糖鎖プロファイリング法の確立と、ムチン産生腫瘍である膵・胆管がん多検体組織を用いてムチン上糖鎖の比較プロファイリングを実施し、診断・治療標的の創出を目指し、疾患特異的糖鎖を検出することを目的とした。これまでに、モデル実験として培養細胞を用い、細胞由来ムチンの比較糖鎖プロファイリング法の確立に成功した。本法を応用し、胆管癌・膵臓癌手術標本を用い、ムチン糖鎖比較解析を実施したところ、術後予後に応じて変化する糖鎖を見出した。本法は新たな診断マーカーおよび創薬標的の探索への応用が期待される。

研究成果の概要(英文): This study demonstrate the development of the mucin glycan profiling targeting to surgical tissue sections from pancreatic ductal adenocarcinoma and cholangiocarcinoma. We establish the glycan profiling of mucin molecules derived from culture cells. Using this method, we next demonstrate the differential mucin glycan profiling targeting to surgical tissue sections from pancreatic ductal adenocarcinoma and cholangiocarcinoma. As the result, we find a specific glycan change according to tumor prognosis after the surgery. Our methodology is expected to applicate to newly biomarker and drug discovery in the future.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：MUC1 腫瘍マーカー 糖鎖 レクチンアレイ 膵臓癌 胆管癌 ムチン

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は、細胞の分化・増殖に伴いその構造が劇的に変化することがよく知られている。中でも、その分子上に多数の糖鎖結合部位を持つ巨大分子、MUC1 はその発現と糖鎖構造変化が癌の形態（浸潤・転移・分化など）に密接に関わるとされることから、MUC1 糖鎖は腫瘍マーカー・治療薬開発において格好の標的とされる。これまでに、MUC1 糖鎖に着目した腫瘍マーカー開発実施例は数多くある。しかしながら、実際のヒト生体試料において MUC1 糖鎖を解析した例はほぼ皆無であり、腫瘍生物学との関連は未だ謎な部分が多く、臨床応用に至ったケースも少ない。なぜなら、組織や血清由来 MUC1 を標的とした糖鎖構造解析は、最新鋭の技術をもってしても尚困難であることに起因する。これまでに申請者らは、高感度比較糖鎖プロファイリングシステム、レクチンマイクロアレイ (図 1) を用い、様々な生体試料中糖タンパク質糖鎖を標的とした比較糖鎖プロファイリング法を開発し、糖鎖バイオマーカー創出へと応用してきた。さらにタンパク質に対する抗体をオーバ

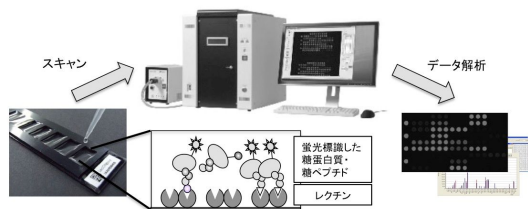


図1. レクチンマイクロアレイ (グライコテクノ社製)

レイさせ、標的とする糖タンパク質上糖鎖プロファイルを選択的に検出する、抗体オーバーレイ・レクチンマイクロアレイ法 (図 2) を開発した。本法の開発は、それまで困難とされていた生体中の微量な糖タンパク質でさえも、その解析対象とするタンパク質上の糖鎖プロファイルを疾患特異的に検出することを可能とし、各種疾患バイオマーカー開発を強力に推し進めてきた。これまでの MUC1 糖鎖解析例の多くは、株化された培養細胞由来のものを標的としたものがほとんどで、生体試料、特に組織切片由来 MUC1 の解析例はなく、生体中の MUC1 上糖鎖がどのような構造でその生物学的重要性は未だ未解明のままである。したがって、実際の生体試料中 MUC1 上糖鎖を解析することは、臨床応用上極めて重要な課題であり、本研究課題において期待される解析技術が抗体オーバーレイ・レクチンマイクロアレイ法である。

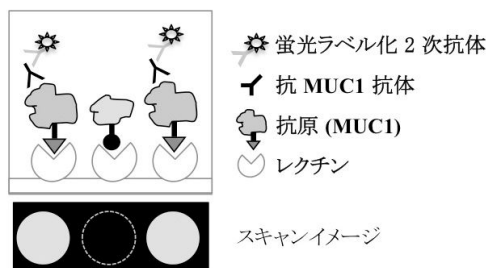


図2. 抗体オーバーレイ・レクチンマイクロアレイ法

2. 研究の目的

癌などでその発現量が上昇するとされる MUC1 は高度に糖鎖修飾された粘液性糖タンパク質である。しかし、生体内 MUC1 糖鎖構造解析は現状の解析技術では困難であり、MUC1 糖鎖を定量的に検出する新たな方法論が必要とされている。本研究の目的は、超高感度糖鎖プロファイラー、レクチンマイクロアレイを用い、生体試料 (組織切片) 中の微量な MUC1 上糖鎖プロファイリング法を確立すること、MUC1 産生腫瘍である膵・胆管癌多検体組織を用いた MUC1 比較糖鎖プロファイリングを実施し、疾患特異的 MUC1 糖鎖の創出と新たな診断・治療標的薬開発への応用およびその腫瘍生物学的作用を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) レクチンマイクロアレイ法による臨床組織切片からの MUC1 糖鎖プロファイリング法を確立する。MUC1 上糖鎖の好感度検出には、ホルマリン固定組織切片からの効率的に MUC1 をエンリッチする方法論を確立することが重要である。免疫染色・レーザーマイクロダイセクション法により、MUC1 陽性領域を選択的に採取し、免疫沈降によって MUC1 エンリッチ後、レクチンアレイ解析に供する。レクチンアレイデータ解析法までを最適化し、統一プロトコルを作成する。

(2) 鹿児島大学病理教室にてライブラリー化された MUC1 を高発現する膵・胆管がん組織を用い、上記より確立したプロトコルに従い、多検体による比較糖鎖プロファイリングを実施する。まずは膵臓・胆管がんの腫瘍間で各腫瘍特異的な糖鎖プロファイルの検出を試みる (図 3)。統計学的解析により、各腫瘍で特異的な糖鎖プロファイル (レクチン反応パターン) を検出する。有意差の認められたレクチンについてレクチン染色によりレクチンアレイデータの整合性を検討する。

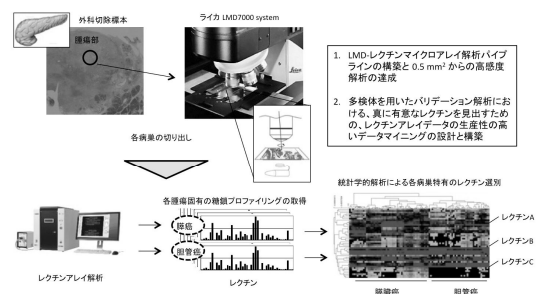


図 3. 腫瘍特異的糖鎖プロファイリングの概念図

(3) 膵臓癌・胆管癌それぞれのレクチンアレイデータから、臨床情報を用い、統計学的手法により、特徴的な MUC1 糖鎖変化を創出する。検証には抗 MUC1 抗体とレクチンによる蛍光二重染色を実施する。

4. 研究成果

本研究により、MUC1 抗体オーバーレイ・レクチンマイクロアレイ法を確立した

(Matsuda A, et al, Anal Chem. 2015)。本法の組織切片への応用を検討したところ、組織切片由来 MUC1 の比較糖鎖解析が可能となった。

MUC1 免疫組織染色を実施し、MUC1 陽性領域よりレーザーマイクロダイセクション法にて、選択的に MUC1 を含む組織断片を回収することにより、効率的な組織切片由来 MUC1 糖鎖プロファイリングが可能となった (図 4) (Matsuda A, et al, Lab Inv. 2017)。最

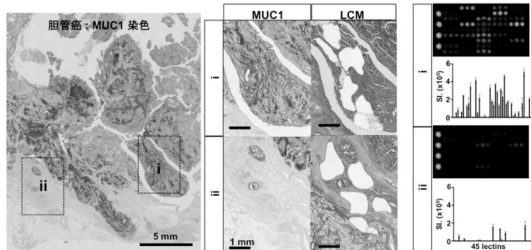


図 4. 組織切片由来 MUC1 抗体オーバーレイ・レクチンマイクロアレイ解析の最適化胆管癌組織切片を MUC1 染色し、serial section 上 MUC1 陽性領域 (i)、陰性領域 (ii) からレーザーマイクロダイセクション (LCM) により組織断片を採取し、レクチンアレイ解析を実施

適化された本法を用いることにより、最終的に 5 μ m 厚のホルマリン固定組織切片より 2.5mm² 程度の MUC1 陽性領域があればその糖鎖プロファイルが取得可能なプロトコルの作成に成功した。標的タンパク質の組織切片中の糖鎖プロファイリングの報告例はこれまでになく、本成果は新たな知見を供給するとともに、世界最高感度の方法論である。

確立した本法に従い、腫瘍間での MUC1 比較糖鎖プロファイリングを検討した。胆管癌 (CCA) 21 症例、膵臓癌 (PDAC) 50 症例を用いて、全ての MUC1 糖鎖プロファイリングを取得。得られた 45 種類のレクチン全てのレクチンアレイデータについて統計学的解析を実施 (階層的クラスター解析、主成分解析)、胆管癌・膵臓癌それぞれで有意差のあるレクチンを選抜し、さらに単変量解析にて各レクチンの統計学的有用性を検討した。結果、胆管癌で有意に上昇するレクチンとして PWM (Pokeweed, *phytolacca Americana*)、膵臓癌で有意に上昇するレクチンとして α 2-3 シアル酸を特異的に認識する MAL (*Maackia amurensis* lectin) をそれぞれ見出し、同じ

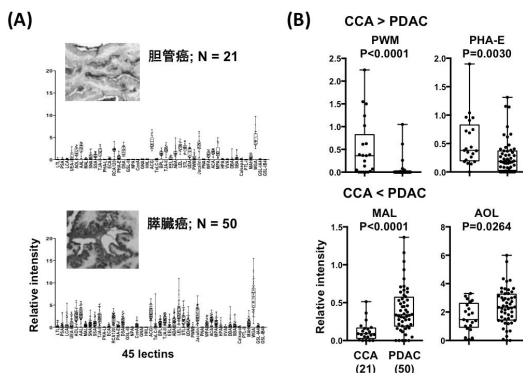


図 5. 胆管癌組織由来 MUC1 の比較糖鎖プロファイリング (A) 胆管癌 21 症例、膵臓癌 50 症例のレクチンシグナルパターン。(B) 胆管癌、膵臓癌それぞれで有意にシグナル増加が認められたレクチン

MUC1 でも産生される腫瘍によってその糖鎖構造は異なることを、生体試料を用いて示すことに成功した (図 5)。また、胆管癌組織 21 症例より得られたレクチンアレイデータから、各種臨床パラメータとの相関関係を検討したところ、特に MUC1 糖鎖構造の変化は、術後予後とよく相関することが判明した。具体的には MAH (*Maackia amurensis* hemagglutinin) のシグナル強度と術後予後

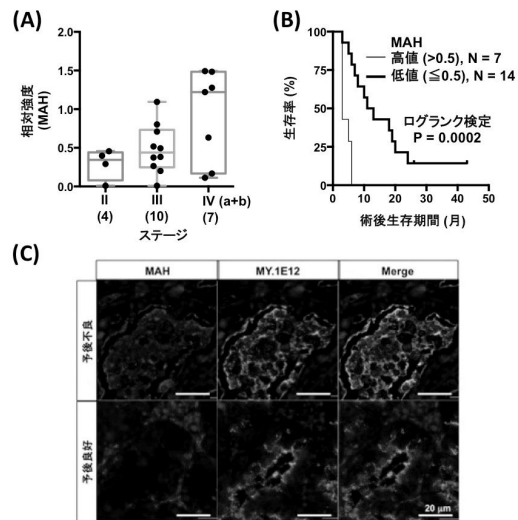


図 6. 組織中 MUC1 比較糖鎖プロファイリング

(A) 膵臓癌各ステージにおける MAH のシグナル強度。MAH のシグナル強度は、がんのステージ依存的に増加する。(B) 生存曲線 (Kaplan-Meier)。MAH 高値の患者群は低値に比べ予後不良であった。(C) MAH と抗 MUC1 抗体による二重染色

が高い相関性を示した (図 6)。これは癌の進展・悪性度によってその糖鎖構造が変化することを示しており、早期診断のみならず、悪性度などを評価するマーカーとして活用できる可能性を示唆するものである。

本研究により、臨床サンプルからの MUC1 糖鎖解析法が確立され、その糖鎖構造は病態に応じて変化することも示された。今後、MUC1 のみならず他の癌関連分子上糖鎖の比較解析にも本法の応用が期待され、新たなマーカー開発ツールとしての活用が見込まれる。

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 6 件)

1. Matsuda A., Kuno A., Higashi M., (他 4 名)、Assessment of tumor characteristics based on glycoform analysis of membrane-tethered MUC1. Lab Inv. 査読有, 97, 2017, 1262, DOI: 10.1028/labinvest.2017.67.
2. Tamaki N., Kuno A., Matsuda A., (他 12 名)、Serum wisteria floribunda agglutinin-positive sialylated mucin 1 as a marker of progenitor/biliary features in hepatocellular carcinoma.

- Sci Rep. 査読有, 7, 2017, 244, DOI: 10.1038/s41498-017-00357-8.
3. Zou X., Yoshida M., Nagai-Okatani C., Iwaki J., **Matsuda A.**, (他 10 名)、A standardized method for lectin microarray-based tissue glycome mapping. Sci Rep. 査読有, 7, 2017, 43560, DOI: 10.1038/srep43560.
 4. Shoda J., **Matsuda A.**, (他 12 名)、Wisteria floribunda agglutinin-sialylated mucin core polypeptide 1 is a sensitive biomarker for biliary tract carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: a multicenter study. J Gastroenterol. 査読有, 52, 2017, 218-228, DOI: 10.1007/s00535-016-1230-0.
 5. Yamaguchi T., Yokoyama Y., Ebata T., **Matsuda A.**, (他 5 名)、Verification of WFA-sialylated MUC1 as a sensitive biliary biomarker for human biliary tract cancer. Ann Surg Oncol. 査読有, 23, 2016, 671-677, DOI: 10.1245/s10434-015-4878-4.
 6. **Matsuda A.**, (他 14 名)、Lectin microarray-based biomarker verification targeting aberrant O-linked glycosylation on mucin 1. Anal Chem. 87, 2015, 7274-7281. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01329.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. **Matsuda A.**, (他 6 名)、Glycan profiling for exploring of MUC1 glycoform with tumor-characteristic by lectin microarray, 16th Human Proteome Organization World Congress, 2017
2. **松田厚志**, (他 6 名)、レクチンマイクロアレイによる血清エクソソームの比較糖鎖プロファイリング、第 36 回日本糖質学会年会、2017
3. **Matsuda A.**, (他 6 名)、Comparative glycoform analysis of endogenous MUC1 for disease-specific glyco-alteration discovery, 9th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology Conference, 2017
4. **Matsuda A.**, (他 7 名)、Comparative glycan analysis of secretory and exosome glycoproteins, 8th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology Conference, 2016
5. **松田厚志**, (他 12 名)、生体内粒子の比較糖鎖プロファイリングへ向けたレクチンマイクロアレイの応用、日本プロテオーム学会 2016 年大会、2016
6. **松田厚志**, (他 12 名)、エクソソーム・ウイルス粒子を標的とした比較糖鎖プロファイリング、第 35 回日本糖質学会

年会、2016

7. **Matsuda A.**, (他 6 名)、An effective method for exploring relationship of glycoform of a cell surface mucin with characteristics of tumor, 14th Human Proteome Organization World Congress, 2015
8. **松田厚志**, (他 6 名)、胆管癌血清診断における WFA-MUC1 の有用性検証、第 34 回日本糖質学会年会、2015
9. **Matsuda A.**, (他 6 名)、Glycan profiling of cell surface mucin from tissue sections, 7th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology conference, 2015

〔図書〕(計 1 件)

1. **松田厚志**, 岡谷千晶、久野敦、パラフィン包埋標本を用いた比較組織グライコム解析、分光堂、病理と臨床・別冊、2017, 628-634

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松田 厚志 (MATSUDA, Atsushi)
 慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教
 研究者番号 : 30722590