

令和元年6月12日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05071

研究課題名(和文) がん幹細胞糖鎖の構造と機能

研究課題名(英文) Structure and function of glycans expressed on cancer stem cells

研究代表者

館野 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・上級主任研究員

研究者番号：30450670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膵がんに対する新たな治療薬を開発することを目的として、膵がんを発現する糖鎖の構造解析を行った。その結果、膵がんを発現する糖タンパク質糖鎖の構造を明らかにするとともに、膵がんの新たな糖鎖マーカーと、それに結合するrBC2LCNレクチンを同定した。そして、新たな創薬標的として期待される膵がんを発現するrBC2LCNレクチンの糖タンパク質リガンド群を同定した。さらに、rBC2LCNに薬剤を融合したレクチン-薬剤複合体を作製し、各種膵がん移植マウスモデルの腫瘍周囲、腹腔内や、静脈に投与した。その結果、作製したレクチン-薬剤複合体は劇的な抗がん作用を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵がんの5年生存率は未だ10%未満であり、新たな治療薬の開発が切望されている。こうした中、本研究では膵がんの新たな創薬標的となる糖鎖マーカーと、認識するレクチンを同定した。さらに、レクチンに薬剤を融合させたレクチン-薬剤複合体が膵がん移植マウスモデルに対して劇的な抗がん作用を示すことを明らかにした。レクチンはこれまで医薬品として応用されたことのない新たなタンパク質であることから、学術的に大きなインパクトがある。また開発したレクチン-薬剤複合体は未だ有効な治療法がない膵がんの新たな治療戦略として期待され、社会的な意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, with the aim of developing new therapeutic agents for pancreatic cancer, we performed structural analysis of glycans expressed in pancreatic cancer. As a result, while clarifying the structure of the glycoprotein glycans expressed in pancreatic cancer, a novel glycan marker for pancreatic cancer and a detection probe lectin, rBC2LCN, were identified. We identified glycoprotein ligands of rBC2LCN lectin that is expressed in pancreatic cancer that are expected as new drug target molecules. Furthermore, a lectin-drug conjugate was prepared by fusing rBC2LCN with a drug that was administered around the tumor, in the peritoneal cavity, or in veins of various pancreatic cancer transplantation mouse models. The lectin-drug conjugate was found to show dramatic anti-tumor effects.

研究分野：糖鎖工学

キーワード：糖鎖 レクチン 膵がん

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

1. 研究開始当初の背景

膵がんは5年生存率が10%未満と最も致死的な難治癌であり、有効な治療法が存在しない。また再発性が高く、標準治療薬である塩酸ゲムシタピン(GEM)で治療しても膵がんの増殖と転移を抑えることができず、しかも投与後まもなくGEM耐性を獲得することが問題となっている。そのためGEM耐性膵がんに対する新たな治療薬の開発が切望されている。こうした中、糖鎖は細胞表層に局在し、癌化に伴い構造が劇的に変化することから、創薬標的として期待される。こうした中、rBC2LCN レクチンと呼ばれるレクチンが膵がん結合すること、そして薬剤処理によりその反応性が增强されることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、膵がんが発現する糖タンパク質糖鎖の構造を明らかにする。次にrBC2LCNが認識する糖タンパク質群を同定し、その機能を明らかにする。さらに、rBC2LCNを用いて膵がんを殺傷除去するための新たな技術を開発する。最終的には最大の難治がんである膵がん糖鎖の構造と機能についての理解を深めるとともに、新たな治療戦略を提案することを目的とする。

3. 研究の方法

膵がん組織に発現する糖鎖構造を、レクチンマイクロアレイで解析する。さらに、液体クロマトグラフィーと質量分析を用いて定量的糖鎖構造解析を実施する。膵がんが発現するrBC2LCNレクチンの糖タンパク質リガンドをプロテオミクスで一斉同定する。rBC2LCNに緑膿菌由来毒素を融合したrBC2LCN-PE38を膵がん腹膜播種マウスの腹腔内に投与して、その治療効果を検証する。さらに、各種濃度のrBC2LCN-PE38を正常マウスに投与して、その安全性を調べる。rBC2LCNに異なる薬剤を融合させた薬剤を創出し、抗がん作用を明らかにする。

4. 研究成果

これまでの研究において、rBC2LCNレクチンと呼ばれるレクチンが膵がん結合すること、そして薬剤処理によりその反応性が增强されることを見出していた。本年度は、液体クロマトグラフィーと質量分析を用いて2種(PC3、PC42)の患者由来膵がんゼノグラフトモデルマウスに発現するN型、及びO型糖鎖の構造を解析した(図1)。フコシル化糖鎖はO型糖鎖中に見出され、LewisY、LewisAに加え、rBC2LCNが認識するHタイプ3が検出された。

さらに膵がんゼノグラフトモデルからrBC2LCN固定化ビーズに結合する糖タンパク質群をエンリッチして、電気泳動後、LCMSを用いて347種の糖タンパク質候補を同定した。同定された糖タンパク質候補に対する抗体を用いて、ウエスタンブロット法と免疫染色によりさらなる検証を行うことで、数種の糖タンパク質リガンドを同定した。

またrBC2LCNを用いたサンドイッチアッセイを構築し、血清を解析すると、健常者と比べ膵がん患者血清で高い反応性を示すことがわかった。さらに、rBC2LCNが反応性を示す血中の糖タンパク質候補群をプロテオミクスで同定し、IP/WB法により3種類の糖タンパク質を同定した。

一方、rBC2LCNに対するウサギポリクローナル抗体を作製し、血中のrBC2LCNを検出するためのサンドイッチELISA法を構築した。また、血中の抗体rBC2LCN抗体を測定するためのELISA法を構築した。さらに、緑膿菌由来毒素に対する抗体を用いて、血中の緑膿菌由来毒素の濃度を測定するためのサンドイッチELISA法を作製した。

rBC2LCNもしくはrBC2LCN-PE38をマウスに投与し、血中のrBC2LCN、rBC2LCN-PE38の濃度、及び中和抗体の濃度を測定した。さらに緑膿菌由来毒素を融合させたrBC2LCN-PE38を作製し、膵がん移植マウスモデルに投与することで、抗がん作用を調べるとともに、安全性についての評価を行った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計29件)

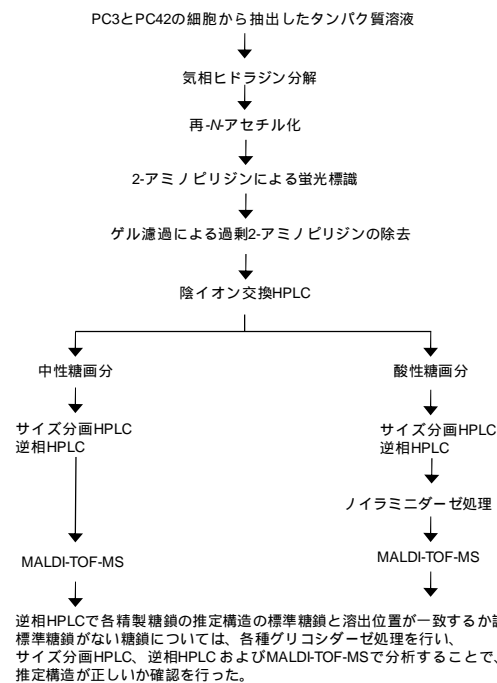


図1 定量的糖鎖構造解析のながれ

1. Two carbohydrate recognizing domains from *Cycas revoluta* leaf lectin show the distinct sugar-binding specificity-A unique manno oligosaccharide recognition by N-terminal domain. Shimokawa M, Haraguchi T, Minami Y, Yagi F, Hiemori K, Tateno H, Hirabayashi J. 2016 Jul;160(1):27-35.
2. 2-6sialylation is a marker of the differentiation potential of human mesenchymal stem cells. *Tateno H(CA), Saito S, Hiemori K, Kiyoi K, Hasehira K, Toyoda M, Onuma Y, Ito Y, Akutsu H, Hirabayashi J. *Glycobiology*. 2016 Dec;26(12):1328-1337.
3. Generation of a monoclonal antibody recognizing the CEACAM glycan structure and inhibiting adhesion using cancer tissue-originated spheroid as an antigen. Sato Y, Tateno H, Adachi J, Okuyama H, Endo H, Tomonaga T, Inoue M. *Sci Rep*. 2016 Apr 21;6:24823.
4. Identification of the cysteine residue responsible for oxidative inactivation of mouse galectin-2. Tamura M, Sasai A, Ozawa R, Saito M, Yamamoto K, Takeuchi T, Ohtake K, Tateno H, Hirabayashi J, Kobayashi J, Arata Y. *J Biochem*. 2016 Oct;160(4):233-241.
5. A rationally engineered yeast pyruvyltransferase Pvg1p introduces sialylation-like properties in neo-human-type complex oligosaccharide. Higuchi Y, Yoshinaga S, Yoritsune K, Tateno H, Hirabayashi J, Nakakita S, Kanekiyo M, Kakuta Y, Takegawa K. *Sci Rep*. 2016 May 19;6:26349.
6. Identification, Characterization, and X-ray Crystallographic Analysis of a Novel Type of Mannose-Specific Lectin CGL1 from the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Unno H, Matsuyama K, Tsuji Y, Goda S, Hiemori K, Tateno H, Hirabayashi J, Hatakeyama T. *Sci Rep*. 2016 Jul 5;6:29135.
7. Carbohydrate-binding domain of the POMGnT1 stem region modulates O-mannosylation sites of α -dystroglycan. Kuwabara N, Manyu H, Yamada T, Tateno H, Kanagawa M, Kobayashi K, Akasaka-Manyu K, Hirose Y, Mizuno M, Ikeguchi M, Toda T, Hirabayashi J, Senda T, Endo T, Kato R. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Aug 16;113(33):9280-5. doi: 10.1073/pnas.1525545113. Epub 2016 Aug 4.
8. Affinity-based Glycan Analysis. *Tateno H(CA). *Proteomics*. 2016 Dec;16(24):3055.
9. Structural and quantitative evidence of 2-6-sialylated N-glycans as markers of the differentiation potential of human mesenchymal stem cells. Hasehira K, Hirabayashi J, Tateno H(CA). *Glycoconj J*. 2017 Dec;34(6):797-806.
10. Development of a practical sandwich assay to detect human pluripotent stem cells using cell culture media. *Tateno H(CA), Hiemori K, Hirayasu K, Sougawa N, Fukuda M, Warashina M, Amano M, Funakoshi T, Sadamura Y, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Shofuda T, Sumida M, Kanemura Y, Nakamura M, Okano H, Onuma Y, Ito Y, Asashima M, Hirabayashi. *Regenerative Therapy* 2017; 6:1-8.
11. Carbohydrate recognition by the rhamnose-binding lectin SUL-I with a novel three-domain structure isolated from the venom of globiferous pedicellariae of the flower sea urchin *Toxopneustes pileolus*. Hatakeyama T, Ichise A, Unno H, Goda

- S, Oda T, Tateno H, Hirabayashi J, Sakai H, Nakagawa H. *Protein Sci.* 2017 Aug;26(8):1574-1583.
12. Isolation of Rice Bran Lectins and Characterization of Their Unique Behavior in Caco-2 Cells. Nakata H, Lin CY, Abolhassani M, Ogawa T, Tateno H, Hirabayashi J, Muramoto K. *Int J Mol Sci.* 2017 May 13;18(5).
 13. Engineering of recombinant *Wisteria floribunda* agglutinin specifically binding to GalNAc 1,4GlcNAc (LacdiNAc). Sato T, Tateno H, Kaji H, Chiba Y, Kubota T, Hirabayashi J, Narimatsu H. *Glycobiology.* 2017 May 26.
 14. Sugar-Binding Profiles of Chitin-Binding Lectins from the Hevein Family: A Comprehensive Study. Itakura Y, Nakamura-Tsuruta S, Kominami J, Tateno H, Hirabayashi J. *Int J Mol Sci.* 2017 May 30;18(6).
 15. Lectin microarray analysis of isolated polysaccharides from *Sasa veitchii*. Yagi H, *Tateno H (equal contribution), Hayashi K, Hayashi T, Takahashi K, Hirabayashi J, Kato K, Tsuboi M. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017 Jun 21:1-3.
 16. Engineering of a Potent Recombinant Lectin-Toxin Fusion Protein to Eliminate Human Pluripotent Stem Cells. *Tateno H(CA), Fumi Minoshima, Saito S. *Molecules.* 2017 Jul 10;22(7).
 17. Distinct roles for each N-glycan branch interacting with mannose-binding type Jacalin-related lectins *Oryzata* and *Calsepa*. Nagae M, Mishra SK, Hanashima S, Tateno H, Yamaguchi Y. *Glycobiology.* 2017 Dec 1;27(12):1120-1133.
 18. Development of a Sensitive Microarray Platform for the Ranking of Galectin Inhibitors: Identification of a Selective Galectin-3 Inhibitor. Dion J, Advedissian T, Storozhylova N, Dahbi S, Lambert A, Deshayes F, Viguier M, Tellier C, Poirier F, Téletchéa S, Dussouy C, Tateno H, Hirabayashi J, Grandjean C. *Chembiochem.* 2017 Dec 14;18(24):2428-2440.
 19. A Novel Therapeutic Strategy for Pancreatic Cancer: Targeting Cell Surface Glycan Using rBC2LC-N Lectin-Drug Conjugate (LDC). Shimomura O, Oda T, Tateno H, Ozawa Y, Kimura S, Sakashita S, Noguchi M, Hirabayashi J, Asashima M, Ohkohchi N. *Mol Cancer Ther.* 2018 Jan;17(1):183-195.
 20. Fucose-specific lectin of *Aspergillus fumigatus*: binding properties and effects on immune response stimulation. Sakai K, Hiemori K, Tateno H, Hirabayashi J, Gono T. *Med Mycol.* 2018 Jan 22.
 21. Glycome analysis of extracellular vesicles derived from human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. Saito S, Hiemori K, Kiyoi K, Tateno H(CA). *Sci Rep.* 2018 Mar 5;8(1):3997.
 22. The trimeric solution structure and fucose-binding mechanism of the core fucosylation-specific lectin PhoSL. Yamasaki K, Yamasaki T, Tateno H. *Sci Rep.* 2018 May 17;8(1):7740.
 23. Identification, Characterization, and X-ray Crystallographic Analysis of a Novel Type of Lectin AJLec from the Sea Anemone *Anthopleura japonica*. Unno H, Nakamura A, Mori S, Goda S, Yamaguchi K, Hiemori K, Tateno H, Hatakeyama T. *Sci Rep.* 2018 Aug 1;8(1):11516.

24. Reduced fucosylation in the distal intestinal epithelium of mice subjected to chronic social defeat stress. Omata Y, Aoki R, Aoki-Yoshida A, Hiemori K, Toyoda A, **Tateno H**, Suzuki C, Takayama Y. Sci Rep. 2018 Sep 4;8(1):13199.
25. Investigation of Selective Recognition of Sugars Using Lectin-inspired Temperature-responsive Polymers. Nakagawa, Y; **Tateno, H**; Ebara, M CHEMISTRY LETTERS 2018 47, 134-137
26. Photoactivable elimination of tumorigenic human induced pluripotent stem cells using a lectin-doxorubicin prodrug conjugate. Dion J, Minoshima F, Saito S, Kiyoi K, Hasehira K, **Tateno H(CA)**. Chembiochem. 2019 Feb 8.
27. Receptor destroying enzyme (RDE) from *Vibrio cholerae* modulates IgE activity and reduces the initiation of anaphylaxis. Yamazaki T, Inui M, Hiemori K, Tomono S, Itoh M, Ichimonji I, Nakashima A, Takagi H, Biswas M, Izawa K, Kitaura J, Imai T, Sugiura N, **Tateno H**, Akashi-Takamura S. J Biol Chem. 2019 Mar 4.
28. Characterization and functional analysis of novel circulating NK cell sub-populations. Khummuang S, Chuensirikulchai K, Pata S, Laopajon W, Chruewkamlow N, Mahasongkram K, Sugiura N, Watanabe H, **Tateno H**, Kamuthachad L, Wongratanacheewin S, Takheaw N, Kasinrerak W. Int Immunol. 2019 Mar 12.
29. Structural basis for specific recognition of core fucosylation in N-glycans by *Pholiota squarrosa* lectin (PhoSL). Yamasaki K, Kubota T, Yamasaki T, Nagashima I, Shimizu H, Terada RI, Nishigami H, Kang J, Tateno M, **Tateno H**. Glycobiology. 2019 Mar 26.

〔学会発表〕(計9件)

1. **舘野浩章**、馳平加代、平林淳、「 α 2-6 シアリル N 型糖鎖はヒト間葉系幹細胞の分化ポテンシャルマーカーである」、第35回日本糖質学会年会、高知市文化プラザかるぽーと、2016/9/2
2. **舘野浩章**、「造腫瘍性を有するヒト ES/iPS 細胞の除去と非侵襲的モニタリング技術」、第16回日本再生医療学会総会、仙台国際センター、2017/3/7
3. **舘野浩章**、「糖鎖を標的としたヒト間葉系幹細胞品質管理技術の開発」、第16回日本再生医療学会総会、仙台国際センター、2017/3/8
4. **舘野浩章**、「レクチン工学によるヒト ES/iPS 細胞検出除去技術の開発と再生医療への応用」、第36回日本糖質学会年会、旭川市民文化会館、2017/7/21
5. **舘野浩章**、「レクチンを用いた幹細胞ターゲティング技術の開発と応用」、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸ポートピアホテル、2017/11/6
6. **舘野浩章**、「細胞外小胞と糖鎖」、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸ポートピアホテル、2017/11/7
7. **Hi roaki Tateno**、「Lectin microarray: from glycan analysis to quality control of stem cells」、5th TERMIS World Congress、2018/9/6
8. **舘野浩章**、「レクチンマイクロアレイによるエクソソームのグリコーム解析」、第91回日本生化学会大会、国立京都国際会館、2018/9/24
9. **Hi roaki Tateno**、「Glycome of stem cells and application to regenerative medicine」、JAACT2018、Tsukuba International Congress Center、2018/11/5

〔図書〕(計 2件)

1. iPS細胞の安全・高品質な作製技術 第1章 iPS細胞作製・培養時における細胞のがん化メカニズムの検出・評価 第4節 レクチンを用いた未分化iPS細胞の選択除去薬剤の開発 **舘野浩章**(2016.10.31 発刊) (株)技術情報協会 ISBN:978-4-86104-629-2
2. 再生医療・細胞治療のための細胞加工物評価技術 第16章 糖鎖を標的としたヒト間葉系幹細胞の品質管理技術の開発 **舘野浩章** シーエムシー出版 ISBNコード: 978-4-7813-1185-2 発行日: 2016年10月27日

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称: レクチンの固定化方法
発明者: 舘野浩章、片山淳子、的場一隆、熊田陽一
権利者: 産総研、日産化学工業、京都工芸繊維大
種類: 特許
番号: 特願 2017-078414
出願年: 2017
国内外の別: 国内

名称: がんの診断及び治療方法
発明者: 平林淳、浅島誠、大河内信弘、小田竜也、下村治、伊藤弓弦、小沼泰子
権利者: 産総研、筑波大
種類: 特許
番号: PCT/JP2016/079577
出願年: 2016
国内外の別: PCT

取得状況(計 2件)

名称: ノダフジ由来改変レクチン
発明者: 佐藤隆、舘野浩章、梶裕之、後藤雅式、成松久、千葉靖典
権利者: 産総研
種類: 特許
番号: 特許 6011985 (日本)、特許 9796765 (米国)
取得年: 2016/9/30
国内外の別: 国内外

名称: 未分化細胞除去方法
発明者: 舘野浩章、伊藤弓弦、小沼泰子、平林淳、浅島誠
権利者: 産総研
種類: 特許
番号: 特許 5985735
取得年: 2016/8/12
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/brd/jp/groups/cgtrg/cgtrg.html>

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 小田竜也

ローマ字氏名: Tatsuya Oda

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。