

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06553

研究課題名（和文）O-GlcNAc修飾網羅的解析法に基づく癌特異的O-GlcNAc化の機能解明

研究課題名（英文）Development of profiling method for cancer-specific O-GlcNAcylation

研究代表者

芳賀 淑美（HAGA, Yoshimi）

公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター がんオーダーメイド医療開発プロジェクト・研究員

研究者番号：40525789

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、O型糖鎖結合部位を質量分析法によって網羅的に分析する独自の技術を利用して、がん特異的にO-GlcNAc修飾される部位を一斉同定することを目的とした。糖ペプチドのみを100倍以上の高い濃縮効率で回収する手法を構築したことにより、未報告のO型糖鎖付加部位を多数同定することに成功した。大腸がん手術検体の解析も実施し、がん部で修飾頻度に有意に差があるサイト・タンパク質を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんではタンパク質のO-GlcNAc化の昂進が高頻度に見られ、リン酸化と共にがん細胞の増殖、浸潤、転移などに関与するという報告もある。しかし、これまでO-GlcNAc修飾の変化を付加部位ごとに、高感度に、かつ網羅的に調べる技術は存在せず、O-GlcNAc修飾が持つ生理機能はごく限られた断片的な知見しか得られていない。本研究によってがん組織でO型糖鎖付加が昂進する意義やメカニズムの解明につながれば、新規糖鎖標的治療薬・診断薬のターゲット探索へも応用可能と期待される。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to simultaneously identify cancer-specific O-GlcNAc modification sites by utilizing an original technique for comprehensive analysis of O-glycan binding sites by mass spectrometry. By establishing a method to concentrate O-glycopeptides with more than 100-fold higher enrichment efficiency, we succeeded in identifying many previously unreported O-glycosylation sites. We also analyzed colorectal cancer surgical specimens and found sites/proteins with significantly different modification frequencies in cancer tissues compared to adjacent normal areas.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 質量分析 グライコプロテオミクス

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

O 結合型 -N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)は、細胞質および核タンパク質のセリン・スレオニン残基のヒドロキシル基に対する翻訳後修飾である。特にがんでは O-GlcNAc 化の昂進が高頻度に見られ、リン酸化と共にがん細胞の増殖、浸潤、転移などに関与するという報告もある (Stephen HM, et al. *Glycobiology* 2021, 31, 724)。タンパク質 O-GlcNAc 化は、リン酸化との競合や物理的性質の変化により結合タンパク質を変化させることによって細胞内のシグナル伝達や転写を制御する。たとえば、c-Myc の Thr58 がリン酸化されるとプロテアソームにより分解を受けるが、Thr58 に O-GlcNAc 化が起こるとその分解が抑制される (Itkonen et al. *Cancer Res.* 2013, 73, 5277)。

がん細胞では、Warburg 効果によりグルコースの細胞内取り込みが増すことや、O-GlcNAc 転移酵素 OGT が高発現することによって、タンパク質の O-GlcNAc 化が昂進すると推測されている (Zachara et al. *Essentials of Glycobiology Chapter 19*, 2017)。タンパク質の O-GlcNAc 化の昂進と OGT の発現上昇は、乳癌、前立腺癌、肺癌、大腸癌、肝臓癌、白血病などすでに多くのがんで見られる (図 1) (Mi et al. *BBA*, 2011, 12, 514)。しかし、どのタンパク質のどの部位に O-GlcNAc 化が起こることによりがん細胞の増殖、生存、浸潤および転移を含むがんの分子病態に影響が及ぶのか、そのメカニズムの大部分は明らかになっていない。その大きな理由の一つに、リン酸化は種々の濃縮法を含め解析法が発達しているのに対し、O-GlcNAc 化タンパク質の有効な網羅的解析法が存在しないことが挙げられる。また、従来の研究では、N 型・O 型糖鎖の構造を解析する際に「様々なレクチンに対する親和性を調べる」または「化学的・酵素的にタンパク質から切り離した糖鎖を蛍光標識して HPLC や質量分析計などで解析する」といった手法によってきたが、これらの分析法では糖鎖がタンパク質のどの部位にどのような付加頻度で結合しているかという重要な情報が得られず、糖鎖が持つ生理機能解明の本質に迫ることが困難であった。特に、本研究でターゲットとする O-GlcNAc 化を含む O 型糖鎖は、全ての O 型糖鎖をペプチド鎖から切断、遊離させる酵素が存在せず、付加部位の同定、構造の解明は極めて難しかった。そのため、現在でも O-GlcNAc 修飾が持つ生理機能はごく限られた断片的な知見しか得られていなかった。

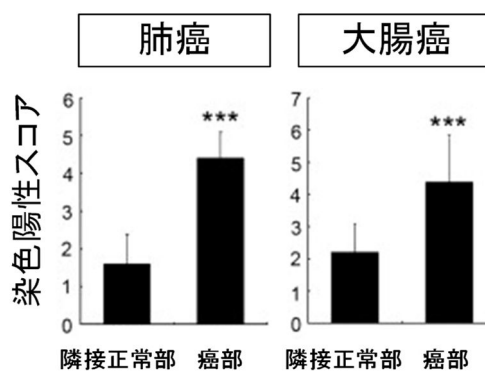


図 1 様々な癌で OGT の発現上昇がみられる (Mi et al. BBA (2011)より改変)

## 2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ、本研究では微量の生体試料中の O-GlcNAc 糖鎖修飾部位を網羅的にプロファイル解析する技術の構築を目指した。研究期間後半には、大腸がん手術時採取組織を用いて網羅的プロファイリングを実施し、がん特異的に O-GlcNAc 糖鎖が付加される基質・サイトの一斉同定を試みた。これにより、がん化によって最も高頻度に O-GlcNAc 糖鎖が付加される部位、およびタンパク質が同定し、がん組織で O-GlcNAc 化が昂進する意義やメカニズムを明らかにすることを目的とする。当該研究は新規糖鎖標的治療薬・診断薬のターゲット探索をはじめ、O-グライコプロテオーム研究に革新をもたらす基盤技術となることが期待されると共に、O 型糖鎖修飾が病態に関わるあらゆる疾患の分子生物学的原因究明に繋がる波及効果も期待できる。

我が国における主要死因別死亡率のトップはがんであり、全死因中の約 3 割を占める。特に大腸がんは、男女ともに罹患数が多く、部位別の罹患数で 1 位、死亡数でも 2 位となっている (国立がん研究センター、2018 年 がん統計)。現在、切除不能進行再発大腸癌に対する薬物療法としては TS-1、FOLFOX、FOLFIRI といった殺細胞性化合物製剤と、分子標的治療薬であるベバシズマブ、ラムシルマブ、アフリベルセプト、セツキシマブ、パニツムマブ、レゴラフェニブを組み合わせた様々なレジメンが一次～五次治療において国内保険診療として使用されている。しかし、有害事象 (副作用) の出現率も考慮すると十分な治療効果が得られる症例は少ない。また、MSI-H (高頻度マイクロサテライト不安定性) 症例にのみがん免疫療法としてペンプロリズマブが承認されているが、治療歴を有する MSI-H 大腸がん患者 61 名を対象にした KEYNOTE-164 試験では、奏効率は 27.9%に留まっている。こうした現状から、本研究開発により上記分子標的治療薬 6 種が標的とする VEGF、EGFR、またはマルチキナーゼシグナル以外の、大腸癌に対する新たな Druggable pathway を見出すことが出来れば、作用機序の異なる分子標的治療薬を組み合わせた新しい治療レジメンの追加に伴ってより多くの切除不能進行再

発大腸がん患者に対して生命予後や QOL の有意な改善が期待できる。

### 3. 研究の方法

申請者はこれまでに、独自の網羅的 O 型糖タンパク質定量プロファイル法開発を行ってきた。O 型糖鎖が付加した糖ペプチドを特殊なアルカリ条件下で処理すると構造の種類によらず全ての O 型糖鎖に 脱離反応が起こり、糖鎖付加を受けていない同じ骨格のペプチドと比べて -1Da の質量シフトが観測される。

本研究では本法を発展させ、脱離で生じたアミノ基を利用した O 型糖ペプチド特異的濃縮法を確立する。さらに、元から存在するアミノ基 (全ペプチドの N 末端、及びリジンの側鎖) をブロックすると同時にサンプル間比較定量も可能とする安定同位体ラベリングも組み合わせた。これにより、あらゆる生体試料に対して網羅的な O 型糖鎖付加部位の同定と、その付加頻度の相対定量解析が同時に実施可能となった。LTQ-Orbitrap-Fusion Lumos 質量分析計 (ThermoFisher Scientific 社) にて溶出ペプチドの分析を行い、データベース検索により、必要なデータ処理後に O 型糖鎖付加部位の同定を行った。その際、本法用に LC-MS 分析パラメータを至適化した。具体的には、Nano-flow HPLC のグラジエントの検討、最適開裂モードの検討、その他質量分析装置の各種電圧条件の決定、イオンモビリティインターフェース (FAIMS) の電圧最適化、Mascot 検索におけるパラメータの決定を行った。本法では、O-GlcNAc 化タンパク質の他に、ムチン型糖鎖をもつタンパク質も反応する。そのため、検索の際に局在解析を行い、核、細胞質、ミトコンドリアに存在するタンパク質を抽出した。培養細胞を用いて系の評価を行った後、大腸がん患者手術検体 20 症例を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 培養細胞を用いた O 型糖鎖修飾タンパク質特異的濃縮法の確立

本法の有効性を検証するために、まずはモデル系として HCT116 細胞総抽出液を用いて網羅的 O 型糖タンパク質プロファイル法を実施した。HCT116 細胞総抽出液を用いた実験において、トリプシン消化物をそのまま質量分析計で測定した場合、O 型糖鎖修飾糖ペプチドは全ペプチドの 0.4% しか存在が確認できなかったのに対し、本法を用いることによりサンプル中の含有率が 84% まで上昇した。今回の測定では、現在 O 型糖タンパク質としてデータベースに登録されている 420 タンパク質を大きく上回る 2,540 タンパク質、5,677 サイトを同定することに成功している。得られたデータを用いて局在解析や GO 解析、パスウェイ解析を行い、ムチンや NF- $\kappa$ B など、がんに関連する分子に実際に O 型糖鎖修飾が起こっていることを確認した。また、通常の総タンパク質プロテオミクス解析の結果との比較により、同定されるタンパク質の細胞内分布に偏りが無いことから本法がバイアスのかからない優れた方法であること、再現性も非常に高いことが確認された。リン酸化と競合するサイトも複数同定されており、細胞の増殖やがん化等機能への影響が期待されるため、今後も解析を継続する。

#### (2) 大腸がん手術検体における O 型糖鎖付加基質の網羅的同定

続いて、大腸がん手術時採取組織 (新鮮凍結組織) を用いての解析を実施した。手術検体 20 症例、同一患者の正常部・癌部組織計 40 サンプルから、強変性溶媒にてタンパク質の抽出を行った。まずは大腸がん患者組織から抽出されたタンパク質の網羅的定量プロテオーム解析を行った。重複を除く 9,481 タンパク質が同定有意水準 (False discovery rate < 1%) を満たして相対定量化された。これらに対して、上記 2 群間で Paired t-test を実施したところ、 $p < 0.05$  かつ Fold change > 2.0 を満たすものは 826 タンパク質であった。この中には、FDA が承認した創薬ターゲットである DPEP1 をはじめ、多くのがん特異的タンパク質が含まれていた。さらに、上記 40 サンプルに対して網羅的 O 型糖タンパク質プロファイル法を実施した。O 型糖タンパク質として 2,984 タンパク質、O 型糖鎖付加サイトとして 6,311 サイトを同定した。現在、得られたデータの解析を継続中であり、今後、新規なバイオマーカーやがん治療薬の標的となる分子の選定を行う予定である。本研究により、微量の生体試料中の O 型糖鎖修飾部位を網羅的に解析する基盤となる技術を開発することができたと考えている。

また、がんにおける糖鎖構造の変化と、それを高感度に検出するための新しい技術の進歩と糖鎖プロテオームの現状、そのがん領域への応用 (がん診断、モニタリング、予後予測) についての総説論文を Glycoconjugate J. 誌に発表した (Haga et al. Glycoconjugate J. 2022, 39, 3037)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okamoto Nobuhiko, Ohto Tatsuyuki, Enokizono Takashi, Wada Yoshinao, Kohmoto Tomohiro, Imoto Issei, Haga Yoshimi, Seino Junichi, Suzuki Tadashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Siblings with MAN1B1-CDG Showing Novel Biochemical Profiles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3117 ~ 3117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10113117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Haga Yoshimi, Ueda Koji	4. 巻 39
2. 論文標題 Glycosylation in cancer: its application as a biomarker and recent advances of analytical techniques	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glycoconjugate Journal	6. 最初と最後の頁 303 ~ 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10719-022-10043-1	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 -
1. 著者名 Nakajima Kazuki, Takahashi Kazuo, Yamaguchi Yoshiki, Shinohara Yasuro, Kaji Hiroyuki, Furukawa Jun-ichi, Suzuki Akemi, Haga Yoshimi, Ueda Koji, Suda Yasuo, Hirabayashi Yoshio, Furukawa Kiyoshi, Yamamoto Kazuo, Kawasaki Toshisuke, Honke Koichi	4. 巻 1
2. 論文標題 Structural Analysis of Glycans (Analytical and Detection Methods)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glycoscience: Basic Science to Applications	6. 最初と最後の頁 3 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-13-5856-2_1	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 -
1. 著者名 Nishihara Shoko, Toyoda Masashi, Kizuka Yasuhiko, Kawamura Yuki I., Nakano Miyako, Haga Yoshimi, Ueda Koji	4. 巻 3
2. 論文標題 Glycan Function in Development and its Regulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glycoscience: Basic Science to Applications	6. 最初と最後の頁 191 ~ 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-13-5856-2_11	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshimi Haga and Koji Ueda
2. 発表標題 Structural characterization of N-glycan microheterogeneity on PD-L1 for development of novel companion diagnostics
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshimi Haga, Motohide Uemura, Kengo Takeuchi, Norio Nonomura, Koji Ueda
2. 発表標題 Multisialylated LacdiNAc structures on PSA (PSA G-Index) as a highly specificity-enhanced secondary biomarker for prostate cancer
3. 学会等名 HUP02019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芳賀淑美、植村元秀、赤松秀輔、稲村健太郎、竹内賢吾、小川修、野々村祝夫、植田幸嗣
2. 発表標題 前立腺癌特異的PSA糖鎖構造の同定による新規な前立腺癌診断アルゴリズムPSA G-Indexの構築
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshimi Haga and Koji Ueda
2. 発表標題 A novel glycoform profiling technology SFC-Erexim for rapid and precise quality control of therapeutic antibodies
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 箱崎 勇治、山田 雄太、峯岸 ゆり子、芳賀 淑美、久米 春喜、植田 幸嗣
2. 発表標題 エクソソーム中変異タンパク質パネルによる新規腎癌診断技術開発
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 箱崎勇治、峯岸ゆり子、芳賀淑美、山田雄太、久米春喜、植田幸嗣
2. 発表標題 エクソソーム内包変異タンパク質検出による新たな腎癌バイオマーカー開発
3. 学会等名 第8回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuriko Minegishi, Kazuma Kiyotani, Kensaku Nemoto, Yoshikage Inoue, Yoshimi Haga, Risa Fujii, Naomi Saichi and Koji Ueda
2. 発表標題 Global Immunopeptidomics by Differential Ion Mobility Mass Spectrometry for Identification of Patient Specific HLA-Presented Antigens Directly from Clinical Tissues
3. 学会等名 HUPO ReCONNECT 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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