

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09097

研究課題名(和文) ポストゲノム解析：糖結合レクチンによる胃癌プロファイリングと新規診断、治療法探索

研究課題名(英文) Glycan expression profile of scirrhous gastric cancer

研究代表者

明石 義正 (Akashi, Yoshimasa)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50709722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：スキルス胃癌は包括的大規模ゲノム解析において遺伝子変異が乏しいゲノム安定型(GS: genomic stable)に分類され、がん細胞表面の膜蛋白を標的とした分子標的薬剤や腫瘍免疫賦活治療の効果も乏しく予後は不良である。本研究では癌細胞の最外層に存在する糖鎖に着目し網羅的レクチンマイクロアレイによりスキルス胃癌細胞への親和性が高い11種類のレクチンと低い8種類のレクチンを同定した。また、高親和性レクチンのうちrBC2LCNレクチンは生体への投与が可能で、薬物複合体を用いたマウス実験でスキルス胃癌モデルマウスに対する抗腫瘍効果を示すことが明らかとなり、糖鎖標的薬物治療の可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未だ有効な薬物治療がなく予後が不良なスキルス胃癌に対して、従来の薬剤とは異なるがん細胞表面糖鎖を標的とした新規薬物治療が、有効である可能性を示すことができた。膀胱癌に対する先行研究を元に臨床応用に向けたレクチン薬物複合体の製剤開発が進んでおり、将来的にスキルス胃癌に対して新たな治療オプションとなる可能性があり、その治療成績を向上させることができるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Scirrhous type of gastric cancer is classified as a genomic stable (GS) subtype with few genetic alterations in a comprehensive large-scale whole genome analysis, and has a poor prognosis due to the lack of efficacy targeting drugs that target membrane proteins on the surface of cancer cells and tumor immunostimulating therapy. In this study, we focused on carbohydrate chains in the outermost layer of cancer cells and identified 11 lectins with high affinity to scirrhous gastric cancer cells and 8 lectins with low affinity by comprehensive lectin microarray. Among the high-affinity lectins, the rBC2LCN lectin can be administered to living animals and showed anti-tumor effects in murine scirrhous gastric cancer models by using a lectin-drug complex, indicating the possibility of sugar chain-targeted drug therapy.

研究分野：腫瘍学

キーワード：スキルス胃癌 糖鎖 レクチン rBC2LCN シアリル化糖鎖 薬物治療

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーを用いた胃癌に対する包括的ゲノム解析により、胃癌は4つのゲノム型に分類されるようになった<sup>1</sup>が、難治性のスキルス胃癌を含むびまん浸潤型胃癌は、この中でゲノム安定型(GS: genomically stable)に含まれ、ゲノムを標的とした治療薬は現時点ではない。近年、全エクソーム解析により RHOA 遺伝子変異がスキルス胃癌症例で同定され、創薬への応用が期待されるが、その変異頻度はスキルス胃癌全体の約 1/4 であり、遺伝子や膜タンパクを標的とした薬剤開発には限界がある。

細胞表面には膜タンパクの更に外側に糖鎖が無数に表出しており、筑波大学消化器外科では、膵癌に対して、膵癌幹細胞特異的に表出する糖鎖 H type3 とそれに反応するレクチン rBC2 を同定し、このレクチンを緑膿菌外毒素(PE38)と結合したレクチン-トキシン融合薬(rBC2-PE38)を開発した。この融合薬は、in vitro での IC50 が従来の抗体-毒素融合薬の約 1000 倍の殺細胞効果を示し、膵癌細胞株移植モデルだけでなく、ヒト膵癌移植マウスモデルでも極めて高い腫瘍抑制効果、延命効果を示した<sup>2</sup>。この結果を踏まえ、難治性癌に対する新規治療薬候補として前臨床試験へと開発が進められている。

スキルス胃癌と膵癌は間質が豊富で薬剤送達が困難という共通項があり、膵癌で得られた治験を応用できる可能性がある。そこで、スキルス胃癌細胞の特異的糖鎖配列を同定すること、及びその糖鎖に結合するレクチンを応用した新規薬物治療の実現可能性について検証すること着想した。

### 2. 研究の目的

スキルス胃癌に特異的な糖鎖発現プロファイルを通常型胃癌(腺癌)との比較によって探索し、糖鎖を標的とした新規薬物治療への応用可能性を検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 胃癌細胞株を用いた網羅的レクチンマイクロアレイ

レクチンマイクロアレイは癌細胞や癌幹細胞などの蛋白抽出液を振りかけると、癌に特異的な糖鎖修飾パターン(グリコフォーム)が判明する。これを用いてスキルス胃癌由来の細胞株(KATO-III, NUGC-4)と通常型胃腺癌由来の細胞株(NCI-N87, SNU-1, MKN-45)の細胞表面に表出している糖鎖と結合するレクチンを解析し、スキルス胃癌と非スキルス胃癌の糖鎖発現の差異を検討。

#### (2) スキルス胃癌標的レクチンと胃癌細胞の結合性評価

レクチンマイクロアレイにより抽出された、スキルス胃癌に親和性の高いレクチンが結合する糖鎖の発現を胃癌細胞株の蛍光染色により評価。

#### (3) 臨床胃癌検体の免疫染色

手術で採取した臨床胃癌組織検体を用いて、スキルス胃癌親和性レクチンによる免疫染色で、その標的糖鎖の発現を解析。

#### (4) スキルス胃癌モデル動物に対する薬剤投与

スキルス胃癌細胞株を移植したマウスモデルを用いて、レクチン・薬物複合体による抗腫瘍効果を検証。

### 4. 研究成果

#### (1) スキルス胃癌親和性レクチンの同定

スキルス胃癌細胞株(SRC)と非スキルス胃癌細胞株(NSRC)に対してレクチンマイクロアレイを実施し、スキルス胃癌細胞に親和性の高いレクチン8種類(図1、オレンジ矢印)と通常型胃癌細胞株と比較して親和性の低いレクチン11種類が同定された(図1、青矢印)。8種類の高親和性レクチンのうち、最もSRCへの親和性が高い(SRC/NSRC比が高い)レクチンが rBC2LCN レクチンであることが判明した。

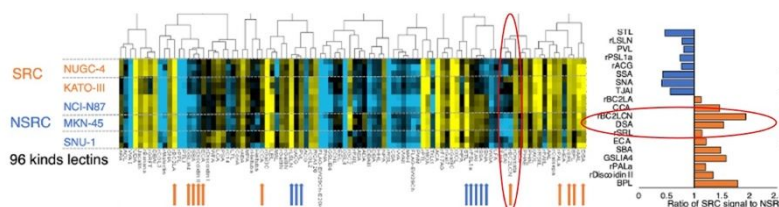


図1: スキルス胃癌(SRC)に特異的なレクチン(オレンジ矢印)の同定

( 2 ) rBC2LCN レクチンとスキルス胃癌細胞との結合性評価

蛍光標識した rBC2LCN レクチンはスキルス胃癌細胞株 ( NUGC-4, KATO-III ) の細胞表面に結合することが、免疫染色、及び Flow cytometry で確認でき、また、rBC2LCN レクチンと緑膿菌外毒素を結合した薬物複合体により、殺細胞効果を示すことが確認された ( 図 2 )

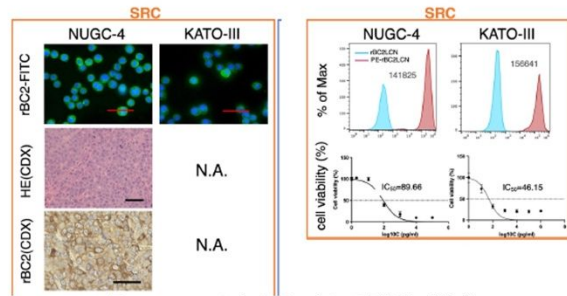


図 2 : rBC2LCNレクチンとスキルス胃癌細胞の結合性

( 3 ) 臨床胃癌検体の免疫染色

臨床手術検体プレパラートを用いた rBC2LCN 免疫染色ではスキルス胃癌症例は全例で 2+以上の強陽性を示した。一方で、非スキルス胃癌においても陽性所見は認められたが、その多くは 1+の弱陽性であり、スキルス胃癌との結合性が高いことが再現された ( 図 3 )

( 4 ) スキルス胃癌モデル動物に対する薬剤投与

ヌードマウス皮下にスキルス胃癌細胞株 ( NUGC-4 ) を移植したマウスモデルを作成し、rBC2LCN レクチンと緑膿菌外毒素 ( PE38 ) を結合したレクチン薬物複合体 ( LDC: lectin drug conjugate ) を腹腔内投与したところ、腫瘍増殖抑制効果を示した ( 図 4 左 )。一方で、マウスの体重は control との差を認めず、重篤な有害作用はないと考えられた ( 図 4 右 )

以上からスキルス胃癌に特異的な糖鎖 rBC2LCN レクチンを用いた糖鎖標的薬物治療はスキルス胃癌に対する新規治療法として臨床応用できる可能性を示すことができた。

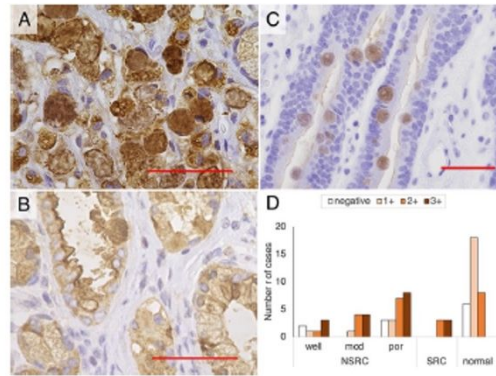


図 3 : 臨床胃癌組織における rBC2LCN 免疫染色

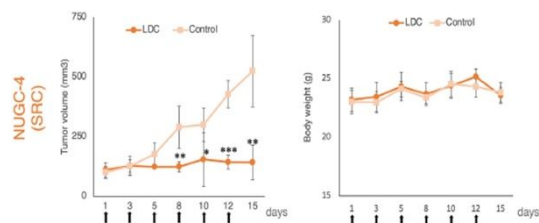


図 4 : スキルス胃癌モデル ( NUGC-4 移植マウス ) に対するレクチン薬物複合体 ( LDC ) の抗腫瘍効果

< 引用文献 >

1. Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, Reynolds SM, Miller M, Bernard B, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. Nature. 2014;513(7517):202-9.
2. Shimomura O, Oda T, Tateno H, Ozawa Y, Kimura S, Sakashita S, et al. A novel therapeutic strategy for pancreatic cancer: Targeting cell surface glycan using rBC2LCN lectin-drug conjugate (LDC). Mol Cancer Ther. 2018;17(1):183-95.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Kitaguchi Daichi, Oda Tatsuya, Enomoto Tsuyoshi, Ohara Yusuke, Owada Yohei, Akashi Yoshimasa, Furuta Tomoaki, Yu Yang, Kimura Sota, Kuroda Yukihito, Kurimori Ko, Miyazaki Yoshihiro, Furuya Kinji, Shimomura Osamu, Tateno Hiroaki	4. 巻 111
2. 論文標題 Lectin drug conjugate therapy for colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4548 ~ 4557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14687	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 Yang Yu, Akashi Yoshimasa, Shimomura Osamu, Tateno Hiroaki, Saito Sayoko, Hiemori Keiko, Miyazaki Yoshihiro, Furuta Tomoaki, Kitaguchi Daichi, Kuroda Yukihito, Pakavarin Louphrasitthiphol, Oda Tatsuya	4. 巻 25
2. 論文標題 Glycan expression profile of signet ring cell gastric cancer cells and potential applicability of rBC2LCN-targeted lectin drug conjugate therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 896 ~ 905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-022-01312-x	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshimasa Akashi, Yu Yang, Osamu Shimomura, Yoshihiro Miyazaki, Tatsuya Oda, et al.
2. 発表標題 Glycan expression profile of signet gastric cancer and potential applicability of lectin drug conjugate
3. 学会等名 第94回日本胃癌学会
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	小田 竜也  (Oda)  (20282353)	筑波大学・医学医療系・教授    (12102)	
研究分担者	下村 治  (Shimomura)  (60808070)	筑波大学・医学医療系・講師    (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