

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390173

研究課題名（和文）改変レクチンおよび特異的抗体を用いた腫瘍マーカーの選択的バイオイメージング

研究課題名（英文）Bioimaging of tumor markers using both engineered lectins and antibodies

研究代表者

山本 一夫（YAMAMOTO KAZUO）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20174782

研究成果の概要（和文）：本研究では、病態に付随した糖タンパク質の量的変動を特異的なモノクローナル抗体で捉え、かつ糖鎖修飾という質的变化を改変レクチンプローブを用いて検出することにより、腫瘍マーカーを精度良くイメージングすることを目標とした。本研究では、がん糖鎖抗原特異的な改変レクチンのスクリーニングを 2 種類の方法で行い、複数のクローンを単離した。取得した改変レクチンの Fc 融合タンパク質は、いくつかのがん細胞株や組織切片を特異的に染色し、抗体と合わせることで、より良い診断法になり得ることが示された。

研究成果の概要（英文）：It is crucial to identify biomarkers that are highly selective and sensitive in the diagnosis of cancers. We aimed to make a diagnosis platform using both antibodies and engineered lectins for detecting increased glycoprotein expression and alteration of sugar moieties accompanied with tumor progression, respectively. Two kinds of methods were applied to screen engineered lectins from randomly substituted lectin library, and several clones specific for tumor-associated glyco-antigens were obtained. Some cancer cells and specimens clearly stained with Fc-fusion proteins of these engineered lectins, which indicated that it would be a selective tool for diagnosis along with a specific antibody.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：生化学、糖鎖生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：レクチン、腫瘍マーカー、がん糖鎖抗原、イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

これまで、植物マメ科レクチンを主な対象として、詳細な糖結合特異性の解析、構造解析、糖結合部位の同定、構造と特異性の相関

などについて研究をしてきた。また、抗体の超可変部位に類似する variable binding loop を見だし、これをランダムなアミノ酸で置換したライブラリーの中から、異なる糖

結合特異性を持つ人工レクチンの探索も行ってきた。この技術を広く応用する目的で、さまざまなタンパク質発現系を用いて種々の人工レクチン分子を作成する技術を確立し、更には人工レクチンを用いたレクチンチップの作成なども行ってきた。一方、改変レクチンライブラリーのスクリーニングに関しては、レポーター細胞を用いた cell surface display の系を用いるが、この系は弱い相互作用を検出するための高感度な系として確立したものであり、数少ないクローンを効率的に濃縮・単離するのに適している。

このような過去のレクチンに関する研究実績に加え、糖転移酵素に着目して、それらの発現変動を遺伝子チップを用いた網羅的な解析をおこない、ヒト膵癌および肺腺癌に特徴的な発現変動を明らかにした。さらに、この発現変化で新たに作られる糖鎖構造の確認、その糖鎖を提示している糖タンパク質の同定を行い、血清診断による可能性を検討した。最終的に、膵臓癌と肺腺癌にそれぞれ特徴的な、シアリル LeX 糖鎖抗原および triplet Tn 糖鎖抗原を明らかにし、さらに、これらの特徴的な糖鎖を提示している糖タンパク質をそれぞれ複数同定し、これらに対するモノクローナル抗体を複数取得している。血清診断では腫瘍組織を特定できず治療には直結できないことから、今回は、腫瘍マーカー分子に対する特異抗体と今回作成するがん糖鎖抗原を認識する改変レクチンを同時に用いることにより、がん糖鎖抗原を持つ腫瘍マーカー分子を発現した細胞・組織を特定し、定量的にイメージングすることを目標とする。

## 2. 研究の目的

タンパク質の機能調節には、転写・翻訳レベルで量を増減させ活性を制御する「量的な調節」と、翻訳後修飾により ON/OFF を切り替える「質的な調節」がある。がんなどの病態においては、これらの機能調節が破綻した状態であると考えられることから、これらの量と質の変化を同時に捉えることにより、精度の高い診断が初めて可能になる。腫瘍マーカーとして糖タンパク質を想定した場合、それらを的確に見つけ出しイメージングするには、病態に付随した腫瘍マーカーの異所的な発現（すなわち、量の変動）を特異的なモノクローナル抗体で捉えると同時に、糖鎖修飾に代表される質的な変化をあらたなプローブを用いて検出し、両者で判断することがもっとも適切な手法と考えられる。

がんの診断に用いられる腫瘍マーカーの多くは、糖鎖抗原であるという明確な事実がある。また種々のがんにおける糖鎖構造のがん性変化に関して多くの報告があるように、糖鎖抗原はがんの病態を鋭敏に反映する良

いマーカーである。糖鎖に対する抗体の取得は困難なため、腫瘍マーカーの質的な変化を捉えるプローブとして、本研究ではがん糖鎖抗原を標的とした「人工改変レクチン」を用いる。糖鎖の構造変化を的確に捉えることができれば、その糖鎖構造をもつタンパク質の異所的発現を合わせて知ることにより、より選択性の高いがんの診断・治療に有効な分子イメージング法の確立が大いに期待できる。

そこで本研究では、第一に、がん糖鎖抗原を標的とする、糖結合特異性を改変した改変レクチンプローブを二種類のスクリーニングを用いて作成すること、第二に、改変レクチンと共に、既に取得している腫瘍マーカー候補タンパク質に対するモノクローナル抗体を合わせて用いることにより、「質と量の変化」を同時に捉え、高感度かつ精度良く *in vivo* で腫瘍組織をイメージングする手法を確立することを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) がん糖鎖抗原特異的な改変レクチンのスクリーニング：実験に供するレクチンは、植物マメ科レクチンを用いた。このレクチンは、多様な特異性を持ち得る例外的なレクチンファミリーの一つである。このファミリーの中から、BPA, PNA, SML, ECorL, LBL, CPA, PHA-E, PHA-L の 8 種類のレクチンをコードする cDNA をクローニングした。まず、これらのレクチンをコードする cDNA の C 末端側に、CD8 膜貫通ドメインおよび CD3 $\zeta$  細胞質ドメインを繋いだキメラ分子とし、pMXs ベクターに組み込み動物細胞表面に発現させたところ、2 種類のレクチンに関して、細胞表面にレクチンが発現し、且つ糖結合活性が確認できた。次に、これら 2 種類のレクチンを骨格として、これらの糖認識部位を構成する variable binding loop にランダムなアミノ酸を導入した人工レクチンライブラリーを作成した。当初、ループ長は変えずにランダムなアミノ酸で置換したが、それに加えて、1 から 4 アミノ酸残基の鎖長を長くしたライブラリーの作成も行った。cell surface display 法を用いるため、改変レクチンの細胞は GFP レポーター遺伝子を持つ T 細胞株 2B4 を用いた。

第 1 のスクリーニング法は、糖鎖ポリマーまたはネオ糖タンパク質を固相化したプレートに上記のライブラリー発現細胞を蒔き、一晚培養、レポーター細胞内に発現誘導された GFP の蛍光を指標にフローサイトメトリーで陽性細胞（陽性側 0.1%以内）を選別した。糖鎖は Tn 抗原 (GalNAc-Ser/Thr)、および LeX 抗原 (Gal $\beta$ 1,4(Fuc $\alpha$ 1,6)GlcNAc) を含むさまざまながん糖鎖抗原およびそれに類似の糖をポリアクリルアミドに結合させた糖鎖ポリマーを用いた。選別を 3-5 回繰り返した

後にクローン化を行った。また、クローン化した細胞からゲノムを抽出し、これを鋳型に挿入した改変レクチン遺伝子をPCRにて増幅した。得られた改変レクチンをpBluescriptに挿入し、20クローンをランダムに選択、その塩基配列から改変レクチン候補遺伝子を特定した。得られた改変レクチン候補遺伝子が各クローン化細胞から2~3種類見出されたので、それぞれのcDNAをpMXs発現ベクターにリクローニングし、さらに2B4細胞に発現させて、同じ糖鎖から刺激が入るか否かを検討した。

(2) がん細胞に結合する改変レクチンのスクリーニング：第2のスクリーニング方法として、標的分子を規定することなく、がん細胞に特異的に結合するという基準でスクリーニングを行った。上記の改変レクチン発現細胞は、細胞表面に提示されたレクチンがリガンドと結合することにより細胞内にGFPタンパク質が発現誘導される。そこで、これらの細胞を、肺腺癌細胞株A549重層し18時間培養、GFP陽性細胞を単離することを試みる。GFP陽性細胞を単離する方法は、ネオマイシン耐性およびGFP陽性であることを指標に、ネオマイシン存在下での培養とフローサイトメトリーで選別した。これを数回繰返し、A549細胞特異的に集積する改変レクチン発現細胞株を単離・クローン化し、上記の方法と同様に改変レクチン候補遺伝子を特定した。さらに、個々のcDNAをpMXs発現ベクターにリクローニングし、さらに2B4細胞に発現させて、A549細胞から刺激が入るか否かを検討した。

(3) 人工レクチンの発現・精製：上記で単離した改変レクチン発現細胞クローンから改変レクチン遺伝子をPCRで単離し、大腸菌用の発現ベクターpColdに組み込み発現させ精製した。また、他の抗体と比較検討するために、Fc(IgG)融合タンパク質用の発現ベクターpRC-CMV及びpCAGGSにリクローニングし、293T細胞で発現させた。大腸菌で発現させた組換え体改変レクチンは、リフォールディング後、糖を固相化したアフィニティカラムに結合し糖で溶出された活性をもつ画分を回収した。また、マウス赤血球を用いて、赤血球凝集試験を行い、活性の確認を行った。Fc融合タンパク質に関しては、プロテインGのアフィニティカラムおよびイオン交換カラムを組み合わせて、培養上清から精製を行った。Fc融合タンパク質の活性は、リガンド糖鎖を固相化したELISAプレートあるいはA549細胞を固相化したプレートに対して、希釈系列を作り、反応性を調べた。

(4) 改変レクチンによるヒトがん細胞パネ

ル・病理切片を用いた特異性の検討および *in vivo* イメージングの検討

一方、がん糖鎖抗原に対する特異性を検証する必要があり、ヒトがん細胞パネルを用いて、これらに対する結合特異性を調べた。改変レクチン発現レポーター細胞とFc融合タンパク質の両者を用いて、フローサイトメトリーで定量を行い比較検討した。また、ヒト肺腺癌および乳がんの病理組織切片に対して、改変レクチンFc融合タンパク質による染色を行なった。*in vivo* イメージングについては、改変レクチンおよびモノクローナル抗体を蛍光標識した後、A549細胞の担癌ヌードマウスに静注して検出を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) がん糖鎖抗原特異的な改変レクチンのスクリーニング：がん糖鎖抗原特異的な改変レクチンのスクリーニングを2種類の方法で行った。改変レクチンの作製は、マメ科レクチンをスキヤフォールドとして用い、この糖結合部位にランダムなアミノ酸を導入しレクチンライブラリーとし、マウスT細胞2B4の表面に発現させた。ライブラリーはループの長さの異なる5種類を作成し、ライブラリーの数はいずれも106以上であった。8種類のマメ科レクチンを検討したが、そのうち、2種類のレクチンに関して細胞表面にレクチンの発現が確認された。他の6種類は何らかの理由で発現が確認できなかった。その際、CD8由来のストークおよび膜貫通ドメイン、CD3zetaの細胞質ドメインを用いることにより、レクチンの糖鎖結合による架橋刺激をGFPの発現誘導でモニターできる *in vitro* の実験系を構築した。Tn抗原等を固相化したプレート上で上記の改変レクチン発現細胞を培養し、GFP陽性の細胞をセルソーターで濃縮する操作を3回繰り返したところ、陽性率が0.1%以下から5-30%まで濃縮することができた。これら濃縮した細胞集団から限界希釈法によってクローン化し、単離したゲノムを鋳型に改変レクチン遺伝子をPCRにより増幅した。一つのクローンから2~3種類の改変レクチン候補遺伝子が見出されたが、これらのいずれが機能していたかを確認するために、それぞれのcDNAをpMXsベクターに組みこみ、2B4細胞表面に発現させることにより、活性の確認を行い、最終的に3種類の活性を持つ改変レクチンを特定した。取得した各改変レクチンクローンの糖認識部位のアミノ酸配列を比較したところ、保存したアスパラギンの2残基N末寄りのアミノ酸がTrpまたはTyr、3つC末寄りのアミノ酸がTyrまたはPheという規則性を持っていた。逆に糖結合活性を示さなかった計20種類のクローンでは、この規則性を満たさなかった。

(2)がん細胞に結合する改変レクチンのスクリーニング:

in vivo スクリーニングを目指し、ヒト肺腺癌 A549 細胞株に特異的に結合する改変レクチンを単離するために、ネオマイシン耐性をマーカーに選別をすることとし、新たなライブラリーの作製を行った。これらの改変レクチン発現細胞ライブラリーを、A549 細胞上に振りかけて一晚培養した。GFP 陽性 (上位 0.1%) の細胞集団をフローサイトメトリーで回収し、拡大培養後、同様のスクリーニングを繰り返し行った。このスクリーニングでは A549 細胞の混入を排除するために、ネオマイシンを添加して改変レクチン発現細胞のみを選別した。4 回のスクリーニングを繰り返した後、(1)と同様にクローニングし、改変レクチン候補遺伝子を単離した。活性の確認を行い、最終的に 1 種類の活性を持つ改変レクチンを特定した。この改変レクチンが A549 を特異的に認識することは確認できたので、次にリガンドが何であるかを調べた。A549 細胞をトリプシン処理、グリコシダーゼ処理、N 型糖鎖プロセッシングの阻害剤であるキフネンシン、スワインソニン、ノジリマイシン等を処理した細胞に対する結合を調べたところ、キフネンシン処理でその結合が有意に増強した。このことは、取得した改変レクチンが高分子量の高マンノース型糖鎖を認識していることを示唆している。このスクリーニング手法は必ずしも糖鎖を認識することにこだわらずに行ったが、結果として糖鎖に結合するクローンが単離できたことは、マメ科レクチンのスキュプフォルドが糖鎖認識に有利である可能性が考えられた。

(3)人工レクチンの発現・精製: 上記でがん糖鎖抗原特異的な改変レクチンのスクリーニングを 2 種類の方法で行い、特異的な改変レクチンクローン計 4 種類を取得した。この 4 種類の改変レクチンを用いて、イメージングに用いるための改変レクチンプローブの作成を行った。第一に、改変レクチンはマメ科レクチンの骨格をもち 2 量体あるいは 4 量体となることが期待されたため、特に修飾することなく、改変レクチン cDNA を大腸菌で発現させた。リフォールディングに成功した 3 種類の組換え体改変レクチンを用いてマウス赤血球を用いた凝集反応を調べたところ、2 種類に活性が認められた。第二に、組織切片の染色を目的として、免疫グロブリン (IgG) の Fc 領域との融合タンパク質の作成を行った。2 種類の発現ベクターを用いて作成し 293T 細胞で発現させたところ、pRC-CMV より pCAGGS の方が発現効率が数倍良く、また 4 つのクローンのうち 3 種類の発現に成功した。Fc 融合タンパク質は培養上清に 2 量体として分泌され、プロテイン G カラム、ならびにイ

オン交換カラムで精製を行った。

(4)改変レクチンによるヒトがん細胞パネル・病理切片を用いた特異性の検討および in vivo イメージングの検討: これら 4 つのクローンと各種がん細胞株との反応性を改変レクチン発現レポーター細胞を用いて調べたところ、特にクローン 2B1 は扁平上皮癌である ME180 および Ho-1-u-1 細胞に特異的に結合し、他のがん細胞株には結合しなかった。(3)で作成した組換え体タンパク質を用いて種々のヒトがん細胞株を染色したところ、特に Fc 融合タンパク質において明確な活性が認められた。レポーター細胞を用いてスクリーニングを行った際の特異性と大きな相違はなく、いくつかのがん細胞株に対して特に強い結合性を示した。また、Fc 融合タンパク質を用いてヒト肺腺癌および乳がん組織切片の染色も行った。ヒトがん患者の血清サンプルが入手できなかったため、A549 細胞の cell lysate 等に対して、別個に取得した HSP90 に対するモノクローナル抗体 2 種類と組み合わせて、サンドイッチ ELISA の系を確立した。

## 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 4 件)

- ① Y. Chen, D. Hu, R. Yabe, H. Tateno, S. Qin, N. Matsumoto, J. Hirabayashi, K. Yamamoto.: Role of Malectin in Glc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-dependent quality control of  $\alpha$ 1-antitrypsin. 査読有 Mol. Biol. Cell 22, 3559-3570 (2011)
- ② A. Akatsuka, M. Ito, C. Yamauchi, A. Ochiai, K. Yamamoto, and N. Matsumoto.: Tumor cells of non-haematopoietic and haematopoietic origins express activation-induced C-type lectin, the ligand for killer cell lectin-like receptor F1. 査読有 Int. Immunol. 22, 783-790 (2010)
- ③ K. Mikami, D. Yamaguchi, H. Tateno, D. Hu, S. Qin, N. Kawasaki, M. Yamada, N. Matsumoto, J. Hirabayashi, Y. Ito, K. Yamamoto.: The sugar-binding ability of human OS-9 and its involvement in ER-associated degradation. 査読有 Glycobiology 20, 310-321 (2010).
- ④ D. Yamaguchi, D. Hu, N. Matsumoto, K. Yamamoto.: Human XTP3-B binds to  $\alpha$ 1-antitrypsin variant null Hong Kong via the C-terminal MRH domain in a glycan-dependent manner. 査読有 Glycobiology 20, 348-355 (2010)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：レクチン提示細胞、レクチンライブラリー、及びレクチンのスクリーニング方法

発明者：山本一夫

権利者：東京大学

種類：特許

番号：PCT/JP2012/052728

出願年月日：2012年2月7日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/iyaku/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本一夫 (YAMAMOTO KAZUO)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20174782