

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659695

研究課題名(和文) 中枢神経原発悪性リンパ腫のN結合型糖たんぱく糖鎖解析から分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Isolation and characterization of an N-linked oligosaccharide that is increased in primary central nervous system lymphoma tissue and cell lines.

研究代表者

山中 龍也 (YAMANAKA, RYUYA)

京都府立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20323991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)34例は全て瀰漫性大細胞性Bリンパ腫であった。診断後に、高用量メトトレキサート単独ないし多剤併用化学療法による化学療法を受け、外照射療法および再発時に多剤併用化学療法を受けた。全症例の5年生存率は46.3%であった。

PCNSLの腫瘍組織を用い、N結合型糖鎖を自動化、簡易化されたHPLCシステムを用いて解析した。21種類の異なるピークが得られ、糖鎖の構造決定がなされた。現在、さらにPCNSLに特異的な糖鎖を探索すべく解析を進めている。標的糖鎖が明らかになりしだい、in vitro, in vivoの実験を進め、診断・治療の分子標的の開発に向けた研究を進める。

研究成果の概要(英文)：We have isolated and characterized N-linked oligo-saccharides that are significantly increased in primary central nervous system lymphoma (PCNSL) tissue and cell lines. The structures of N-linked oligosaccharides present in 3 human normal brain tissues, 34 patients with PCNSL and 1 PCNSL cell lines were analyzed by partially automated technique for the isolation and fluorescent labeling of N-linked sugar chains from glycoproteins. Characterization of the sugar chains was achieved with the use of a combination of HPLC columns and a highly sensitive fluorescence detector at femtomole levels. By collecting peaks which accounted for 0.1% or more, twenty-one different oligosaccharide structures were characterized. The amount of specific structure for PCNSL is now under investigation. Oligo-saccharides in specimens may provide a novel marker and target for the diagnosis and treatment of PCNSL, respectively.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：中枢神経原発悪性リンパ腫 糖タンパク糖鎖

1. 研究開始当初の背景

中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)は中枢神経系に原発する節外性非ホジキン型リンパ腫で、多くはB細胞リンパ腫である。しかし、全身性に発生する瀰漫性大細胞性B細胞リンパ腫とは遺伝学的に異なるものと考えられている。PCNSLはその頻度は最近増加している。本邦では標準治療としてHigh dose Methotrexate (HD-MTX) 化学療法終了後、全脳放射線治療が広く行われている。しかしながら、本治療法の問題点として整理してみると、

- 1) 5年生存率は約30%と、全身性非ホジキンリンパ腫と比べ著しく不良である。
- 2) 副作用として晩発性の神経毒性がある。
- 3) 多くは再発し治療抵抗性となり、新たな治療スケジュールの開発が待たれている。

今後は、臨床試験を通じて、より有効で、副作用の少ない治療法を開発する必要がある。こうした現況からも、PCNSLの多角的な細胞生物学的研究の発展が必要である。

ポストゲノム研究が21世紀のライフサイエンスの中心的課題の一つであるが、その中でも糖鎖による修飾反応はタンパク質の50%以上に見られ、タンパク質の機能や構造に大きな影響を与える事がわかっている。糖鎖の機能異常は腫瘍細胞の浸潤、転移とも大きく関わると考えられる。こうした事からも腫瘍の蛋白解析だけでなく、糖鎖の修飾反応も含め多角的に解析する必要がある。共同研究者の池中は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた糖蛋白質糖鎖の解析方法を開発し(J Biochem 129: 537-42,2001; Anal Biochem 267:336-43,1999)、正常脳における解析の結果、糖鎖パターンが個体差なく良く保存されている事を明らかにした。

我々は悪性脳腫瘍におけるN結合型糖蛋白質糖鎖の解析から、(Gal β 1,4-GlcNAc β 1,2-Man α 1,3-) (Gal β 1,4-GlcNAc β 1,2-Man α 1,6-)Man 1,4-GlcNAc β 1,4-(Fuc

α 1,6-)GlcNAc, 以下A₂G₂F)という糖鎖が正常脳組織には発現せず、悪性神経膠腫組織に特異的に発現していることを明らかにした。更に、A₂G₂Fに特異的に結合するLCAレクチンが神経膠腫細胞と特異的に結合しアポトーシスを誘導することを明らかとした(Int J Oncol 27:1231-9,2005:特許第4852703号:特許第5158577号)。

2. 研究の目的

PCNSLの腫瘍組織におけるN結合型糖蛋白質糖鎖の網羅的解析を行い、疾患特異的なマーカーを探索し、この分子を標的とする新たな診断技術・分子標的療法の開発を目指す。

PCNSLの特異的なマーカー分子が明らかとなり、この分子を用いた分子診断、分子標的治療の発展が期待される。糖鎖を標的としたLCAレクチン或はアプタマーに抗癌剤やアイソトープなどを包含することにより薬剤を病巣局所に集約させ生体の有害事象を最小限に食い止められる可能性がある。また、髄液・血清中の糖鎖を用いた診断が可能かどうか検討する。PCNSLは生検術で診断されるため、研究を行うための十分量の組織が得られず、国際的にも分子遺伝学的研究が進んでいない。我々は既にPCNSL50症例の凍結腫瘍組織・髄液・血清を保有しており、こうした研究が可能である。以上の研究を通じさらに、糖鎖の異常と腫瘍の病態病理に関する知見が得られる可能性がある。

3. 研究の方法

中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL) 50症例の組織をレーザーマイクロダイセクションを用いて組織から腫瘍細胞を取り出す。N結合型糖鎖を自動化、簡易化されたHPLCシステムを用いて解析する。PCNSLの疾患特異的な糖鎖を検討する。また、臨床情報も参考に糖鎖の発現パターンと予後、治療反応性の相関関係の解析を行い、バイオマーカーを選択する。対象

症例の選択、臨床情報の整理、および患者・その家族から解析の同意書の取得を行う。

標的糖鎖が明らかになったら、LCA レクチンまたはアプタマーを作製する。LCA レクチンまたはアプタマーに抗癌剤を包含し、PCNSL 培養細胞を用いて in vitro で細胞障害能を検討する。

また、坦脳リンパ腫マウスを用いて、in vivo で LCA レクチンまたはアプタマー drug conjugate による治療効果について検討する。また、LCA レクチンまたはアプタマーに isotope 標識し、腫瘍の in vivo imaging をマウスを用いて検討する。

さらに、髄液や血清を用いた糖鎖診断が可能かどうか、PCNSL 患者の髄液および血清を用いて ELISA をベースとした解析により検討する。

4. 研究成果

2000 年～2010 年に外科的切除ないし生検術を受けた患者 34 人から、中枢神経原発悪性リンパ腫標本を得た。患者の平均年齢は 65.5 歳 (44-76 歳) であり、男性 19 人、女性 15 人であった。病理組織学的には全て瀰漫性大細胞性 B リンパ腫であった。腫瘍の診断後に、患者は高用量メソトレキセート単独ないし高用量メソトレキセートを含む多剤併用化学療法による第一選択化学療法を受け、外照射療法 (標準線量 20-40 Gy) および再発時に多剤併用化学療法を受けた。初期治療および維持治療中の腫瘍の再発について、MRI または CT により観察した。全症例の 5 年生存率は 46.37%であった。

PCNSL の腫瘍組織を用いて N 結合型糖鎖を自動化、簡易化された HPLC システムを用いて解析を行った。

表 1 の「%Total」は記入してある糖鎖とそのシアル酸化糖鎖の合計が全体の N-結合型糖鎖の何%あるのかを示す。

次の欄の「 $\alpha 2, 3$ 」はその糖鎖の中で、 $\alpha 2, 3$ 結合のシアル酸の付いている%を示す。「non $\alpha 2, 3$ 」は $\alpha 2, 3$ 結合以外で結合しているシアル酸糖鎖の%を示す。ほとんどが $\alpha 2, 6$ 結合と考えられる。

表 1. 症例 1 の糖鎖パターン

	%Total	$\alpha 23$	non $\alpha 23$
GM9	0.32	—	—
M9A	2.59	—	—
M8A	2.74	—	—
M7A	1.15	—	—
M7B	0.92	—	—
M6B	4.31	—	—
M5A	7.97	—	—
BA2	3.28	—	—
A2G0F	2.08	—	—
BA-1	1	—	—
LewisXa/b_BA2	7.97	—	—
Gab BA2	0.81	6.31	31.9
G2BA2	0.44	5.36	63.56
A2G2	22.5	0.54	91.41
A2G2F	2.77	1.2	66.4
A3G3	1.31	1.15	95.57
A3G3F	0.51	13.27	70.17
A4G4F	0.35	23.79	67.56
A2G1 (3) (6)F	2.22	3.86	33.05
UnknownP1 GU10.8	0.83	6.43	63.94
UnknownP2 GU10.6	1.69	0.63	99.36

糖鎖の GM9 から LewisXa/b BA2 は理論的にシアル酸化されない糖鎖である。その次の GabBA2 からシアル酸化される糖鎖である。症例 1 の GabBA2 に関しては、全体の N-結合型糖鎖の 0.81%あり、その中で 6.31%が $\alpha 2, 3$ シアル酸が結合しているものである。また、31.9%は $\alpha 2, 3$ 以外 (多分 $\alpha 2, 6$) の結合でシアル酸が結合している。

ほとんどのサンプルで $\alpha 2, 6$ が主に使われていることが分かった。ただ、血液だとほとんど $\alpha 2, 3$ が見つからないのに、少しは発現していることも明らかになった。

現在、さらに全症例の発現パターンから中枢神経原発悪性リンパ腫に特異的な糖鎖を探索すべく統計解析を進めている。標的糖鎖が明らかになりしだい、in vitro, in vivoの実験を進め、診断・治療の分子標的の開発に向けた研究を進める。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

1. Noguchi M, Mine T, Komatsu N, Suekane S, Moriya F, Matsuoka K, Yutani S, Shichijo S, Yamada A, Toh U, Kawano K, Azuma K, Uemura H, Okuno K, Matsumoto K, Yanagimoto H, Yamanaka R, Oka M, Todo S, Sasada T, Itoh K: Assessment of immunological biomarkers in patients with advanced cancer treated by personalized peptide vaccination. *Cancer Biol Ther* 10(12):1266-1279, 2011
2. Komohara Y, Horlad H, Ohnishi K, Ohta K, Makino K, Hondo H, Yamanaka R, Kajiwara K, Saito T, Kuratsu J, Takeya M: M2 macrophage/microglial cells induce activation of stat3 in primary central nervous system lymphoma. *J Clin Exp Hematop* 51(2):93-99, 2011
3. 吉田直久, 中村晃和, 松田清美, 菅谷和子, 富田英津子, 石川 剛, 八木信明, 古倉 聡, 内藤裕二, 山中龍也, 谷脇雅史, 吉川敏一, 三木恒治: 外来化学療法センターにおける症状チェックシートの有効性. *Progress in Medicine* 31(4):1163-1168, 2011.
4. Kawaguchi A, Yajima N, Komohara Y, Aoki H, Tsuchiya N, Homma J, Sano M, Natsumeda M, Uzuka T, Saitoh A, Takahashi H, Sakai Y, Takahashi H, Fujii Y, Kakuma T, Yamanaka R: Identification and Validation of a Gene Expression Signature That Predicts Outcome in Malignant Glioma Patients. *Int J Oncol*

40(3):721-730, 2012.

5. Kawaguchi A, Iwadata Y, Komohara Y, Sano M, Kajiwara K, Yajima N, Tsuchiya N, Homma J, Aoki H, Kobayashi T, Sakai Y, Hondoh H, Fujii Y, Kakuma T, Yamanaka R : Gene expression signature-based prognostic risk score in patients with primary central nervous system lymphoma. *Clin Cancer Res* 18(20): 5672-5681, 2012.
6. 山中龍也, 楠本華織: 脳腫瘍. 中川和彦, 西尾和人編, 分子標的薬-がんから他疾患までの治療をめざして. 日本臨床社, 東京, 421-427, 2012.
7. Kawaguchi A, Yajima N, Tsuchiya N, Homma J, Sano M, Natsumeda M, Takahashi H, Fujii Y, Kakuma T, Yamanaka R: Gene expression signature-based prognostic risk score in patients with glioblastoma. *Cancer Sci* 104(9): 1205-1210, 2013.
8. Takahashi R, Ishibashi Y, Hiraoka K, Matsueda S, Kawano K, Kawahara A, Kage M, Ohshima K, Yamanaka R, Shichijo S, Shirouzu K, Itoh K, Sasada T: Phase II study of personalized peptide vaccination for refractory bone and soft tissue sarcoma patients. *Cancer Sci* 104(10):1285-1294, 2013
9. Kon T, Natsumeda M, Takahashi H, Taki T, Fujii Y, Yamanaka R: Radiation-Induced Glioblastoma Following Radiotherapy for Pituitary Adenomas: Marked Response to Chemotherapy. *J Neurol Neurophysiol* 4: 155, 2013.
10. Iwadata Y, Suganami A, Ikegami S, Shinozaki N, Matsutani T, Tamura Y, Saeki N, Yamanaka R: Non-deep-seated primary CNS lymphoma - therapeutic responses and a molecular signature *J Neurooncol* 117(2):261-268, 2014

[学会発表](計 4 件)

1. 近 貴志, 山中龍也, 棗田 学, 藤井幸彦, 高橋 均: 下垂体腺腫に対する照射 22 年後に

meningioma,30年後に glioma を発症した 1 例、
第52回日本神経病理学会総会学術研究会、京
都、6月2日-4日、2011

2. 山中龍也、川口淳、角間辰行、酒井ゆうこ、
藤井幸彦:悪性神経膠腫患者の予後を予測する
遺伝子群の探索、第10回日本臨床腫瘍学会学
術集会、大阪、7月26日-28日、2012

3. 山中龍也、楠本華織、川口淳、青木洋、藤
井幸彦:悪性神経膠腫患者の予後を予測する遺
伝子群の探索、第71回日本癌学会学術集会、
札幌、9月19日-21日、2012

4. 山中龍也、川口淳、藤井幸彦、角間辰行:悪
性星細胞腫瘍患者の予後予測方法の探索、第
11回日本臨床腫瘍学会学術集会、仙台、8月
29日-31日、2013

[図書](計 3 件)

1. Yamanaka R: Medical management of brain
metastases from lung cancer. pp.253-266, In
Ana Lucia Abujamra(ed.), Brain Tumors /
Current and emerging therapeutic strategies.
INTECH, 2011.

2. Yamanaka R, Kajiwar K: Dendritic cell
vaccine. Pp187-200. In Yamanaka R (ed.),
Glioma:Immunotherapeutic approaches.
Landes Bioscience, Austin, Texas, 2012

3. Yamanaka R: Primary Central Nervous System
Lymphoma- Recent advance on clinical research.
pp461-470, In Terry Lichtor (ed.), Brain Tumors.
INTECH, 2013.

[産業財産権]

○出願状況(計 2 件)

名称:中枢神経原発悪性リンパ腫患者の予後予
測方法、キット及び使用

発明者:山中龍也、岩立康男、藤井幸彦、角間
辰之、川口淳、梶原浩司

権利者:新潟大学、千葉大学、久留米大学、山
口大学、京都府立医科大学

種類:特願

番号:2011-154664

出願年月日:平成 23 年 7 月 13 日

国内外の別: 国内

名称:発明の名称;悪性神経膠腫 Grade4 患者
の予後予測方法及びキット

発明者:山中龍也、藤井幸彦、角間辰之、川口
淳

権利者:新潟大学、久留米大学、京都府立医
科大学

種類:特願

番号:2013-124686:

出願年月日:平成 25 年 6 月 13 日

国内外の別: 国内

○取得状況(計 3 件)

名称:脳腫瘍の検出方法及びそれに用いる脳
腫瘍の検出物質

発明者:山中龍也、土屋尚人、池中一裕

権利者:新潟大学、国立共同研究機構

種類:特許

番号:第 4852703 号

取得年月日:平成 23 年 11 月 4 日

国内外の別: 国内

名称:HLA-A24 分子結合性 KIF 由来ペプチド

発明者:伊東恭悟、山中龍也、原田守

権利者:新潟大学、久留米大学

種類:特許

番号:第 5065273 号

取得年月日:成 24 年 8 月 17 日

国内外の別: 国内

名称:医薬組成物

発明者:山中龍也、土屋尚人、池中一裕

権利者:新潟大学、国立共同研究機構

種類:特許

番号:第 5158577 号

取得年月日:平成 24 年 12 月 21 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/c/kouza/igaku/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山中龍也 (Ryuya Yamanaka)

京都府立医科大学・医学部・教授

研究者番号:20323991

(2)研究分担者

池中一裕 (Kazuhiro Ikeaka)

自然科学研究機構・生理学研究所・教授

研究者番号: 00144527