

筑波大学

博士（医学）学位論文

疾患生物学に関連する生体内微量試料中
の糖鎖修飾意義の探求と情報の可視化

2020

筑波大学

我 妻 孝 則

【目次】

第一章:【序論】	2
第二章:【本研究の目的】	5
第三章:【ウイルス粒子上糖鎖修飾情報の可視化】	6
1.【B型肝炎ウイルス概論】	6
2.【方法】	8
3.【結果と考察】	12
4.【小括】	17
第四章:【組織細胞膜の糖鎖修飾情報の可視化】	18
1.【膵管腺癌概論】	18
2.【方法】	19
3.【結果と考察】	21
4.【小括】	25
第五章:【総括と展望】	27
【図表】	29
【謝辞】	48
【出典】	49
【引用文献】	50

第一章:【序論】

生体内における糖鎖修飾

糖鎖修飾は真核生物のタンパク質翻訳後修飾の一つとして広く知られている。タンパク質上で糖鎖を介した相互作用によって分子機能の制御や分子局在に関与しており、普遍的に生命事象の機能発現に関連している^{1,2}。タンパク質の特定のアミノ酸残基に糖鎖が付加することで大きく 2 種類の糖鎖修飾様式が盛んに研究されている。一つはアスパラギン (Asn) 残基への糖鎖付加であり、N-結合型糖鎖として知られている。もう一つはセリン (Ser) またはスレオニン (Thr) 残基の持つ水酸基側鎖への糖鎖付加で O-結合型糖鎖として知られる。

N-結合型糖鎖修飾はタンパク質翻訳過程において、小胞体腔内で新生鎖の Asn を含むコンセンサス配列 (-Asn-X-Ser/Thr: X はプロリン以外のアミノ酸) へ糖鎖付加される。この糖鎖は小胞体内腔に存在する分子シャペロンであるカルネキシン、カルレティキュリンによって認識されることで、生合成されたタンパク質の立体的な折りたたみが正常に行われるかを監視する、品質管理機構に関与する³。また、細胞膜上の成長因子受容体や細胞接着分子上に糖鎖付加することで、細胞外環境の認識センサーとして機能し、細胞応答を制御することが報告されている⁴⁻⁷。さらに、免疫機構でも糖鎖とタンパク質分子間の相互作用が言及されている。インターロイキン (IL-) 2 受容体に付加した N-結合型糖鎖はリガンドである IL-2 との相互作用に重要であり、細胞増殖等のシグナル制御に関与する^{8,9}。このように、N-結合型糖鎖はタンパク質安定性や分子間相互作用に寄与することが知られている。

O-結合型糖鎖修飾には、MUC1 などの細胞膜に局在する糖タンパク質に付加し、ムチン型糖鎖として知られるものがある^{10,11}。ムチン型糖鎖修飾は N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が付加することで糖鎖修飾が始まる。ヒトでは GalNAc 修飾に関連する遺伝子が 20 種類報告されており、アイソフォームによって生体内での発現分布が異なることが報告されている¹²⁻¹⁴。O-結合型糖鎖修飾は分泌糖タンパク質にも付加することが明らかになっており、免疫グロブリン A (IgA) では分子中ヒンジ部に付加した O-結合型糖鎖構造変化によって、ヒンジ部のアミノ酸残基へ相互作用し、ペプチド立体構造を変化させることが報告されている¹⁵。

このように、糖鎖修飾は細胞膜上分子から循環中の分泌タンパク質まで幅広く付加することで、分子機能や生理的イベントに関連することが明らかになっている。

疾患における糖鎖修飾の意義

糖鎖修飾は感染症や癌などの疾患でも関与することが報告されている¹⁶⁻¹⁸。外来因子であるウイルスは宿主細胞への感染や分泌過程において細胞膜上糖鎖構造を利用することが知られている^{16,19}。

A 型インフルエンザウイルスの感染過程において、ウイルス粒子上のヘマグルチニンと

宿主細胞膜上のシアル酸が相互作用することでウイルス粒子アタッチメントが始まる。近年、宿主細胞膜上の電位依存性カルシウムチャンネルに付加した N-結合型糖鎖の還元末端に存在するシアル酸がヘマグルチニンと直接的に相互作用することが明らかになり、糖鎖を介したインフルエンザウイルス感染に関連する細胞膜上糖タンパク質分子の一つが同定された²⁰。また、ノロウイルスの感染過程では腸管上皮細胞上に発現した糖鎖構造である ABO 血液型抗原や Lewis 血液型抗原に結合することが報告されており^{21,22}、種々のウイルス感染症における感染の成立過程と組織中に存在する糖鎖構造は密接に関連することが予想されている。

癌では細胞内の糖鎖生合成の異常な亢進や破綻等によって細胞表面の糖鎖修飾が変化することが示唆されている²³⁻²⁵。

大腸癌のホルマリン固定パラフィン包埋 (EEPE) 組織切片を用いた研究では、細胞膜上に存在する N-, O-結合型糖鎖修飾パターンが正常大腸組織細胞膜と比べ、異なることが報告されている²⁶。また、胆管細胞癌と膵管腺癌の FFPE 組織切片中に存在する、特定分子に注目した糖鎖修飾の比較解析も行われている。癌組織中の細胞膜上糖タンパク質として MUC1 を免疫沈降法 (IP) にて精製後、分子上糖鎖特異的に解析することで、腫瘍組織に依って同一分子でも糖鎖修飾が異なることが明らかになった²⁷。

これらの報告から、癌による糖鎖修飾の変化は分子レベルから組織全体まで幅広く生じることが予想される。

糖鎖の医工学応用

疾患による糖鎖修飾変化を用いた腫瘍マーカーが数多く開発されており、循環中に存在する糖鎖抗原を用いて各種腫瘍のスクリーニング・診断に利用されている。特に、4 糖構造からなるシアリル Lewis a は CA19-9 抗原として膵臓癌などの腫瘍マーカーとして知られている²⁸。また、肝細胞癌では分泌タンパク質である Alpha fetoprotein (AFP) 上の N-結合型糖鎖にコアフコースが付加したフォーム (AFP-L3 画分) は腫瘍マーカーとして利用されている²⁹。

また、腫瘍領域以外でも疾患マーカーとしての糖鎖修飾が注目されている。これまで、ウイルス性肝炎などに起因する肝臓関連疾患において、病態に影響を与える肝線維化の評価は侵襲的な肝生検が主な手段として用いられていた。産業技術総合研究所糖鎖医工学研究センター (産総研) の成松久、久野敦らは、C 型肝炎に感染した患者血清中で糖タンパク質 Mac-2 binding protein (M2BP) 上に付加する N-結合型糖鎖構造が肝線維化ステージに伴って変化することを見出した³⁰。この糖鎖構造変化は特定のレクチン (*Wisteria floribunda* agglutinin: WFA) を用いることで鋭敏に捉えることが可能であり、市販の *In vitro* 検査測定系に組み込むことで 20 分以内の迅速診断が実現された。また、2013 年からは薬価収載を受けたことで国内において広く臨床利用されている。

この事例は糖鎖修飾に注目した有用な医工学応用であり、我が国発の肝線維化診断系と

して各国で使用されている。

レクチンマイクロアレイ

糖鎖の部分構造を認識するレクチンは植物や動物、海藻類など自然界において多岐にわたって分布し、様々な生命事象に関与する³¹⁻³³。産総研では、レクチンの糖鎖結合特異性を解析し、データベース化することで糖鎖 - レクチン間相互作用の情報を公開している³⁴。これらの基礎的情報などを参考に、糖結合特異性などが異なる 45 種類のレクチンを用いたレクチンマイクロアレイが開発された^{35,36}。

各レクチンはアレイ基板上に固相化されており、相互作用した糖タンパク質を蛍光イメージにて画像化する。得られたレクチン反応性をもとに、糖鎖プロファイルとして試料中の糖鎖修飾情報を可視化するシステムである。

このシステムでは培養試料（細胞、培養上清、細胞外小胞など）、臨床試料（血清、FFPE 組織切片抽出物など）などで解析実例がある³⁷⁻⁴¹。また、特定の糖タンパク質に注目した糖鎖プロファイリングも可能であり⁴²、組織中グライコミクスから分子上糖鎖修飾まで網羅的に可視化する。また、エバネッセント場を用いた蛍光励起スキャナによって、高感度なシグナル検出が可能であり、精製度の高い糖タンパク質であればナノグラムレベルで解析に資する⁴²。さらに、得られたレクチン反応性は試料中の糖鎖修飾情報を直接的に反映しているため、該当するレクチンをプローブとした、さらなる解析系構築に応用することが期待できる⁴³⁻⁴⁵。

これらの特性から、レクチンマイクロアレイは生体由来試料等の限られた試料量での解析に適しており、微量糖タンパク質分子上の糖鎖修飾情報を可視化するのに有用なシステムである。

第二章:【本研究の目的】

ウイルス感染症や癌などの疾患生物学的事象において、糖鎖修飾は密接に関連していることが示唆される。しかし、感染症領域において、ウイルスタンパク質と相互作用する組織中の糖鎖構造解析やウイルス受容体としての部分糖鎖構造は多数報告されているが、ウイルス表面に存在する N-, O-結合型糖鎖構造を網羅的に研究している事例は少ない。また、腫瘍生物学領域において、ホルマリン固定した組織試料を用いた糖鎖研究事例は報告されているが、よりネイティブな条件に近い凍結組織試料を用いた解析事例はほとんど報告されていない。

これらの疾患領域での N-, O-結合型糖鎖情報は医工学応用の視点から、将来的な糖鎖関連モダリティに重要な知見を与えるものと考えられる。そこで、各種臨床試料から解析対象となる糖タンパク質分子群を精製し、微量試料での糖鎖プロファイリングに資する手技の確立を行う。

本研究の目的として、以下の 2 項目を設定した。

1. 微量血清試料を用いたウイルス粒子上糖鎖情報の可視化、糖鎖応用可能性の探求
2. 凍結組織切片を用いた糖鎖情報の可視化、癌部と近傍非癌部間での糖鎖修飾差異の探求

第三章では、目的 1. の課題解決のため、解析対象として B 型肝炎ウイルス上の糖鎖プロファイリング系確立と糖鎖情報を用いた解析応用を行った。

続く、第四章では、目的 2. の課題解決のため、膵臓がんの病理組織試料を用いた糖鎖情報取得を行った。

第三章:【ウイルス粒子上糖鎖修飾情報の可視化】

1.【B 型肝炎ウイルス概論】

臨床試料中に存在する糖タンパク質解析標的としてのウイルス粒子

ウイルス粒子上糖鎖修飾情報の取得にあたり、将来的な医工学応用可能性を視野に入れた研究対象を設定した。

医療充足率とニーズの観点から、以下の 3 点に着目して対象を設定した。1) 今日において、当該ウイルス感染症の根絶が未達成であること。2) 感染流行が世界中の国と地域に拡大していること。3) ウイルス感染によって発癌または劇症化等の不可逆的な臨床経過をたどる症例報告があること。また、国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センターと糖鎖に着目した共同研究を行っていた点から、B 型肝炎ウイルスを本研究の解析対象として設定した。

B 型肝炎ウイルス感染症

B 型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus: HBV) は世界人口の 5% にあたる 4 億人に感染していると推定される。血液や性分泌液などの体液を介して感染伝播する。以前、我が国においては集団予防接種時の針再使用などで広範囲な感染が起きた。近年では若年層などでの性感染症として HBV への感染が起きている (水平伝播)。また、世界中の国と地域においては医療・公衆衛生設備が不十分な地域において、出産時に感染キャリアである母体から経膈・血液を介しての新生児への感染が問題となっている (垂直伝播)⁴⁶。

HBV への感染は急性肝炎症状を呈した後、90% の症例では宿主免疫機構によるウイルス排除を経て回復する傾向にある。一方で 10% の症例では体内に HBV が残存し、慢性肝炎状態に移行する場合や無症候性キャリアとなってウイルスを保有し続けることが知られている。また、B 型肝炎では他のウイルス性肝炎と異なり、無症候性キャリアの状態から肝細胞癌の発癌へと移行する例が知られている⁴⁷。これらのことから、HBV を保有する場合、肝臓関連疾患のリスク因子となる⁴⁸。

HBV 感染症の治療原状と感染予防について

近年では HBV 感染症治療として、損傷した肝臓への庇護療法に加え、核酸アナログ製剤 (ラミブジン、アデホビル、エンテカビル、テノホビル) などを用いたウイルスゲノム複製阻害やインターフェロンを用いた宿主免疫系の賦活化療法などが実施されている⁴⁹。しかし、沈静化した HBV が投薬の中断によって再燃する場合がある。また、長期間に渡る抗ウイルス薬の投与によって HBV が薬剤耐性を獲得することがあり問題となっている⁵⁰。これらに加え、悪性リンパ腫治療時などに用いるリツキシマブ (抗 CD20 モノクローナル抗体) によって宿主免疫系が抑制を受けた際に急激なウイルス増殖などを来す場合があり、免疫系の抑制を伴う抗がん治療時において HBV 感染の有無はリスク因子として重要である⁵¹⁻⁵³。

これらのことから、HBV 感染の抑制や感染者の治療は医学的に重要な課題となっている。

HBV のウイルス学的性状

HBV はヘパドナウイルス科に属し、エンベロープを持つ不完全二重鎖の DNA ウイルスである。3 種類のウイルス粒子から構成されており (Figure 1A)、各ウイルス粒子のサイズは電子顕微鏡を用いた観察から明らかになっている。ウイルス DNA を含有し感染能を持つ粒子は平均直径 42 nm の粒子で、発見者の名前を取り Dane 粒子と呼ばれている⁵⁴。一方、感染能を持たない中空粒子はサブウイルス粒子 (Sub-viral particles: SVPs) と呼ばれ、形状から 2 種類存在することが知られている。SVPs の内、球形粒子は平均直径 22 nm の粒子 (Spherical particle) で、もう一方は繊維状粒子である (Filamentous particle)。HBV 感染者の血清中では Dane 粒子よりも SVPs が多く存在し、比率は 1:1,000-10,000 程である⁵⁵。

HBV エンベロープ (表面抗原) アイソフォーム

各ウイルス粒子表面は糖鎖修飾を伴うエンベロープタンパク質である B 型肝炎表面抗原 (Hepatitis B surface antigen: HBsAg) で覆われている。HBsAg は読み枠の違いから 3 種類存在する。最も多く存在する Small タンパク質/S domain (S-HBsAg) は 226 アミノ酸残基からなる 4 回膜貫通糖タンパク質である。S-HBsAg の N 末端側に 55 アミノ酸残基からなる Pre-S2 domain が付加したフォームは Middle タンパク質 (M-HBsAg) と呼ばれる。M-HBsAg の N 末端側に更に 108 アミノ酸残基からなる Pre-S1 domain が付加したフォームは Large タンパク質 (L-HBsAg) と呼ばれる。各 HBsAg アイソフォームの構成比は HBV 粒子毎に異なることが報告されており、L-HBsAg は Dane 粒子や繊維状粒子に多く存在する⁵⁶。

HBV の糖鎖修飾について

S-HBsAg の 146 番目の Asn 残基は N-結合型糖鎖修飾サイトであり、糖鎖修飾の有無で 2 種類のアイソフォームが報告されている⁵⁷。また、Pre-S2 domain にも糖鎖修飾が入ることが報告されており、4 番目の Asn 残基は高頻度で N-結合型糖鎖修飾を受ける。また、HBV 遺伝子型の内、Genotype C, D などでは、Pre-S2 domain の 37 番目に存在する Thr 残基に O-結合型糖鎖修飾が入ることが報告されている^{58,59}。さらに、Pre-S2 domain の N 末端側はアセチル化を受けることが明らかになっており、HBsAg の安定性などに寄与することが示唆されている。M-HBsAg, L-HBsAg についても、S-HBsAg と同様、S domain への N-結合型糖鎖修飾の有無で各々 2 種類のアイソフォームが存在する (Figure 1B)。

S domain の糖鎖修飾サイト近傍には免疫原性の高いループ領域が存在し、抗原決定基領域 “a” (Determinant “a”) と呼ばれている。N-結合型糖鎖は空間的にこの領域を覆うため、

抗体によるエピトープ認識を妨害することが予想されている。近年、いくつかの研究グループが Determinant “a” の変異に伴う、新たな N-結合型糖鎖修飾サイトを報告し、変異 HBV が糖鎖付加を利用して宿主免疫系からの回避を行うことが示唆されている^{60,61}。また、別の研究グループは臨床例で生じた変異 HBV の配列情報をもとに、In vitro で S domain の変異体を発現させた。この変異体は Determinant “a” の 133 番目の Met 残基が Thr 残基に置換したことで新たな N-結合型糖鎖修飾サイトが生じ、その結果、感染細胞からのウイルス粒子分泌の促進に寄与した⁶²。Pre-S2 domain においても N-結合型糖鎖が小胞体内分子シャペロンであるカルネキシンと相互作用することで M-HBsAg のウイルス粒子へのパッキングに寄与することが報告されており、また、N-結合型糖鎖修飾合成経路の阻害剤であるデオキシノジリマイシンによって糖鎖構造の成熟化を止めると、ウイルス粒子分泌を抑制することが報告された⁶³⁻⁶⁵。

これらのことから、HBV 粒子に対する糖鎖修飾は宿主免疫系からの回避だけでなく、ウイルス粒子の形成・分泌にも重要であることが示唆される。

よって、臨床試料中に微量存在する HBV 粒子の表面糖鎖をネイティブに近いコンディションで解析し、糖鎖修飾の情報を可視化することでウイルス粒子を特徴づける糖鎖コンポーネントを探索する。これにより、HBV 感染本体である Dane 粒子と糖鎖修飾の関連性を見出し、将来的な医工学応用のための基礎情報とする。

2. 【方法】

各試料と試薬について

本研究に用いた HBV Genotype C ウイルス粒子は既報の超遠心濃縮法に従って感染者プール血清から精製した試料を用いた⁶⁶。精製 HBV 粒子は 60°C で一晩熱処理不活化した後、各種解析に使用した。Jacalin 分画系では、国立国際医療研究センターにて慢性 B 型肝炎と診断された一症例の血清試料を用いた。血清試料は採取後、本研究の解析に使用するまで -80°C にて凍結保管されていた。各種解析系構築にあたり、ウイルス感染ネガティブであることが担保されたコーカサス人種由来の市販健常者血清 (KOHJIN BIO, Saitama, Japan) を使用した。

特記事項の無い限り、本研究に用いた各種試薬類は Sigma-Aldrich (St. Louis), Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan), Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) から購入した。

本研究で使用した HBsAg に対するモノクローナル抗体 (抗 S domain 抗体: HB0116) は富山大学医学部で確立された⁶⁷。

レクチンブロットで使用した 5 種類のビオチン標識化レクチン (*Phaseolus vulgaris* agglutinin: PHA-E, peanut agglutinin: PNA, *Ricinus communis* agglutinin I: RCA120, *Salvia sclarea* agglutinin: SSA, Jacalin) は J-OIL MILLS, Inc. (Tokyo, Japan), Vector Lab. (Burlingame, CA) から購入した。

臨床試料取扱いにおける倫理承認と研究指針の準拠

本研究における臨床検体を用いた研究プロトコルは、国立国際医療研究センターおよび産業技術総合研究所の各倫理委員会によって承認された。また、本研究における各種解析は人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に従って実施された。

HBV 感染モデル血清を用いた HBsAg の免疫沈降

本研究に用いる臨床検体モデルとして、HBV 含有血清（スパイク血清）を調整した。HBsAg 量換算で 250 ng 相当の HBV 粒子を市販健常者血清 2.5 μL 中に添加したものをスパイク血清として、免疫沈降法（IP）によるクルード試料中からの HBV 粒子精製系確立に使用した。HB0116 は市販のビオチン標識化キット（Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan）を用いて標識化後、IP 系に使用した。また、スパイク血清試料中に存在する非特異的吸着物の IP 系への混入を減弱するため、ストレプトアビジン結合磁性ビーズを試料に添加した後、4 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間激しく振盪し、プレクリア処理を行った。

1% 濃度の界面活性剤 Triton X-100 を含むトリス緩衝生理食塩水（TBSTx）で調整したストレプトアビジン結合磁性ビーズ 100 μg を含む溶液に、ビオチン標識化 HB0116 を 1.0 μg とプレクリア済スパイク血清試料を添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ で 3 時間激しく振盪することで抗原-抗体反応を行った。

抗原-抗体反応後、上清を取り除き、残存磁性ビーズを TBSTx, 500 μL で 3 回洗浄した。続いて、0.2% 濃度のラウリル硫酸ナトリウム（SDS）を含む TBS（溶出液）, 10 μL で磁性ビーズを再懸濁し、95 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間熱溶出した。この時、溶出液への還元剤（Dithiothreitol: DTT）添加有無で、還元または非還元条件下での IP 溶出とした。

IP 溶出液中に残存するビオチン標識化 HB0116 を除くため、新たにストレプトアビジン結合磁性ビーズ 100 μg を添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間激しく振盪反応を行った。

最終的に、得られた精製物を IP 抽出物としてレクチンマイクロアレイに使用した。

各種生化学解析: 銀染色、ウェスタンブロット、レクチンブロット

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）には市販の泳動分離ゲル（Super Sep Ace, Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan）を使用した。

泳動分離後の各 HBsAg アイソフォームの検討ではゲルを酢酸固定化した後、一般的な銀染色法にて試料中のバンドを可視化した。

ウェスタンブロットでは、ゲル中の HBV 由来タンパク質を市販のポリフッ化ビニリデン膜（PVDF 膜: Trans-Blot Turbo, BIO-RAD, Hercules, CA）へ転写後、市販ブロッキング剤（Block-Ace, DS Pharma Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan）を用いて 37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間のブロッキングを行った。続いて、0.1% 濃度の界面活性剤 Tween-20 を含む TBS（TBST）で PVDF 膜を洗浄後、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整したビオチン標識化 HB0116 を用いて、37 $^{\circ}\text{C}$ で 50 分間の 1 次抗体反応を行った。TBST で余剰な 1 次抗体を洗浄した後、ビ

オチン標識化抗体の検出プローブとして、西洋ワサビペルオキシダーゼが結合したストレプトアビジン (SA-HRP, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) を使用した。TBST で洗浄後、化学発光基質 (ImmunoStar LD, Wako Pure Chemical Industries) を用いて PVDF 膜上のバンドを検出した。

レクチンブロットでは、泳動分離したタンパク質を PVDF 膜へ転写後、TBST 洗浄を 10 分間、3 回行うことでブロッキング処理とした。続いて、ビオチン標識化レクチンを用いて室温で 1 時間の 1 次レクチン反応を行った。TBST 洗浄後、ウェスタンブロット同様、SA-HRP を用いて PVDF 膜と反応させ、化学発光基質添加後にバンドを検出した。

抗体オーバーレイレクチンマイクロアレイ

抗体オーバーレイ法は既報を参考にした⁴²。糖鎖プロファイリングには市販のレクチンマイクロアレイ基板 (LecChip, GlycoTechnica, Yokohama, Japan) を用いた。

LecChip に固相化されている L 型レクチンを賦活化するため、2 価金属イオン (1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂) と 500 mM グリンシンを含む TBSTx (Probing buffer) で基板を洗浄した。1% Triton X-100 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBSTx) で調整した HBV 含有 IP 抽出物を LecChip の反応槽へ添加した後、20°C で一晩反応させた。その後、LecChip 上の未反応のレクチンをブロッキングするため、ヒト免疫グロブリン (IgG) 20 µg を添加し、20°C で 30 分間反応させた。

PBSTx で 3 回洗浄し、余剰 IgG を除いた後、検出プローブとしてビオチン標識化 HB0116, 50 ng を添加し、20°C で 1 時間反応させた。洗浄後、蛍光色素 Cy3 結合ストレプトアビジン (SA-Cy3, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を添加し、20°C で 20 分間反応させた。

余剰な SA-Cy3 を洗浄後、LecChip 上の複合体 (固相化レクチン-HBV 粒子-HB0116) をエバネッセント場励起蛍光画像スキャナ (GlycoStation Reader 1200, GlycoTechnica) にて検出した。

市販アレイ解析ソフトウェア (Array Pro Analyzer software version 4.5, Media Cybernetics, Bethesda, MD) を用いて、LecChip 画像データを定量的な数値情報に変換し、各種解析に使用した。各レクチンシグナルは LecChip 反応槽内の自家蛍光レベルをバックグラウンドとして減算した後、3 スポット毎の平均値を用いて数値化した (Net Intensity)。

糖鎖加水分解酵素シアリダーゼ処理

試料中のシアル酸除去には *Arthrobacter ureafaciens* から精製したシアリダーゼ (Sialidase A, ProZyme, Hayward, CA) を使用した。HBsAg 量換算で 500 ng 相当の HBV 粒子にシアリダーゼ 5 mU を添加し、総反応体積 20 µL で混合した。37°C で 2 時間の反応後、シアリダーゼ処理試料をレクチンブロットに用いた。

Jacalin レクチンによる血清中 HBV 粒子の分画

B 型肝炎罹患者血清中の HBV 粒子を Jacalin を用いて精製した。HBV Genotype C 感染と診断された患者血清一症例分をアッセイ系構築モデルとして使用した (53 歳、男性: ALT, 238 IU/L; HBsAg, 2,985.1 IU/mL; HBV DNA, 7.6 log copies/mL; HBeAg, +)。

0.1% Tween-20 を含む PBS (PBST) で調整したストレプトアビジン結合磁性ビーズにビオチン標識化 Jacalin, 10 μ g を添加し、4°C で 30 分間反応させた。この時、Jacalin を加えずに調整したものを実験系のコントロールとして用いた。PBST で 3 回洗浄し、余剰な Jacalin を除いた後、非加熱血清試料を Jacalin 結合磁性ビーズ (Jacalin, 10 μ g) およびコントロール磁性ビーズ (Control) に添加し、4°C で一晚振盪反応させた。反応後、上清を Jacalin 非結合 (Flow-through) 画分として回収した。残存した磁性ビーズは競合糖溶液 (1M methyl α -D-galactopyranoside) を用いて再懸濁し、4°C で一晚振盪反応させた。反応後、競合糖溶出液を Jacalin 結合 (Eluate) 画分として非加熱条件下で回収した。

HBsAg 量測定とリアルタイム定量 PCR による HBV DNA 量定量

患者血清 2.5 μ L 相当で Jacalin 分画を行った試料を用いて HBsAg 量測定を行った。自動臨床検査装置を用いた化学発光免疫測定法 (Chemiluminescent immunoassay: CLIA) にて定量化した (HBsAg QT, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)。

ウイルス DNA の定量には患者血清 0.625 μ L 相当で Jacalin 分画した試料を用いた。市販の DNA 抽出試薬 (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて、画分中のウイルス DNA を抽出した後、リアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応法 (Real-time quantitative polymerase chain reaction: リアルタイム qPCR) にて定量化した。ウイルス DNA の増幅には市販の Taq ポリメラーゼを使用した (Eagle Taq Master Mix with ROX, Roche Life Science)。核酸増幅・検出にはマルチウェルタイプのリアルタイム qPCR システムを用いた (Light Cycler 480, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)。PCR サイクルおよび HBV DNA の検出には既報を参考にした⁶⁸。試料中 DNA は 95°C, 10 分間の熱変性の後、45 サイクルで増幅と蛍光検出 (95°C, 15 秒: 60°C, 60 秒) を行った。

各プライマー配列は次の通りである。

HBV-SF2 (5'-CTTCATCCTGCTGCTATGCCT-3')

HBV-SR2 (5'-AAAGCCCAGGATGATGGGAT-3')

PCR 増幅産物中の HBV DNA の検出には次の TaqMan プロンプを使用した。

HBV-SP2 (FAM-ATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAG-TAMRA)

3. 【結果と考察】

B 型肝炎ウイルス表面抗原 (HBsAg) への抗 HBsAg 抗体とレクチン反応性の差異

超遠心濃縮された HBV 粒子に含まれる、HBsAg アイソフォームの存在割合を検討するため、還元条件下にて SDS-PAGE を行い、泳動分離後に銀染色を行った (Figure 1C)。他の研究グループによる既報同様に、20-25 kDa にかけて 2 本のメジャーなバンドを検出した^{62,63}。各バンドは S-HBsAg の非糖鎖修飾フォームと糖鎖修飾フォームに相当した。本研究で用いた HBV 粒子中の HBsAg は既報と比べ分子量が小さく検出された。そのため、本研究では非糖鎖修飾フォームを S-P、糖鎖修飾フォームを S-GP と定義する。

さらに、S-HBsAg に次いで L-HBsAg の 2 本のバンドが強く検出された。これらのバンドも非糖鎖修飾フォームを L-P、糖鎖修飾フォームを L-GP と定義する。M-HBsAg の各フォームは他のフォームと比べ弱く検出された。S domain に N-結合型糖鎖が付加せず、Pre-S2 domain にのみ糖鎖修飾されたフォームを M-GP1、S domain にも糖鎖付加されたフォームを M-GP2 と定義する。各 HBsAg フォームの存在割合は既報と同様であった⁵⁷ (Figure 1C)。

抗 S-HBsAg モノクローナル抗体である HB0116 は酵母で発現させた HBV Genotype C の組換え S-HBsAg を用いて確立された。HB0116 は S domain の Determinant “a” を認識することが明らかになっている⁶⁷。また、この抗体は強い抗原認識を示し、HepaRG 細胞を用いた In vitro での研究から、感染抑制が示された^{67,68}。本研究では、HB0116 を生体由来試料中に含まれる HBsAg 認識プローブとして各種解析に使用した。

HBV 粒子を還元条件下で泳動分離し、HB0116 を用いたウェスタンブロットを行うと、非糖鎖修飾フォームの HBsAg (S-P, L-P) のみを検出し、S domain に N-結合型糖鎖が存在するフォーム (S-GP, M-GP2) は認識しなかった (Figure 1D)。質量分析を用いた研究で HBsAg 上糖鎖構造の非還元末端にはシアル酸が存在することが明らかになっている^{58,59}。そこで、糖鎖修飾フォームの HBsAg を検出するため、 α 2,6-シアル酸を認識する SSA レクチンを用いたレクチンブロットを行った。SSA ブロットでは糖鎖修飾フォームの HBsAg (S-GP, M-GP1, M-GP2) のバンドを強く検出した (Figure 1D)。

これらのことから、HB0116 はエピトープである Determinant “a” 近傍に N-結合型糖鎖が存在すると、抗原との結合が阻害されることが示唆された。一方、レクチンをプローブとして用いることで糖鎖修飾フォームの HBsAg を認識することが可能であり、抗体とレクチンは別々の HBsAg アイソフォームを認識していた (Figure 1E)。

糖鎖修飾型/非修飾型 HBsAg はウイルス粒子中に共に存在

HBV 粒子への糖鎖修飾を詳細に解析するため、スパイク血清中 HBV を HB0116 を用いた免疫沈降 (IP) 系にて精製した。IP 抽出物を HB0116 にてウェスタンブロットすると、Figure 1D と同様、S-P を強く検出した (Figure 2A)。この時、健常者血清でコントロール実験を行うと 25 kDa 付近に強いバンドを検出した。このバンドは IP に用いた抗

体の軽鎖であると考えられる。また、IP 抽出物を SSA レクチンブロットすると複数の非特異的なバンドとともに S-GP のバンドを検出した (Figure 2B)。

これらの結果は非糖鎖修飾型と糖鎖修飾型 HBsAg が同一のウイルス粒子上に存在することを示唆していた。よって、HBV 粒子構造を保持している場合、抗体とレクチンを用いて同時にウイルス粒子を検出可能であると考えられる (Figure 2A, 2B)。

次に、HBV 粒子構造を保持した状態での HB0116 の反応性を検討するため、還元剤の有無条件下でウェスタンブロットを行った。HBsAg 量換算で 4 段階の希釈系列を調整、試料を泳動した (125, 31.2, 7.5, 1.9 ng/lane)。還元条件 (DTT+) にてウイルス粒子構造を破壊した状態では、HB0116 は HBsAg, 31.2 ng 相当までを検出した (Figure 2C)。一方、非還元条件 (DTT-) でウイルス粒子構造を保持した場合は泳動分離されず、一部の粒子はゲルトップに残存した。この時、HB0116 はより高感度に HBsAg を認識し、1.9 ng 相当で検出した (Figure 2C)。また、非還元条件ではスミアなバンドが検出されるが、これは超遠心濃縮過程で部分的に分解した HBV 粒子と考えられる。

これらの結果は、ウイルス粒子構造を保つことで HBsAg が粒子中に多数集積し、HB0116 の強い反応性が得られることを示唆していた。さらに、レクチンと抗体を二重プローブとして用いる検出系構築によって HBsAg 量にしてナノグラムレベルでの糖鎖修飾情報の取得が期待できるものであった。

レクチンマイクロアレイを用いたウイルス粒子上の糖鎖プロファイリング

産総研の久野らが開発したレクチンマイクロアレイシステムは高感度かつ網羅的に糖鎖構造中の部分構造をプロファイリングすることが可能である³⁵。さらに、固相化レクチンに反応した特定の糖タンパク質分子に対する抗体を用いることで、高感度・高特異的に分子レベルでの糖鎖修飾情報の取得が可能である (抗体オーバーレイ法)⁴²。

Figure 2 の結果より、マイクロリットルスケールの微量血清試料から抗体を用いて HBV 粒子を精製可能であることが示唆されたので、レクチンマイクロアレイと組み合わせることで HBV 粒子上糖鎖修飾情報の取得系構築を行った。

レクチンと抗体が同一の HBV 粒子をサンドイッチ検出可能か検証するため、HB0116 で IP 後、還元剤有無条件下で溶出を行った。この溶出物をレクチンが固相化されたアレイ基板上で反応させた後、ビオチン標識化 HB0116 を用いてサンドイッチ検出した。その後、Cy3 結合ストレプトアビジンを反応させ、蛍光シグナル値から HBsAg に付加した糖鎖修飾情報を得た (Figure 3A)。還元条件下 (DTT+) では HBV 粒子が破壊されるので、レクチンが認識する糖鎖修飾型 HBsAg と HB0116 が認識する非糖鎖修飾型 HBsAg は別々に存在した (Figure 3A)。そのため、HBsAg 量換算で 160 ng 相当の IP 抽出物でも特定のレクチンに由来するシグナルは検出されなかった (Figure 3B)。一方で、非還元条件下 (DTT-) では粒子構造が保持されているので抗体オーバーレイが可能となり、いくつかのレクチンで HBsAg 上糖鎖に由来するシグナルを検出した (Figure 3C)。

この結果から、HBsAg 量換算で 5 ng 相当の微量 HBV 粒子で高感度な糖鎖プロファイリングが可能であり、5 ng を定性下限値とした。また、一部のレクチンでは 1.25 ng でもシグナルを検出し、この値を検出下限とした (Figure 3C)。

HBV 粒子上糖鎖はマイクロアレイ基板上でいくつかのレクチンと反応した (Figure 3D)。この内、 α 2,6-シアル酸認識レクチン (*Sambucus nigra* agglutinin: SNA, SSA, *Trichosanthes japonica* agglutinin I: TJA-I)、ガラクトース認識レクチン (RCA120)、バイセクティング N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 認識レクチン (PHA-E)、GlcNAc 認識レクチン (*Datura stramonium* agglutinin: DSA) などで反応性が見られたことから、HBV 粒子上の N-結合型糖鎖構造をプロファイリング可能であることが示唆された。また、この結果は既報の質量分析法 (Mass spectrometry: MS) を用いた HBsAg 糖鎖解析と矛盾の無いものであった^{58,59}。一方、既報と異なり、レクチンマイクロアレイの結果からはポリラクトサミン認識レクチン (*Lycopersicon esculentum*: LEL, *Solanum tuberosum*: STL) シグナルも検出された。このシグナルはウイルス粒子構造が保持されることで糖鎖がクラスターを形成し、これらのレクチンが反応したためと考えられる。

日本を含む東アジア地域に感染流行している HBV Genotype C では Pre-S2 domain の 37 番目の Thr に O-結合型糖鎖修飾を受ける^{59,69}。レクチンマイクロアレイからは O-結合型糖鎖である T 抗原 (Core 1) 認識レクチン (*Agaricus bisporus* agglutinin: ABA, Jacalin, *Maclura pomifera* agglutinin: MPA) のシグナルも検出された (Figure 3D)。

これらの結果は、レクチンマイクロアレイを用いることで、非破壊的にウイルス粒子上の糖鎖修飾情報をプロファイリング可能であり、N-, O-結合型糖鎖付加を同時かつ高感度に検出することを示唆した。

HBsAg 分子上の糖鎖に対するレクチンプロット

レクチンマイクロアレイの結果をもとに、HBV 粒子表面に暴露している糖鎖構造を特異的に認識するプローブとして、N-結合型糖鎖認識レクチン 3 種 (SSA, RCA120, PHA-E) と O-結合型糖鎖認識レクチン 2 種 (Jacalin, PNA) を選択した。HBsAg の各アイソフォームに対するこれらのレクチン結合性を検討するため、泳動分離後にレクチンプロットを行った。

Figure 1D と同様、SSA レクチンプロットを行った。還元条件下では糖鎖修飾型 HBsAg (S-GP, M-GP1, M-GP2) のバンドを検出し、非還元条件下ではゲルトップに残存する HBV 粒子を強く認識した。この時、シアリダーゼ酵素消化によってシアル酸のみを糖鎖構造中から除去すると、SSA レクチン反応性は消失した (Figure 4)。対照的に、RCA120 レクチン反応性は酵素消化前では得られなかった。シアル酸消化によるアシアロ化に伴って糖鎖修飾型 HBsAg のバンドを強く認識したことから、ガラクトース残基が暴露していることが示唆された。

Jacalin レクチンプロットでは、M-HBsAg (M-GP1, M-GP2) が特異的に検出された。こ

れは Pre-S2 domain にのみ存在する O-結合型糖鎖に由来するレクチン反応性と考えられる。シアル酸消化前後で Jacalin 反応性が見られるが、シアル酸消化後により強く認識していた。また、非還元条件下でも HBV 粒子を認識し、ゲルトップにバンドを検出した (Figure 4)。PNA レクチンブロットではシアル酸消化後に M-HBsAg を微弱に検出した。PNA はシアル酸修飾を受けた O-結合型糖鎖を許容しないため、アシアロ化に伴って反応性が亢進した。

PHA-E レクチンブロットではシアル酸消化後の糖鎖修飾型 HBsAg を微弱に検出した。PHA-E の認識するバイセクティング GlcNAc 構造は N-結合型糖鎖にのみ存在するため、Pre-S2/S domain の糖鎖に反応していることが示唆された (Figure 4)。

これらの結果から、糖鎖修飾型 HBsAg に含まれる Pre-S2/S domain 上の N-結合型糖鎖には非還元末端に $\alpha 2,6$ -シアル酸がガラクトースに結合する構造 (Sia $\alpha 2,6$ -Gal) が存在し、いずれかの構造中にはバイセクティング GlcNAc が付加する可能性が示唆された。さらに、Pre-S2 domain にのみ存在する O-結合型糖鎖上にもシアル酸が存在することが示唆された。O-結合型糖鎖に関する構造情報は既報の MS を用いた解析と一致した^{58,59}。

HBsAg 上糖鎖を標的とするレクチン反応性の応用

感染者体内において循環血中に存在する HBV 粒子の大部分はウイルス DNA を含まない SVPs である。感染本体である Dane 粒子に特徴的な糖鎖修飾を見出すため、試料中から Dane 粒子を分画する系の構築を行った。

これまでの結果から、HB0116 は各 HBsAg に共通の S domain に N-結合型糖鎖が付加しないフォームを認識した (Figure 1, 2)。S domain を標的にすると、全ての HBV 粒子を認識するため、Dane 粒子特異的な IP は不可能である。さらに、レクチンマイクロアレイとレクチンブロットの結果から、HBsAg 上の N-結合型糖鎖構造は組織中ならびに血清中に大量に存在する糖タンパク質上糖鎖構造と類似するものであり、生体内に普遍的に存在する糖鎖構造であった。

よって、S domain を認識する抗体や N-結合型糖鎖を認識するレクチンでは生体由来試料中に大量に存在する血中糖タンパク質や SVPs から、Dane 粒子を効率的に濃縮することが困難であることが予想された。

一方で、Jacalin などで認識された O-結合型糖鎖構造は血中などでは IgA などの免疫グロブリンや遊離ムチンなどの一部の糖タンパク質上に限定されているため、血中糖タンパク質と HBV 粒子の分画に適している。また、HBV Genotype C, D において、O-結合型糖鎖修飾は M-HBsAg の Pre-S2 domain に限定され、HBV 粒子の分泌過程において M-HBsAg がウイルス粒子に含有されることが報告されている⁶⁵。

よって、O-結合型糖鎖を標的とした濃縮系を構築することで、血中糖タンパク質の影響を限定し、Dane 粒子を効率的に分画できるのではないかと考えた。レクチンブロットの結果から、シアル酸修飾の有無に関わらず M-HBsAg 上の O-結合型糖鎖を検出し、非還元

条件下でも HBV 粒子を認識するレクチンとして Jacalin を選択した (Table 1)。

Jacalin を用いた Dane 粒子濃縮

Jacalin レクチンによる Dane 粒子濃縮を検討するため、慢性 B 型肝炎患者血清を使用した (HBsAg: 2,985.1 IU/mL, HBV DNA: 7.6 log copies/mL)。

事前に Jacalin を結合させた磁性ビーズを用いて、患者血清 2.5 μ L 相当中に含まれる O-結合型糖タンパク質を分画した。この時、IgA などの血中糖タンパク質は除かずに含有条件下で分画を行っている。HBV 粒子は Jacalin 結合画分 (Euate) と非結合画分 (Flow-through) に分けられた。コントロール実験として、Jacalin 非結合の磁性ビーズでも同様の分画を行った。

CLIA 法を用いて各画分に含まれる S-HBsAg 量を定量した。コントロールでは、S-HBsAg の大部分は Flow-through 画分に存在した。対照的に、10 μ g の Jacalin を用いて分画した実験では、コントロールと比べ、全体の 10% 相当の S-HBsAg が Euate 画分に存在した (Figure 5)。

さらに、各画分に含まれる HBV DNA 量を測定することで、Jacalin が Dane 粒子を効率的に分画するか検討した。

リアルタイム qPCR 法を用いて HBV DNA 量を測定した。生体由来試料中には大量の断片化した核酸が含まれるため、しばしば PCR を阻害する。そのため、使用する血清試料量を極微量とし、サブマイクロリットルスケールで Jacalin 分画を行った。PCR では患者血清 0.625 μ L 相当中に含まれる HBV DNA 量を測定した。コントロール実験では、大部分の HBV DNA は Flow-through 画分に存在した。この時、Euate 画分でも僅かに核酸増幅を検出したが、リアルタイム qPCR 系の非特異的な増幅と考えられる。一方、Jacalin を用いた分画では、大部分の HBV DNA が Euate 画分に存在した (Figure 6)。

これらの結果から、Jacalin は S-HBsAg に影響することなく、O-結合型糖鎖が付加した M-HBsAg に応じて HBV 粒子を分画し、この粒子は Dane 粒子であることが明らかになった。

4. 【小括】

第三章の概要

本章では、疾患生物学的事象における糖鎖修飾意義の探求のため、ウイルス感染症に着目した解析対象として B 型肝炎を設定した。

ウイルス粒子の糖鎖修飾情報可視化のため、免疫沈降系を確立し、血清試料中に存在する HBV を粒子構造が保持されている状態で精製した。レクチンマイクロアレイを用いた HBV 粒子糖鎖プロファイリングからは、N-, O-結合型糖鎖に由来するレクチン反応性を見出し、糖鎖修飾の可視化と解析系における定性・定量下限値を決定した。

さらに、いくつかのレクチンに注目した生化学的実験から、各レクチンが標的とするウイルス構成要素 (HBsAg アイソフォーム) を検討し、これまでは糖鎖修飾意義が未解明であった、O-結合型糖鎖に焦点を当てた解析系構築を行った。

Jacalin レクチンを用いた HBV 感染者血清中からのウイルス粒子精製法では、既存のウイルス学的検査技術と組み合わせることで、感染本体である Dane 粒子を効率良く分離することが可能となった。

本法を用いることで、サブマイクロリットルスケールの血清試料中に存在する HBV DNA を分画・検出することに成功した。

ウイルス粒子上の糖鎖修飾情報を利用した医工学応用への展開

我が国における輸血用途の血液製剤は市中等での献血などで供給されている。血液センター等の医療関連機関において、血液試料中の検査を実施する際は 20 人分のドナー血液を一つの単位としてウイルス検査を実施している。しかし、HBV 感染者血液等が検査下限から漏れる事例が報告されている^{70,71}。

本研究では、特定の糖鎖構造に着目することで簡便な分画法を構築し、極めて微量試料中の HBV を精製、定量 PCR 法によって高感度に Dane 粒子を検出した。今後、糖鎖修飾情報を基盤とした特異性の高いプローブを開発することで、既存手法よりもさらに微量スケールでの検査体制確立が期待される。

また、このようなプローブはイムノクロマトグラフィー法などへ応用することで、検出時の周囲状況及びインフラ設備等の制約を受けず、簡便かつ迅速な医療供給体制構築に寄与することが期待できる⁷²⁻⁷⁵。

さらに、糖鎖プロファイリング情報は直接的にウイルス粒子表面に暴露するウイルス構成要素の情報を提供するものである。本研究における Dane 粒子の事例のように、感染本体を効率良く識別する糖鎖とその近傍ペプチド配列を解析することで、新たな抗原性をもたらすワクチン製剤等への応用も期待される。

これらの観点から、ウイルス粒子上の糖鎖修飾情報可視化とその意義の探求は、新興・再興感染症領域における新たな切り口を提案する可能性を内包している。

第四章:【組織細胞膜の糖鎖修飾情報の可視化】

1.【膵管腺癌概論】

微量臨床試料中の糖鎖修飾解析モデルとしての腫瘍組織凍結薄切切片

凍結組織切片を用いた、ネイティブに近い条件下での微量試料中糖鎖修飾情報の可視化にあたり、将来的な糖鎖関連モダリティへの応用可能性を視野に入れた研究対象を設定した。

今日における腫瘍学領域での医療ニーズの観点から、以下の 3 点に着目して対象を設定した。1) 既存の分子標的治療での有効な治療標的に乏しいこと。2) 腫瘍悪性度が高く、発見時点において治療選択肢が限られていること。3) 組織内浸潤・遠隔転移等により著しい予後不良性の腫瘍であること。また、慶應義塾大学医学部病理学教室と糖鎖に着目した共同研究を行っていた点から、膵管腺癌の凍結薄切切片を本研究の解析対象として設定した。

膵管腺癌について

膵管腺癌 (Pancreatic ductal adenocarcinoma: PDAC) は膵臓癌全体の 90% 以上を占める。初期症状に乏しく、進行に伴い腹部や腰部、背部痛などが見られる。また、腹部膨満感、食欲不振や黄疸などの症状を呈することがある。診断時点において、しばしば膵臓組織内での広範な癌細胞浸潤や周囲リンパ節、肝臓などへの遠隔転移を認めることがある^{76,77}。今日、世界中での癌関連死亡原因として第 4 位となっており⁷⁸、2030 年には肺・呼吸器関連癌に続いて第 2 位となることが予想されている⁷⁹。

PDAC 治療には外科的切除や放射線療法に加え、ゲムシタビンなどを用いた化学療法が行われている。しかし、治療抵抗性を示すことがあり、5 年生存率は 5-9% 程度となっている⁸⁰。現段階において有効な分子標的に乏しく、抗体-薬物結合物 (Antibody-drug conjugation: ADC) 投与療法の標的シーズが求められている。

病理学的所見

PDAC は、びまん性組織像をとる。癌腺管の周囲を取り囲む様に著しい線維化を伴い、周囲間質への孤在性浸潤像が観察される⁸¹。また、一部の癌細胞は抹消神経への浸潤も認め、膵癌に伴う癌性疼痛の原因の一つとなる^{82,83}。比較的分化度を保った癌腺管の細胞と組織内浸潤細胞とでは一部の糖タンパク質の発現が異なることも報告されており、遺伝子レベルでも形態学的にもヘテロな細胞集団である⁸⁴。

膵癌細胞での糖鎖修飾

膵癌培養細胞株を用いた既報では、一部の PDAC 細胞において特定のレクチン (*Burkholderia cenocepacia* lectin: BC2LC-N) が認識する糖鎖構造が発現していることが報告された⁸⁵。また、同報告では BC2LC-N を用いた組織染色も行っており、PDAC 臨床検体において中分化度の癌腺管を強く染色していた。

また、PDAC, 62 症例の FFPE 組織切片を用いた糖鎖プロファイリングでは糖鎖構造中のフコース残基を認識するレクチン (*Aspergillus oryzae* lectin: AOL, *Aleuria aurantia* lectin: AAL) やマンノース残基を認識するレクチン (*Hippeastrum hybrid* lectin: HHL) の反応性が膵管腺癌部において増加することが報告された⁸⁶。

これらのことから、PDAC に関連して糖鎖修飾が変化することが示唆された。そこで、より生体内に近い条件として、ホルマリン固定を経験しない凍結組織からの糖鎖プロファイル取得系確立を行う。これにより、同一症例・同一組織における癌部-近傍非癌部間での糖鎖修飾差異を見出し、糖鎖に関連した新たな治療標的探索のための情報基盤とする。

また、本研究では疾患に特徴的な糖鎖構造を多角的な視点から議論するため、データサイエンス技術を用いて糖転移酵素群の遺伝子発現情報解析も実施する。これらの実験生物学的手法と *In silico* 手法の領域融合化により、従来得られなかった情報深度での生体内微小領域における糖鎖修飾変化の可視化を図る。

2. 【方法】

PDAC 臨床検体凍結組織標本

慶應義塾大学病院にて PDAC と診断された 14 症例の膵臓組織から癌部と近傍非癌部組織を採取した。組織試料は迅速に凍結された後、本研究に使用するまで凍結保管された。

本研究での病理学的解析および糖鎖に着目した解析には凍結組織試料から作製した薄切切片を使用した。薄切後、糖タンパク質抽出を行うまで、組織試料スライドは -80°C にて保管された。

臨床試料取扱いにおける倫理承認と研究指針の準拠

本研究における研究プロトコルは 1975 年ヘルシンキ宣言に準拠し、慶應義塾大学医学部倫理委員会で承認を受けた (No. 20040034)。本研究に用いた全症例において、臨床試料を用いることへのインフォームドコンセントを実施済みである。

PDAC 薄切切片の組織学的解析

各薄切試料はヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色により組織学的特徴を観察した。HE 染色の明視野像はデジタル病理画像スキャナ NanoZoomer-XR C12000-03 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) において、20 倍対物レンズを用いた撮像にて取得した。薄切試料内における糖タンパク質抽出領域の決定と組織面積の算出には画像ビューアソフトウェア NDP.view2 (Hamamatsu Photonics) を使用した。

レクチンマイクロアレイによる組織間比較糖鎖プロファイリング

レクチンマイクロアレイを用いた組織抽物の糖鎖プロファイリングは既報を参考に、一

部変更して実施した^{26,40}。

凍結薄切組織からの試料採取には、HE 染色像と連続する未染色薄切組織切片 (10 μm 厚) を使用した。HE 像を参考に 100-150 mm^2 の注目領域を決定し、ディスプレイブルメスを用いて迅速に試料を採取した。糖タンパク質を含む細胞膜画分の抽出には、CellLytic MEM Protein Extraction Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を用いた。

PBSTx を用いて組織抽出物を希釈し、組織面積 1 mm^2 相当を含む 10 μL 溶液とした。この組織抽出物溶液を用いて NHS 活性基結合 Cy3 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), 10 μg を可溶化し、遮光下で室温 1 時間の蛍光標識化を行った。標識化反応後、Probing buffer を 90 μL 加えて 2 時間インキュベートし、未反応の蛍光色素を完全にブロックした。

Cy3 標識化組織抽出物 0.1 mm^2 相当を LecChip 反応槽へ添加し、20 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。PBSTx を用いた洗浄で余剰な蛍光標識化試料を取り除いた後、GlycoStation Reader 1200 を用いて蛍光画像を取得した。市販の画像解析ソフトウェア (GlycoStation ToolsPro Suite ver.1.5, GlycoTechnica) を用いて、画像データを数値情報に変換した。LecChip 反応槽に固相化された 45 種類のレクチンシグナルを用いて、反応槽全体での平均値を算出した。この平均値を用いて各レクチンシグナルを除き、標準化した値で統計解析を行った (Mean-normalized Intensity)。

パブリックデータベースを用いた遺伝子発現解析

正常膵臓組織と膵癌組織間での糖転移酵素遺伝子発現レベルを比較検討するため、パブリックデータベース (DB) を用いて比較解析を行った。カリフォルニア大学サンタクルーズ校 (UCSC) で開発された、Xena ブラウザー (<https://xenabrowser.net/datapages/>) を用いて遺伝子発現量の比較を行った⁸⁷。

正常組織での遺伝子発現情報には Genotype-Tissue expression project (GTEx) の DB に格納されている膵臓 165 例分のデータセットを使用した。癌部組織での遺伝子発現情報は The Cancer Gnome Atlas program (TCGA) の DB に格納された膵癌症例 178 例分のデータセットを用いた。

各 DB に格納された任意の糖転移酵素遺伝子の RNA シーケンシングカウント値は期待値最大化アルゴリズムで数値化した (RSEM) 後、DESeq2 法による標準化で解析毎のバッチ効果を減弱させた。この数値を Xena ブラウザーを介して入手し (Version 2018-05-08)、統計処理を行った。

統計的解析: 一変量解析、多変量解析

各組織間のレクチン反応性の比較はウィルコクソンの符号付き順位和検定を用いた。DB による正常膵臓と膵癌組織での糖転移酵素遺伝子発現の比較はウィルコクソンの順位和検定を用いた。

各組織間におけるレクチン反応性の一変量解析では、各群の中央値をもとに統計的に検討を行った。まず、癌部の中央値を非癌部のそれで除した値を算出し、この値の対数絶対値を用いてレクチン反応性変化量とした ($|\log_2 [\text{median value of tumor} / \text{median value of non-tumor}]|$)。結果と考察の項では、レクチン反応性変化量を $|\text{FC}[\log_2]|$ と表記した。

統計解析には市販ソフトウェア GraphPad Prism 8 for macOS (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いた。検定値 $P < 0.05$ で有意差あり、 $P = 0.0001$ の時は著しい有意差を認めると定義した。

多変量解析には、市販ソフトウェア JMP 14.2.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いた。45 種類のレクチン反応性を基に、ペアワイズ法ー共分散行列として主成分解析 (Principle component analysis: PCA) を行った。

3. 【結果と考察】

凍結組織薄切切片中の糖鎖プロファイリング戦略

ネイティブに近い条件下で疾患組織を特徴づける糖鎖プロファイリングを取得するため、14 症例の PDAC 癌部・非癌部マッチドペア凍結薄切切片を使用した。本研究に用いた全症例の臨床情報は典型的な膵管腺癌であった (Supplemental table 1)。

各症例の連続切片を用いた HE 染色像にて病理学的特徴を確認し、非癌部と癌部における糖タンパク質抽出領域を決定した。非癌部領域では、明瞭な膵管構造と膵実質細胞である腺房細胞が高密度に存在し、秩序だった組織構造が観察された (Figure 7A, 左図)。対照的に癌部領域では、不規則な腺管様構造 (癌腺管) が散在し、広範な領域で腺房細胞が消失して著しい線維化を伴っていた (Figure 7A, 右図)。

凍結組織切片からの試料採取後、細胞膜画分として糖タンパク質を抽出、蛍光色素標識を行った。その後、レクチンマイクロアレイによって組織グライコームを取得し、各組織間の比較糖鎖プロファイリングを実施した (Figure 7B)。

PDAC 組織糖鎖プロファイリング

各症例の糖鎖プロファイリングからは N-, O-結合型糖鎖を認識するレクチンシグナルを検出した (Supplemental figure 1)。全プロファイルにおいて、O-結合型糖鎖 Core 1 構造を認識するレクチン群 (ABA, Jacalin) は比較的低レベルの検出シグナルであり、組織抽出物中ではこれらの糖鎖構造は低含量であることが示唆された。また、ABO 組織 – 血液型抗原 (ABO 血液型) である部分糖鎖構造を認識するレクチン群 (*Ulex europaeus* agglutinin I: UEA-I, *Trichosanthes japonica* agglutinin II: TJA-II, *Euonymus europaeus* lectin: EEL, *Dolichos biflorus* agglutinin: DBA, *Psophocarpus tetragonolobus* lectin I: PTL-I) は非癌部抽出物でのみシグナルを検出した。

これらの比較糖鎖プロファイリングから、PDAC に関連して組織レベルで糖鎖修飾が変

化していることが示唆された。

組織間比較糖鎖プロファイリングの一変量解析

同一症例における癌部・非癌部で見られたレクチン反応性から、PDACに関連した糖鎖修飾変化を解析するため、各レクチンシグナル値について一変量解析を行った (Table 2)。癌部において、非癌部と比較して有意に反応性亢進 ($P = 0.0001$) したレクチンは 5 種類存在し、 $\alpha 2,3$ -シアル酸認識レクチン (*Maackia amurensis* lectin I: MAL-I)、 $\alpha 2,6$ -シアル酸認識レクチン (SNA, TJA-I)、バイセクティング GlcNAc 認識レクチン (PHA-E)、高マンノース型糖鎖認識レクチン (HHL) であった (Figure 8A, Table 2)。

対照的に有意に反応性低下 ($P = 0.0001$) したレクチンは 1 種類存在し、ABO 血液型のうち B 型糖鎖抗原末端のガラクトース (Gal) を認識するレクチン (EEL) であった (Figure 8B, Table 2)。

EEL 反応性は癌部-非癌部組織間で 2.9 倍の変化量 ($|\text{FC}[\log 2]|$) が生じていた。そこで、他の ABO 血液型認識レクチンについても同様の解析を行った結果、A 型糖鎖末端の GalNAc 認識レクチン (DBA, *Griffonia simplicifolia* lectin I – isolectin A4: GSL-I-A4) や A, B 型糖鎖構造どちらも認識するレクチン (PTL-I)、末端 Gal 認識レクチン (*Griffonia simplicifolia* lectin I – isolectin B4: GSL-I-B4)、O 型糖鎖構造である H 抗原認識レクチン (UEA-I, TJA-II) は癌部-非癌部間で反応性差異が見られ、統計的有意差を認めた ($|\text{FC}[\log 2]| > 1, P < 0.05$; Figure 8B, Table 2)。

非癌部で検出された、これら 7 種のレクチン反応性は各症例の ABO 血液型と一致していたことから、膵臓組織において ABO 血液型を反映する糖鎖修飾が存在することが示唆された。

組織間比較糖鎖プロファイリングの多変量解析

PDACに関連した糖鎖修飾変化を可視化するため、45 種類のレクチン反応性を用いて多変数解析を行った。各レクチンシグナルを標準化後、共分散行列として数値化した。この値を用いて主成分解析し、症例毎の特徴を抽出するスコアプロットとレクチン反応性を位置づけるローディングプロットを得た (Figure 9)。

スコアプロットでは各症例における癌部と非癌部が第 1 主成分軸 (PC1) に基づいて分類された。この時、ローディングプロットでは $\alpha 2,3$ -シアル酸認識レクチン (MAL-I, *Agrocybe cylindracea* galectin: ACG)、 $\alpha 2,6$ -シアル酸認識レクチン (SNA, SSA, THA-I) や PHA-E などが癌部と同軸方向にベクトル化されており、PDAC を特徴づけるレクチンとして抽出された。対照的に、PTL-I, DBA, EEL などの ABO 血液型認識レクチンは非癌部と同方向にベクトル化され、いずれも一変量解析と矛盾無い結果を示していた。また、非癌部組織では第 2 主成分軸 (PC2) によって、2 グループに分類された。この分類のうち、3 症例は ABO 血液型 O 型症例のグループであった ($\text{PC1} > 0, \text{PC2} < 0$;

Patient No. 11-13)。この 3 症例は TJA-II, UEA-I などの H 抗原認識レクチンに加え、糖鎖構造中の α 1,2-フコースに由来すると考えられる、AAL, AOL 反応性も抽出された。

統計学的手法を用いた一変量解析と主成分解析の結果から、癌部を特徴づける糖鎖構造としてシアル酸やバイセクティング GlcNAc の増加と ABO 血液型抗原の低下が抽出され、PDAC に関連した糖鎖情報の可視化が可能となった。

パブリックデータベースを用いた糖転移酵素群遺伝子発現比較解析

膵臓組織を用いたレクチンマイクロアレイ結果からは、ABO 血液型抗原やシアル酸修飾などが PDAC に関連する組織糖鎖プロファイリング変化として抽出された。この事象を多角的な視点から検証するため、糖鎖生合成に関与する因子群である糖転移酵素の RNA 発現レベル解析を行った。

本研究では、凍結薄切組織切片から糖タンパク質抽出を実施している。これらの解析で使用した組織試料は極めて微量であるため、他のヒトゲノム産物と比較して発現レベルが低い糖鎖合成機構に関連する遺伝子群の解析は困難であることが予想された。そこで、遺伝子発現に関連するパブリックデータベース (DB) を用いることで正常組織-腫瘍組織間での糖転移酵素 RNA 発現傾向の比較解析を行った。

組織間遺伝子発現情報は次世代シーケンシング技術をベースにした 2 種類の DB から RNA 発現量を抽出し、ウェブベースのアナライザーを用いて数値間比較解析を行った。正常膵臓組織における RNA 発現情報は GTEx から 165 例の健常者データを使用し、膵癌組織は TCGA から 178 例のデータを用いた。

ABO 血液型抗原はコア構造である H 抗原とその末端に付加する部分糖鎖構造によって規定される^{88,89}。H 抗原は 2 種類の α 1,2-フコース転移酵素 (FUT1, FUT2) によって生合成される。FUT1 は消化管系の上皮細胞や赤血球、ミエロイド系細胞などで発現し、循環中における ABO 血液型決定に寄与する。一方、FUT2 は上皮細胞や腺組織でも発現し、分泌糖タンパク質への ABO 血液型抗原付加に関与する⁹⁰。H 抗原のみで合成が止まると血液型 O 型となる。H 抗原の還元末端に、さらに α 1,3-GalNAc が付加したものは A 型抗原となり、 α 1,3-Gal が付加したものは B 型となる。A, B 型糖鎖構造の付加は α 1,3-Gal/GalNAc 転移酵素 (ABO) の複対立遺伝子で決定される (Figure 10A)。DB を用いて各組織間におけるこれらの RNA 発現量を統計学的に比較検討した。

FUT1 遺伝子は正常膵臓と比較して、膵癌組織で有意に発現低下が見られた ($|FC[\log_2]| = 1.5, P = 0.0001$)。一方、*FUT2* 遺伝子は膵癌組織で有意に発現増加が見られ ($|FC[\log_2]| = 3.8, P = 0.0001$)、膵癌に関連して膵臓組織中での *FUT2* 発現亢進が示唆された。この時、同様の手法で ABO 遺伝子も比較すると、膵癌組織において有意に発現増加が見られた ($|FC[\log_2]| = 1.1, P = 0.0001$; Figure 10A)。

これらの結果から、レクチンマイクロアレイでの癌部組織における ABO 血液型抗原の消失は、*FUT1* 遺伝子発現量減少に伴う H 抗原の産生低下に起因することが示唆された。

さらに、癌部組織ではシアル酸認識レクチンの反応性亢進が見られたことから、糖鎖構造末端の Gal 残基にシアル酸を付加する、 α 2,3-, α 2,6-シアル酸転移酵素 (ST3GALs, ST6GALs) についても同様の解析を行った。ヒト遺伝子産物で確認されている 6 種類の ST3GALs アイソフォーム (*ST3GAL1-6*) と 2 種類の ST6GALs アイソフォーム (*ST6GAL1, ST6GAL2*) はいずれの遺伝子も膵癌部で有意に発現増加が見られた ($|\text{FC}[\log_2]| > 1, P = 0.0001$; Figure 10B)。

また、バイセクティング GlcNAc を修飾する GlcNAc 転移酵素 III (MGAT3) とその競合反応を担う GlcNAc 転移酵素 V (MGAT5) についても解析を行った。

正常膵臓組織と比べ、膵癌組織の *MGAT3* 遺伝子発現量は 3.0 倍であったのに対し ($|\text{FC}[\log_2]| = 3.0$)、*MGAT5* 遺伝子発現量は 2.2 倍であった ($|\text{FC}[\log_2]| = 2.2$)。

これらのことから、膵癌においては *MGAT3* 産物が修飾する糖鎖構造が多分に存在することが示唆された (Figure 10C)。

DB を用いた組織間の糖鎖修飾に関連する遺伝子発現量の比較は、凍結組織を用いたレクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリング結果を強く支持するものであった。実験的手法と DB を用いた *In silico* 手法を組み合わせることで、従来では困難であった極めて微量な試料中の糖鎖修飾情報を可視化し、これにより、PDAC を特徴づける糖鎖修飾として ABO 血液型抗原の消失、シアル酸修飾とバイセクティング GlcNAc 修飾の増加を見出すことに成功した。

4. 【小括】

第四章の概要

本章では、疾患に関連した糖鎖修飾情報の可視化と癌部－非癌部組織間での糖鎖修飾差異を探究するため、対象疾患として膵管腺癌を設定した。

ネイティブに近い条件下での微量組織試料中糖鎖修飾情報を取得するため、これまで研究報告の無い、凍結薄切切片を用いたレクチンマイクロアレイ解析系の確立を行った。同一症例における癌部－非癌部間での組織間糖鎖修飾情報の比較検討を行うため、病理学的所見に基づいた解析領域の決定と微量試料中からの糖タンパク質抽出を行った。

膵管腺癌 14 症例における糖鎖プロファイリングからは、N-, O-結合型糖鎖修飾情報を同時かつ網羅的に取得することに成功した。統計学的手法を用いて、微量組織試料における 45 種類のレクチン反応性を比較解析し、一部のレクチン反応性において組織間で顕著な差異を認めた。さらに、これらの解析データセット・マトリクスを用いた多変量解析手法による情報の可視化では、癌部－非癌部間での糖鎖修飾差異に基づいて明確に各検体の特徴を抽出した。

本研究から、各症例の非癌部膵臓において ABO 組織－血液型抗原を規定する糖鎖構造が組織細胞膜上に発現していることを見出し、かつ、この糖鎖構造は癌部において消失することが明らかになった。さらに、膵管腺癌部においては、 $\alpha 2,3$ -、 $\alpha 2,6$ -シアル酸修飾やバイセクティング GlcNAc 修飾が増加することを見出した。

また、パブリックデータベースを用いた糖転移酵素群の遺伝子発現情報解析では、正常膵臓組織と膵癌組織間における多検体の RNA 発現比較を実施し、癌部における ABO 血液型抗原の消失は *FUT1* 遺伝子が関与していることを見出した。さらに、糖鎖プロファイリングデータを支持する結果として、膵癌組織においてシアル酸修飾やバイセクティング GlcNAc 修飾に関連する糖転移酵素遺伝子の発現亢進が確認された。

これらのことから、実験的手法と *In silico* でのデータサイエンス手法を組み合わせ、多面的・多角的アプローチによって、従来は困難であった情報深度での微量試料中糖鎖修飾情報の可視化に成功した。

微量組織試料上糖鎖修飾情報抽出の多角的アプローチと次世代型医療基盤への応用

薄切切片等の微量生体試料中糖鎖修飾情報が抽出可能となった。また、レクチンマイクロアレイによる種々のレクチン反応性は、病態組織を構成する個々の細胞への直接的なプローブ候補としても活用できる。

将来的には、レクチンを用いての組織染色情報なども組み合わせることで、空間的な翻訳後修飾の意義を探究することが可能と考えられる。

これにより、遺伝子・タンパク質に続き、第三の生体高分子と呼ばれる糖鎖修飾についても病理・形態学的知見と連結した、*In situ* な情報取得・可視化が期待される。

これらマルチオミクスとしての複合的な情報は、疾患本態の場（癌－微小環境等）と生命事象の表現型（遺伝子－タンパク質－翻訳後修飾）とが一つの空間において双方向に情報連結可能となる。本研究手法を種々の病理学的試料・対象疾患へ応用することで、従来は成し得なかった新たな創薬研究ツールとなることが期待されるものであった。

これらの観点から、生体由来の微量試料中糖鎖修飾情報の可視化とその意義の探求は、次世代型医学研究基盤への応用可能性を内包するものである。

第五章:【総括と展望】

総括

本研究では、疾患に関連する生体由来試料を対象とした糖鎖修飾情報の可視化とその意義の探求を行った。

第三章では、血清中のウイルス粒子を精製し、糖鎖プロファイリング系を確立した。特定の糖鎖構造が感染能を有すウイルス粒子に存在することを明らかにし、新たな診断技術開発・治療標的創出につながる可能性を見出した。

第四章では、凍結薄切切片から微量な糖タンパク質試料を抽出し、糖鎖プロファイリングを行った。多角的アプローチによる糖鎖修飾情報の可視化から、新たな医学研究・創薬基盤となる可能性を見出した。

今後の研究展望

ポストゲノム時代以降、生命事象の中心教義（セントラルドグマ）としての遺伝子情報による細胞制御機構やタンパク質挙動が関与するシグナリング研究が進展し、様々な疾患・病態に対する診断・創薬標的開発が盛んに行われた。しかし、生体における時空間的な現象（Phenomenon）にはセントラルドグマだけでは制御困難な部分が存在することが明らかになるにつれ、翻訳後修飾としてのリン酸化やアセチル化、脂質修飾や糖鎖修飾の意義が注目されてきた。核酸増幅や抗体によるタンパク質抗原認識と異なり、生体由来微量試料中の糖鎖修飾を高感度かつ網羅的に解析することは困難であった。

本研究において、レクチンマイクロアレイの発展型アプリケーションとして凍結薄切切片を用いた組織グライコームが可能となったことは、より生体内を反映したネイティブに近い条件下での翻訳後修飾情報を提供するものとなる。これにより、次世代型医学研究・病理学的探求に極めて有用な情報基盤となることが期待される。

Society 5.0 時代における次世代型医学研究基盤と糖鎖生物学情報の応用

わが国では、科学技術基本法に基づいた未来社会コンセプトとして、経済発展ならびに社会課題解決に向けた第 5 期基本計画“Society 5.0”が提唱されている

(https://www8.cao.go.jp/cstp/society5_0/)⁹¹。情報技術革命を経た今日において、Society 5.0 がもたらすデジタル社会では生命科学・医学研究の様相性（モダリティ）もまた技術革新が求められている。

実験的アプローチから得た網羅的糖鎖修飾情報を一つの生体情報層として位置づけし、パブリックデータベース等のオープンリソース上に存在する臨床医学情報との連結化を図ることは限られた試料量・症例数であっても極めて有益な情報深度を与える。さらに、研究データを運用する上での資金的・時間的コスト面を抑制することで、持続可能な研究展開と社会還元性を両立しうるものである。

これにより、従来の技術では解決が困難であった新興・再興感染症領域や悪性新生物、自己免疫疾患などの難治性疾患領域におけるアンメットメディカルニーズへ応える、新たな糖鎖関連創薬モダリティの研究開発戦略を提供するものであり、ビッグデータ時代における医工学研究の基礎となるものである。

【図表】

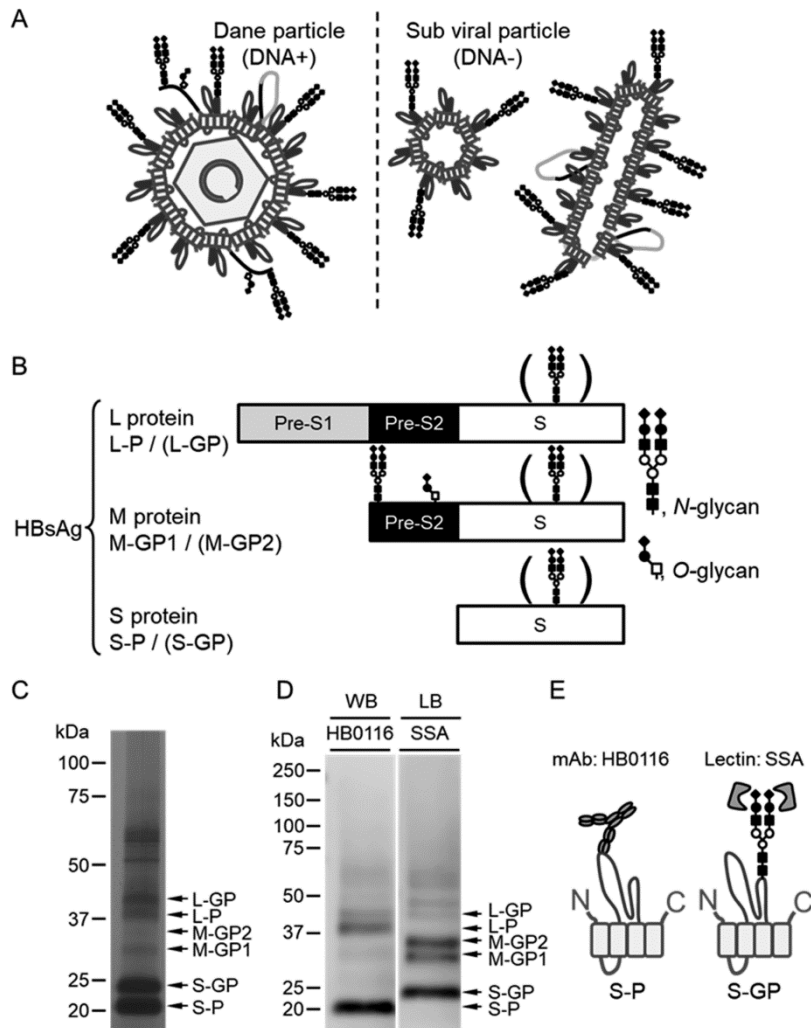


Figure 1: 抗体とレクチンによる HBsAg アイソフォームの認識差異

(A) HBV 粒子の模式図、ウイルス DNA を含有し感染能を有する粒子 (Dane 粒子, 左図) と感染に寄与しない球状および繊維状中空粒子 (サブウイルス粒子, 右図)。(B) HBsAg アイソフォームの模式図と糖鎖付加情報^{58,59}。S domain への N-結合型糖鎖修飾の有無で異なるアイソフォームは括弧付きで表記した。(C) 超遠心濃縮法で精製した HBV 試料の銀染色図。矢印は各 HBsAg アイソフォームを指示する。(D) HB0116 によるウェスタンブロット (WB) と SSA によるレクチンブロット (LB)。(E) HB0116 と SSA での異なる HBsAg アイソフォーム認識機構模式図。

HB0116: 抗 S domain モノクローナル抗体、SSA: α 2,6-シアル酸認識レクチン

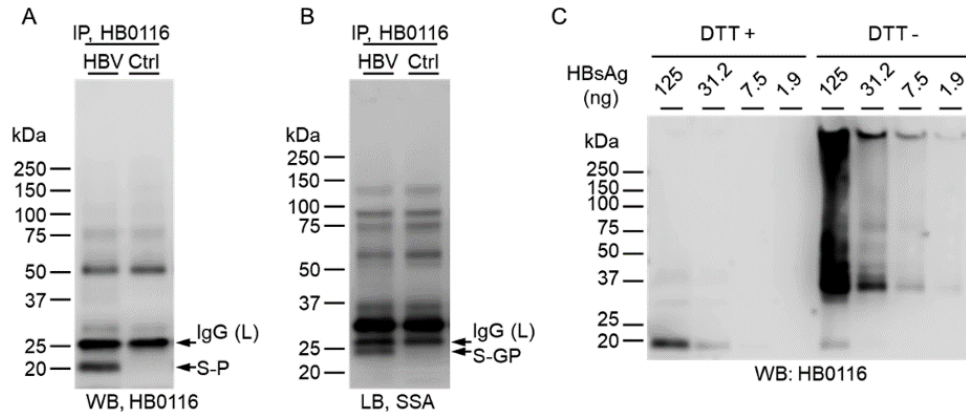


Figure 2: 糖鎖修飾型、非修飾型 HBsAg は同一ウイルス粒子上に存在

(A) HB0116 を用いた、HBV 粒子含有モデル血清（スパイク血清）の免疫沈降（IP）とウェスタンブロット。矢印は試料中の糖鎖非修飾型 S-HBsAg（S-P）と IP に使用した HB0116 の軽鎖 [IgG(L)] を指示する。(B) IP 試料の SSA レクチンブロット。スパイク血清試料では糖鎖修飾型 S-HBsAg（S-GP）が検出された。(C) 還元剤（DTT）添加有無条件下での HB0116 反応性検討。非還元条件下、HBV 粒子に対する HB0116 反応性は著しく増加した。

Ctrl: 健常者血清（ウイルス陰性）を用いたコントロール試料

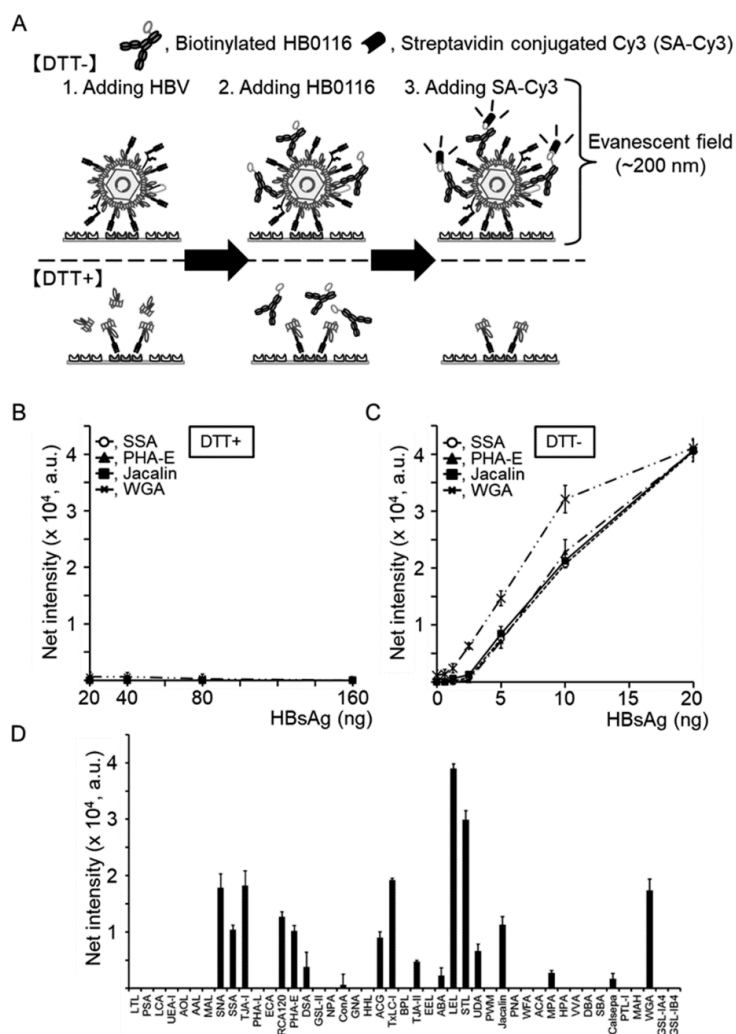


Figure 3: 抗体オーバーレイ法による HBV 粒子糖鎖プロファイリング

(A) DTT 有無条件下での HBV 試料を用いた抗体オーバーレイ法の概略図。レクチンマイクロアレイ基板に非結合性の試料や余剰な検出プローブ (HB0116, SA-Cy3) は各ステップにおける洗浄工程 (矢印) にて取り除かれた。(B) DTT+ にてウイルス粒子構造が破壊 [(A) 下図] 条件でのレクチンマイクロアレイ。基板から選択した 4 種のレクチンはいずれも検出限界以下。(C) DTT- にてウイルス粒子構造を保持 [(A) 上図] 条件でのレクチンマイクロアレイ。基板上レクチンシグナルを検出、HBsAg 量換算 5 ng でウイルス粒子上糖鎖プロファイルの定性下限 (LOQ = 5 ng)、1.25 ng で検出下限 (LOD = 1.25 ng) とした。(D) HBV 粒子 (5 ng) を用いた、45 種類のレクチンによる糖鎖プロファイリング。N-, O-結合型糖鎖認識レクチンにおいてシグナルを検出した。グラフ中のエラーバーは各レクチンシグナルの標準偏差 (\pm SD) を示す。

SSA: α 2,6-シアル酸認識レクチン、PHA-E: バイセクティンゲン GlcNAc 認識レクチン、Jacalin: O-結合型糖鎖認識レクチン、WGA: GlcNAc およびシアル酸認識レクチン

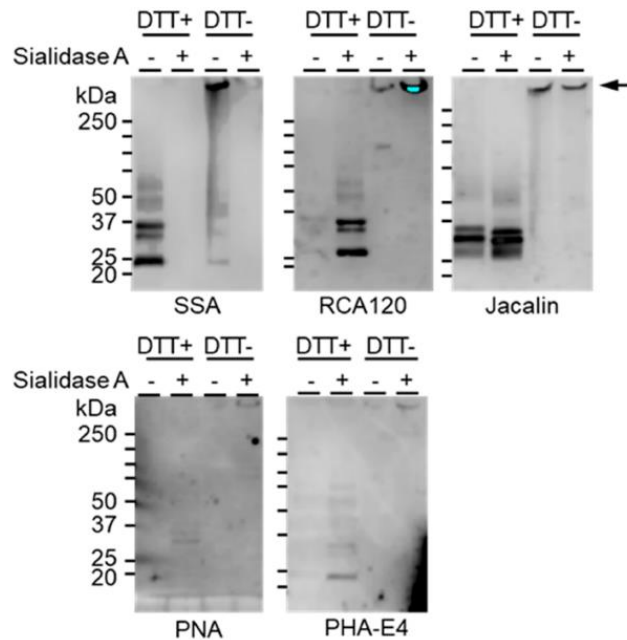


Figure 4: シアル酸消化前後の HBV 試料レクチンブロット

還元剤有無 (DTT+ or DTT-) 条件下で HBV に由来するバンドを検出した。矢印は、DTT- で粒子構造を保持した HBV のバンドを示す。シアリダーゼ処理によるシアル酸除去で SSA と RCA120 レクチン反応性が逆転した。この反応性変化は、HBsAg 上 N-結合型糖鎖末端に Sia α 2,6- Gal 構造の存在を示唆した。Jacalin は M-HBsAg のバンドを強く検出し、DTT- でも HBV 粒子を検出した。

SSA: α 2,6-シアル酸認識レクチン、RCA120: ガラクトース (Gal) 認識レクチン (N-結合型糖鎖非還元末端 Gal に強く反応)、Jacalin と PNA: O-結合型糖鎖認識レクチン、PHA-E: バイセクティング GlcNAc 認識レクチン

		SSA	RCA120	Jacalin	PNA	PHA-E4
DTT+	intact	+	-	+	-	-
	asialo	-	+	++	+	+
DTT-	intact	+	+	+	-	+
	asialo	-	++	+	+	+
specificity		S-GP	S-GP			S-GP
		M-GP1	M-GP1	M-GP1	M-GP1	M-GP1
		M-GP2	M-GP2	M-GP2	M-GP2	M-GP2

Table 1: HBsAg に対するレクチン反応性のまとめ

HBV 試料に対する 5 種類のレクチンブロット結果 (Figure 4) の概要。還元剤有無 (DTT+ or DTT-) における、シアリダーゼを用いたシアル酸有無 (Intact or asialo) 条件に分けてレクチン反応性を表記した。レクチンブロットで検出したバンドから、各レクチンが反応する HBsAg アイソフォーム特異性を下部に付記した。

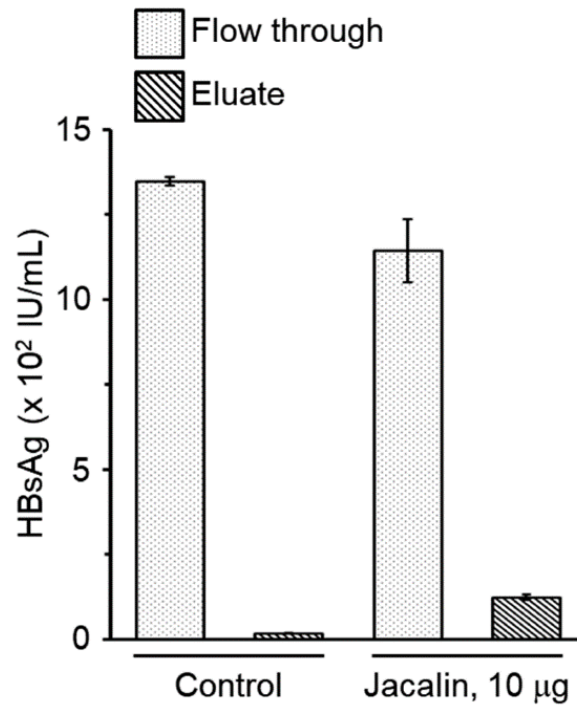


Figure 5: Jacalin 分画系における試料中 HBsAg 力価測定

コントロール実験 (Control) では、Jacalin レクチンを結合せず磁性ビーズのみを用いて患者血清を分画した後、CLIA 法にて HBsAg を測定した。大部分の HBsAg は磁性ビーズに結合せず、Flow-through 画分に存在し (1,348 IU/mL)、非特異的な吸着は僅かであった (17 IU/mL)。Jacalin レクチンを結合した分画系 (Jacalin, 10 µg) では、大部分の HBsAg が Flow-through 画分に存在した (1,144 IU/mL)。Jacalin 結合性 Eluate 画分には試料中の 10% に相当する HBsAg が存在した (124 IU/mL)。エラーバーは独立三群の分画実験における CLIA 測定値の標準偏差 (\pm SD) を示す。

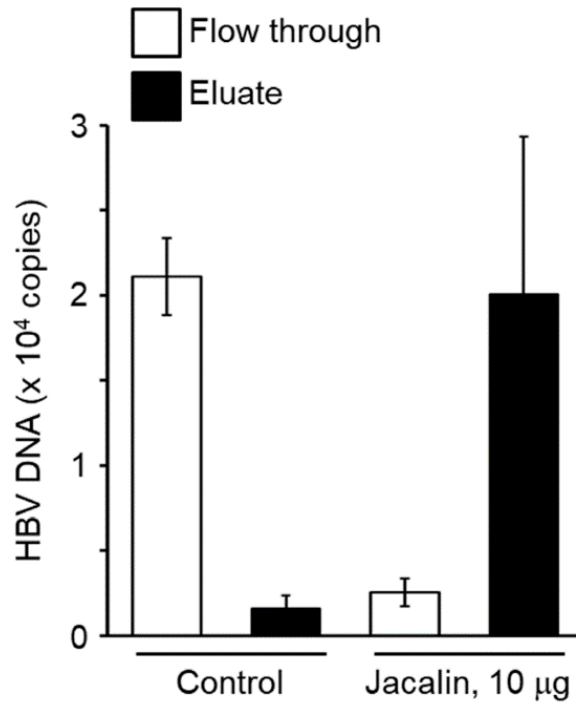


Figure 6: Jacalin 分画系における試料中 HBV DNA 量測定

リアルタイム定量 PCR 法にて画分中の HBV DNA 量を測定した。Jacalin 結合磁性ビーズを用いた分画 (Jacalin, 10 µg) では、Eluate 画分に大部分の HBV DNA が存在した (20,084 copies)。Flow-through 画分には僅かであった (2,543 copies) ことから、Jacalin 反応性 HBV 粒子はウイルス DNA を含有する Dane 粒子である。対照的に、コントロール実験では Dane 粒子を分画することが不可能であった。エラーバーは独立三群の分画実験における HBV DNA 定量値の標準偏差 (±SD) を示す。

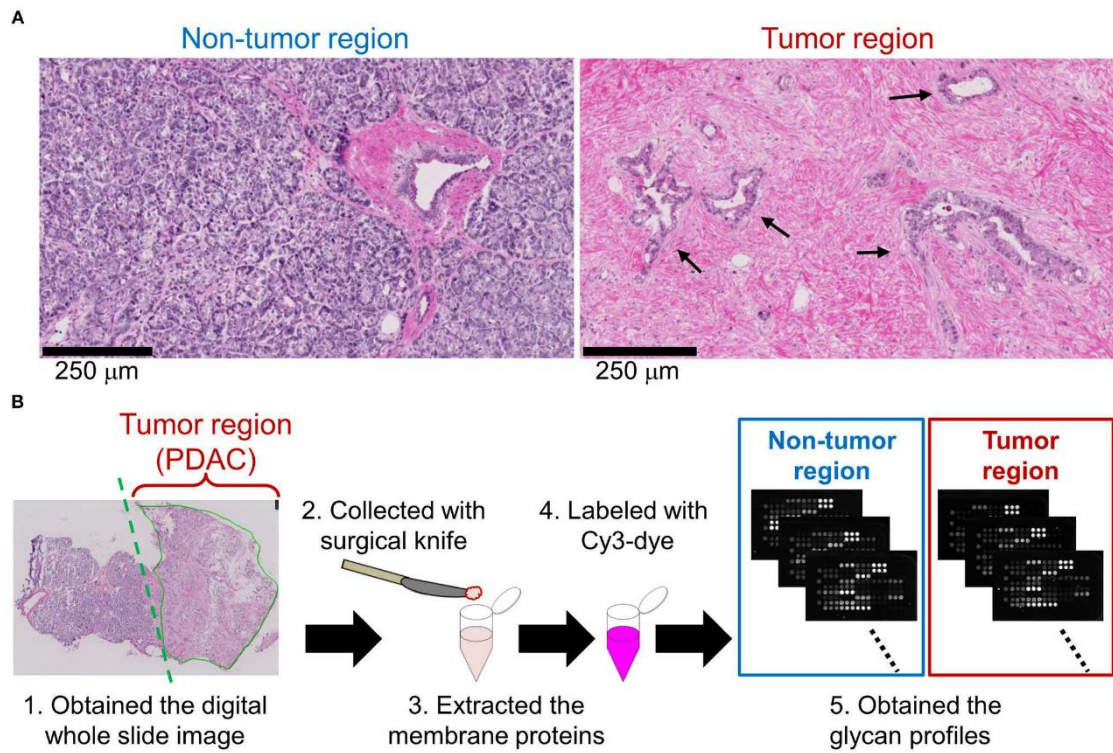


Figure 7: 膵管腺癌 (PDAC) 凍結薄切切片を用いた組織間比較糖鎖プロファイリング
 (A) PDAC 同一症例の非癌部 (左図) と癌部 (右図) のヘマトキシリン-エオシン染色像。矢印は癌腺管を示す。(B) 凍結薄切切片からの糖タンパク質抽出とレクチンマイクロアレイを用いた組織間比較糖鎖プロファイリング工程概略図

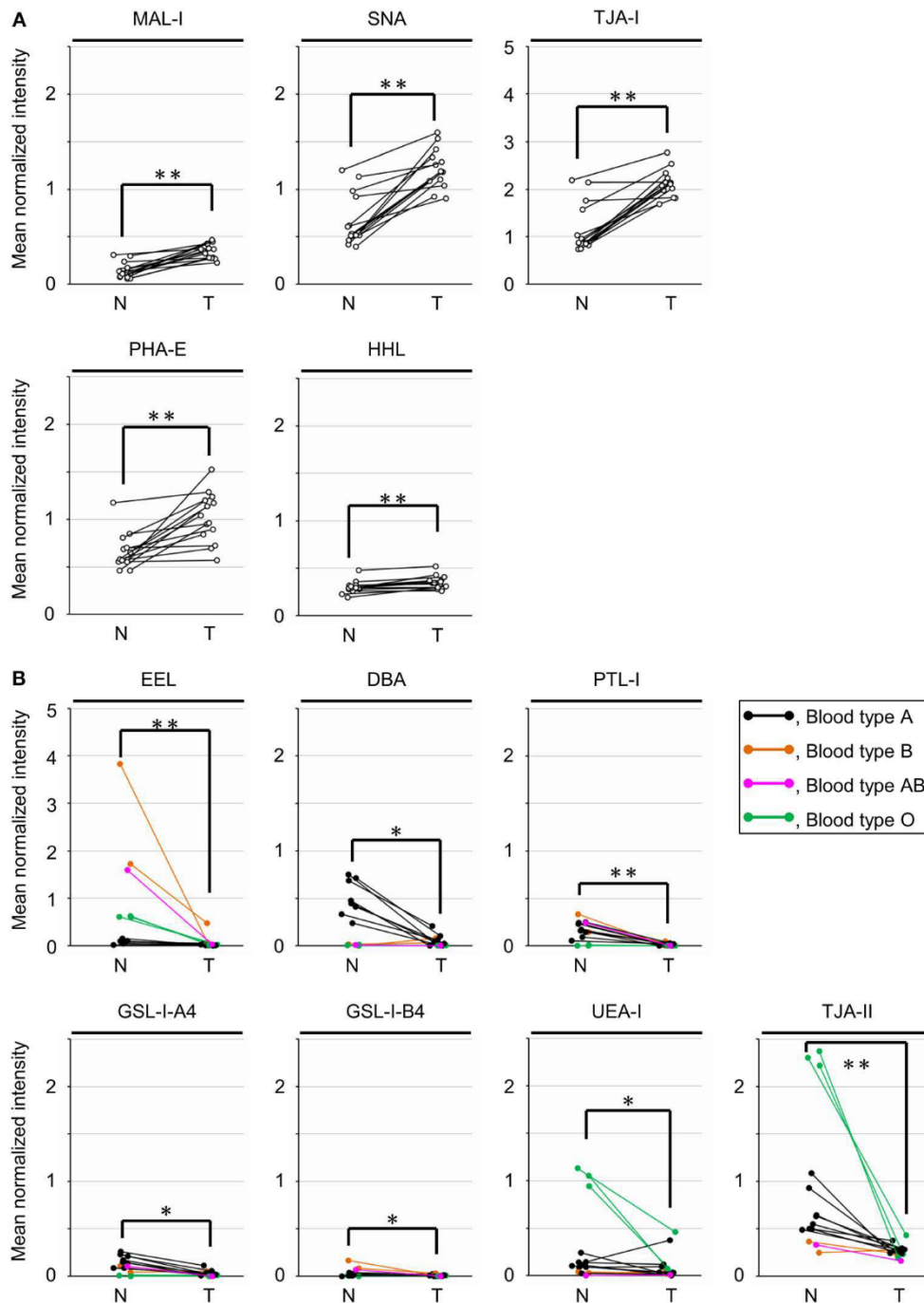


Figure 8: PDAC 同一症例における非癌部-癌部間レクチン反応性差異

(A) 同一症例の非癌部 (N) と癌部 (T) 組織間、対応のあるプロット。癌部で著しく有意な反応性亢進を認めた 5 種類のレクチンについて図示。(B) 7 種類の ABO 血液型抗原認識レクチンのプロット。各症例の血液型情報は N-T 間を連結する色線で表記 (黒: A 型、黄: B 型、赤紫: AB 型、緑: O 型)。各群におけるレクチンシグナルの統計量と P 値は Table 2 に記述した。

* $P < 0.05$, ** $P = 0.0001$

Lectin	P	Median (N)	Median (T)	FC(log2 [T/N]) ^a	Summary
MAL-I	0.0001	0.13	0.36	1.5	Up
SNA	0.0001	0.54	1.19	1.1	Up
TJA-I	0.0001	0.88	2.12	1.3	Up
PHA-E	0.0001	0.58	1.00	0.8	Up
HHL	0.0001	0.29	0.35	0.2	Up
MPA	0.0002	0.09	0.14	0.6	Up
SSA	0.0004	0.62	1.30	1.1	Up
ACG	0.0006	2.31	2.73	0.2	Up
TxLC-I	0.0067	0.15	0.21	0.5	Up
EEL	0.0001	0.12	0.02	2.9	Down
TJA-II	0.0002	0.59	0.26	1.2	Down
WFA	0.0004	0.24	0.07	1.7	Down
PTL-I	0.0005	0.15	0.00	5.1	Down
Calsepa	0.0012	0.80	0.61	0.4	Down
GSL-I-A4	0.0017	0.11	0.01	2.9	Down
DSA	0.0031	4.22	3.83	0.1	Down
SBA	0.0031	0.06	0.00	3.7	Down
GSL-I-B4	0.0052	0.01	0.00	1.5	Down
DBA	0.011	0.29	0.02	4.1	Down
UEA-I	0.030	0.11	0.04	1.5	Down
LCA	0.042	0.54	0.45	0.3	Down
UDA	0.049	6.59	5.63	0.2	Down
NPA	0.058	1.60	1.18	0.4	-
LEL	0.058	5.89	6.34	0.1	-
Jacalin	0.058	0.42	0.47	0.1	-
STL	0.091	3.72	3.82	0.0	-
PWM	0.091	0.04	0.02	0.7	-
BPL	0.10	0.09	0.13	0.5	-
PSA	0.12	0.31	0.34	0.1	-
ECA	0.12	0.24	0.13	0.9	-
GNA	0.12	0.50	0.42	0.3	-
ABA	0.14	1.01	0.81	0.3	-
MAH	0.24	0.23	0.24	0.0	-
GSL-II	0.33	0.04	0.02	0.8	-
LTL	0.43	0.05	0.06	0.2	-
WGA	0.43	1.90	1.80	0.1	-
VVA	0.50	0.00	0.00	N.D.	-
ACA	0.54	0.31	0.34	0.1	-
AOL	0.58	1.00	1.00	0.0	-
ConA	0.58	2.57	2.25	0.2	-
AAL	0.76	1.62	1.45	0.2	-
PNA	0.81	0.00	0.00	N.D.	-
PHA-L	0.95	0.12	0.12	0.0	-
RCA120	> 0.99	1.74	1.74	0.0	-
HPA	> 0.99	0.00	0.00	N.D.	-

Table 2: PDAC 組織間糖鎖プロファイリングの一変量解析

PDAC 非癌部 (N) と癌部 (T) 組織における糖鎖プロファイリング、45 種類のレクチンシグナル値 (Mean-normalized intensity) を用いた統計解析概要。表の右列に統計的有意差を認めたレクチン ($P < 0.05$) について、癌部でのレクチン反応性亢進 (Up) と低下(Down) 情報を記述した。^a 変化量が著しく大きい ($|FC(\log_2[T/N])| > 1$) 場合は太字で表記
N.D.: 非癌部でシグナルを検出せず、変化量算出不可能

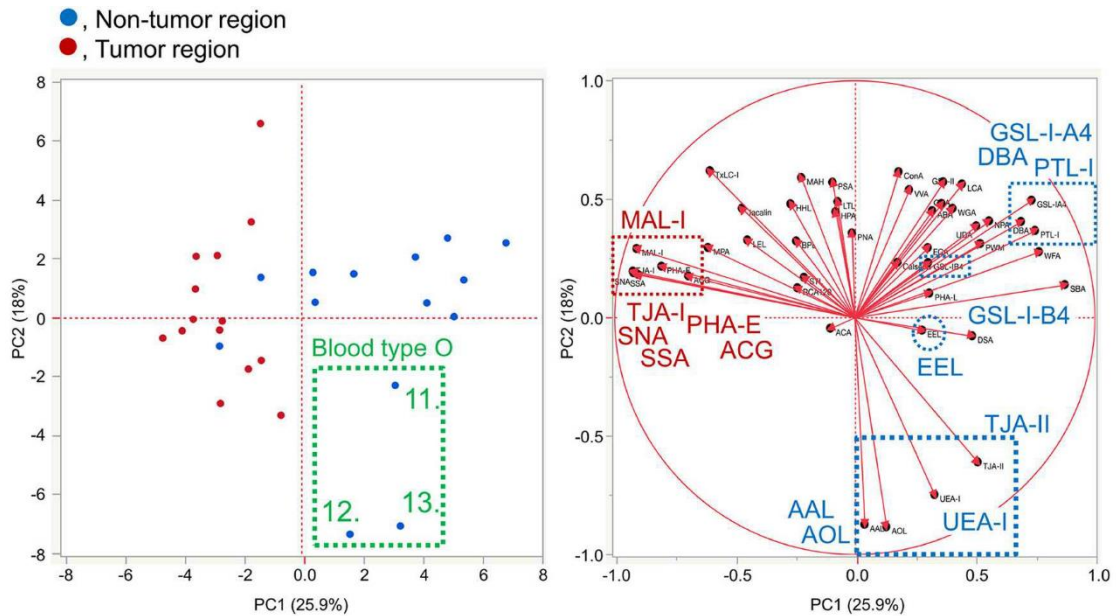


Figure 9: PDAC 組織間糖鎖プロファイリングの主成分解析

スコアプロットでは、レクチンマイクロアレイ結果から各症例における非癌部（青）と癌部（赤）組織をプロットした（左図）。ローディングプロットでは、45 種類のレクチン反応性ベクトルを図示した（右図）。非癌部と癌部を特徴づけるレクチンとして抽出されたものはそれぞれ青字と赤字で付記した。

緑破線枠: 血液型 O 型症例非癌部 (Patient No. 11-13)

青破線枠: ABO 血液型認識レクチン、フコース認識レクチン

赤破線枠: シアル酸認識レクチン、バイセクティング GlcNAc 認識レクチン

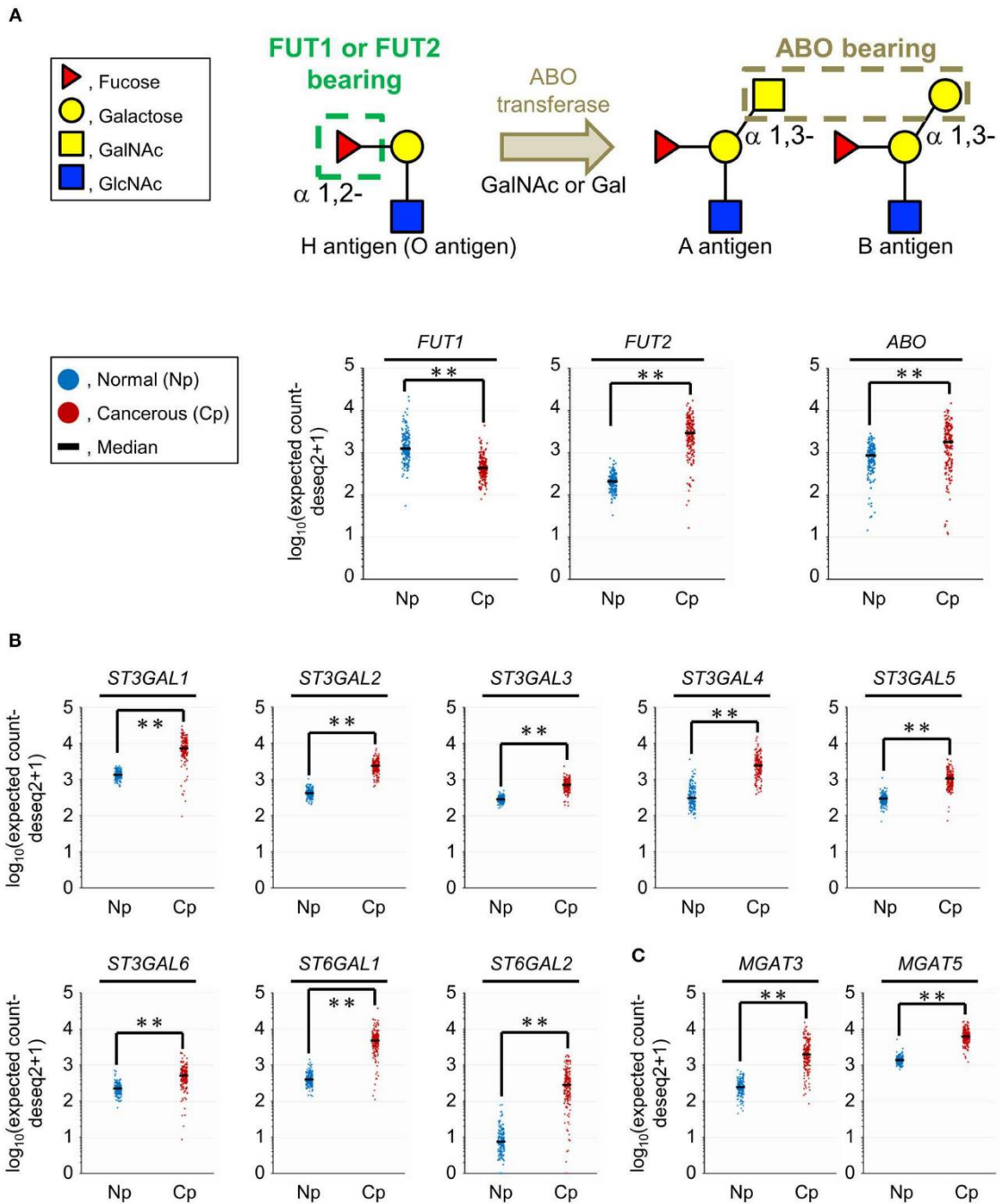
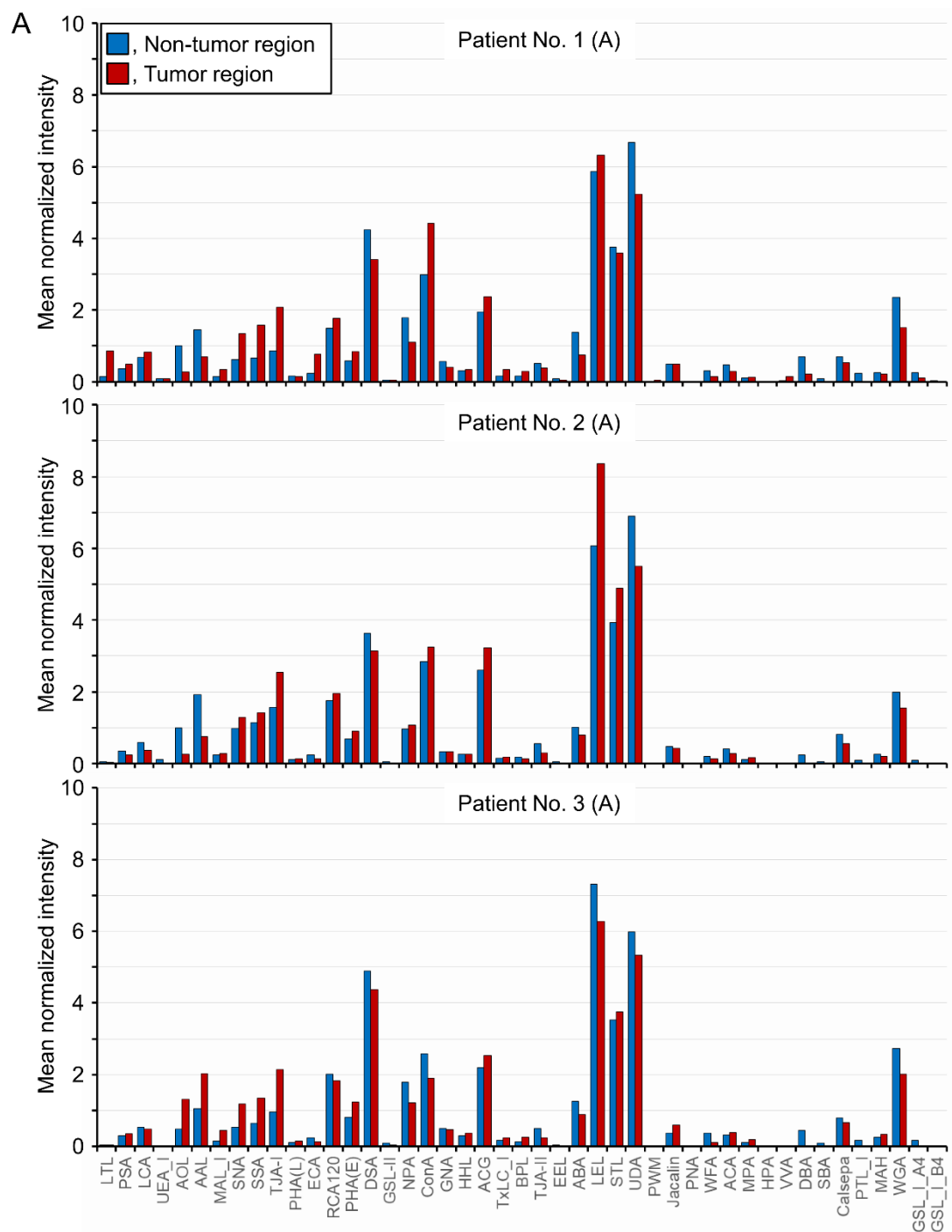


Figure 10: パブリックデータベースを用いた膵臓組織の糖転移酵素群遺伝子発現解析 (A) ABO 血液型抗原を規定する糖鎖構造の模式図 (上部)。各抗原を生合成する糖転移酵素遺伝子の発現比較 (下部)。正常膵臓組織 (Normal pancreas: Np) と膵臓癌組織 (Cancerous pancreas: Cp) はそれぞれ青と赤でプロットし、各群の中央値を黒線で付記した。(B) α 2,3-シアル酸 (ST3GALs)、 α 2,6-シアル酸 (ST6GALs) 転移酵素遺伝子発現比較。(C) バイセクティング GlcNAc 生合成酵素 (MGAT3) と β 1,6-分岐鎖構造生合成酵素 (MGAT5) 遺伝子発現比較。

Np: 165 症例、Cp: 178 症例、** $P=0.0001$

Age	[Range]
Mean, years	67.4 [55-84]
Gender	
Male	10
Female	4
Blood type	
O	3
A	8
B	2
AB	1
Tumor location	
Head	4
Body	4
Tail	6
Tumor size	
Mean, cm	3.0 [1.6-5.7]
Tumor grade	
G1	1
G2	10
G3	3
Stage (AJCC 8th edition)	
I	3
II	10
III	1

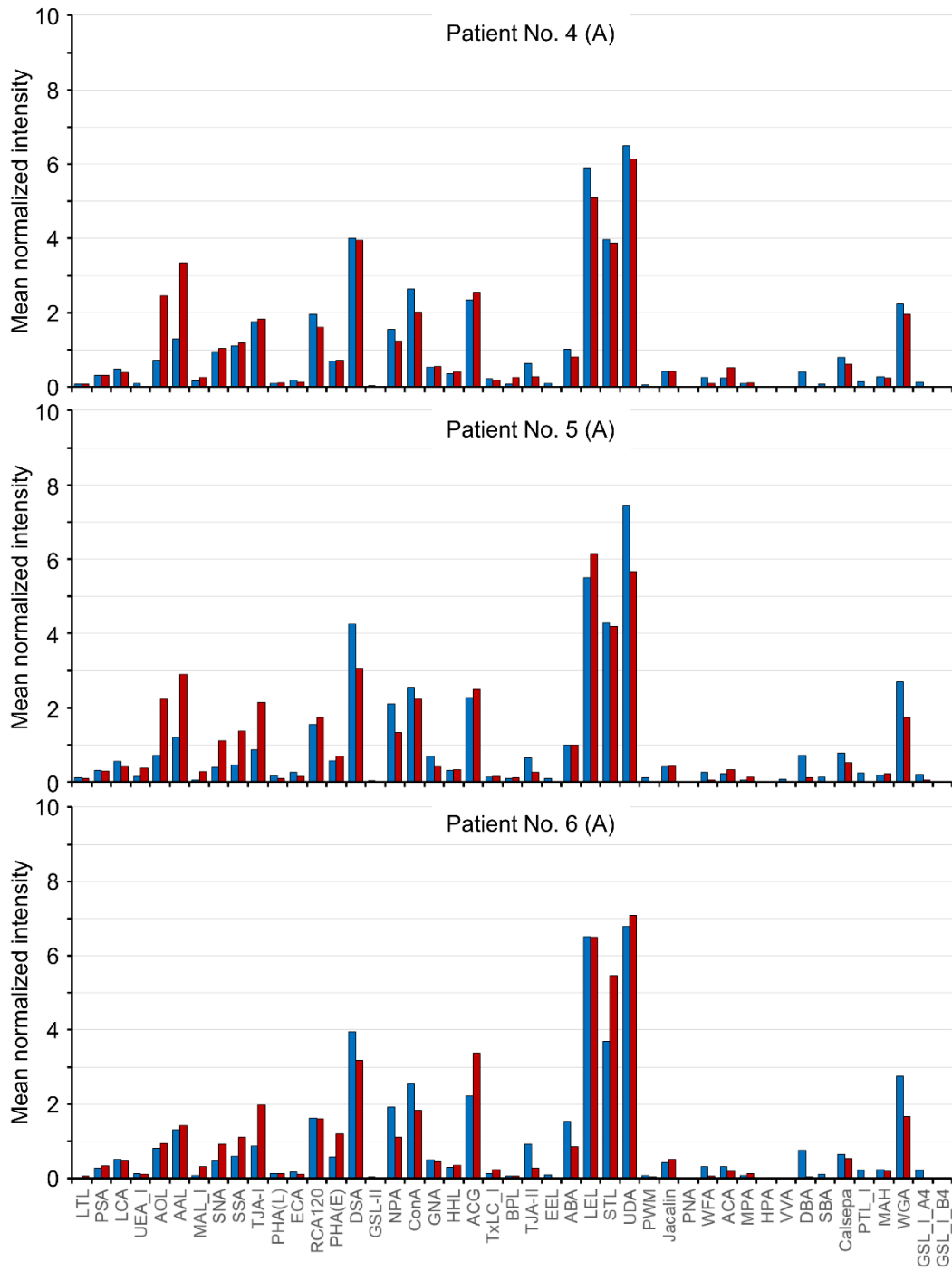
Supplemental table 1: 組織糖鎖プロファイリング試料の臨床病理学的特徴
本研究に使用した 14 症例の凍結組織は典型的な膵管腺癌である。



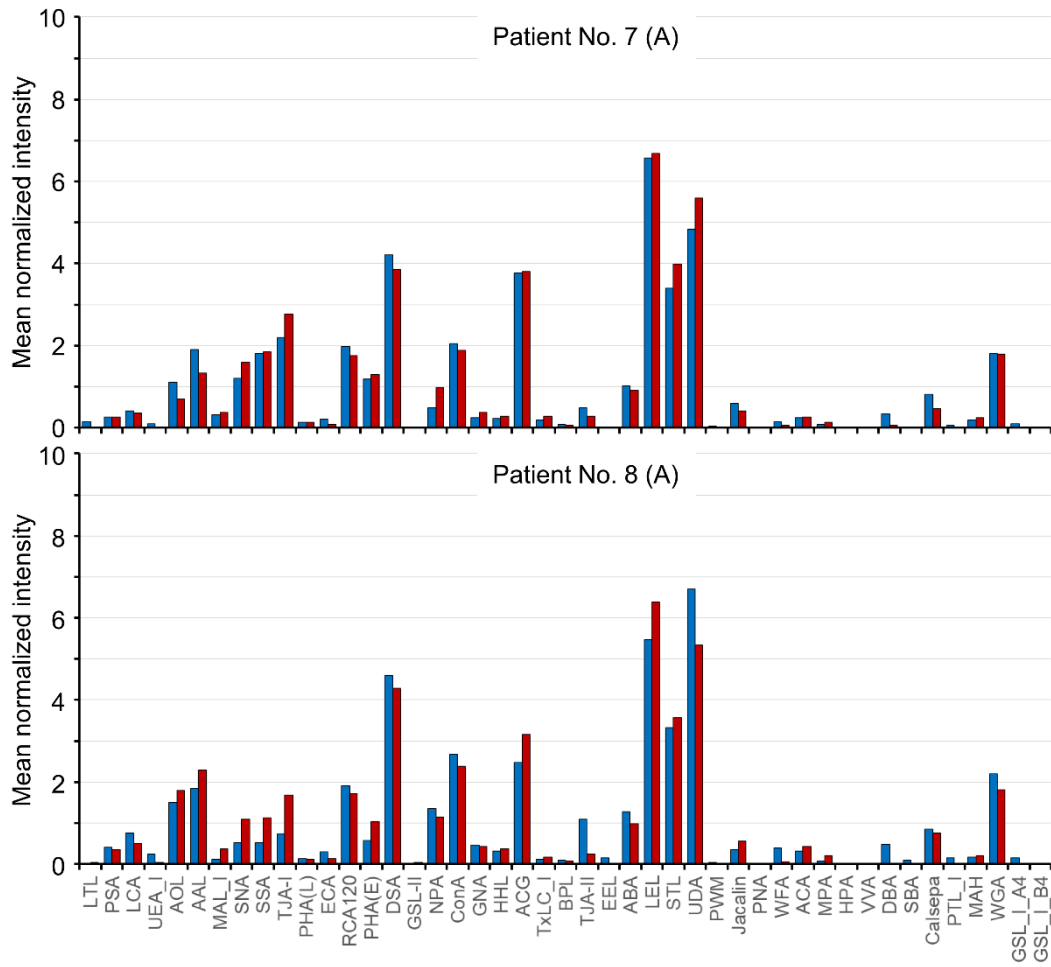
Supplemental figure 1: PDAC, 14 症例の組織間比較糖鎖プロファイリング

(A) 血液型 A 型症例 (Patient No. 1-8)、(B) B 型症例 (No. 9-10)、(C) O 型症例 (No. 11-13)、(D) AB 型症例 (No. 14)。

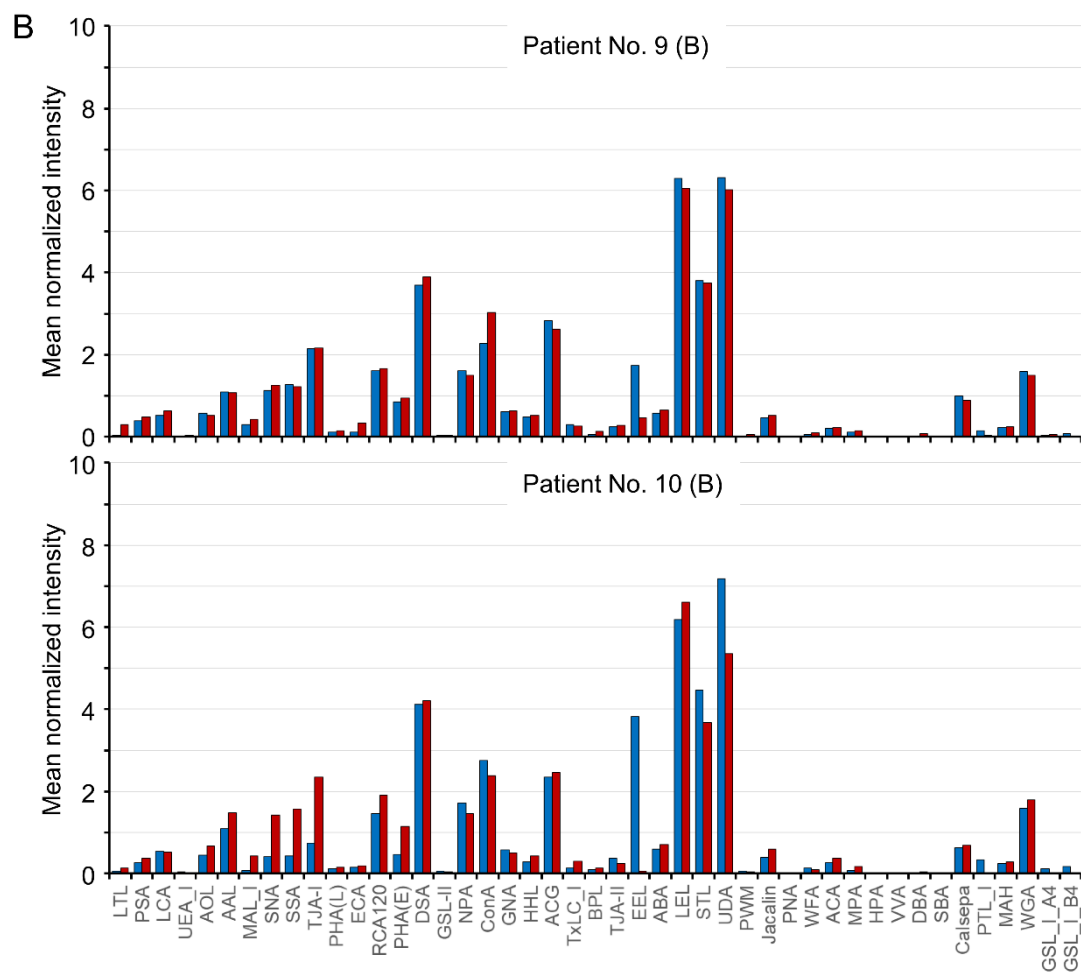
青: 非癌部組織、赤: 癌部組織



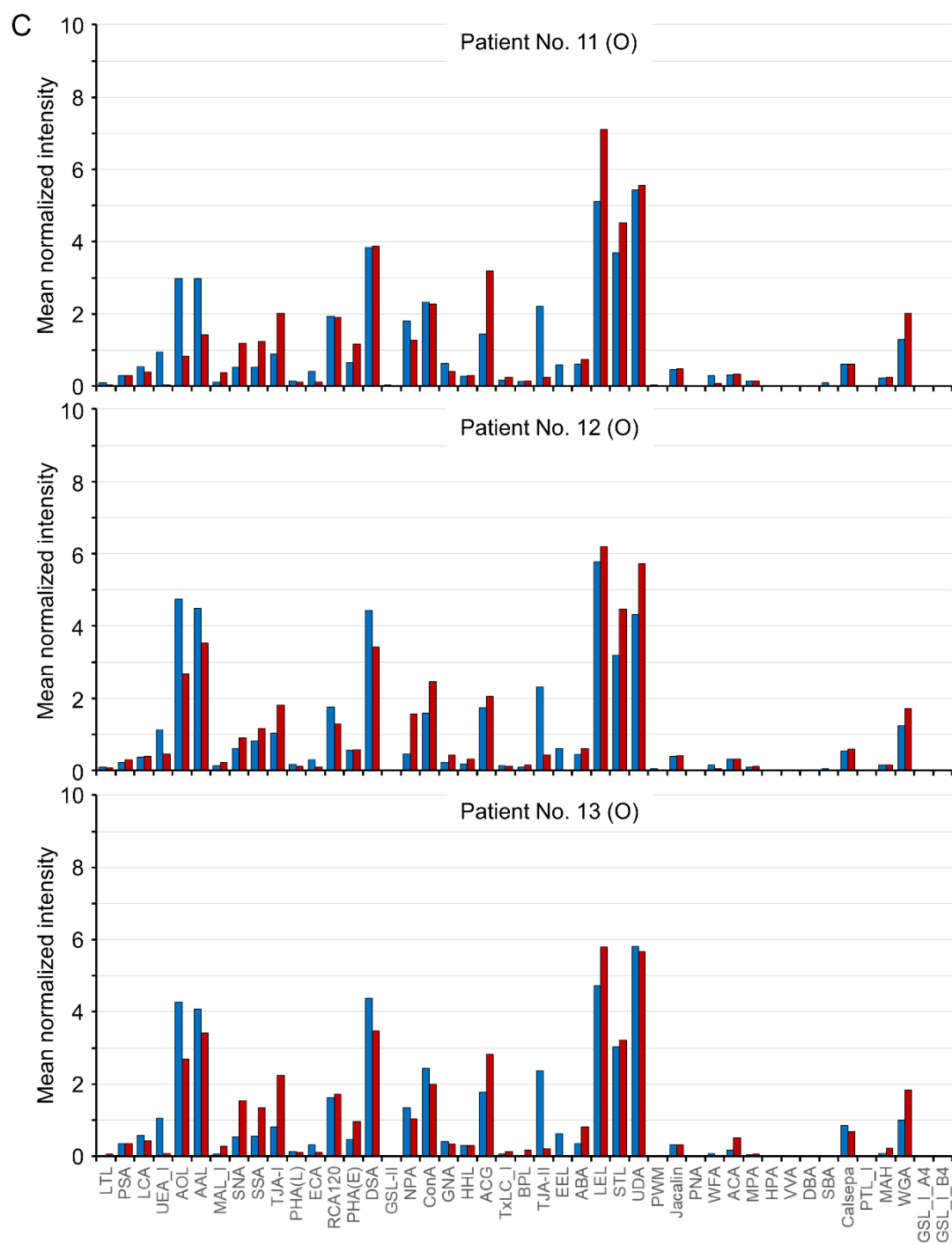
Supplemental figure 1: 続き



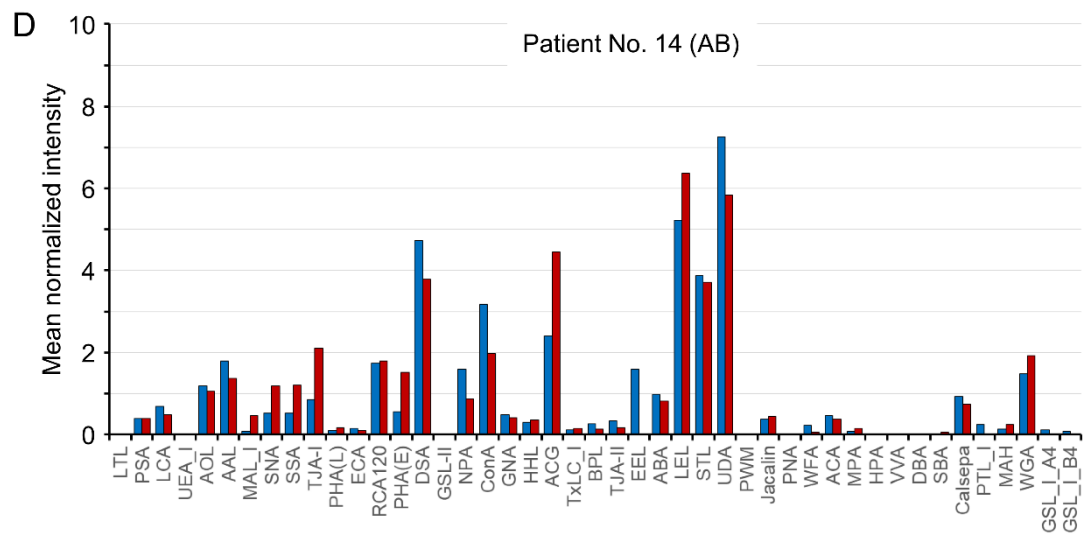
Supplemental figure 1: 続き



Supplemental figure 1: 続き



Supplemental figure 1: 続き



Supplemental figure 1: 続き

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました産業技術総合研究所糖鎖医工学研究センター長の成松久先生に謹んで深謝致します。

B 型肝炎ウイルス研究におけるご指導と臨床試料のご提供いただきました、国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター 溝上雅史先生、是永匡紹先生、杉山真也博士に心より感謝申し上げます。

膵臓癌の研究におけるご指導と臨床試料のご提供をいただきました、慶應義塾大学医学部病理学教室 坂元亨宇教授、眞杉洋平先生、山崎剣先生、今岡尚子先生に心より感謝申し上げます。

精製 B 型肝炎ウイルス試料をご提供いただきました、日本赤十字社近畿ブロック血液センター 高橋順子先生に感謝申し上げます。

抗 S-HBsAg モノクローナル抗体をご提供いただきました、富山大学医学部内科学第三講座 田尻和人先生ならびに富山大学大学院医学薬学研究部免疫学講座 小澤龍彦先生に感謝申し上げます。

肝炎ウイルス感染症に関してご指導いただきました、愛知医科大学医学部内科学講座肝胆膵内科学 伊藤清顕教授に感謝申し上げます。

レクチンマイクロアレイを中心とした糖鎖生物学的研究に関してご指導と多大なるご助言を賜りました、産業技術総合研究所生命工学領域細胞分子工学研究部門 久野敦博士、安形清彦博士、梶裕之博士、佐藤隆博士、岡谷千晶博士、日尾野隆大博士に心より感謝申し上げます。また、糖鎖研究におけるご助言をいただきました、創価大学理工学部糖鎖生命システム融合センター 榎谷内晶教授ならびにシスメックス株式会社 松田厚志博士、横浜市立大学 高倉大輔先生に心より感謝申し上げます。

公私共に多大なるご助言とご協力を賜りました、一般財団法人バイオインダストリー協会の服部幸男博士に深く感謝申し上げます。また、研究活動ならびに本研究の発展に関して様々な面でお世話になりました、中川知美女史、宮崎美知代女史、大橋祥子女史に心から感謝申し上げます。

最後に、卒後も深く交流を結ぶ友人、長きに亘り温かく見守っていただきました両親に心より感謝申し上げます。

令和 2 年
我妻孝則

【出典】

本学位論文では、(1) *Analytical Chemistry*, 90:10196-10203, 2018 に掲載された論文内容を American Chemical Society (ACS), Copyright [2018] から許可を得て再利用している。

また、(2) *Frontiers in Oncology*, 10:338, 2020 に掲載された論文内容を、CC-BY license (Creative Commons Attribution license, version 4.0) の規定にしたがって再利用している。

1. Takanori Wagatsuma, Atsushi Kuno, Kiyohiko Angata, Kazuto Tajiri, Junko Takahashi, Masaaki Korenaga, Masashi Mizokami, Hisashi Narimatsu
Highly Sensitive Glycan Profiling of Hepatitis B Viral Particles and a Simple Method for Dane Particle Enrichment. *Anal Chem*, doi:10.1021/acs.analchem.8b01030 (2018).

2. Takanori Wagatsuma, Chiaki Nagai-Okatani, Atsushi Matsuda, Yohei Masugi, Masako Imaoka, Ken Yamazaki, Michiie Sakamoto, Atsushi Kuno
Discovery of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma-Related Aberrant Glycosylations: A Multilateral Approach of Lectin Microarray-Based Tissue Glycomic Profiling With Public Transcriptomic Datasets. *Frontiers in Oncology* 10, doi:10.3389/fonc.2020.00338 (2020).

【引用文献】

- 1 Varki, A. Biological roles of glycans. *Glycobiology* **27**, 3-49, doi:10.1093/glycob/cww086 (2017).
- 2 Reily, C., Stewart, T. J., Renfrow, M. B. & Novak, J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol* **15**, 346-366, doi:10.1038/s41581-019-0129-4 (2019).
- 3 Xu, C. & Ng, D. T. Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 742-752, doi:10.1038/nrm4073 (2015).
- 4 Gu, J. & Taniguchi, N. Regulation of integrin functions by N-glycans. *Glycoconj J* **21**, 9-15, doi:10.1023/b:Glyc.0000043741.47559.30 (2004).
- 5 Takahashi, M., Tsuda, T., Ikeda, Y., Honke, K. & Taniguchi, N. Role of N-glycans in growth factor signaling. *Glycoconj J* **20**, 207-212, doi:10.1023/B:GLYC.0000024252.63695.5c (2004).
- 6 Seales, E. C. *et al.* Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer Res* **65**, 4645-4652, doi:10.1158/0008-5472.Can-04-3117 (2005).
- 7 Kaszuba, K. *et al.* N-Glycosylation as determinant of epidermal growth factor receptor conformation in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 4334-4339, doi:10.1073/pnas.1503262112 (2015).
- 8 Fukushima, K. & Yamashita, K. Interleukin-2 carbohydrate recognition modulates CTLL-2 cell proliferation. *J Biol Chem* **276**, 7351-7356, doi:10.1074/jbc.M008781200 (2001).
- 9 Fukushima, K., Hara-Kuge, S., Ideo, H. & Yamashita, K. Carbohydrate recognition site of interleukin-2 in relation to cell proliferation. *J Biol Chem* **276**, 31202-31208, doi:10.1074/jbc.M102789200 (2001).
- 10 Hanson, R. L. & Hollingsworth, M. A. Functional Consequences of Differential O-glycosylation of MUC1, MUC4, and MUC16 (Downstream Effects on Signaling). *Biomolecules* **6**, doi:10.3390/biom6030034 (2016).
- 11 Burchell, J. M., Beatson, R., Graham, R., Taylor-Papadimitriou, J. & Tajadura-Ortega, V. O-linked mucin-type glycosylation in breast cancer. *Biochem Soc Trans* **46**, 779-788, doi:10.1042/BST20170483 (2018).
- 12 Hussain, M. R., Hoessli, D. C. & Fang, M. N-acetylgalactosaminyltransferases in cancer. *Oncotarget* **7**, 54067-54081, doi:10.18632/oncotarget.10042 (2016).
- 13 Zhang, Y. *et al.* Cloning and characterization of a new human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, designated pp-GalNAc-T13, that is specifically expressed in neurons and synthesizes GalNAc alpha-serine/threonine antigen. *J Biol*

- Chem* **278**, 573-584, doi:10.1074/jbc.M203094200 (2003).
- 14 Guo, J. M. *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, pp-GalNAc-T12. *FEBS Lett* **524**, 211-218, doi:10.1016/s0014-5793(02)03007-7 (2002).
- 15 Narimatsu, Y. *et al.* Effect of glycosylation on cis/trans isomerization of prolines in IgA1-hinge peptide. *J Am Chem Soc* **132**, 5548-5549, doi:10.1021/ja9106429 (2010).
- 16 Bagdonaite, I. & Wandall, H. H. Global aspects of viral glycosylation. *Glycobiology* **28**, 443-467, doi:10.1093/glycob/cwy021 (2018).
- 17 Dube, D. H. & Bertozzi, C. R. Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 477-488, doi:10.1038/nrd1751 (2005).
- 18 Peixoto, A., Relvas-Santos, M., Azevedo, R., Santos, L. L. & Ferreira, J. A. Protein Glycosylation and Tumor Microenvironment Alterations Driving Cancer Hallmarks. *Front Oncol* **9**, 380, doi:10.3389/fonc.2019.00380 (2019).
- 19 Raman, R., Tharakaraman, K., Sasisekharan, V. & Sasisekharan, R. Glycan-protein interactions in viral pathogenesis. *Curr Opin Struct Biol* **40**, 153-162, doi:10.1016/j.sbi.2016.10.003 (2016).
- 20 Fujioka, Y. *et al.* A Sialylated Voltage-Dependent Ca(2+) Channel Binds Hemagglutinin and Mediates Influenza A Virus Entry into Mammalian Cells. *Cell Host Microbe* **23**, 809-818 e805, doi:10.1016/j.chom.2018.04.015 (2018).
- 21 Shirato, H. Norovirus and histo-blood group antigens. *Japanese journal of infectious diseases* **64**, 95-103 (2011).
- 22 Shirato, H. Norovirus recognition sites on histo-blood group antigens. *Front Microbiol* **3**, 177, doi:10.3389/fmicb.2012.00177 (2012).
- 23 Tuccillo, F. M. *et al.* Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: focus on CD43. *Biomed Res Int* **2014**, 742831, doi:10.1155/2014/742831 (2014).
- 24 Nguyen, A. T. *et al.* Organelle Specific O-Glycosylation Drives MMP14 Activation, Tumor Growth, and Metastasis. *Cancer Cell* **32**, 639-653 e636, doi:10.1016/j.ccell.2017.10.001 (2017).
- 25 Vajaria, B. N. & Patel, P. S. Glycosylation: a hallmark of cancer? *Glycoconj J* **34**, 147-156, doi:10.1007/s10719-016-9755-2 (2017).
- 26 Matsuda, A. *et al.* Development of an all-in-one technology for glycan profiling targeting formalin-embedded tissue sections. *Biochem Biophys Res Commun* **370**, 259-263, doi:10.1016/j.bbrc.2008.03.090 (2008).
- 27 Matsuda, A. *et al.* Assessment of tumor characteristics based on glycoform analysis

- of membrane-tethered MUC1. *Lab Invest* **97**, 1103-1113, doi:10.1038/labinvest.2017.53 (2017).
- 28 Krishna, K. & Bekaii-Saab, T. in *Biomarkers in Cancer* (eds Victor R. Preedy & Vinood B. Patel) 179-201 (Springer Netherlands, 2015).
- 29 Miyoshi, E., Moriwaki, K. & Nakagawa, T. Biological function of fucosylation in cancer biology. *J Biochem* **143**, 725-729, doi:10.1093/jb/mvn011 (2008).
- 30 Kuno, A. *et al.* A serum "sweet-doughnut" protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Sci Rep* **3**, 1065, doi:10.1038/srep01065 (2013).
- 31 Dias Rde, O., Machado Ldos, S., Migliolo, L. & Franco, O. L. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. *Molecules* **20**, 519-541, doi:10.3390/molecules20010519 (2015).
- 32 Mu, J., Hirayama, M., Sato, Y., Morimoto, K. & Hori, K. A Novel High-Mannose Specific Lectin from the Green Alga *Halimeda renschii* Exhibits a Potent Anti-Influenza Virus Activity through High-Affinity Binding to the Viral Hemagglutinin. *Mar Drugs* **15**, doi:10.3390/md15080255 (2017).
- 33 Van Holle, S. & Van Damme, E. J. M. Messages From the Past: New Insights in Plant Lectin Evolution. *Front Plant Sci* **10**, 36, doi:10.3389/fpls.2019.00036 (2019).
- 34 Hirabayashi, J., Tateno, H., Shikanai, T., Aoki-Kinoshita, K. F. & Narimatsu, H. The Lectin Frontier Database (LfDB), and data generation based on frontal affinity chromatography. *Molecules* **20**, 951-973, doi:10.3390/molecules20010951 (2015).
- 35 Kuno, A. *et al.* Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. *Nature methods* **2**, 851-856, doi:10.1038/nmeth803 (2005).
- 36 Hirabayashi, J., Yamada, M., Kuno, A. & Tateno, H. Lectin microarrays: concept, principle and applications. *Chem Soc Rev* **42**, 4443-4458, doi:10.1039/c3cs35419a (2013).
- 37 Tateno, H. *et al.* Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem* **286**, 20345-20353, doi:10.1074/jbc.M111.231274 (2011).
- 38 Matsuda, A. *et al.* Comparative Glycomic Analysis of Exosome Subpopulations Derived from Pancreatic Cancer Cell Lines. *J Proteome Res*, doi:10.1021/acs.jproteome.0c00200 (2020).
- 39 Matsuda, A. *et al.* Lectin Microarray-Based Sero-Biomarker Verification Targeting Aberrant O-Linked Glycosylation on Mucin 1. *Anal Chem* **87**, 7274-7281, doi:10.1021/acs.analchem.5b01329 (2015).

- 40 Zou, X. *et al.* A standardized method for lectin microarray-based tissue glycome mapping. *Sci Rep* **7**, 43560, doi:10.1038/srep43560 (2017).
- 41 Nagai-Okatani, C., Nagai, M., Sato, T. & Kuno, A. An Improved Method for Cell Type-Selective Glycomic Analysis of Tissue Sections Assisted by Fluorescence Laser Microdissection. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20030700 (2019).
- 42 Kuno, A. *et al.* Focused differential glycan analysis with the platform antibody-assisted lectin profiling for glycan-related biomarker verification. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **8**, 99-108, doi:10.1074/mcp.M800308-MCP200 (2009).
- 43 Kaji, H. *et al.* Glycoproteomic discovery of serological biomarker candidates for HCV/HBV infection-associated liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res* **12**, 2630-2640, doi:10.1021/pr301217b (2013).
- 44 Sogabe, M. *et al.* Novel glycobiomarker for ovarian cancer that detects clear cell carcinoma. *J Proteome Res* **13**, 1624-1635, doi:10.1021/pr401109n (2014).
- 45 Hirao, Y. *et al.* Glycoproteomics approach for identifying Glycobiomarker candidate molecules for tissue type classification of non-small cell lung carcinoma. *J Proteome Res* **13**, 4705-4716, doi:10.1021/pr5006668 (2014).
- 46 Trepo, C., Chan, H. L. & Lok, A. Hepatitis B virus infection. *Lancet (London, England)* **384**, 2053-2063, doi:10.1016/s0140-6736(14)60220-8 (2014).
- 47 Yu, M. W. *et al.* Prospective study of hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis in asymptomatic chronic hepatitis B virus carriers. *American journal of epidemiology* **145**, 1039-1047, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a009060 (1997).
- 48 Nguyen, M. H., Wong, G., Gane, E., Kao, J. H. & Dusheiko, G. Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy. *Clinical microbiology reviews* **33**, doi:10.1128/cmr.00046-19 (2020).
- 49 Seto, W. K. *et al.* Reduction of hepatitis B surface antigen levels and hepatitis B surface antigen seroclearance in chronic hepatitis B patients receiving 10 years of nucleoside analogue therapy. *Hepatology* **58**, 923-931, doi:10.1002/hep.26376 (2013).
- 50 Furusyo, N. *et al.* Long-term lamivudine treatment for chronic hepatitis B in Japanese patients: a project of Kyushu University Liver Disease Study. *World J Gastroenterol* **12**, 561-567, doi:10.3748/wjg.v12.i4.561 (2006).
- 51 Dervite, I., Hober, D. & Morel, P. Acute hepatitis B in a patient with antibodies to hepatitis B surface antigen who was receiving rituximab. *N Engl J Med* **344**, 68-69, doi:10.1056/nejm200101043440120 (2001).
- 52 Yeo, W. *et al.* Hepatitis B virus reactivation in lymphoma patients with prior resolved hepatitis B undergoing anticancer therapy with or without rituximab. *J*

- Clin Oncol* **27**, 605-611, doi:10.1200/JCO.2008.18.0182 (2009).
- 53 Hwang, J. P. & Lok, A. S. Management of patients with hepatitis B who require immunosuppressive therapy. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **11**, 209-219, doi:10.1038/nrgastro.2013.216 (2014).
- 54 Dryden, K. A. *et al.* Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy. *Mol Cell* **22**, 843-850, doi:10.1016/j.molcel.2006.04.025 (2006).
- 55 Bruss, V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* **13**, 65-73 (2007).
- 56 Heermann, K. H. *et al.* Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol* **52**, 396-402 (1984).
- 57 Gilbert, R. J. *et al.* Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14783-14788, doi:10.1073/pnas.0505062102 (2005).
- 58 Schmitt, S. *et al.* Analysis of the pre-S2 N- and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus. *J Biol Chem* **274**, 11945-11957, doi:10.1074/jbc.274.17.11945 (1999).
- 59 Schmitt, S. *et al.* Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. *J Gen Virol* **85**, 2045-2053, doi:10.1099/vir.0.79932-0 (2004).
- 60 Yu, D. M. *et al.* N-glycosylation mutations within hepatitis B virus surface major hydrophilic region contribute mostly to immune escape. *J Hepatol* **60**, 515-522, doi:10.1016/j.jhep.2013.11.004 (2014).
- 61 Salpini, R. *et al.* Hepatitis B surface antigen genetic elements critical for immune escape correlate with hepatitis B virus reactivation upon immunosuppression. *Hepatology* **61**, 823-833, doi:10.1002/hep.27604 (2015).
- 62 Ito, K. *et al.* Impairment of hepatitis B virus virion secretion by single-amino-acid substitutions in the small envelope protein and rescue by a novel glycosylation site. *J Virol* **84**, 12850-12861, doi:10.1128/JVI.01499-10 (2010).
- 63 Block, T. M. *et al.* Secretion of human hepatitis B virus is inhibited by the imino sugar N-butyldeoxynojirimycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2235-2239 (1994).
- 64 Block, T. M. *et al.* Treatment of chronic hepadnavirus infection in a woodchuck animal model with an inhibitor of protein folding and trafficking. *Nat Med* **4**, 610-614 (1998).
- 65 Werr, M. & Prange, R. Role for calnexin and N-linked glycosylation in the assembly and secretion of hepatitis B virus middle envelope protein particles. *J Virol* **72**, 778-782 (1998).
- 66 Takahashi, T., Nakagawa, S., Hashimoto, T., Takahashi, K. & Imai, M. Large-scale isolation of Dane particles from plasma containing hepatitis B antigen and

- deomnstration of circular double-stranded DNA molecule extruding directly from their cores. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **117**, 1392-1397 (1976).
- 67 Tajiri, K. *et al.* Analysis of the epitope and neutralizing capacity of human monoclonal antibodies induced by hepatitis B vaccine. *Antiviral Res* **87**, 40-49, doi:10.1016/j.antiviral.2010.04.006 (2010).
- 68 Hamada-Tsutsumi, S. *et al.* Validation of cross-genotype neutralization by hepatitis B virus-specific monoclonal antibodies by in vitro and in vivo infection. *PLoS One* **10**, e0118062, doi:10.1371/journal.pone.0118062 (2015).
- 69 Sunbul, M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol* **20**, 5427-5434, doi:10.3748/wjg.v20.i18.5427 (2014).
- 70 Inaba, S. *et al.* Individual nucleic amplification technology does not prevent all hepatitis B virus transmission by blood transfusion. *Transfusion* **46**, 2028-2029, doi:10.1111/j.1537-2995.2006.01011.x (2006).
- 71 Candotti, D. & Laperche, S. Hepatitis B Virus Blood Screening: Need for Reappraisal of Blood Safety Measures? *Front Med (Lausanne)* **5**, 29, doi:10.3389/fmed.2018.00029 (2018).
- 72 Vaughn, D. W. *et al.* Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of dengue virus infection. *Journal of clinical microbiology* **36**, 234-238 (1998).
- 73 Akkapinyo, C., Khownarumit, P., Waraho-Zhmayev, D. & Poo-Arporn, R. P. Development of a multiplex immunochromatographic strip test and ultrasensitive electrochemical immunosensor for hepatitis B virus screening. *Anal Chim Acta* **1095**, 162-171, doi:10.1016/j.aca.2019.10.016 (2020).
- 74 Loeffelholz, M. J. & Tang, Y. W. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections - the state of the art. *Emerg Microbes Infect* **9**, 747-756, doi:10.1080/22221751.2020.1745095 (2020).
- 75 Pan, Y. *et al.* Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID-19 patients. *J Infect* **81**, e28-e32, doi:10.1016/j.jinf.2020.03.051 (2020).
- 76 Houg, D. S. & Bijlsma, M. F. The hepatic pre-metastatic niche in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer* **17**, 95, doi:10.1186/s12943-018-0842-9 (2018).
- 77 Orth, M. *et al.* Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. *Radiat Oncol* **14**, 141, doi:10.1186/s13014-019-1345-6 (2019).
- 78 Adamska, A., Domenichini, A. & Falasca, M. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18071338 (2017).

- 79 Rahib, L. *et al.* Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* **74**, 2913-2921, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0155 (2014).
- 80 McGuigan, A. *et al.* Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol* **24**, 4846-4861, doi:10.3748/wjg.v24.i43.4846 (2018).
- 81 Masugi, Y. *et al.* Upregulation of integrin beta4 promotes epithelial-mesenchymal transition and is a novel prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Lab Invest* **95**, 308-319, doi:10.1038/labinvest.2014.166 (2015).
- 82 Zhu, Z. *et al.* Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol* **17**, 2419-2428, doi:10.1200/jco.1999.17.8.2419 (1999).
- 83 Koide, N. *et al.* Establishment of perineural invasion models and analysis of gene expression revealed an invariant chain (CD74) as a possible molecule involved in perineural invasion in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **12**, 2419-2426, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1852 (2006).
- 84 Yamazaki, K. *et al.* Upregulated SMAD3 promotes epithelial-mesenchymal transition and predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Lab Invest* **94**, 683-691, doi:10.1038/labinvest.2014.53 (2014).
- 85 Shimomura, O. *et al.* A Novel Therapeutic Strategy for Pancreatic Cancer: Targeting Cell Surface Glycan Using rBC2LC-N Lectin-Drug Conjugate (LDC). *Mol Cancer Ther* **17**, 183-195, doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0232 (2018).
- 86 Tada, K. *et al.* Fucosyltransferase 8 plays a crucial role in the invasion and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Surg Today* **50**, 767-777, doi:10.1007/s00595-019-01953-z (2020).
- 87 Chang, Y. *et al.* Comprehensive characterization of cancer-testis genes in testicular germ cell tumor. *Cancer Med* **8**, 3511-3519, doi:10.1002/cam4.2223 (2019).
- 88 Ravn, V. & Dabelsteen, E. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **108**, 1-28, doi:10.1034/j.1600-0463.2000.d01-1.x (2000).
- 89 Dotz, V. & Wuhrer, M. Histo-blood group glycans in the context of personalized medicine. *Biochim Biophys Acta* **1860**, 1596-1607, doi:10.1016/j.bbagen.2015.12.026 (2016).
- 90 de Mattos, L. C. Structural diversity and biological importance of ABO, H, Lewis and secretor histo-blood group carbohydrates. *Rev Bras Hematol Hemoter* **38**, 331-340, doi:10.1016/j.bjhh.2016.07.005 (2016).

- 91 Ishii, E. *et al.* The advent of medical artificial intelligence: lessons from the Japanese approach. *J Intensive Care* **8**, 35, doi:10.1186/s40560-020-00452-5 (2020).