

筑波大学

博士（医学）学位論文

膵癌特異的な rBC2LCN レクチンの
リガンドの同定

2021

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

古田智章

目次

1. 背景と目的.....	3
1.1 我が国における膵癌の現状	
1.2 癌研究における糖鎖	
1.3 糖鎖解析への取り組み	
1.4 当研究室の取り組み ～rBC2LCN レクチンの同定～	
1.5 rBC2LCN レクチンと多能性幹細胞の関連	
1.6 癌研究における rBC2LCN レクチン	
1.7 レクチンの治療応用の問題点	
1.8 本研究の目的	
2. 材料と方法.....	7
2.1 臨床サンプルとマウス PDX サンプル	
2.2 細胞株および細胞培養	
2.3 フローサイトメトリー	
2.4 免疫蛍光細胞染色	
2.5 免疫組織化学染色および二重染色	
2.6 LC-MS/MS 分析	
2.7 rBC2LCN または抗 CEA 抗体による沈降	
2.8 ウェスタンおよびレクチンブロット解析	
2.9 統計解析	
3. 結果	12
3.1 LC-MS/MS 解析による膵癌細胞における rBC2LCN 陽性糖タンパク質の同定	
3.2 膵癌における 5 つの候補タンパク質の免疫組織化学的染色	
3.3 膵癌細胞株における CEA と rBC2LCN の検証	
3.4 膵癌 PDX マウス腫瘍組織における CEA と rBC2LCN の検証	
3.5 臨床膵癌および正常組織における CEA と rBC2LCN の検証	
4. 考察	17
4.1 本研究の総括	

4.2 LC/MS/MS 解析による rBC2LCN レクチンの候補リガンド	
4.3 候補タンパクに対する免疫組織化学染色結果	
4.4 CEA の検証	
4.5 rBC2LCN の有用性の再確認	
4.6 rBC2LCN 認識糖鎖の発現部位	
4.7 α 1-2 フコース	
4.8 CEA をターゲットとした治療応用	

5. 結語	22
6. 要約図.....	23
7. 略語集.....	24
8. 謝辞	25
9. 出典	26
10. 図表	27
参考文献.....	47

1.背景と目的

1.1 我が国における膵癌の現状

膵癌は5年生存率が約8%という極めて予後不良な癌のひとつである（国立がん研究センターがん情報サービス 2009-2011）。膵癌に対する治療として手術および化学療法が主におこなわれているが、膵臓は後腹膜臓器であり臨床症状や自覚症状が少なく早期診断が難しいとされ、診断時に手術を受けることができる膵癌患者は全体の約20%に過ぎない。したがって膵癌の治療においては、新規治療薬などの新しい治療戦略の開発が不可欠となっている。

1.2 癌研究における糖鎖

これまでに、膵癌を克服しようとする様々な研究が行われてきたが、有用かつ決定的な治療標的はこれまでに解明されていない¹。当研究室では膵癌への治療戦略において、すべての細胞が glycocaryx と呼ばれる糖鎖で覆われていることから細胞表面の糖鎖に注目し研究を行っている。生体内において糖鎖はタンパク質や脂質に結合し、糖タンパク質、プロテオグリカン、糖脂質として存在している²。この糖鎖は癌の発生や進行等の様々な状態に変化することが知られており、糖鎖修飾は悪性腫瘍の変化の特徴でもあるとされている³。癌化における代表的な糖鎖修飾の変化として、腫瘍マーカーである CA19-9 に応用されているシアル化や、AFP-L3 に応用されているフコシル化、さらに O 型糖鎖の短縮が報告されている³（図1）。

1.3 糖鎖解析への取り組み

糖鎖構造はその複雑性や多様性から直接的に構造を解析することが難しくなっ

ている。そこで新たな糖鎖解析の方法として、共同研究を行っている産業技術総合研究所でレクチンを利用したレクチンマイクロアレイが開発された。レクチンとは糖鎖に結合するタンパク質を表し、レクチンによって結合する糖鎖が違ふという特徴を有している。この特徴を利用したレクチンマイクロアレイによって、間接的な糖鎖構造解析が可能となった。

1.4 当研究室の取り組み ～rBC2LCN レクチンの同定～

当研究室ではこれまでにレクチンマイクロアレイを使用し、rBC2LCN レクチンが膵癌細胞に強く結合すること⁴を同定し、さらに糖鎖構造解析によりそのフコシル化三糖エピトープである H type 3 (Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc) が膵癌細胞に発現していること⁵を明らかにしている。

本研究で着目した rBC2LCN レクチンは細菌の *Burkholderia cenocepacia* から検出されたもので、フコース複合体 (Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc/GalNAc (H type 1/3/4)) に特異性を持つとされている⁴(図 2)。

さらにこの rBC2LCN レクチンは外因性レクチンで問題となる血液凝集が起こらず、rBC2LCN レクチンと緑膿菌外毒素の 38kDa ドメインを融合させて作製したレクチン-薬物複合体 (lectin drug conjugate : LDC) は、in vitro および in vivo の膵癌モデルで強い抗癌作用を示している⁴。

1.5. rBC2LCN レクチンと多能性幹細胞の関連

また、rBC2LCN レクチンは、H type3 に結合する人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPS Cell) の幹細胞マーカーとして同定され、rBC2LCN 認識糖鎖は多能性を有する細胞に主に発現しており^{6,7}、このレクチンを緑膿菌毒素と結合させ、未分化な多能性幹細胞と分化した体細胞に添加すると、未分化なヒ

ト多能性幹細胞 (human pluripotent stem cell : hPSC) のみが除去されたと報告されている⁸(図 3, 4)。

1.6 癌研究における rBC2LCN レクチン

rBC2LCN レクチンの癌研究におけるこれまでの報告では、いくつかの種類の人にこのレクチンが結合する細胞が存在し、rBC2LCN 認識糖鎖と細胞の増殖速度の低下、細胞運動性の増加、薬剤耐性などの癌幹細胞に似た特徴との関連が示唆されている^{4,9}。実際、膀胱癌や大腸癌、乳癌、前立腺癌などの癌における rBC2LCN レクチンの報告が最近なされている⁹⁻¹¹。大腸癌においては膀胱癌同様に、rBC2LCN レクチンと緑膿菌毒素が *in vitro* および *in vivo* の大腸癌モデルで強い抗腫瘍効果を証明した¹⁰(図 5)。しかし、癌細胞における rBC2LCN レクチン認識糖鎖の分子機構、具体的には癌細胞における rBC2LCN 認識糖鎖(H type 1/3/4)で装飾されたキャリアータンパク質として働く分子については未だ解明されていない。また、前述のように rBC2LCN レクチン陽性細胞は、癌幹細胞としての特徴を保持している可能性があり、癌の治療標的となりうると思われる。

1.7 レクチンの治療応用の問題点

レクチンの治療応用と考えた際に、正常細胞への反応性が大きな障壁となる可能性がある。実際、rBC2LCN 認識糖鎖を修飾する糖転移酵素である FUT1, FUT2 に関しては、正常組織にも発現しており、rBC2LCN が癌細胞だけでなく正常組織にも反応する可能性がある。

1.8 本研究の目的

本研究では、膀胱癌細胞に発現する rBC2LCN の糖タンパク質リガンドを同定する

ことを目的とし、さらに診断および治療応用への可能性も考慮し、膵癌特異的なリガンドの同定を試みた (図 6)。

2. 材料と方法

2.1 臨床サンプルとマウス PDX サンプル

患者の腫瘍および正常組織は、筑波大学附属病院から入手した。膵癌 PDX モデルは、過去の論文を参照し作製した⁴。患者から採取した腫瘍サンプルを 2mm の大きさにミンチし、3~4 個を CB17/Icr-scid/SCID マウス（雌、6~8 週齢、日本 CLEA 社製）の腹部に作成した皮下ポケットに移植した。すべての動物実験は、筑波大学動物実験委員会 University Health Network（茨城県つくば市）で承認された倫理規定に基づいて行い、マウスは筑波大学の動物使用ガイドラインに従って管理した。本研究のための臨床サンプルの使用については、すべての患者から書面によるインフォームド・コンセントを得て、筑波大学附属病院の Institutional Review Board（IRV コード：H28-90）の承認を得た。

2.2 細胞株および細胞培養

ヒト膵癌細胞株 Capan-1 は American Type Tissue Culture Collection (ATCC)より、SUIT-2 細胞は Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank より購入した。Capan-1 細胞は、20%ウシ胎児血清（Thermo Fisher Scientific 社）と 1%ペニシリン-ストレプトマイシン（富士フイルム和光純薬社）を添加した Iscove's modified Dulbecco's medium（富士フイルム和光純薬社）で培養した。SUIT-2 細胞は、10%FBS および 1%ペニシリン-ストレプトマイシン（富士フイルム和光純薬）を添加したダルベッコ改変イーグル培地（富士フイルム和光純薬社）で培養した。

2.3 フローサイトメトリー

rBC2LCN-635（富士フイルム和光純薬株式会社）および FITC 標識抗 CEA モノクローナル抗体（mAb ; Cat No.ab106739, Abcam）を用いて、室温で 30 分間反応させた。2 回の洗浄後、FACSJazz cytometer（BD）と FlowJo v.7.6.1（FlowJo LLC）を用いて解析した。

2.4 免疫蛍光細胞染色

35mm のガラスボトムディッシュに細胞を播種し、培養した。細胞が 50%~70% コンフルエントになった後、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、パラホルムアルデヒド（富士フイルム和光純薬）で 10 分間固定した。ウシ血清アルブミンを用いて室温で 60 分間ブロッキングした後、抗 CEA mAb（GTX17254, GeneTex 社）を添加し、4°C で一晩反応させた。ビオチン化した二次ポリクローナル抗体（pAb）と 10 分間の反応後、ストレプトアビジン-Alexa 594（s32256, Invitrogen）を 30 分間添加した。PBS で洗浄後、FITC 標識した rBC2LCN を室温で 60 分間添加した。核の染色は、4',6-diamidino-2-phenylindole（Dojindo Molecular Technologies Inc）を用いて行った。染色した細胞の画像は、BZX-710 顕微鏡（株式会社キーエンス）で取得した。

2.5 免疫組織化学染色および二重染色

ホルマリン固定，パラフィン包埋した組織を 3 μ m のスライド切片に切り出し，脱パラフィン処理した。抗原の賦活化は、10 mmol/L クエン酸-Na 緩衝液を用いてオートクレーブで行った。その後、組織切片をメタノール 3%ペルオキシダーゼ水溶液で 15 分間処理し、内因性ペルオキシダーゼ活性を失活させた。動物血清でブロッキングした後、組織を以下の一次抗体と室温で 1 時間反応させた：抗 CEA mAb（1 : 50、GTX17254、GeneTex）、抗 ITGB1 mAb（1 : 50、Cat No.

9699、Cell Signaling Technology)、抗 MUC16 pAb (1 : 500、Cat No.20077-1-AP、Proteintech)、抗 PSCA mAb (4 μ g/mL、Cat No.MAB7636、R&D Systems)、および抗 GLUT1 pAb (1 : 50、Cat No.ab14683、Abcam)。免疫組織化学染色は、メーカーの仕様書に従って、SAB-PO キット (ニチレイバイオサイエンス) を用いたアビジン・ビオチン複合体 (ABC) 法で行った。3,3' -ジアミノベンジジン (ニチレイバイオサイエンス) で可視化し、核染色はヘマトキシリンで行った。画像は、BZ-X710 顕微鏡 (株式会社キーエンス) で撮影した。

組織の染色性は、2 人の研究者が独立して盲検法で評価した^{12,13}。組織の染色性は、陽性細胞の割合に応じて以下のように score 化した : 0、0%、1、25%未満、2、25%~50%、3、51%~75%、4、76%~100%。また、染色強度を以下のように score 化した。0 : なし、1 : 弱い、2 : 中程度、3 : 強い。上記の 2 つの sub score を掛け合わせて染色 score を算出した。score が 0~3 の試料は低発現、score が 4 以上のサンプルは高発現と判断した。正常な膵臓組織は、膵管の染色強度に基づいて、低発現群と高発現群に分けた。

蛍光染色は、rBC2LCN と一次抗体による二重染色のために、切片をストレプトアビジン 594 (Invitrogen) と FITC 標識した rBC2LCN で可視化した。蛍光画像は、BZ-X710 顕微鏡 (株式会社キーエンス) を用いて得た。

2.6 LC-MS/MS 解析

2 つの異なる PDX ライン (PC3 および PC42) を LC/MS/MS 分析で解析した。腫瘍組織を 1% Triton X-100 と氷上で 1 時間反応させタンパク質を抽出した。このライセート (320 mg) を、Dynabeads M-280 Streptavidin (VERITAS Corporation) に固定化したビオチン化 rBC2LCN と反応させた。rBC2LCN で沈殿させたタンパク質を 12.5% SDS-PAGE (DRC 社) で分離し、銀染色した。銀染色後、SDS-

PAGE ゲルからタンパク質のバンド全体を切り出し、このゲルをトリプシンと 37°Cで 16 時間反応させた。ゲルからペプチドを抽出した後、ペプチド溶液を乾燥させ、LC-MS/MS に供した。LC-MS/MS 分析は、Paradigm MS4 液体クロマトグラフ (Michrom Bioresources 社) と LTQ Orbitrap XL 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて行った。検索用の配列データセットは、Swiss-Prot version 2017_08 から出力されたヒト (Homo sapiens) のタンパク質エントリ (総件数 20 192 件、Swiss Institute of Bioinformatics; European Bioinformatics Institute) とブタ (Sus scrofa) のトリプシンのアミノ酸配列を用いて構築した。配列データは Mascot (ver.2.5; Matrix Science 社) を用いて検索し、検索結果を Scaffold browsing software (Proteome Software 社) に入力した。

各候補タンパク質の細胞内での局在は、UniProtKB データベースを用いて確認した。N- および O- グリコシル化部位は、NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) および NetOGlyc 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) を用いて予測した。タンパク質の組織での発現は、The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>)を用いて解析した。

2.7 rBC2LCN または抗 CEA 抗体による沈降

CellLytic MEM Protein Extraction Kit (Sigma-Aldrich)を用いて、メーカーの手順に従って疎水性画分を調製した。タンパク質濃度は Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。Dynabeads M-280 Streptavidin に固定化したビオチン化 rBC2LCN またはビオチン化抗 CEA pAb (Cat No.PA5-16665, Thermo Fisher Scientific) (10 μ L) を、親水性画分 (10 μ g) と 4°Cで一晩攪拌しながら反応させた。ビーズを 1% Triton X-100 を含む PBS で 4 回洗浄した後、結

合したタンパク質を 0.2% SDS を含むトリス緩衝液 (20 μ L) を用いて 95°C で 5 分間溶出した。

2.8 ウェスタンおよびレクチンブロット解析

抽出したタンパク質の 1 μ g、または上述の rBC2LCN または抗 CEA pAb で沈殿させたサンプルの 4 μ L を、5%-20% ポリアクリルアミドゲル (DRC) 上で電気泳動分離のためにロードした。分離したタンパク質を PVDF 膜に転写した。ウェスタンブロット分析のために、PVDF 膜を Block Ace (フナコシ) でブロックした。その後 HRP 標識 rBC2LCN (0.1 mg/mL) または抗 CEA pAb (1:200, Cat No. PA5-16665, Thermo Fisher Scientific) で反応させた後、HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG (1:5000, Cat No. 111-035-003, Jackson ImmunoResearch) で反応させた。また、ゲルの銀染色は、銀染色 MS キット (和光純薬株式会社) を用いて、メーカーの指示に従って行った。HRP 標識はペルオキシダーゼ標識キット (Dojindo Molecular Technologies Inc) を用いて行った。

2.9 統計解析

データの解析には GraphPad Prism 6.0 を使用した。IHC における正常組織に対する PDAC の陽性率は、フィッシャーの正確検定を用いて解析した。P 値は以下のように表される。*P < 0.05 および***P < .0001。

3. 結果

3.1 LC-MS/MS 分析による膵癌細胞における rBC2LCN 陽性糖タンパク質の同定

膵癌細胞における rBC2LCN 陽性糖タンパク質を同定するために、2つの PDX マウスの腫瘍組織を rBC2LCN 固定化ビーズと反応させ、結合したタンパク質を溶出させ、LC-MS/MS で分析した。LC-MS/MS データから抽出した質量クロマトグラムは類似の検出パターンが観測され、一連の工程が一様に行われたと判断した (図 7)。膵癌に発現する rBC2LCN 陽性糖タンパク質は、以下の方法で選択した (図 8)。同定された 343 のタンパク質のうち、UniProtKb データベースを用いて膜および糖タンパク質を選択し、NetNGlyc 1.0 サーバーおよび NetOGlyc 4.0 サーバーを用いて、N-および/または O-グリコシル化部位を持つ 12 の糖タンパク質を同定した (表 1)。また、Human Protein Atlas を用いて、正常膵臓および膵癌におけるタンパク質の発現量を評価した。これらの知見をもとに、膵癌組織では発現しているが、正常膵組織では発現が少ない 5 つの糖タンパク質を選択した; CEA (Carcinoembryonic Antigen / CEACAM5)、インテグリン β 1 (ITGB1)、ムチン 16 (MUC16)、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、グルコーストランスポーター 1 型 (GLUT1)。

3.2 膵癌における 5 つの候補タンパク質の免疫組織化学的染色

次に、膵癌組織 (n = 19) と正常膵組織 (n = 22) に対して、CEA, ITGB1, MUC16, PSCA, GLUT15 の免疫組織化学染色を行った (図 9)。5 つの糖タンパク質において、正常膵組織よりも膵癌組織で強い染色性を示した。CEA, MUC16, GLUT1 は、膵癌組織が正常膵臓よりも高発現群の割合が有意に高かったが (CEA [腫瘍

vs 正常, 74% vs 0%, $P < .0001$] , MUC16 [53% vs 22%, $P = .0262$] , GLUT1 [63% vs 0%, $P < .0001$]) , ITGB1 (48% vs 23%, $P = .1147$) や PSCA (37% vs 9%, $P = .0570$) では有意な差は認められなかった。今回評価したタンパク質の中では、CEA が最も多くのサンプルで高発現となり、本研究では CEA に焦点を当てて以降の検証を行った。

CEA は 702 個のアミノ酸からなり、理論上の分子量は 76.8kDa であるといわれている^{14,15}。CEA は 29 個の N-グリコシル化部位と 2 個の O-グリコシル化部位を持つ重度の糖タンパク質であるため、見かけ上の分子量は約 180kDa であるとされている^{16,17}。

3.3 膵癌細胞株における CEA と rBC2LCN の検証

rBC2LCN は Capan-1 細胞には結合するが、SUIT-2 細胞には結合しないことが報告されている⁴。まず、細胞の染色性を確認すると、Capan-1 細胞では rBC2LCN と抗 CEA mAb が蛍光染色された (図 10 A) 。rBC2LCN は Capan-1 細胞の細胞表面に結合し、抗 CEA mAb は細胞表面と細胞質に染色性を示した。細胞膜の一部に共局在を示した。一方、SUIT-2 細胞は、rBC2LCN と抗 CEA mAb の両方の染色が陰性であった。フローサイトメトリー解析でも同様に、Capan-1 細胞では、rBC2LCN と抗 CEA mAb が陽性となる細胞群を認め、SUIT-2 細胞は、rBC2LCN、抗 CEA mAb に陰性であった(図 10 B) 。rBC2LCN によるレクチンブロッキングでは、Capan-1 細胞では 37kDa から 250kDa の範囲のバンドを示したが、SUIT-2 細胞では観察されなかった。抗 CEA pAb によるウェスタンブロッティングでは、Capan-1 細胞では 75kDa と 160kDa のバンドを示したが、SUIT-2 細胞では認められなかった (図 10 C) 。rBC2LCN で沈降させたサンプルでは、Capan-1 細胞で 75kDa と 160kDa のバンドが抗 CEA pAb で可視化されたが、SUIT-2 細胞で

は可視化されなかった（図 10 D）。CEA の見かけ上の分子量は約 180kDa であることが知られているため^{16,17}、160kDa のタンパク質バンドは、糖化された CEA に対応するものと考えられる。実際、抗 CEA mAb は、PDAC PDX モデルの腫瘍組織ライセートにおいて 160kDa の特異的なバンドを示し（図 11）、160kDa のタンパク質バンドが糖鎖付加された CEA に対応することが示された。75kDa のバンドは、非特異的な反応や抗 CEA pAb と他の CEA アイソフォームとの交差反応によるものかもしれない¹⁸。これらの結果は、CEA が Capan-1 細胞における rBC2LCN の糖タンパク質リガンドであることを示している。

3.4 膵癌 PDX マウス腫瘍組織における CEA と rBC2LCN の検証

次に、CEA が膵癌 PDX マウスの腫瘍において、rBC2LCN の糖タンパク質リガンドであるかどうかを評価した。3 種類の PDX マウスの腫瘍組織を、rBC2LCN と抗 CEA mAb で染色した（図 12 A および表 2）。膵癌の腺管構造の一部部分において rBC2LCN と CEA の 2 重染色像を認めた。レクチンブロッキングでは、すべての PDX マウスに rBC2LCN が強いスメアバンドを示し、rBC2LCN 陽性の分子量の異なる様々な糖タンパク質が腫瘍に発現していることが確認された（図 12 B、左パネル）。抗 CEA pAb によるウェスタンブロッキングでは、160kDa のバンドだけでなく、50-100kDa のバンドも検出した（図 12 B、右パネル）。rBC2LCN によるレクチン沈降サンプルの CEA への反応性（図 12 C、中パネル）および、抗 CEA 抗体による沈降サンプルの rBC2LCN への反応性（図 12 D、左パネル）が、160kDa のバンドに加え、50-150kDa のバンドとして検出された。

以上より CEA が膵癌 PDX における rBC2LCN の糖タンパク質リガンドであることが証明された。

rBC2LCN 陽性 CEA の分子量 (～160kDa) は、PDX の違いによって若干異なっていたが、サンプル間での CEA の糖鎖修飾の程度の違いによるものと考えられる。

3.5 臨床膵癌および正常組織における CEA と rBC2LCN の検証

最後に、臨床膵癌において CEA が rBC2LCN の糖タンパク質リガンドであるかどうかを検証した。膵癌 6 例、正常膵組織 3 例の組織切片および凍結検体を用いて解析を行った。

蛍光染色では、臨床膵癌の腺管構造に一致して rBC2LCN と抗 CEA mAb による 2 重染色像が観察された (図 13, 図 14 A)。図 S3 は、6 例全例の染色結果を示している。さらに、6 例の膵癌組織と 3 例の正常膵組織を用いて、レクチンおよびウェスタンブロットによる検証を行った。rBC2LCN と抗 CEA 抗体の反応性は、正常膵臓組織よりも膵癌組織で強い反応性を示した。膵癌検体では 160kDa のバンドが rBC2LCN と抗 CEA 抗体の両方で検出された (図 14 B)。rBC2LCN 沈降させたタンパク質を抗 CEA 抗体でブロッティングした結果、膵癌組織では CEA に対応する 160kDa のバンドが検出されたが、正常な膵臓組織では検出されなかった (図 13 C)。さらに、抗 CEA 抗体で沈降させたサンプルのレクチンブロッティングでも、～160kDa のバンドが検出された (図 14 D)。これらの結果は、CEA が膵癌における rBC2LCN の糖タンパク質リガンドであることを証明している。また、rBC2LCN 陽性の CEA は、腫瘍にのみ発現し正常組織には発現しておらず、腫瘍特異的な発現ということを示している。

また、他の正常組織での発現を検証するために、正常な大腸組織の抗 CEA 抗体による沈降サンプルのレクチンブロッティングを行った (図 15)。CEA は正常大腸組織で発現しているが、抗 CEA 抗体による免疫沈降後サンプルの rBC2LCN レクチンへの反応性は、膵癌の反応性よりも低かった。この結果は、rBC2LCN

陽性 CEA を標的とすることで、腫瘍特異性が向上する可能性を示唆していると考えられる。

4. 考察

4.1 本研究の総括

既報同様に本研究結果においても膵癌は rBC2LCN レクチンに強い親和性を示すことが証明された。rBC2LCN レクチンは多能性分化能を持つ iPS 細胞と結合することが明らかになっている。iPS 細胞においては糖タンパク質であるポドカリキシンが iPS 細胞膜上の rBC2LCN の主要なリガンドの一つとして同定されたが⁷、膵癌細胞上のリガンドは同定されていない。そこで、本研究において rBC2LCN のがん特異的な糖タンパク質リガンドを同定することを目的とした。PDX マウスから rBC2LCN で沈降させた膜タンパク質を基に、LC-MS/MS 解析によるスクリーニングで 343 個のタンパク質を同定した。Web ベースのデータベースを利用して、候補となる糖タンパク質を 12 種類に絞り込んだ。最終的に、CEA が膵癌特異的な rBC2LCN レクチンのリガンドの 1 つであることを証明した。

4.2 LC/MS/MS 解析による rBC2LCN レクチンの候補リガンド

本研究で選定した糖タンパク質が治療のターゲットや診断マーカーになりうるかは議論しなければならない。LC/MS/MS 解析の結果では、rBC2LCN リガンド以外の様々なノイズタンパク質が含まれており、同定されたタンパク質の中から、Web ベースのデータベースを用いて、最終的に 12 種類の糖タンパク質が膵癌の rBC2LCN 陽性糖タンパク質として同定された。これらの 12 種類のタンパク質は、いずれも N-または O-型糖鎖修飾部を含むため、rBC2LCN レクチンと結合できる膵癌細胞上の糖タンパク質であるはずである（表 1）。選択された 12 種類の糖タンパク質には、細胞表面受容体（TFRC、CD44）、輸送体（SLC3A2、

GLUT1)、LAMP ファミリータンパク質 (LAMP1、CD63)、CEA ファミリータンパク質 (CEACAM5、CEACAM6)、ムチンファミリータンパク質 (MUC16)、その他 (ITGB1、PSCA、SPTNB1) が含まれていた。本研究では膵癌特異的なリガンドの同定を目的としており、膵癌細胞に強く発現していることと、がん以外の細胞には発現していないことを前提に候補の選定を行った。The Human Protein Atlas データベースをもとに、12 種類の候補タンパク質から、癌特異的と考えられる 5 種類の糖タンパク質 (CEA、ITGB1、MUC16、PSCA、GLUT1) に絞り込んで検証を行った。

4.3 候補タンパクに対する免疫組織化学染色結果

本研究で行った免疫組織化学染色の結果から、5 つの候補タンパクの陽性率は、正常組織よりも膵癌組織で高いことが示された (図 9)。本実験では、候補タンパク中、CEA が膵癌組織で最も高い陽性率を示し、正常膵臓組織では陽性にならないことから、CEA に着目しさらなる検証を行った (図 10, 12-15)。

4.4 CEA の検証

CEA は、最もポピュラーな腫瘍マーカーの一つであり、膵癌を含む多くの固形がんの評価に用いられている²⁰。また、胃がんや大腸がんでは、悪性度に応じて CEA 上の糖鎖が変化することが報告されている^{21,22}。しかし、膵癌における CEA 上の糖鎖についてはほとんど知られていない。膵癌サンプルの免疫組織化学染色では、CEA が rBC2LCN のリガンドと共局在することが示され、レクチンおよびウェスタンブロット解析にて、CEA が rBC2LCN と結合することが示された (図 14)。このことから、CEA が膵癌における rBC2LCN の糖タンパク質リガンドのひとつであると結論づけた。さらに、臨床検体のレクチンブロットの結果

から、rBC2LCN が存在する膵癌では 75-100 kDa と 160 kDa のバンドが観察されたが、正常組織では 160 kDa のバンドは観察されなかった (図 14 B)。さらに、CEA の反応性をみると、正常組織では観察されないが、膵癌組織では 160kDa のバンドが検出されており、これらの結果は、CEA が rBC2LCN のがん特異的なりガンドであることを示唆していると考えられる。

4.5 rBC2LCN の有用性の再確認

本研究で注目した rBC2LCN レクチンは既報の通り⁴、レクチン染色にて膵癌細胞株 (Capan-1)、膵癌 PDX、臨床膵癌組織検体で陽性であった。また、rBC2LCN によるレクチンブロッティングでは、全ての膵癌検体に強い親和性を示した。さらに、臨床検体では、正常な膵臓組織検体よりも膵癌検体に強い反応性を示した (図 14 B)。これらの結果から、rBC2LCN の糖鎖エピトープは、膵癌の診断および治療のターゲットとしての可能性があることが再確認された。

4.6 rBC2LCN 認識糖鎖の発現部位

rBC2LCN の糖鎖エピトープが CEA 上に発現していることを証明したが、CEA 糖鎖上の修飾部位に関しては不明なままである。

rBC2LCN の糖鎖エピトープである H タイプ 3 (Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc) が、iPSC のポドカリキシン上の N 型糖鎖ではなく、O 型糖鎖にのみ検出されることが報告されている⁷。CEA は、約 60%が炭水化物で構成される糖タンパク質であり、NetNGlyc 1.0 サーバーおよび NetOGlyc 4.0 サーバーの予測によると、29 個の N-型糖鎖と 2 個の O 型糖鎖修飾部を持つ (表 1)。最近、高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) とマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間 (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-

of-flight :MALDI-TOF) MS を用いて、rBC2LCN の糖鎖エピトープである H タイプ 3 が膵癌 PDX マウスの腫瘍の O 型糖鎖に発現していることが明らかにされた⁵。したがって、CEA には 2 つの O-型糖鎖修飾部があることが予想されるため、膵癌に発現した CEA 上の O 型糖鎖が H タイプ 3 に修飾されている可能性があると考えられる。

4.7 α 1-2 フコース

rBC2LCN の糖鎖エピトープである Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc は、膵癌に発現している。この α 1-2 フコースは、フコース転移酵素 1 (FUT1) および 2 (FUT2) によって転移される^{6, 23}。癌の進行における α 1-2 フコース化の意味合いについては、様々な報告がある²⁴。メラノーマ、口腔・頭頸部癌、胃癌、肝細胞癌では、 α 1-2 フコースが腫瘍抑制効果を発揮することが報告されている²⁵⁻²⁸。一方、乳癌、卵巣癌、前立腺癌では、 α 1-2 フコシル化は、TGF β シグナルや細胞増殖を促進するなど、腫瘍促進作用を示すことが報告されている²⁹⁻³²。また、iPSC では FUT1 と FUT2 が過剰に発現している⁵。これらの結果は、 α 1-2 フコースが幹細胞と関係している可能性を示唆している。しかし、膵癌における α 1-2 フコースについての報告はほとんどない。本研究では、CEA が α 1-2 フコースで修飾されていることを初めて明らかにした。図 13-15、表 3 を基に、臨床サンプルの染色パターン、レクチンブロッキングの結果と膵癌の悪性度との関係を検証した。rBC2LCN と CEA の共局在は、その程度に差はあるもののすべての膵癌症例で観察され、rBC2LCN 陽性 CEA と悪性度の相関は明らかにはならなかった。症例が少なく、膵癌の悪性度や血清 CEA 値による差異の検証は不十分であり、今後の課題である。また、CEA の α 1-2 フコシル化ががんの進行にどのように関与しているかも未解明のままであり、今後の研究で解明していく必要がある。

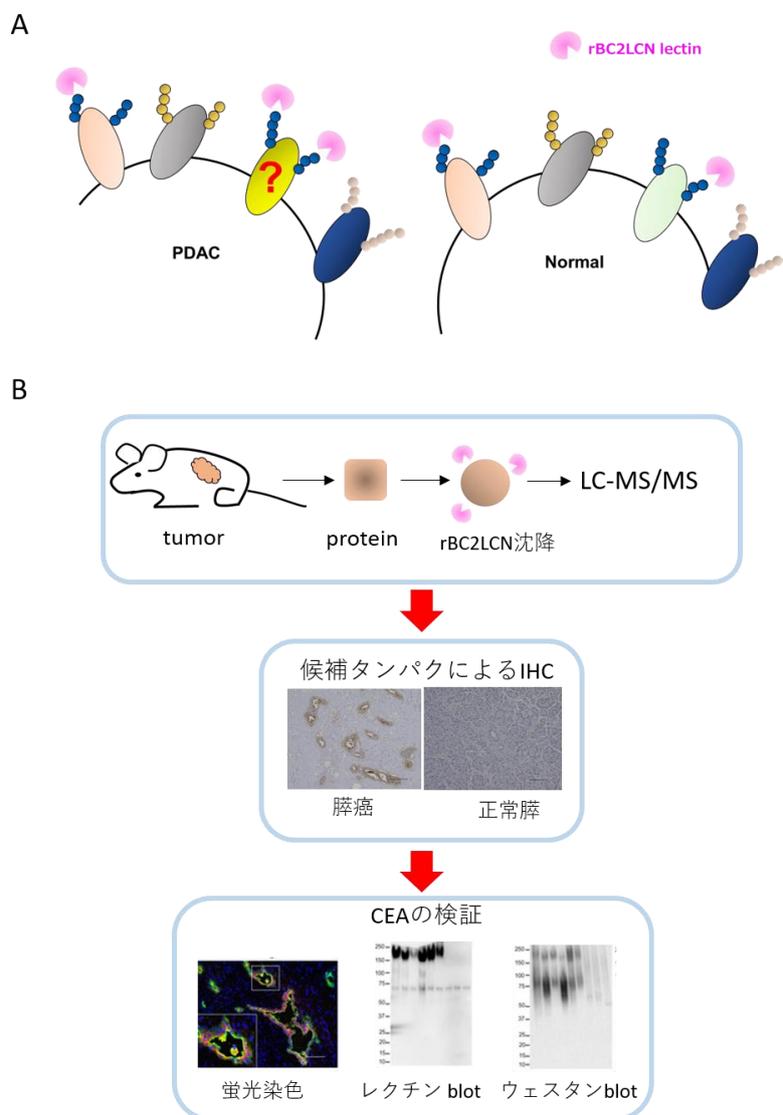
4.8 CEA をターゲットとした治療応用

CEA を標的とした抗体薬物複合体 (antibody drug conjugate:ADC) は、大腸がんの治療薬として臨床試験が行われている³⁵⁻³⁷。しかし、CEA は食道、胃、大腸などの正常組織にも発現している³⁸。図 15 の結果を見ると、rBC2LCN 陽性の CEA は正常大腸組織において反応性が低下する症例が認められる。この点で、rBC2LCN 陽性 CEA は、より腫瘍特異的な標的となりうると考えられる。最近、rBC2LCN 陽性のポドカリキシンには結合するが rBC2LCN 陰性のポドカリキシンには結合しないモノクローナル抗体の作製に成功したことが報告されている³⁹。このように、糖タンパクの糖鎖およびタンパク質を認識する抗体の作成が可能となってきており、膀胱癌をより特異的に標的とする rBC2LCN 陽性の CEA 抗体が作成することができるかもしれない。

5. 結語

本研究では、膵癌マウスモデル腫瘍サンプルに対して液体クロマトグラフ質量分析計(Liquid Chromatograph - Mass Spectrometry:LC-MS/MS)にて解析を行い、12種類の rBC2LCN レクチンの候補リガンドを同定し、さらにその中から CEA が膵癌特異的に発現する rBC2LCN 陽性糖タンパク質であることを明らかにした。今回の発見は、予後不良な悪性疾患である膵癌の分子メカニズムの解明や、膵癌の新しい診断または治療法を開発するための一助となる可能性がある。

6. 要約図



A 本研究の概略図。rBC2LCN レクチンは膵癌に結合することは証明されているが、どのような糖たんぱく質（リガンド）に結合するかは未だ解明されていない。rBC2LCN レクチンのリガンドは正常組織および膵癌に発現している可能性があり、本研究ではリガンドの中でもさらに膵癌特異的なリガンドの同定を試みた。B 本研究のフローチャート。まず、PDX 腫瘍を LC-MS/MS 解析を行い、候補リガンドを同定した。その中から膵癌特異的な候補タンパクを選定し、IHC にて検証した。検証結果から CEA に着目し、CEA が真のリガンドであることを蛍光染色、レクチンおよびウェスタンブロットにて確認した。

7. 略語集

iPSC: induced pluripotent stem cell

hPSC: human pluripotent stem cell

PDX: patient-derived xenograft

CEA: carcinoembryonic antigen /carcinoembryonic antigen 5

LC-MS/MS: Liquid Chromatograph – Mass Spectrometry:

ITGB1: integrin beta 1

MUC16: mucin 16

PSCA: prostate stem cell antigen

GLUT1: glucose transporter type 1

8. 謝辞

本研究は筑波大学医学医療系 消化器外科 小田竜也（指導教員）、産業技術総合研究所 舘野浩章博士の指導のもとに計画、遂行した。ここに深く感謝の意を表する。

共著者の方々には実験にご協力いただいた。ここに心より感謝の意を表する。

最後に、本研究のために検体を提供いただいた患者様、およびそのご家族に深く感謝の意を表する。

9. 出典

本学位論文の作成にあたり、WILEYの規定に従って以下の論文の内容を再利用した。

Carcinoembryonic antigen as a specific glycoprotein ligand of rBC2LCN lectin on pancreatic ductal adenocarcinoma cells. Tomoaki Furuta, Tatsuya Oda, Kayo Kiyoi, Ozawa Yusuke, Sota Kimura, Ko Kurimori, Yoshihiro Miyazaki, Yang Yu, Kinji Furuya, Yoshimasa Akashi, Osamu Shimomura, Hiroaki Tateno. *Cancer Sci.* 2021 Jun 11. doi: 10.1111/cas.15023. Online ahead of print.

10. 図表

図 1. 癌研究における糖鎖

図 2. 当研究室の取り組み

図 3. rBC2LCN と多能性幹細胞との関連

図 4. rBC2LCN レクチン-外毒素複合体の開発

図 5. 癌研究における rBC2LCN レクチン

図 6. 本研究の目的

図 7. LC-MS/MS 解析における質量クロマトグラムの比較

図 8. 膵癌特異的な rBC2LCN 糖タンパク質リガンドの選定方法

図 9. 膵癌および正常膵組織における候補タンパク質(CEA, ITGB1, MUC16, PSCA, GLUT1)の検討

図 10. 膵癌細胞株における rBC2LCN と CEA の検証

図 11. 膵癌 PDX マウス腫瘍のウェスタンブロット分析におけるモノクローナル抗 CEA Abs とポリクローナル抗 CEA Abs の比較

図 12. 膵癌 PDX マウスにおける rBC2LCN と CEA の検証

図 13. 臨床膵癌および正常膵組織における rBC2LCN および CEA の免疫蛍光染色

図 14. 臨床検体(膵癌および正常膵組織)における rBC2LCN と CEA の検証

図 15. 抗 CEA pAb および rBC2LCN-HRP を用いた膵癌、正常膵組織、正常大腸組織のウェスタンブロットおよびレクチンブロット解析

表 1. LC-MS/MS 解析による rBC2LCN 候補リガンドの一覧

表 2. PDX に使用した 3 例の臨床的特徴

表 3. WB とレクチンブロッキングを行った膵癌患者 6 例の臨床的特徴

癌研究における糖鎖

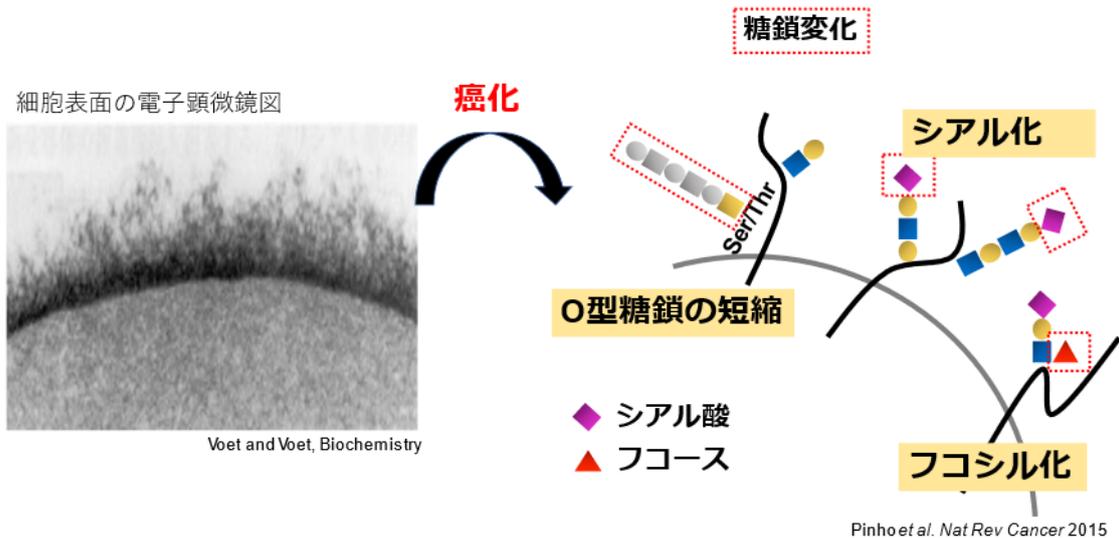


図 1. 癌研究における糖鎖

すべての細胞表面は無数の糖鎖により覆われている。糖鎖は癌の発生や進行等の様々な状態に変化することが知られており、糖鎖修飾は悪性腫瘍の変化の特徴でもあるとされている。癌化における代表的な糖鎖修飾の変化として、腫瘍マーカーである CA19-9 に応用されているシアル化や、AFP-L3 に応用されているフコシル化、さらに O 型糖鎖の短縮が報告されており、当研究室は癌における糖鎖変化に着目し、研究を行っている。

当研究室の取り組み ～rBC2LCNレクチンの同定～

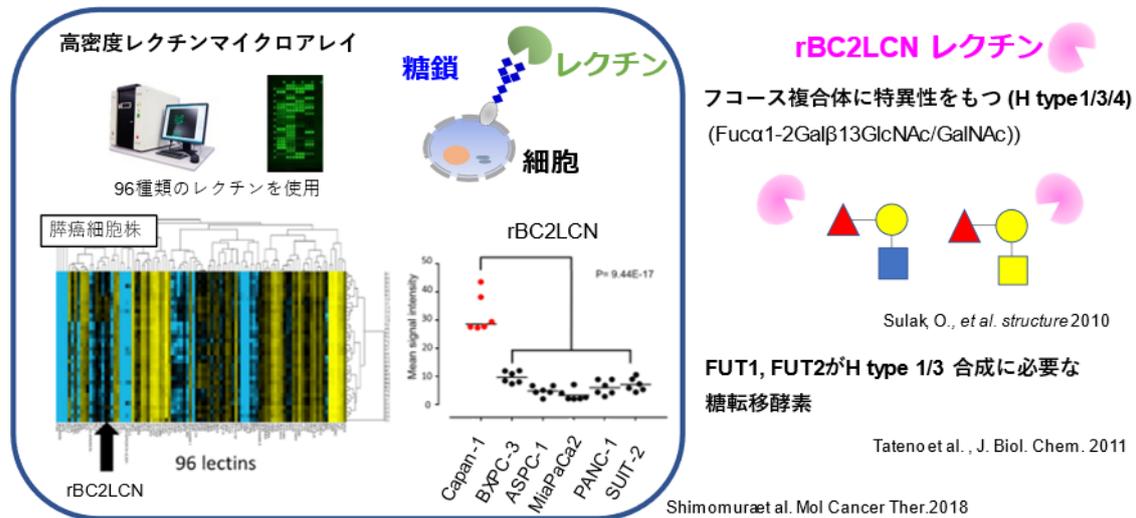
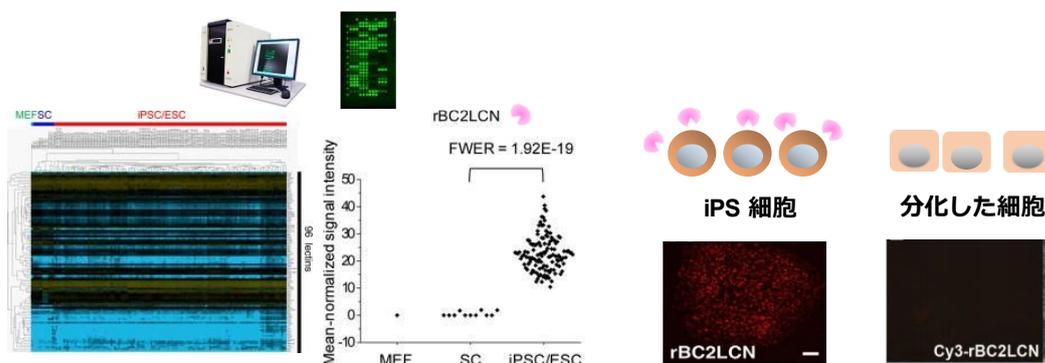


図 2. rBC2LCN レクチンの同定

先行研究として、当研究室では膵癌細胞株に対するレクチンマイクロアレイによる糖鎖解析を行っている。レクチンとは糖鎖に結合するタンパク質の総称をあらわしたもので、レクチンマイクロアレイは、レクチン毎に認識糖鎖が異なっているという特徴を利用し、糖鎖の間接的な解析を行う手法として産業技術総合研究所で開発された。膵癌細胞株に対するレクチンマイクロアレイ解析により、臨床膵癌に形態的に類似するとされる、Capan-1膵癌細胞株において他の細胞株と比較し優位に結合する rBC2LCN レクチンを同定し報告した。

rBC2LCN レクチンは α 1-2 フコースを持つ、フコース複合体である H type 1/3/4 型糖鎖という 3 糖構造を認識するレクチンで、細菌由来のレクチンとして 2010 年に報告されたものである。 α 1-2 フコース糖鎖修飾に関しては糖転移酵素である FUT1, FUT2 という酵素が key enzyme として報告されている。

rBC2LCNレクチンと多能性幹細胞の関連



- ✓ レクチンマイクロアレイによりiPS細胞に特異的に結合する幹細胞マーカーとして同定 (Tateno et al. J Biol Chem. 2011)
- ✓ 未分化細胞のみに結合し、分化した細胞には反応しない (Onuma et al. BBRC 2013)
- ✓ 未分化マーカーとして商品化もされている

図 3. rBC2LCN レクチンと多能性幹細胞の関連

当研究室で着目した rBC2LCN レクチンは iPS 細胞の幹細胞マーカーとして 2011 年に報告されていたレクチンである。rBC2LCN レクチンは線維芽細胞、体細胞、iPS cell に対するレクチンマイクロアレイにより、iPS cell に特異的に結合するレクチンとして報告され、実際に分化した細胞には結合せず、未分化細胞にのみ反応すると報告され、iPS cell の未分化マーカーとして商品化もされているレクチンである。

rBC2LCNレクチン-外毒素複合体の開発 (Lectin drug conjugate: LDC)

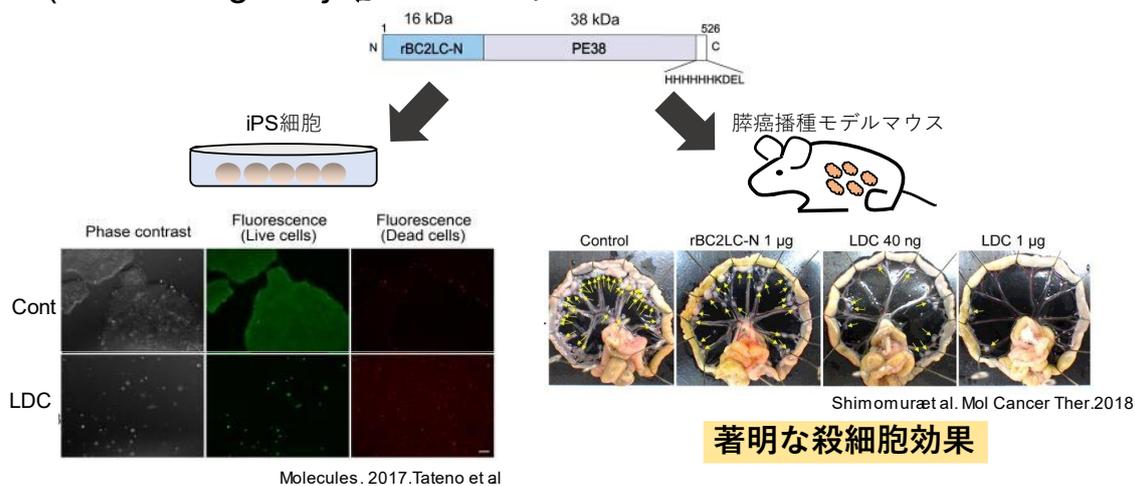
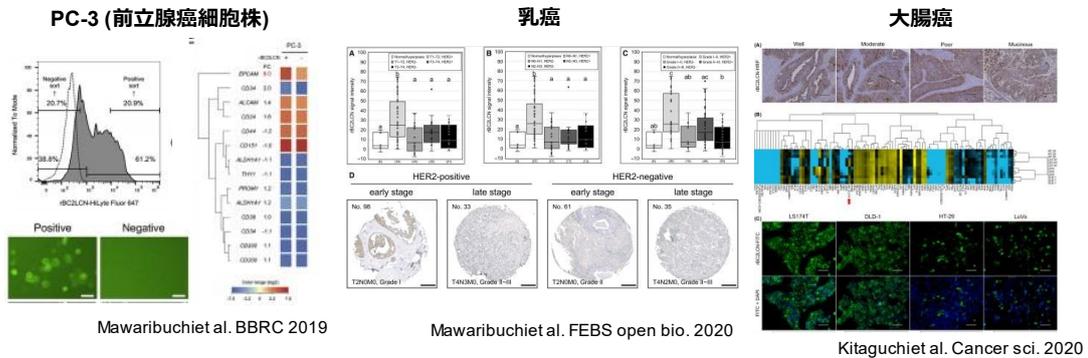


図 4. rBC2LCN レクチン-外毒素複合体の開発

産業総合技術研究所では、rBC2LCN レクチンに外毒素である緑膿菌毒を結合させた、レクチン外毒素複合体を開発し、rBC2LCN レクチンに結合する iPS cell および膵癌播種モデルマウスへの投与において著明な殺細胞効果を示した

癌研究におけるrBC2LCNレクチン



- ✓ 複数の癌での報告
- ✓ rBC2LCN認識糖鎖と細胞の増殖速度の低下、細胞運動性の増加、薬剤耐性などの癌幹細胞に似た特徴との関連が示唆

rBC2LCN認識糖鎖は癌の治療ターゲットとなる可能性

図 5. 癌研究における rBC2LCN レクチン

rBC2LCN レクチンは膀胱癌だけでなく、前立腺癌や乳癌、大腸癌にも結合することが報告され、前立腺癌細胞株を用いた報告では、細胞の増殖速度の低下、細胞運動性の増加、薬剤耐性などの癌幹細胞に似た特徴との関連が示唆され、rBC2LCN 認識糖鎖は癌の治療ターゲットとなる可能性が示唆されている。

本研究の目的

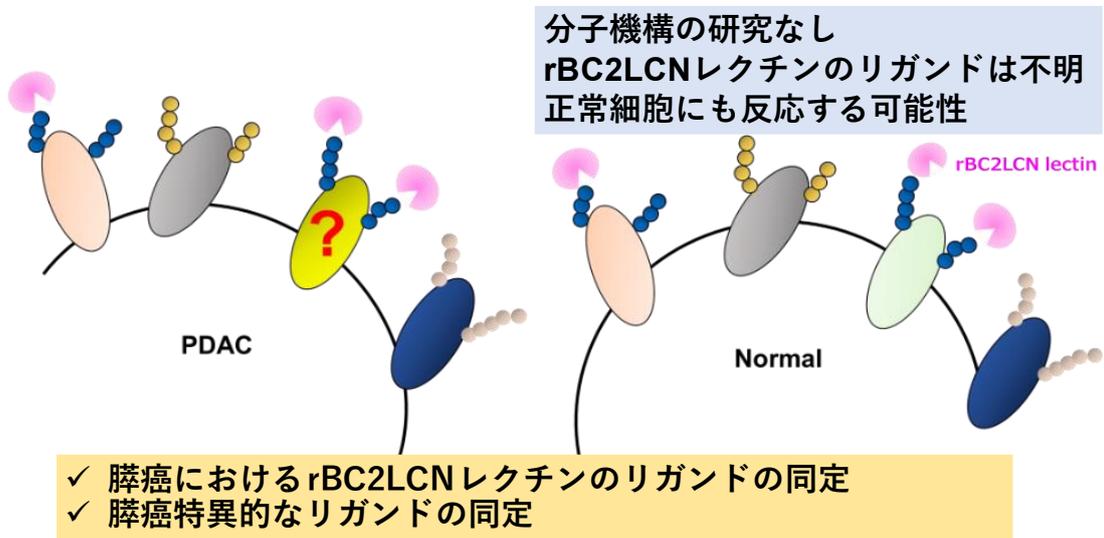


図 6. 本研究の目的

rBC2LCN は治療応用の魅力的なツールとなりえるが、rBC2LCN の分子機構の研究はなく、どういった糖タンパクに結合するか、レクチンのリガンドの同定は不明なままである。また、rBC2LCN 認識糖鎖である α 1-2 フコースを合成する FUT1,FUT2 は正常細胞にも発現しており、rBC2LCN が正常細胞にも反応する可能性がある。そこで本研究では、膵癌における rBC2LCN レクチンのリガンドの同定さらに正常細胞には反応しない、膵癌特異的なリガンドの同定を目的とし研究を行った。

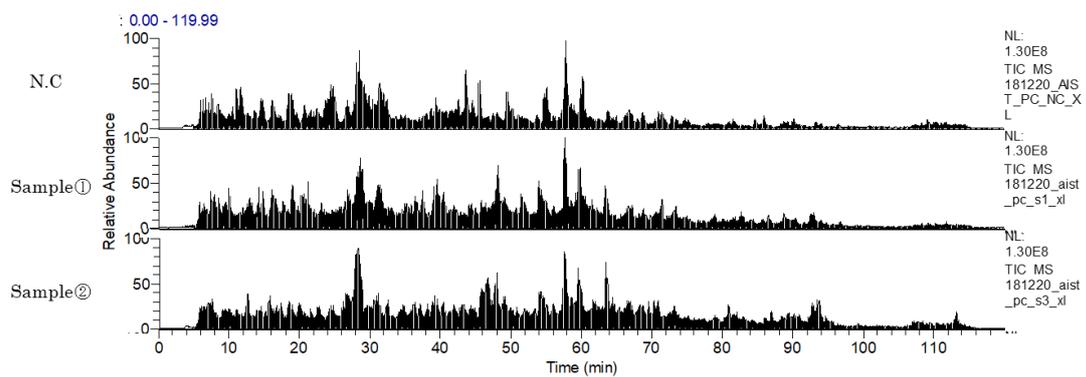


図 7. LC-MS/MS 解析における質量クロマトグラムの比較

LC-MS/MS データから抜き出した質量クロマトグラムを示した図。類似の検出パターンが観測され、料調製から LC-MS/MS までの工程は一樣に行われたと判断した。

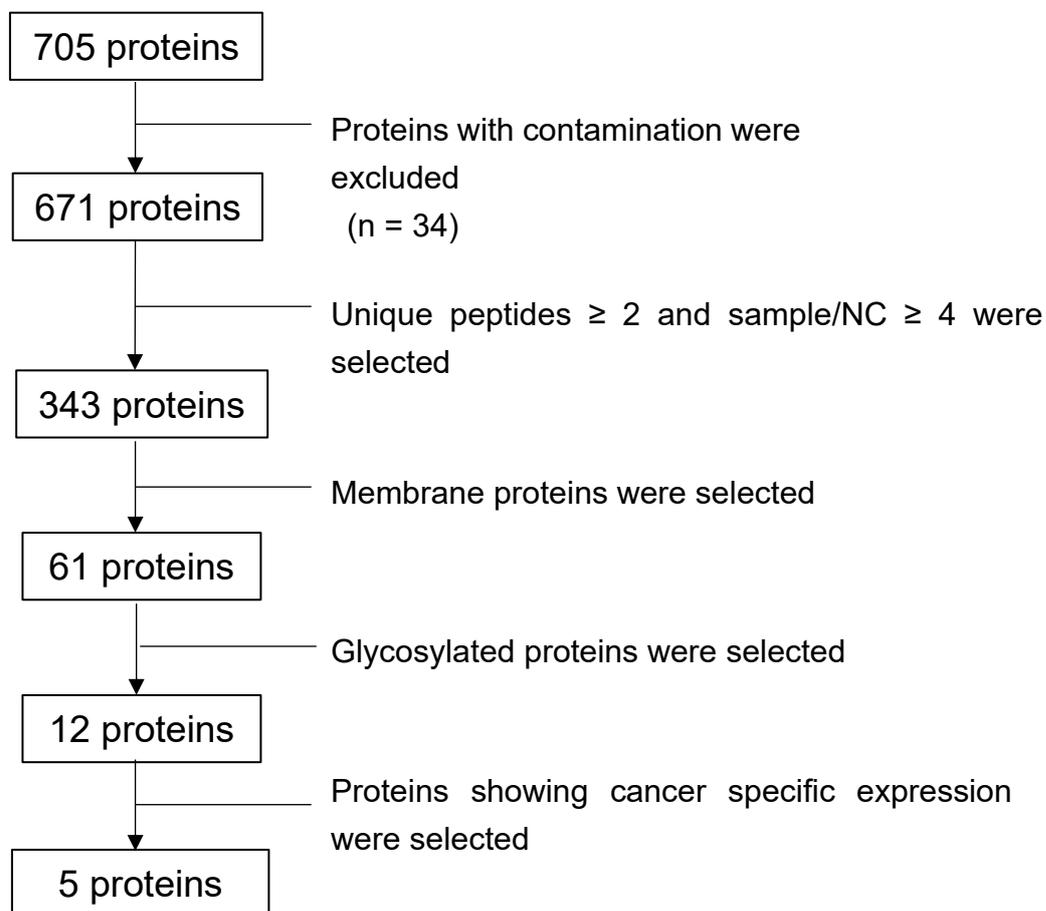


図 8. 特異的な rBC2LCN 糖タンパク質リガンドの選定方法

rBC2LCN 沈殿画分より 705 個のタンパク質を LC/MS/MS 分析により同定した。その後、コンタミネーションを含むタンパク質を除去した (671 タンパク質)。ユニークペプチド 2 個以上、サンプル/ネガティブコントロール (NC) 4 以上を選択した (343 タンパク質)。さらにその中から膜タンパク質を選択した (61 タンパク質)。次に、グリコシル化されたタンパク質を選択した (12 タンパク質)。最後に、がんの特異的な発現を示す 5 つのタンパク質に着目した

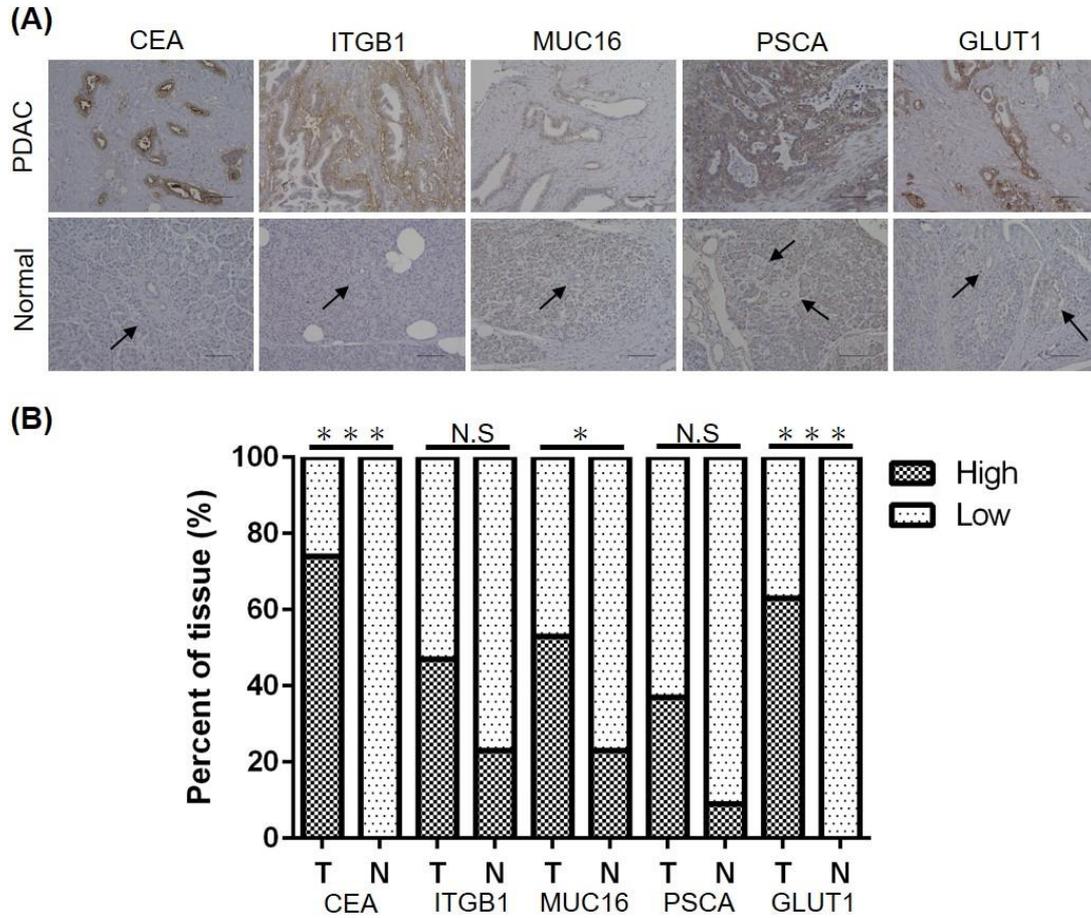


図 9. よび正常膵組織における候補タンパク質(CEA, ITGB1, MUC16, PSCA, GLUT1)の検討

A 膵癌組織と正常膵臓組織における 5 種類の膜糖タンパク質 (CEA, ITGB1, MUC16, PSCA, GLUT1) の免疫組織化学染色の代表例。黒矢印：膵管。スケールバー、100 μ m。B PDAC 組織 (T; n = 19) と正常膵臓組織 (N; n = 22) において、各膜糖タンパク質を高発現するサンプルの割合を定量化したグラフ。N.S: not significant, *P < 0.05, ***P < 0.0001

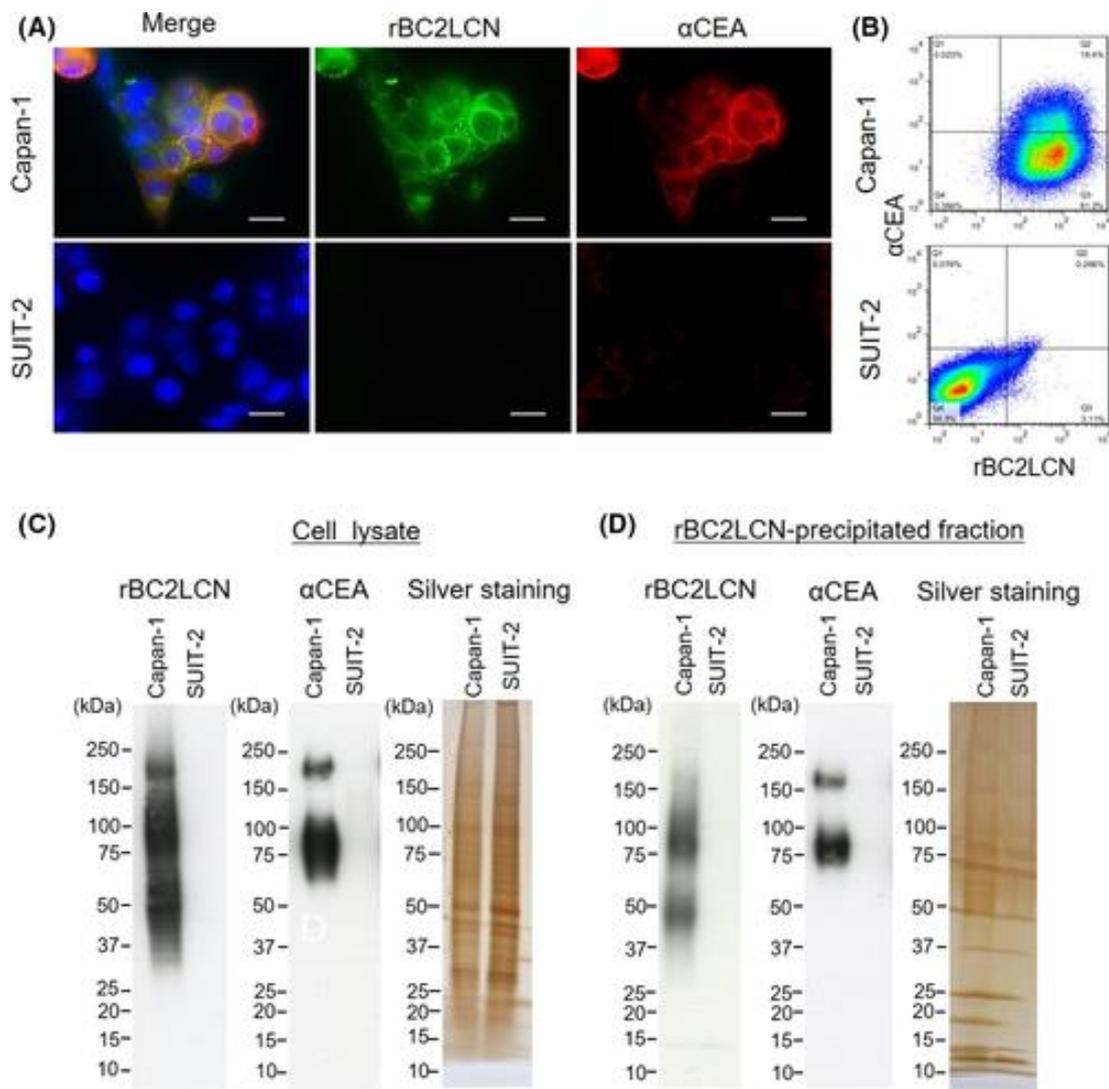


図 10.膵癌細胞株における rBC2LCN と CEA の検証

A Capan-1 および SUI-2 細胞における rBC2LCN (緑)、CEA (赤)、および核 (青) の免疫蛍光染色。merge: 黄色。倍率: $\times 1000$ 。スケールバー: $50 \mu\text{m}$ 。B Capan-1 および SUI-2 細胞における CEA および rBC2LCN のフローサイトメトリー分析。C rBC2LCN と CEA に対する cell lysate のレクチンおよびウェスタンブロッティング、および銀染色。

D rBC2LCN によりレクチン沈降させた画分を、rBC2LCN または抗 CEA ポリクローナル抗体 (pAb) (α CEA) でブロッティングし、銀染色を行った。

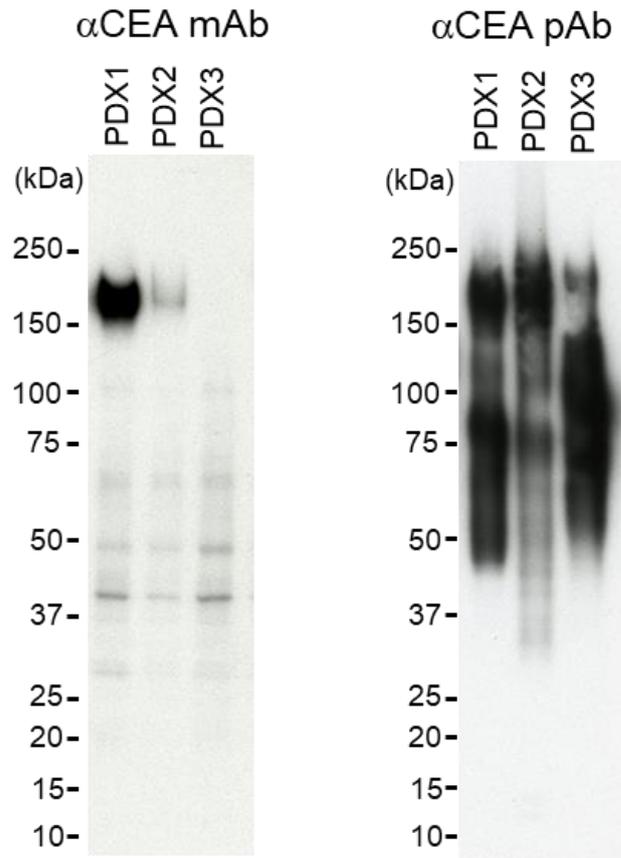


図 11. 膵癌 PDX マウス腫瘍のウェスタンブロット分析におけるモノクローナル抗 CEA Abs とポリクローナル抗 CEA Abs の比較

免疫沈降およびウェスタンブロット分析におけるポリクローナル抗 CEA Ab (Cat No.PA5-16665, Thermo Fisher Scientific) の特異性を決定するために、モノクローナル抗 CEA Ab (GTX17254, GeneTex) を用いた WB を実施した。抗 CEA mAb は約 160-180kDa の単一バンドを示したが、抗 CEA pAb は 160kDa に強いバンドを示し、50-100kDa の間の低分子量のバンドが不鮮明であった。CEA の理論的な分子量は 76.8kDa と約 160kDa と報告されているが、CEA には 29 個の N-および 2 個の O-グリコシル化部位があり、見かけの分子量は約 180kDa であることが既に知られているため、160-180kDa のバンドはグリコシル化した CEA に対応すると考えられる。したがって、モノクローナル抗 CEA 抗体は特定のサブタイプのグリコシル化された CEA とのみ反応し、ポリクローナル抗 CEA 抗体はグリコシル化状態の異なる複数の CEA のアイソフォームと反応する可能性があると考えられる。

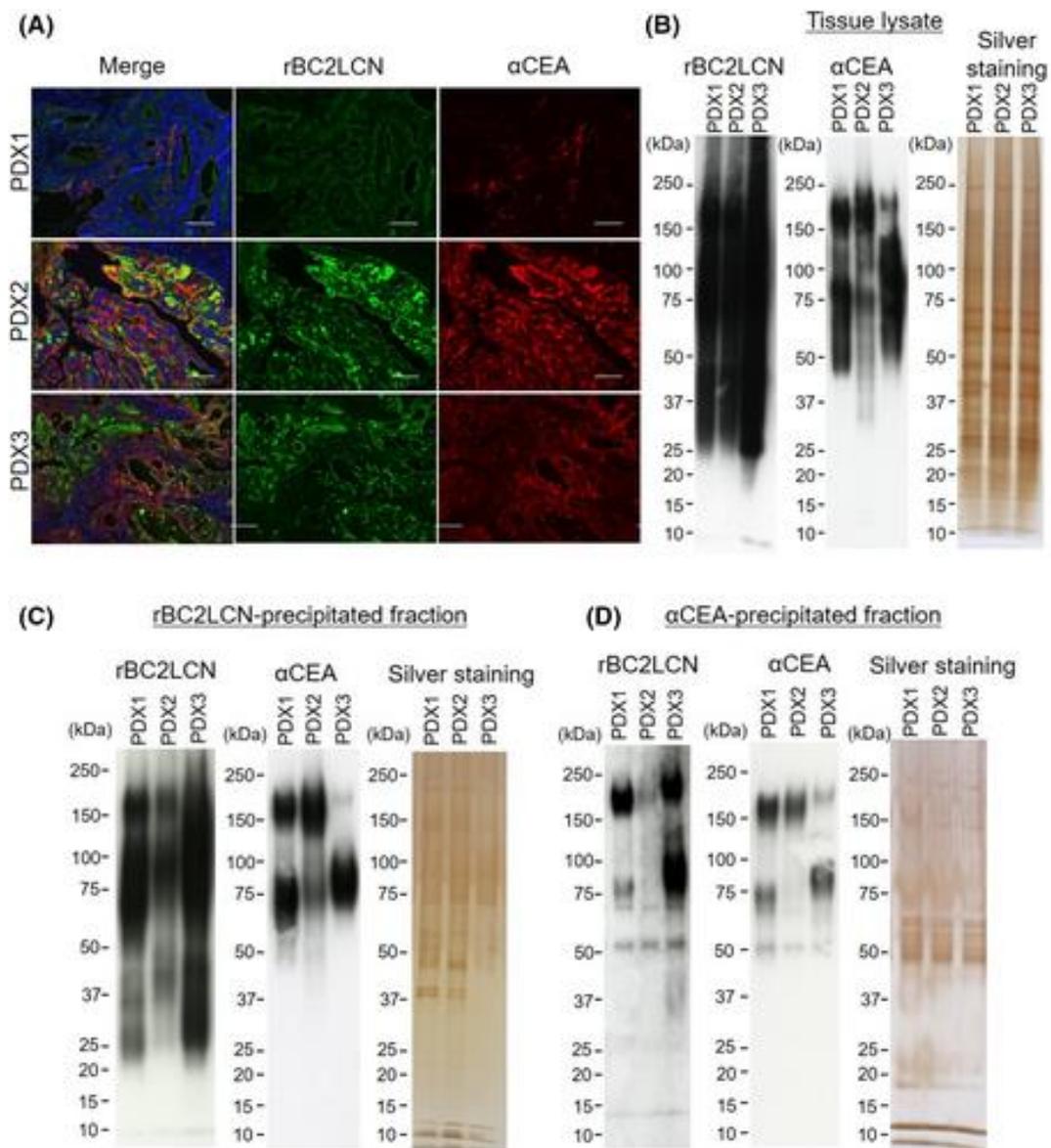


図 12. 膵癌 PDX マウスにおける rBC2LCN と CEA の検証

A 膵癌 PDX 組織を rBC2LCN (緑) と抗 CEA モノクローナル抗体 (mAb) (赤) による蛍光免疫染色。核: 青。merge: 黄色。スケールバー: 100 μ m。B rBC2LCN および抗 CEA ポリクローナル抗体 (pAb) を用いた PDAC PDX モデルマウスの cell lysate のレクチンおよびウェスタンブロッティング (n=3) および銀染色。C rBC2LCN 沈降した画分を、rBC2LCN または抗 CEA の pAb でブロッティングし、銀染色した。D, 抗 CEA 抗体による免疫沈降画分を rBC2LCN および抗 CEA pAb でプロットし、銀染色した。

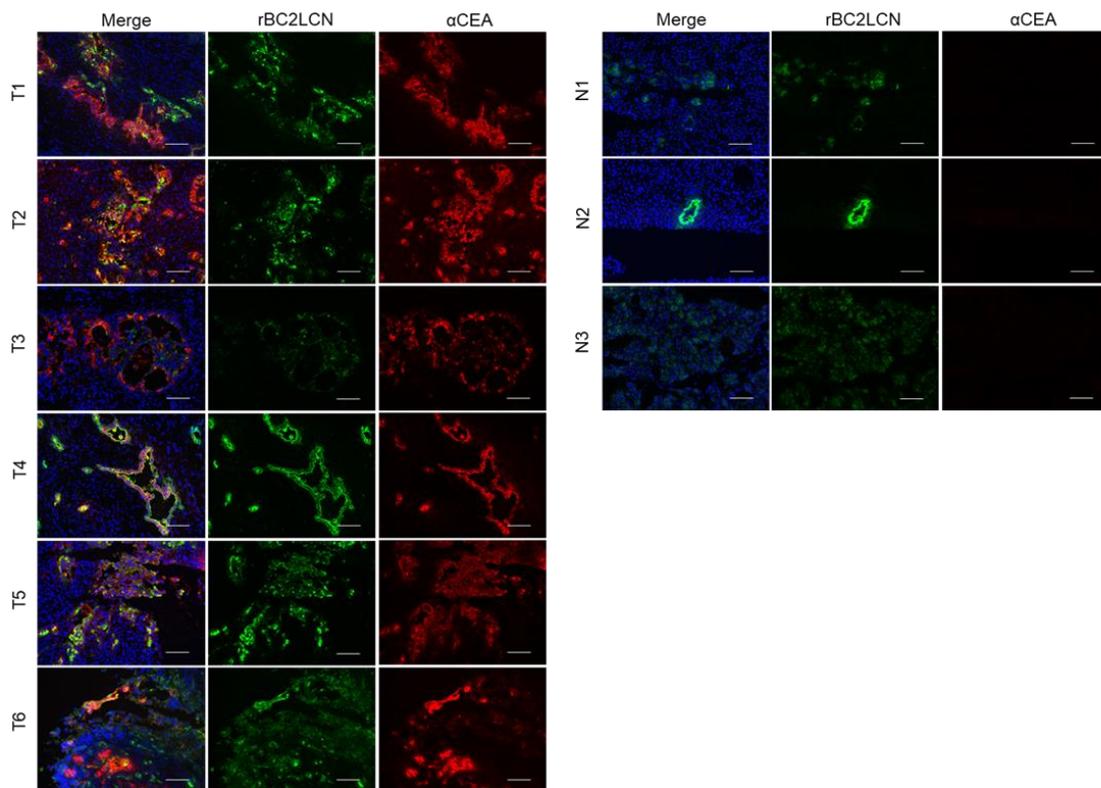


図 13. 臨床膵癌および正常膵臓組織における rBC2LCN および CEA の免疫蛍光染色

臨床膵癌 (A) と正常膵臓組織 (B) における rBC2LCN (緑) と CEA (赤) の免疫蛍光染色組織像。核：青。Merge：黄色。スケールバー：100 μ m。

膵癌組織では rBC2LCN と α CEA の共局在が観察されたが、正常組織では観察されなかった。

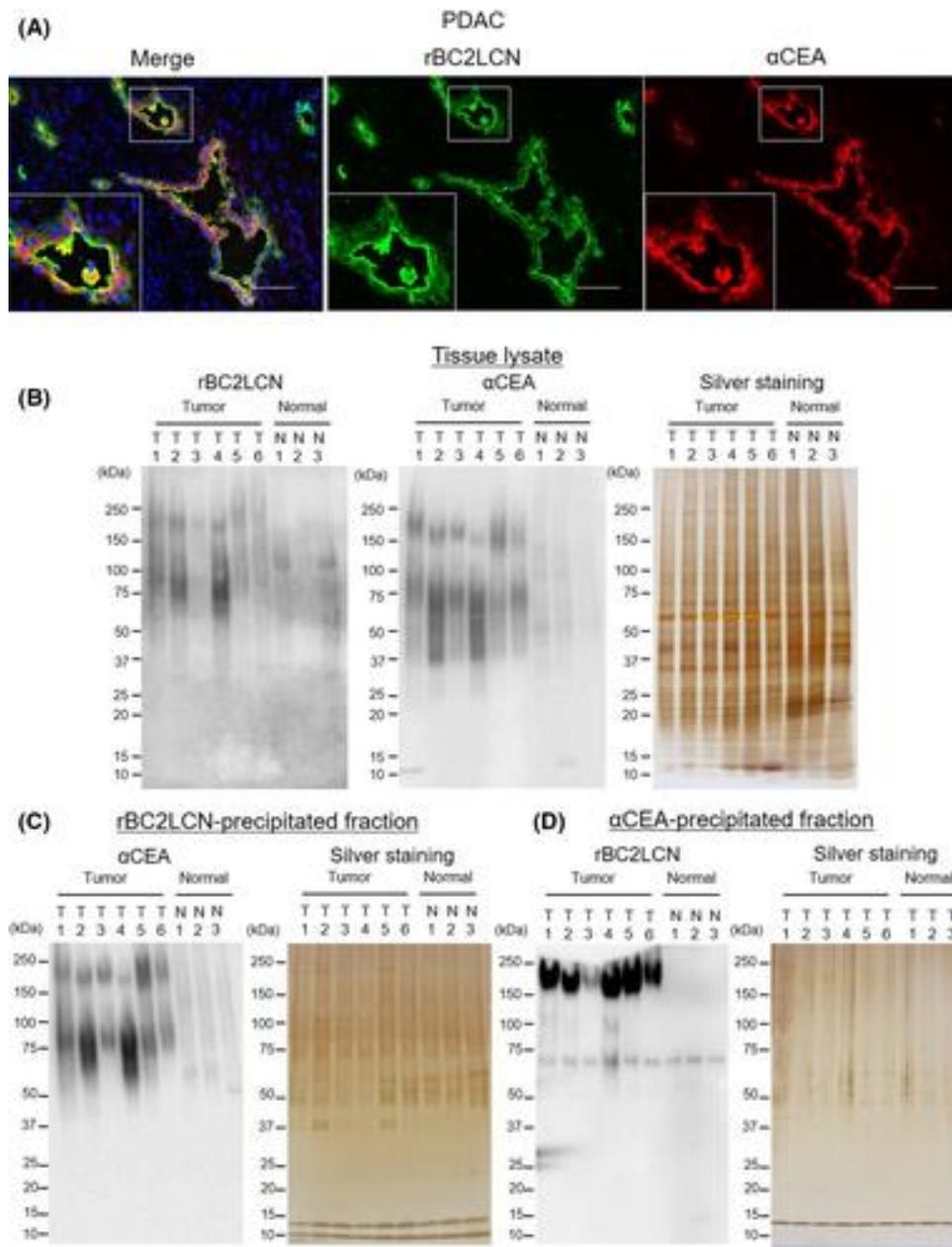


図 14. 臨床検体(膵癌および正常膵組織)における rBC2LCN と CEA の検証

A 臨床膵癌組織における rBC2LCN (緑) と CEA (赤) の代表的な免疫蛍光染色。核：青。マージ：黄色。Scale bar : 100 μ m. B 膵癌組織(n=6)と正常膵臓組織(n=3)における rBC2LCN と CEA のレクチンブロットとウェスタンブロット解析および銀染色。C, rBC2LCN 沈降画分を抗 CEA ポリクローナル抗体 (pAb) でブロッティングし、銀染色した。D, α CEA 沈降画分を rBC2LCN とブロッティングし、銀染色した。

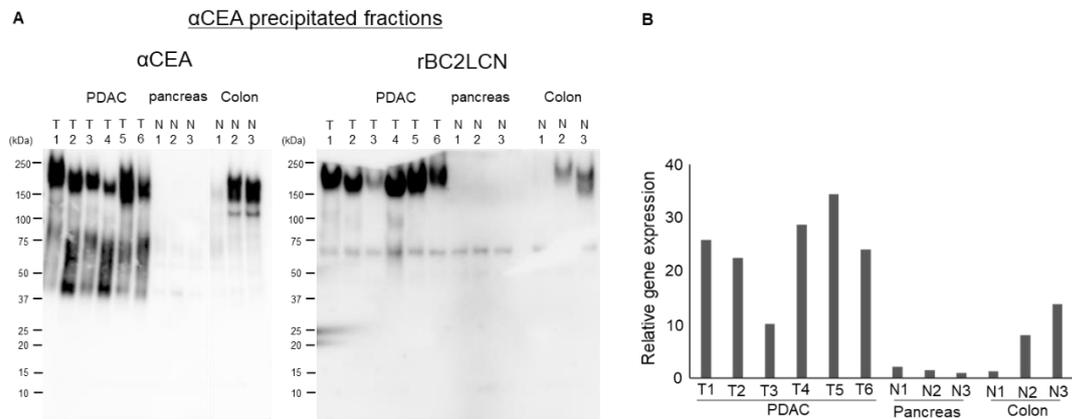


図 15. 抗 CEA pAb および rBC2LCN-HRP を用いた膵癌、正常膵組織、正常大腸組織のウェスタンブロットおよびレクチンブロット解析

(A) 膵臓癌、正常膵臓組織、正常大腸組織の α CEA 沈降画分を、抗 CEA pAb (左パネル) および rBC2LCN-HRP (右パネル) を用いて、ウェスタンブロットおよびレクチンブロット解析した。正常大腸組織 3 例中 1 例では、rBC2LCN の反応は検出されなかった(colon N1)。さらに rBC2LCN の反応性は正常大腸組織よりも膵癌で強く、CEA の発現が陽性であっても、CEA 上の rBC2LCN 認識糖鎖は、正常組織よりも癌においてより特異的な事象である可能性が示された。T:腫瘍、N:正常組織 (B) 膵癌組織、正常膵組織、正常大腸組織の rBC2LCN-HRP を用いた α CEA 沈降画の相対的なバンド強度を ImageJ ソフトウェアを用いて算出したグラフ。

Table 1 LC-MS/MS で解析した rBC2LCN 候補リガンドの一覧

No.	Protein Name	Gene	Unique Peptides	N-glycosylation sites ¹	O-glycosylation sites ²
1	Integrin beta 1	ITGB1	7	12	13
2	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	LAMP1	3	18	7
3	Prostate stem cell antigen	PSCA	3	3	0
4	4F2 cell-surface antigen heavy chain	SLC3A2	3	4	1
5	Spectrin beta chain, nonerythrocytic 1	SPTBN1	3	6	134
6	CD44 antigen	CD44	2	11	145
7	CD63 antigen	CD63	2	3	3
8	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	CEA/CEACAM 5	2	29	2
9	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6	CEACAM6	2	12	2
10	Glucose transporter type 1	GLUT1	2	2	1
11	Transferrin receptor protein 1	TFRC	2	5	11
12	Mucin-16	MUC16	2	117	4876

¹The number of N-glycosylation sites was predicted by the NetNGlyc 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

²The number of O-glycosylation sites was predicted by the NetOGlyc 4.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>).

Table 2. PDX に使用した 3 例の臨床および病理学的特徴

No.	Age	Gender	Stage*	Histology	Grade †	Source of tumor	CEA (ng/ml)	CA19-9 (ng/ml)
PDX 1	51	M	IV	DAC	—	peritoneal dissemination	6.8	1026.0
PDX 2	71	M	I A	DAC	G3	primary cancer	3.5	58.1
PDX 3	67	F	II B	DAC	G2	primary cancer	4.5	2154.0

* TNM classification (Union for International Cancer Control, eighth edition)

† Histological grade; G1 (well differentiated), G2 (moderately differentiated), G3 (poorly differentiated)

M, male; F, female; DAC, ductal adenocarcinoma

Table3. WB とレクチンブロッティングを行った膵癌患者 6 例の臨床的特徴

No.	Age	Sex	Surgery	Tumor size,mm	T	N	M	Stage*	Histology	Grade	CEA (ng/ml)	CA19-9 (ng/ml)	Rec	Survival (month/status)
T1	60	M	DP	48	3	1	0	II B	DAC	G1	1.0	78.0	LN	20.6 / D
T2	75	M	PD	23	2	1	0	II B	DAC	G2	9.2	746.6	Local	8.2 / A
T3	66	F	DP	80	3	1	0	II B	DAC	G2	2.6	886.6	Liver	9.4 / D
T4	70	M	PD	45	3	1	0	II B	DAC	G2	2.2	70.0	Liver	5.2 / D
T5	71	M	DP	18	1c	0	0	I A	DAC	G3	3.5	58.1	—	44.0 / A
T6	59	F	DP	50	3	0	0	II A	DAC	G3	—	10.7	—	41.0 / A

* TNM classification (Union for International Cancer Control, eighth edition)

†Histological grade; G1 (well differentiated), G2 (moderately differentiated), G3 (poorly differentiated)

M, male; F, female; DP, distal pancreatectomy; PD, pancreatoduodenectomy; DAC, ductal adenocarcinoma; Rec, recurrence; LN, lymph node; D, dead; A, alive

11. 参考文献

- 1 Yu Y, Yang G, Huang H, et al. Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma: challenges and opportunities in the era of precision medicine. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021; 40: 8.
- 2 Tarbell JM, Cancel LM. The glycocalyx and its significance in human medicine. *J Intern Med.* 2016; 280: 97-113.
- 3 Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer.* 2015; 15: 540-555.
- 4 Shimomura O, Oda T, Tateno H, et al. A Novel Therapeutic Strategy for Pancreatic Cancer: Targeting Cell Surface Glycan Using rBC2LC-N Lectin–Drug Conjugate (LDC). *Molecular Cancer Therapeutics.* 2018; 17: 183-195.
- 5 Hasehira K, Furuta T, Shimomura O, Asada M, Oda T, Tateno H. Quantitative structural analysis of glycans expressed within tumors derived from pancreatic cancer patient-derived xenograft mouse models. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020.
- 6 Tateno H, Toyota M, Saito S, et al. Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem.* 2011; 286: 20345-20353.
- 7 Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, et al. Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. *Stem Cells Transl Med.* 2013; 2: 265-273

- 8 Tatenno H, Saito S. Engineering of a Potent Recombinant Lectin-Toxin Fusion Protein to Eliminate Human Pluripotent Stem Cells. *Molecules*. 2017; 22.
- 9 Mawaribuchi S, Onuma Y, Aiki Y, et al. The rBC2LCN-positive subpopulation of PC-3 cells exhibits cancer stem-like properties. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019; 515: 176-182.
- 10 Kitaguchi D, Oda T, Enomoto T, et al. Lectin drug conjugate therapy for colorectal cancer. *Cancer Sci*. 2020; 111: 4548-4557.
- 11 Mawaribuchi S, Haramoto Y, Tatenno H, Onuma Y, Aiki Y, Ito Y. rBC2LCN lectin as a potential probe of early-stage HER2-positive breast carcinoma. *FEBS Open Bio*. 2020; 10: 1056-1064.
- 12 Liu JY, Jiang L, Liu JJ, et al. AEBP1 promotes epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells by activating the NF-kappaB pathway and predicts poor outcome of the patients. *Sci Rep*. 2018; 8: 11955.
- 13 Liu L, Liu X, Dong Z, et al. N6-methyladenosine-related Genomic Targets are Altered in Breast Cancer Tissue and Associated with Poor Survival. *J Cancer*. 2019;10: 5447-5459.
- 14 Beauchemin N, Benchimol S, Cournoyer D, Fuks A, Stanners C P. Isolation and characterization of full-length functional cDNA clones for human carcinoembryonic antigen. *Mol Cell Biol*. 1987; 9: 3221-3230.
- 15 Hammarstrom S, Engvall E, Johansson BG, Svensson S, et al. Nature of the tumor associated determinant(s) of carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975; 72: 1528-1532.

- 16 Yamashita K, Totani K, Kuroki M, Matsuoka Y, et al. Structural studies of the carbohydrate moieties of carcinoembryonic antigens. *Cancer Res.* 1987; 13: 3451-3450.
- 17 Chandrasekaran EV, Davila M, Nixon DW, Goldfarb M, et al. Isolation and structures of the oligosaccharide units of carcinoembryonic antigen. *J Biol Chem.* 1983; 11:7213-7222
- 18 Hatakeyama K, Wakabayashi-Nakao K, Ohsima K, et al. Novel protein isoforms of carcinoembryonic antigen are secreted from pancreatic, gastric and colorectal cancer cells. *BMC Res Notes.* 2013; 6: 381.
- 19 Hiroshima Y, Maawy A, Zhang Y, et al. Photoimmunotherapy Inhibits Tumor Recurrence After Surgical Resection on a Pancreatic Cancer Patient-Derived Orthotopic Xenograft (PDOX) Nude Mouse Model. *Ann Surg Oncol.* 2015; 22 Suppl 3: S1469-1474.
- 20 Gold P, Shuster J, Freedman SO. Carcinoembryonic antigen (CEA) in clinical medicine: historical perspectives, pitfalls and projections. *Cancer.* 1978; 42: 1399-1405.
- 21 Gomes C, Almeida A, Barreira A, et al. Carcinoembryonic antigen carrying SLe(X) as a new biomarker of more aggressive gastric arcinomas. *Theranostics.* 2019; 9: 7431-7446.
- 22 Saeland E, Belo AI, Mongera S, van Die I, Meijer GA, van Kooyk Y. Differential glycosylation of MUC1 and CEACAM5 between normal mucosa and tumour tissue of colon cancer patients. *Int J Cancer.* 2012; 131: 117-128.

- 23 Nolfi D, Capone A, Rosati F, Della Giovampaola C. The alpha-1,2 fucosylated tubule system of DU145 prostate cancer cells is derived from a partially fragmented Golgi complex and its formation is actin-dependent. *Exp Cell Res.* 2020; 396: 112324.
- 24 Keeley TS, Yang S, Lau E. The Diverse Contributions of Fucose Linkages in Cancer. *Cancers (Basel).* 2019; 11.
- 25 Keeley T, Lin S, Lester DK, Lau EK, Yang S. The fucose salvage pathway inhibits invadopodia formation and extracellular matrix degradation in melanoma cells. *PLoS One.* 2018; 13: e0199128.
- 26 Hotta H, Hamamura K, Yamashita K, et al. Lewis y antigen is expressed in oral squamous cell carcinoma cell lines and tissues, but disappears in the invasive regions leading to the enhanced malignant properties irrespective of sialyl-Lewis x. *Glycoconj J.* 2013; 30: 585-597.
- 27 Chandrasekaran EV, Xue J, Piskorz C, et al. Potential tumor markers for human gastric cancer: an elevation of glycan:sulfotransferases and a concomitant loss of alpha1,2-fucosyltransferase activities. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2007; 133: 599-611.
- 28 Huthinson WL, Du MQ, Johnson PJ, Williams R. Fucosyltransferases: differential plasma and tissue alterations in hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *Hepatology.* 1991; 13: 683-688.
- 29 Tan KP, Ho MY, Cho HC, Yu J, Hung JT, Yu AL. Fucosylation of LAMP-1 and LAMP-2 by FUT1 correlates with lysosomal positioning and autophagic flux of breast cancer cells. *Cell Death Dis.* 2016; 7: e2347.

- 30 Hao Y, Zhu L, Yan L, et al. c-Fos mediates alpha1, 2-fucosyltransferase 1 and Lewis y expression in response to TGF-beta1 in ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2017; 38: 3355-3366.
- 31 Li FF, Liu JJ, Liu DW, et al. Lewis Y regulates signaling molecules of the transforming growth factor beta pathway in ovarian carcinoma-derived RMG-I cells. *Int J Oncol.* 2012; 40: 1196-1202.
- 32 Kosanovic MM, Jankovic MM. Sialylation and fucosylation of cancer-associated prostate specific antigen. *J BUON.* 2005; 10: 247-250.
- 33 Lai TY, Chen IJ, Lin RJ, et al. Fucosyltransferase 1 and 2 play pivotal roles in breast cancer cells. *Cell Death Discov.* 2019; 5: 74.
- 34 Aubert M, Panicot L, Crotte C, Giber P, Lombardo D, et al. Restoration of alpha (1,2) fucosyltransferase activity decreases adhesive and metastatic properties of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2000; 60: 1449-1456.
- 35 Sousa AR, Oliveira MJ, Sarmiento B. Impact of CEA-targeting Nanoparticles for Drug Delivery in Colorectal Cancer. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019; 370: 657-670.
- 36 Dotan E, Cohen SJ, Statodub AN, Lieu CH, et al. Phase I/II Trial of Labetuzumab Govitecan (Anti-CEACAM5/SN-38 Antibody-Drug Conjugate) in Patients With Refractory or Relapsing Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2017; 35: 3338-3346.
- 37 Zhang C, Wang Z, Yang Z, et al. Phase I Escalating-Dose Trial of CAR-T Therapy Targeting CEA (+) Metastatic Colorectal Cancers. *Mol Ther.* 2017; 25: 1248-1258.

- 38 Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol.* 1999; 9: 67-81.
- 39 Watanabe T, Kakuta J, Saito S, et al. Monoclonal antibodies specific for podocalyxin expressed on human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020; 532: 647-654.