

疾患糖鎖の解析から糖鎖治療へ

三善 英知¹, 藤井 宏修¹, 新崎 信一郎², 種村 匡弘³, 鎌田 佳宏^{1,2}

1. はじめに

微量解析技術の進歩とともに糖鎖バイオマーカーの研究は第二の黄金期を迎えた。しかし糖鎖の生物学的機能解析にはブレークスルーとなる研究は見当たらない。遺伝子改変細胞や動物を解析しても、特定のタンパク質だけの糖鎖構造を変える技術が困難なためである。ただ実際のヒトの病態生理において、特定のタンパク質の糖鎖構造だけが変わることはきわめてまれな現象で、これまでの糖鎖リモデリングの研究は人工的なものではなく、ある病態を虫眼鏡で見ているようなものかもしれない。最近、臨床医学の学会では、糖鎖研究が大変注目を浴びている。糖鎖バイオマーカー研究の進歩もその一因だが、糖鎖の生物機能に興味を持つ聴衆も多い。多くの臨床医学研究者が糖鎖に興味を持つ理由は、新しいバイオテクノロジーの技術を自分の研究分野に取り入れようとするからである。C型慢性肝炎に対する新規経口薬や抗体医薬のように、画期的な薬剤が基礎研究の中から生まれてきた。まさに新しい治療薬開発が時代の潮流といえる。2016年度から糖鎖治療薬開発を目指した日本医療開発研究機構（AMED）の大型研究もスタートした。本稿では、我々がこの10年間で行った難治性消化器疾患（炎症性腸疾患、膵がん）に関する糖鎖研究を紹介し、糖鎖治療の可能性について論じたい。

2. 炎症性腸疾患と糖鎖

炎症性腸疾患（inflammatory bowel disease：IBD）は、潰瘍性大腸炎とクローン病に大別される腸管に炎症を繰り返す慢性疾患で、近年その患者数が増加している。疾患の背景に何らかの免疫学的な異常があると考えられるが、これまで明確な原因はわかっていない。我々は以前に、IBD患者の血清IgGの糖鎖構造の違い（フコシル化IgGにおけるガラクトース欠損の増加）が、潰瘍性大腸炎とクローン病を鑑別し、それぞれの疾患活動性を反映する糖鎖バイオマーカーであることを見いだした¹⁾。それまでの*in vitro*の実験から、T細胞を抗体刺激すると細胞表面上のコアフコース（アスパラギン結合型糖鎖の非還元末端のGlcNAcに結合するフコースのこと）が劇的に増加することがわかっていった。そこでIBD患者の腸管組織を、コアフコースを認識するレクチンであるPhoSLで免疫染色すると、炎症の活動性の高い部分に浸潤したT細胞が強く染色されることが観察された（図1A）。問題は、これがIBDに伴う結果なのか原因なのかである。そこでコアフコースが完全に欠損したフコース転移酵素8（Fut8）ノックアウトマウスを用いて、TNBSという薬剤（主にT細胞を刺激して腸炎を誘導する）を使った実験的IBDを誘導すると、Fut8ノックアウトマウスでは劇的に腸炎が抑制されていたのである²⁾。図1Bに示すように、ノックアウトマウスではリンパ球の浸潤が軽度で、腸管の粘膜破壊像がほとんど認められない。その結果、野生型マウスでみられた体重減少も、ノックアウトマウスではほとんどみられなかった。また臨床免疫研究の常法に従って炎症性サイトカインの発現を検討すると、野生型マウスに比較してノックアウトマウスでは炎症性のサイトカインであるインターロイキン2やインターフェロン γ （IFN γ ）の発現が有意に低かった。

3. コアフコースがT細胞受容体の機能を制御するメカニズムの解析

コアフコース合成を制御する糖転移酵素Fut8は、1996年にタンパク質の分離精製と遺伝子クローニングがなされた³⁾。もともと肝がんの腫瘍マーカー α -フェトプロテイン-L3（AFP-L3）のフコシル化に関与する糖転移酵素として着目されていたが、ノックアウトマウスや遺伝子改変細

¹ 大阪大学大学院医学系研究科機能診断科学（〒565-0871 吹田市山田丘1-7）

² 同消化器内科学（〒565-0871 吹田市山田丘2-2）

³ 大阪警察病院外科（〒543-0035 大阪府天王寺区北山町10-30）

Comprehensive analysis of disease-related glycosylation, leading to glyco-therapy

Eiji Miyoshi¹, Hironobu Fujii¹, Shinichiro Shinzaki², Masahiro Tanemura³ and Yoshihiro Kamada^{1,2} (¹ Osaka University Graduate School of Medicine, Department of Molecular Biochemistry & Clinical Investigation, 1-7 Yamada-oka, Suita 565-0871, Japan, ² Osaka University Graduate School of Medicine, Department of Gastroenterology & Hepatology, 2-2 Yamada-oka, Suita 565-0871, Japan, ³ Osaka Police Hospital, Department of Surgery, 10-31 Kitayama-cho, Tennouji, Osaka 543-0035, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890264

© 2017 公益社団法人日本生化学会

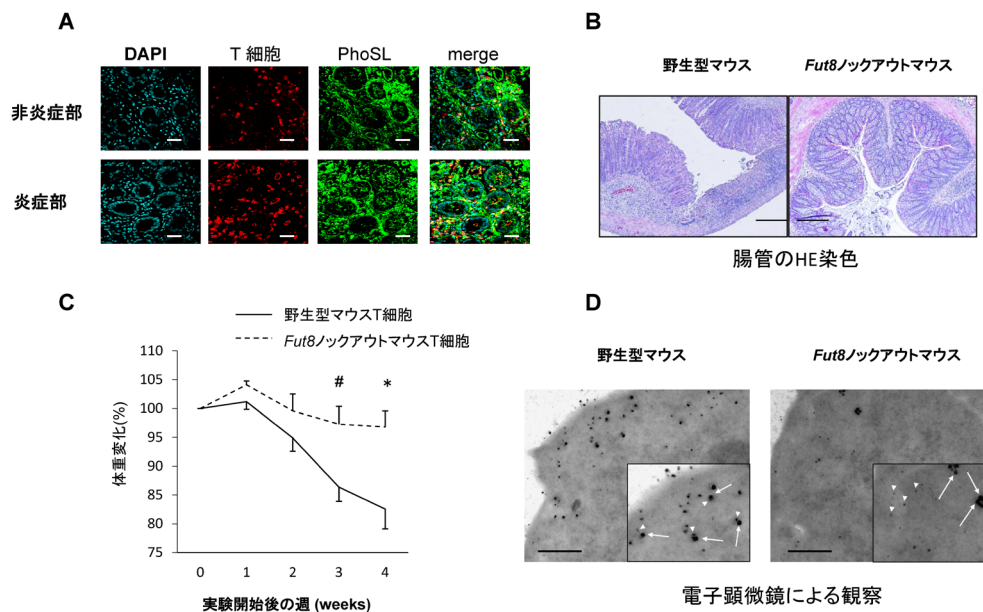


図1 炎症性腸疾患におけるT細胞のコアフコースの重要性

(A)炎症性腸疾患患者の腸組織において、炎症部ではT細胞のマーカーであるCD3抗体の染色とコアフコースを認識するPhoSL染色が一致するが、非炎症部では一致しない。(B)*Fut8*ノックアウトマウスではTNBS腸炎が著明に抑制される。(C)*Rag2*ノックアウトマウスを使ったT細胞移入実験で、*Fut8*ノックアウトマウス由来のT細胞では腸炎が抑制され、体重減少がみられなかった(#: $p < 0.05$, *: $p < 0.01$)。(D)*Fut8*ノックアウトマウスのT細胞では、T細胞を抗体刺激したときにラフトのマーカーであるFlotillin-1(矢印)とT細胞受容体(矢印頭)の共局在がみられなかった。文献2を改変して引用。

胞の研究から、多くの増殖因子受容体の機能を正に制御することがわかった^{4,5)}。つまりコアフコースを欠損させると膜受容体の活性化が抑制される。このため*Fut8*ノックアウトマウスで実験的腸炎が抑制されたメカニズムとして、まずT細胞受容体の異常を考えた。しかしこのマウスは全身の*Fut8*が欠損しているため、腸管上皮細胞や他の免疫担当細胞の影響を完全には否定しきれない。そこで、養子細胞(リンパ球)移入系を用いて*Rag2*欠損マウスにT細胞を移入する実験を行った。すると最初の実験結果と同様に、*Fut8*ノックアウトマウスのT細胞を移入した系では、実験的腸炎が著明に抑制された(図1C)。我々の実験結果では、腸管の粘膜バリアを破壊してマクロファージの活性化を介して腸炎を誘導するデキストラン硫酸(DSS)という薬剤を投与した場合には、野生型マウスと*Fut8*ノックアウトマウスの腸炎の程度には差を認めなかった²⁾。しかしながら、DSS腸炎でも炎症に関わる $\text{IFN}\gamma$ の産生は*Fut8*ノックアウトマウスで低下しており、*Fut8*ノックアウトマウスの免疫細胞は炎症が抑制されていることがわかった。また、マクロファージにおけるコアフコース有無の影響は*in vitro*では差を認めるが、*in vivo*では顕著ではなく当初の予想とは異なる結果となった。一般的にT細胞受容体は細胞表面に存在するラフトという膜ドメインで作用するといわれている⁶⁾。ラフトにおけるT細胞受容体の局

在をショ糖密度勾配法による生化学的実験、蛍光免疫細胞染色や電子顕微鏡による形態学的な実験で検討した。紙面の都合で電子顕微鏡の実験結果のみ示すが、ノックアウトマウスではT細胞受容体とラフトに存在するFlotillin-1タンパク質の共局在がみられなかった(図1D)。なぜ、コアフコースを欠損するT細胞受容体がラフトに移行しないのだろうか。HPLCを使った糖鎖構造解析でも、コアフコースは非常に疎水性の強い糖鎖といえる。脂質に富むラフトに糖タンパク質が移行するためには、コアフコースの疎水性を必要とする可能性がある。コアフコースは、肝臓で作られる糖タンパク質の選択的な輸送にも関与することが報告されているが⁷⁾、ラフト移行と何らかの関わりがあるのかもしれない。IBDの治療としては、免疫調節薬の他に近年はレミケード($\text{TNF}\alpha$ 阻害薬)などの抗体医薬が使われている。しかし、医療費や副作用の問題からインフリキシマブは長期的には投与できない。腸管からT細胞受容体のコアフコースを標的にした薬剤を投与する戦略は新しい糖鎖治療法となる可能性がある。

4. 膵がんと糖鎖バイオマーカー

膵がんはわが国のがん死の第4位を占め、5年生存率は10%以下と現代医学最大の難治がんといえる。我々は膵が

んの新しいがんバイオマーカーとしてフコシル化ハプトグロビン (Fuc-Hpt) を発見し⁸⁾, 血中Fuc-Hptを定量できるレクチン—抗体ELISAの開発に成功した⁹⁾. Fuc-Hptは膵がんの臨床病期とともに陽性率が増加し, CA19-9に匹敵する膵がんのバイオマーカーであることがわかった. 最近の研究からFuc-Hptの産生臓器として, 膵がんの肝転移 (画像診断で見えないものを含む) の可能性が高いことがわかってきた. 膵がんが予後不良である最大の原因は, 早期診断が困難なことである. CA19-9やFuc-Hptをはじめ, 従来の腫瘍マーカーでは早期診断はきわめて難しい. 我々は膵がんの病理学的な研究から, 膵がん周囲の膵臓にはほとんど潜在性の慢性膵炎が存在することを見いだした¹⁰⁾. 膵がん早期診断のためには, この潜在性慢性膵炎を何らかのバイオマーカーでハイリスク群として囲い込むことが重要といえる. 大変興味深いことにFuc-Hptのフコシル化の結合様式が健常者, 慢性膵炎, 膵がんで劇的に変化することを見いだした¹¹⁾. その原因については現在検討中であるが, 膵がん発症のヒントになることを期待している. 一般にコアフコースは肝臓や静止期のT細胞を除く, 多くの組織や細胞で発現している. 一方ルイス型のフコースは, がん細胞 (特に悪性度の高いがん細胞) や炎症時のリンパ球で発現する. 現在, Fuc-Hptに対するモノクローナル抗体の作製に成功しており, Fuc-Hptの産生細胞を探索している. 膵がんの発がん過程にみられるハプトグロビンの劇的な糖鎖変化に関して, 筆者らは文献11に示すような大胆な仮説を立てている.

すなわち健常者, 慢性膵炎, 膵がんの発がん過程においてハプトグロビンの糖鎖をみていくと, 健常者ではFuc-Hptがほとんど発現せず, 慢性膵炎になるとコア型Fuc-Hptが上昇し, そして膵がんになるとむしろコア型Fuc-Hptの比率は減少しルイス型Fuc-Hptが増加する. この一連のハプトグロビンの糖鎖解析で膵がんハイリスク群が囲い込めるかもしれない.

5. 膵がんに対するブタ型糖鎖ワクチン治療

バイオマーカーを使って膵がんを早期診断することは難しい. 画像診断で2cmの腫瘍が診断されたときでさえ, その多くが浸潤・遠隔転移しており, 極論すれば画像でみえたら膵がんは手遅れといっても過言ではない. 上述の潜在性慢性膵炎の中から, 膵がんハイリスク群を同定することが膵がん克服の最短距離かもしれない. 腫瘍がみえないので手術することはできないが, 我々は画期的なブタ型糖鎖ワクチンの可能性を考えている. ブタ型糖鎖とは α -gal エピトープ (Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R) のことで, Galiliらによって長年研究されてきた¹²⁾. α -gal エピトープは, 糖転移酵素である α 1,3ガラクトース転移酵素によりタン

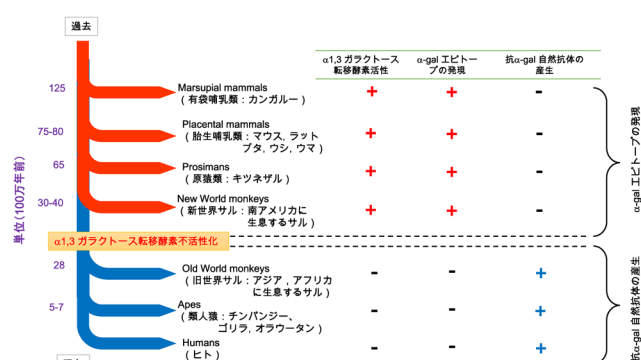


図2 哺乳類の進化課程における α -gal エピトープの発現と抗Gal自然抗体の産生

ヒトや類人猿, 旧世界サルでは α 1,3ガラクトース転移酵素遺伝子に変異によって偽遺伝子となっている.

パク質および脂質に結合する糖鎖末端に生合成される. この α 1,3ガラクトース転移酵素は図2に示すように, 哺乳類が地球上に発生し新世界サルまで進化する過程においては酵素活性が維持され, 生体内の糖鎖末端に α -gal エピトープを生合成する. しかし, 哺乳類が旧世界サル, 類人猿, ヒトへとさらに進化すると, その酵素活性は糖鎖遺伝子の点突然変異のため失活し, α -gal エピトープを生合成することができない. したがって, 旧世界サル, 類人猿, ヒトではこのエピトープは非自己の糖鎖構造となり, 代わりに α -gal エピトープを特異的に認識する抗Gal自然抗体が産生される. 我々ヒトでは循環IgGの約1%が抗Gal自然抗体として備わっている. さて, 移植医療における慢性的なドナー不足を解消すべく, ブタの臓器をヒトに移植する異種移植の研究がなされてきた. これはブタの臓器は大きさ, 機能がヒトに近いことから実現可能と考えられてきた. しかし, ブタの臓器がヒトに生着するためには, ブタ移植片の細胞表面に存在するブタ型糖鎖・ α -gal エピトープとヒトに備わる抗Gal自然抗体による抗原抗体反応によって引き起こされる超急性拒絶反応を克服する必要がある. α 1,3ガラクトース転移酵素遺伝子のノックアウトブタ作出などブタ糖鎖構造改変の研究が長らく行われてきた¹³⁾.

この原理を逆に使って, 我々は腫瘍抗原に α -gal エピトープをつけた新たな糖鎖がんワクチンの可能性について検討した¹⁴⁾. 想定される腫瘍免疫の概略を図3に示す. α 1,3ガラクトース転移酵素を遺伝子導入したがん細胞由来の膜タンパク質画分 (膜構造が壊れないよう, 界面活性剤を使わず凍結・融解および放射線照射での不活性化のみ) をワクチンとして担がんマウスに投与すると腫瘍形成が著しく抑制され, マウスの生存期間も延長された. この手法のメリットとしては複数のがん抗原にブタ型糖鎖を結合させ強力なアジュバント効果が得られること, 逆にデメリットとしてはがん抗原以外のタンパク質にもブタ型糖鎖がつ

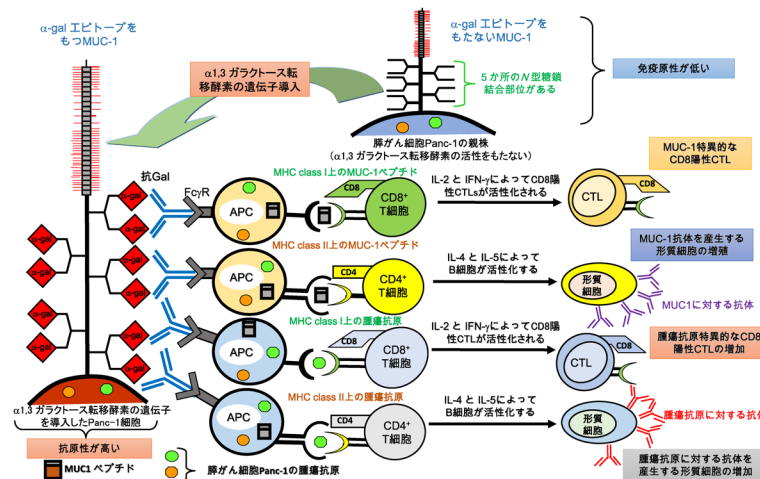


図3 α-galエピトープを使った糖鎖ワクチンによる膵がん免疫治療

膵がん細胞Panc-1にα1,3ガラクトース転移酵素の遺伝子を導入し、Panc-1が産生する多くのタンパク質にブタ型糖鎖を付加する。するとMUC-1を代表に、さまざまなTAA（腫瘍抗原）に対する液性および細胞性免疫が活性化される。

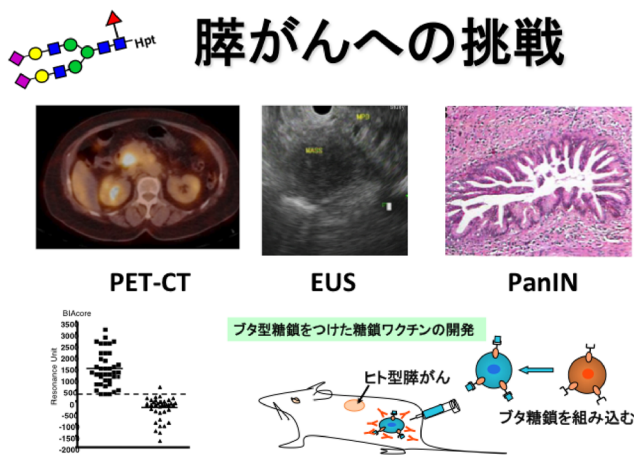


図4 膵がんへの挑戦

PETなどの画像診断で膵がんが発見されたときは、ほとんどの症例で完治は難しい。超音波内視鏡（EUS）で早期発見もしくは血中バイオマーカー（たとえば脂質型CA19-9¹⁶⁾）を使ってPanIN（上皮内腫瘍）の状態膵がん発症の早期予測を行い、糖鎖ワクチンで先制医療を試みる。

抽出液で免疫し、抗Gal抗体を産生させたヒト型マウスを作る。このマウスにα1,3糖転移酵素遺伝子導入したPanc-1細胞で免疫し、そのマウスからリンパ球を採取する。そして、このリンパ球をNOD-SCIDマウスにリンパ球を移入した上で、Panc-1細胞を移植し、その腫瘍形成をみる実験においても、腫瘍形成がきわめて強く抑制された¹⁵⁾。ただし、この系においてもベクター導入の問題があるため、現在我々は*in vitro*で抽出したα1,3糖転移酵素そのものを使ってブタ型糖鎖を付加させる方法や化学合成を使う系を考えている。多くのがんは画像診断で腫瘍を発見し、それが早期がんであれば手術などの治療によって完治できる。しかし膵がんの場合は、画像で腫瘍がみえた段階でほとんどのケースが完治できない。したがって、バイオマーカーや遺伝子診断によって膵がんが画像にみえる以前の段階で膵がんハイリスク群を絞り込み、ワクチン療法などの先制医療を行うことが最善の治療法ではないかと夢のような話を考えている（図4）。

文 献

- Shinzaki, S., Iijima, H., Nakagawa, T., Egawa, S., Nakajima, S., Ishii, S., Irie, T., Kakiuchi, Y., Nishida, T., Yasumaru, M., Kanto, T., Tsujii, M., Tsuji, S., Mizushima, T., Yoshihara, H., Kondo, A., Miyoshi, E., & Hayashi, N. (2008) *Am. J. Gastroenterol.*, **103**, 1173–1181.
- Fujii, H., Shinzaki, S., Iijima, H., Wakamatsu, K., Iwamoto, C., Sobajima, T., Kuwahara, R., Hiyama, S., Hayashi, Y., Takamatsu, S., Uozumi, N., Kamada, Y., Tsujii, M., Taniguchi, N., Takehara, T., & Miyoshi, E. (2016) *Gastroenterology*, **150**, 1620–1632.
- Uozumi, N., Yanagidani, S., Miyoshi, E., Ihara, Y., Sakuma, T., Gao, C.X., Teshima, T., Fujii, S., Shiba, T., & Taniguchi, N. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 27810–27817.

- 4) Wang, X., Inoue, S., Gu, J., Miyoshi, E., Noda, K., Li, W., Mizuno-Horikawa, Y., Nakano, M., Asahi, M., Takahashi, M., Uozumi, N., Ihara, S., Lee, S.H., Ikeda, Y., Yamaguchi, Y., Aze, Y., Tomiyama, Y., Fujii, J., Suzuki, K., Kondo, A., Shapiro, S.D., Lopez-Otin, C., Kuwaki, T., Okabe, M., Honke, K., & Taniguchi, N. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15791–15796.
- 5) Wang, X., Gu, J., Ihara, H., Miyoshi, E., Honke, K., & Taniguchi, N. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 2572–2577.
- 6) Horejsi, V. (2003) *Immunol. Rev.*, **191**, 148–164.
- 7) Nakagawa, T., Uozumi, N., Nakano, M., Mizuno-Horikawa, Y., Okuyama, N., Taguchi, T., Gu, J., Kondo, A., Taniguchi, N., & Miyoshi, E. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 29797–29806.
- 8) Okuyama, N., Ide, Y., Nakano, M., Nakagawa, T., Yamanaka, K., Moriwaki, K., Murata, K., Ohigashi, H., Yokoyama, S., Eguchi, H., Ishikawa, O., Ito, T., Kato, M., Kasahara, A., Kawano, S., Gu, J., Taniguchi, N., & Miyoshi, E. (2006) *Int. J. Cancer*, **118**, 2803–2808.
- 9) Kamada, Y., Kinoshita, N., Tsuchiya, Y., Kobayashi, K., Fujii, H., Terao, N., Kamihagi, K., Koyama, N., Yamada, S., Daigo, Y., Nakamura, Y., Taniguchi, N., & Miyoshi, E. (2013) *Clin. Chim. Acta*, **417**, 48–53.
- 10) Tomita, Y., Azuma, K., Nonaka, Y., Kamada, Y., Tomoeda, M., Kishida, M., Tanemura, M., & Miyoshi, E. (2014) *Pancreas*, **43**, 1032–1041.
- 11) Miyoshi, E. & Kamada, Y. (2016) *Cancer Sci.*, **107**, 1357–1362.
- 12) Galili, U. (2013) *Immunology*, **140**, 1–11.
- 13) Galili, U. (2013) *Xenotransplantation*, **20**, 138–147.
- 14) Deguchi, T., Tanemura, M., Miyoshi, E., Nagano, H., Machida, T., Ohmura, Y., Kobayashi, S., Marubashi, S., Eguchi, H., Take-da, Y., Ito, T., Mori, M., Doki, Y., & Sawa, Y. (2010) *Cancer Res.*, **70**, 5259–5269.
- 15) Tanida, T., Tanemura, M., Miyoshi, E., Nagano, H., Furukawa, K., Nonaka, Y., Akita, H., Hama, N., Wada, H., Kawamoto, K., Kobayashi, S., Eguchi, H., Mori, M., & Doki, Y. (2015) *Int. J. Oncol.*, **46**, 78–90.
- 16) Uozumi, N., Gao, C., Yoshioka, T., Nakano, M., Moriwaki, K., Nakagawa, T., Masuda, T., Tanabe, M., & Miyoshi, E. (2010) *J. Proteome Res.*, **9**, 6345–6353.

著者寸描

●三善 英知 (みよし えいじ)



大阪大学大学院医学系研究科機能診断科学講座教授。医学博士。

■略歴 1986年大阪大学医学部を卒業。消化器内科を中心とした臨床研修後、大学院から糖鎖の研究を始める。2007年6月から現職。14～15年医学部保健学科長。15年より保健学専攻BDC研究センター長。

■研究テーマと抱負 糖鎖の病態生化学に関する研究で、多くの基礎・臨床の教室と共同研究を続けている。糖鎖研究の力で、難治性消化器疾患の治療法を開発することが大きな夢である。

■ウェブサイト <http://sahswww.med.osaka-u.ac.jp/~tousa/c01.html>

■趣味 将棋、読書、ゴルフ。