

Ref. No. : 170072

研究代表者 : 舘野 浩章

研究機関 : 国立研究開発法人産業技術総合研究所

助成期間 : 2017/4/1-2018/3/31

研究課題 : 疾患グライコーム非破壊解析システムの開発

研究報告 :

(a) 要旨 : (英文で A4・1 ページ以内)

Abstract

We developed a glycan profiling technology called lectin microarray, where various lectins are immobilized on glass slides (1). Using the technology, we analyzed various stem cells and tumor cells and obtained glycan profiles of them, followed by the development of practical technologies for the quality control of stem cells used for regenerative medicine (2,3), and drug candidates for pancreatic cancer therapy (4). However, cells or tissues must be pre-destructed for the analysis of lectin microarray, and thus the original glycome of living cells could not be obtained. At least more than 1,000 cells are required for lectin microarray analysis under normal protocol and thus the glycome could not be analyzed at a single cell level. The purpose of this study is to develop a non-destructive system to analyze the glycome at a single cell level.

Author's



We developed a recombinant lectin library and commercialized more than 40 recombinant lectins. The glycan-binding specificity information of the recombinant lectins was obtained by glycan microarray and frontal affinity chromatography. Using the recombinant lectin library, we challenged to develop a system to analyze the glycome at a single cell level.

During this research project, we could develop a basic strategy to analyze the glycome at a single cell level. We accumulated experimental data to apply for a patent.

Reference

- (1) Lectin microarrays: concept, principle and applications. Hirabayashi J, Yamada M, Kuno A, Tateno H. *Chem Soc Rev*. 2013 May 21;42(10):4443-58.
- (2) A medium hyperglycosylated podocalyxin enables noninvasive and quantitative detection of tumorigenic human pluripotent stem cells. Tateno H, Onuma Y, Ito Y, Hiemori K, Aiki Y, Shimizu M, Higuchi K, Fukuda M, Warashina M, Honda S, Asashima M, Hirabayashi J. *Sci Rep*. 2014 Feb 12;4:4069.
- (3) Elimination of tumorigenic human pluripotent stem cells by a recombinant lectin-toxin fusion protein. Tateno H, Onuma Y, Ito Y, Minoshima F, Saito S, Shimizu M, Aiki Y, Asashima M, Hirabayashi J. *Stem Cell Reports*. 2015 May 12;4(5):811-20.
- (4) A Novel Therapeutic Strategy for Pancreatic Cancer: Targeting Cell Surface Glycan Using rBC2LC-N Lectin-Drug Conjugate (LDC). Shimomura O, Oda T, Tateno H, Ozawa Y, Kimura S, Sakashita S, Noguchi M, Hirabayashi J, Asashima M, Ohkohchi N. *Mol Cancer Ther*. 2018 Jan;17(1):183-195.

以下、特許出願前のため confidential

(b) 目的：

申請者はこれまで、スライドガラス上に数十種の糖結合タンパク質、レクチンを固定化したレクチンアレイと呼ばれる糖鎖プロファイリング技術を開発し、再生医療や創薬に貢献する実用的な技術の開発を進めてきた (Hirabayashi et al., 2013)。本レクチンアレイは GlycoTechnica 社から上市され、診断薬や創薬など幅広い分野への応用が進んでいる。レクチンアレイでは解析対象となる細胞や組織から糖タンパク質を抽出し、蛍光標識後にレクチンアレイに供して解析する。しかしレクチンアレイでは、細胞や組織を破壊して解析する必要があるため、本来の生きた状態の細胞のグリコームを取得できないという課題があった。こうした課題を解決すべく、申請者は生きた細胞に蛍光色素を導入して、そのままレクチンアレイで解析する手法も開発したが (Tateno et al., 2007b)、数 μm の直径をもつ大きな細胞をマイクロアレイに反応させて解析する場合は、得られる結果にバラつきが生じてしまうなどの課題があった。また通常のレクチンアレイでは $0.5 \mu\text{g/mL}$ 程度の濃度のタンパク質分画を反応させて解析する必要があるが、更なる高感度化が望まれている。現在、つくば国際戦略特区の枠組みで製薬企業、医療機関との共同で癌幹細胞に特異的に発現する複合糖質に対する抗体医薬品の開発を進めている。ここでは難治性癌の代表である膵がんに対する標準治療薬であるゲムシタビンで治療後に残存する薬剤耐性がん細胞をがん幹細胞と定義し、本細胞に特異的に発現する糖タンパク質をレクチンアレイで同定する。この際、組織切片の癌部・非癌部をレーザーマイクロダイセクションで切り出し、糖タンパク質を抽出後、蛍光標識化してレクチンアレイで比較解析するという流れになる (Matsuda et al., 2008)。しかし実際にはかなりの面積 (直径 2 mm 以上) の組織切片が解析に必要となってしまう、目的部位を切り出すために多大な時間と労力が必要となる。また得られたデータも実際の構造とは異なってしまうという課題があった。組織や細胞のグリコームを、非破壊且つより超高感度に網羅解析する技術を開発できれば、現在のレクチンアレイの抱える課題を解決した次世代グリコーム解析技術へと発展できるはずである。そこで本研究では、治療ターゲットとしての疾患関連グリコームを、非破壊で、単一細胞レベルで超高感度に解析することが可能な新しい技術を開発することを目的とした。

(c) 方法：

本研究では組換えレクチンライブラリーを DNA バーコード化することにより、糖鎖情報を増幅し、単一細胞レベルでグリコームを解析する新たな技術の開発を構築することとした。

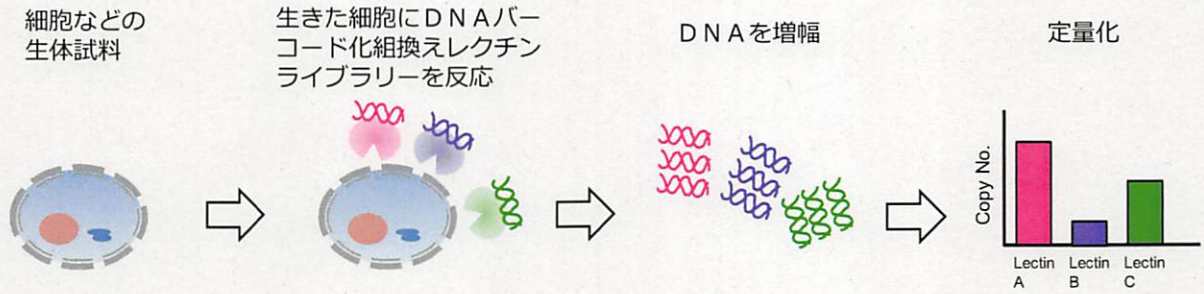
- ・まず各種方法を用いて組換えレクチンにオリゴ DNA やプラスミドを結合させる方法を検討した。

- ・次に DNA バーコード化レクチンをアフィニティークロマトグラフィーで精製し、過剰なオリゴ DNA を除去する方法について検討した。

- ・各レクチンへのオリゴ DNA の修飾率を算定する方法について検討した。

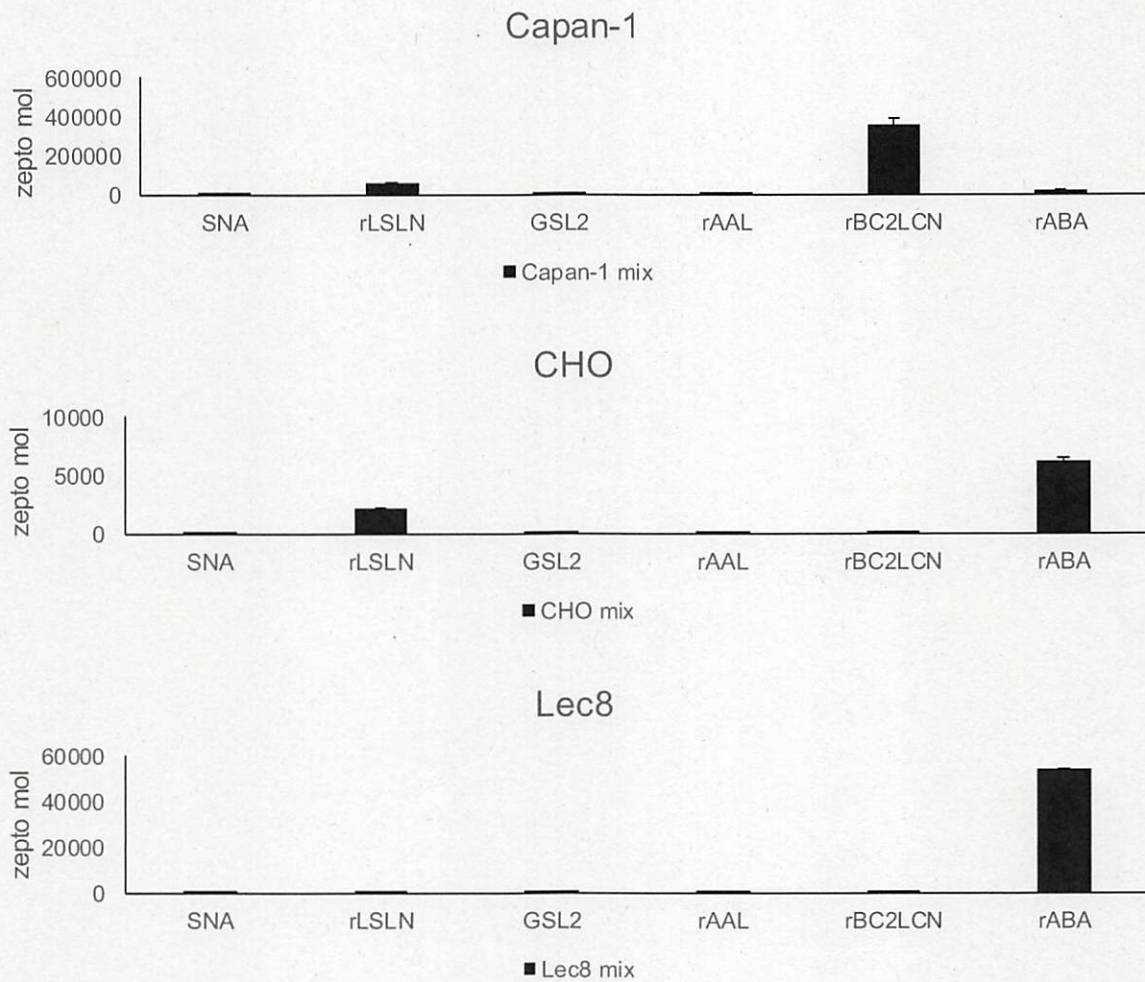
- ・更に DNA バーコード化レクチンを細胞に反応させて、リアルタイム PCR 法で解析するプロトコルの構築について検討した。細胞としては Capan-1、CHO 細胞、Lec1、Lec8 等の細胞を用いて検討した。

解析の流れ



(d) 結果 (ネガティブデータを含む) :

本研究ではまず、試験的に計6種類のレクチンにDNAを修飾した。得られたDNAバーコード化レクチンを1万個のCapan-1、CHO、Lec8細胞に反応させて、リアルタイムPCR法で測定した。その結果、それぞれの細胞で異なる糖鎖プロファイルを示すことが分かった。また、それぞれの糖鎖の構造を反映していることが分かった。



(e) 考察:

単一細胞レベルでグライコームを解析するために、現在は次世代シーケンサーでの検出法の構築を進めている。DNA バーコード化レクチンを 30 種類以上調製し、各種細胞や組織の解析を進めていく予定である。

(f) 論文のリスト:

1. The trimeric solution structure and fucose-binding mechanism of the core fucosylation-specific lectin PhoSL. Yamasaki K, Yamasaki T, Tateno H. *Sci Rep*. 2018 May 17;8(1):7740.
2. Glycome analysis of extracellular vesicles derived from human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. Saito S, Hiemori K, Kiyoi K, Tateno H. *Sci Rep*. 2018 Mar 5;8(1):3997.
3. Fucose-specific lectin of *Aspergillus fumigatus*: binding properties and effects on immune response stimulation. Sakai K, Hiemori K, Tateno H, Hirabayashi J, Gono T. *Med Mycol*. 2018 Jan 22.
4. Development of a Sensitive Microarray Platform for the Ranking of Galectin Inhibitors: Identification of a Selective Galectin-3 Inhibitor. Dion J, Advedissian T, Storozhylova N, Dahbi S, Lambert A, Deshayes F, Viguier M, Tellier C, Poirier F, Téletchéa S, Dussouy C, Tateno H, Hirabayashi J, Grandjean C. *Chembiochem*. 2017 Dec 14;18(24):2428-2440.
5. Distinct roles for each N-glycan branch interacting with mannose-binding type Jacalin-related lectins Oryzata and Calsepa. Nagae M, Mishra SK, Hanashima S, Tateno H, Yamaguchi Y. *Glycobiology*. 2017 Dec 1;27(12):1120-1133.
6. A Novel Therapeutic Strategy for Pancreatic Cancer: Targeting Cell Surface Glycan Using rBC2LC-N Lectin-Drug Conjugate (LDC). Shimomura O, Oda T, Tateno H, Ozawa Y, Kimura S, Sakashita S, Noguchi M, Hirabayashi J, Asashima M, Ohkohchi N. *Mol Cancer Ther*. 2018 Jan;17(1):183-195.
7. Engineering of a Potent Recombinant Lectin-Toxin Fusion Protein to Eliminate Human Pluripotent Stem Cells. Tateno H, Saito S. *Molecules*. 2017 Jul 10;22(7).
8. Lectin microarray analysis of isolated polysaccharides from *Sasa veitchii*. Yagi H, Tateno H, Hayashi K, Hayashi T, Takahashi K, Hirabayashi J, Kato K, Tsuboi M. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2017 Sep;81(9):1687-1689.
9. Sugar-Binding Profiles of Chitin-Binding Lectins from the Hevein Family: A Comprehensive Study. Itakura Y, Nakamura-Tsuruta S, Kominami J, Tateno H, Hirabayashi J. *Int J Mol Sci*. 2017 May 30;18(6).
10. Engineering of recombinant *Wisteria floribunda* agglutinin specifically binding to GalNAcB1, 4GlcNAc (LacdiNAc). Sato T, Tateno H, Kaji H, Chiba Y, Kubota T, Hirabayashi J, Narimatsu H. *Glycobiology*. 2017 May 26.
11. Isolation of Rice Bran Lectins and Characterization of Their Unique Behavior in Caco-2 Cells. Nakata H, Lin CY, Abolhassani M, Ogawa T, Tateno H, Hirabayashi J,

Muramoto K. Int J Mol Sci. 2017 May 13;18 (5).

12. Carbohydrate recognition by the rhamnose-binding lectin SUL-I with a novel three-domain structure isolated from the venom of globiferous pedicellariae of the flower sea urchin *Toxopneustes pileolus*. Hatakeyama T, Ichise A, Unno H, Goda S, Oda T, Tateno H, Hirabayashi J, Sakai H, Nakagawa H. Protein Sci. 2017 Aug;26 (8) :1574-1583.

(g) 署名・印・日付：

金野三幸章  2018/6/19