

研 究 報 告 書

「超高感度・非破壊1細胞糖タンパク質解析技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者: 舘野 浩章

1. 研究のねらい

申請者はこれまで、数十種の糖結合タンパク質(レクチン)を用いた糖鎖プロファイリング技術としてレクチンマイクロアレイの応用開発を行い、再生医療や創薬に貢献する実用的な技術を開発してきた。レクチンマイクロ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マイクロアレイに供して解析する。しかしレクチンマイクロアレイでは、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糖タンパク質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、そのままレクチンマイクロアレイで解析する手法も開発した。しかし数 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ることは難しく、得られたデータ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マイクロアレイでは 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、単一細胞での解析はできなかった。一方、製薬企業や医療機関との共同で膵がんの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きた。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マイクロアレイで同定する。この際、組織切片の癌部・非癌部をレーザーマイクロディ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マイクロアレイで比較解析するという流れになる。しかし直径 1.5 mm もの組織切片が解析に必要となり、組織を切り出すために多大な時間と労力が必要となる。単一細胞の糖タンパク質を、非破壊で生きたまま解析する技術を開発できれば、現在のレクチンマイクロアレイの抱える課題を克服した、次世代の糖タンパク質解析技術へと発展できるはずである。

本研究ではレクチンマイクロアレイとは全く逆の反応系を採用する。すなわち、生きた細胞を壊さずに、そのまま各種レクチンを反応させる。それぞれのレクチンにはDNAバーコードを修飾しておき、レクチンシグナルをPCR増幅する。増幅したDNAバーコードをNGSで解析することにより、超高感度かつ定量的に単一細胞の糖タンパク質を取得する。本技術を開発することで、生体システムを構成する細胞集団の不均一性と個別性を明らかにするとともに、新たな医療技術の開発へと展開する。

2. 研究成果

(1)概要

本研究では我々がこれまで開発してきた組換えレクチンライブラリーを用いて、単一細胞(シングルセル)の糖タンパク質を生きたまま、非破壊で解析するための革新的な技術を開発することを目的としている。本技術を開発することができれば、これまで細胞集団の平均的な糖タンパク質情報のみが取得可能であったが、これまで観察不可能であった単一細胞の糖

イコーム情報の取得が世界で初めて可能となる。そのため、糖鎖の新たな生物学的意義を明らかにすることが可能となるだけでなく、希少な細胞の検出・同定・分離技術の開発、それを標的とした各種疾患の診断薬や治療薬の開発、再生医療に用いる細胞の品質管理技術等を開発することが可能となると強く期待できる。そこで本研究では、①DNAバーコード化組換えレクチンライブラリーの構築、②細胞や組織切片への反応プロトコルの構築、③PCR、NGSを用いた検出技術の構築、④各種生体試料を用いたプロトコルの検証の研究項目を実施した。各種のレクチンの DNA バーコード化方法を検討し、クリック反応で高効率に修飾する方法を確立した。DNA バーコード修飾後にレクチンを精製し、最終的に約 40 種の DNA バーコード化レクチンを作製した。そして各種哺乳細胞への反応プロトコル（反応時間、反応温度、洗浄方法、ブロッキング方法等）を最適化するとともに、DNA バーコードの回収法、PCR 増幅条件、qPCR/NGS 解析のプロトコルを構築した。構築した方法でまず1万個の細胞のグライコーム情報を取得する技術を確立し、得られたデータがフローサイトメトリーで得られたデータと相関することを確認した。次に単一細胞に分離し、それぞれのグライコーム情報を取得する方法を確立した。最終的にヒト iPS 細胞のグライコームの多様性をシングルセルで取得するとともに、分化誘導後のグライコーム変化をシングルセルで解析し、追跡することに成功した。

（2）詳細

研究テーマ1「DNAバーコード化組換えレクチンライブラリーの構築」

レクチンライブラリーにオリゴ DNA を結合させるための各種方法を検討し、最終的にクリック反応を用いて効率的に導入する方法を構築した。さらに、オリゴ DNA に光応答性のリンカーを導入し、UV 照射で切り離し、PCR 増幅する方法を構築した。レクチンにオリゴ DNA を結合させた後、余剰のオリゴ DNA を除くために糖を固定化したアフィニティークロマトグラフィーで DNA バーコード化レクチンを精製した。さらにレクチンに導入されたオリゴ DNA 量を測定する方法を確立した。最終的に様々な糖結合特異性を有する約 40 種のレクチン-DNA バーコードライブラリーを構築した。オリゴ DNA 修飾レクチンと、未修飾のレクチンの反応性に違いがないことをフローサイトメトリーで確認した。

研究テーマ2「細胞や組織切片への反応プロトコルの構築」

レクチン-DNA バーコードライブラリーを細胞に反応させるための細胞濃度、バッファーの種類や濃度、ブロッキング剤、反応時間、反応温度等の各種パラメーターを最適化した。更にその後、オリゴ DNA を回収する条件を最適化した。また、1細胞分離装置を用いてシングルセルに分離する方法について最適化した。

研究テーマ3「NGS を用いた解析技術の構築」

まず 1 万個の細胞をリアルタイム PCR で解析する技術を構築し、フローサイトメーターで得られた結果と相関することを確認した。次に1万個の細胞に反応させたレクチン-DNA バーコードライブラリーをNGSで解析するための一連のプロトコルを構築した。そして、得られた結果がフローサイトメトリーで得られたデータと相関することを確認した。そして、DNA バーコードをカウントするためのバーコードカウントシステムを開発した。さらに1細胞分離装置で分離し

たシングルセルを解析するプロトコルを構築した。

研究テーマ4「各種生体試料を用いたプロトコルの検証」

構築したプロトコルを用いて、まず1万個の未分化なヒト iPS 細胞と分化したヒト皮膚線維芽細胞の2種の全く異なる細胞のグライコーム解析を行った。この2種の細胞の糖鎖構造情報は以前我々の研究によって明らかにしている。得られた結果をクラスター解析すると、予想通り細胞の種類で明確にグループ化された。さらにフローサイトメトリーで得られたデータと関連することを確認した。このことは、構築した技術を用いることで、ヒト iPS 細胞とヒト皮膚線維芽細胞のグライコームの違いを解析できていることを示している。次にヒト iPS 細胞とヒト皮膚線維芽細胞のグライコームをシングルセルで解析し、ヒト iPS 細胞グライコームの多様性を明らかにするとともに、明らかに異なるグライコームを持つ希少なヒト iPS 細胞が存在することがわかった。最終的にはヒト iPS 細胞を外胚葉に分化させる過程におけるグライコーム変化を1万個の細胞とシングルセルで解析した。1万個の細胞の解析において、分化過程で糖鎖プロファイルが分化日数に依存して変化していることがわかった。シングルセル解析を行うと、細胞集団の不均一は糖鎖発現を明らかにすることができた。

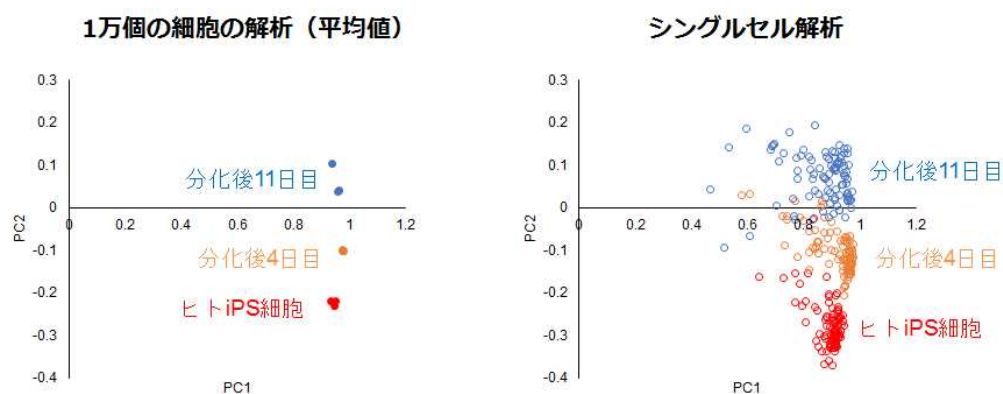


図 ヒト iPS 細胞の分化過程の糖鎖を1細胞粒度で見る

ヒト iPS 細胞の外胚葉への分化過程を1万個(左)とシングルセル(右)で解析した。不均一な糖鎖発現状態を可視化できた。

3. 今後の展開

開発した技術を用いて、単一細胞のグライコーム情報を取得し、グライコームの多様性を明らかにしていく。そして、細胞集団中に存在する希な細胞、例えば残存未分化細胞、がん幹細胞、組織幹細胞、逸脱細胞など、の同定や分離などに応用するとともに、それを標的とした試薬や医薬品候補の開発に展開する。また、本技術を用いて微生物叢の解析に展開し、微生物叢のグライコーム解析にも発展させる。

4. 自己評価

本研究では、単一細胞のグライコームを生きたまま、非破壊で解析するための技術を開発することを目的とした。最終的にNGSを用いて、高スループットに単一細胞のグライコームを生きたまま解析する技術を確立し、ヒト iPS 細胞やその分化過程におけるグライコームの多様性をシ

グルセルで可視化することに成功した。本技術は世界で初めてシングルセルでのグライコーム解析を実現するものであり、希少な細胞の糖鎖構造や機能解明のみならず、各種疾患の新たな診断・治療技術の開発や、未知な微生物叢グライコームへの展開等が強く期待できる。本研究成果は世界初の技術であることから科学技術への波及効果はもちろんのこと、新たな医療技術へと応用できることから社会・経済への波及効果も期待される。そのため、本プロジェクトで目標としていた内容を予定通り達成できたと自己評価する。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Oriented immobilization of rBC2LCN lectin for highly sensitive detection of human pluripotent stem cells using cell culture supernatants. *Tateno H(CA), Hiemori K, Minoshima F, Kiyoi K, Matoba K, Katayama J, Kumada Y. J Biosci Bioeng. 129 215-222 (2020)
2. Human Stem Cell Glycome: From Structural Elucidation to Social Implementation. Tateno H. Trends in Glycoscience and Glycotechnology 31 (181), SE83-SE84 (2019)

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<総説>

館野浩章、新たなモダリティとしてのレクチン-薬剤複合体の創出 医学のあゆみ 269(9)、659-667(2019)

<発表>

館野浩章、「TIAレクチン利用技術研究会活動報告とレクチン工学の未来」、平成29年度先端技術交流会・シンポジウム、機械振興会館ホール、2018/2/5

Hiroaki Tateno、「Lectin microarray: from glycan analysis to quality control of stem cells」、5th TERMIS World Congress、2018/9/6

Hiroaki Tateno、「Glycome of stem cells and application to regenerative medicine」、JAACT2018、Tsukuba International Congress Center、2018/11/5

<受賞>

2018年7月18日

第2回バイオインダストリー奨励賞

糖鎖プロファイリング技術の開発と再生医療・創薬への応用