

がんを指紋認証のように認識・標識化する技術
ー生体内のがん組織を識別する新たな診断法へー

理化学研究所（理研）の田中克典主任研究員、野村昌吾特別研究員らの研究チームは、人工糖ペプチドを細胞上で合成することにより、指紋認証のようにがん細胞をパターンで認識し、そのパターンを利用してマウス体内で特定のがん組織を標識化することに成功しました。



図1 左から田中克典主任研究員、野村昌吾特別研究員

2017年に田中主任研究員らは、細胞表面上でRGDyKペプチドと細胞表面の接着分子インテグリンの「強い」相互作用と、糖鎖と受容体レクチンの「弱い」相互作用を利用した細胞認識技術を開発しました。

今回、研究チームは、この技術を一般化するために、4種類のRGDyKペプチドと5種類の糖鎖の組み合わせ、クリック反応により人工糖ペプチドを細胞上で合成することで、5種類のがん細胞と1種類の非がん細胞をパターン認識できることを見いだしました。さらに、得られたパターンをマウス体内でのがん組織の識別に応用したところ、特定のがん組織を高感度で選択的に見分けることに成功しました。

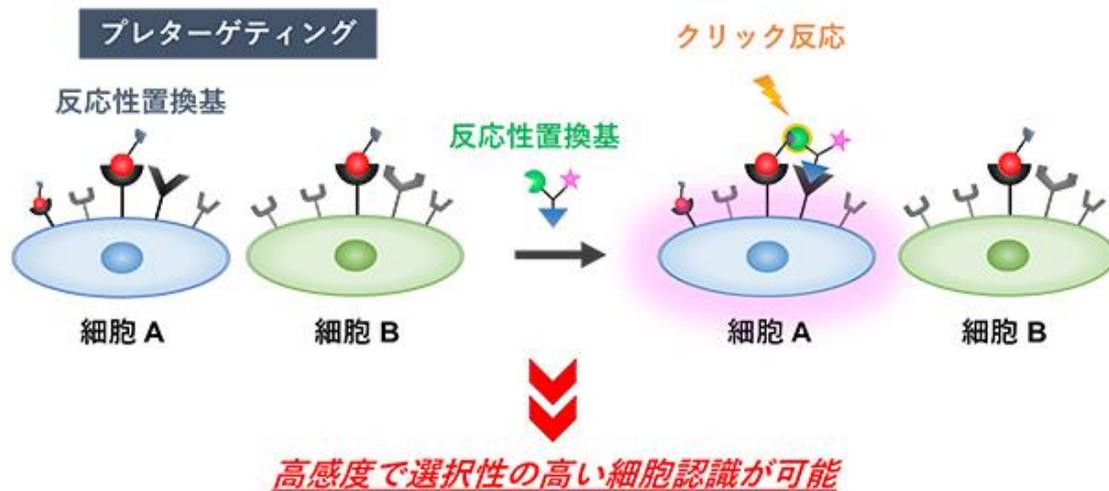


図2 2種類の分子を組み合わせて標的細胞を認識する

背景

ヒトや動物などの生体内分子イメージングは、抗がん剤の体内動態や特定の細胞を選択的に見分ける診断方法として注目されています。従来の分子イメージングは、見分けたい細胞（標的細胞）の表面に発現する1種類の受容体に対して「強く」相互作用する低分子化合物や抗体、ペプチドなどのリガンド分子[7]が広く用いられてきました。

しかし、「強く」相互作用するリガンド分子を用いると、標的細胞以外の細胞に発現している受容体にも「強く」相互作用するため、数多くの細胞から標的細胞のみを選択的に認識するには限界があります。例えば、「強く」相互作用するリガンド分子を用いて、同じ種類の受容体が発現している細胞 A、B から細胞 A のみを選択的に認識しようとしても、リガンド分子が細胞 A、B 両方の受容体と相互作用してしまうため、二つの細胞を区別することは困難です（図3 a）。また、「弱く」相互作用するリガンド分子を用いた場合は、受容体に相互作用してもすぐ離れてしまうため、感度良く検出することができません（図3 b）。

2017年に田中克典主任研究員らは、正常細胞の HUVEC（ヒト臍帯上皮細胞）を HeLa 細胞（ヒト子宮頸がん細胞）から感度良く見分ける細胞認識技術を開発しました（図3 c）注1）。ある反応性官能基を持つ「強く」相互作用するリガンド分子（ペプチドリガンド）を細胞表面上の受容体と一次的に相互作用させた後（プレターゲティング）、「弱く」相互作用するリガンド分子（糖鎖リガンド）を別の受容体と二次的に相互作用させます。この糖鎖リガンドには、プレターゲティングした官能基と選択的に結合する反応性官能基、および標識基が結合しています。二次的相互作用の際、ペプチドリガンドと糖鎖リガンドがそれぞれ相互作用する2種類の受容体が存在する細胞 A の表面のみで、両リガンド同士が結合する化学

反応（クリック反応）が進行します。すると、人工糖ペプチドが生成され、糖鎖リガンドの標識基により細胞 A を選択的に検出できます。



図3 従来の標的細胞を見分ける方法と本研究で開発した手法

a: 「強く」相互作用するリガンド分子を用いた場合、たとえ細胞 A に相互作用する受容体が多く発現していても、細胞 A、B 両方の受容体を認識してしまうため、見分けることが困難である。

b: 「弱く」相互作用するリガンド分子を用いた場合、受容体に相互作用してもすぐ離れてしまうため、感度良く検出できない。

c: 「強い」相互作用と「弱い」相互作用を順番に使い、さらにこれらのリガンド分子を標的細胞の表面で化学反応（クリック反応）によってつなぐことで、標的細胞を選択的に見分けることができる。

研究手法と成果

研究チームは、これまでに開発した細胞認識技術を一般化するために、「強く」相互作用するペプチドリガンドを 4 種類、「弱く」相互作用する糖鎖リガンドを 5 種類準備しました。そして、5 種類のがん細胞（HeLaS3：ヒト子宮頸がん細胞、A549：ヒト肺胞基底上皮腺が

ん細胞、BxPC3：ヒト膵臓線がん細胞、PC3：ヒト前立腺がん細胞、SW620：ヒト結腸がん細胞) および 1 種類の非がん細胞 (TIG3：ヒト二倍体線維芽細胞) に応用しました (図 4)。

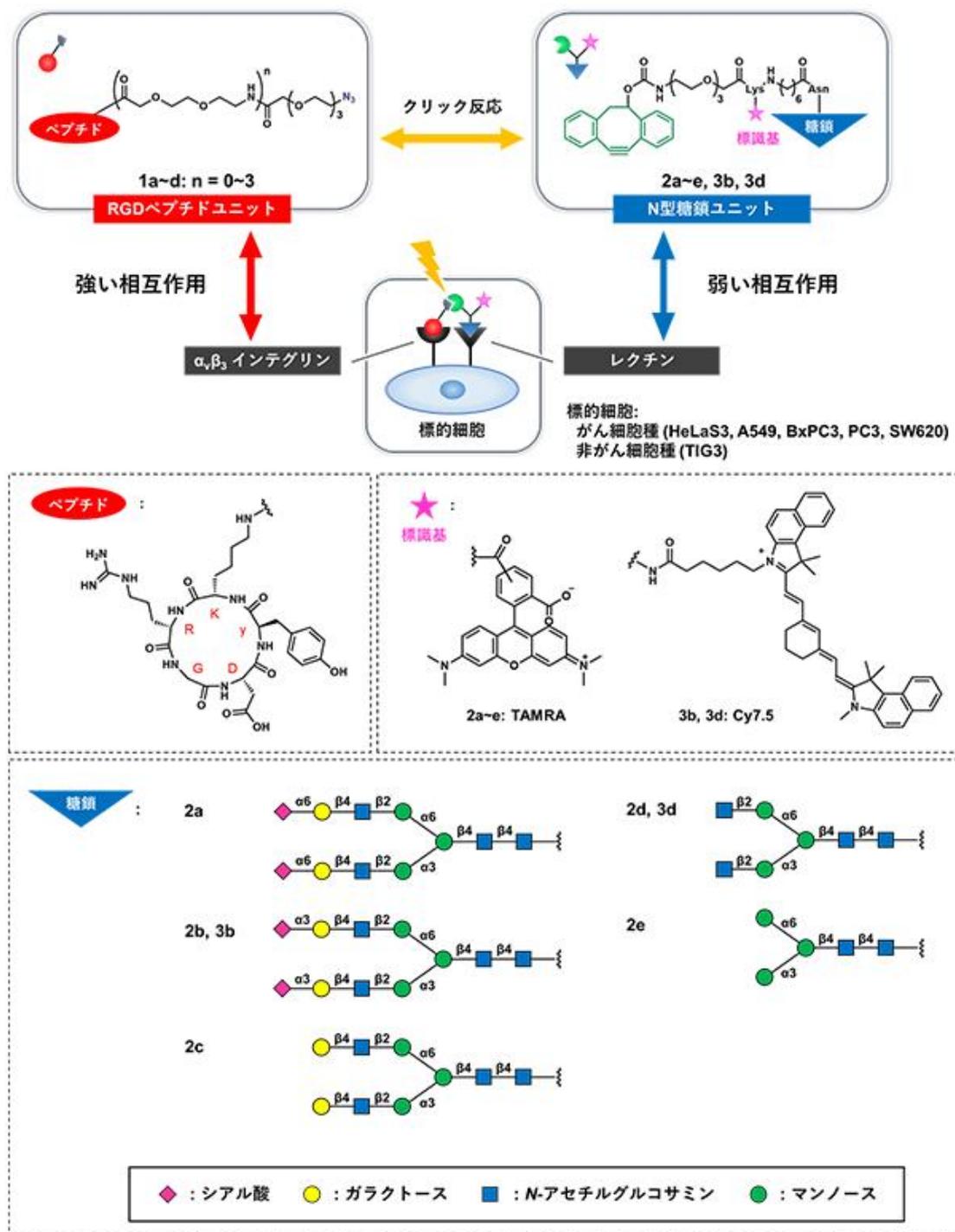


図4 「強い」相互作用のペプチドリガンドと「弱い」相互作用の糖鎖リガンドのデザイン $\alpha_v\beta_3$ インテグリン受容体のリガンド分子である RGDyK ペプチドユニット (1a~1d) と、

レクチン受容体のリガンド分子である N 型糖鎖ユニット (2a~2e)、標識基の構造。

用いた 6 種類の細胞には、RGDyK ペプチドリガンドと「強く」相互作用する $\alpha v \beta 3$ インテグリン受容体が発現しています。従来の「強い」相互作用のみで細胞認識した場合は、全ての細胞で強い蛍光シグナルを検出してしまい、これらの細胞を識別できませんでした (図 5 右上枠内)。

一方、今回開発した手法では、「強く」そして「弱く」相互作用する 2 種類のリガンドを組み合わせることで、がん細胞と非がん細胞をパターン認識することに成功しました (図 5)。例えば、HeLaS3 細胞では末端に N-アセチルグルコサミンもしくはマンノースを持つ糖鎖リガンド (2d、2e) を、A549 細胞では末端に α (2、3) シアル酸を持つ糖鎖リガンド (2b) を、BxPC3 細胞では末端にガラクトース、N-アセチルグルコサミン、もしくはマンノースを持つ糖鎖リガンド (2c、2d、2e) を用いることで、それぞれの細胞を標識化できました。

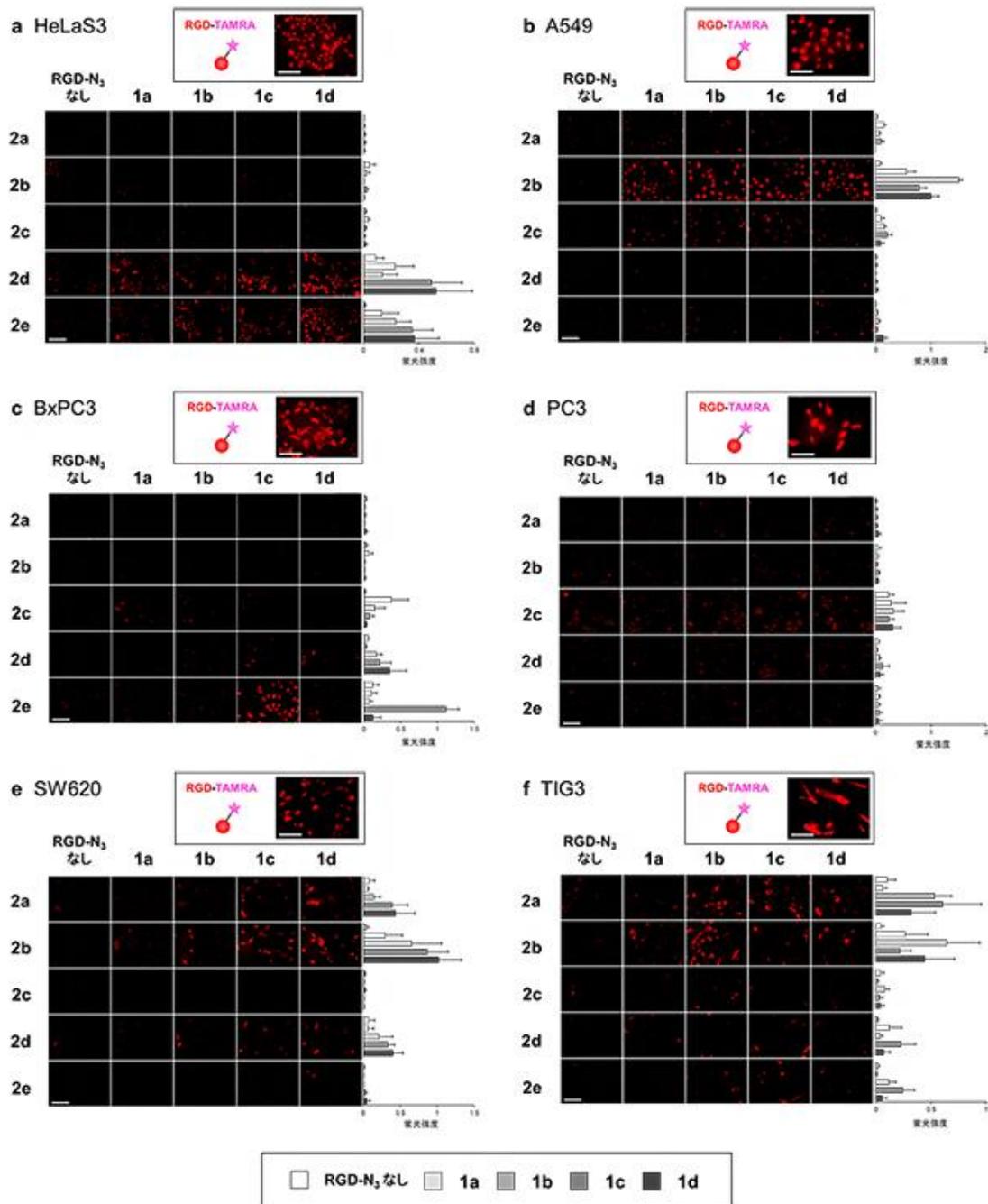


図5 RGDyK ペプチドリガンドと N 型糖鎖リガンドを用いた選択的細胞標識化
 a~f のそれぞれの細胞の右上枠内に示してあるように、従来の「強い」相互作用を持つリガンドだけでは細胞を見分けることはできない。一方で、プレターゲティングを用いた場合、特定のリガンドを組み合わせ得られる蛍光シグナルのパターンによって、細胞を識別することができる。

さらに、本手法を生体内でのがん組織認識に展開しました。HeLaS3 細胞（ヒト子宮頸がん細胞）または A549 細胞（ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞）を播種したマウスに、まず「強く」相互作用する RGDyK ペプチドリガンド（1d）を投与してプレターゲットイングし、その 30 分後に「弱く」相互作用する糖鎖リガンド（3b または 3d）を投与してがん組織を標識化しました（図 6 a）。この際、標識基は近赤外線[10]で標識できる Cy7.5 を使用しました。その結果、HeLaS3 細胞由来のがん組織では糖鎖リガンド（3d）で、A549 細胞由来のがん組織では糖鎖リガンド（3b）で強い蛍光シグナルが検出され、がん組織を選択的に見分けることに成功しました（図 6 b、c）。

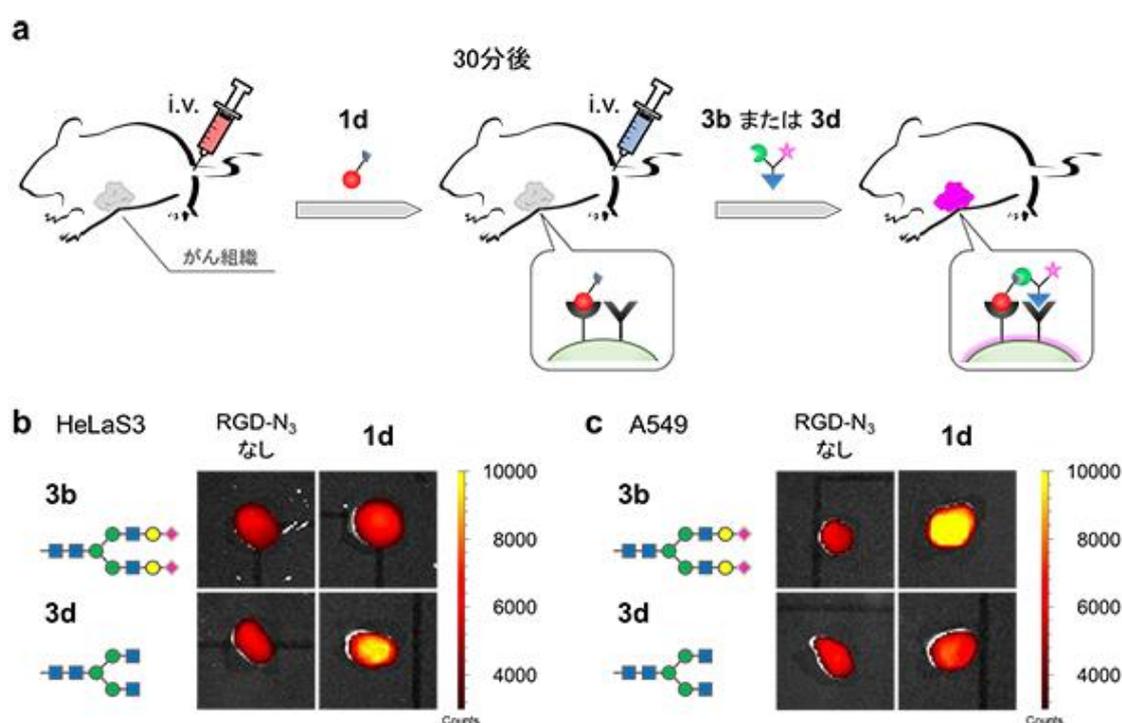


図 6 生体内でプレターゲットイング法を用いたがん組織標識化

a:生体内認識の概要。ヒトがん細胞を播種したマウスに、RGDyK リガンド（1d）を投与してプレターゲットイングした後、30分後に糖鎖リガンド（3b または 3d）を投与した。

b:HeLaS3 細胞（ヒト子宮頸がん細胞）では、1d と 3d の組み合わせで選択的にがん組織を見分けることができた。

c:A549 細胞（ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞）では、1d と 3b の組み合わせで選択的にがん組織を見分けることができた。

本研究では、標的細胞上で合成した人工糖ペプチドによる細胞のパターン認識に成功し、そのパターンを生体内イメージングに応用することで、特定のがん組織を識別できることを

実証しました。この 2 種類のリガンド分子を組み合わせて標的細胞上の複数の受容体を認識する技術を応用することで、生体内のがん組織や疾患部位を選択的に識別することができる新たな診断方法の開発が期待できます。

論文情報

タイトル Cancer discrimination by on-cell N-glycan ligation

雑誌 Communications Chemistry

DOI 10.1038/s42004-020-0270-9

日本語原文 https://www.riken.jp/press/2020/20200309_1/index.html

文 JST 客観日本編集部