

Ab interacts specifically with  $\alpha$ -gal epitopes on glycolipids and glycoproteins. The reason for this high specificity is that  $\alpha$ -gal epitope, like most other carbohydrate chains lacking sialic acid, is devoid of electrostatic charges. Thus, binding of anti-Gal Ab to  $\alpha$ -gal epitopes is facilitated only by hydrogen bonds, hydrophobic interactions and van der Waal's forces.

### Interaction of Anti-Gal Ab/ $\alpha$ -gal Epitope is a Major Obstacle in Clinical Xenotransplantation

Transplantation of pig organs into humans, that is, xenotransplantation, is a research field of considerable clinical significance since the number of human organ donors is insufficient.<sup>(15,16)</sup> Pigs are considered suitable organ donors because their organs are similar in size and function to many human organs.<sup>(15,16)</sup> However, the interaction of human natural anti-Gal Ab with millions of  $\alpha$ -gal epitopes expressed on the pig cell surface causes strong xenograft rejection.<sup>(3)</sup> The immunorejection is the result of cell lysis following complement activation by bound anti-Gal Ab (complement-dependent cytotoxicity) and ADCC, in which anti-gal IgG binding to  $\alpha$ -gal epitopes on pig cells directs the subsequent binding of cytolytic effector cells, including macrophages and natural killer cells (Fig. 2).<sup>(3)</sup> Pig kidneys and hearts transplanted into Old World monkeys, such as rhesus and baboon, are rejected immediately within 30 min to several hours by a process designated as hyperacute rejection (Fig. 2).<sup>(3)</sup>

Extensive research has been performed to find methods that can prevent the hyperacute rejection. Because  $\alpha$ 1,3 GT competes enzymatically with other "masking" glycosyltransferases within the Golgi apparatus for the same acceptor substrates,

several research groups attempted to downregulate the expression of  $\alpha$ -gal epitopes by overinduction of  $\alpha$ 1,2fucosyltransferase<sup>(17)</sup> or sialyltransferase<sup>(18)</sup> in pig cells. However, these efforts did not completely eliminate the epitope, due to the fact that as many as 1% of human circulating B lymphocytes are quiescent but capable of anti-Gal Ab production when activated.<sup>(3,4)</sup> The increase in the amount of high affinity anti-Gal Ab is potent enough to mediate the killing of xenograft cells.<sup>(3,4)</sup>

### Epidemiology of Pancreatic Cancer and Clinical Management

Pancreatic cancer is highly aggressive and is the fifth leading cause of cancer death in Japan with over 27 000 estimated new cases in 2009.<sup>(22,36)</sup> The prognosis of these patients is dismal with overall survival <5% and a median survival of 4–6 months. At the time of diagnosis, 15–26% of patients present with operable disease, whereas approximately 30% have locally advanced, unresectable disease and approximately 44% have metastatic disease. Surgical resection remains the only potentially curative intervention<sup>(19)</sup> but is contraindicated in most patients because the disease is diagnosed at an advanced stage. However, even with complete surgical resection, recurrence is common and the majority of patients develop recurrence with distant metastases. The median survival time after surgery is 15–20 months with a 5-year survival rate of approximately 20%.<sup>(19,20)</sup> The median survival time of patients with locally advanced, unresectable disease is 10–12 months.<sup>(19,21)</sup>

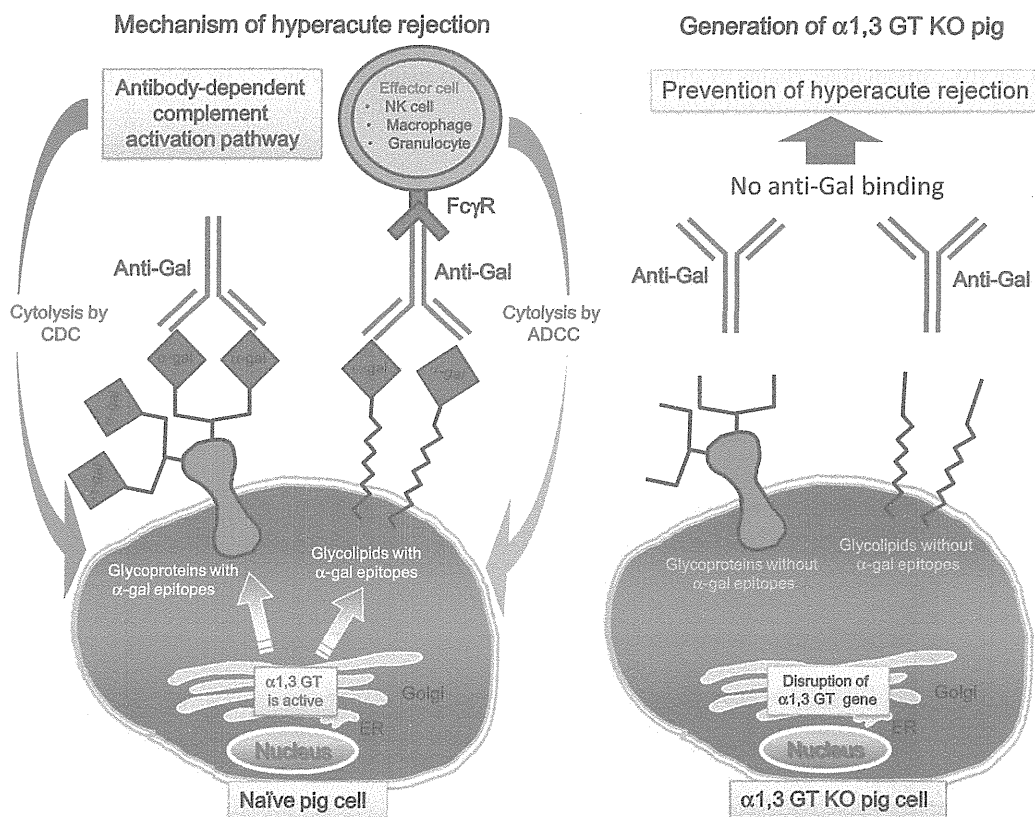


Fig. 2. Mechanism of pig xenograft rejection. The interaction of human natural anti-Gal with millions of  $\alpha$ -gal epitopes, expressed on the pig cell surface causes strong xenograft rejection. The *in vivo* binding of anti-Gal antibody (Ab) to  $\alpha$ -gal epitopes on transplanted pig heart or kidney is the main cause of hyperacute rejection of such grafts in humans and in Old World monkeys. The recent generation of  $\alpha$ 1,3 GT-knockout (KO) pigs that lack  $\alpha$ -gal epitopes has resulted in the elimination of this immunological barrier.  $\alpha$ 1,3 GT,  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase; ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; CDC, complement-dependent cytotoxicity; ER, endoplasmic reticulum; Fc $\gamma$ R, Fc $\gamma$  receptor; NK, natural killer cells.

The poor prognosis of pancreatic cancer is related to a combination of late detection, as most patients present with locally advanced or metastatic disease, and standards of care that consist of relatively ineffective chemotherapeutic regimens. Gemcitabine is currently approved and the chemotherapeutic agent of choice, for the treatment of patients with pancreatic cancer, with adjuvant chemotherapy now considered the standard of care in many postoperative pancreatic cancer patients treated in Japan.<sup>(22)</sup> Several promising drugs that target the main aspects of malignancy, such as angiogenesis, proliferation and metastasis, have failed to provide clinically relevant benefits, despite trivial improvement in disease-free survival and overall survival rates.<sup>(23)</sup> Therefore, new therapeutic approaches need to be encouraged and investigated.

Immunotherapy is an innovative approach that uses techniques such as vaccination designed to activate the patient's immune system with TAA expressed in pancreatic cancer cells. While several clinical studies have documented evidence of treatment-induced, antigen-specific immune responses, few, if any, protective immune responses have been observed in patients with metastatic disease. Despite this setback, there is renewed optimism for immunotherapy, since vaccination after surgery in patients with no or minimal disease has been reported to have an impact in pancreatic cancer.<sup>(24)</sup> In addition, vaccination against tumor antigens is an attractive approach to adjuvant treatment post-surgery, when tumor-induced immune suppression is minimal.<sup>(25,26)</sup>

### Targeting Whole-Cell Vaccines to APC

The simplest vaccine approach that has been applied to cancer is inoculation of individuals with irradiated tumor cells. This approach has the following advantages: (i) specific tumor antigens do not need to be identified or characterized prior to vaccination; (ii) immune responses to multiple tumor antigens can be generated, which might protect against tumor escape variants;<sup>(27)</sup> (iii) such vaccines are not limited by patient human leukocyte antigen (HLA) background due to cross-presentation of tumor antigens after uptake by dendritic cells (DC),<sup>(27,28)</sup> which is particularly advantageous as tumor cell lines are readily available, while the availability of autologous tumor cells might be limited; and (iv) the tumor cell vaccine platform can be easily modified. For example, tumor cells can be transduced to express immunomodulatory cytokines such as granulocyte macrophage colony-stimulatory factor (GM-CSF), as reported by Jaffee and colleagues in a phase I clinical study.<sup>(29)</sup> They tested a new vaccine in an adjuvant setting in patients with resected pancreatic cancer. Two cell lines of pancreatic cancer were tested, both of which were genetically modified to express the human GM-CSF described above. The tumor cell vaccines were administered to 14 patients who had undergone pancreaticoduodenectomy. Delayed-type hypersensitivity in response to the autologous tumor cells occurred in three patients, who also had disease-free survival of longer than 25 months at the time the study was conducted.<sup>(29)</sup> These pancreatic tumor cell vaccines induce a CD8<sup>+</sup> T-cell response, specific mesothelin, regardless of the HLA match between the tumor vaccine and the recipient, demonstrating the occurrence of cross priming.<sup>(28,29)</sup> Mesothelin, a cell-surface glycoprotein, is a particularly promising cancer vaccine target due to its low level of expression in healthy pancreatic tissue and high levels of expression in pancreatic as well as other cancers (e.g. ovarian).<sup>(30)</sup> A phase II trial of these vaccines is currently being conducted in patients with resectable pancreatic cancer (NCT0038610). Unfortunately, TAA present in tumor cells cannot efficiently induce an antitumor immune response by themselves, because tumor cells lack costimulatory molecules.<sup>(31,32)</sup> Effective induction of an antitumor immune

response by a tumor cell vaccine requires uptake of tumor cells or tumor cell membranes by professional APC, processing of TAA molecules, presentation of TAA antigenic peptide on APC in association with MHC class II molecules for activation of specific CD4<sup>+</sup> helper T cells, and association with MHC class I molecule for activation of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells (CD8<sup>+</sup> CTL) (first signal).<sup>(31,32)</sup> In addition, activation of tumor-specific T cells requires the delivery of a costimulatory non-specific signal (second signal), which can be provided by interaction between costimulatory molecules expressed on the membrane of APC and T cells. Accordingly, T cells require two signals to become fully activated.<sup>(32)</sup> Another reason for the absolute need for effective uptake of tumor cell vaccine by APC is that activation of TAA-specific T cells does not occur at the vaccination site, but rather within the draining lymph nodes of the vaccination site or within the spleen. Only after they are activated can tumor-specific T cells leave the lymph nodes or spleen to seek and destroy tumor cells expressing the TAA. For such activation to occur, the tumor vaccine must be transported from the vaccination site by APC to the lymph nodes or to the spleen.<sup>(33)</sup>

### In Vivo Targeting of Tumor Cell Vaccine to APC by $\alpha$ -Gal Epitopes/Anti-Gal Interaction

As described in the previous sections, TAA molecules on pancreatic cancer cells do not express markers that contain modification of TAA to be recognized by APC. To increase the immunogenicity of TAA against APC, IgG bound to TAA could be a suitable strategy. The APC, including macrophages, skin Langerhans cells and blood-derived DC, all express Fc $\gamma$ R (e.g. Fc $\gamma$  RI/CD64, Fc $\gamma$  RII/CD32, Fc $\gamma$  RIII/CD16). These Fc $\gamma$ R can effectively bind and mediate the internalization of opsonized cells (i.e. cells with bound IgG molecules), cell membranes or molecules (all defined as cancer antigen) via the Fc portion of the opsonizing IgG antibody.<sup>(34,35)</sup> This results in effective enhancement of the immunogenicity of the antigen complexed with an IgG antibody. Thus, vaccination of cancer patients with a tumor cell vaccine, modified to express  $\alpha$ -gal epitopes, should result in *in situ* binding of the patient's anti-Gal IgG molecules to  $\alpha$ -gal epitopes on the vaccinating cell membrane. This targets the vaccines to APC by interaction of the Fc portion of anti-Gal Ab on the vaccinating cell membrane with Fc $\gamma$ R on the APC.<sup>(6,7)</sup> This interaction induces the uptake of the vaccine by APC, which subsequently transport the vaccinating tumor membranes to the draining lymph nodes. Once the TAA-specific T cells are activated, they can leave the lymph node, circulate in the body and seek malignant cells expressing the TAA in order to destroy them. There is an ongoing clinical immunotherapy study, which is being conducted as a clinical phase III study in patients with surgically resected pancreatic cancer (NCT01072981). The purpose of the study is to assess overall survival after treatment with a regimen of adjuvant therapy (Gemcitabine alone or with 5-fluorouracil [5-FU] chemoradiation) with or without experimental immunotherapy using Hyper-Acute Pancreas (Algenpantucel-L), which consists of two separate allogeneic cancer cell lines engineered to express  $\alpha$ -gal epitopes in subjects who have undergone surgical resection. At present, this study is currently recruiting participants until January 2014, the estimated study completion date.

### Immunotherapy with MUC1-Based Vaccine for Pancreatic Cancer

In our previous study, we investigated the effects of vaccination with  $\alpha$ -gal epitope-expressing pancreatic cancer cells and examined the usefulness of this vaccine in the induction of tumor-specific T-cell responses, *in vivo* prevention of tumor

growth and improvement of survival.<sup>(36)</sup> We used a human pancreatic cancer cell line, PANC1, which endogenously expresses Mucin 1 (MUC1) protein in the tumor cell vaccine. MUC1 is the most notable tumor antigen of pancreatic cancer. This molecule is a large membrane glycoprotein that consists of multiple 20 amino acid repeats, which are heavily O-glycosylated. Expression of the glycosylated MUC1 is normally restricted to the apical surface of epithelial ducts. Both the glycosylation pattern and surface expression pattern change dramatically in cancer tissues. Tumor MUC1 is underglycosylated and no longer restricted to a particular surface of the cell as tumor cells lose polarity.<sup>(37,38)</sup> This change in the expression profile of tumor MUC1 leads to increased processing and presentation of the protein backbone to the immune system. Numerous studies reported identical anti-MUC1 immune responses in cancer patients. The eventual goal of MUC1-based immunotherapy is to enhance these immune responses with the hope of facilitating tumor rejection. In addition, a MUC1-based vaccine could be useful prophylactically in high-risk individuals.<sup>(39)</sup> In fact, several clinical trials of MUC1-based vaccines have already been tested.<sup>(2,40)</sup> However, the vaccine has not been as successful as hoped, because MUC1 proteins on pancreatic cancer cells do not express markers that contain modification of MUC1 to be recognized by APC. To increase the immunogenicity of both PANC1 tumor cell vaccine and MUC1 antigen against APC, we modified these cells to express  $\alpha$ -gal epitopes by mouse  $\alpha$ 1,3 GT gene transfection (designated here as  $\alpha$ -gal PANC1) (Fig. 3). This modified tumor cell vaccine takes advantage of anti-Gal Ab found in most people based on exposure to gastrointestinal flora, resulting in an increased uptake of the vaccine in an antibody-dependent manner. Moreover, MUC1 can also be remodeled to

express  $\alpha$ -gal epitopes, because the MUC1 molecule has five potential sites of N-glycans and can bind anti-Gal *in situ* at the vaccination site (Fig. 3). Using mice in our experimental studies, we investigated the effects of  $\alpha$ -gal PANC1 vaccine in eliciting both antibody production (Fig. 4a) and T cell responses (Fig. 4b) against MUC1 antigen. The results showed that  $\alpha$ -gal PANC1 vaccines protected and prolonged the survival of  $\alpha$ 1,3 GT knockout mice harboring tumors of MUC1-B16F10 melanoma cells that had been sensitized by pig kidney fragment (Fig. 5).<sup>(36)</sup>

### $\alpha$ -gal PANC1 Vaccine Elicits an Immune Response Against Pancreatic Cancer Stem Cells

A rare population of cells with stem cell properties called cancer stem cells (CSC) was identified recently.<sup>(41)</sup> The CSC are generally dormant or slowly cycling tumor cells that can reconstitute tumors. Based on this new finding, it is necessary to develop effective therapies for CSC to achieve complete eradication of cancer cells. Apart from reconstituting tumor cells, CSC are also important because they are considered to be involved in resistance to chemotherapy and radiotherapy, tumor relapse and progression. In 2007, Li and colleagues reported that putative pancreatic CSC express CD44, CD24 and epithelial-specific antigen (ESA), which are glycoprotein molecules, and that they can be used as markers to identify CSC.<sup>(42)</sup> Accordingly, we hypothesized that biosynthesis of  $\alpha$ -gal epitopes on the carbohydrate of CSC markers expressed on pancreatic CSC could effectively induce antibody production against these stem cells. In our previous study, sera obtained from  $\alpha$ -gal PANC1-vaccinated KO mice produced anti-CD44<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> PANC1 antibody, but those from parental

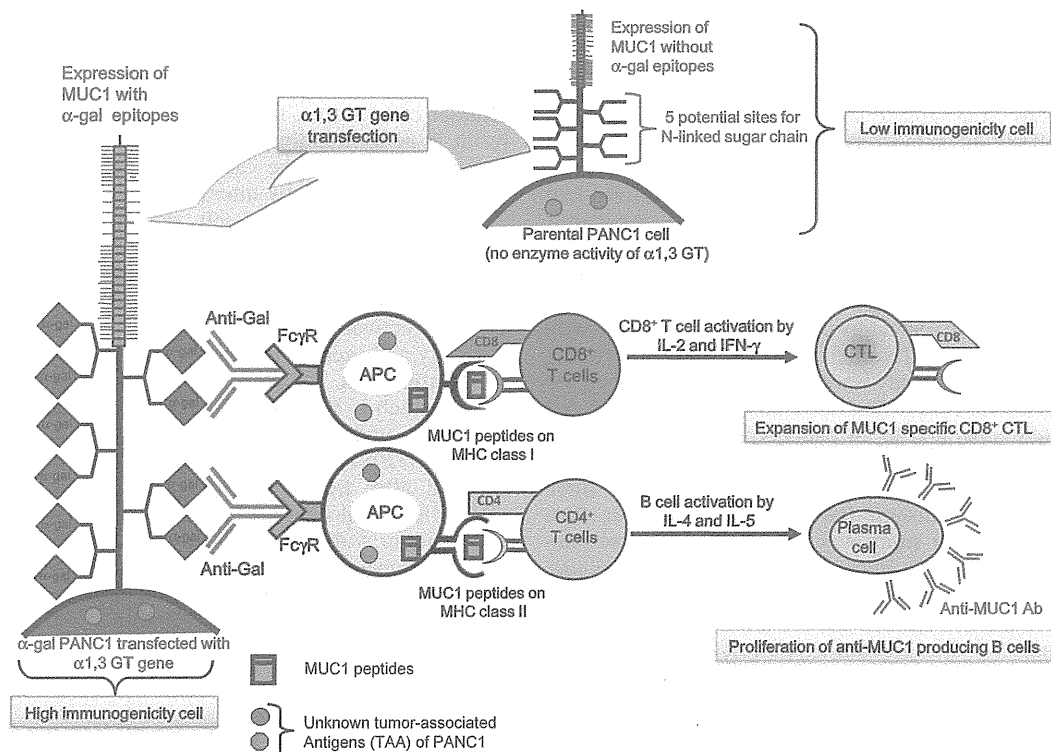
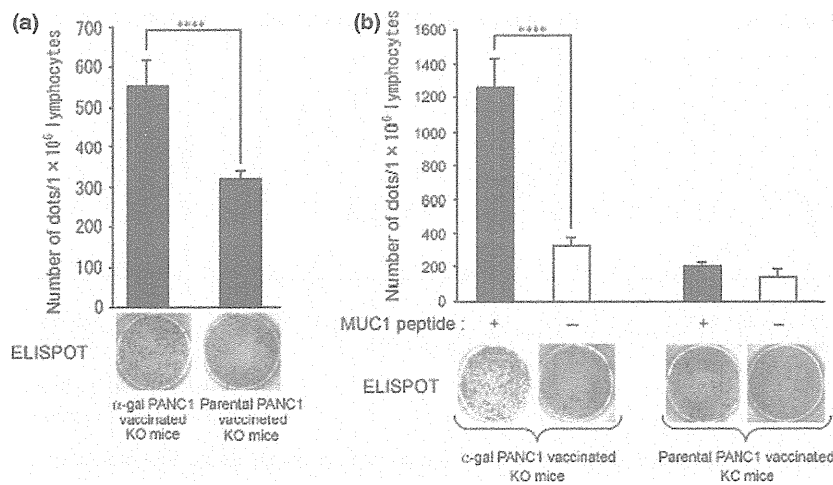
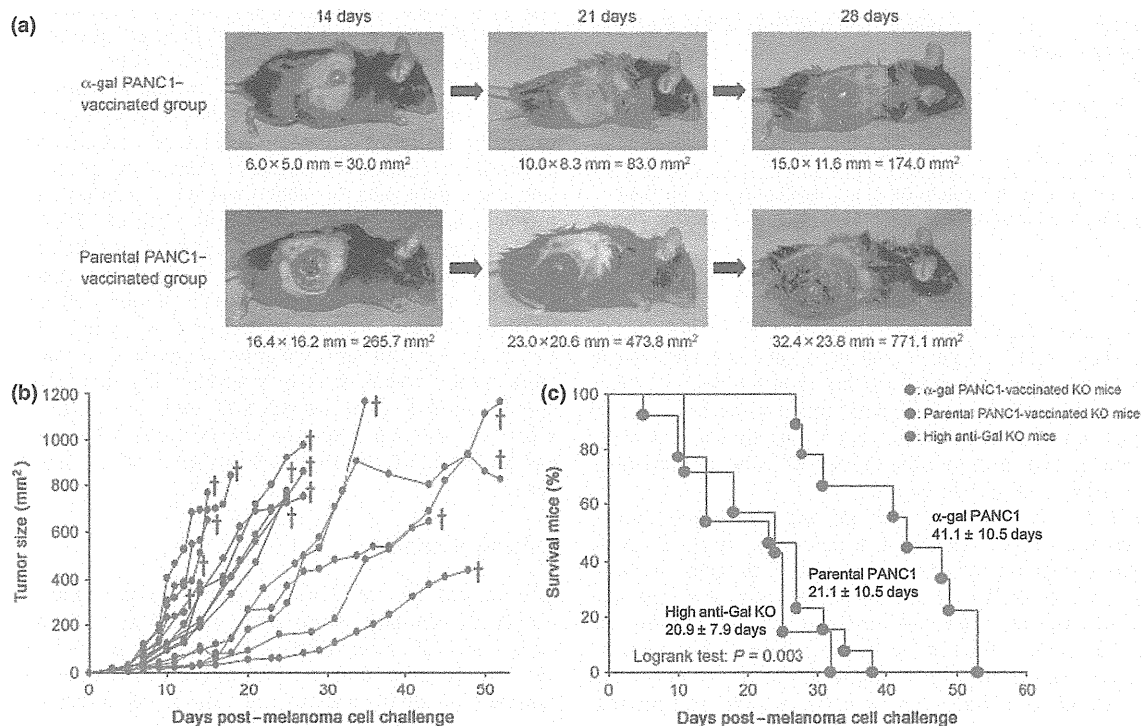


Fig. 3. Increased immunogenicity of tumor-associated antigen (TAA), MUC1, engineered to express  $\alpha$ -gal epitopes. Immunity towards TAA, including MUC1, in cancer patients is relatively weak and presentation of these TAA to the immune system is poor due to low immunogenicity. We tested the effects of vaccination using immunogenetically enhanced MUC1 (by expressing  $\alpha$ -gal epitopes) on production of antibodies for MUC1 as well as other TAA derived from pancreatic cancer cells, and induction of tumor-specific T cell responses.  $\alpha$ 1,3 GT,  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase; APC, antigen-presenting cells; CTL, cytotoxic T lymphocytes; Fc $\gamma$ R, Fc $\gamma$  receptor.



**Fig. 4.** Expansion of B and T cells in response to cell vaccination. (a) ELISPOT assay for anti-MUC1 antibody (Ab)-producing B cells with lymphocytes from  $\alpha$ -gal PANC1-vaccinated knockout (KO) mice and parental PANC1-vaccinated KO mice. Parental PANC1-vaccinated KO mice had  $320 \pm 19$  spots/ $10^6$  splenocytes compared with  $554 \pm 67$  spots/ $10^6$  splenocytes in  $\alpha$ -gal PANC1-vaccinated KO mice. The latter included a significantly higher proportion of anti-MUC1 B cells ( $P < 0.0001$ ). (b) ELISPOT assay for *in vitro* activated T cells detected using interferon- $\gamma$  secretion. In parental PANC1-vaccinated KO mice,  $211 \pm 33.4$  and  $153 \pm 15.2$  spots/ $10^6$  splenocytes were detected in the presence or absence of MUC1 peptide, respectively, and no significant difference in the number of spots was observed. In contrast,  $\alpha$ -gal PANC1-vaccinated KO mice displayed  $1238 \pm 283$  spots/ $10^6$  splenocytes in the presence of MUC1 peptides, but only  $314 \pm 49$  spots/ $10^6$  splenocytes in the absence of MUC1 peptides.



**Fig. 5.** Photographs of growing tumors in vaccinated knockout (KO) mice after tumor cell challenge with MUC1-B16F10 cells and resultant *in vivo* prevention of tumor growth and prolongation of survival. (a) Representative photographs of mice treated with either  $\alpha$ -gal PANC1 or parental PANC1 vaccines. The tumor size in each mouse treated with  $\alpha$ -gal PANC1 vaccine was smaller than that of mice treated with parental PANC1 vaccine. (b) Tumor size of mice vaccinated with parental PANC1 doubled every 3–7 days and reached a maximum size of  $\sim 980$  mm $^2$  within 22–25 days. Tumors of mice treated with  $\alpha$ -gal PANC1 continued to grow in non-vaccinated  $\alpha$ ,3-galactosyltransferase KO mice but displayed a much slower growth rate than most parental PANC1-treated KO mice. (c) The mean survival time of KO mice treated with  $\alpha$ -gal PANC1 was significantly longer ( $41.4 \pm 10.5$  days) than that of KO mice treated with parental PANC1 vaccine ( $21.1 \pm 10.5$  days,  $P = 0.003$ ).

PANC1-vaccinated KO mice were negative for anti-CD44 $^+$  CD24 $^+$  PANC1 antibody (Fig. 6). These findings suggest that the build-up of  $\alpha$ -gal epitopes on the carbohydrate of CSC markers, thus allowing those molecules to be internalized by APC, is a potentially useful strategy to eliminate cancer cells,

including differentiated cancer cells and pancreatic CSC, and might open a window of opportunity for cure of pancreatic cancer by the destruction of micro-metastasis and minimal residual disease. Various CSC markers, including CD44, CD24, ESA and CD133, were used previously to identify CSC



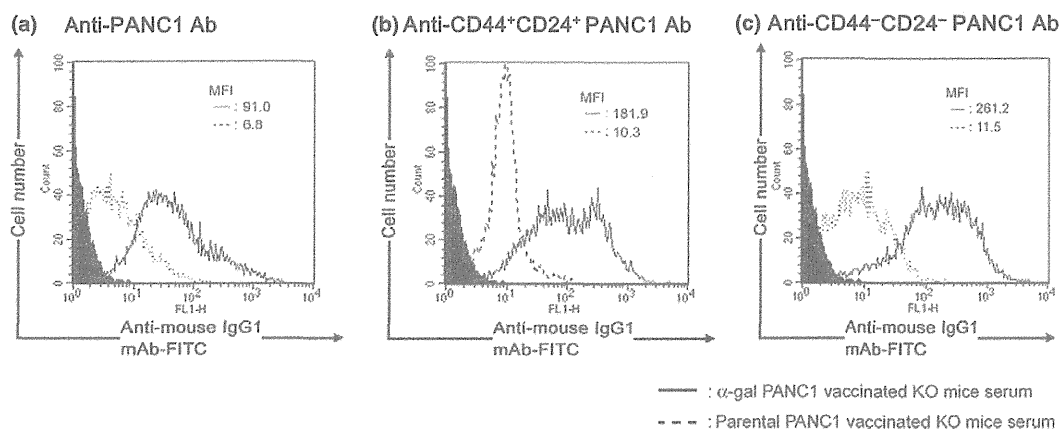


Fig. 6. Production of antibodies against cancer stem cells assessed using flow cytometry assay. (a) Production of anti-PANC1 antibody (Ab) in sera of vaccinated knockout (KO) mice. (b) Production of anti-CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> PANC1 (i.e. pancreatic cancer stem cells) Ab in sera of vaccinated KO mice. (c) Production of anti-CD44<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup> PANC1 (i.e. differentiated pancreatic cancer cells) Ab in sera of vaccinated KO mice. (a-c) Closed histogram, unstained cells; open histogram, stained cells with sera from vaccinated KO mice.

Table 1. Markers of cancer stem cells (CSC) in various cancers

Cancer	CSC marker
Pancreatic cancer	CD44, CD24, ESA, CD133
Gastric cancer	CD44, CD133
Colorectal cancer	CD44, CD133, CD166, CD326 (EpCAM)
Hepatocellular carcinoma	CD90
Glioblastoma	CD133
Head and neck cancer	CD44
Ovarian cancer	CD133
Malignant mesothelioma	CD24, CD26

All stem cell markers described in Table 1 are glycoproteins. EpCAM, epithelial cell-specific adhesion molecule; ESA, epithelial-specific antigen.

in pancreatic cancer and other type of cancers.<sup>(43–45)</sup> As shown in Table 1, these CSC markers are glycoproteins and  $\alpha$ -gal epitopes could be biosynthesized on the carbohydrate of these CSC markers. Therefore, our novel immunotherapy, using  $\alpha$ -gal epitopes/anti-Gal interaction, can be applied to not only pancreatic cancer but also to other types of cancer, including colorectal, ovarian and gastric cancer.

Although MUC1 protein is a potential target in immunotherapy for pancreatic cancer, vaccination against a single TAA is disadvantageous because it is not clear which antigens, including MUC1, can potentially induce effective antitumor immune responses. Furthermore, immunity against various antigens is expected to be more effective in heterogeneous cell populations of cancers compared with a single antigen. In our study, we used a vaccine of whole cancer cells, which upregulated the immunogenicity of well characterized as well as uncharacterized multiple TAA contained in cancer cells by biosynthesis

of  $\alpha$ -gal epitopes on the carbohydrate of TAA. As shown in Table 2, several TAA of pancreatic cancer, including MUC1 and mesothelin are glycoproteins and thus the use of a vaccine of whole cancer cells could effectively induce APC to internalize these TAA. Multiple TAA can be presented to T cells by both MHC class I and class II pathways, ultimately leading to polyclonal expansion of both B and T cells.

To further develop effective immunotherapy of pancreatic cancer, we proposed the use of tumor cell lysate as the source of tumor antigens, because such lysate contains several known as well as unknown antigens that can elicit an antitumor immune response. In other words, vaccines prepared from tumor cell lysates can provide both multiple TAA of differentiated cancer cells and stem cell markers of CSC. However, it is noteworthy that induction of the immune response against CSC by standard vaccination with tumor cell lysate is often difficult, because the proportion of CSC is only 1% of all cancer cells. Accordingly, we plan to generate a vaccine prepared from tumor lysate that is enzymatically engineered to express  $\alpha$ -gal epitopes. It is hoped that such a vaccine can elicit an effective immune response toward both TAA and CSC markers to eliminate the replenishing pool of all pancreatic cancer cells.

## Closing Remarks

The reason for the lethal nature of pancreatic cancer is the ability of remnant tumor cells, including differentiated cancer cells and CSC after surgery, chemotherapy and radiation therapy, to develop into a recurrent or metastatic tumor. These remnant residual cancer cells cannot be detected by imaging, but their destruction might be achieved by activation of immunocytes that can specifically attack and destroy TAA-

Table 2. Overview of candidate pancreatic cancer-associated antigens for immune targeting

Antigen	Location	Molecular type	Expression in tumor	Prevalence (%)
Mesothelin	Cell surface (GPI linked)	Glycoprotein	Overexpressed	90–100
CEA	Cell surface (GPI linked)	Oncofetal protein	Overexpressed	30–100
Her2-neu	Transmembrane	Oncoprotein	Overexpressed	>50
K-Ras	Intracellular	Oncoprotein	Mutated self	90
MUC1	Transmembrane	Glycoprotein	Overexpressed hypoglycosylation	90
p53	Intracellular	Tumor-suppressor protein	Mutated self	50–70

CEA, carcinoembryonic antigen; GPI, glycosylphosphatidylinositol; Her2-neu, human epidermal growth factor receptor 2; K-Ras, v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog.

expressing tumor cells. Microarray technology and serial analysis of gene expression have identified new targets for vaccine development. However, advances in biotechnology are also needed for vaccine administration and for eliciting the most effective immune response. The most encouraging results of immunotherapy in pancreatic cancer have been seen in adjuvant settings, such as post-surgery. Moreover, immunotherapy studies on specific TAA have identified the inefficiency of mono-TAA-based immunization in eliciting a clinically protective immune response. Due to genome instability, the immunological selection pressure for the destruction of TAA-expressing tumor cells frequently results in the appearance and expansion of tumor cell subclones with no or low expression of the specific TAA.<sup>(46-48)</sup> Therefore, any vaccine used for patients with pancreatic cancer should contain multiple TAA, that is, a polyvalent tumor vaccine, prepared from autologous tumors. Recent publications have demonstrated the presence of multiple mutations in pancreatic cancer that can be targeted, that many of these mutations are already present in primary pancreatic cancers and that vaccination after resection of the primary tumor might protect against recurrence.<sup>(49,50)</sup> These findings suggest that personalized vaccines tailored toward the

mutations found in individual patients might be necessary for successful immunotherapy.<sup>(51)</sup> Exploiting anti-Gal as an antibody targeting vaccine for APC can overcome the inefficient autologous tumor vaccine uptake by APC, provided that the vaccine expresses  $\alpha$ -gal epitopes.

To establish this novel immunotherapy as the next generation therapeutic option in pancreatic cancer, clinical studies involving the application of immunotherapy using tumor lysate, remodeled to express  $\alpha$ -gal epitopes, should be conducted.

### Acknowledgments

The authors thank Dr Issa for the careful reading and editing of the manuscript. This work was supported by a grant from the Ministry of Education, Sports and Culture of Japan to M.T. (no. 22591520), and by Kobayashi Foundation for Cancer Research to M.T.

### Disclosure Statement

The authors have no conflict of interest and the present study does not include discussion of off-label or investigational use.

### References

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2011; **61**: 133-4.
- Lepisto AJ, Moser AJ, Zeh H *et al*. A phase I/II study of a MUC1 peptide pulsed autologous dendritic cell vaccine as adjuvant therapy in patients with resected pancreatic and biliary tumors. *Cancer Ther* 2008; **6**: 955-64.
- Galili U. The alpha-gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* 2005; **83**: 674-86.
- Macher BA, Galili U. The Galalpha1, 3Galbeta1, 4GlcNAc-R (alpha-Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1780**: 75-88.
- Galili U, Wigglesworth K, Abdel-Motal UM. Intratumoral injection of alpha-gal glycolipids induces xenograft-like destruction and conversion of lesions into endogenous vaccines. *J Immunol* 2007; **178**: 4676-87.
- Galili U, Wigglesworth K, Galili U. Intratumoral injection of alpha-gal glycolipids induces a protective anti-tumor T cell response which overcomes Treg activity. *Cancer Immunol Immunother* 2009; **58**: 1545-56.
- Abdel-Motal UM, Wigglesworth K, Galili U. Mechanism for increased immunogenicity of vaccines that form *in vivo* immune complexes with the natural anti-Gal antibody. *Vaccine* 2009; **27**: 3072-82.
- Rossi GR, Mautino MR, Unfer RC *et al*. Effective treatment of preexisting melanoma with whole cell vaccines expressing alpha (1, 3)-galactosyl epitopes. *Cancer Res* 2005; **65**: 10555-61.
- Rossi GR, Unfer RC, Seregina T, Link CJ. Complete protection against melanoma in absence of autoimmune depigmentation after rejection of melanoma cells expressing alpha (1, 3) galactosyl epitopes. *Cancer Immunol Immunother* 2005; **54**: 999-1009.
- Eto T, Ichikawa Y, Nishimura K, Ando S, Yamakawa T. Chemistry of lipid of the posthemolytic residue or stroma of erythrocytes. XVI. Occurrence of ceramide pentasaccharide in the membrane of erythrocytes and reticulocytes of rabbit. *J Biochem* 1968; **64**: 205-13.
- Stellner K, Saito H, Hakomori SI. Determination of aminosugar linkages in glycolipids by methylation. Aminosugar linkages of ceramide pentasaccharides of rabbit erythrocytes and of Forssman antigen. *Arch Biochem Biophys* 1973; **155**: 464-72.
- Wood C, Kabat EA, Murphy LA, Goldstein IJ. Immunochemical studies of the combining sites of the two isolectins, A4 and B4, isolated from *Bandeiraea simplicifolia*. *Arch Biochem Biophys* 1979; **198**: 1-11.
- Joziassse DH, Shaper JH, Jabs EW, Shaper NL. Characterization of an alpha 1-3-galactosyltransferase homologue on human chromosome 12 that is organized as a processed pseudogene. *J Biol Chem* 1991; **266**: 6991-8.
- Lantéri M, Giordanengo V, Vidal F, Gaudray P, Lefebvre JC. A complete alpha1, 3-galactosyltransferase gene is present in the human genome and partially transcribed. *Glycobiology* 2002; **12**: 785-92.
- Tisato V, Cozzi E. Xenotransplantation: an overview of the field. *Methods Mol Biol* 2012; **885**: 1-16.
- Ekser B, Ezzelarab M, Hara H *et al*. Clinical xenotransplantation: the next medical revolution? *Lancet* 2012; **379**: 672-83.

- Sandrin MS, Fodor WL, Mouhtouris E *et al*. Enzymatic remodelling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity. *Nat Med* 1995; **1**: 1261-7.
- Tanemura M, Miyagawa S, Koyota S *et al*. Reduction of the major swine xenoantigen, the alpha-galactosyl epitope by transfection of the alpha2, 3-sialyltransferase gene. *J Biol Chem* 1998; **273**: 16421-5.
- Cress RD, Yin D, Clarke L, Bold R, Holly EA. Survival among patients with adenocarcinoma of the pancreas: a population-based study (United States). *Cancer Causes Control* 2006; **17**: 403-9.
- Garcea G, Dennison AR, Pattenden CJ *et al*. Survival following curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. A systematic review of the literature. *JOP* 2008; **9**: 99-132.
- Roy R, Maraveyas A. Chemoradiation in pancreatic adenocarcinoma: a literature review. *Oncologist* 2010; **15**: 259-69.
- Kosuge T, Sakamoto Y, Ueno H. Postoperative adjuvant therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011; **18**: 792-96.
- Mackenzie RP, McCollum AD. Novel agents for the treatment of adenocarcinoma of the pancreas. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; **9**: 1473-85.
- Wedén S, Klemp M, Gladhaug IP *et al*. Long-term follow-up of patients with resected pancreatic cancer following vaccination against mutant K-ras. *Int J Cancer* 2011; **128**: 1120-8.
- Shakhar G, Ben-Eliyahu S. Potential prophylactic measures against postoperative immunosuppression: could they reduce recurrence rates in oncological patients? *Ann Surg Oncol* 2003; **10**: 972-92.
- Weighardt H, Heidecke CD, Emmanuilidis K *et al*. Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production. *Surgery* 2000; **127**: 309-15.
- Saito H, Dubsy P, Dantin C *et al*. Cross-priming of cyclin B1, MUC-1 and survivin-specific CD8+ T cells by dendritic cells loaded with killed allogeneic breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2006; **8**: R65.
- Thomas AM, Santarsiero LM, Lutz ER *et al*. Mesothelin-specific CD8 (+) T cell responses provide evidence of *in vivo* cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients. *J Exp Med* 2004; **200**: 297-306.
- Jaffee EM, Hruban RH, Biedrzycki B *et al*. Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 145-56.
- Hassan R, Ho M. Mesothelin targeted cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 2008; **44**: 46-53.
- Bour-Jordan H, Bluestone JA. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol Rev* 2009; **229**: 41-66.
- Ermann J, Fathman CG. Costimulatory signals controlling regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 15292-3.
- Bear AS, Cruz CR, Foster AE. T cells as vehicles for cancer vaccination. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011**: 417403.

- 34 Hogarth PM, Pietersz GA. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2012; **11**: 311–31.
- 35 Kohrt HE, Houot R, Marabelle A *et al.* Combination strategies to enhance antitumor ADCC. *Immunotherapy* 2012; **4**: 511–27.
- 36 Deguchi T, Tanemura M, Miyoshi E *et al.* Increased immunogenicity of tumor-associated antigen, mucin 1, engineered to express alpha-gal epitopes: a novel approach to immunotherapy in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2010; **70**: 5259–69.
- 37 Gendler SJ. MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; **6**: 339–53.
- 38 Schuman JT, Grinstead JS, Apostolopoulos V, Campbell AP. Structural and dynamic consequences of increasing repeats in a MUC1 peptide tumor antigen. *Biopolymers* 2005; **77**: 107–20.
- 39 Finn OJ. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 630–41.
- 40 Loveland BE, Zhao A, White S *et al.* Mannan-MUC1-pulsed dendritic cell immunotherapy: a phase I trial in patients with adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 869–77.
- 41 Wang Z, Li Y, Ahmad A *et al.* Pancreatic cancer: understanding and overcoming chemoresistance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; **8**: 27–33.
- 42 Li C, Heidt DG, Dalerba P *et al.* Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007; **67**: 1030–7.
- 43 MacKenzie MJ. Molecular therapy in pancreatic adenocarcinoma. *Lancet Oncol* 2004; **5**: 541–9.
- 44 Kawakami Y, Fujita T, Matsuzaki Y *et al.* Identification of human tumor antigens and its implications for diagnosis and treatment of cancer. *Cancer Sci* 2004; **95**: 784–91.
- 45 Lee CJ, Dosch J, Simeone DM. Pancreatic cancer stem cells. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 2806–12.
- 46 Livingston P. The unfulfilled promise of melanoma vaccines. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 1837–8.
- 47 Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol* 2002; **3**: 999–1005.
- 48 Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H *et al.* Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; **3**: 991–8.
- 49 Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ *et al.* The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* 2010; **467**: 1109–13.
- 50 Yachida S, Jones S, Bozic I *et al.* Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 2010; **467**: 1114–7.
- 51 Segal NH, Parsons DW, Peggs KS *et al.* Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; **68**: 889–92.

## 特集II 肝疾患と幹細胞をめぐる進歩

# 糖鎖を用いた肝癌幹細胞の 単離とその生物学的特性\*

寺尾尚子\*\*  
奥戸久美子\*\*  
森脇健太\*\*  
三善英知\*\*

**Key Words :** oligosaccharide, hepatoma, cancer stem cells, lectin, sialic acid

### はじめに

癌幹細胞(cancer stem cells)は、癌組織にわずかに存在する特殊な細胞で、発癌の早期から存在し、癌の悪性化や抗癌薬や放射線治療の再発の原因になるといわれている<sup>1)</sup>。しかし、癌幹細胞の実態はいまだ明らかでなく、その定義そのものが研究者によって異なるため、癌研究の最先端でありながら、きわめてあいまいなニュアンスを含む研究領域とも考えられる。以前から、癌幹細胞の表面マーカーとしてCD133が注目されてきたが<sup>2)</sup>、近年、CD133のみでは、癌幹細胞の単離は困難であることがわかってきた。すなわち、CD133と他のマーカーを組み合わせることで、より効率的に癌幹細胞を分別しようという試みである<sup>3)</sup>。

糖鎖はタンパク質の翻訳後修飾を担う重要な生体分子の一つで、近年糖鎖の持つ生物学的機能の解析が急速に進んだ<sup>4)</sup>。糖鎖の構造は、細胞の分化、増殖、癌化ならびに癌の転移によって大きく変化するため、“細胞の顔”とも呼ばれる。特定の糖鎖構造に対する抗体は、腫瘍マーカーとして今日の臨床医療の場で用いられている。糖鎖構造の解析法としては、タンパク質から化

学的または酵素的に遊離した糖鎖を蛍光標識した後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)やマススペクトロメトリー(MS)で解析する方法が主流である。しかし、これらの方法は正確な糖鎖構造を決定できるが、糖タンパク質に結合した立体的な糖鎖構造の解析、すなわち機能的な糖鎖構造解析が十分とはいえない。これに対して、レクチンは特定の糖鎖構造を認識し、生体内でさまざまな形で糖鎖機能を調節している。細胞もしくはタンパク質の糖鎖構造を網羅的に解析する手法としてレクチンマイクロアレイが開発された<sup>5)</sup>。この手法を用いることで、ある細胞に特徴的な糖鎖構造のパターンをきわめて短時間に知ることができる。最近われわれは、レクチンマイクロアレイを用いて肝癌幹細胞に特徴的な糖鎖構造を決定し、レクチンを用いた肝癌幹細胞の単離に成功した。さらに、この細胞の生物学的特徴を知るとともに、糖鎖を標的にした癌幹細胞に対する糖鎖治療の可能性について検討したので紹介する。

### 肝癌細胞Huh7の

#### 癌幹細胞に特異的な糖鎖構造の決定

2010年のJournal of Clinical Investigationに、Haraguchi, Moriらは肝癌の癌幹細胞の表面マーカーとして、CD133に加えてCD13を報告した<sup>6)</sup>。CD133の生物学的機能に関しては、現在さまざま

\* Characterization of liver cancer stem cells isolated with glycomics technology.

\*\* Naoko TERAO, D.C., Kumiko OKUDO, M.S., Kenta MORIWAKI, Ph.D. & Eiji MIYOSHI, M.D., Ph.D.: 大阪大学大学院医学系研究科機能診断科学[〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-7]; Departments of Molecular Biochemistry and Clinical Investigation, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka 565-0871, JAPAN

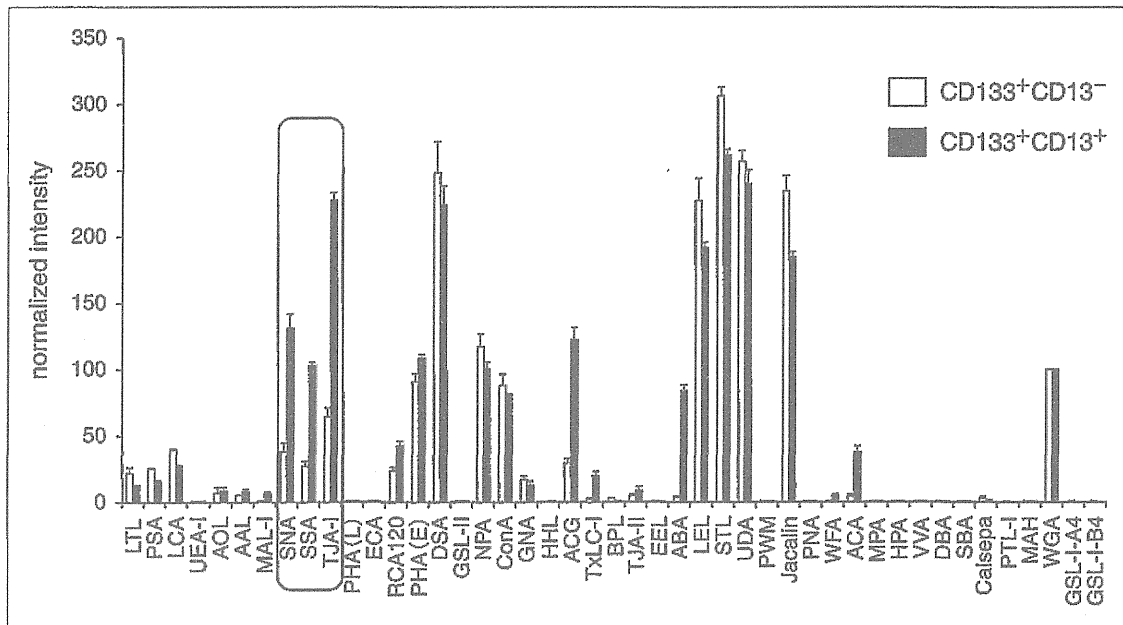


図1 レクチンアレイによる肝癌幹細胞の糖鎖構造解析

■がCD133+CD13+細胞，□がCD133+CD13-細胞を示す。データはWGAのシグナルのdensityで補正した。45種類のレクチンの中で，シアル酸を認識するSNA, SSA, TJA-Iに対する親和性がCD133+CD13+細胞で著明に増加していることがわかった。

まな解析が進められているが一定の見解は得られていない。これに対して，CD13は細胞内のラジカル除去に関与する機能が知られている<sup>7)</sup>。われわれは，フローサイトメトリーを用いて，肝癌細胞Huh7細胞から4つの分画，すなわちCD133+CD13+，CD133-CD13+，CD133+CD13-，CD133-CD13-を分離し，それぞれの細胞群の糖鎖構造をレクチンマイクロアレイで解析した<sup>8)</sup>。4群間の中で最も重要と考えられるCD133+CD13+細胞とCD133+CD13-細胞の結果を示す(図1)。DNAアレイの場合RT-PCRで確認するように，本来ならレクチンによるウエスタンブロットなどでシアル酸増加を確認し，どのようなタンパクでシアル酸が増加しているのか検討すべきであるが，CD133+CD13+細胞の数が少ないので，レクチンアレイの解析結果にとどめた。Haraguchiらが行ったDNAアレイの解析でもシアル酸転移酵素の発現上昇を認めたことから，このレクチンアレイの結果は一致しているものと考えられる(data not shown)。次に，シアル酸陽性の細胞とCD133+CD13+細胞の関係をFluorescence Activated Cell Sorting(FACS)で検討した(図2)。青色ドットで示す細胞がCD133，CD13強発現細胞と考えられるが，これらはすべてSSAに対して強い結合性を

有することが確認できた。

### SSAレクチンを用いた， 肝癌の幹細胞の分離

CD133+CD13+細胞には，すでに強い癌幹細胞としての活性があることが知られている。そこで，われわれは，CD133+CD13-細胞群の中からSSA陽性群と陰性群を分離し，癌幹細胞としての生物学的機能に関して解析した。まず，CD13強陽性細胞(図3-左のピンク色の細胞)を除去し，残りの細胞をCD133とSSAを指標にFACSで展開した(図3)。図で示す青色をCD133+SSA-細胞，緑色で示す部分をCD133+SSA+細胞として回収した。次に回収した細胞を，それぞれ100個，500個，1,000個，5,000個ずつマトリジェルとともに重症免疫不全マウス(NOD/SCIDマウス)の背部に移植した。そして移植後，1か月後の腫瘍形成能を観察した。CD133+SSA+細胞では，CD133+SSA-細胞に比べ，より大きな腫瘍を形成するとともに，少ない細胞を移植した場合にも腫瘍形成を認めた。その結果を表1にまとめる。

次に，もう一つの癌幹細胞の特徴としての足場非依存性細胞増殖活性，すなわちspheroid形成能に関して検討した。CD133+SSA+細胞とCD133+



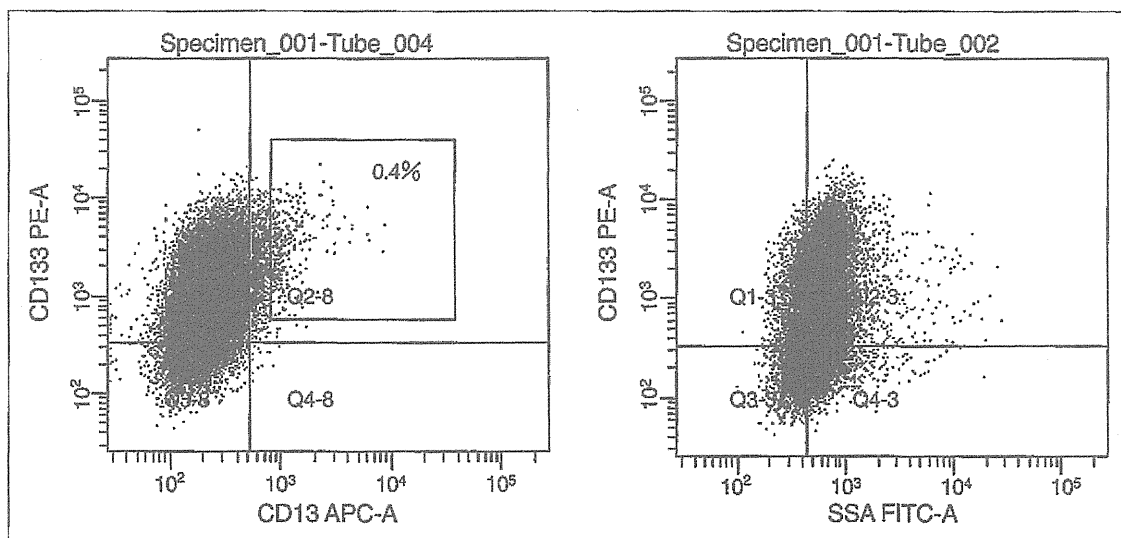


図2 CD133<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>Huh7細胞のSSAとの結合性についての検討  
Huh7細胞をCD133, CD13で染色し, 両者が陽性の細胞とSSAレクチンとの染色性の関係をFACSにて検討した. 詳細は, 文献<sup>8)</sup>に示す.

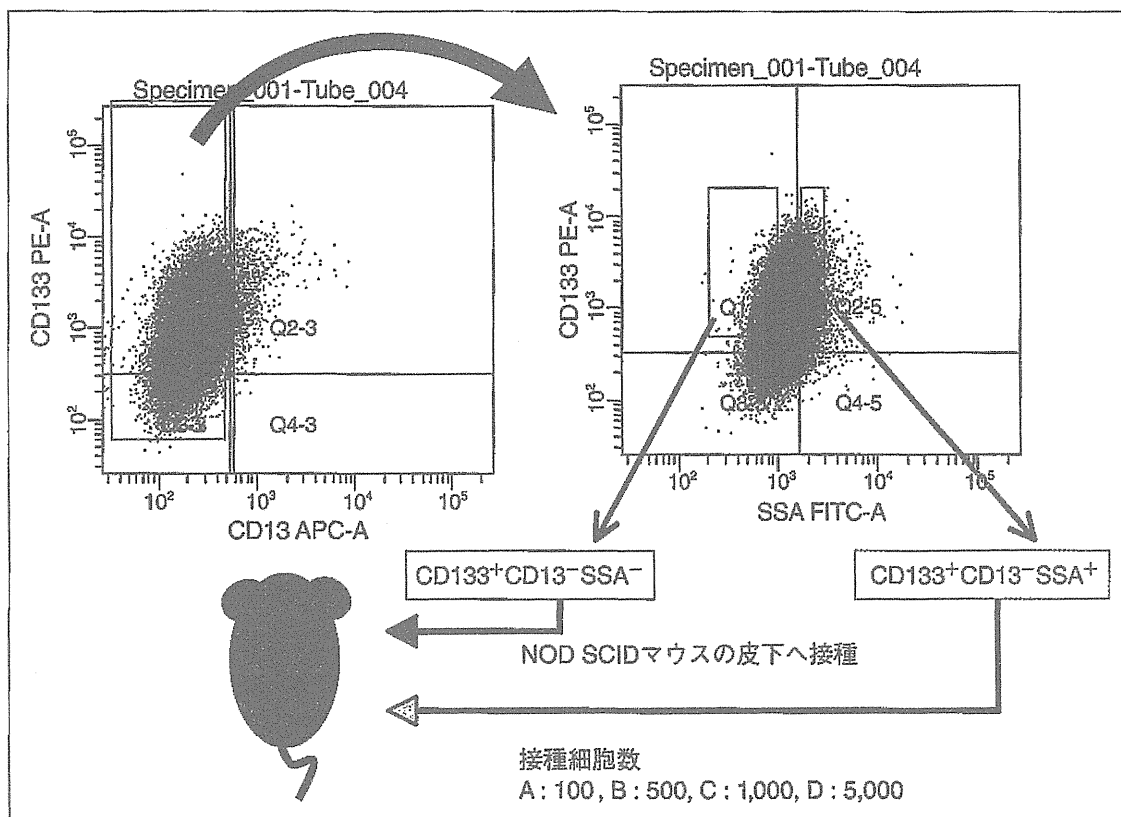


図3 CD133とSSAで分離した癌幹細胞を免疫不全マウスに移植  
あらかじめCD133強陽性の細胞を除き, CD133<sup>+</sup>SSA<sup>-</sup>とCD133<sup>+</sup>SSA<sup>+</sup>の細胞をFACSで分離して, 免疫不全マウスの背部に図に示す数の細胞を移植し, 1月後の腫瘍形成を肉眼的に観察した.  
(文献<sup>9)</sup>より引用改変)

SSA<sup>-</sup>細胞を血清free, EGF, FGF, B27 NeuroMixを含むHam F12培養液中で10日間培養し, spheroid形成を顕微鏡下で観察した(図4). 図4-左に

示すように, CD133<sup>+</sup>SSA<sup>+</sup>細胞ではCD133<sup>+</sup>SSA<sup>-</sup>細胞に比べて形成されるspheroidのサイズが大き. いくつかの視野で写真を撮影し, 全視野の

表 1 CD133<sup>+</sup>CD13<sup>-</sup>のHuh7細胞をSSAの陽性/陰性で分離し, 免疫不全マウスに皮下注射したときの1か月後の腫瘍ができたマウスの匹数(腫瘍ができたマウスの数/腫瘍を移植したマウスの数)

	1×10 <sup>2</sup> cells	5×10 <sup>2</sup> cells	1×10 <sup>3</sup> cells	5×10 <sup>3</sup> cells
CD133 <sup>+</sup> CD13 <sup>-</sup> SSA <sup>-</sup>	1/8	1/8	2/8	2/8
CD133 <sup>+</sup> CD13 <sup>-</sup> SSA <sup>+</sup>	4/8	6/8	8/8	8/8

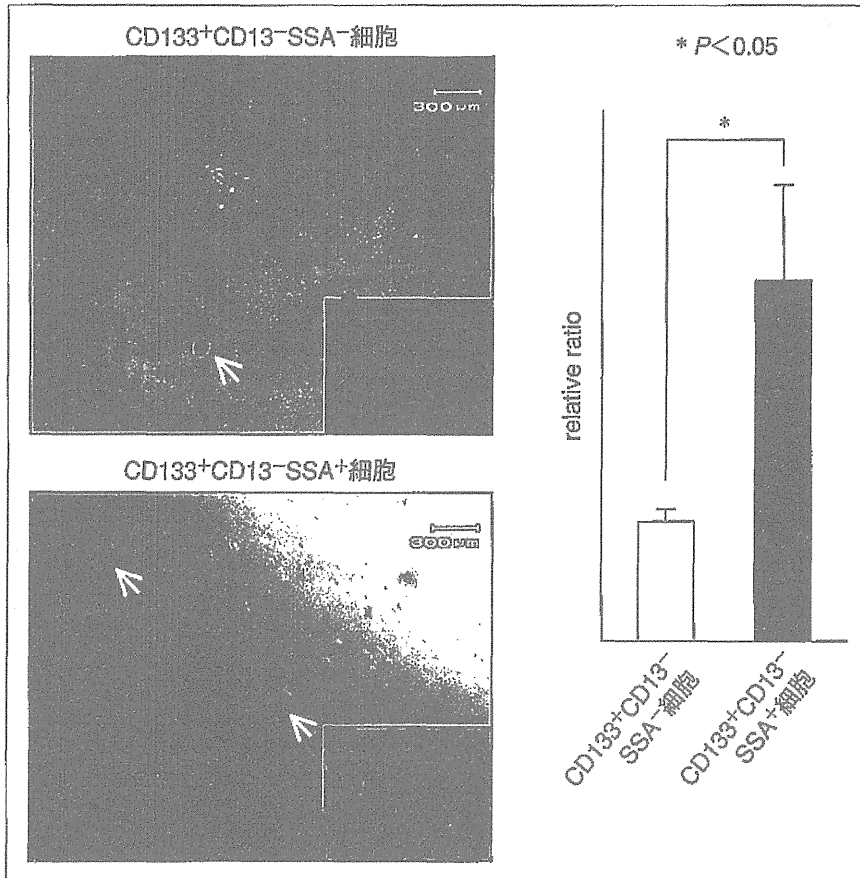


図 4 Spheroid assayによる検討

図 3 で分離した細胞を既報の条件で培養し, 癌幹細胞の特徴の1つであるspheroid形成能を観察した. ランダムに選んだ1視野に存在するspheroidの数を計算したのが, 右図である. (文献<sup>9)</sup>より引用改変)

面積に対するspheroidの面積の比を計算し, グラフ化した(図4-右). すると■で示すCD133<sup>+</sup>SSA<sup>+</sup>細胞では, CD133<sup>+</sup>SSA<sup>-</sup>細胞(□)に比べて約3倍のspheroid形成能があることがわかった.

最後に, CD133<sup>+</sup>SSA<sup>+</sup>細胞とCD133<sup>+</sup>SSA<sup>-</sup>細胞の抗癌薬に対する抵抗性に関してWST assayを用いて検討した(図5). 通常の培養条件下では, 両者の増殖速度にほとんど差は認めない. 抗癌薬の一つである5-FUの処理で, 中等度の5-FU濃度ではCD133<sup>+</sup>SSA<sup>+</sup>細胞は, CD133<sup>+</sup>SSA<sup>-</sup>細胞に比べて薬剤耐性を示した.

### 肝癌の幹細胞におけるシアル酸増加の遺伝子的解析

これまでの検討で, 肝癌細胞Huh7では, 癌幹細胞の糖鎖マーカーとしてSSAレクチンが有用であることを証明した. 強い癌幹細胞活性を持つCD13細胞を除いた群でもCD133, SSA陽性細胞は癌幹細胞としての形質を持つので, SSAはより広い網でHuh7の癌幹細胞をトラップしているものと考えられる. 次に, 肝癌の幹細胞におけるシアル酸増加の普遍性を証明するため, Hep3B細胞を用いて同様の検討を行った. その結果,

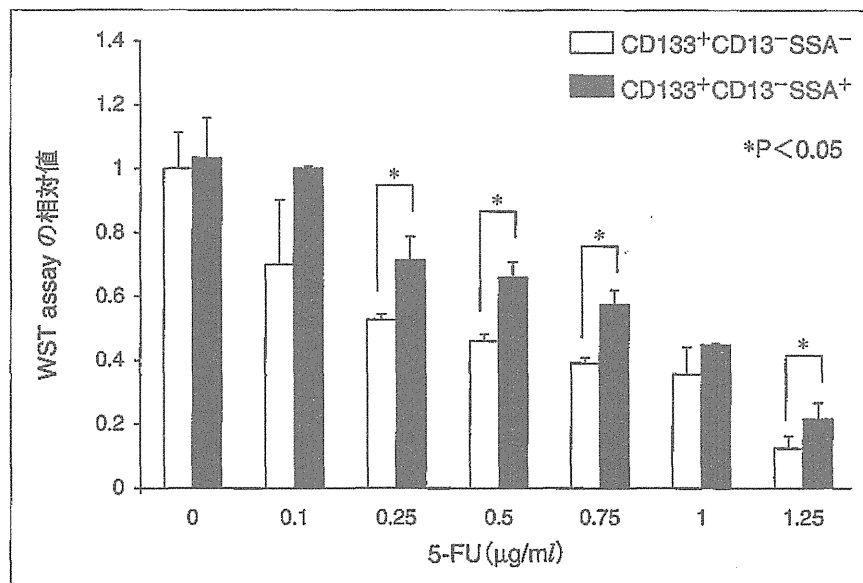


図5 SSAで分離した癌幹細胞の抗癌薬耐性についての検討  
 図3で分離した2群の細胞に対して5-FU処理を行ったところ、SSA陽性細胞では有意な抗癌薬耐性を示した。  
 (文献<sup>9)</sup>より引用改変)

Huh7細胞のときと同様に、Hep3B細胞でもCD133<sup>+</sup>CD13<sup>+</sup>細胞ではシアル酸を認識するSNA, SSA, TJA-Iに対する結合性が増加していることがわかった(data not shown). 次に、なぜ癌幹細胞でシアル酸が増加するのかというメカニズムを知るため、産総研の澤木、成松らが開発した糖鎖遺伝子の一括real-time PCRのシステムを使って解析した。その結果、CD133<sup>+</sup>CD13<sup>+</sup>細胞が、CD133<sup>+</sup>CD13<sup>-</sup>細胞に比べて発現レベルに差があった糖転移酵素としては、8つの糖鎖遺伝子が同定された(図6-A)。その中でシアル酸の増加にかかわる糖転移酵素としては、ST6GALNAC1, GCNT3があげられる。また図には示さないがMGAT5の発現上昇もみられた。最初のシアル酸転移酵素はO型糖鎖のシアリル化に関与するもので、後者の2つは直接シアル酸を増やすのではなく、N型O型糖鎖の枝分かれ構造を決定する糖転移酵素であった。このことは、従来からシアル酸の増加は、癌の悪性化に関与するといわれてきたが、その制御機構としてはシアル酸転移酵素の発現上昇だけでなく、糖鎖の枝分かれ構造の増加が重要であることを示唆する。また、MGAT5は、古くから癌の転移、発癌にかかわる糖転移酵素として注目されてきたので<sup>9)</sup>、今回の結果は非常に興味深いと思われる。また、CD13の影響を除いた状態で、SSAとの結合性の

有無でもST6GALNAC1とGCNT3の2つの糖転移酵素に差がみられた(図6-B)。したがって、実際にはN型糖鎖だけでなく、O型糖鎖のシアル酸付加が肝癌の幹細胞化に関与しているのかもしれない。

### BNC (bio-nano capsule) を用いた 癌幹細胞への*in vitro*ターゲティング

BNCは名古屋大学の黒田教授によって開発された、特定の細胞をターゲットに、遺伝子やsmall molecule(薬剤を含む)を導入できるシステムである<sup>10)</sup>。HBs抗原のN末端のPre-S1領域がヒトの肝臓に特異的なレセプターとなり、この部分をさまざまな生体認識分子(抗体、レクチン、レセプター)に置き換えることで肝臓以外の細胞や組織を標的とすることが可能である。このBNCを用いた薬物伝達システム(DDS)の例として、HBs抗原のPre-S1領域のN末端部分にL<sub>6</sub>-PHAレクチンを提示したBNCは、L<sub>6</sub>-PHAに認識される糖鎖(β1-6GlcNAc)を高発現する悪性腫瘍に取り込まれやすいこと<sup>11)</sup>、また、抗EGFR抗体を提示したBNCはEGFRv IIIを発現している脳腫瘍に取り込まれやすいということが報告されている。そこで本研究では癌幹細胞をターゲットにしたDDSを構築するため、そのキャリアーであるBNCを用いて、肝癌細胞Huh7の癌幹細胞分画(CD133<sup>+</sup>

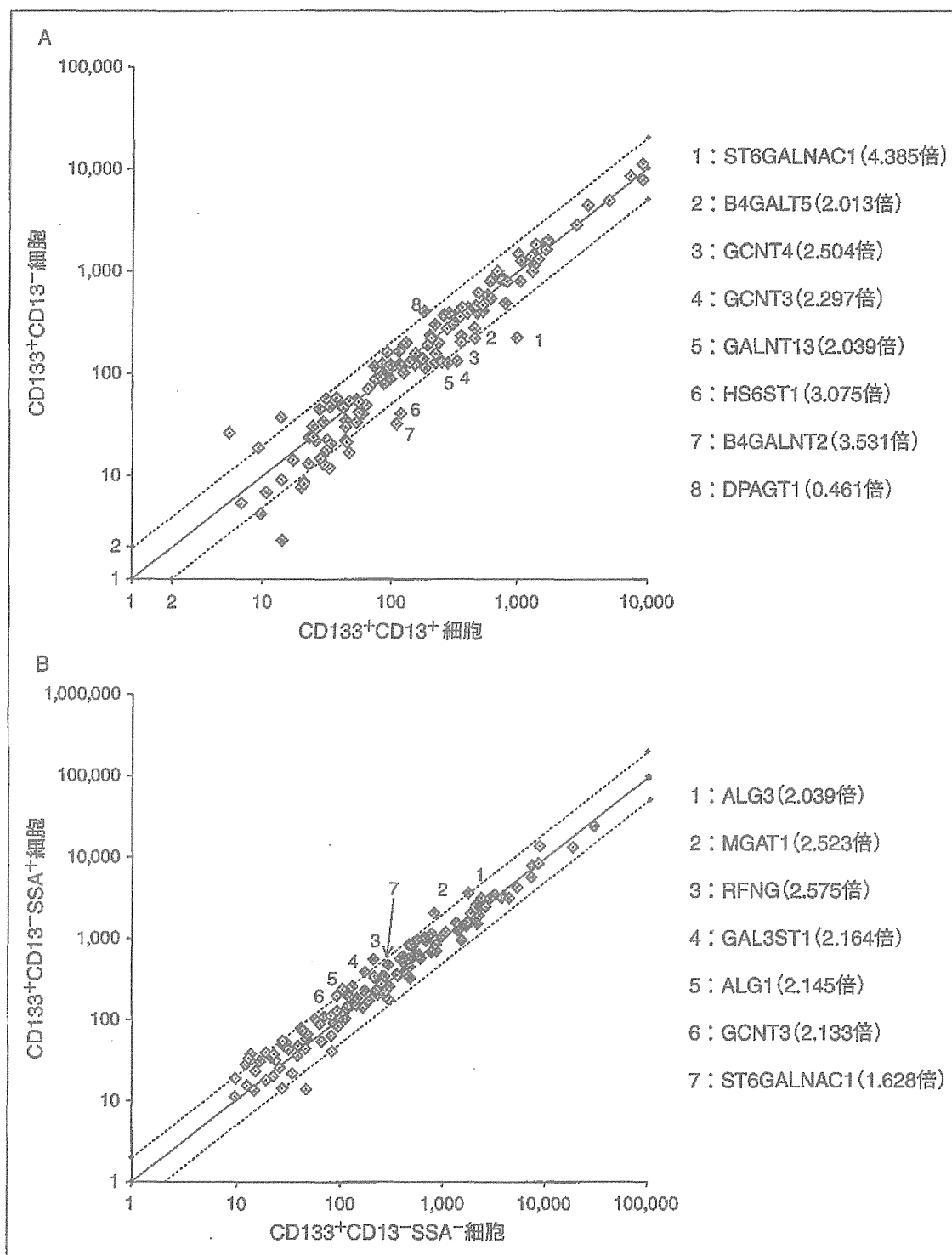


図6 癌幹細胞に特異的に発現する糖鎖遺伝子の解析

A : CD133<sup>+</sup>CD13<sup>-</sup>細胞とCD133<sup>+</sup>CD13<sup>+</sup>細胞の糖鎖遺伝子の発現を、一括real-time PCR法で解析した。記載の倍数は、CD13<sup>-</sup>に対してCD13<sup>+</sup>で何倍発現しているか示している。B : CD133<sup>+</sup>CD13<sup>-</sup>SSA<sup>+</sup>細胞とCD133<sup>+</sup>CD13<sup>-</sup>SSA<sup>-</sup>細胞の糖鎖遺伝子の発現を、一括real-time PCR法で解析した。記載の倍数は、SSA<sup>-</sup>に対してSSA<sup>+</sup>で何倍発現しているか示している。(文献<sup>9)</sup>より引用改変)

SSA<sup>+</sup>細胞)に対して、CD133抗体やSSAレクチンを提示したBNCが効率的に取り込まれるか否か検討を行った。

まず最初に、FACSで分離しないHuh7細胞へのBNCの取り込みを検討した。方法としては、コーゲンコートした24穴dishに10<sup>5</sup>個の細胞をま

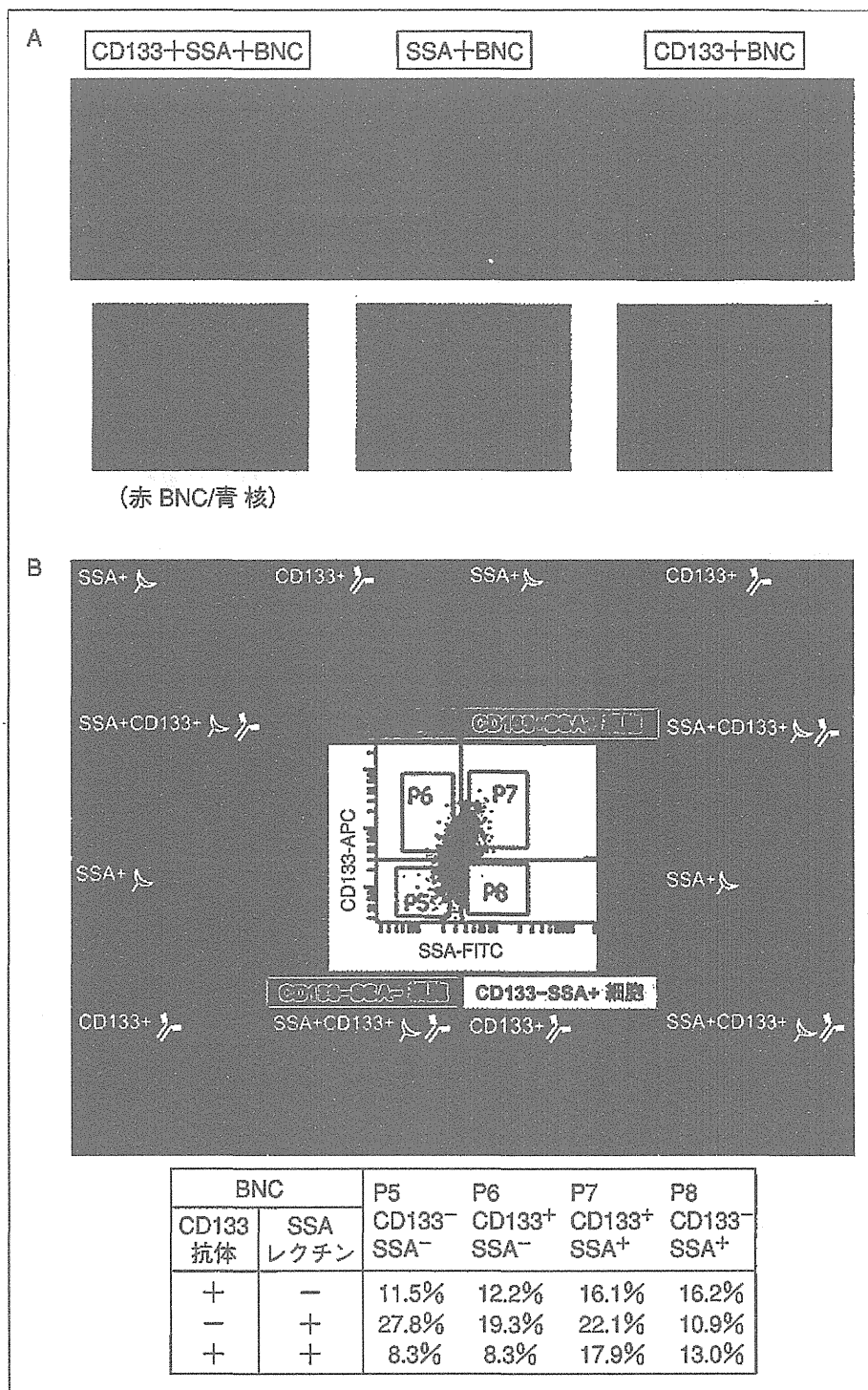


図7 蛍光顕微鏡を用いたBNCの肝癌細胞への取り込み  
 A : Huh7細胞に、各種の標識をしたBNCを3時間取り込ませ、3時間後に蛍光顕微鏡(オールインワン)で観察した。B : FACSを用いて、CD133およびSSA陽性/陰性の細胞を分画し、CD133抗体/SSAレクチン掲載BNCの細胞への選択的な取り込みについて検討した。数字は、各細胞に5つ以上のBNCが取り込まれた細胞の割合を示す。

き、24時間後にBNC存在化で3時間培養し、パラホルムアルデヒドで固定後に蛍光顕微鏡(オールインワン)で観察した。しかし、3種類による細胞への取り込みに関して、明らかな差

は認めなかった(図7-A)。

次に、横軸にSSAを縦軸にCD133をとって、FACSで以下の4つのfractionに分画した。すると、下記に示すように、明らかに各fractionでBNC



の取り込みに差を認めた(図7-B)。全般的にSSAレクチン+BNCは、どのfractionにも取り込まれる率が高い傾向にあった。それぞれでみると、CD133抗体+SSAレクチン+BNCはP7 fraction (CD133<sup>+</sup>SSA<sup>+</sup>細胞)に取り込まれやすい傾向にあったが、SSAレクチン+BNCはSSAを発現していないP5 fraction (CD133<sup>-</sup>SSA<sup>-</sup>細胞)に、CD133抗体+BNCはCD133を発現していないP8 fraction (CD133<sup>-</sup>SSA<sup>+</sup>細胞)にも多く取り込まれていた。これに加え、Huh7細胞全体に対しての取り込みでは3種類のBNC間に明らかな差はみられなかったことから、それぞれのBNCがどの程度目的の細胞をターゲットにできているか確認できなかった。現状での評価の正確さを改善するためには、まずbackground (dishにBNCが非特異的に接着すること)の影響を除くこと、BNCの取り込み率と細胞密度の関係を明らかにすることが考えられる。

以上の結果より、FACSで分離したHuh7細胞に対して、3種類のBNCのうち、CD133抗体とSSAレクチンのどちらか片方を提示したBNCは非特異的な取り込みが多かった。一方、両方を提示したBNCはそれらを発現しているP7 fractionに最も多く取り込まれていたことから、目的細胞への特異性が高く、よりターゲティングしやすいことが示唆された。しかし、本当に癌幹細胞に選択的に入っているかどうかは、癌幹細胞マーカーとしてすでに報告されているCD133抗体との共染色で確認する必要がある。また、細胞表面にBNCが付着しているのか、それとも細胞内に取り込まれているのかは今回の検討だけでは評価が困難である。また、SSAレクチンの結合がCD133抗体に比べて少し強い印象を受けるので、結合させる物質の調整も試みたい。また、今後さらにBNCを取り込ませた後にFACSで解析する方法、レクチンと細胞表面との接着をとるようなwashing bufferの条件検討などにより、細胞内へのBNCの取り込みを確認し、抗癌薬を封入した糖鎖標的治療を目指したい。

### おわりに

癌幹細胞のとらえ方が各研究者で異なることが、この研究分野の問題である<sup>12)</sup>。また、癌幹細胞

研究は、各研究者によってコンセプトに違いがあり、いまだその存在そのものを疑問視する研究者もいる。本研究のように、レクチンで糖鎖の違いを包括的にみた場合は、癌幹細胞と癌幹細胞から一部分化したものを大きな網でとらえた感覚がある。したがって、癌幹細胞学ということで、一定の性質を持つ癌幹細胞の生物機能を深く解析するためには、従来の細胞表面マーカーの方が適しているかもしれない。ただ実地臨床を考えたときは、あまり特定の細胞をターゲットにしすぎるとエスケープして出現する細胞があり、むしろ包括的に治療した方がいいようにも思う。もし、より正確に特定の癌幹細胞を同定するなら、癌幹細胞の表面抗原の特定の糖鎖構造のみ認識できる抗体ができれば(特定のタンパク質の糖鎖に対する特異抗体は、糖鎖研究者の夢ではあるが、現実的にはほとんど存在しない)、その夢がかなうかもしれない。また、癌細胞へのターゲティングに関しては、BNC以外にもリポソームを使ったDDSも有効ではないかと考えられる。いずれにしても、糖鎖研究は腫瘍マーカー、細胞表面のマーカーとして非常にホットな研究分野といえる。

謝辞：最後に、癌幹細胞実験の基本的な手技をご指導いただいた大阪大学大学院医学系研究科消化器外科の森 正樹先生、原口直昭先生、糖鎖遺伝子の解析をしていただいた産総研医工学センターの成松 久先生、澤木弘道先生、BNCの調整や実験指導をしていただいた名古屋大学農学部の黒田俊一先生、当研究室の大学院生の中山小太郎純友君、学部4回生の山谷恵里佳さんに深謝します。また、レクチンアレイや実験のすべてにわたって絶大なサポートと詳細な議論をいただいたGPバイオサイエンス社の武石俊作博士に深謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105.
- 2) Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396.

- 3) Haraguchi N, Ohkuma M, Sakashita H, et al. CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> population efficiently enriches colon cancer initiating cells. *Ann Surg Oncol* 2008 ; 15 : 2927.
- 4) Hart GW, Copeland RJ. Glycomics hits the big time. *Cell* 2010 ; 143 : 672.
- 5) Kuno A, Uchiyama N, Koseki-Kuno S, et al. Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray : a new strategy for glycan profiling. *Nat Methods* 2005 ; 2 : 851.
- 6) Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, et al. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest* 2010 ; 120 : 3326.
- 7) Nishikawa S, Ishii H, Haraguchi N, et al. Genotoxic therapy stimulates error-prone DNA repair in dormant hepatocellular cancer stem cells. *Exp Ther Med* 2012 ; 3 : 959.
- 8) Moriwaki K, Okudo K, Miyoshi E, et al. Combination use of anti-CD133 antibody and SSA lectin can effectively enrich cells with high tumorigenicity. *Cancer Sci* 2011 ; 102 : 1164.
- 9) Partridge EA, Le Roy C, Di Guglielmo GM, et al. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* 2004 ; 306 : 120.
- 10) Yamada T, Iwasaki Y, Tada H, et al. Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nat Biotechnol* 2003 ; 21 : 885.
- 11) Kasuya T, Miyoshi E, Kuroda S, et al. *In vivo* delivery of bionanocapsules displaying *Phaseolus vulgaris* agglutinin-L<sub>4</sub> isolectin to malignant tumors overexpressing *N*-acetylglucosaminyltransferase V. *Hum Gene Ther* 2008 ; 19 : 887.
- 12) Valent P, Bonnet D, Eaves C, et al. Cancer stem cell definitions and terminology : the devil is in the details. *Nat Rev Cancer* 2012 ; 12 : 767.

\* \* \*

&lt;がん&gt;

## 7. 糖鎖がんマーカー

三善英知，鎌田佳宏，魚住尚史

腫瘍マーカーとは，がん細胞がつくる，または非がん細胞ががん細胞に反応してつくる物質の中で，がんの存在，種類とその量を反映する指標である。1980～90年頃，がんに伴う異常糖鎖に対する抗体が糖鎖関連腫瘍マーカーとして開発され，一世を風靡した。近年の糖鎖解析技術と微量分析の進歩により，糖鎖がんマーカーは第二の最盛期を迎えていると思う。本稿では，われわれがグライコミクス的手法を使って開発してきたフコシル化糖鎖マーカーを中心に概説し，その産生メカニズムや臨床応用の可能性について述べる。さらに，糖鎖がんマーカーの今後の展開に関しても言及したい。

### はじめに

糖鎖がんマーカーとは，糖鎖に関連した腫瘍マーカーである。英語表記では tumor marker という記載は少なく，cancer biomarker と言われるため，このタイトルでの執筆依頼があった。しかし，日本には分子腫瘍マーカー研究会という伝統的な研究会があるので，以後本稿ではあえて腫瘍マーカーという言葉を使わせていただく。

腫瘍マーカーとは，がんの存在を示唆する主として血中の物質で，がんの種類，病態を反映するものであ

る。この基準を満たせば，必ずしもがん細胞が産生しなくても，がんの存在によって周囲の組織から産生される物質も含まれることになる。腫瘍マーカーの歴史を振り返ると，がん胎児性抗原として発見された AFP や CEA という代表的なマーカーに始まり，モノクローナル抗体の技術によってさまざまながん糖鎖抗原に対する抗体 (CA19-9, CA125 など) が見つかった<sup>1)</sup>。さらにゲノム解析技術の進歩により，がん関連遺伝子の変異も1つの腫瘍マーカーとして脚光を浴びた。しかし，本当に臨床医療に必要とされる，がんの早期診断に有用な腫瘍マーカーはほとんど存在しないと言われ

#### [キーワード&略語]

腫瘍マーカー，フコシル化，膵がん，ハプトグロビン，AFP-L3

AAL : Aleuria aurantia lectin

AFP :  $\alpha$ -fetoprotein

CEA : carcino embryonic antigen

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay

Fuc-Hpt : Fucosylated haptoglobin

Fut8 :  $\alpha$ 1-6 fucosyltransferase

PIVKA-II : protein induced by vitamin K absence or antagonist-II

PSA : prostate specific antigen

#### Glyco cancer biomarker

Eiji Miyoshi/Yoshihiro Kamada/Naofumi Uozumi : Osaka University Graduate School of Medicine, Department of Molecular Biochemistry & Clinical Investigation (大阪大学大学院医学系研究科機能診断科学)

ている。また近年の微量解析技術の進歩によりオミックス研究が大きく展開され、網羅的なマーカーの組み合わせ、あるいはmicroRNAという新兵器が登場した。確かに、理論上はこの手法により早期診断可能な腫瘍マーカーが見つかるかもしれないが、現在までに公表された多くの論文を見る限り、まだまだ臨床応用への道は遠い。その理由としては、新規腫瘍マーカーの臨床応用が実際に不可能なのか、詳細な臨床データの情報処理が不十分なのか、よくわからない。しかし、新しい発見なので、論文は数多く書ける。

21世紀はポストゲノムの時代と言われて久しい。糖鎖はタンパク質の翻訳後修飾にかかわる最も重要な因子の1つで、がん特異的な糖タンパク質が腫瘍マーカーとして期待される。実際に、肝がんの腫瘍マーカーとして保険適応されているAFP-L3（フコシル化AFP）は代表的なものである<sup>2)</sup>。われわれは、長年新しい糖鎖腫瘍マーカーの開発とその産生メカニズムに関する研究を続けてきた。本稿では、それらを概説して現状での（糖鎖）腫瘍マーカーの有用性と限界について論じ、今後この分野の研究がどのように展開するかという可能性についても言及したい。

## 1 臨床応用されている腫瘍マーカーの現状と問題点

腫瘍マーカーという項目でインターネットを検索すると、腫瘍マーカー.comというサイト (<http://tumor-marker.com/>) が見つかり、現在臨床的に用いられている腫瘍マーカーが詳細に説明されている。個々のマーカーで長所・短所はあるが、例えば健診でCEAが少し上昇したとき、肺がん、大腸がん、ほかの消化器がんのどの臓器を検査すべきか迷うことがある。そしていろいろ調べた結果、結局は喫煙や高齢の影響だったということが少なくない。ただ、大腸がんの術後にCEAが微増してきたら、かなりの確率で再発、転移が存在する。

これに対して、AFPやPSAが上昇した場合は、基本的に肝臓と前立腺を調べたらよい。もちろん、慢性肝炎（AFP）や前立腺炎（PSA）で擬陽性を示すことも少なくないが、これらのタンパク質の糖鎖をみることで、がんと炎症を鑑別することが可能である。実際にAFP-L3は肝がんの特異性の高いマーカーで、日本発

の腫瘍マーカーとしてFDA（米国食品医薬品局）にも承認された<sup>3)</sup>。そして近年ミュータスという新しい測定法の導入により、10倍近く感度が上がり定量も可能となった<sup>4)</sup>。一方PSAに関しては、がん細胞の産生するPSAと炎症で増加するPSAの糖鎖構造が異なることまでは証明されているが<sup>5)</sup>、現状のテクノロジーではキット開発までは至っていない。いくつかの企業が、PSAの糖鎖に注目してキット化をめざしていると思われるが、AFP-L3とは認識するレクチンの種類が異なる（AFP-L3の場合はフコシル化認識レクチンを使う）ことなどから少し工夫が必要だろう。

また膀胱がんの腫瘍マーカーとして広く知られているCA19-9は、擬陽性に加え、大腸がん、肺がん、その他多くのがんでも上昇することが知られている。その理由の1つとして、CA19-9はシアリルルイスAという糖鎖構造に対する同一のモノクローナル抗体を使ったサンドイッチELISAで測定されるため、理論上はシアリルルイスAという糖鎖をたくさんもつ複数のタンパク質（もしくは物質）を認識することが考えられる。CA19-9のキャリアタンパク質を同定し、そのタンパク質上のシアリルルイスAを同定することで膀胱がん診断の特異性を面的に上げるという興味深い最近の報告もある<sup>6)</sup>。これら以外にも、がんに伴って出現する異常糖鎖（多くは糖脂質もしくはO-型糖鎖）に対するモノクローナル抗体が、CAで始まる多くの腫瘍マーカーとして臨床応用されている。

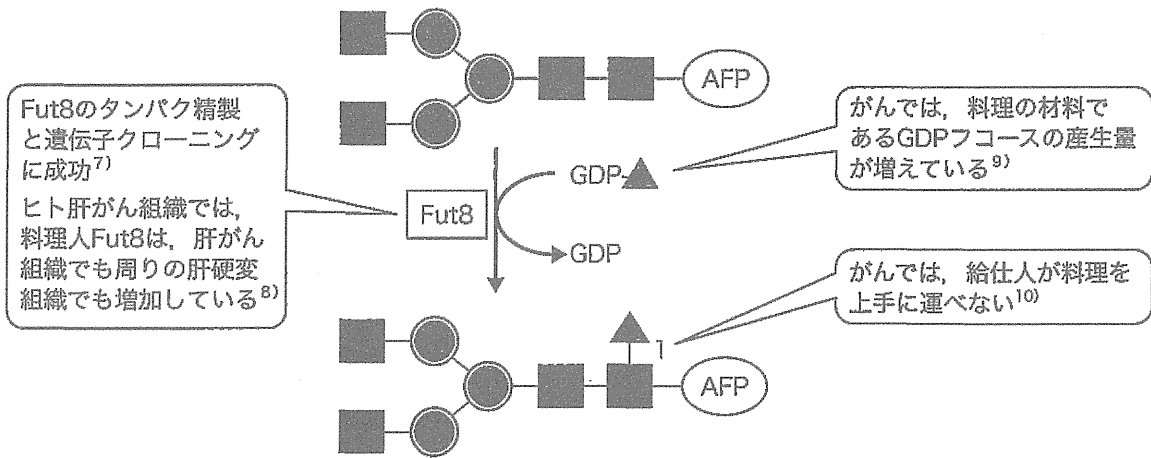
## 2 AFP-L3の産生機構について

私が糖鎖の研究を始めた最初のモチベーションは、肝がんが特異的に産生される（肝硬変ではほとんど産生されない）AFP-L3の産生機構に対する興味であった。AFPには1本のN-型糖鎖が存在し、その根元に（還元末端のGlcNAcに）フコースが $\alpha$ 1-6結合したものをAFP-L3と呼ぶ。1996年に、われわれはこの $\alpha$ 1,6フコース転移酵素（Fut8）を精製・遺伝子クローニングしたが<sup>7)</sup>、必ずしもFut8は肝がんだけでなく周囲の肝硬変組織で高発現していた<sup>8)</sup>。むしろ、Fut8のドナー基質であるGDP-フコースの方が肝がん有意に増えていた<sup>9)</sup>。肝がんがAFP-L3が増えるメカニズムとしては、これら以外に肝細胞におけるフコシル化<sup>\*1</sup>タンパク質の分泌異常が想定される（図1A）。す

A)

AFP-L3分画は、なぜ肝がん患者で増加するのか？

～Fut8は料理人、GDP-フコースは材料、そして給仕人は？～



B)

フコシル化腫瘍マーカーの産生と細胞極性

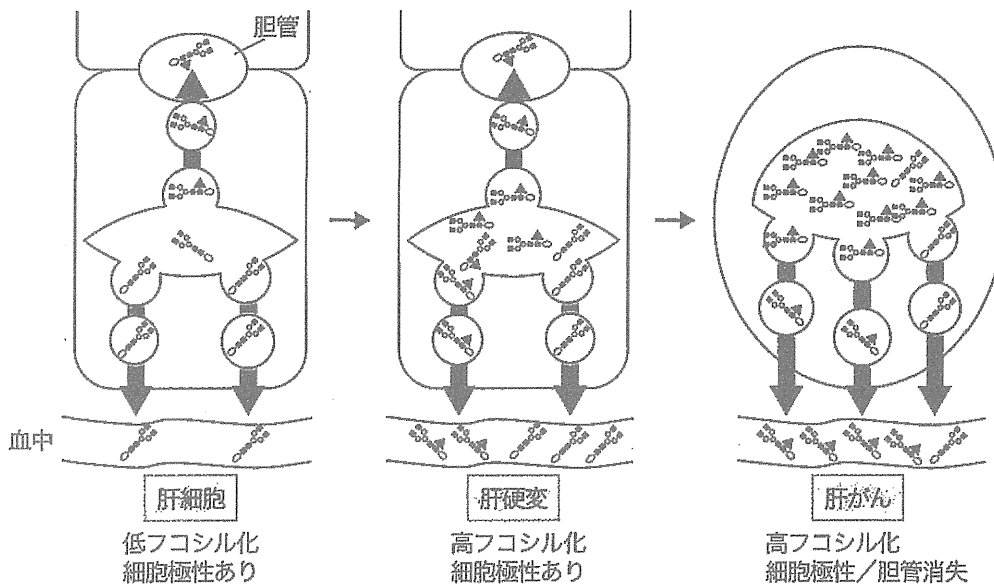


図1 AFP-L3がなぜ、肝がんで増加するかという研究のまとめ

A) 糖転移酵素Fut8の遺伝子発現は、正常肝で低く、肝硬変と肝がんが増加する。Fut8のドナー基質であるGDP-フコースは肝がん有意に高いが、その増加量は2倍前後である。実際のAFP-L3の肝がん診断率はきわめて特異性が高く、Fut8とGDP-フコース量以外に分泌異常の存在が示唆される。一連のメカニズムを、AFP-L3を料理、Fut8は料理人、GDP-フコースは料理の材料、そしてがんにおける給仕人の異常などを、Fut8の反応図とともにまとめた。B) 正常の肝細胞ではフコシル化タンパク質は胆管側へ分泌されるが、肝硬変になるとそれが増加し、ある程度のタンパク質選択性をもって胆管側、血中へと分泌される。肝がんでは、細胞極性が崩壊したり、胆管構造が消失したりすることによって、フコシル化タンパク質は血中へ分泌される。文献11をもとに作成

なわち、胆汁中には本来多くのフコシル化タンパク質が存在するが、Fut8 KOマウスでは肝細胞で産生される糖タンパク質が胆汁中にほとんど分泌されない<sup>10)</sup>。このメカニズムを、比較的細胞の極性<sup>\*2</sup>が保たれたHepG2細胞で解析した結果、タンパク質の種類によ

ってフコシル化されたときの胆管側へ運ばれやすさが異なることがわかった(図1B)<sup>11)</sup>。つまり、肝臓の発がん過程において、フコシル化タンパク質の産生は慢性肝炎、肝硬変の時期に増加するが、多くのタンパク質は胆管側に分泌され、肝がんになってこの機序が破綻



することや、胆管構造が消失することで、血液中にフコシル化タンパク質が増加する。現在、さまざまなフコシル化タンパク質が糖鎖関連腫瘍マーカーとして報告されているが、少なからず図1に示す機序が関与するのではないと思われる。

### ③ グライコミクスの手法を使った糖鎖関連腫瘍マーカーの開発

糖鎖関連タンパク質を網羅的に解析(同定)することが、グライコミクスの基本概念である。レクチンカラム、二次元電気泳動、マスペクトロメトリー、バイオインフォマティクスの技術を駆使して、新しい腫瘍マーカーを開発しようとする試みは2007~11年に産総研のNarimatsuらによってMGプロジェクトとして展開された<sup>12)</sup>。最新のグライコテクノロジーを使って、数々の腫瘍マーカーの候補が同定されたと思う。特許の関係で、血中マーカーとしての成果報告(論文)は少ないが、今後いくつかの新しいマーカーが世の中に出てくるであろう。私が2002年、大阪大学医学部保健学科で准教授としてラボをもったとき、グライコミクスの手法を使った糖鎖関連腫瘍マーカーの開発研究に取り組んだ。培養細胞から糖鎖関連の腫瘍マーカーの候補を探索し、実際のヒトの患者血清で検証しようというものである。当時は、まだマスペクトロメトリーの技術が現在ほど普及されておらず、タンパク質の同定は古典的なN末端シークエンス法であった。もちろんレクチンアレイのような高度な技術はなかったが、それまでのがんと糖鎖研究に関する経験から、

糖鎖のがん性変化としては枝分かれ、シアル酸付加、そしてフコシル化であると思っていた。当時から肝がんは、すでに診断のチャートが完成されていたので、消化器がんとして最も難治性とされる膵がん、胆管がんの糖鎖マーカーの探索をめざした。レクチンカラムを使用するとき、シアル酸を認識するSSAや $\beta$ 1-6GlcNAc分岐鎖を認識するL4-PHAは結合性が弱いので、フコースを認識するAALをプローブとして用いた。培養細胞から同定されたフコシル化タンパク質としては、Mac-2Bp(ガレクチン3結合タンパク質)、トロンボスポンジン、補体C3などであった。しかし、実際の膵がん患者の血清のAALレクチンプロットでは、これらのタンパク質はフコシル化タンパク質として見えず、40kDaのバンドのみ膵がん患者で増加することを学生が見つけた(図2A)。冷静に考えると、がん細胞から分泌される特殊な糖鎖をもつタンパク質は、大量の血清タンパク質の中に埋もれてしまい、単純な電気泳動では見出せないのだろう。逆に言えば、40kDaのタンパク質を膜から切り出しN末端シークエンスでハプトグロビンの $\beta$ 鎖と同定したが<sup>13)</sup>、本当に膵がん細胞がフコシル化ハプトグロビン(Fuc-Hpt)を産生しているのかどうか疑問であった。実際に数種類の膵がん細胞を解析したところ、ハプトグロビンを産生したものはPSN-1という細胞だけであった<sup>14)</sup>。また、膵がんだけでなく大腸がんや肝がん血清でもFuc-Hptは陽性を示した(もちろん、膵がんの方が頻度は高い)。いずれにせよ、AALレクチンプロットだけでは定量性に乏しいため、Fuc-Hptを検出できるキットの作製を試みた。

#### ※1 フコシル化

タンパク質や脂質のような生体高分子にL-フコースを酵素的に付加する反応のことである。L-フコースは6-デオキシ-L-ガラクトースに相当するものであり、哺乳類で見られるその他の六単糖とは2点の構造的相違点をもつ。1つ目は6位の炭素に水酸基がみられない点、2つ目は異性体としてD体ではなく、L体を使用する点である。フコシル化は、がんや炎症と密接な関係をもつ。

#### ※2 細胞極性

一般的に腸管や尿管のような上皮細胞では、細胞の上部(apical側)と側底部(basolateral側)をもち、それぞれ特徴的な膜タンパク質が局在する。肝細胞においては、胆管側をapical、血管側をbasolateralと考える。タンパク質の極性輸送には、多くのRab familyが関与する。細胞極性の崩壊は、腫瘍マーカーの産生と密接な関係があると言われている。

### ④ Fuc-HptのELISAキットの作製と臨床応用

当時CREST「研究糖鎖の生物機能の解明と利用技術『糖鎖構造の制御によるがん及びウイルス疾患の予防法及び治療法の開発』(代表:小山信人)」でタカラバイオと共同研究していた関係で、同社とFuc-Hptを定量できるレクチン抗体ELISAキットの開発を行った。すなわち、ハプトグロビンに対するIgG抗体のFab部分のみを固相化し(Fc部分には糖鎖が存在するため)、ビオチン化AALでFuc-Hptを認識する系である(図2B)。膵がん細胞の培養上清中に存在する