

厚生労働科学研究費補助金
(政策科学総合研究事業 (臨床研究等 ICT 基盤構築・人工知能実装研究事業))
分担研究報告書

課題名 : 新薬創出を加速する症例データベースの構築・拡充／創薬ターゲット推定アルゴリズムの開発

研究分担者名 : 西村 紳一郎 北海道大学・教授

研究要旨

本研究チームは「血中エクソソームの由来臓器を糖鎖解析により推定する基盤技術」という研究テーマを分担している。令和2年度は計画していた正常 ddY マウス主要臓器 (脳・肝臓・肺・骨格筋) と大腿骨、腎臓、膵臓、脾臓、心臓、胃、腸 (大腸および小腸)、皮膚、甲状腺、卵巣、子宮、睾丸および血清 (エクソソームを含む) の定量的糖鎖プロファイリングを完了した。その結果、特定の組織・臓器や細胞から放出される定量的紐つきのエクソソーム糖鎖プロファイルデータベース構築の重要性が改めて明確に示された。世界初の「マウス組織・臓器糖鎖アトラス」の完成と発信に向けて論文を作成中である。

A. 研究目的

エクソソームが積載する様々な生体分子はいずれもそのエクソソームを放出した細胞内で合成されているため、エクソソームはそれらの細胞が分布する組織や臓器での異常を示唆する有効なバイオマーカーとなる可能性が高い。しかし、血液中のエクソソームは明らかに複雑なナノ微粒子の混合物であり、それらの由来組織・臓器を特定することはもとより推定すること自体困難である。我々は由来する組織や臓器と定量的に紐づいたエクソソームの情報を抽出できれば特定の組織・臓器での疾患特異的な変化を検知できると考えた。

本研究チームでは「血中エクソソームの由来臓器・組織を糖鎖解析により推定する基盤技術」を確立し、由来臓器・組織と定量的に紐づいたエクソソームの糖鎖構造情報を用いる新たな AI 支援型診断技術への応用を目的とした。

B. 研究方法

図1の基本プロトコルに基づいて主要臓器と組織の糖鎖構造解析を行ってそれらの詳細な構造パターンを定量的にプロファイリングした。正常 ddY マウスを解剖して摘出した主要臓器 (脳・肝臓・肺・骨格筋) と大腿骨、腎臓、膵臓、脾臓、心臓、胃、腸 (大腸および小腸)、皮膚、甲状腺、卵巣、子宮、睾丸および血清 (エクソソームを含む) の定量的糖鎖プロファイルの比較を行った。血清以外の臓器についてはマウス 5 検体の糖鎖発現量の平均と標準誤差を求め、血清や他の臓器との比較を行った。

マウス主要臓器・組織の糖タンパク質の糖鎖プロファイルを獲得するための標準プロトコルを確立

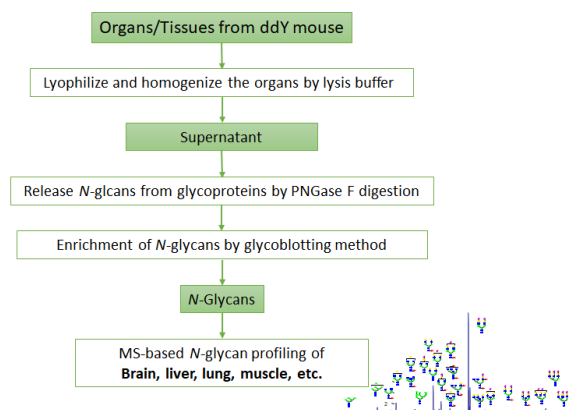


図1 マウス組織・臓器糖鎖解析基本プロトコル

(倫理面への配慮)

なお動物実験に際しては、動物愛護管理法および関係基準等を遵守し、動物福祉の基本概念である 3R: Replacement, Reduction, Refinement の原則および動物実験倫理に基づいて適正に実施した。

C. 研究結果

その結果、各臓器・組織間で糖鎖プロファイルにおける大きな差異が認められた。一例として図 2 には主要 4 臓器（脳・肝臓・肺・骨格筋）と 8 臓器（脳・肝臓・肺・筋肉、骨、腎臓、膵臓、脾臓）の糖鎖プロファイルと血清の糖鎖プロファイルと比較した結果を示した。また、血清糖鎖プロファイルは糖鎖ごとに比較した場合に特定の臓器・組織の発現プロファイルとの相関がみられるものも確認できるが、基本的に血清糖鎖プロファイルとの差異が大きく組織・臓器のみで発現しているユニークな構造の糖鎖も存在することが初めて明らかとなった。例えば非常に興味あることに、脳と肺においては、他の臓器あるいは培養細胞などには見られない特徴的な糖鎖が数種類存在していた。

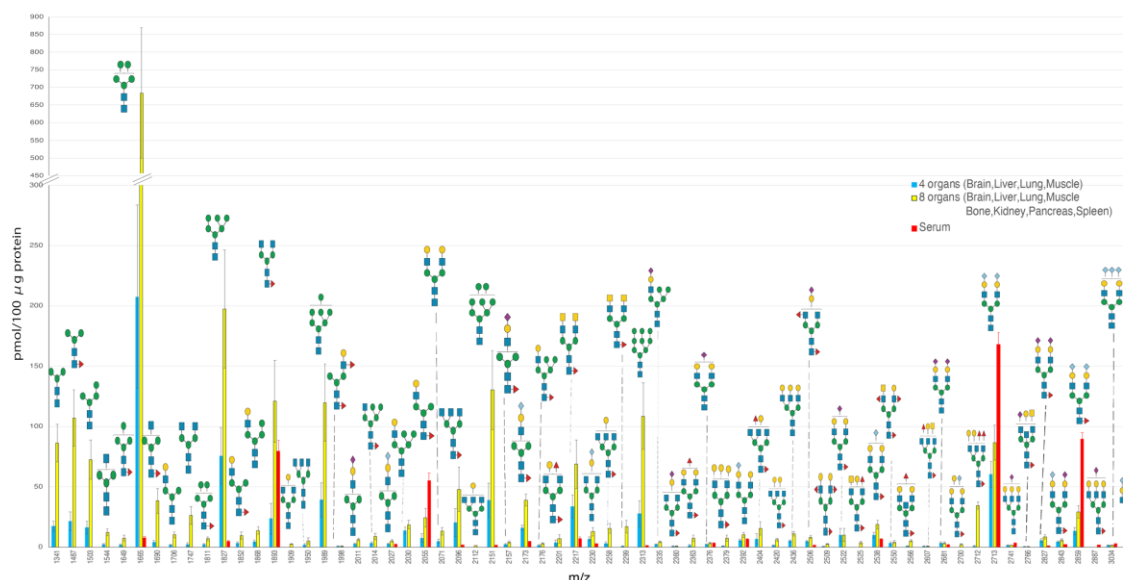


図 2 ddY マウス脳・肝臓・肺・筋肉（青）、脳・肝臓・肺・筋肉、骨、腎臓、膵臓、脾臓（黄）、およびエクソソームを含む血清（赤）の全糖鎖の比較（n=5）。各糖鎖構造の発現量の平均と標準偏差を示している。

D. 考察

今回の結果から糖鎖（構造）プロファイルはそれぞれの臓器（細胞）および組織間で大きく異なっていることが改めて証明できた。一方、血液から抽出・精製されるエクソソームの糖鎖プロファイルは由来する臓器・組織の糖鎖プロファイルの総和として観測されることを意味している。その際に各臓器・組織に由来するエクソソームの重みづけは個々の臓器や組織の定量的な糖鎖プロファイルとの相関（紐づけ）から予測可能であると考えられる。マウス血液中のエクソソーム糖鎖プロファイルと今回取得した個々の臓器・組織糖鎖プロファイルの比較からエクソソームの由来臓器・組織の割合を推定することができる。言い換えると、何らかの疾患により血液中のエクソソーム糖鎖プロファイルに変化が見られた場合に、それがどの臓器・組織の異常・変調によるのが AI などにより容易に検出できることを示唆している（論文投稿準備中）。

E. 結論

特定の組織・臓器や細胞から放出されるエクソソームの血中濃度は主要な臓器や組織の糖鎖プロファイルデータベースとの相関を解析することによって推定できる。すなわち、由来する組織や臓器と定量的に紐づいたエクソソームの情報を抽出できれば特定の組織・臓器での疾患特異的な変化を検出できるという仮説が支持された。正常マウスの臓器・組織糖鎖アトラスを健常ヒト臓器・組織糖鎖アトラスに拡張すれば患者血清のエクソソームの糖鎖プロファイルからの新しい診断技術の研究開発に展開できる可能性が高い。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi H., Kamiyama T., Hirane N., Kobayashi N., Aiyama T., Nagatsu A., Shimada S., Orimo T., Kakisaka T., Fukai M., Yokoo H., Kamachi H., Nishimura S-I., Taketomi A., “Analysis of the correlation between alterations in *N*-glycans and invasiveness in liver cancer cell lines” *Oncol. Rep.* 44, 2757-2769 (2020)
- 2) Pablo A. Guillen-Poza, Elena Matilde Sánchez-Fernández, Gerard Artigas, José Manuel García Fernández, Hinou H., Carmen Ortiz Mellet, Nishimura S-I., Fayna Garcia-Martin, “Amplified detection of breast cancer autoantibodies using MUC1-based Tn antigen mimics” *J. Med. Chem.* 63, 8524-8533 (2020)
- 3) Yokoi Y., Nishimura S-I., “Effect of Site - specific *O*-Glycosylation on the Structural Behavior of NOTCH1 Receptor Extracellular EGF - like Domains 11 and 10” *Chem. Eur. J.* 26, 12363-12372 (2020)
- 4) Wakui H., Tanaka Y., Ose T., Matsumoto I., Kato K., Yao M., Tachibana T., Sato M., Naruchi K., García-Martín F., Hinou H., Nishimura S-I. “A straightforward approach to antibodies recognising cancer specific glycopeptidic neoepitopes” *Chem. Sci* 11, 4999-5006 (2020)

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

4. 特許取得

なし

5. 実用新案登録

なし

6. その他

なし