

# 糖鎖・レクチン創薬の基礎と 糖鎖解読の新技术 (scGR-seq)

国立研究開発法人産業技術総合研究所  
筑波大学医学医療系

舘野浩章

# 内容

1. 糖鎖・レクチンの基礎
2. 糖鎖・レクチン創薬の動向
3. 1細胞糖鎖RNA同時解析技術

# 内容

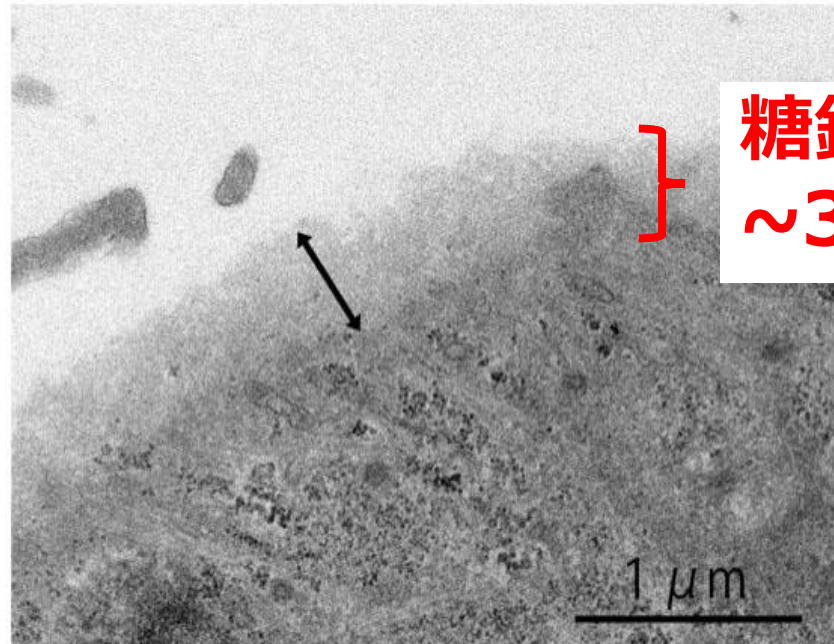
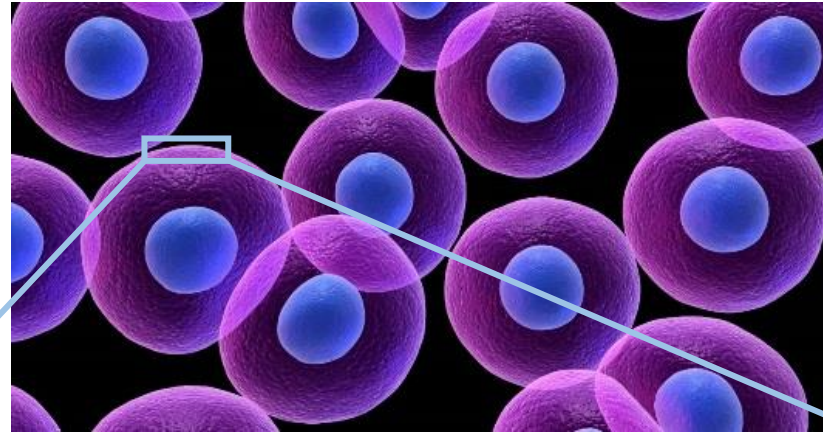
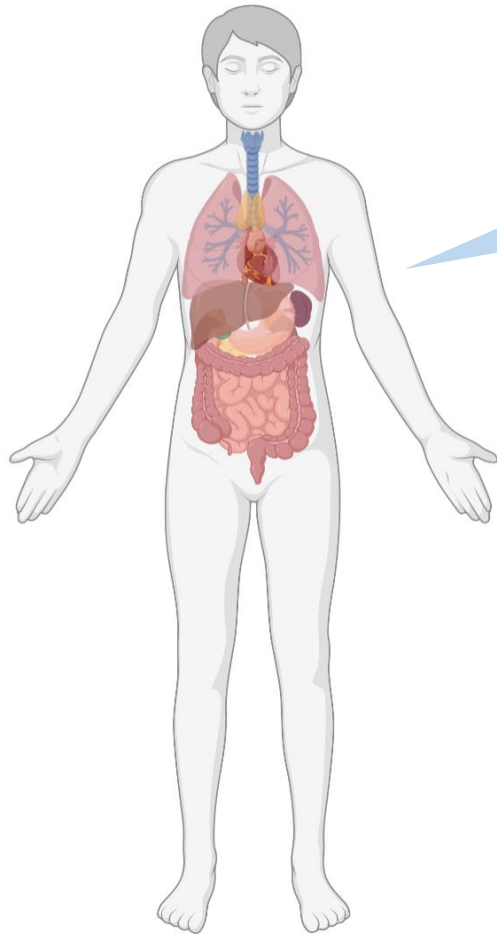
1. 糖鎖・レクチンの基礎

2. 糖鎖・レクチン創薬の動向

3. 1細胞糖鎖RNA同時解析技術

# 全ての細胞は糖鎖で覆われている

37兆個の細胞



糖鎖 =  
~30 nm

# 糖鎖複合体として存在

ヒアルロン酸  
(遊離)

糖タンパク質

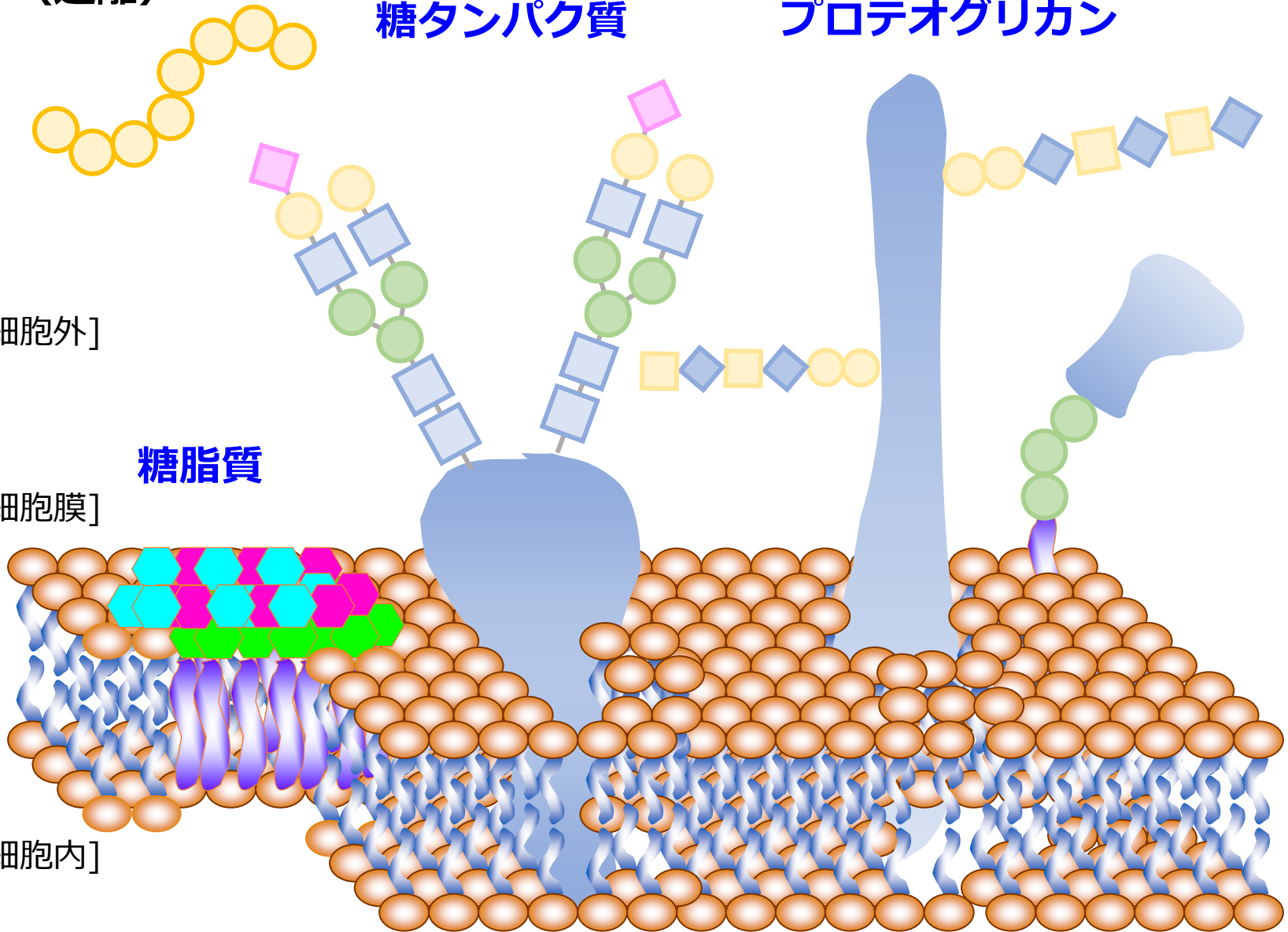
プロテオグリカン

[細胞外]

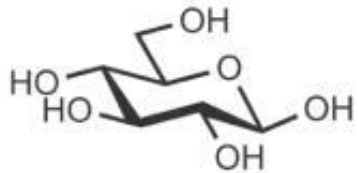
[細胞膜]

糖脂質

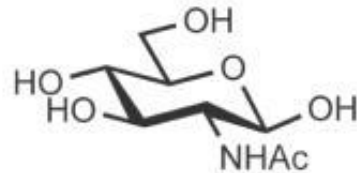
[細胞内]



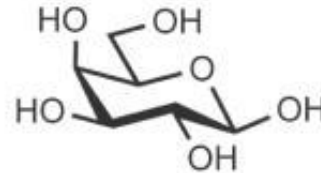
# ヒトの糖鎖は主に10種の単糖で構成 (=核酸、アミノ酸に相当)



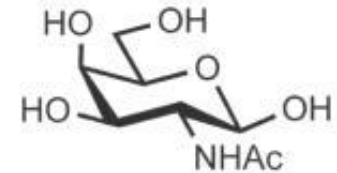
D-Glucose  
(Glc)



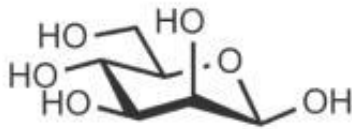
N-Acetyl-D-glucosamine  
(GlcNAc)



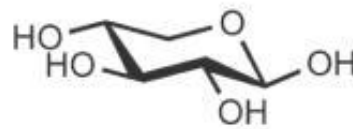
D-Galactose  
(Gal)



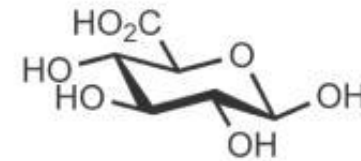
N-Acetyl-D-galactosamine  
(GalNAc)



D-Mannose  
(Man)



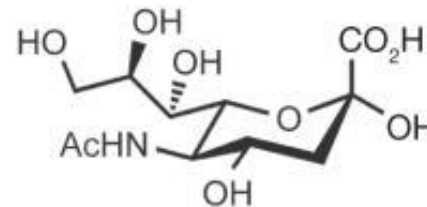
D-Xylose  
(Xyl)



D-Glucuronic acid  
(GlcA)



L-Fucose  
(Fuc)



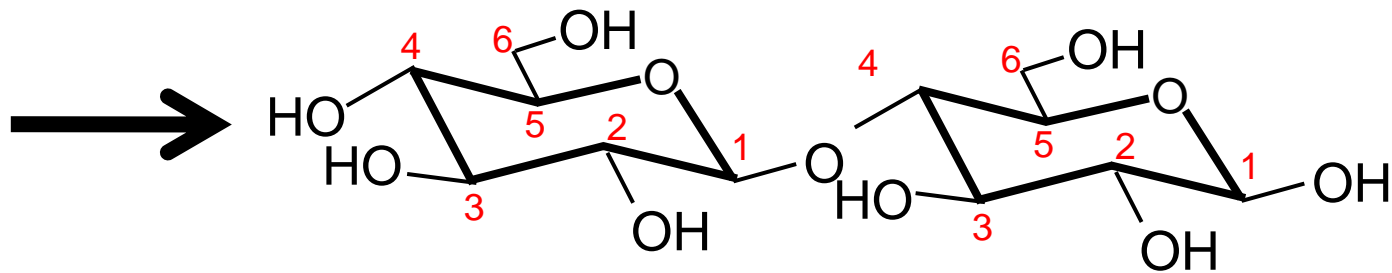
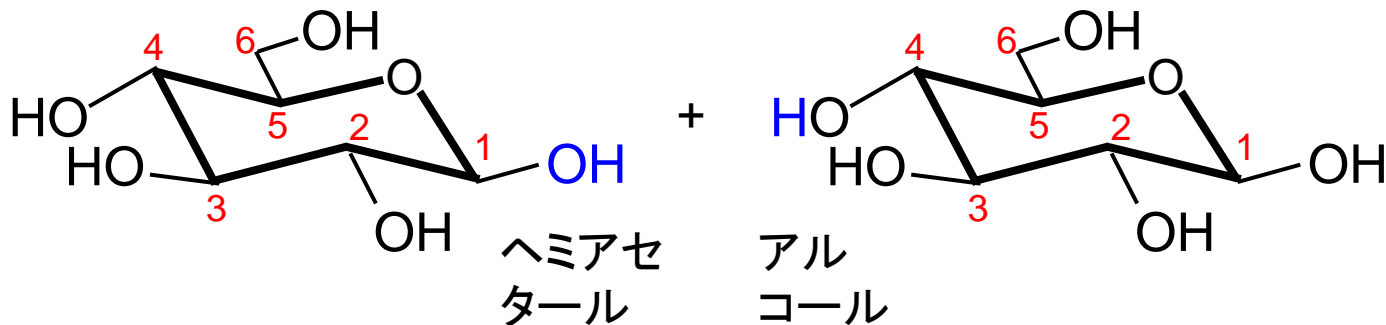
N-Acetylneuraminic acid  
(NeuAc)



Iduronic acid  
(IdoA)

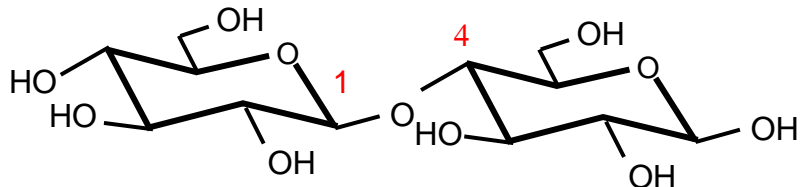
# 糖鎖は単糖がグリコシド結合でつながり構成

## 脱水縮合



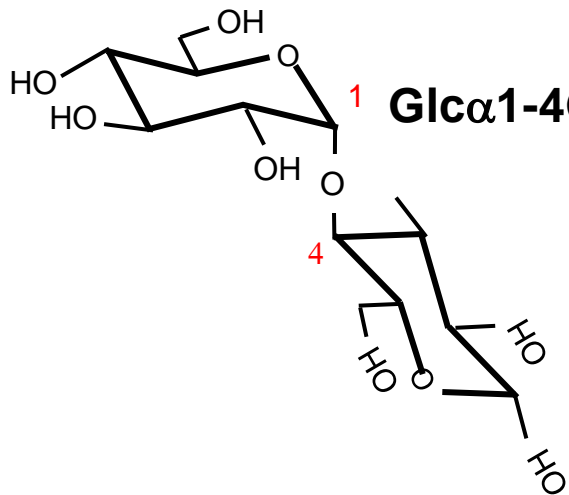
# アノマー異性と位置異性体 (グルコース 2 糖)

**Glc $\beta$ 1-4Glc**



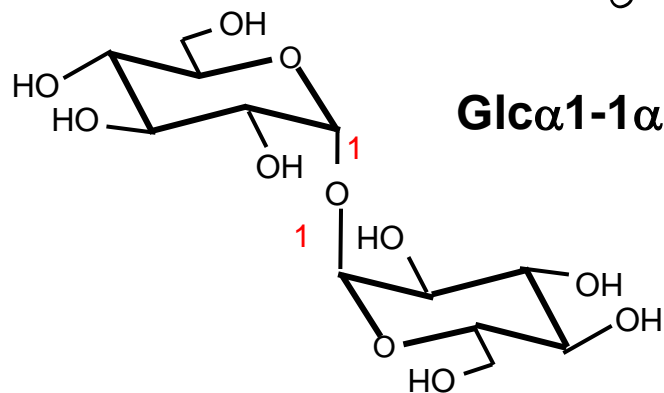
セロビオース → セルロース

**Glc $\alpha$ 1-4Glc**



マルトース → アミロース (デンプン)

**Glc $\alpha$ 1-1 $\alpha$ Glc**



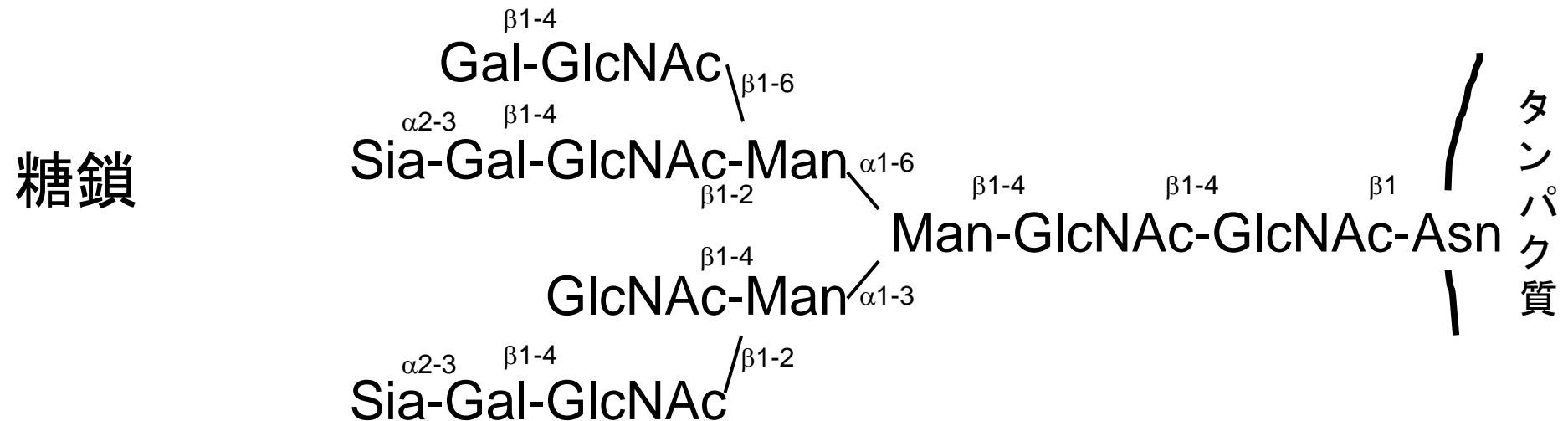
トレハロース



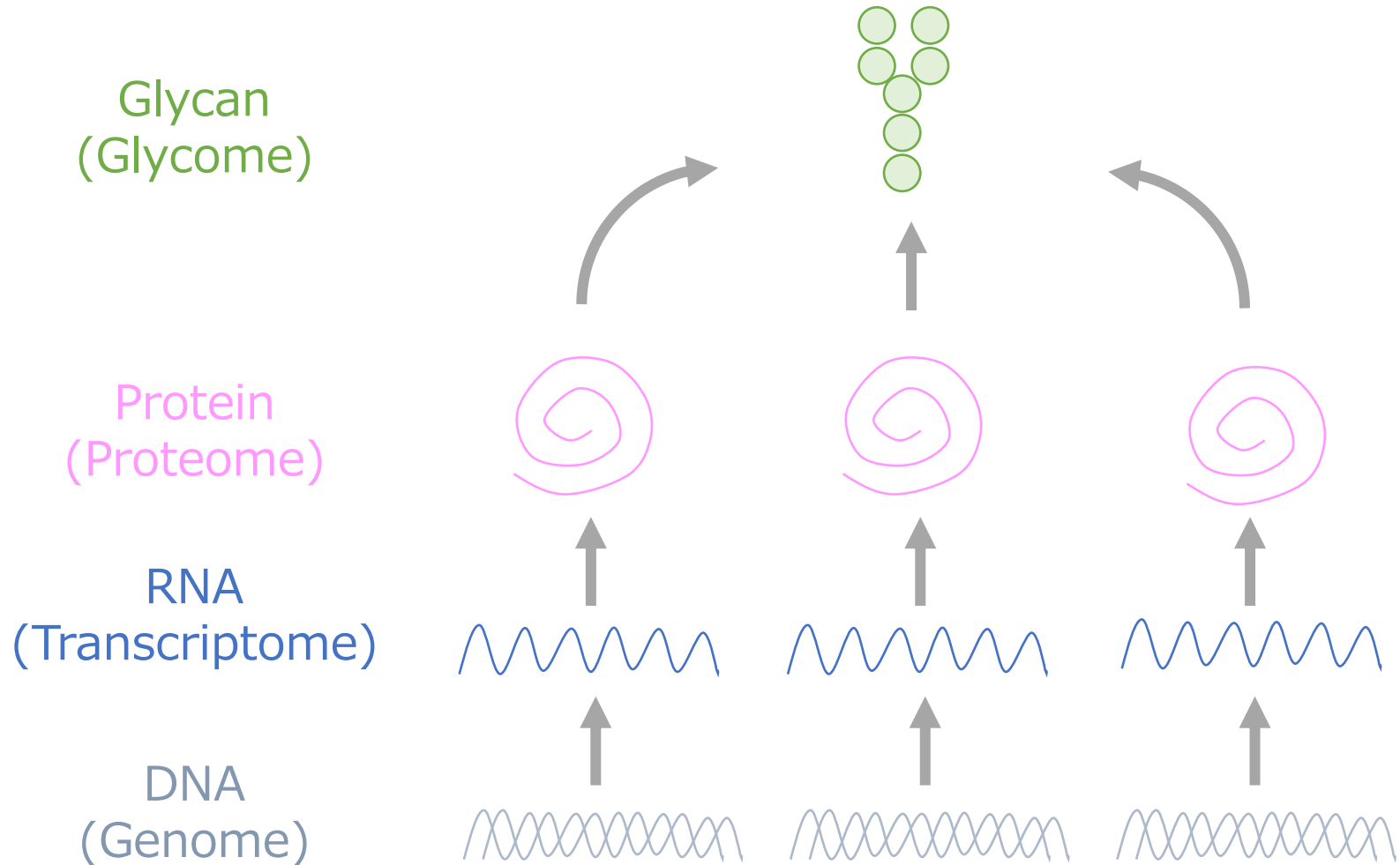
# 糖鎖は分岐構造で構成されている

核酸 A-T-G-C-A-T-G-C-A-T-G-C-A-T

タンパク質 Met-Ala-Arg-Gly-Thr-Ser-Glu-Asp



# 糖鎖は遺伝子の2次産物であり 様々なタンパクで合成される



糖鎖構造を遺伝子発現のみから決定することは困難である

# 糖鎖合成に関わる遺伝子

分類	性質
糖転移酵素	糖を転移する酵素
硫酸転移酵素	硫酸を転移する酵素
エピメラーゼ	糖をエピメル化する酵素
糖加水分解酵素	糖を加水分解する酵素
糖ヌクレオチド合成酵素	糖の原料となる糖ヌクレオチドを合成する酵素
糖ヌクレオチドトランスポーター	糖の原料となる糖ヌクレオチドをERやゴルジ内腔に輸送する分子

>200遺伝数（全遺伝子の1%）

# 糖タンパク質糖鎖生成過程の全体像

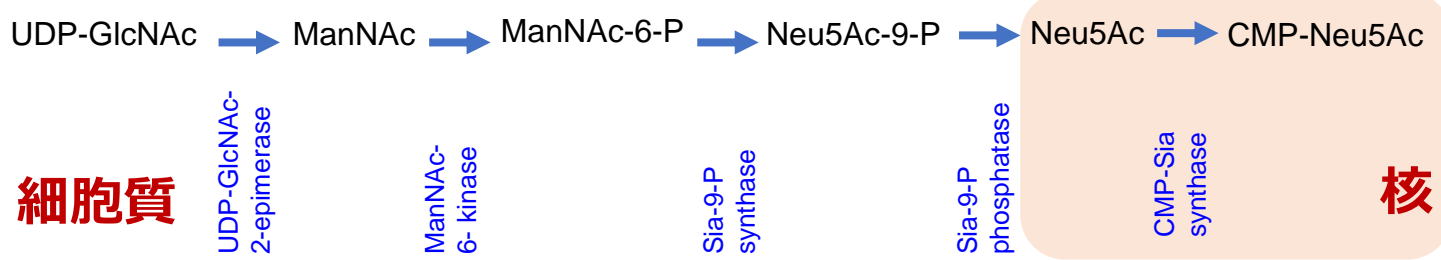
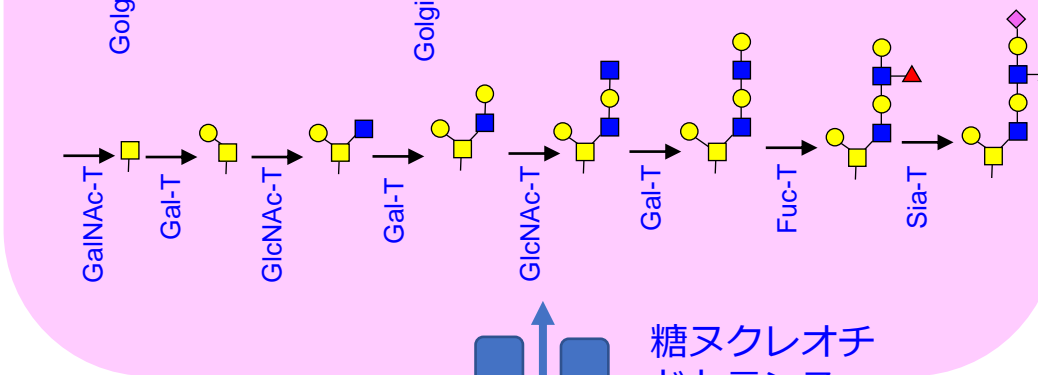
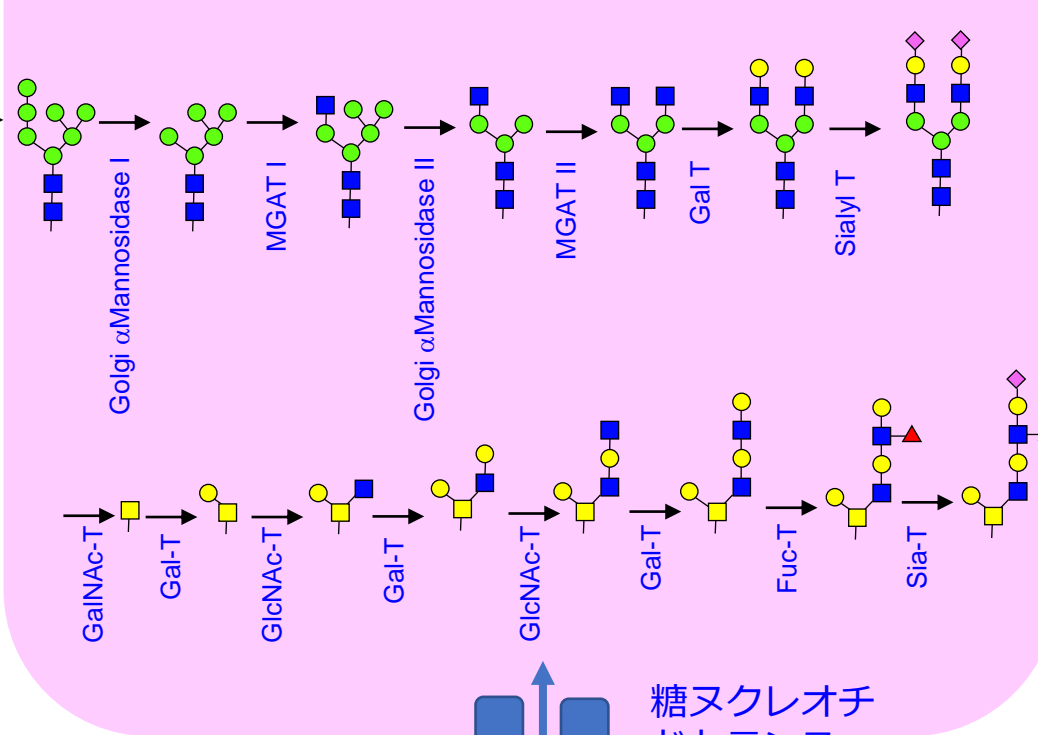
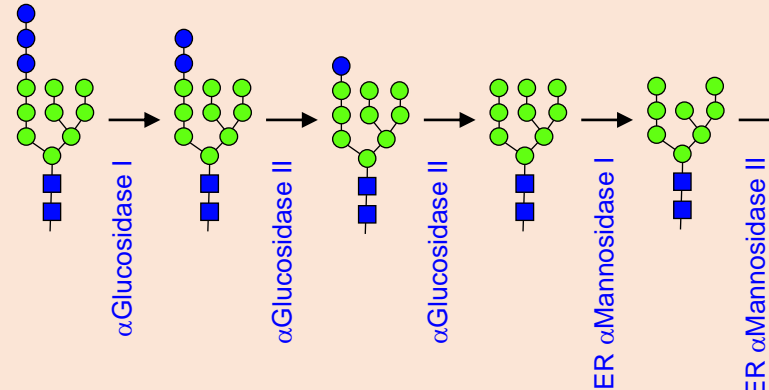
## 小胞体

## ゴルジ体

N型糖鎖

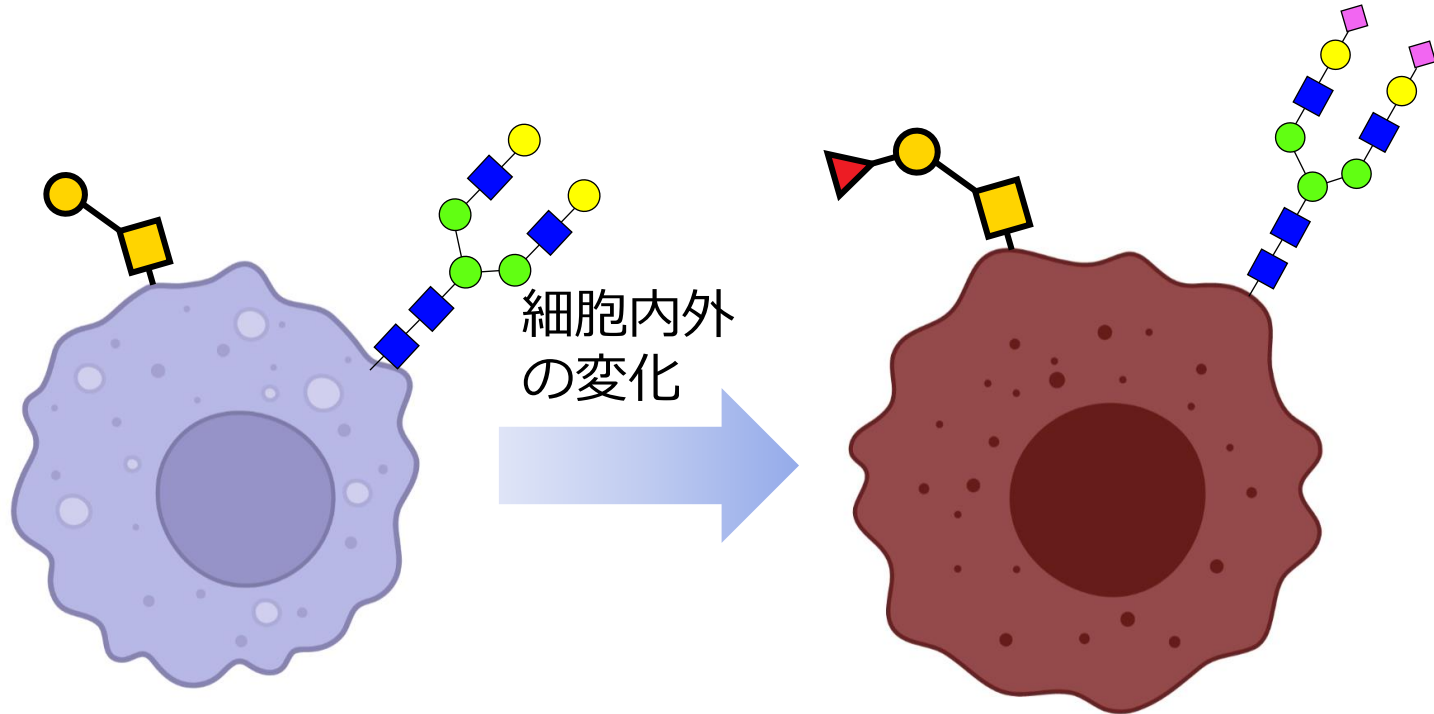
O型糖鎖

G3M9GN2

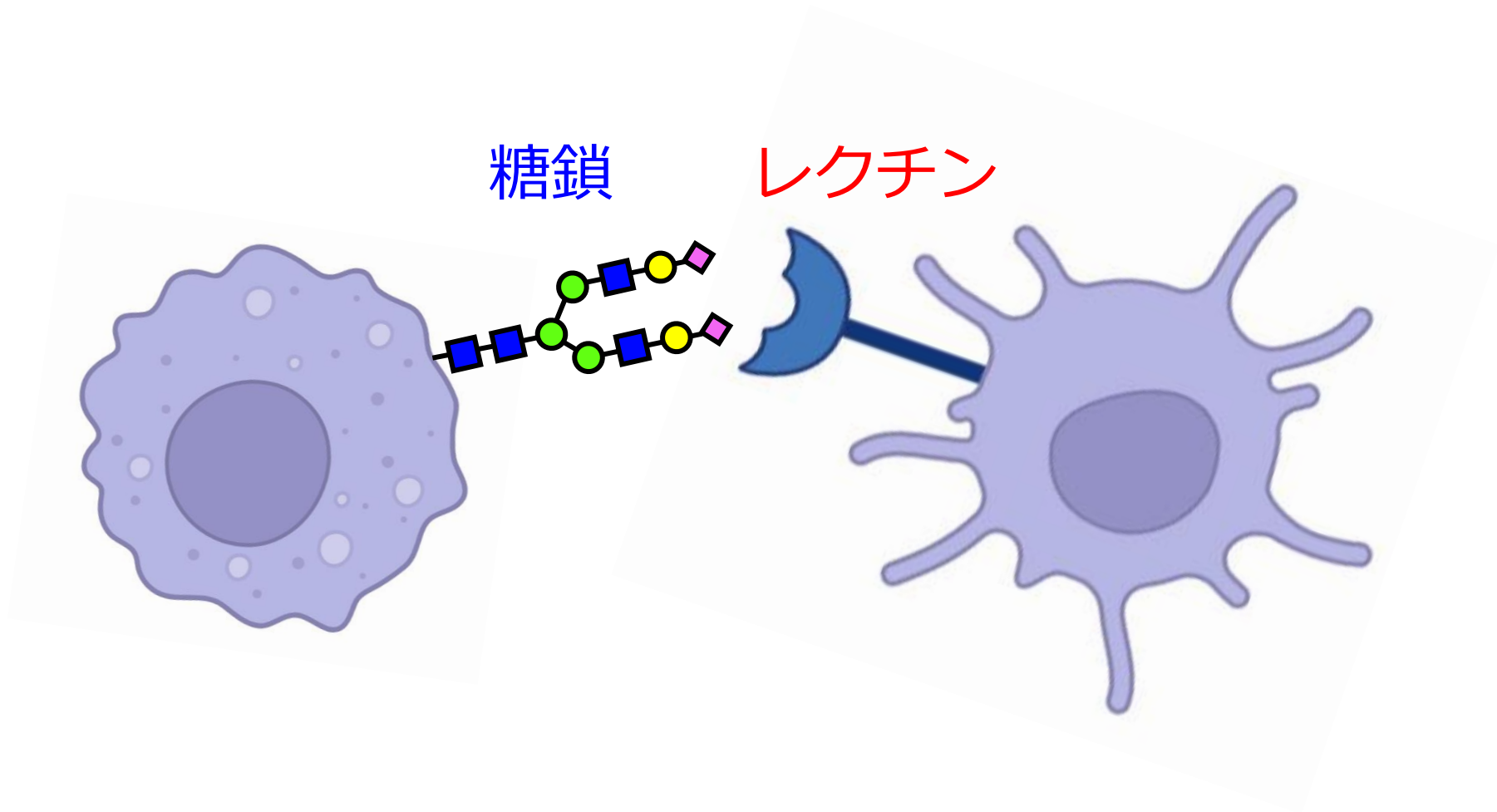


# 糖鎖は「細胞の顔」

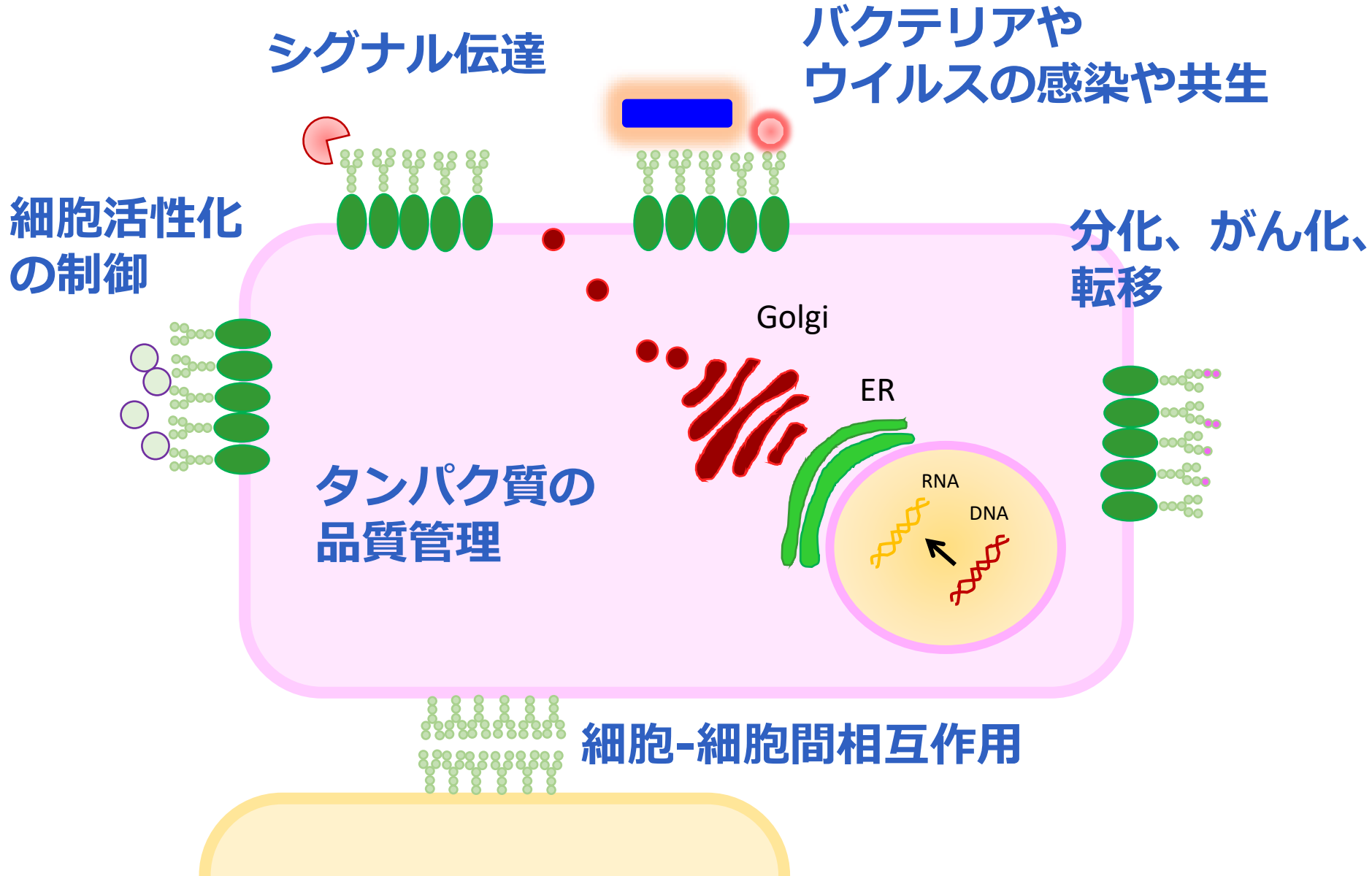
細胞型や細胞の状態（分化・脱分化、がん化、炎症、老化）で変化する



# 糖鎖暗号はレクチンにより受容され、 多細胞間・多臓器間のコミュニケーションを媒介



# 糖鎖-レクチン相互作用は様々な生命現象を媒介



# レクチンとは

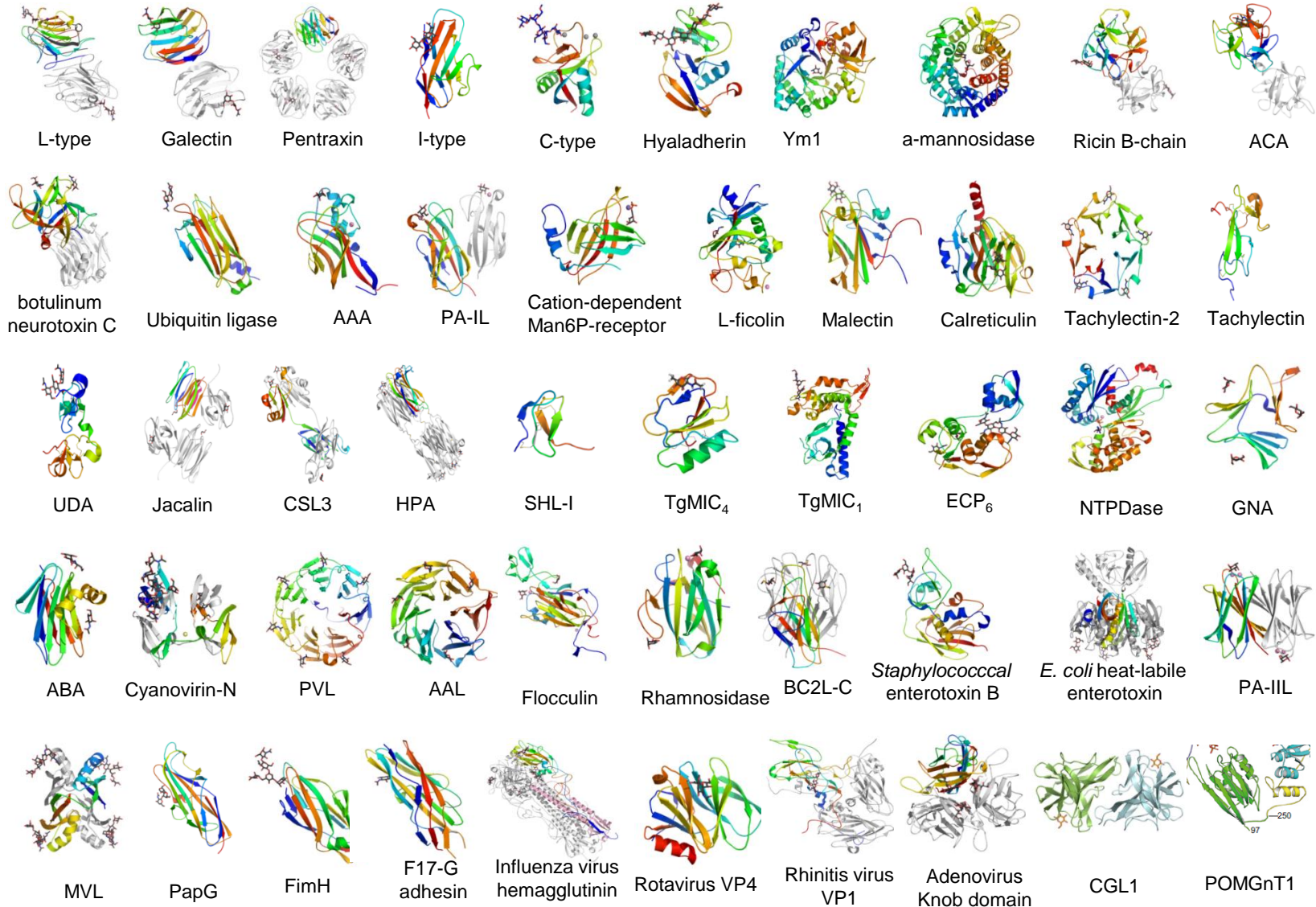
- 1、糖に結合するタンパク質の総称
- 2、ラテン語の「選び出す」*legere*にちなみ、レクチンと名づけられた
- 3、1888年に、ロシアのPeter Hermann Stillmarkにより、トウゴマ種子抽出液から発見されたのが最初（リシン）
- 4、ウイルスから哺乳生物まで全ての生物に存在する
- 5、ヒトでは150種以上のレクチンが知られているが、実際には多くのタンパク質が糖への結合活性を有する



# 様々なタンパク質構造が糖結合活性を持つ

一般的に $\beta$ シートを含む

Fujimoto et al. Methods  
Mol Biol 2014

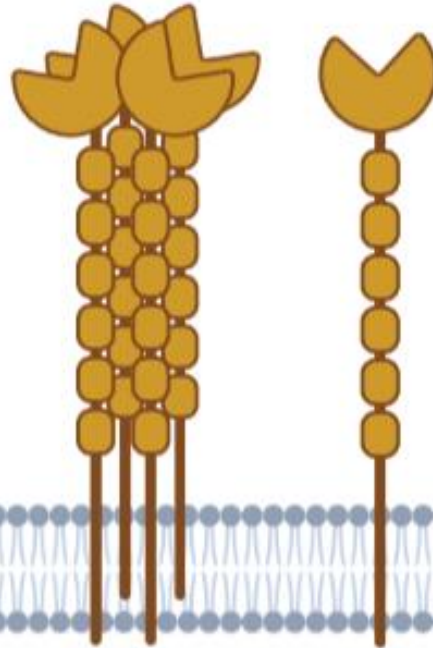


# ヒトに存在する主なレクチン

Galectin  
14種



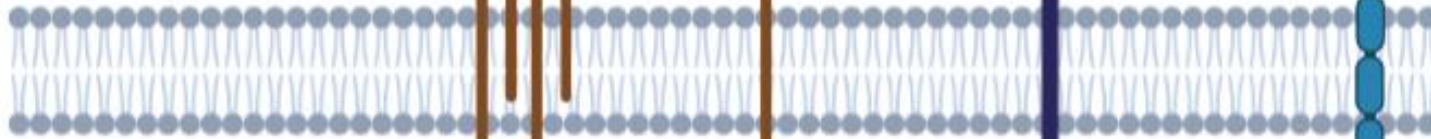
C-type lectin  
~100種



P-type lectin  
1種

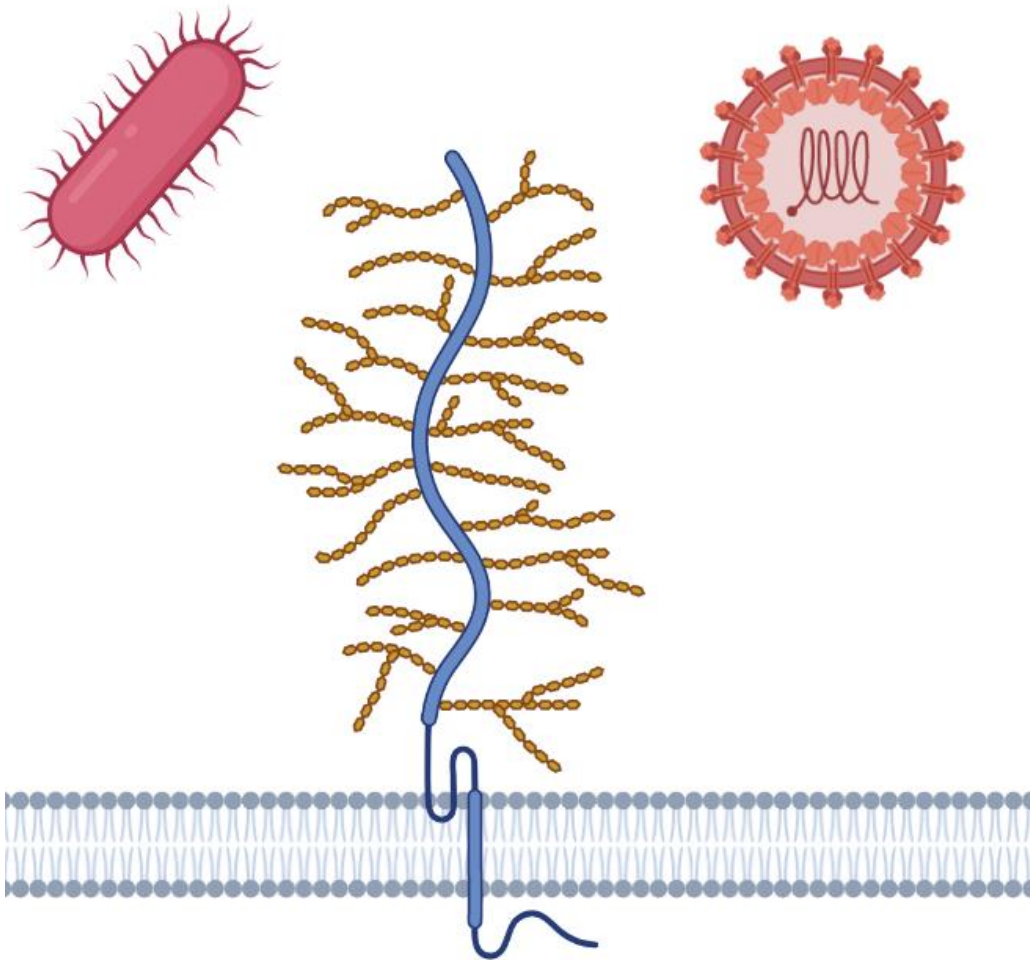


SIGLEC  
14種



# 多くの病原体は、宿主の糖鎖と結合し、感染

ウイルス  
細菌  
真菌



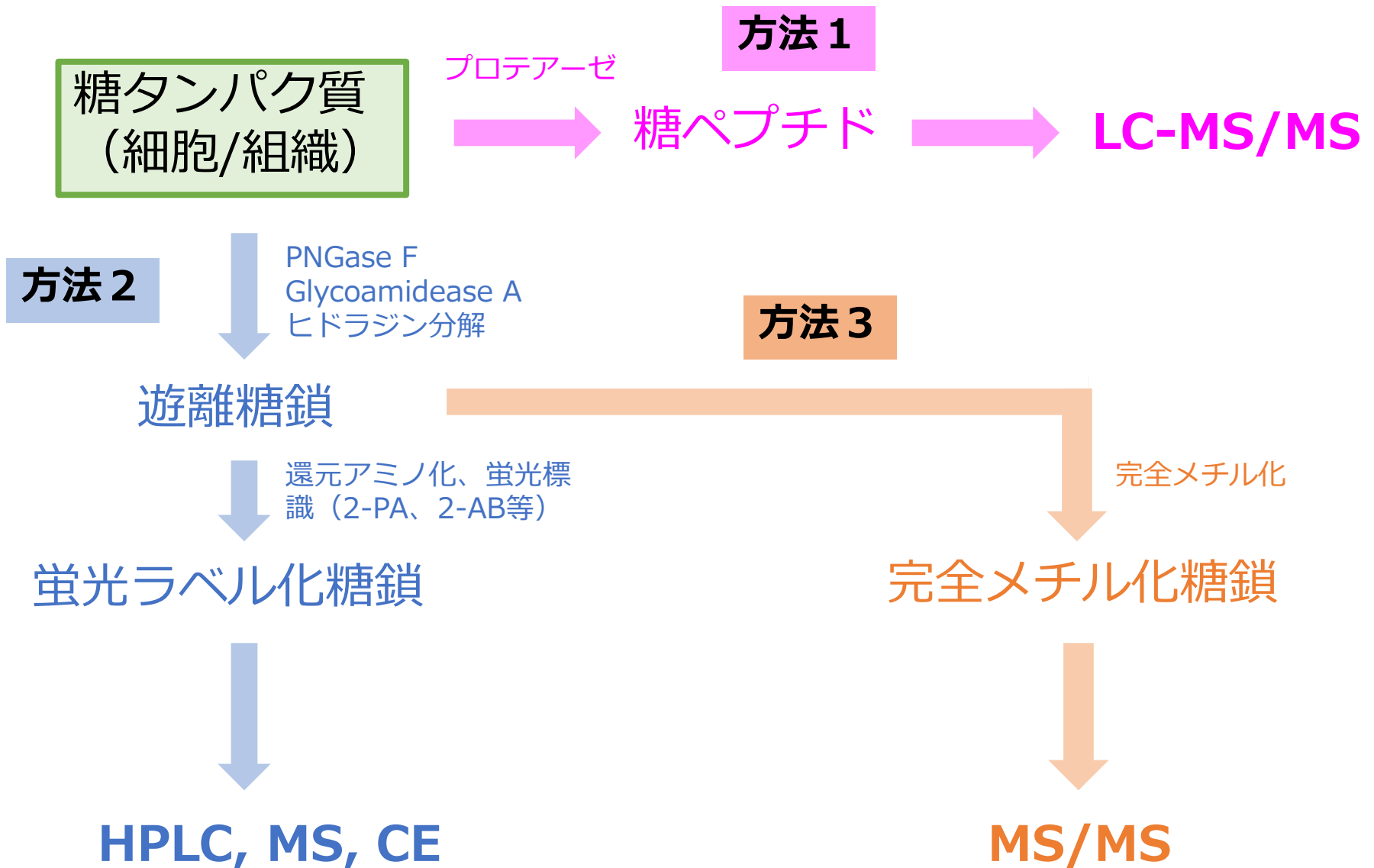
# 代表的な例

分類	病原体の名称	結合する糖
ウイルス	SARS-CoV-2	GAG、糖脂質
	Influenza virus A/B	シアル酸
	Norovirus	血液型糖鎖
	Coronavirus OC43/HKU1	Oアセチルシアル酸
バクテリア	<i>Yersinia enterocolitica</i> SubB	シアル酸
	<i>Escherichia Coli</i> F17a-G	GlcNAc
	<i>Clostridium botulinum</i> HA	Gal/GalNAc
	<i>Salmonella typhi</i> toxin B5	シアル酸
	<i>Vibrio cholerae</i> AB toxin	GM1

# 糖鎖を解析する一般的な方法

1. 質量分析
2. 液体クロマトグラフィー
3. キャピラリー電気泳動
4. NMR
5. 抗体・レクチン染色
6. 抗体・レクチンアレイ

# 一般的な糖タンパク質糖鎖構造解析法

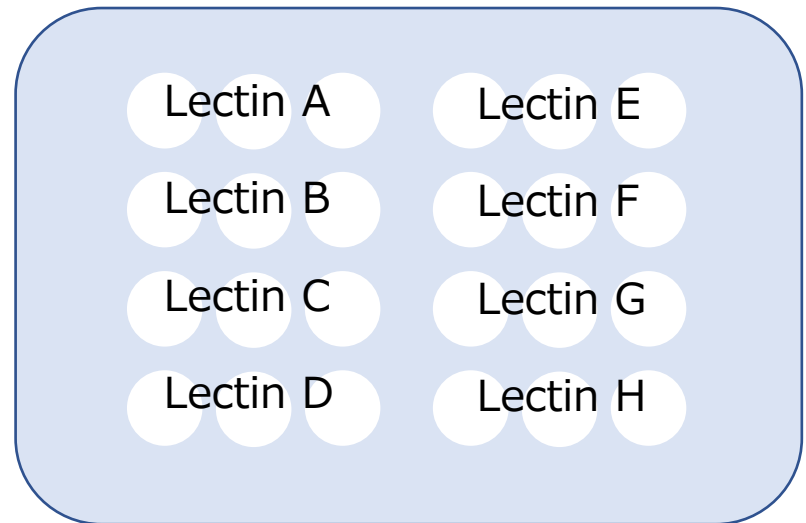
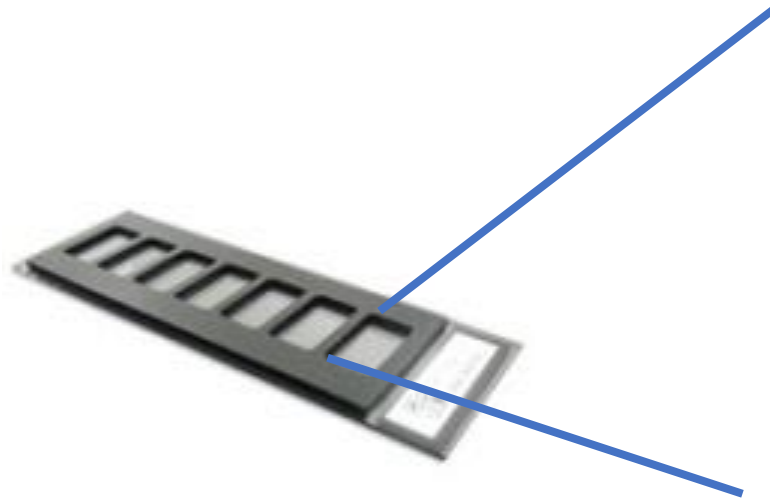


# 抗体・レクチンマイクロアレイ

各種抗体・レクチン



基板の上にアレイ化

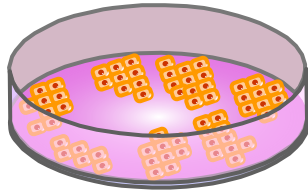


レクチン・抗体との反応パターンから糖鎖プロファイルを高感度取得

# アレイ解析の流れ

細胞

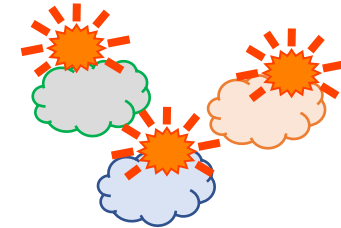
~10 million cells



タンパク質の抽出

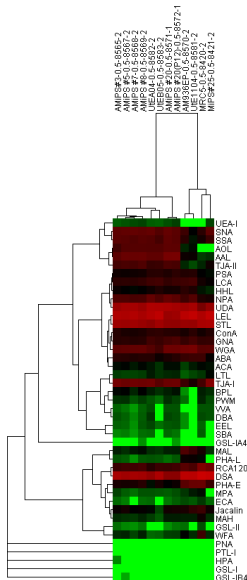


蛍光標識



50 ng =  
~10<sup>3</sup> cells

統計解析



スキャン



レクチンアレイと反応





# 内容

1. 糖鎖・レクチンの基礎
- 2. 糖鎖・レクチン創薬の動向**
3. 1細胞糖鎖RNA同時解析技術  
の開発と創薬応用

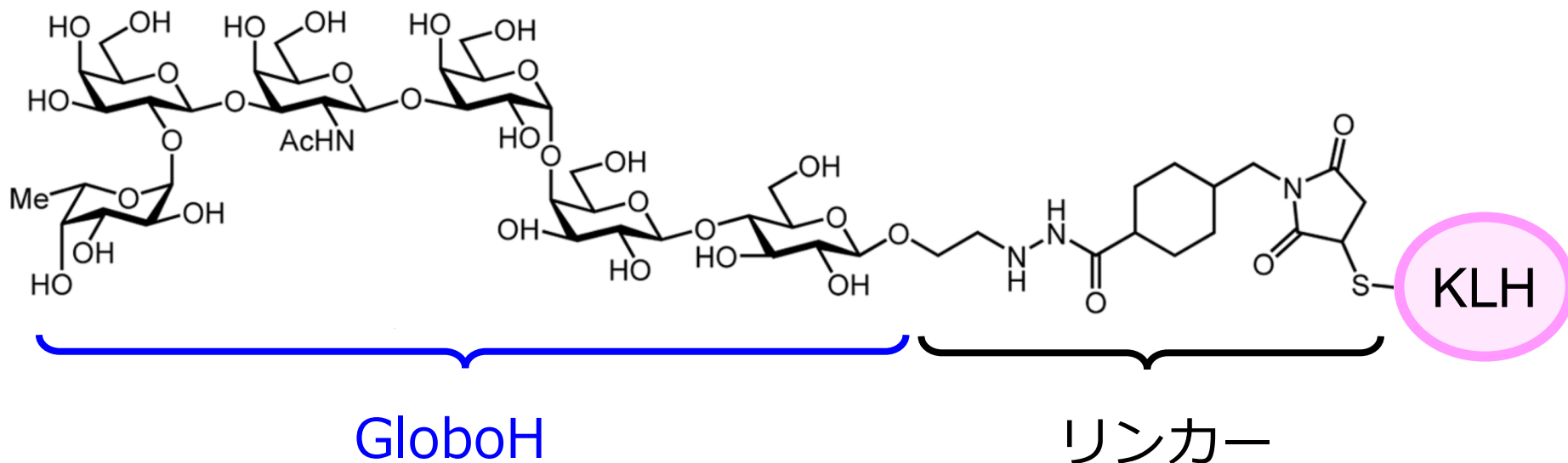
# 糖鎖・レクチン関連医薬

分類	例
糖鎖	ヒアルロン酸（関節機能改善剤）、低分子量ヘパリンフラグメント（Fondaparinux, FDA approval in 2001, 抗凝固薬）
糖ペプチド系抗菌薬	Vancomycin（FDA approved, 抗生物質）、Teicoplanin（FDA approved, 抗生物質）
糖鎖ワクチン	Globo H-KLH/QS-21ワクチン（Adagloxad simolenin, Phase III ongoing, トリプルネガティブ乳がん）
糖加水分解酵素阻害剤	シアリダーゼ阻害剤（oseltamivir/zanamivir, インフルエンザ, FDA approval in 1999）
レクチン阻害剤	汎レクチン阻害剤（Rivipansel, FDA approval in 2020, 鎌形赤血球症）、ガレクチン阻害剤（TD139, 突発性肺線維症）
抗レクチン抗体	CD33抗体（Gemtuzumab ozogamicin, FDA approval in 2017, 白血病）
抗糖鎖リガンド抗体	CD24Fc（Phase III ongoing, ウイルス性肺炎）
抗糖鎖抗体	ジヌキシマブ（FDA approval in 2015, 小児ハイリスク神経芽細胞腫）
抗糖タンパク質抗体	Sotrovimab（FDA approval in 2021, COVID19）、抗MUC16/CA125（Oregovomab, Phase III ongoing, 卵巣がん）
糖鎖標的CAR-T	抗GD2 CAR NKT（Phase I ongoing, 神経芽腫）
抗体-酵素（シアリダーゼ）複合体	HER2抗体-シアリダーゼ複合体（乳がん）
糖転移酵素阻害剤	GlcCer合成酵素阻害剤（Genz-112638, 糖尿病治療薬）
アジュバント	LPS（がん）

# Globo H-KLH/QS-21ワクチン

- 乳がん（幹）細胞ではGloboHが高発現し、がんの進展に関与
- 転移性乳がん（5年生存率27%以下）の治療薬
- OBI Pharma（台湾の企業）で開発中で現在臨床研究が進行中（Phase3）

## OBI-822 (OBI pharma)



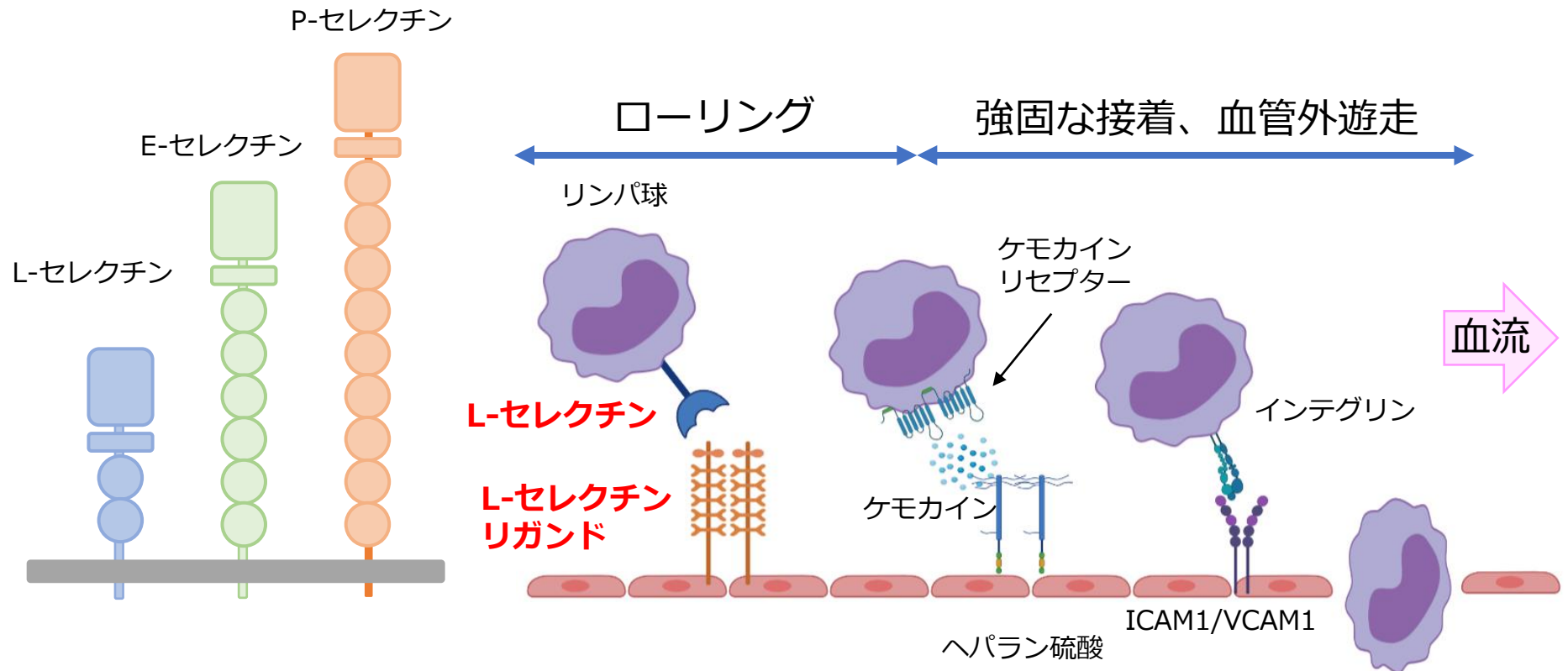
# セレクチン

- ・ Cタイプレクチンの一種で白血球と血球内皮細胞との接着に関与
- ・ 白血球の炎症部位や高内皮細静脈への遊走に関与

L-セレクチン：白血球に発現

E-セレクチン：血管内皮に発現

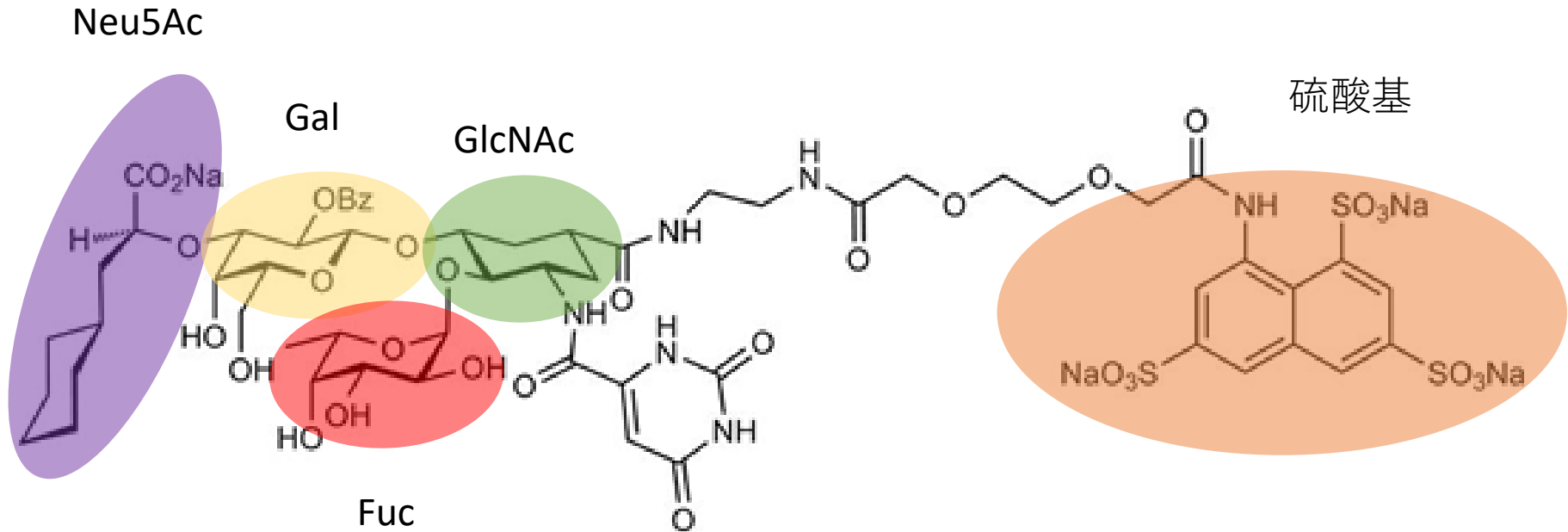
P-セレクチン：血小板に発現



セレクチン阻害剤は抗炎症剤として期待

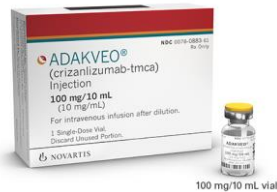
# Rivipansel : 汎セレクチン阻害剤の開発

sLeX

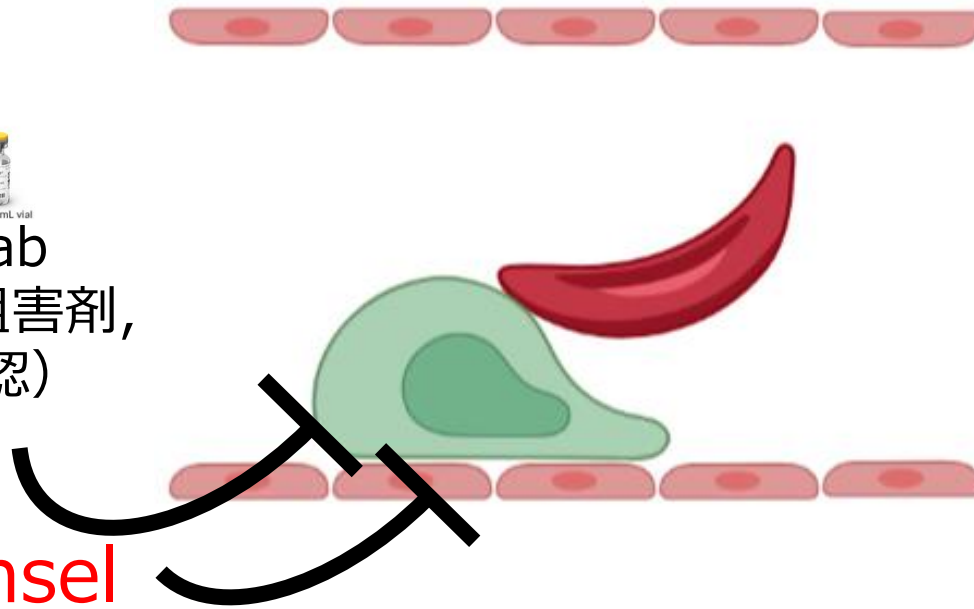


# 汎セレクチン阻害剤：Rivipansel Glycomimetics社

鎌状赤血球症による血管閉塞症の治療薬  
として効果を発揮し、2020年にFDA承認



Crizanlizumab  
(P-selectin阻害剤,  
2019FDA承認)



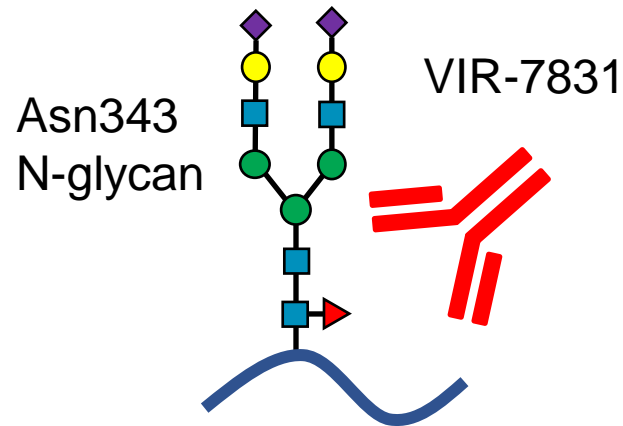
Rivipansel

白血球の血管内皮細胞への接着を阻害

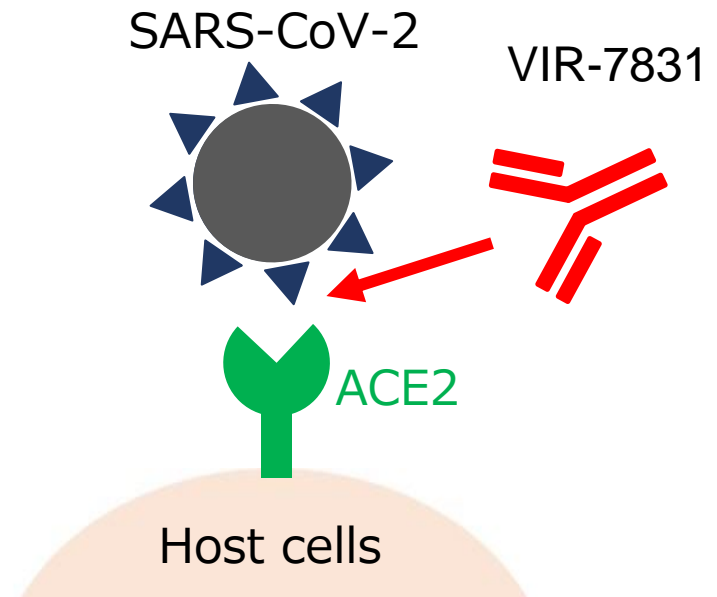
# Sotrovimab VIR-7831

- SARS-CoV-2 Sタンパク質のリセプター結合ドメイン（RBD）に高度に保存されているAsn343に修飾されたN型糖鎖のコアフコースとその近傍ペプチドを認識
- 中和活性、ADCC活性、ADCP活性を持つ
- Vir Biotechnology, Inc.とGSKが開発（2021年5月にFDAとEUAから承認）
- オミクロン株にも効果を示す

Sタンパク質に高度に保存されている  
Asn343のN型糖鎖と近傍ペプチドを認識



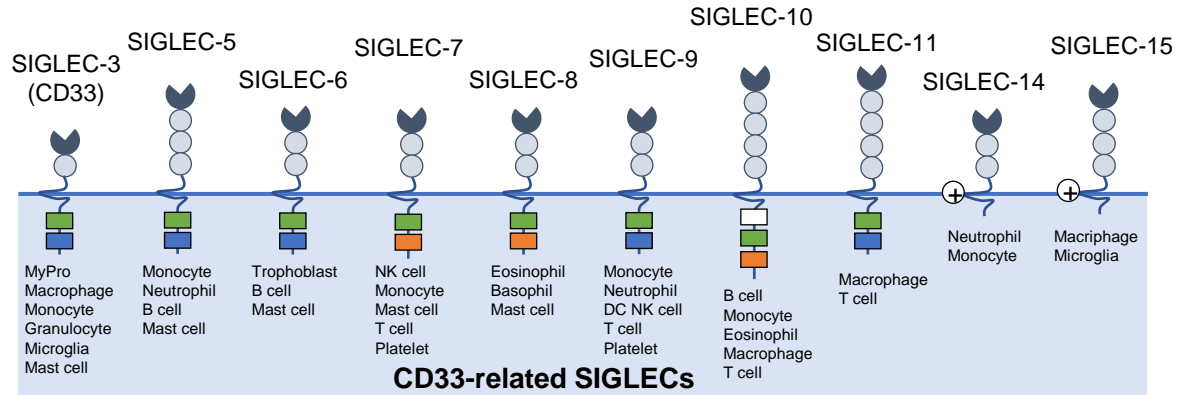
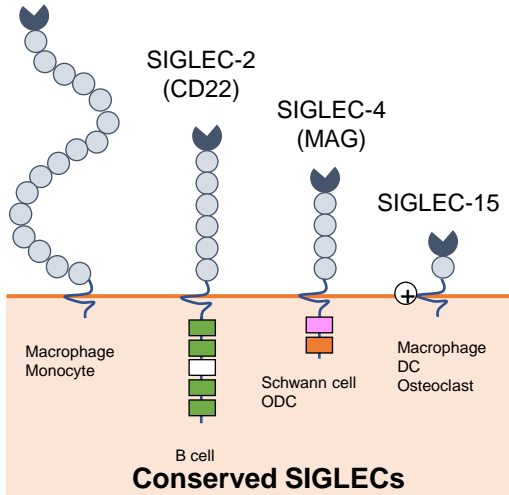
SARS-CoV-2がACE2受容体に  
結合するのを阻害



# シグレック シアル酸特異性レクチン

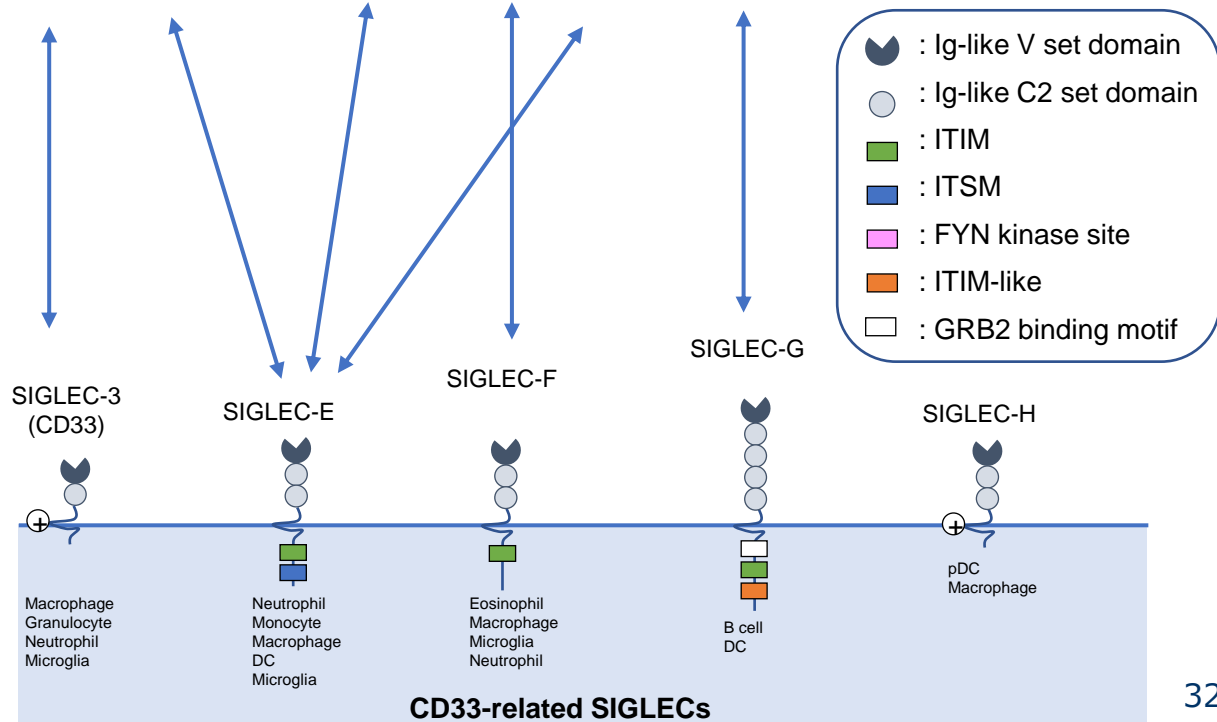
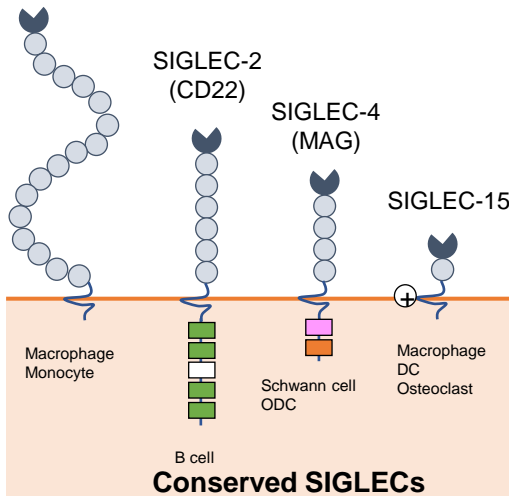
ヒト: 14種

SIGLEC-1  
(Sialoadhesin)



マウス: 9種

SIGLEC-1  
(Sialoadhesin)



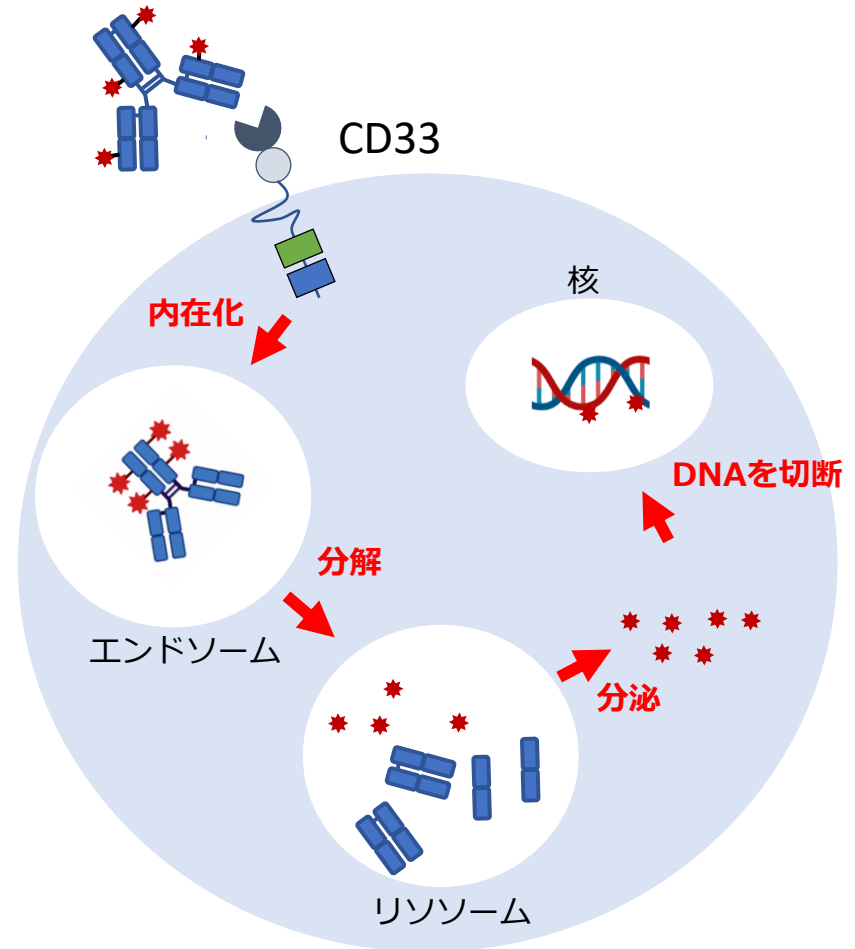
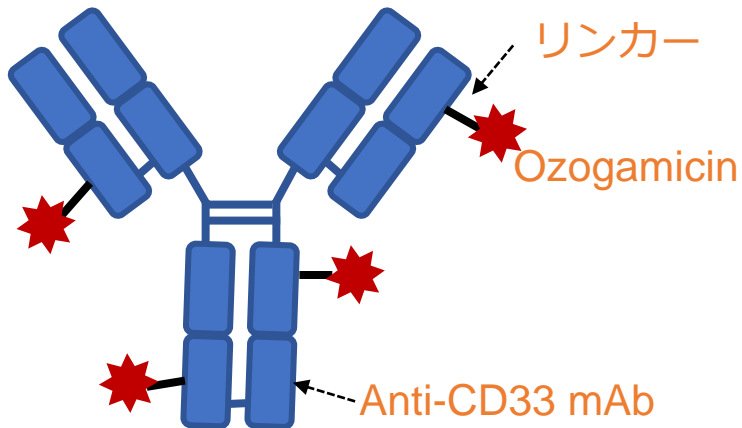
- : Ig-like V set domain
- : Ig-like C2 set domain
- : ITIM
- : ITSM
- : FYN kinase site
- : ITIM-like
- : GRB2 binding motif



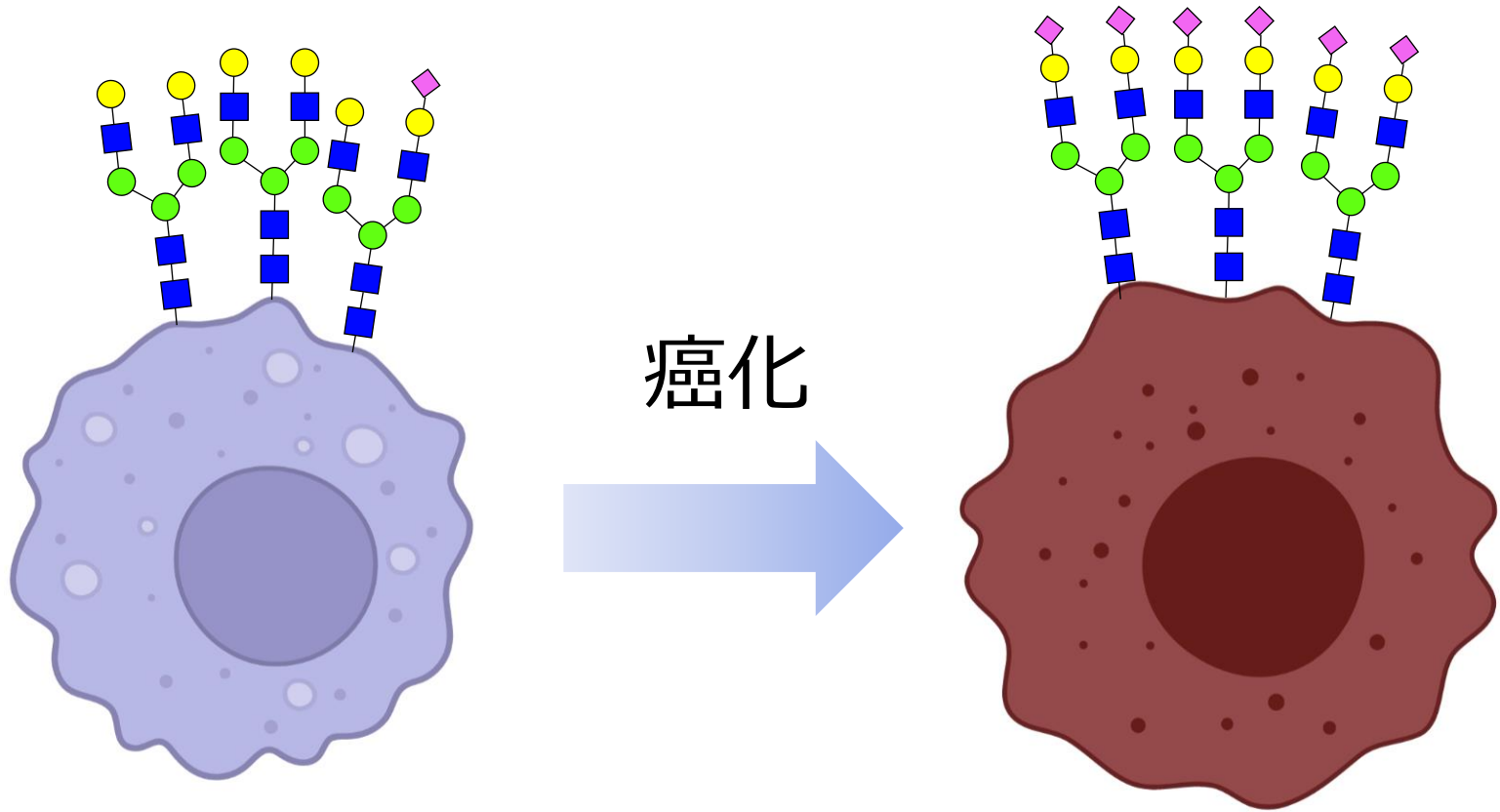
# 抗CD33抗体-薬物複合体 (ADC) : Gemtuzumab Ozogamicin

- SIGLEC-3 (CD33) は骨髄細胞に発現
- 急性骨髄白血病 (AML) の治療薬
- 2000年にFDAから承認

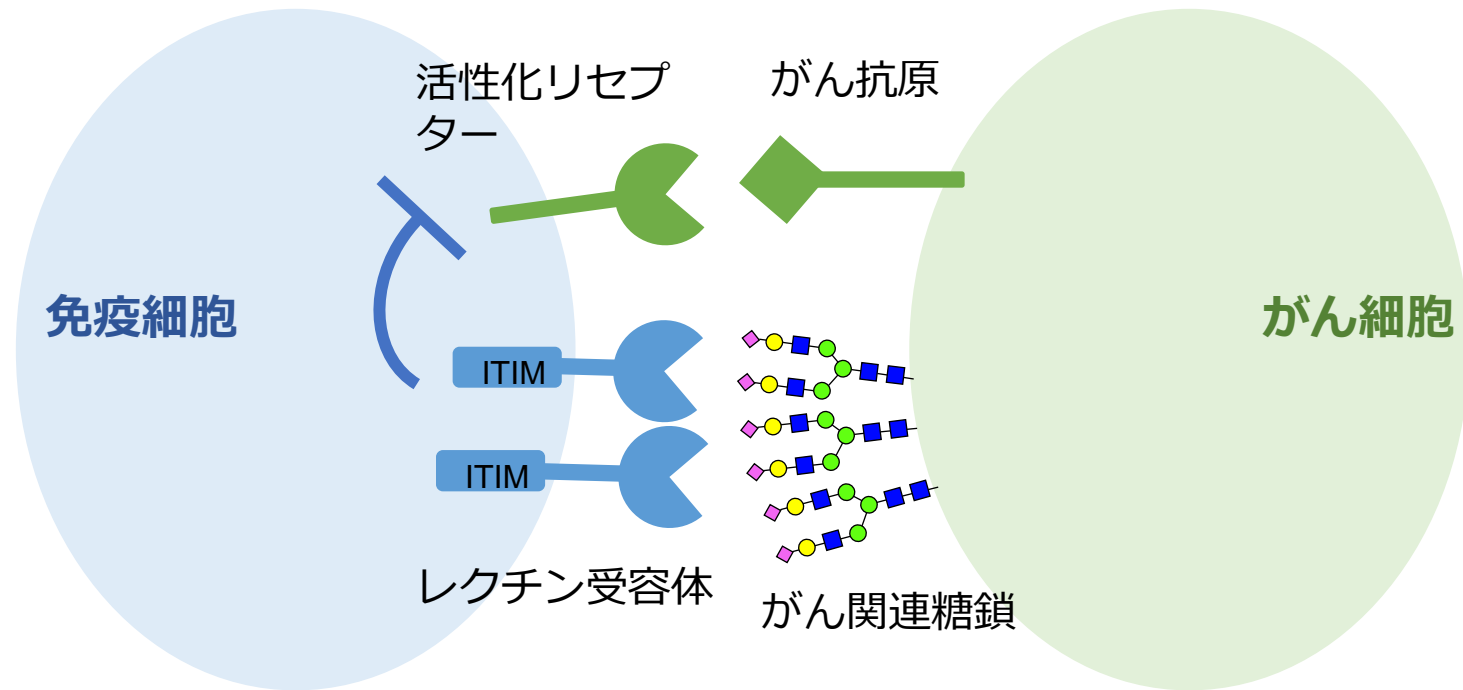
## Gemtuzumab Ozogamicin



# 癌化によりシアル化が亢進



# 糖鎖免疫チェックポイント



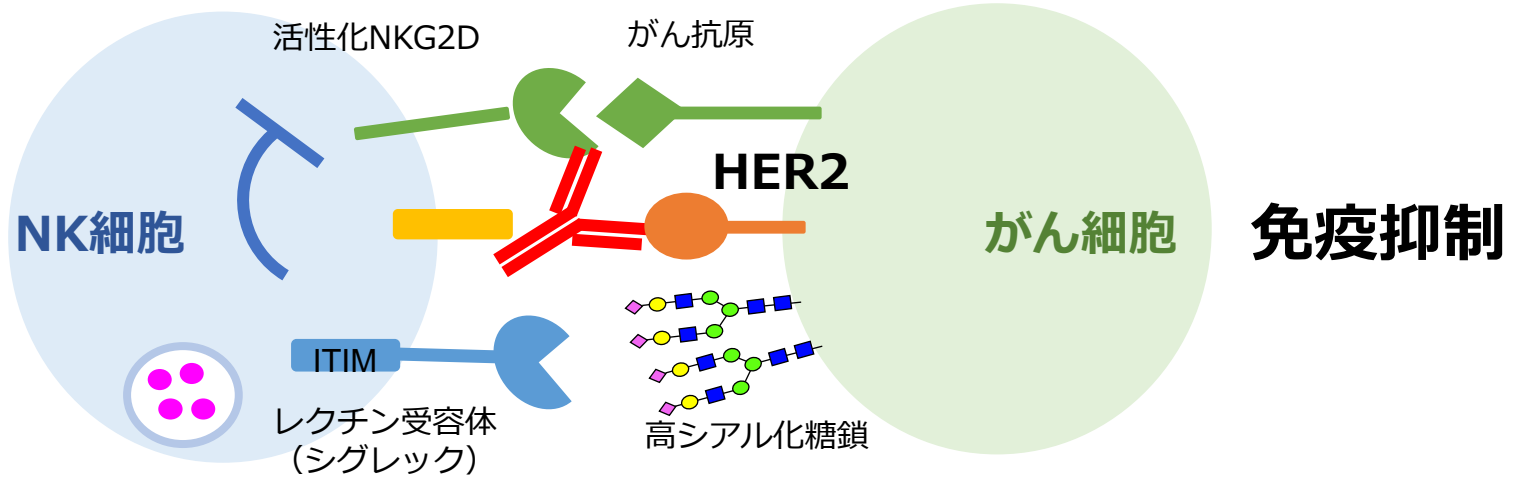
- ・レクチン受容体 (SIGLEC等) はがん関連糖鎖と相互作用し、免疫抑制を誘導する

- ・がん細胞は正常細胞とは異なる糖鎖を発現し、免疫回避

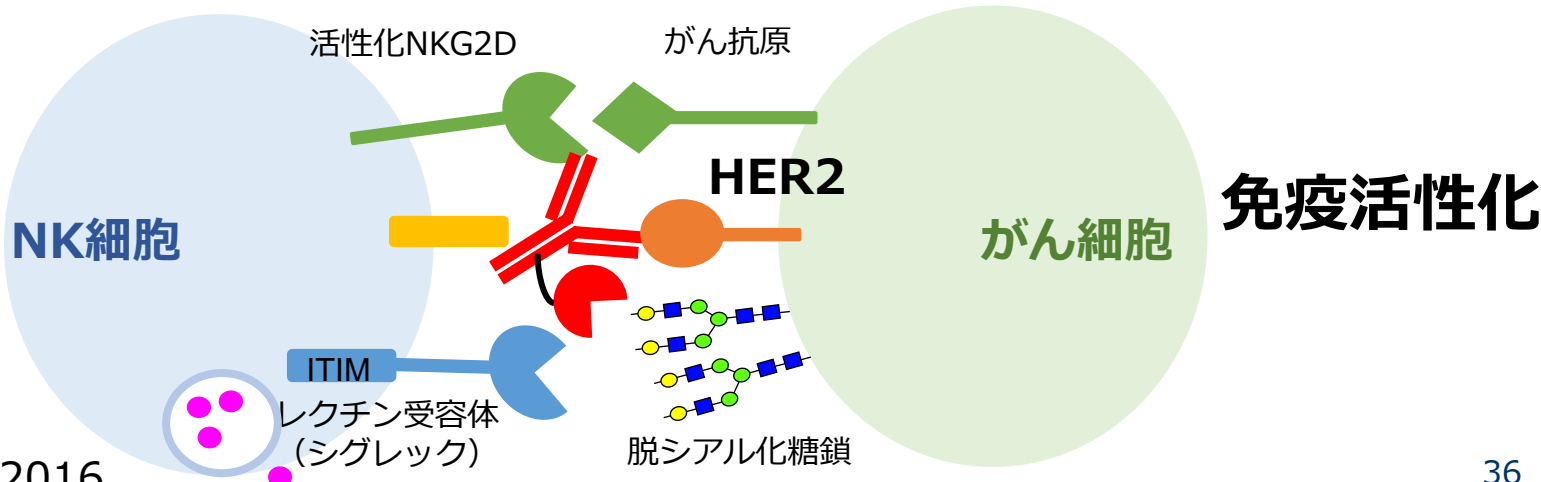
# 抗体-シアリダーゼ複合体による癌細胞を脱シアル化 →NK細胞依存的ADCCを増強

- Palleon Pharmaceuticals社で実用化に向けて研究が進められている

HER2抗体  
処理



HER2抗体-  
シアリダーゼ  
処理

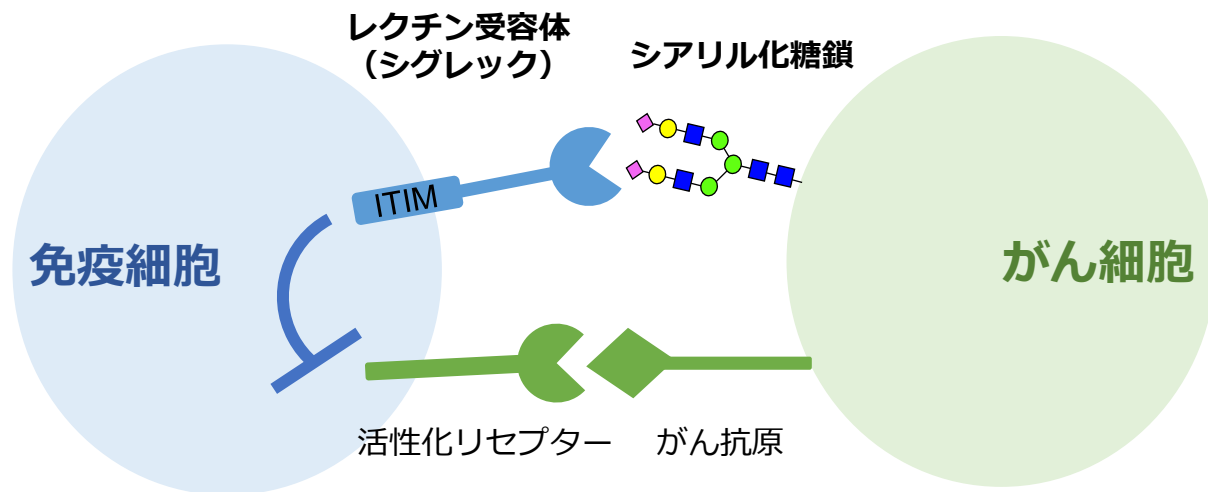


# 各種のシグレック標的治療薬

1. SIGLEC抗体
2. 組換えSIGLECリガンド
3. 糖鎖被覆ナノ粒子
4. 抗SIGLECリガンド抗体
5. SIGLECデコイ
6. 抗体-シアリダーゼ複合体



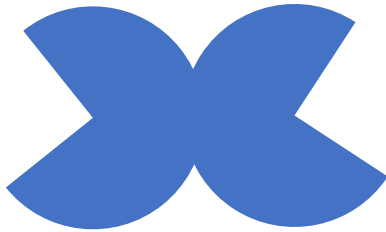
SIGLEC-糖鎖リガンド相互作用を阻害し、  
糖鎖免疫チェックポイントを解除



# ガレクチン

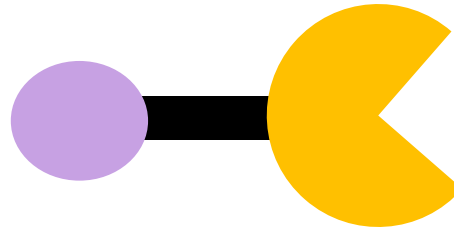
- ・分泌型のレクチンで、ヒトで14種類存在
- ・ドメイン構造により、プロト、キメラ、タンデムリピートの3種に大きく分類
- ・ $\beta$ -ガラクトシドに結合する

プロト



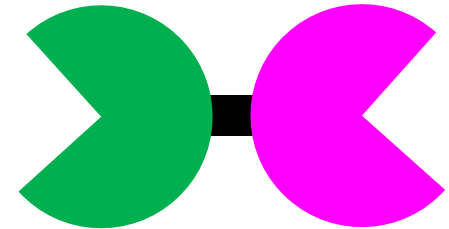
Galectin-1,2,5,7,  
10,11,13,14

キメラ



Galectin-3

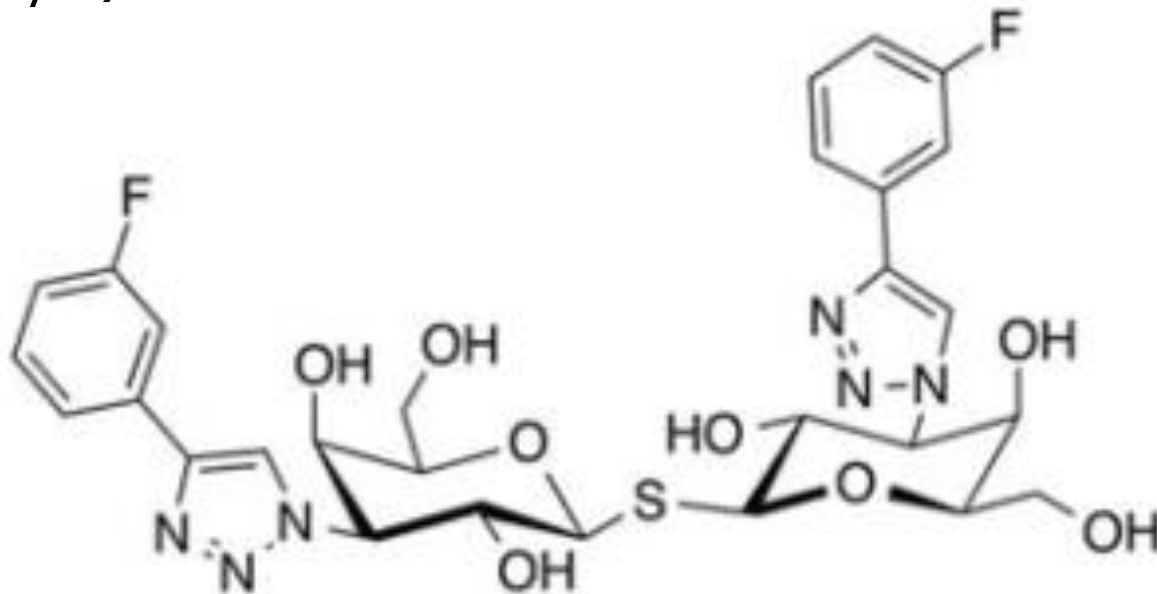
タンデムリピート



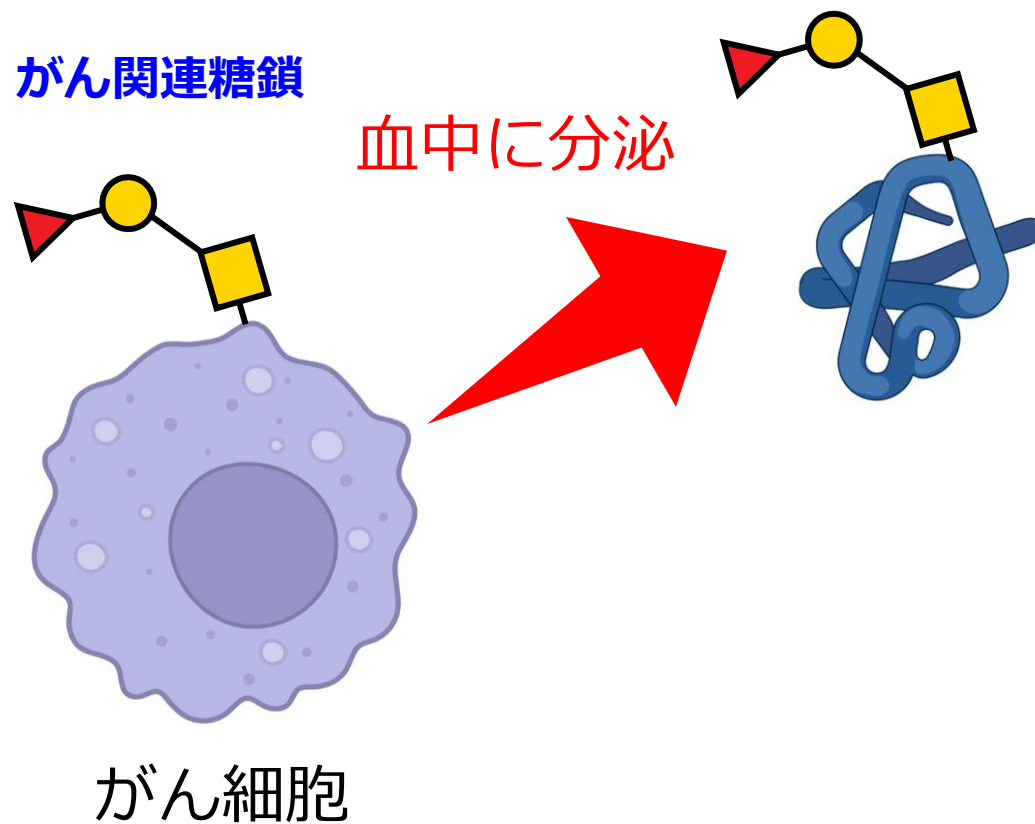
Galectin-4,6,8,9,12

# Olitigaltin TD139

- ・ガレクチン3の糖鎖リガンド ( $\beta$ -thiodigalactoside)
- ・肺に高発現し、炎症に関係するガレクチン3を特異的に阻害することで、特発性肺線維症に効果を示す
- ・COVID19の治療薬として、Galecto, Inc社で開発中 (phase2/3)



# 糖鎖関連診断薬



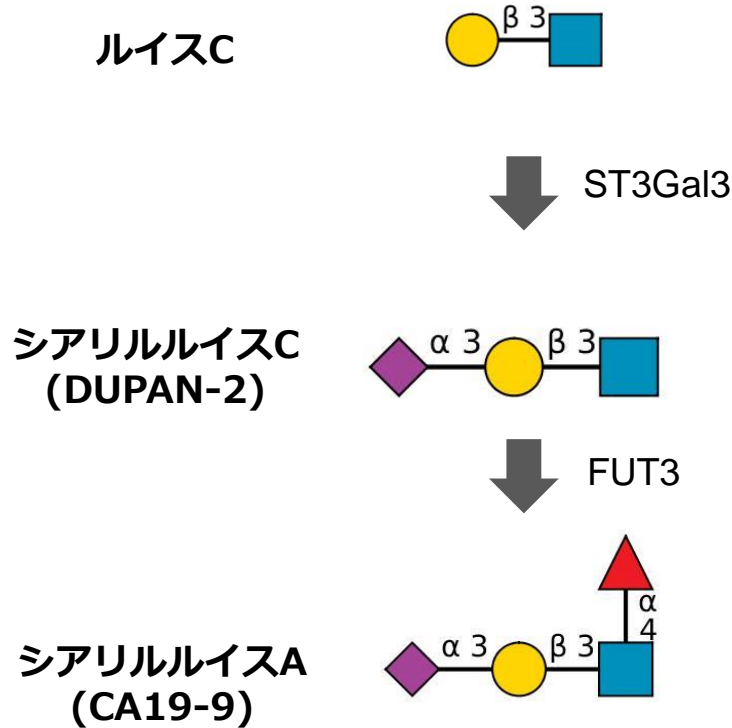
がん関連糖鎖  
で修飾された  
糖タンパク質  
=がんマーカー



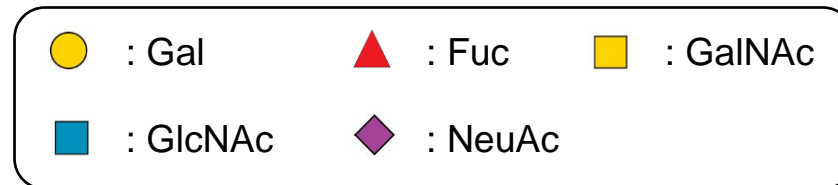
# 糖鎖関連診断薬

分類	例
抗糖鎖抗体	CA19-9 (sLeA, 膵がん) DUPAN-2 (sLeC, 膵がん) STN (sTn, 胃がん) SLX (sLeX, 卵巣がん)
抗糖タンパク質抗体	CEA (消化器がん) CA125 (卵巣がん) CA72-5 (卵巣がん、乳がん) PSA (前立腺がん)
レクチン-タンパク質抗体	AFP-L3 (肝がん) M2BPGi (肝線維化)

# 膵がんマーカー合成経路 (DUPAN-2とCA19-9)



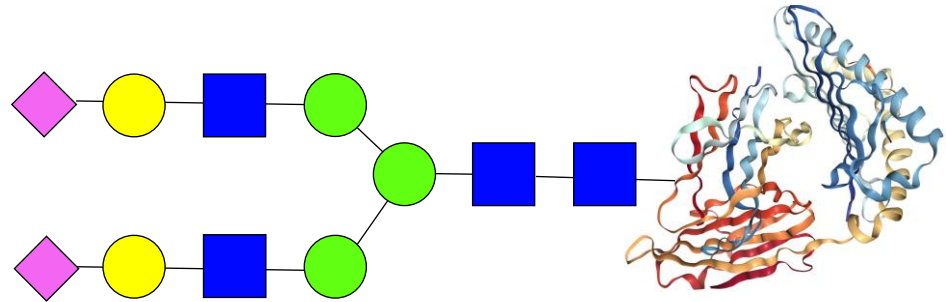
日本人の10%はルイス陰性



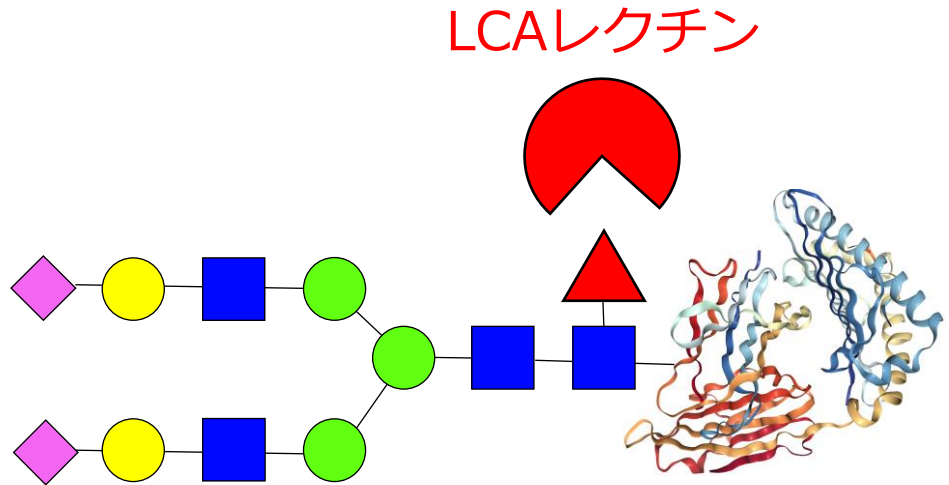
# 肝がんマーカー（AFP-L3）

肝がんでは $\alpha$ -Fetoprotein（AFP）にある1本のN型糖鎖がコアフコシル化される

AFP  
肝臓の炎症で上昇



AFP-L3  
肝がん特異的に上昇



自動化測定装置（ $\mu$ TASWako）が富士フィルム和光純薬から製品化

# 糖鎖・レクチン創薬の課題と解決法

## (課題)

1. 新たな糖鎖標的の探索が進んでいない
2. 糖鎖-受容体相互作用ネットワークの全体像が不明であり、制御薬を戦略的に開発できない
3. 早期診断への応用が進んでいない



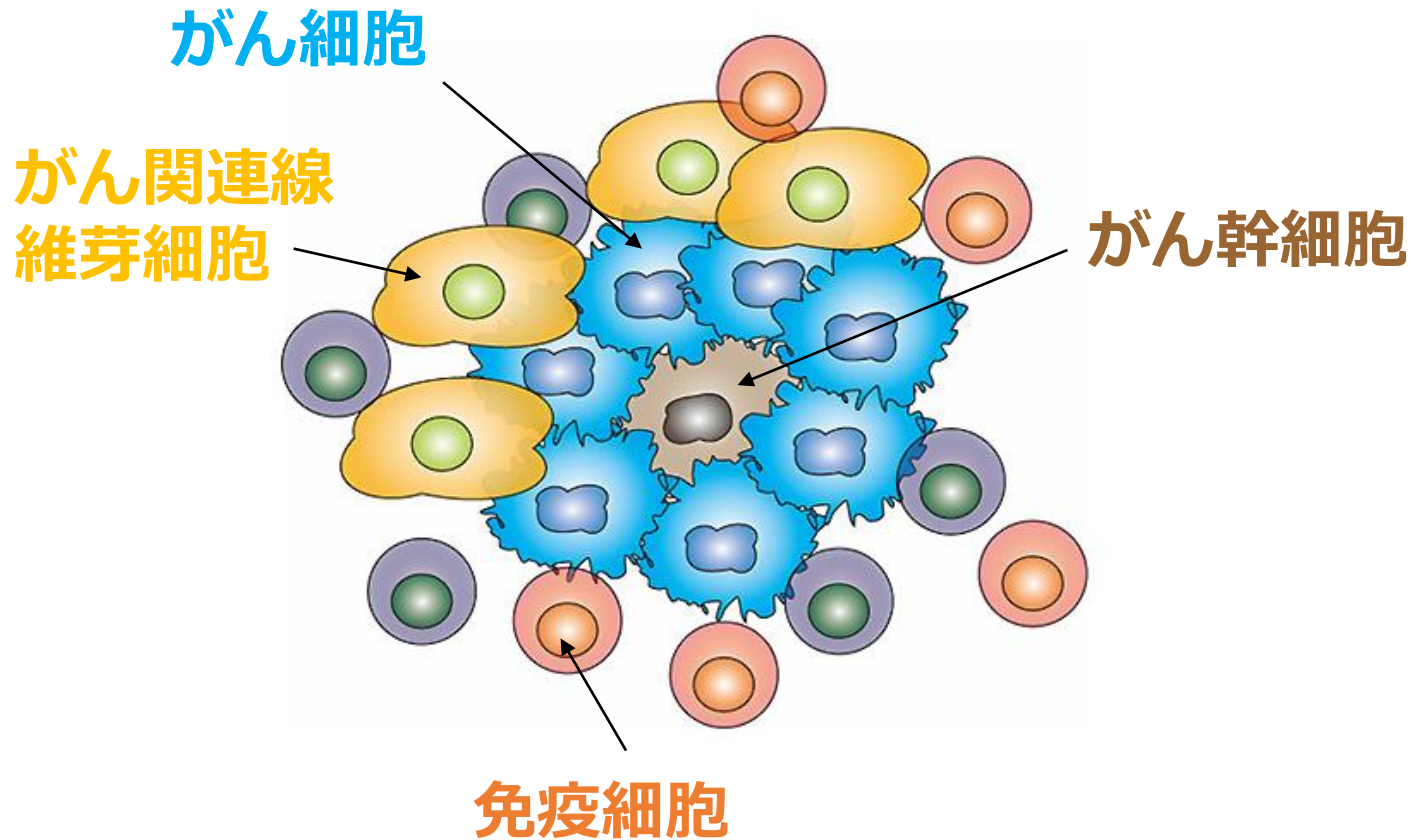
## (解決法)

1. 新たな糖鎖解析技術を用いた糖鎖標的の探索
2. 糖鎖-レクチン相互作用ネットワークの解明による制御薬の開発
3. 早期疾患に発現する糖鎖マーカーの探索

# 内容

1. 糖鎖・レクチンの基礎
2. 糖鎖・レクチン創薬の動向
- 3. 1 細胞糖鎖RNA同時解析技術  
の開発と創薬応用**

# がん微小環境

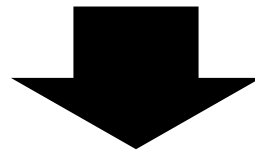


様々な細胞で構成されている

# 従来の糖鎖解析技術の課題

## (課題)

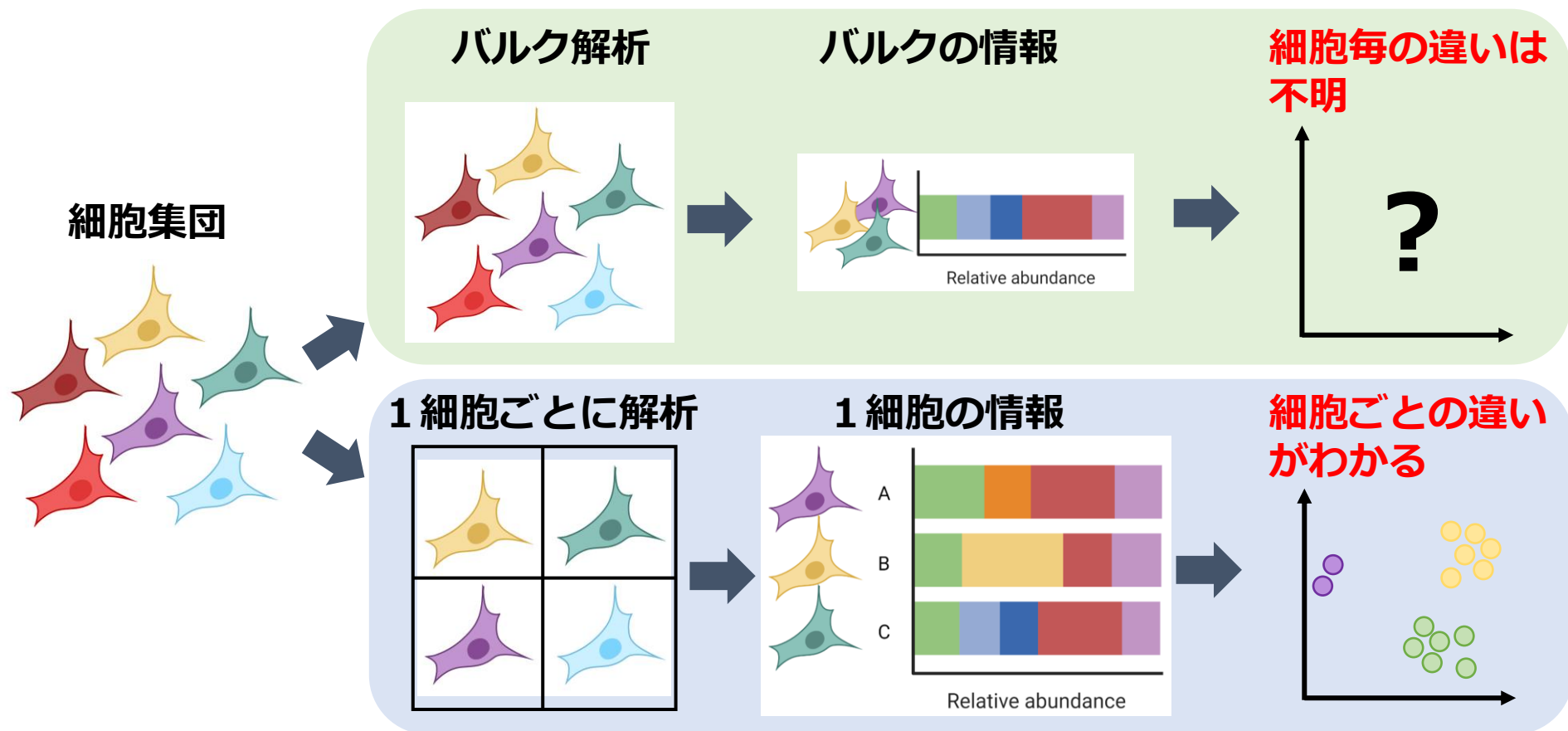
1. 従来の糖鎖解析技術では、腫瘍組織を構成する個々の細胞の糖鎖情報を取得できない
2. 細胞を破壊して解析に用いるため、他のオミクス情報を同時に取得できない



## (解決法)

1 細胞ごとの糖鎖とRNA（遺伝子）を同時解析する技術を開発することで、がん微小環境を構成する個々の細胞の糖鎖や、糖鎖-レクチン相互作用ネットワークの全体像を解明できる

# 1 細胞解析の利点

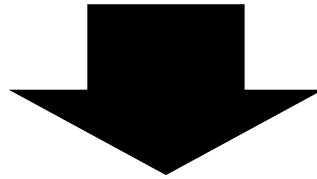


結果が平均化されない

1. 細胞集団内の不均一性の解析  
(細胞亜集団の同定)
2. 細胞種毎の細胞応答
3. 希少細胞のマーカ探索



なぜ 1 細胞ごとの糖鎖情報を  
取得することが難しいのか？



糖鎖情報を増幅できないため

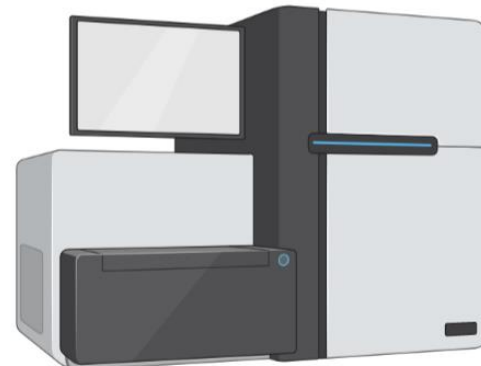
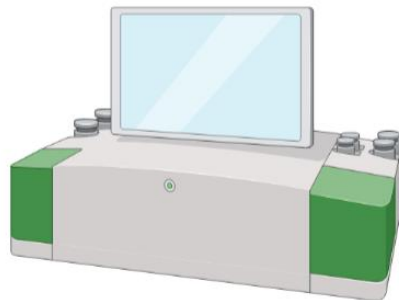
# 糖鎖情報を遺伝情報に変換

糖鎖認識プローブ  
(レクチン)

DNAバーコード



糖鎖情報をPCRで増幅し、発展目覚ましい  
様々な遺伝子解析装置で解析可能となる



# 1 細胞糖鎖RNA同時プロファイリング技術 (scGR-seq)

## 方法の概要

41種のDNAバーコード標識レクチンを細胞に反応

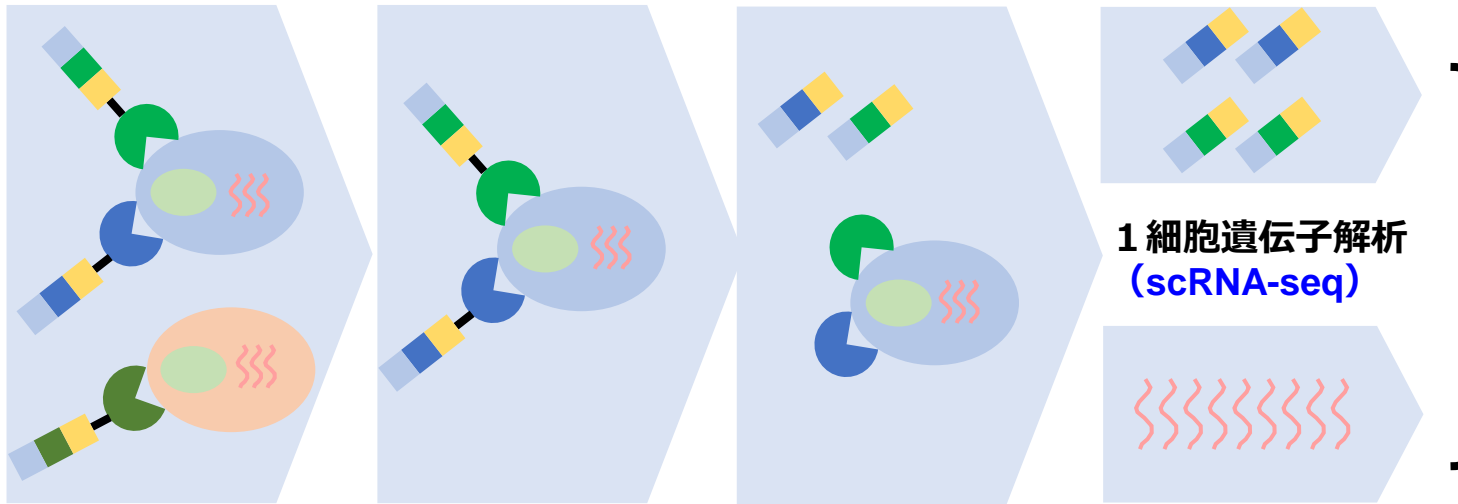
1 細胞毎に分離

光照射でDNAバーコードを遊離

1 細胞糖鎖解析  
(scGlycan-seq)

1 細胞遺伝子解析  
(scRNA-seq)

scGR-seq

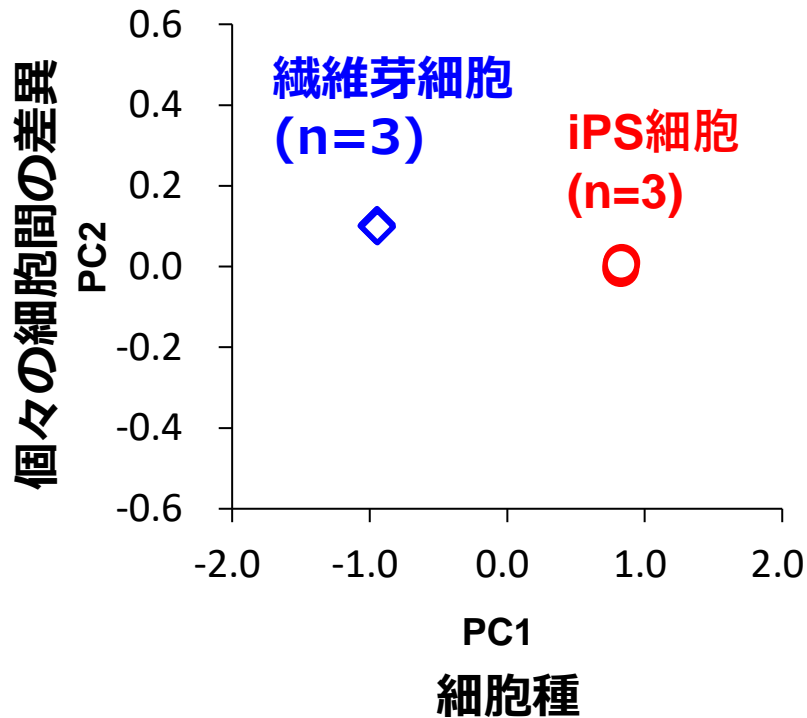


Minoshima et al. iScience 2021

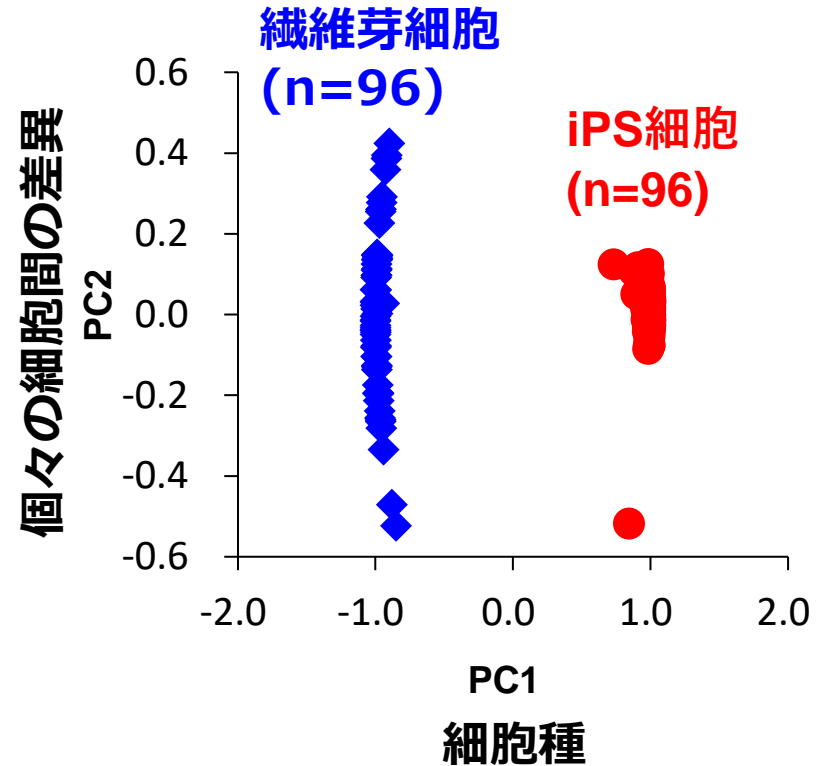
Odaka et al. STAR Protocols 2022

# バルクと1細胞のGlycan-seq (iPS細胞 vs 繊維芽細胞)

## バルク(PCA)



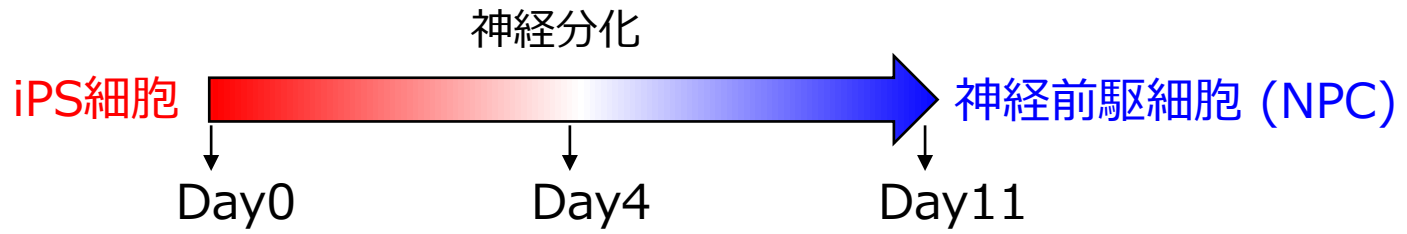
## 1細胞(PCA)



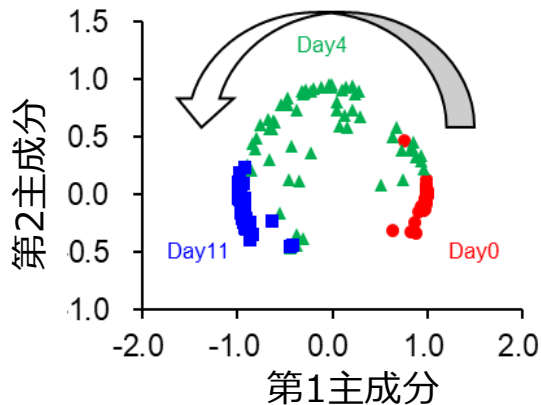
Minoshima et al.  
iScience 2021

1細胞ごとの糖鎖プロファイルの違いがわかる

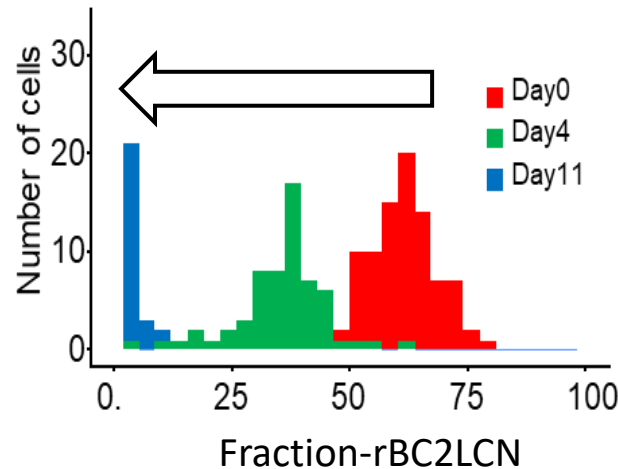
# scGlycan-seq (iPS細胞 vs iPS細胞由来神経前駆細胞)



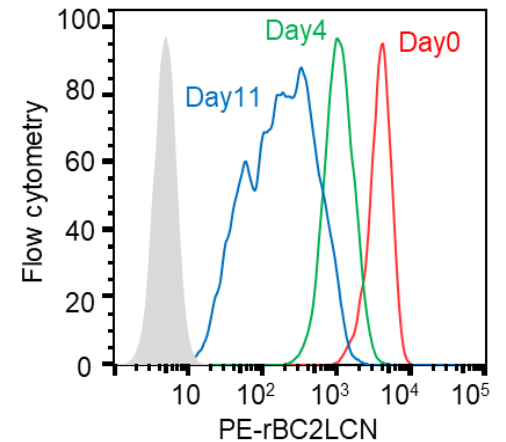
PCA (主成分分析)



scGlycan-seq  
(BC2レクチン：iPS特異的レクチン)

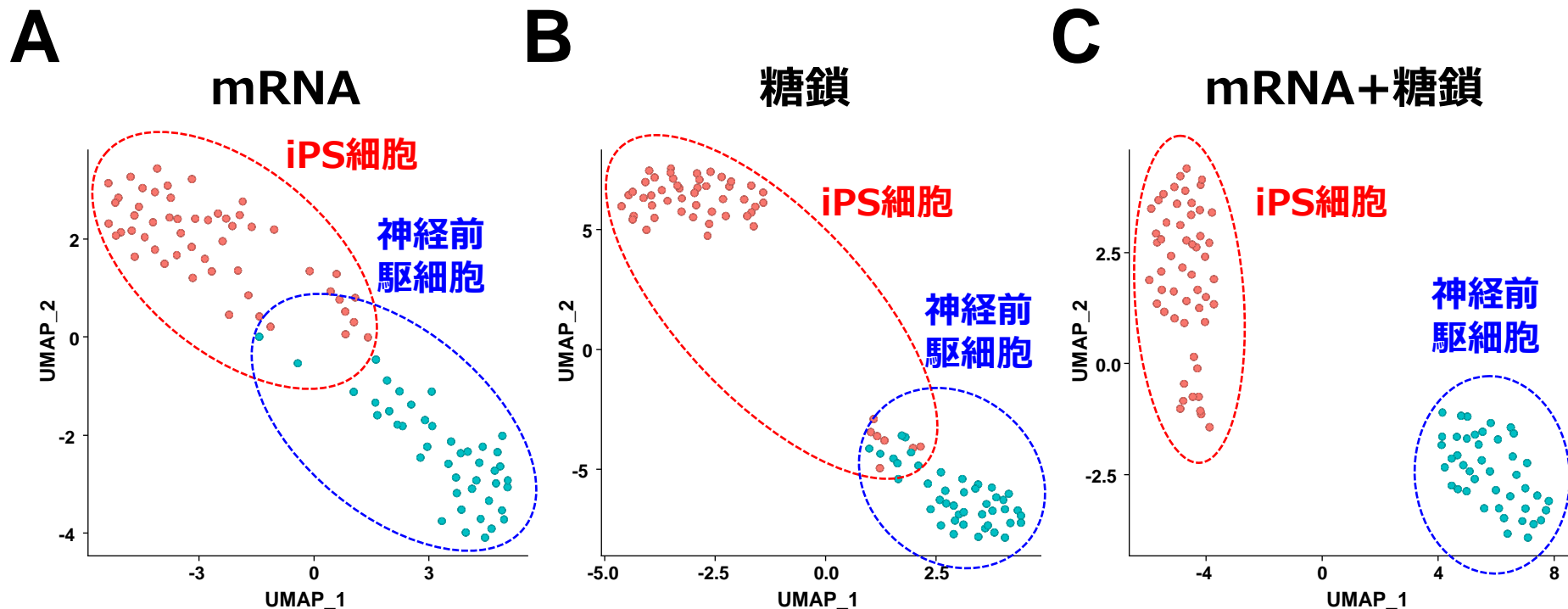


フローサイトメトリー  
(BC2レクチン)



1 細胞ごとの糖鎖プロファイルの変化を定量的に解析できる

# scGR-seqによる細胞の識別 (iPS細胞 vs iPS細胞由来神経前駆細胞)

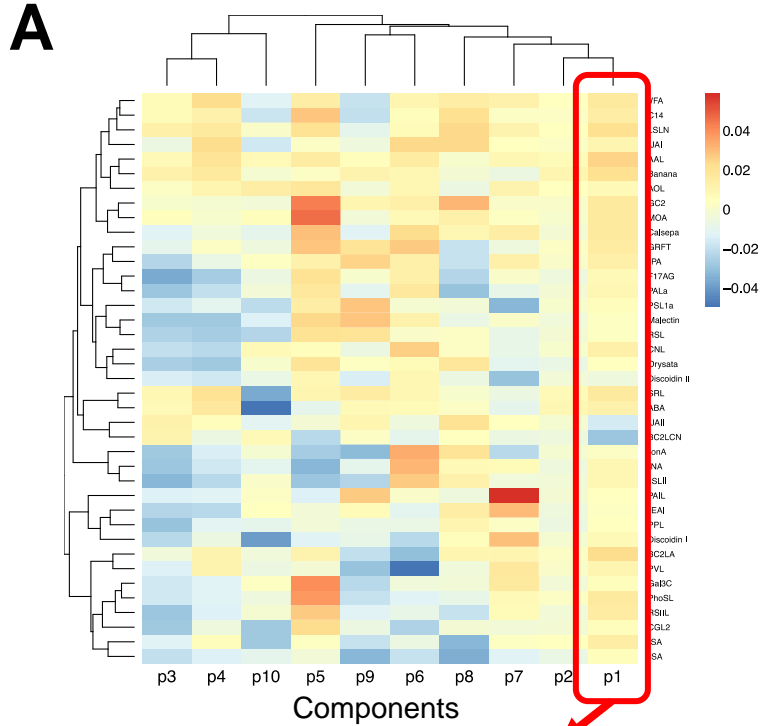


Minoshima et al.  
iScience 2021

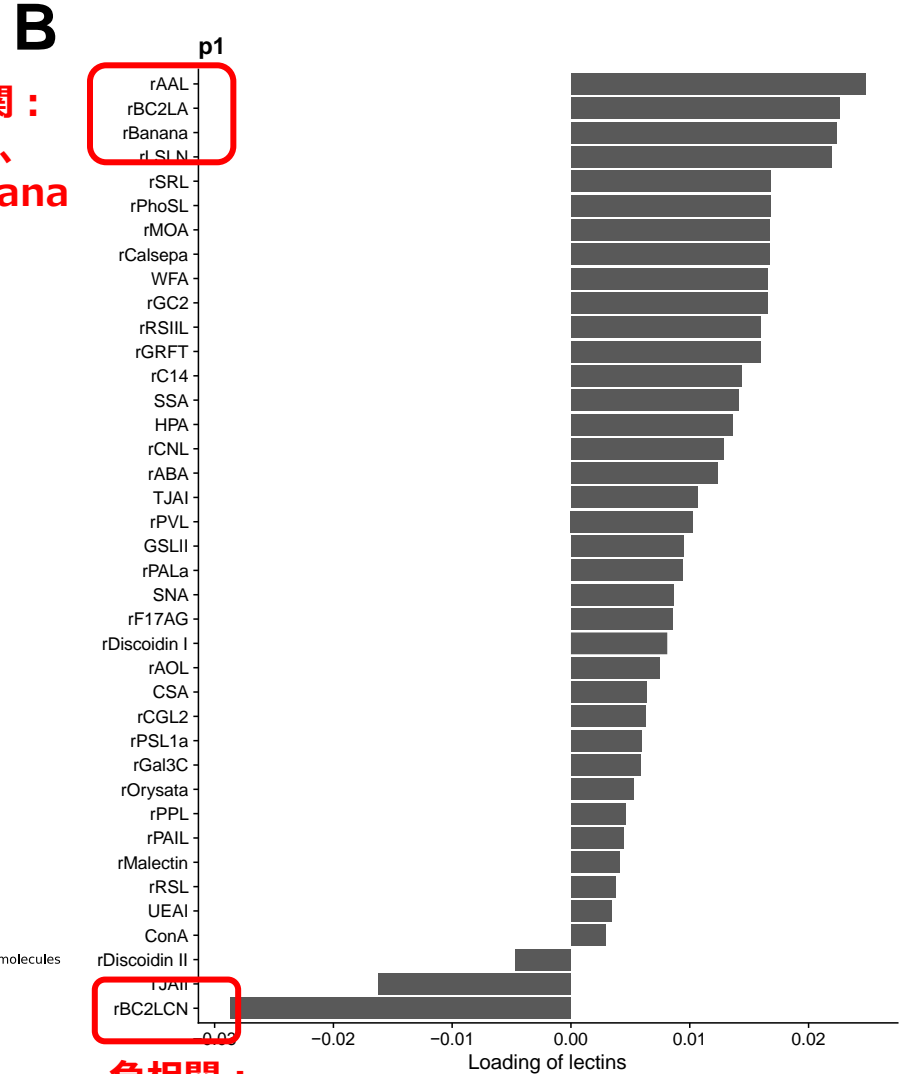
mRNAのみ、糖鎖のみと比べて、mRNAと糖鎖の2つの情報の組み合わせにより2種の細胞が正確に分離

# 遺伝子群とレクチン群の相関解析

相関性の高い遺伝子と  
レクチンをグループ分け

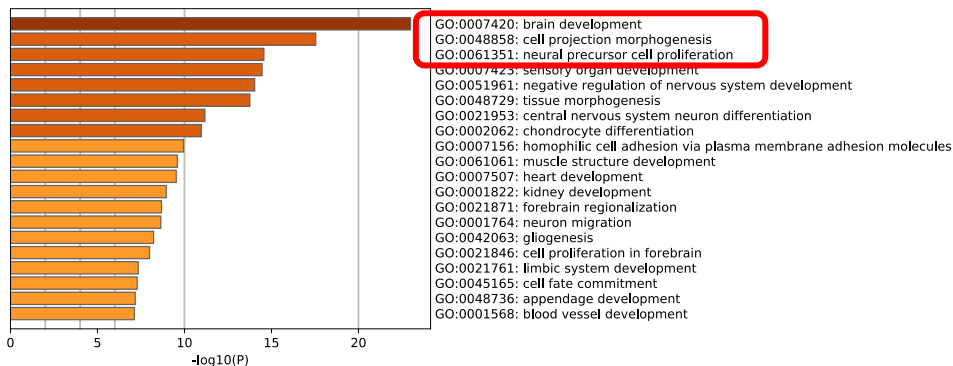


レクチンの相関性



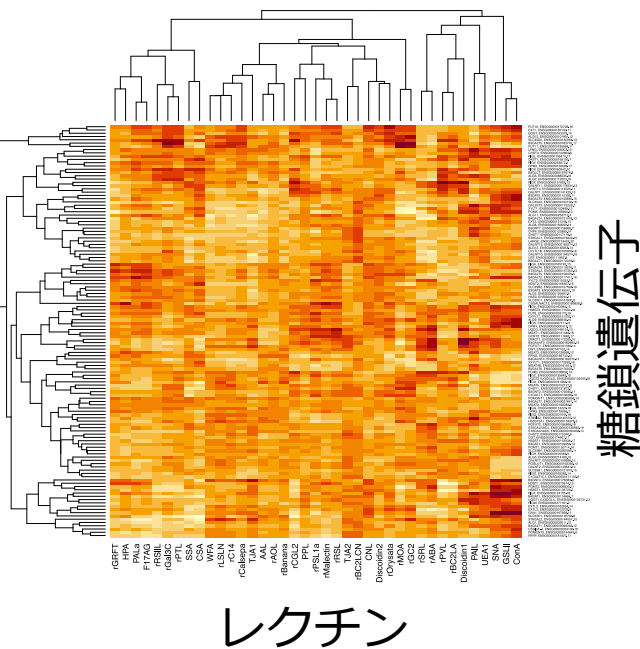
**C** GO enrichment analysis

神経発生関連  
遺伝子

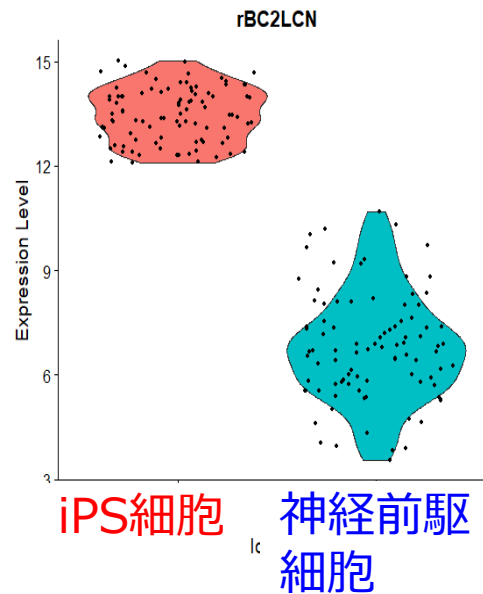


# 1 細胞ごとのレクチンの反応性と糖鎖遺伝子発現解析

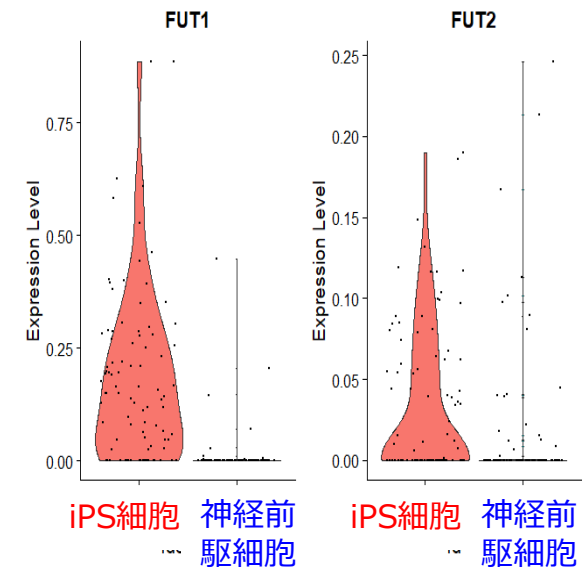
Minoshima et al.  
iScience 2021



$\alpha$ 1,2-フコース結合性  
レクチン (BC2)



$\alpha$ 1,2-フコース転移酵素

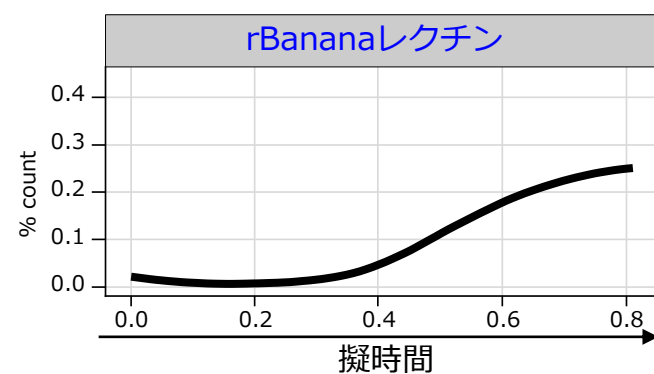
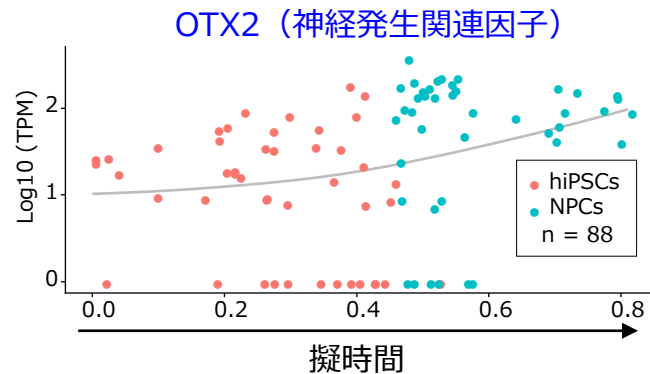
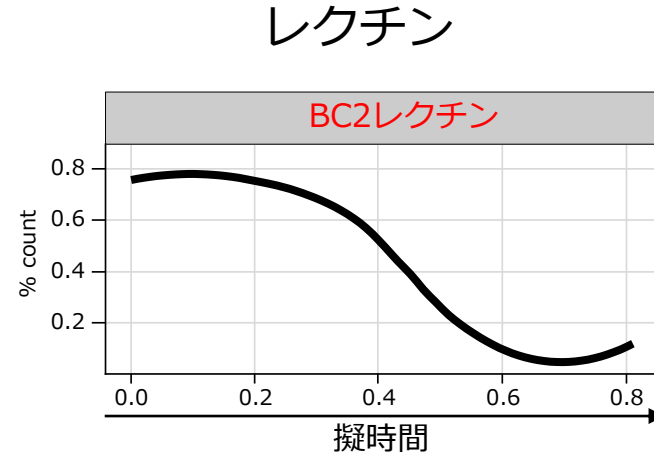
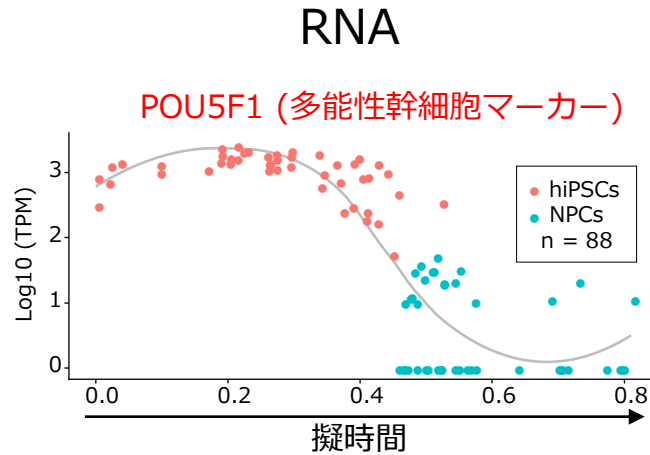


糖鎖遺伝子発現とレクチン反応性から個々の細胞の糖鎖をより正確に解析できる



# scGR-seqによる擬時間解析（遺伝子とレクチン）

Minoshima et al.  
iScience 2021



遺伝子発現の変化と相関するレクチンを探索できる

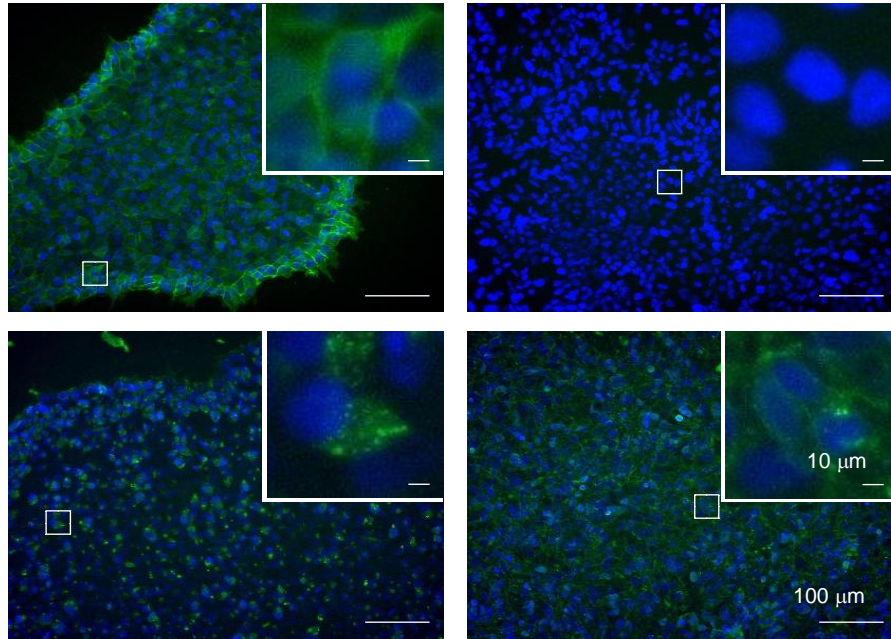
# 未分化・分化細胞糖鎖マーカープローブの同定

レクチン染色

iPS細胞

神経前駆細胞

BC2レクチン  
(既知のiPS細胞マーカー  
プローブ)



rBanana  
(新たな神経幹細胞マーカー  
プローブ候補)

Green: lectin staining, blue: nuclear staining.

細胞糖鎖マーカープローブの同定が可能

# まとめ

DNA標識レクチンを用いてシーケンシングでバルク、及びシングルセルで糖鎖をプロファイリングする技術を開発した (**scGlycan-seq**)

1 細胞ごとの糖鎖とRNAの発現を同時解析する技術を開発した (**scGR-seq**)

# scGR-seqの利点

1. 糖鎖を次世代シーケンサーで解析できる
2. 組織を構成する個々の細胞に発現する糖鎖を解析できる
3. グライコームとトランスクリプトームの関係を解析できる

# 参考文献

1. Integrated analysis of glycan and RNA in single cells.

Minoshima F, Ozaki H, Odaka H, Tateno H.

iScience. 2021 Jul 17;24(8):102882. doi: 10.1016/j.isci.2021.102882.

2. Glycan Profiling by Sequencing to Uncover Multicellular Communication: Launching Glycobiology in Single Cells and Microbiomes.

Oinam L. and Tateno H.

Front. Cell Dev. Biol. 2022 in press. doi: 10.3389/fcell.2022.919168

3. Glycan profiling of the gut microbiota by Glycan-seq.

Oinam L, Minoshima F, Tateno H.

Isme Commun. 2022; 2(1). doi: org/10.1038/s43705-021-00084-2

# 問い合わせ

ご質問や研究室に参加希望の方は下記までお気軽にご連絡ください。

国立研究開発法人産業技術総合研究所  
筑波大学

舘野浩章 ([h-hateno@aist.go.jp](mailto:h-hateno@aist.go.jp))

Twitter: @tateno\_hiroaki

HP: <https://sites.google.com/view/hiroakitateno/home>