

# 日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業 (糖鎖利用による革新的創薬技術開発事業) 事後報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 高感受性フコシル化 TRAIL 受容体を標的とした新たな癌治療戦略の開発  
(英語) The novel anti-cancer therapy targeting highly sensitive fucosylated TRAIL receptors

研究開発実施期間: 平成28年9月1日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 森脇 健太  
(英語) Kenta Moriwaki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 学校法人東邦大学 医学部医学科生化学講座生化学分野・准教授  
(英語) Department of Biochemistry, Toho University School of Medicine

## II 研究開発の概要

細胞傷害性リンパ球に発現する TRAIL は、TRAIL 受容体を発現するがん細胞に細胞死を誘導してその増殖を抑制しており、腫瘍免疫監視機構の一翼を担う分子である。マウスでの組換え TRAIL 投与実験より、TRAIL が正常組織には傷害を与えず、がん細胞に特異的に細胞死を引き起こす性質を有することがわかっている。そのため、TRAIL 受容体はがん治療の分子標的として期待され、多くの製薬会社が組換え TRAIL や抗 TRAIL 受容体アゴニスティック抗体などの TRAIL 受容体標的薬の開発を進めている。これまでに様々な種類のがんに対して臨床試験が実施され、TRAIL 受容体標的薬単剤または既存の薬剤との併用療法で一定の治療効果が見られている一方で、TRAIL 耐性を獲得しているがん細胞が存在するなどの理由で十分な治療効果が見られない患者もおり、未だ臨床応用には至っていない。がん治療法の開発においては、よりがん殺傷効果の高い治療薬の開発だけでなく、効果を期待できる患者を選別する方法の開発や患者に適した併用療法の開発も重要であり、全ての要素を踏まえた戦略的な治療法の開発が必要とされている。がん細胞で糖鎖構造の特異的な変化が起こることはよく知られており、この糖鎖変化を利用した治療戦略が新たながん治療のステージを切り開くと期待されている。我々は以前に、フコシル化糖鎖ががん細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスへの感受性を正に制御することを明らかにしており、本研究ではフコシル化糖鎖による TRAIL 誘導性細胞死の制御に着目して新たながん治療戦略を開発することを目的として研究を行った。

## 「得られた成果」

### ● フコシル化糖鎖による TRAIL 誘導性細胞死の制御機構

フコシル化糖鎖には  $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3,  $\alpha$ 1-4,  $\alpha$ 1-6 結合と *O*-fucose という 5 種類の結合様式が存在する。どの結合様式のフコシル化糖鎖が TRAIL 誘導性細胞死を制御するかを明らかにするために、特定のタンパク質にしか付加されない *O*-fucose を除いて、それぞれの結合様式を担うフコース転移酵素を CRISPR/Cas9 法を用いて欠損させ、TRAIL 誘導性細胞死に与える影響を調べた。その結果、 $\alpha$ 1-3/4 フコース (ルイス糖鎖) を欠損させた細胞で TRAIL 誘導性細胞死が抑制されることがわかった。このことからルイス糖鎖が TRAIL 誘導性細胞死を亢進させることがわかった。

TRAIL 受容体には DR4 と DR5 があり、DR4 には *N*型糖鎖が 1 箇所付加される。一方で、DR5 には *O*型糖鎖のみが付加されている。細胞に発現させて精製した DR4 細胞外ドメインの質量分析解析を行い、我々は DR4 にも *O*型糖鎖が複数箇所において付加されていることを明らかとした。さらに、これらの TRAIL 受容体上の糖鎖にルイス糖鎖が検出されないことがわかり、TRAIL 受容体以外の分子に付加されたルイス糖鎖が TRAIL 誘導性細胞死を亢進させていることが明らかとなった。

ルイス糖鎖は糖タンパク質または糖脂質上に付加される糖鎖構造である。そこで、CRISPR/Cas9 法を用いて糖タンパク質上または糖脂質上にルイス糖鎖を付加できなくさせた細胞を作成し、TRAIL 誘導性細胞死に与える影響を調べた。その結果、糖タンパク質上にルイス糖鎖を付加できなくさせても、ルイス糖鎖による TRAIL 誘導性細胞死の増強効果が見られたのに対して、糖脂質上にルイス糖鎖を付加できなくさせた細胞では、ルイス糖鎖による TRAIL 誘導性細胞死の増強効果が消失した。これらの結果から、糖脂質上に付加されたルイス糖鎖が TRAIL 誘導性細胞死を亢進させることが明らかとなった。

リガンド刺激を受けて TRAIL 受容体は細胞膜上で重合し、そこに FADD、caspase 8 が集積して受容体複合体が形成されて caspase 8 が活性化される。その後、FADD、caspase 8 が受容体から乖離して細胞質内で FADD-caspase 8 複合体を形成し、そこでさらに caspase 8 が活性化される。ルイス糖鎖の有無によってリガンド依存的な TRAIL 受容体の重合と受容体複合体の形成には違いは見られなかったのに対して、リガンド依存的な細胞質 FADD-caspase 8 複合体の形成がルイス糖鎖によって顕著に亢進された。このことからルイス糖鎖が、リガンド刺激に応じた TRAIL 受容体複合体から細胞質 FADD-caspase 8 複合体の形成を亢進させていることがわかった。

### ● ルイス糖鎖を指標としたがん細胞の TRAIL 誘導性細胞死への感受性の評価

複数のヒト大腸がん細胞株を用いて、細胞表面上のルイス糖鎖の発現レベルをフローサイトメーターで定量し、TRAIL 誘導性細胞死への感受性との相関関係を調べたところ、ルイス糖鎖の発現が高いがん細胞株ほど TRAIL 誘導性細胞死への感受性が高いことがわかった。さらに、これらの細胞株の培養上清中のルイス糖鎖の量について調べたところ、ルイス糖鎖を多く分泌する細胞株ほど TRAIL 誘導性細胞死への感受性が高いことが明らかとなった。さらに、大腸がん患者のがん組織から樹立したがんオルガノイドを用いて同様の実験を行ったところ、ルイス糖鎖を強く発現するがんオルガノイドほど TRAIL 誘導性細胞死への感受性が高いことがわかった。また、用いたがんオルガノイドの由来となる患者の血清中ルイス糖鎖の量との関係を調べたところ、血清ルイス糖鎖の値が高い患者から樹立したがんオルガノイドはより TRAIL 誘導性細胞死への感受性が高いことがわかった。

### ● TRAIL 誘導性細胞死を亢進させる化合物の同定

がん細胞の TRAIL 誘導性細胞死への感受性を増強させる化合物を同定するために、セミオートマチックな発光スクリーニング系を構築し、約 25,000 化合物のスクリーニングを行った。1 次スクリーニングで得られた 58 種類のヒット化合物について、さらに濃度依存性などの検証を行い、最終的に TRAIL 誘導性細胞死への感受性を増強させる 12 種類の新規化合物を同定した。これらの化合物の中で特に高い効果を示したものは、10 nM 程度の低い濃度で複数のがん細胞株の TRAIL 誘導性細胞死への感受性を顕著に増加させた。さらに当該化合物で処理をした

細胞ではルイス糖鎖の発現が増加していた。ルイス糖鎖を発現できなくさせた細胞では当該化合物による TRAIL 誘導性細胞死の増強効果が減弱したことから、この化合物によるルイス糖鎖の発現増加が、細胞死増強効果に寄与していることが明らかとなった。

#### 「意義」

がん細胞の TRAIL 誘導性細胞死への感受性は、TRAIL 受容体標的薬の治療効果を規定する重要な要素である。また、現在有効ながん治療法として期待されているがん免疫療法は種々の方策によって患者の細胞傷害性リンパ球を活性化することでがん細胞を排除するものであり、最近のゲノムワイド CRISPR/Cas9 ノックアウトスクリーニング解析により、CAR T 療法などのがん免疫療法でのがん細胞の殺傷に TRAIL が重要な役割を果たしていることが報告されている。本研究によってルイス糖脂質が TRAIL 誘導性細胞死を亢進させることが明らかとなり、今後さらに詳細な分子機構を明らかにすることで、TRAIL 受容体標的薬やがん免疫療法の治療効果を増大させる新たな戦略の開発につながることを期待される。本研究で同定した化合物について今後さらなる研究を行うことで、ルイス糖鎖の発現が低いがんに対して選択的な併用療法の開発につながることを期待される。

これまでにがん細胞の TRAIL 誘導性細胞死への感受性を遺伝子・タンパク質発現パターンで評価しようという試みがなされており、また、がん免疫療法の効果を予測する因子の探索が遺伝子、miRNA、タンパク質、細胞集団などを対象にして進められている。しかし、これらの因子だけで効果を予測することは現状困難とされている。単一マーカーでの治療効果予測は困難であるため複数のマーカーを用いて総合的に判断する必要があり、これまでにないアプローチでの治療効果予測マーカーの開発が求められている。このような状況において、本研究は糖鎖というこれまでにない側面からがん細胞の TRAIL 誘導性細胞死への感受性を評価できる可能性を示しており、TRAIL 受容体分子標的治療だけでなく、がん免疫療法の治療効果予測法の確立につながることを期待される。

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), which is a member of the death ligand family, is expressed on cytotoxic lymphocytes and kills cancer cells through engagement with TRAIL receptor. Early studies demonstrated that injection of recombinant TRAIL into tumor-bearing mice successfully eliminated tumors without causing injury in normal tissues. Therefore, TRAIL receptor has garnered a great attention as a promising therapeutic target for cancer. Various types of therapeutic antibodies targeting TRAIL receptor has shown anti-tumor effect in clinical trials. However, a certain population of cancer patients were non-responsive to the therapy partly due to resistance of cancer cells against TRAIL receptor-mediated apoptosis. Therefore, development of a novel strategy to increase the therapeutic effect is required. Glycosylation is a modification of proteins and lipids by glycans and regulate a number of cellular events. Glycan structures are dramatically changed during cancer development. We have previously shown that fucosylated glycans enhance TRAIL-induced apoptosis. In this study, we aimed to develop a glycotherapeutic strategy to combat cancer by understanding the mechanism how fucosylation regulate TRAIL-induced apoptosis.

First, we tested which linkage of fucose is involved in TRAIL-induced apoptosis. Deletion of  $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3/4, or  $\alpha$ 1-6 fucose by CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of responsible fucosyltransferases revealed that loss of  $\alpha$ 1-3/4 fucose (lewis glycans), but not  $\alpha$ 1-2 or  $\alpha$ 1-6 fucose, significantly reduced TRAIL-induced apoptosis. While these results indicate that lewis glycans enhance TRAIL-induced apoptosis, we have not been able to detect the lewis glycans on TRAIL receptors, DR4 and DR5. To identify molecules that carry the lewis glycans and regulate TRAIL-induced apoptosis, we generated the cells that carry lewis glycans on either glycoproteins or glycolipids and find that lewis glycans on glycolipids were critical for lewis glycan-mediated enhancement of TRAIL-induced apoptosis. In addition, we found that lewis glycans facilitated the formation of cytosolic FADD-caspase 8 complex without affecting receptor-containing signaling complex. Secondly, we found that in colon cancer cell lines, both cell surface and secreted lewis glycans positively correlated with the sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. Similar results were observed in human colon cancer organoids derived from colon cancer patients. Thirdly, we performed a chemical screening using about 25,000 small compounds and found 12 novel compounds that enhances TRAIL-induced apoptosis. One of the compounds elevated cell surface lewis glycans. The ability of the compound to enhance TRAIL-induced apoptosis was reduced in the cells that cannot produce lewis glycans, indicating that lewis glycans contributed to the cell death-enhancing effect of the compound.

The TRAIL-TRAIL receptor axis has been shown to be a critical determinant of a therapeutic effect of cancer immunotherapies such as CAR-T therapy in which activated cytotoxic lymphocytes kill cancer cells. Therefore, elevation of lewis glycolipids in cancer cells might be a novel strategy to enhance an effect of not only therapeutic antibody against TRAIL-receptor but also cancer immunotherapy. In addition, cell surface and serum lewis glycans might be a novel biomarker to predict an effect of these therapies. Furthermore, the compounds identified in this study might be a promising agent that can effectively eliminate cancer cells in combination with these therapies.