

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06863

研究課題名(和文) 微量酸性糖を標的とした腫瘍マーカーの開発

研究課題名(英文) Identification of serum tumor marker candidates by focused glycomics analyses for acidic carbohydrates

研究代表者

岡本 三紀 (TANAKA-OKAMOTO, Miki)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：20332455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は微量酸性糖に着目し、血清サンプルから臨床応用可能な新規腫瘍マーカーを探索することを目的とした。血清中の大部分を占める中性糖とシアル酸付加した酸性糖を除去することにより、がん患者血清から効率的に硫酸基付加した14種類の糖鎖構造を新規腫瘍マーカー候補として同定した。マーカー候補は糖鎖構造を決定し、その中には結合様式の異なるtype1とtype2の両方を有する特徴的なハイブリッド構造も観察された。また質量分析によりマーカー候補の血清レベルの測定を行った結果、がん患者で有意な上昇が確認された。

研究成果の概要(英文)：Glycomic analysis focused on sulfated O-glycans was performed to identify novel serum carbohydrate tumor markers for clinical diagnosis. In human sera, the majority of serum oligosaccharides are composed of neutral glycans or terminally sialylated acidic glycans. The elimination of these glycans facilitated the identification of 14 sulfated carbohydrate tumor marker candidates from cancer patient sera. The carbohydrate structures of all marker candidates were precisely analyzed using enzymatic digestion, glycan synthesis, 2D mapping and mass spectrometry. Some candidates have the type1 and type2 lactosamine hybrid backbone. Furthermore, the levels of these sulfated candidates in sera from 11 gastric and 9 pancreatic cancer patients and 20 healthy controls were quantified using mass spectrometry. The levels of all candidates were elevated in sera of at least one or more patients.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：癌 糖鎖 診断マーカー HPLC 質量分析

1. 研究開始当初の背景

細胞はがん化に伴い糖鎖構造が大きく変化する。変化した糖鎖の一部は転移や浸潤に関与すると考えられているほか、糖鎖腫瘍マーカーとして利用されている。これらの糖鎖腫瘍マーカーは、ヒトがん組織あるいは腫瘍細胞株をマウスに免疫することにより、がん組織を認識するモノクローナル抗体を作製後、診断可能なものを選別することで開発されてきた。しかし、糖鎖の中には抗体が作製し難いものもあり、そこには未知の糖鎖腫瘍抗原が少なからず存在すると考えた。また血清中の糖鎖は、中性糖鎖と糖鎖構造末端に *N*-アセチルノイラミン酸(シアル酸)が付加した酸性糖鎖が大部分を占める。しかし、がん組織糖鎖構造解析から、硫酸基や KDN 等のシアル酸以外の酸性糖が存在していることも知られている。そこでこのような微量酸性糖に着目した。

2. 研究の目的

本研究はシアル酸以外の酸性糖が付加された糖鎖に着目し、血清サンプルから臨床応用可能な新規腫瘍マーカーを探索することを目的とする。また、抗体を用いず、HPLCにより作成した血清中 *O*-型糖鎖プロファイルから、がん患者・健常者間で有意な差を示す糖鎖を検出し、新規糖鎖腫瘍マーカーの同定を目指す。

3. 研究の方法

がん患者及び健常者の血清を、ヒドラジン分解により血清の糖たんぱく質から糖鎖部分を切り出し、アミノピリジンにて糖鎖を蛍光標識(PA化)する。それらを順相および逆相HPLCで分離し、*O*-型糖鎖プロファイルを作成後、がん患者、健常者間の分離パターンを詳細に比較し、がん患者特異的なピークを腫瘍マーカー候補として検出する。それらの腫瘍マーカー候補の糖鎖構造を決定し、SRM(selected reaction monitoring)法による質量分析を用いた定量を行い、有用性を検討する。

シアル酸以外の微量酸性糖鎖を効率的に回収するため、がん患者および健常者の血清から PA 化糖鎖を調整した後、*Arthrobacter ureafaciens* 由来 *N*-アセチルノイラミニダーゼと反応させ、DEAE カラムにて酸性糖と中性糖に分離する。血清糖鎖で大部分を占めるシアル酸付加糖鎖は、この酵素処理により中性糖分画に溶出されるが、硫酸基や KDN 付加された糖鎖は *N*-アセチルノイラミニダーゼには反応しないため、酸性糖領域に溶出される。この酸性領域に溶出された分画を濃縮後、順相および逆相のクロマトグラムにかけ、がん患者、健常者間の分離パターンを詳細に比較し、がん患者特異的なピークを腫瘍マーカー候補として検索する。マーカー候補は、イオントラップ型質量分析装置を用いた LC/MS/MS にて質量分析し、糖鎖の構造を推定

する。

4. 研究成果

胃がん患者 11 名、膵臓がん患者 9 名、健常者 20 名の血清から PA 化糖鎖を調整し、*Arthrobacter ureafaciens* 由来 *N*-アセチルノイラミニダーゼで反応後、DEAE カラムにて酸性糖と中性糖に分離した。分取した酸性糖鎖は、順相および逆相 HPLC にてさらに分離し、そのパターンの比較を行った。がん患者に特異的に認められたピークは、イオントラップ型質量分析装置(LCQ Deca XP)を用いた LC/MS/MS にて質量分析し、糖鎖構造を推定した。その結果 14 種類の糖鎖構造をマーカー候補として同定し、さらに酵素消化、2 次元糖鎖マッピング、質量分析法を組み合わせ、結合様式を含む詳細な構造解析を行った。これらのマーカー候補は、9 種類の core1 構造と 5 種類の core2 構造を持つ糖鎖からなり、全て硫酸基が付加されていた。6-sulfo type2 lactosamine、6-sulfo Lewis X/Y、3'-sulfo type1 lactosamine、3'-sulfo Lewis A を含む糖鎖構造のうち 5 種類のマーカー候補には、結合様式の異なる type1 と type2 の両方を有する特徴的なハイブリッド構造が観察された。これらの構造は表 1 に示す。

(表 1 腫瘍マーカー候補の糖鎖構造)

Core	No.	Structure
1	No. 1	HSO <sub>3</sub> -3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal-PA
	No. 2	HSO <sub>3</sub> -3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal-PA 4   Fucα1
	No. 3	HSO <sub>3</sub>   6 Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal-PA 3   Fucα1
	No. 4	HSO <sub>3</sub>   6 GlcNAcβ1-3Galβ1-3GalNAcPA
	No. 5	HSO <sub>3</sub>   6 Galβ1-4GlcNAcβ1 6 Gal-PA Galβ1-3GlcNAcβ1 3
	No. 6	HSO <sub>3</sub>   6 Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Gal-PA 3   Fucα1
	No. 7	Galβ1-4GlcNAcβ1 6 Gal-PA HSO <sub>3</sub> -3Galβ1-3GlcNAcβ1 3 4   Fucα1

	No. 8	
	No. 9	
2	No. 10	
	No. 11	
	No. 12	
	No. 13	
	No. 14	

腫瘍マーカー候補の糖鎖構造解析に引き続き、それらの血中レベルを測定した。胃がん患者、膵臓がん患者および健常者の血清からPA 化糖鎖を調整し、SRM 法による質量分析で相対定量を行った結果、がん患者での有意な上昇が確認された。特に、type1/type2 ハイブリッド構造に3'-sulfo Lewis Aや6-sulfo Lewis X を有する腫瘍マーカー候補は、様々な患者での上昇が観察された。図1に一例を示す。

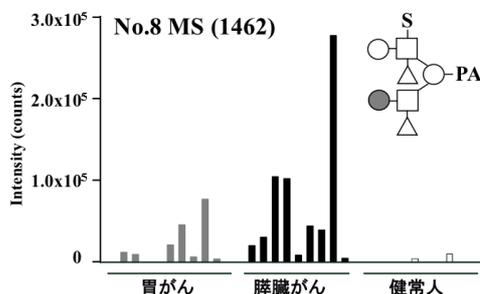


図1 腫瘍マーカーの血中レベル

以上のことは、*N*-アセチルノイラミダーゼを用いたフォーカストグリコミクスが、微量酸性糖の探索に極めて有効であることを

示している。またその構造解析によって、糖鎖 type1/type2 ハイブリッド構造が新たな腫瘍マーカーになりうることを明らかにした。

SRM 法を用いた定量法の利点は、一度の測定で複数の腫瘍マーカーを同時に測定できることであり、より正確ながん診断につながる。多くのがん患者に有効な診断システムを確立するためには、臨床的に有用な腫瘍マーカーを多く見出すことが必須である。本研究で見出した腫瘍マーカー候補がその一端を担う可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 3件)

Tanaka-Okamoto M, Hanzawa K, Mukai M, Takahashi H, Ohue M, Miyamoto Y.

Correlation of serum sialyl Tn antigen values determined by immunoassay and SRM based method.

*Anal Biochem.* 査読有り 2017, 544:42-48.

DOI: 10.1016/j.ab.2017.12.026.

Tanaka-Okamoto M, Mukai M, Takahashi H, Fujiwara Y, Ohue M, Miyamoto Y.

Various sulfated carbohydrate tumor marker candidates identified by focused glycomic analyses.

*Glycobiology.* 査読有り 2017, 27(5):400-415.

DOI: 10.1093/glycob/cww133.

Tanaka-Okamoto M, Yabu M, Mukai M, Takahashi H, Fujiwara Y, Ohue M, Kamada Y, Miyoshi E, Miyamoto Y.

Elevation of CA19-9-Related Novel Marker, Core 1 Sialyl Lewis A, in Sera of Adenocarcinoma Patients Verified by a SRM-Based Method.

*J. Proteome Res.* 査読有り 2016, 15(1):152-65.

DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00893.

〔学会発表〕(計 6件)

岡本三紀、半澤 健、宮本泰豪  
硫酸付加糖鎖腫瘍マーカー候補群の詳細な  
構造解析とその定量  
第36回日本糖質学会年会 (2017)

岡本三紀、半澤 健、宮本泰豪  
硫酸付加糖鎖腫瘍マーカー候補群の構造解  
析とその定量  
第40回日本分子生物学会年会、第90回日本  
生化学会、合同大会 (2017)

岡本三紀、宮本泰豪  
フォーカストグライコミクスによって同定  
された硫酸付加された糖鎖腫瘍マーカー候  
補群  
第35回日本糖質学会年会 (2016)

岡本三紀、藪 政彦、宮本泰豪  
SRM法を用いた血清糖鎖腫瘍マーカー候補  
Core 1 Sialyl Lewis Aの定量解析：癌患者  
血清での有意な上昇を認める  
第38回日本分子生物学会年会、第88回日本  
生化学会、合同大会 (2015)

岡本三紀、藪 政彦、宮本泰豪  
SRM法を用いた血清糖鎖腫瘍マーカー候補  
core 1 sialyl Lewis Aの定量解析  
第34回日本糖質学会年会 (2015)

宮本泰豪、岡本三紀、高橋秀典、向井幹夫、  
藤原義之、大植雅之  
SRM法を用いた血清糖鎖腫瘍マーカー候補  
core 1 sialyl Lewis Aの定量解析  
第74回日本癌学会学術総会 (2015)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.mc.pref.osaka.jp/laboratory/  
department/bunshi/](http://www.mc.pref.osaka.jp/laboratory/department/bunshi/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡本 三紀 (TANAKA-OKAMOTO, Miki)  
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪  
国際がんセンター(研究所)・その他部局  
等・研究員  
研究者番号：20332455

### (2) 連携研究者

宮本 泰豪 (MIYAMOTO, Yasuhide)  
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪  
国際がんセンター(研究所)・その他部局  
等・総括研究員(分子生物学部門長)  
研究者番号：90322742