

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07344

研究課題名(和文) フォーカストグライコミクスを用いた血清糖鎖腫瘍マーカーの探索

研究課題名(英文) Identification of serum tumor marker candidates by focused glycomic analyses

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・分子生物学部主任研究員

研究者番号：20332455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：がん患者血清中からがん診断に有用な新規糖鎖腫瘍マーカーを検出するため、血清グライコミクス解析を行った。既に同定した硫酸基付加した微量酸性糖14種類に加え、糖鎖構造内の側鎖としてシアル酸が付加したユニークな酸性糖を新たに17種類同定した。これら全ての腫瘍マーカー候補のがん患者血清中の相対定量を行ったところ、個体ごとに高値を示す糖鎖構造が全く異なり、がん診断には複数の腫瘍マーカーを用いた測定が有効であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん診断において、腫瘍マーカーはがん治療における経過観察やがん再発の確認に利用されている。しかし早期診断や多様ながんに対応できる腫瘍マーカーを欠いていることも事実である。本研究ではHPLCの溶出パターンに基づいた独自の糖鎖腫瘍マーカー探索を行い、新たに17種類の腫瘍マーカー候補を見出した。これらのがん患者血清レベルを測定すると、患者血清ごとに高値を示すマーカー候補が異なり、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ことが示唆された。また新規腫瘍マーカー探索は、より精度の高いがん診断に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To detect novel carbohydrate tumor markers for cancer diagnosis, focused glycomic analyses using cancer patient sera was performed. In addition to the 14 acidic tumor marker candidates with sulfate groups already identified, 17 unique internally sialylated carbohydrate tumor marker candidates were newly identified. Relative quantification of all these tumor marker candidates in the sera of cancer patients revealed that the carbohydrate structure showing high values was completely different for each individual, suggesting that analysis of multiple markers may be an effective means of diagnosing various cancers.

研究分野：糖鎖化学

キーワード：腫瘍マーカー 糖鎖 HPLC MS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床検査で実用化されている腫瘍マーカーには、CA19-9 や DuPan-2、STN 等の糖鎖腫瘍マーカーが利用されている。これらの腫瘍マーカーは、おもにがん治療における経過観察やがん再発の確認に用いられており、がん早期診断や多様ながん診断には適していないことが大きな問題点である。そのため精度の高いがん診断に寄与する新規腫瘍マーカーの開発が期待されている。

2. 研究の目的

本研究は、がん診断に有効な新規糖鎖腫瘍マーカーの開発をめざす。現在利用されている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し、診断可能なものを選別することで開発されてきた。しかしがん抗原の中には構造的に抗体に認識され難いものも存在すると考え、抗体に依存せず HPLC の溶出パターンに基づいた独自の手法によりがん患者血清中から腫瘍マーカー候補の検出を試みた。その結果、複数の糖鎖腫瘍マーカー候補を見出すことに成功し、HPLC を用いた方法(HPLC-based グライコミクス解析)も新たな腫瘍マーカーの探索に有効な手段となり得ることがわかった。そこで本研究では、がん患者血清中の微量酸性糖に絞った HPLC-based グライコミクス解析を行い、新たな糖鎖腫瘍マーカー候補を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

血清中の糖鎖は、非還元末端にシアル酸付加された酸性糖と中性糖で構成されているが、生体内にはシアル酸以外の酸性糖鎖も少なからず存在する。これまでに腫瘍マーカー候補として硫酸基付加した微量酸性糖を標的とし、その選択的検出方法として全てのシアル酸を切り出す *N*-アセチルノイラミニダーゼ(*Arthrobacter ureafaciens* 由来)を利用した HPLC-based グライコミクス解析を行い、14 種類の硫酸基付加糖鎖を検出した(Tanaka-Okamoto Glycobiology 2017)。そこで次に着目したのは、ユニークな構造を持つシアル酸付加糖鎖である。大部分のシアル酸付加糖鎖は非還元末端部分にその修飾を受ける。しかし、disialosyl LewisA 構造 (NeuAc 2-3Gal 1-3(NeuAc 2-6)(Fuc 1-4)GlcNAc-R) や、disialosyl LewisC 構造 (NeuAc 2-3Gal 1-3(NeuAc 2-6)GlcNAc-R) といった非還元末端だけでないシアル酸修飾を受けた糖鎖構造が、がん特異的抗原として報告があることから、糖鎖構造の内部に付加されたシアル酸も大いに腫瘍マーカーとしての可能性を持つと考えた。そこで、本研究では非還元末端以外に位置するシアル酸付加糖鎖を選択的に分離するため、*N*-アセチルノイラミニダーゼの基質特異性を利用して血清グライコミクス解析を実施し、マーカー候補を網羅的に検出した。

糖鎖の調整方法は、がん患者及び健常者血清を凍結乾燥した後、ヒドラジン分解により血清糖たんぱく質から糖鎖部分を切り出し、アミノピリジンで糖鎖を蛍光標識(PA 化)する。PA 化糖鎖は *Salmonella typhimurium* 由来の *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。*Salmonella typhimurium* 由来の *N*-アセチルノイラミニダーゼは、硫酸基に利用した *Arthrobacter ureafaciens* 由来の *N*-アセチルノイラミニダーゼとは異なり、非還元末端に位置するシアル酸のみを切断する。血清糖鎖で大部分を占める非還元末端のシアル酸付加糖鎖は、この酵素処理で末端のシアル酸のみが除去され中性糖領域に溶出される。一方、内部構造にシアル酸付加された糖鎖は *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。この酸性糖領域に溶出された分画を濃縮後、順相カラム、次に逆相カラムを用いた HPLC で分離し、その分離パターンを詳細に比較した。がん患者特異的なピークは、イオントラップ型質量分析装置を用いた LC/MS/MS にて分析し、糖鎖構造を推定した。その後、酵素消化、2次元糖鎖マッピング法と質量分析を組み合わせて、結合様式を含む詳細な構造解析を行った。さらにそれぞれのマーカー候補は 3 連四重極型質量分析計を用いた Selected Reaction Monitoring(SRM)法を用いて、血清中の相対定量によって腫瘍マーカー候補の臨床応用への可能性を検討した。

4. 研究成果

本研究では非還元末端以外に位置するシアル酸付加糖鎖をターゲットとしたグライコミクス解析を行った。非還元末端に位置するシアル酸のみを切断する *Salmonella typhimurium* 由来の *N*-アセチルノイラミニダーゼの基質特異性を利用して、糖鎖構造内部に側鎖として位置するシアル酸付加糖鎖を

選択的に分離濃縮した。引き続き順相 HPLC と逆相 HPLC で分離後、図 1 に示すような HPLC の溶出パターン比較により、複数のがん患者特異的なピークを検出した。その糖鎖構造解析では、前もって同定した硫酸基付加糖鎖に加え、本研究で標的としていたシアル酸付加糖鎖が予想通り確認できた。検出したピークに含まれる糖鎖は酵素消化により結合様式を含む構造決定を行い、17 種類の糖鎖構造を腫瘍マーカー候補として同定した(図 2)。これらの腫瘍マーカー候補には、既に腫瘍マーカーとして臨床応用されている STN 抗原を検出した他、8 個の糖鎖構造に、これまで腫瘍マーカーとして全く報告されていなかった血液型抗原 Sda/CAD 構造を確認した。Sda/CAD 抗原は NeuAc 2-3Gal 構造の galactose に GalNAc が 1,4 結合した構造であり、糖鎖腫瘍マーカーとして臨床応用されている CA19-9 の本体である sialyl Lewis A 構造と共通の前駆体を持つ。がん組織では Sda/CAD 抗原の低下が確認されているので、血中の Sda/CAD 構造の増加は発現量の増加ではなく、血中への放出の増加が考えられる。

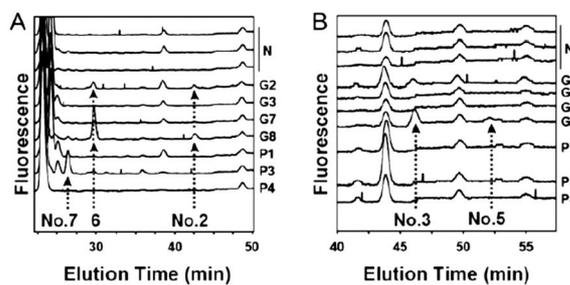


図1 RP-HPLCのFr2(A)とFr3(B)の溶出パターンによるがん特異的ピークの検出

さらにこれらの微量糖鎖を定量するために、3 連四重極型質量分析計を用いる SRM 法を用いた高感度な定量法を利用した。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、より精度の高い正確ながん診断につながると考える。17 種類のシアル酸付加糖鎖腫瘍マーカー候補を胃がんおよび膵がん患者の血清中レベルを測定すると、構造依存的にがん患者の血清で上昇していることがわかった(図 3)。前もって同定していた硫酸基付加腫瘍マーカー候補の測定値と比較検討すると、がん患者ごとに高値を示す糖鎖構造が大きく異なっていた。硫酸基付加糖鎖は低値だがシアル酸付加糖鎖は高値を示す個体や、またその逆の個体も存在し、個体ごとに腫瘍マーカーとなりえる糖鎖構造が異なり、正確ながん診断には複数マーカーによる多項目測定が有効であること示唆された。質量分析装置が医療機器として承認され、今後、質量分析の臨床検査への応用が期待されることから、本研究の成果もその発展の一端を担う可能性がある。

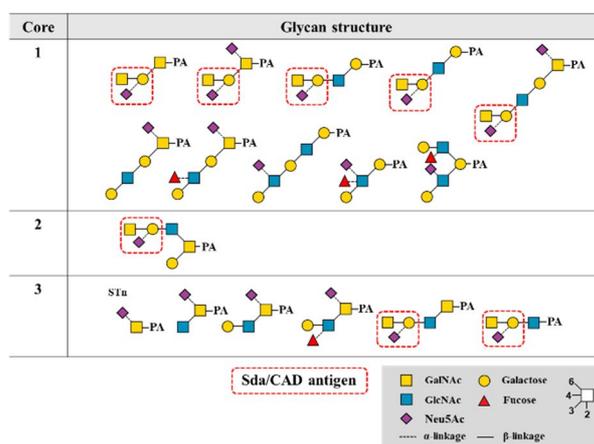


図2 血清グライコミクスにより検出した腫瘍マーカー候補群

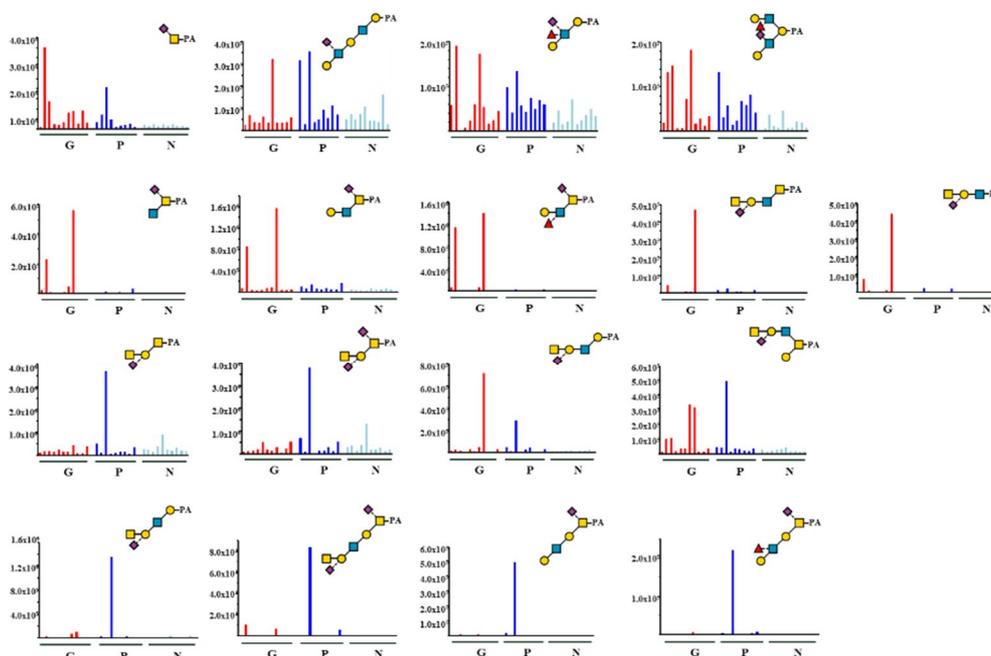


図3 胃がん患者(G)膵がん患者(P)健常者(N)血清の腫瘍マーカー候補の測定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka-Okamoto M, Hanzawa K, Mukai M, Takahashi H, Ohue M, Miyamoto Y.	4. 巻 28
2. 論文標題 Identification of internally sialylated carbohydrate tumor marker candidates, including Sda/CAD antigens, by focused glycomic analyses utilizing the substrate specificity of neuraminidase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 247-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwy010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hanzawa Ken, Tanaka-Okamoto Miki, Murakami Hiroko, Mukai Mikio, Takahashi Hidenori, Omori Takeshi, Ikezawa Kenji, Ohkawa Kazuyoshi, Ohue Masayuki, Miyamoto Yasuhide	4. 巻 -
2. 論文標題 Investigation of acidic free-glycans in urine and their alteration in cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwaa100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本三紀 半澤健 宮本泰豪
2. 発表標題 シアリダーゼ基質特異性を利用したフォーカストグリコミクスによる血清腫瘍マーカー候補群の同定
3. 学会等名 第37回 日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡本三紀 半澤健 宮本泰豪
2. 発表標題 シアリダーゼ基質特異性を利用したフォーカストグリコミクスによる血清腫瘍マーカー候補群の同定
3. 学会等名 第91回 日本生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 半澤健 岡本三紀 村上博子 宮本泰豪
2. 発表標題 腫瘍マーカー候補としての遊離糖鎖の解析
3. 学会等名 第38回 日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 半澤健 岡本三紀 村上博子 宮本泰豪
2. 発表標題 腫瘍マーカー候補としての尿中遊離糖鎖の定量解析
3. 学会等名 第39回 日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 半澤健 岡本三紀 村上博子 宮本泰豪
2. 発表標題 腫瘍マーカー候補としての尿中遊離糖鎖の定量解析
3. 学会等名 第68回 質量分析総合討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 半澤健 岡本三紀 村上博子 宮本泰豪
2. 発表標題 尿中遊離糖鎖の腫瘍マーカー候補の探索
3. 学会等名 第45回 日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------