

令和 3 年 4 月 28 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：18K07433

研究課題名(和文)糖鎖腫瘍マーカー群の質量分析を用いた多項目同時測定法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a mass spectrometry-based multiplex assay for glycation tumor markers

研究代表者

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・研究所分子生物学部部長

研究者番号：90322742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が見出した異性体を含む多種類の糖鎖腫瘍マーカー群を、質量分析の Selected reaction monitoring (SRM)法により、高精度、高感度、多項目同時測定する技術の確立を目指した。使用するHPLC、配管径、用いるカラム、溶媒、溶出条件など様々なパラメーターを検討した。その結果、多項目同時測定可能な条件を見出すことができた。数種類の糖鎖混合物を用いて精度、感度の確認も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、腫瘍マーカーの測定はすべて抗体を用いるELISA法が利用されている。ELISA法では、複数のマーカーを同時に測定することは困難で、個々のマーカーを別々に測定している。そのため、2-3種類のマーカーを選択している。一方、SRM法では多項目を同時に測定することが可能であり、今回の研究で、我々が見出した糖鎖腫瘍マーカー群を多項目同時に測定する方法を確立した。臨床検査において、腫瘍マーカー群のELISAと並ぶ測定方法になると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish a highly accurate, highly sensitive, and multiplex analytical method for a group of glycan tumor markers, including the isomers found by us, by the selected reaction monitoring (SRM) method of mass spectrometry. We investigated various parameters such as HPLC, pipe inner diameter, column, solvent, and elution conditions. As a result, we were able to find the conditions that enable multiplex analyses. The accuracy and sensitivity were also confirmed using several types of glycan mixtures.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：腫瘍マーカー 糖鎖 質量分析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌の診断や、治療後の経過観察、再発の発見などには、画像診断のほかに、血清診断が用いられる。腫瘍マーカーとして、たんぱく質抗原は AFP、CEA、PSA などがあり、糖鎖抗原としては CA19-9、DU-PAN-2、STN などが臨床の場で広く使用されている。ただし、これらのマーカーのみではまだまだ不十分で、さらなる癌診断、治療成績の向上には、新たなマーカーの発見と、測定技術の開発の両者が期待されている。現在使用されている腫瘍マーカーで、一つのマーカーのみですべての癌を診断できるものはないため、幾つかのマーカーを組み合わせで使用している。もちろんすべてのマーカーを使用できれば診断向上につながるのは間違いない。しかし、これらのマーカーは、すべて ELISA で測定されている。一回の ELISA 測定で複数のマーカーを同時に測定する(多項目同時測定、Multiplex 解析)試みはなされてきたが、multiplex の immunoassay は困難であるといわざるを得ない。そのため、個々のマーカーを別々に ELISA 測定せざるを得ず、医療行政の観点から、現在は 2 - 3 種類のマーカーのみ測定している。これらの点を克服するには、1) 有望な新規のマーカーを数多く探索すると共に、2) それらをすべて multiplex で測定する系の確立が必要であると考えた。

2. 研究の目的

糖鎖腫瘍マーカーの探索とその臨床検査への応用を重要な研究テーマとしている。既存の糖鎖腫瘍マーカーの発見はすべて単クローン抗体に依存している。すなわち、癌組織、癌細胞株などをマウスに免疫し、糖鎖を認識するものを含む数多くの単クローン抗体が得られた。我々は、糖鎖抗原の中には構造的に抗体が作製し難いものがある可能性が高く、そこには未知の糖鎖腫瘍マーカーが少なからず存在すると考えた。そこで、微量糖鎖構造解析技術を駆使し、血清中の糖鎖腫瘍マーカーの本体とされる O 型糖鎖を、2 次元の HPLC で分離し、がん患者・健常者間で定量・比較することで(HPLC-based な血清グライコミクス解析)、新規の腫瘍マーカー候補の同定を試みた。さらに、検出されたマーカー候補は血中で微量にしか存在しないため(ppm レベル)、通常の HPLC の蛍光検出では定量が不可能であった。

そこで、質量分析の Selected Reaction Monitoring 法(SRM 法)を用いて微量糖鎖を定量する技術を独自に開発し、同定した糖鎖マーカー候補を数百人の症例に対して、個々に高精度、高感度に定量し、臨床での有用性を検討してきた。さらに、この SRM 法での定量の利点は、multiplex 解析に非常に適している点である。すなわち、HPLC-based な方法で数多くのマーカーが検出されれば、将来的にそれらを一度に SRM で測定できる可能性が大きく、実際の臨床検査への導入の可能性が期待できる。

硫酸付加糖鎖などを含む、有望な新規のマーカーとして 20 をこえる糖鎖マーカー候補をすでに同定していた。そこで、本研究では、臨床検査の現場に向けたための次のステップとして、臨床的に有用と思われるマーカーすべてを一回の解析で測定する系を確立し、臨床応用にむけた基盤作りを行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、糖鎖腫瘍マーカーの SRM 法を用いた、高精度、高感度の多項目同時測定法の確立を目指した。使用する HPLC の種類、用いる配管の内径、サンプル注入方法、糖鎖分離に用いる HPLC カラム、使用する溶媒、溶媒の濃度勾配など、様々なパラメータを詳細に解析し、最適化を目指す

した。解析にはピリジルアミノ化(PA化)された糖鎖を用いた。

4. 研究成果

最初に、質量分析装置のフロント部分、すなわち高速液体クロマトグラフィー(HPLC)での多種類の糖鎖マーカー群を分離する技術の改良を行った。nano-HPLC(流速 2micro liter/ min、0.2mm X 50mm系のマイクロカラムを使用)と、conventionalなHPLC(流速 100-200micro liter/ min、1-2mm X 100-150mm系のセミマイクロカラムを使用)とで、感度や分離能を比較した。その結果、conventionalなHPLCでは、nano-HPLCに比して感度は1桁程度落ちるが、分離能には優れていた。本研究の目的達成には、感度はもちろん重要であるが、それ以上に異性体の分離が必須であることから、conventionalなHPLCでのシステム構築を採用した。次に、感度を上げる条件検討に取り組んだ。低感度の一つの理由は、注入したサンプルがC18逆相カラムを通過中に拡散しピークがブロードになることが上げられる。糖鎖はC18逆相カラムへの吸着能は低い。アプライするサンプル量は5-10microLであるが、サンプルループが100micro Lであるため、サンプルループを溶媒が流れる間に拡散するものと考えられた。そこで、サンプルが注入された後、サンプルループを通過しないように(ループカット)して溶媒を流す条件を試行錯誤した。その結果、流速50micro liter/minで測定を開始した後、2分後にループカットすることで、サンプルのカラム内での拡散を防ぐことができ、3-5倍程度の感度の上昇につながった。HPLCカラムと質量分析装置をつなぐtube内で拡散する可能性も検討した。PEEK tubeを使用しているが、0.125mm系のtubeに比して、0.05mm系のtubeの方がサンプルの拡散が少なく、感度が2倍程度上昇した。

SRM法での多項目同時測定に向けてさらに詳細に条件検討した。用いるカラムを順相、逆相のカラムで詳細に比較検討した結果、現時点では、逆相カラム(1mm X 150mm, 粒子径3μm)が最適と判断した。溶媒を検討したところ、酢酸トリエチルアミン系を使用する場合は、感度、分離に優れていたが、糖鎖は1価のプロトン付加イオン[M+H]⁺として検出された。定量用の3連四重極型質量分析装置(4500QTRAP、AB Sciex)の質量検出限界は通常は2000以下である。そのため、酢酸トリエチルアミン系での解析は、質量が2000以下のものに適応することとした。質量が2000をこえるN型糖鎖などでは、代わりにギ酸系を使用することで、すべての糖鎖がm/zが2000以下の[M+2H]²⁺、[M+3H]³⁺などの多価イオンとして検出できたため、ギ酸を用いることとした。溶出にはアセトニトリルの濃度勾配を用いた。

実際のサンプルを用いて上記の条件をイオントラップ型質量分析計(LTQ XL、Thermo)で確認した。糖鎖には還元末端がピリジルアミノ化されたものを用いた。グルコースオリゴマー混合物(グルコースが1個から15個まで付加された15種類の糖鎖混合物)、GM3やGD1aなどの12種類の酸性糖脂質糖鎖混合物、ラクトースやlacto-neo-tetraoseなどの16種類の中性糖脂質糖鎖混合物で多項目同時測定を実施した(図1)。

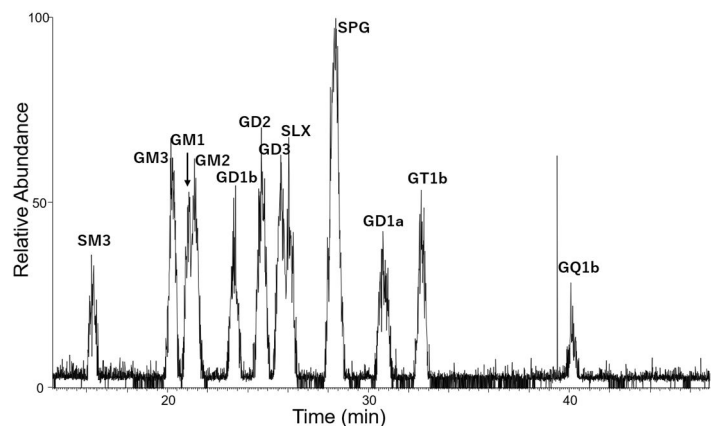


図1 12種類の酸性糖脂質糖鎖の質量分析による多項目同時測定

それぞれの糖鎖の量は100fmol程度であったが、ほとんどすべての糖鎖が分離できた。3連四

重極型質量分析装置では、問題なく定量可能と判断できる。

今後は、実際のヒトサンプルでの定量する必要がある。ヒトサンプルの定量に関しては、異性体がどの程度分離できているかの確認が必須である。PA化した糖鎖を利用する場合は、HPLCでのpeak areaでの定量と、SRM法での定量結果を詳細に解析することで、個々の糖鎖マーカでの異性体との分離ができているか否かを確認することが可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshida H, Koodie L, Jacobsen K, Hanzawa K, Miyamoto Y, Yamamoto M.	4. 巻 10
2. 論文標題 B4GALNT1 induces angiogenesis, anchorage independence growth and motility, and promotes tumorigenesis in melanoma by induction of ganglioside GM2/GD2.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-57130-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

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 K, Tanaka-Okamoto M, Murakami H, Mukai M, Takahashi H, Omori T, Ikezawa K, Ohkawa K, Ohue M, Miyamoto Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Investigation of acidic free-glycans in urine and their alteration in cancer.	5. 発行年 2021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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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 日本糖質学会
4. 発表年 2019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 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尿中遊離糖鎖の定量解析
3. 学会等名 日本糖質学会
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 日本医用マススペクトル学会
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
---------	---------