

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：84409

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16569

研究課題名（和文）尿中遊離糖鎖に着目した新規腫瘍マーカーの開発

研究課題名（英文）Development of novel tumor markers focusing on urinary free-glycans

研究代表者

半澤 健（Hanzawa, Ken）

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：00808347

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：がん化に伴い増加する糖鎖は腫瘍マーカーとして臨床検査において利用されている。現在利用されている糖鎖マーカーは複合糖質（糖タンパク質・糖脂質）として存在するものである。一方で、他分子に結合せずに存在する遊離糖鎖に関する研究はあまり行われていなかった。本研究ではがん患者の尿中に排出される遊離糖鎖に着目し、新規腫瘍マーカー候補の探索を行った。糖鎖は液体クロマトグラフィーと質量分析に基づく手法で解析した。結果として、一部のがん患者において特徴的な増加傾向を示す遊離糖鎖群を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖はこれまでも腫瘍マーカーとして広く用いられ、また、さまざまな研究が行われてきた。本研究は遊離糖鎖に着目するという点で新しい試みであり、現在までの糖鎖マーカー研究をさらに発展させるものである。また、尿中遊離糖鎖の詳細なプロファイリングは、がんを含む疾患と糖鎖の生合成・代謝に関する新たな知見を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：Altered glycan levels, which are specific in cancer patients, have been used as tumor markers. Those glycans are glycoconjugates that exist as glycoproteins or glycolipids. On the other hand, free glycans that are not covalently bound to other molecules have received less attention. Therefore, to identify novel tumor marker candidates, urinary free-glycans (acidic fraction) from cancer patients were investigated. The glycans were analyzed by liquid chromatography and mass spectrometry. As a result, glycans that showed characteristic increasing trends in some cancer patients were found.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 遊離糖鎖 がん 尿 高速液体クロマトグラフィー 質量分析 選択反応モニタリング

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

がんの診断において、腫瘍マーカーは治療効果や再発の判断を含めた重要な役割を担っている。その一方で、診断精度の向上のためにさらなる腫瘍マーカーの探索と検出方法の開発が求められている。がん化に伴い増加する糖鎖を利用した腫瘍マーカー(例: CA19-9、DuPan-2、STN)は広く用いられている。これらの糖鎖は糖タンパク質・糖脂質として存在する複合糖質である。一方で、他の分子に結合せずに存在する遊離糖鎖とがんに関する知見は少ない。尿は体内で生成された遊離糖鎖が排出されることが知られるため、がん患者の尿検体における組成の変化を解析することにより、新規腫瘍マーカーの候補の発見につながると考えられる。

### 2. 研究の目的

がん患者の尿に含まれる遊離糖鎖に焦点を当てた腫瘍マーカー候補の探索を行い、そのマーカー候補の臨床へ利用可能かどうかの検証へと進めることを目指す。また、現行の手法では時間を要する、糖鎖調製から定量解析までの迅速化も併せて検討を進める。

### 3. 研究の方法

出発試料として、がん患者(胃・膵・胆管がん患者、ステージ3~4に相当する進行がん)および健常者コントロール(非担がん)から採取された尿検体を用いた。尿検体間の濃度差は尿中クレアチニン濃度を基準として補正を行い、検体間の比較には400 mgクレアチニン相当量を出発試料として調製したものの一部を使用した。遊離糖鎖は、尿から陽イオン交換樹脂とグラファイトカーボン固相抽出により抽出し、その糖鎖還元末端をピリジルアミノ化により蛍光標識した。その後、多段階の高速度液体クロマトグラフィー(HPLC)により分離を行った。まず陰イオン交換(DEAE)HPLCにより酸性度に基づいて糖鎖を分離した。尿中遊離糖鎖は非常に多様な糖鎖混合物であるため、本研究ではまず、酸性糖鎖画分、かつその中の大多数を占める2から10糖程度の糖鎖画分を対象を絞って解析を進めた。続いて、順相(Amide-HILIC mode)および逆相(C18)HPLCにより分離し、遊離糖鎖のプロファイルを検体間で比較した。糖鎖の構造解析は、HPLCにおける移動度(2次元HPLCマッピング法)および質量分析と、これらに酵素・化学的な処理を組み合わせることによって行った。また、糖鎖の存在量の高感度な検体間比較は、三連四重極型質量分析装置(QTRAP4500)のLC/MS/MSによる選択反応モニタリング(SRM)法によって行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 尿中酸性遊離糖鎖のプロファイリング

尿中遊離糖鎖解析において、一つの課題は検体間で大きな濃度差がある尿から安定して糖鎖を回収し比較できるのかという点であったが、これに関しては尿中クレアチニン濃度を基準として出発試料の量を定め、陽イオン交換とグラファイトカーボン精製を行うことにより、遊離糖鎖の濃度がほぼ一定で抽出できる(健常者の場合)ことが確認できた。

尿中遊離糖鎖は非常に多様な糖鎖混合物であり全ての構造の解析は困難であった。本研究では、既存の糖鎖腫瘍マーカーではCA19-9(Sialyl Lewis A)、DuPan-2(Sialyl Lewis C)やSTN(Sialyl Tn)といった酸性糖鎖が用いられていることから、酸性糖鎖画分に焦点を当てて解析を進めた。

まず、健常者とがん患者でともに主要な糖鎖および一部のがん患者で特徴的に増加傾向がみられる糖鎖構造の把握を行った。見つかった遊離糖鎖はエピメリ化したものを含めると100種類以上が同定され、それらはその還元末端構造に基づいて、ラクトース(Gal 1-4Glc)コア型、Type-II N-アセチルラクトサミン(LacNAc, Gal 1-4GlcNAc)コア型、遊離ムチン型コア(Gal 1-3GalNAc)、遊離N-結合型糖鎖(Man 1-4GlcNAc / GlcNAc 1-4GlcNAc)、Xyl 1-3Glc-コア、その他のウロン酸(HexA)含有糖鎖、

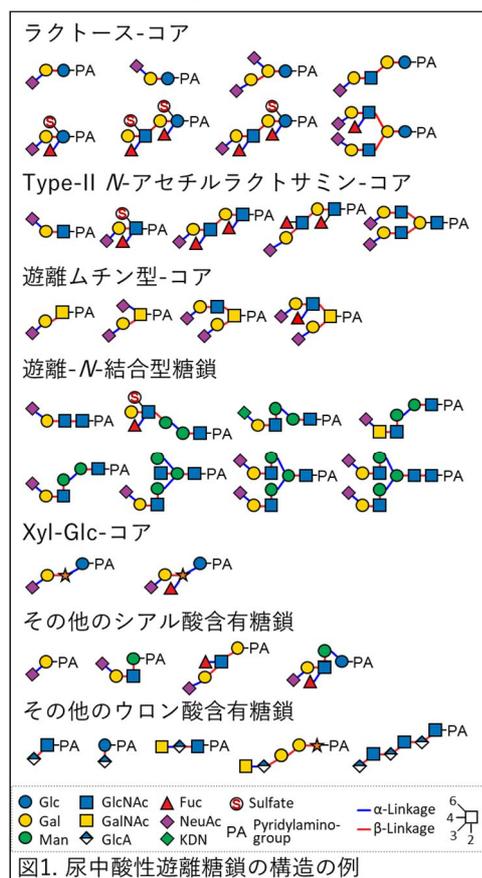


図1. 尿中酸性遊離糖鎖の構造の例

その他のシアル酸含有糖鎖に分類された。

(2) がん患者において増加傾向を示した遊離糖鎖

図2は遊離糖鎖のSRMによる測定結果の例を示し、一部のがん患者において明らかな糖鎖レベルの上昇が認められている。がん患者において増加傾向が認められた代表的な糖鎖構造は、シアリルラクトース類(図2-a,b)、シアリルルイスA/Xにより伸長されたラクトースまたはLacNAc-コア糖鎖(図2-c,d,e)、遊離N-結合型糖鎖(図2-f,g,h,i)そして新規のXyl 1-3Glc-コア糖鎖である、NeuAc 2-3Gal 1-4(+/-Fuc 1-3) Xyl 1-3Glc(図2-j,k)であった。構造的に類似したラクトース-コア糖鎖とLacNAc-コア糖鎖では、前者の方ががん患者における増加の度合いが大きかった。シアリルルイスA(NeuAc 2-3Gal 1-3(Fuc 1-4)GlcNAc-R)を含む糖鎖はCA19-9と同様の増加傾向を示した(図2-e)、N-結合型糖鎖では、2,6-結合したNeuAcまたは6-スルホルイスX(Gal 1-4(Sulfate-6)(Fuc 1-3)GlcNAc-R)構造を有する糖鎖が増加傾向を示した。また、全ての遊離糖鎖が必ずしも増加傾向を示すわけではなかった(図2-l,m,n,o)。今回の分析対象はステージ3~4に相当する進行がん患者検体のみである。しかし興味深いことに、この中には進行がんであるにも関わらずCA19-9(またはDuPan-2)およびCEAを含む既存の腫瘍マーカーが陰性の患者が含まれており、さらにその一部において遊離糖鎖レベルの上昇傾向が見られた(図2において示す)。したがって、これらの遊離糖鎖は、そのような患者のための補助的なマーカーとして有用となる可能性がある。

(3) 分析手法の改良

上記の遊離糖鎖の探索および定量測定は多段階のHPLC分離を経た後に行われた。一方で、複数種類の糖鎖の一括した検出を含め、測定までの時間を短縮するために、標識された尿中糖鎖混合物をLC/MSを用いて一括して測定する系の検討も進めた。尿中遊離糖鎖には、質量分析では分別が困難な構造的に類似した異性体が多く含まれるが、異性体の分離には逆相系の分離が適しているようであった。ギ酸系の移動相を用いることで、二糖の小さな糖鎖から少なくとも10数残基からなるサイズの糖鎖までを一括して分析できることが確認された(図3)。

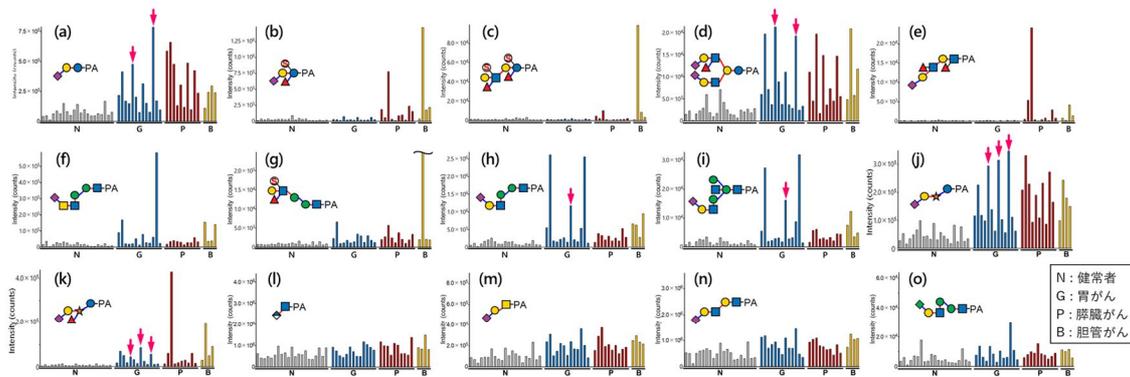


図2. 尿中酸性遊離糖鎖のSRM測定 ↓: CEA, CA19-9陰性患者

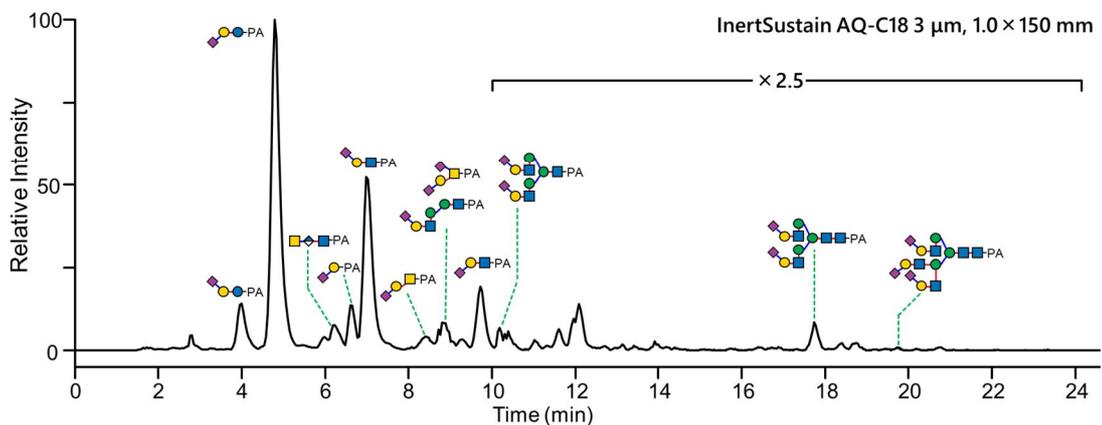


図3. 逆相LC/MSによる尿中酸性遊離糖鎖の分離と検出を行った例(ペースピークイオンクロマトグラム)

## 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 Tanaka-Okamoto Miki, Hanzawa Ken, Murakami Hiroko, Mukai Mikio, Takahashi Hidenori, Omori Takeshi, Ikezawa Kenji, Ohkawa Kazuyoshi, Ohue Masayuki, Miyamoto Yasuhide	4. 巻 12
2. 論文標題 Occurrence of a d-arabinose-containing complex-type free-N-glycan in the urine of cancer patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-08790-0	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 Miki, Hanzawa Ken, Murakami Hiroko, Mukai Mikio, Miyamoto Yasuhide	4. 巻 641
2. 論文標題 Identification of 1-3 galactosylglucose-core free-glycans in human urine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 114427 ~ 114427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2021.114427	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 31
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 391 ~ 409
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2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 がん患者における尿中遊離糖鎖の変化の解析
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021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

〔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
---------	---------