

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07409

研究課題名（和文）血清グライコミクスを用いた糖鎖腫瘍マーカーの同定と多項目同時診断システムの構築

研究課題名（英文）Identification of novel carbohydrate tumor markers using serum glycomics and development of a diagnostic system using multiple tumor markers

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・糖鎖オンコロジー部 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）：がん患者の血清中O型糖鎖プロファイルを健常者と比較することにより、がん患者特異的な糖鎖構造の探索を行った。これまでに報告のある短いO型糖鎖ではなく、伸長型O型糖鎖に着目し、その検出方法の最適化を行った。確立した方法を用いて見出した糖鎖構造のがん患者血清中レベルは、一部の患者検体で高値であるものの、全てのがん患者で高い値を示すわけではない。これらの結果より、検体ごとに腫瘍マーカーとなり得る糖鎖構造が異なること示した。患者ごとに異なるがん診断マーカーを検出するには、多項目同時診断測定が可能な質量分析が有効である。その測定方法の検討も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖腫瘍マーカーはがん検診あるいは治療後のモニターとして利用されているが、全てのがん患者に有効ではない。がん患者の糖鎖構造は、糖鎖合成不全により短いO型糖鎖が増加すると報告されてきた。これらは糖転移酵素の活性によるものであり、本研究で示した伸長構造を合成することもある。個々のがん検体で腫瘍マーカーとなり得る糖鎖構造は異なるため、より多くの腫瘍マーカー候補となる糖鎖構造の組み合わせにより、より多くのがん検出が可能となる。多項目同時測定が可能な質量分析によるがん診断は、これまで検出できなかったがん患者の検出が期待できる。

研究成果の概要（英文）：For identification of novel carbohydrate tumor markers, we searched for cancer patient-specific glycan structures by comparing the serum O-glycan profiles of cancer patients with those of healthy individuals. We focused on extended O-glycans instead of short O-glycans, which have been reported so far, and optimized the detection method for them. The serum levels of glycan structures found using the established method were high in some patient specimens, but not in all cancer patients. These results indicate that each individual specimen has a different glycan structure that can be used as a tumor marker. To detect cancer diagnostic markers that differ from patient to patient, mass spectrometry is an effective method that enables simultaneous multi-parameter diagnostic measurements. We also investigated the measurement method.

研究分野：糖鎖オンコロジー

キーワード：腫瘍マーカー 糖鎖 HPLC 質量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん化による糖鎖構造の変化は、多くのがん組織での共通した現象で、変化した糖鎖の一部は腫瘍マーカーとしてがん診断や治療効果・再発のモニターなどに利用されている。しかし全てのがん患者に有効な腫瘍マーカーは欠如している。現在、臨床検査で実用化されている腫瘍マーカーの測定には、抗体を用いた ELISA 法が主流である。この方法のデメリットは、抗体に依存する点である。抗体に認識される分子のみが抗原として利用されるので、がん抗原の検出には限界がある。また、多項目同時測定は不向きであり、複数分子の同時測定は難しい。多くのがん患者に有効な精度の高いがん診断を達成するためには、臨床的に有用な腫瘍マーカーをより多く同定し、それら全てを同時に測定できる診断システムの開発が求められる。

2. 研究の目的

本研究は、多くの腫瘍マーカーの同時測定システムを用いた精度の高いがん診断の臨床応用を目的としている。細胞の糖鎖構造はがん化に伴い変化し、変化した糖鎖構造の一部は、糖鎖腫瘍マーカーとして既にごん診断に利用されている。これらの腫瘍マーカーは、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、がん組織を特異的に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。しかし糖鎖抗原の中には構造的に抗体を作製し難いものも存在すると仮定し、抗体に依存した従来の方法ではなく、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた独自の血清糖鎖プロファイリングを行った。がん患者と健常者間で有意な差を示す糖鎖構造の検出およびその同定を試みた結果、CA19-9 関連糖鎖である core1 sialyl Lewis A (C1SLA) や STn 抗原など既に知られたがん抗原に加え、数種類の新規糖鎖腫瘍マーカー候補を見出すことに成功し、新たな腫瘍マーカーの探索に、HPLC を用いた方法 (HPLC-based グライコムクス解析) も有効な手段となり得ることがわかった。さらに血清中の微量酸性糖に着目した独自の HPLC-based グライコムクス解析を行い、新たに 14 種類の硫酸基付加糖鎖と 17 種類のシアル酸付加糖鎖を腫瘍マーカー候補として見出した。これらの血清中レベルの測定結果から、患者ごとに有意に上昇する糖鎖構造が多様であることが示唆された。そこで複数の糖鎖腫瘍マーカーの同時測定による新たながん診断の確立を目指すことが、これまで見逃されていた多様ながんの検出につながると考えた。

3. 研究の方法

本研究では、HPLC-based グライコムクス解析に基づいた、がん患者血清中の新規腫瘍マーカー探索と、同定した腫瘍マーカー候補を含めた多項目腫瘍マーカー同時測定方法の確立を行った。

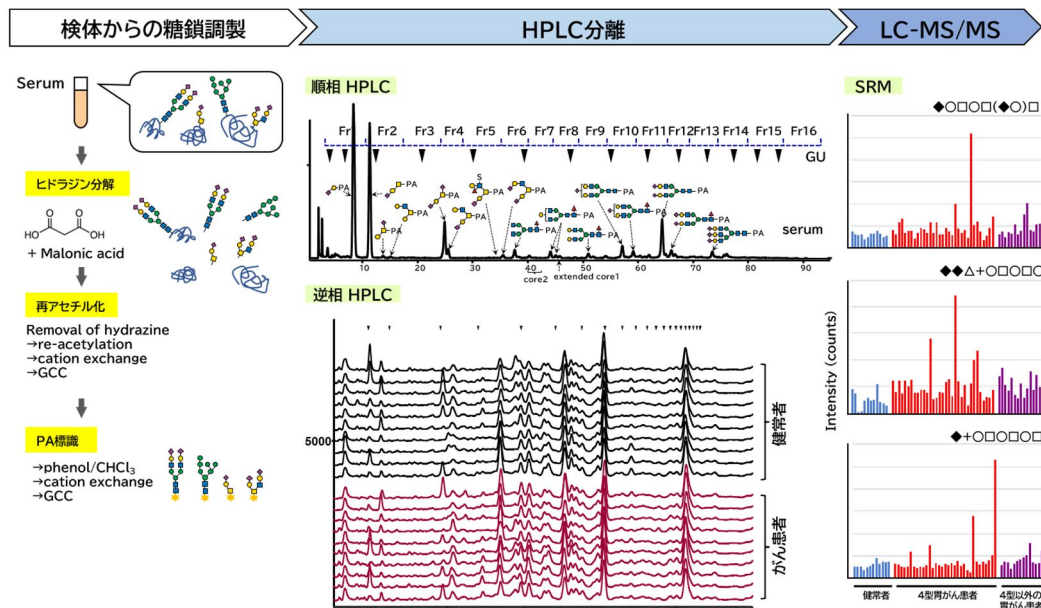
(1) がん患者血清から調整した糖鎖を HPLC のパターン比較により新規腫瘍マーカーを検出する。血清中の糖鎖腫瘍マーカーは、おそらくがん組織の分泌するムチン由来で、ムチンに付加する糖鎖のほとんどは O 型糖鎖であり、腫瘍マーカーの本体を担っている。また、がん細胞では糖鎖合成不全により Tn 抗原や T 抗原のような短い糖鎖構造が増加する。これらは糖転移酵素の活性によるものであり、反対に伸長構造を合成することもある。そこで、本研究では伸展型 O 型糖鎖に着目し、その検出方法の最適化を行った。最適化した方法を用いて、糖鎖プロファイルを得た後、見出した糖鎖腫瘍マーカー候補の血清中糖鎖レベルを質量分析で測定した。

(2) 複数の糖鎖腫瘍マーカーを用いた多項目腫瘍マーカー同時測定方法の検討は、質量分析により行った。糖鎖定量解析には 3 連四重極型質量分析計 (AB SCIEX 4500QTRAP) による selected reaction monitoring (SRM) 法を適用している。SRM 法を用いた定量法の利点は、一度の測定で複数の糖鎖腫瘍マーカーを同時に測定できることである。既に当研究室で同定した複数の糖鎖腫瘍マーカー候補を用いて測定法の検討を行った。

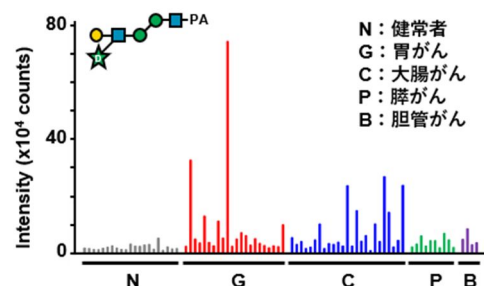
4. 研究成果

(1) 研究開始当初は N 型糖鎖の混在を除去するため、N 型糖鎖特異的切断酵素 PNGaseF を反応させた後、タンパク沈殿および遠心濾過により糖タンパク質と N 型および遊離糖鎖 mixture に分ける方法を検討していた。N 型糖鎖の約 5% が O 型糖鎖フラクションへ混入してしまうものの、N 型糖鎖および遊離糖鎖と O 型糖鎖の分離回収方法はほぼ完成した。しかし、分離過程でおそらくムチン型糖鎖の回収率が不安定であることがわかった。検体ごとの糖鎖修飾の程度による回収率のばらつきが予測されたため、最終的にはヒドラジンによる O 型糖鎖回収を行った。N 型糖鎖の混在のため、順相 HPLC 分取を N 型糖鎖とオーバーラップしてしまう伸展型 O 型糖鎖の分取を考慮した条件に最適化することで、標的とする伸展型 O 型糖鎖の検出を試みた。

本研究では 4 型胃癌を含む胃癌を標的とした。健常者 12 名、4 型胃癌患者を含む胃癌患者 47 名の血清から O 型糖鎖の調製および蛍光標識を行い、そのプロファイルからがん患者で高値を示した糖鎖の定性解析および血清中糖鎖レベルの測定を質量分析を用いて行った。全ての患者で高い値を示すような糖鎖構造はなかったものの、数個体で上昇している糖鎖構造を複数見出している。伸展型 O 型糖鎖の解析の問題点として、構造解析に必要な糖鎖量が得られないことと、糖鎖が伸展するほど増える異性体数である。これらの理由から、血清中に含まれている腫瘍マーカー候補の正確な糖鎖構造の解析は、現在解析途中である。



(2) これまでに同定した腫瘍マーカー候補を含めた多項目腫瘍マーカー同時測定方法の検討を行った。血清中の糖鎖構造を用いた測定法は、上記の通り糖鎖構造を解析中であるため、既に糖鎖腫瘍マーカー候補が決定済みである尿中遊離糖鎖を用いて検討した。nano-LC/MS の SRM 法では、5 種類のマーカーの同時測定は成功していたが、利便性の面から ESI-LC/MS システムに変更した。検体は蛍光ラベルした糖鎖 mixture を逆相分離によりグラジエント溶出し MS 解析に供した。本研究で検討した 7 種類の糖鎖構造は、1 種類の内部標準と 6 種類の尿中遊離糖鎖である。異性体との区別のため、それぞれの溶出時間を確認した上で、collision 後の fragmentation product (Q3 イオン) の設定により選択性を上げた。また 6 種類の尿中遊離糖鎖の中の 1 つに、これまでヒトでは合成の報告のない D-arabinose の付加した糖鎖構造を含めた。D-arabinose 付加した N 型遊離糖鎖は、複数のがん患者尿中で有意に上昇していることを見出した。D-arabinose はペントースの一つで、ヒトで合成可能なペントースは xylose であるがその構造は特徴的であり、また他の単糖に比べペントース含有糖鎖構造は圧倒的に少ない。そこで、



異性体がほとんどないであろう D-arabinose 付加糖鎖構造を多項目腫瘍マーカー候補の一つに選択した。

現在、質量分析を用いた複数糖鎖構造の同時測定の精度および正確性等の検討は終了し、多項目同時測定法が有効な手段となり得ることを明らかにしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

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 2021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 -
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 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 Hanzawa Ken, Tanaka-Okamoto Miki, Murakami Hiroko, Suzuki Noriko, Mukai Mikio, Takahashi Hidenori, Omori Takeshi, Ikezawa Kenji, Ohkawa Kazuyoshi, Ohue Masayuki, Natsuka Shunji, Miyamoto Yasuhide	4. 巻 17
2. 論文標題 Increased levels of acidic free-N-glycans, including multi-antennary and fucosylated structures, in the urine of cancer patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0266927 ~ 0266927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0266927	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岡本三紀、半澤健、村上博子、谷口直之、宮本泰豪
2. 発表標題 がん患者尿中におけるD-arabinose付加遊離N型糖鎖の同定
3. 学会等名 第41回 日本糖質学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ken Hanzawa, Miki Tanaka-Okamoto, Hiroko Murakami, Yasuhide Miyamoto
2. 発表標題 Sialylated free-glycans in urine and their alterations in cancer
3. 学会等名 国際シアロ糖鎖科学会議2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 半澤健、岡本三紀、村上博子、中嶋和紀、宮本泰豪
2. 発表標題 尿中遊離糖鎖の検出と疾患マーカーとしての可能性
3. 学会等名 第47回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2022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 尿中酸性遊離糖鎖とそのがん患者における変化の解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022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 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 宮本泰豪、半澤健、岡本三紀、向井幹夫、高橋秀典、大森 健、池澤賢治、大川和良、大植雅之
2. 発表標題 尿中の酸性遊離糖と癌におけるそれらの変化の検討
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新規逆相スケールによる高速液体クロマトグラフィー溶出時間標準化法	発明者 宮本泰豪、半澤健、 岡本三紀、長束俊 治、木下崇司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-053075	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------