

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430151

研究課題名(和文)糖鎖腫瘍マーカーの探索とその評価

研究課題名(英文)Exploration and evaluation of carbohydrate tumor marker

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府立成人病センター(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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：血清中の糖鎖腫瘍マーカーの本体とされるO型糖鎖を患者・健常者間で定量・比較することで、新規の腫瘍マーカー候補の探索を行った。その結果、3種類の糖鎖腫瘍マーカー候補を検出し、それらの詳細な糖鎖構造も解析した。これら候補の血中濃度を質量分析法のselected reaction monitoring法、特に安定同位体標識した内部標準を用いる方法で、高精度、高感度に測定する方法を確立した。この方法を用いて、1種類の候補のバリデーションを行った。

研究成果の概要(英文)：We have attempted to identify a novel glycan tumor marker by comparing the serum O-glycan profiles from healthy controls with those of cancer patients. We identified 3 marker candidates. The precise oligosaccharide structures of these candidates was clarified. To quantify these glycans, we developed the selected reaction monitoring (SRM) assay, which used a stable isotope-labeled glycan as internal standard with a high level of sensitivity and accuracy. Verification study of one of the candidate was then performed by SRM analyses.

研究分野：腫瘍生化学

キーワード：糖鎖 腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

糖鎖抗原は腫瘍マーカーとして広く臨床の場で使用されている。例として、CA19-9 や DuPan-2、CA125、STN 等があげられる。これらの糖鎖抗原にはすべてが単クローン抗体に依存するという特徴がある。すなわち、ヒト癌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、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。個々の抗体の性状が調べられ、その認識エピトープが判明した後、研究目的に、さらに診断目的に使用されるものが確立されてきた。すなわち、先に単クローン抗体が作製され、その中から糖鎖腫瘍マーカーとして応用できるものが選抜され、今日の検査に用いられている。しかし、特異性の高い単クローン抗体の作製の成否はエピトープに大きく依存するという問題点が存在する。実際、ウエスタンプロテイング・免疫組織化学において、明瞭かつ単一のバンドが検出できる、または S/N 比が高く、特異的な陽性シグナルが検出できる、といった抗体が数少ないことは多くの研究者が経験している。このことは糖鎖抗原でも同様であると推測できるため、既出のもの以外にも臨床応用可能な糖鎖抗原が多数あることが期待される。

2. 研究の目的

上記の背景を元に、抗体を用いずに、HPLC で血清中の糖鎖を定量し、癌患者・健常者間で有意な差を示す糖鎖の検出、さらにその同定を試みることにした。申請者の研究室では、既に微量糖鎖構造解析技術を有していた。この技術を、血清中の N 型/O 型糖鎖、特に、ムチン型である O 型糖鎖が腫瘍マーカーとして有力視されているため、これに応用できるよう、O 型糖鎖解析の方法論の確立を目指した。O 型糖鎖は構造解析に困難を要するため、その解析が進展していないのだが、血清のヒドラジン分解、糖鎖の蛍光標識 (PA 化)、HPLC による分離・精製、PA 化糖鎖の LC/MS/MS 解析、という一連の操作により、血清中の N 型/O 型糖鎖が良好な再現性を保って検出・解析できることが判明した。また、当技術により既存の腫瘍マーカーの CA19-9 の検出が可能か否かを検討したところ、CA19-9 高値患者の血清で CA19-9 構造付加 O 型糖鎖の HPLC のクロマトのピークとして検出に成功した。このことは、このアプローチは新規糖鎖腫瘍マーカー候補の検出に有効であることを示唆する。さらに、マーカー候補があれば、分取したものを遠心濃縮した後、イオントラップ型質量分析装置 (LCQ DecaXP) を用いた nanoLC-MS/MS にて質量分析し、糖鎖の構造を推定する。

3. 研究の方法

がん患者および健常者の血清をヒドラジン分解、60、16 時間行い、血清蛋白質から糖鎖部分を切り出す。糖鎖をアミノピリジン

にて蛍光標識し、PA 化糖鎖 mixture を作成する。この mixture を最初は amide 順相カラムにて分離し、O 型糖鎖が溶出される領域を 7 フラクションに分け、すべてのフラクションを分取する。分取したフラクションは次に C18 逆相カラムにて分離する。この 2 回目の逆相カラムでの分離パターン (糖鎖プロファイル) を、健常者、がん患者で詳細に比較して、癌関連ピークの探索、すなわち患者では検出できるが健常者では認められない、あるいは極めて低いピークを探索する。マーカー候補があれば、分取したものを遠心濃縮した後、イオントラップ型質量分析装置 (LCQ DecaXP) を用いた nanoLC-MS/MS にて質量分析し、糖鎖の構造を推定する。さらに、 α 2-3 シアリダーゼ、 α 1-3/4 フコシダーゼ、ヘキソダミニダーゼなどのグリコシダーゼ処理や 2 次元糖鎖マッピング法、さらには質量分析法を組み合わせることにより、リンケージを含め詳細な構造解析を行う。

4. 研究成果

(1) 糖鎖腫瘍マーカー候補の検出

健常者 10 名、膵臓癌患者 10 名、胃癌患者 10 名の血清の O 型糖鎖のプロファイルと比較することで 3 種類の糖鎖腫瘍マーカー候補が検出された。図 1 には、そのうちの一つの例を示す。健常人 (N1-N6) には認められないが、膵臓癌患者 P2, P3 にははっきりと認められるピークが存在する (矢頭参照)。

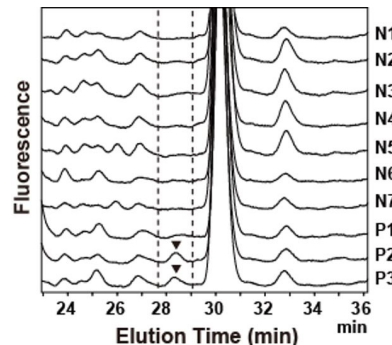


図1 糖鎖腫瘍マーカー候補の検出

このマーカー候補の特徴として、CA19-9 値が高い人に、このピークが認められる傾向があった。このピークを構成する糖鎖の構造を質量分析、グリコシダーゼ処理等で検討した結果、O 型糖鎖の Core1 構造に sialyl Lewis A 構造が付加されたもの、NeuAc α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal (Core1 sialyl Lewis A, C1SLA と略す)であった。これは CA19-9 そのものあるいは CA19-9 に関連する糖鎖と考えられた。

(2) 微量糖鎖の定量法の開発

検出された糖鎖は、1 種類を除き、非常に微量で (血清中では数 PPM レベル) で、HPLC の蛍光検出限界以下である。そこで、これらの微量糖鎖を高精度、高感度で定量できる方法をオリジナルに開発した。具体的には、質量分析の selected reaction monitoring 法 (SRM

法)を用いる方法である。さらには、精度を高めるために、安定同位体標識した内部標準を用いた。安定同位体標識した内部標準は、重水素標識したアミノプリジン(d_6 -AP)で糖鎖を標識することで質量が4増える PA 化糖鎖ができる(d_4 -PA glycan)。C1SLA の内部標準(d_4 -PA-C1SLA)は、大腸癌細胞株 SW1116 の培養上清を用いて作成した。定量の手順は以下に示す。血清から作成した PA-glycan mixture に 10fmol の内部標準を加える。この mixture を最初に amide 順相のカラムにて分離して、ターゲット(d_0 -PA-C1SLA)と内部標準(d_4 -PA-C1SLA)が溶出されるフラクションを分取する。そのフラクションを次に C18 逆相カラムにて分離し、同様に d_0 -PA-C1SLA と d_4 -PA-C1SLA が溶出されるフラクションを分取する。遠心濃縮後、SRM にて定量した。この定量法を評価するために、reverse calibration curve を作成した。その結果、C1SLA が 0.5fmol-1000fmol まで、直線性を示した。

(3) 多検体を用いた C1SLA の定量
血清 C1SLA 値を健常人 194 名(N)、胃癌患者 146 名(G) (ステージ I:69 名、ステージ II-IV: 77 名、大腸癌患者 101 名(C) (ステージ I: 17 名、ステージ II-IV: 84 名、膵臓癌患者 65 名(P)で測定した。

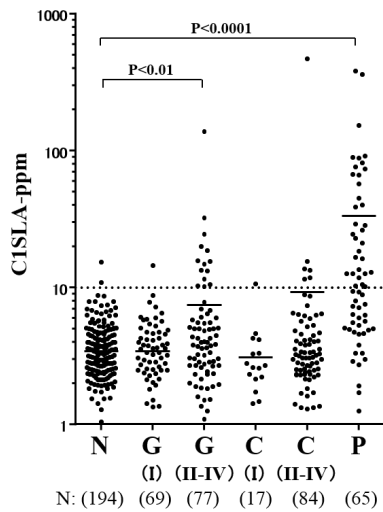


図2

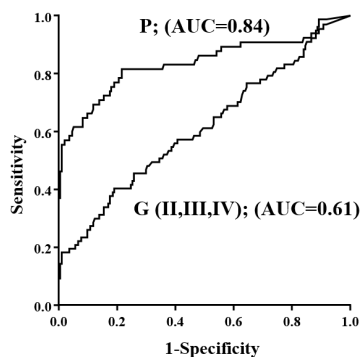


図3

その結果、C1SLA はステージ II-IV の進行胃癌および膵臓癌患者で有意に上昇していることが判明した(図2)。

ROC 曲線を作成したところ、進行胃癌(G)、膵臓癌(P)で、AUC 値がそれぞれ 0.61、0.84 であった(図3)。

SRM で測定した C1SLA 値と、ELISA で測定した血清の CA19-9 値を比較した。その結果、膵臓癌では弱く相関していたが(相関係数 0.44)(図4) 胃癌では相関が非常に低かった(相関係数 0.11)(図5)。

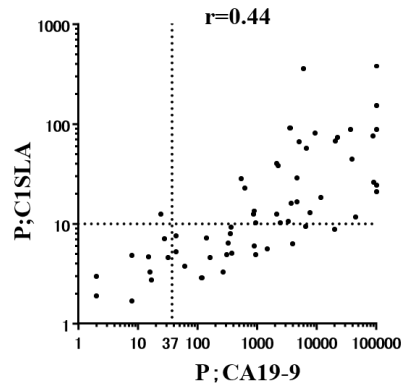


図4

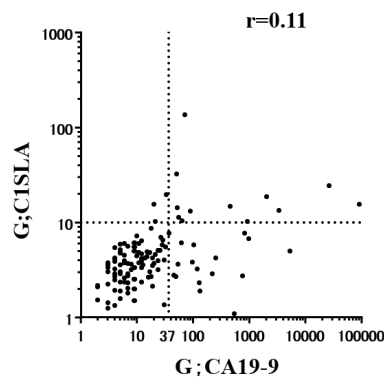


図5

すなわち、膵臓癌では、CA19-9 の上昇とともに、多くの症例では C1SLA 上昇する傾向にある。一方、胃癌では、CA19-9 高値でも C1SLA 値が低い症例、逆に、CA19-9 低値でも C1SLA 値が高い症例が少なからず存在した。このことは、胃癌などの、CA19-9 と C1SLA の相関が悪いがんでは、C1SLA は CA19-9 を補助するマーカーになりうる可能性を示唆する。

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.; 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 2016, 15, 152-65. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00893 査読あり

Jiang, Y.; Saga, K.; Miyamoto, Y.; Kaneda, Y., Cytoplasmic calcium increase via fusion with inactivated Sendai virus induces apoptosis in human multiple myeloma cells by downregulation of c-Myc oncogene. Oncotarget 2016, 7, 36034-36048. DOI: 10.18632/oncotarget.9105 査読あり

Yabu, M.; Korekane, H.; Miyamoto, Y., Precise structural analysis of O-linked oligosaccharides in human serum. Glycobiology 2014, 24, 542-53. DOI: cwu022 [pii]10.1093/glycob/cwu022 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

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、2016 年 9 月 3 日、高知市文化プラザ(高知)

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、2015 年 7 月 31 日、東京大学(東京)

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 回日本癌学会学術集会、2015 年 10 月 8 日、名古屋国際会議場(名古屋)

藪政彦、岡本三紀、是金宏昭、宮本泰豪、ヒト血清中の O 型糖鎖の詳細な構造解析、第 33 回日本糖質学会、2014 年 8 月 12 日、名古屋大学豊田講堂(名古屋)

6. 研究組織

(1) 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府立成人病センター(研究所)・その他の部局・総括研究員(分子生物学部門長)

研究者番号: 90322742

(2) 研究協力者

岡本 三紀 (Okamoto Miki)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他の部局・研究員

研究者番号: 20332455