

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07004

研究課題名（和文）マイナー酸性糖鎖解析技術を用いた膵管腺癌マーカーの開発

研究課題名（英文）Serum minor acidic glycan analysis for the development of pancreatic ductal adenocarcinoma markers

研究代表者

山田 佳太（Yamada, Keita）

大阪大谷大学・薬学部・講師

研究者番号：80584185

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）：本研究では、技術上の問題から解析が進んでいない血清中のマイナー酸性糖鎖の解析を行い、膵管腺癌マーカーとなりうる糖鎖を探索した。解析の結果、グルクロン酸化及び硫酸化N-型糖鎖、硫酸化O-型糖鎖、グルクロン酸化糖脂質糖鎖等の発現量が膵管腺癌患者血清で変動しており、それらの糖鎖がマーカーになると期待された。さらに、マイナー酸性糖鎖解析技術の高スループット化検討を行い、多検体の同時処理が可能な前処理法を確立すると共に、キャピラリー電気泳動法を用いた高速分析法を確立した。また、マイナー酸性糖鎖発現機構を明らかにする上で必要となる糖鎖キャリアタンパク質の特定技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、膵管腺癌マーカーとなりうる血清中糖鎖を特定することができた。膵管腺癌は膵臓癌患者の90%以上を占めており、早期診断が困難であると共に、死亡率の高いがん疾患である。本研究で得られた成果は、診断法の確立が求められている膵管腺癌の診断技術の向上に資するものであると考えられる。また、マイナー酸性糖鎖の解析は技術課題により困難であったが、本研究で確立された分析手法により、多くの技術課題が解決された。これらの技術は、他の疾患マーカーの探索に応用できる可能性がある。また、本研究で開発した技術は、解析が遅れているマイナー酸性糖鎖の機能解析を加速させるツールになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed minor acidic glycans in serum, which had not been previously analyzed due to technical difficulties, to search for glycan markers of pancreatic ductal adenocarcinoma. We found that the expression amount of glucuronide and sulfated N-glycans, sulfated O-glycans, and glucuronidated glycolipid glycans in serum were different between pancreatic ductal adenocarcinoma patients and healthy subjects. These results indicate that these minor acidic glycans can be used as pancreatic ductal adenocarcinoma markers. Furthermore, we have established a high-throughput pretreatment method that enables simultaneous preparation of minor acidic glycans from multiple samples and a rapid analysis method using capillary electrophoresis. We have also developed a technique to identify carrier proteins of minor acid glycans. In the future, we plan to use these technologies to identify carrier proteins of glycans identified as cancer markers and to clarify their expression mechanism.

研究分野：分析化学

キーワード：硫酸化糖鎖 グラフィー リン酸化糖鎖 セロトニン固定化カラム 親水性相互作用クロマト
キャピラリー電気泳動 膵管腺癌 膵臓がんマーカー

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。

1. 研究開始当初の背景

膵臓で発生する悪性腫瘍の90%以上は、膵管腺癌であり、発症後の予後は非常に悪い事が知られている。また、膵管腺癌は初期の段階では自覚症状が乏しいことに加えて、有効な診断法もないため、発見された時には治療が施せない状況であることが多い(CA. Cancer J. Clin. 59 (2009) 225-249.)。したがって、膵管腺癌の早期診断を可能にする有用なバイオマーカーが求められている (Pancreatolgy 15 (2015) 8-18)。

一方、バイオマーカー探索のアプローチの一つとして血清中の糖鎖構造変化を追跡する方法がある。糖鎖生合成は生体環境の変化に影響を受けやすいため、疾患発症時は、発現する糖鎖構造のバリエーションが健常時とは大きく異なる。また、膵臓がんを含む消化器系がんのマーカーとして、CA19-9やDUPAN-2等の糖鎖を指標としたものが使用されている。このような背景から、多くの研究者が糖鎖の網羅的な解析(グライコムクス解析)手法を用いて、新たな疾患マーカーとなる血清中糖鎖の探索に鎬を削っている。しかしながら、グライコムクス技術は未だ未成熟であり、技術的課題も多く残されている。したがって、現行の解析法で生体中の全ての糖鎖構造を追跡しているとは言い難く、有用な糖鎖マーカーが見逃されている可能性がある。既存の方法で特に検出し難い糖鎖として、生体中糖鎖群のマイナー成分である硫酸化糖鎖、リン酸化糖鎖、グルクロン酸化糖鎖等の酸性糖鎖(マイナー酸性糖鎖)が挙げられる。マイナー酸性糖鎖は、生体中のグライコムに占める割合は極僅かであり、通常の解析では主要な糖鎖に妨害され検出できない。こうした問題により、疾患との関係が疑われながらも、マイナー酸性糖鎖を標的としたマーカー探索は手が付けられていない状況であった。

申請者は、前述のような糖鎖分析上の問題を解決するための研究を続けており、硫酸化及びリン酸化糖鎖を濃縮し同時に解析できる技術を開発した(申請者、Anal Chem. (2018) ; 90(14):8387-8395)。また、この分析技術を発展させることで、グルクロン酸化糖鎖の同時解析も可能にし、生体中のマイナー酸性糖鎖を網羅的に解析できる手法を確立した。

2. 研究の目的

申請者が開発したマイナー酸性糖鎖解析技術をヒト血清に適用し、これまで解析が見逃されていたマイナー酸性糖鎖群の中から膵管腺癌の診断マーカーとなりうる糖鎖を見出すことが本研究の目的である。また、マイナー酸性糖鎖解析の高速化を行い多検体解析に対応しうる分析技術の確立も本研究目的である。

3. 研究の方法

血清中に含まれる主要な糖鎖として、アスパラギン結合型糖鎖(N-型糖鎖)、セリン/スレオニン結合型糖鎖(O-型糖鎖)並びに、糖脂質糖鎖等が挙げられる。これらの糖鎖群中のマイナー酸性糖鎖解析を実施するためには、各糖鎖群に適応した前処理法の確立が必須となる。したがって前処理法の検討を実施後、健常者血清と膵管腺癌患者血清中のマイナー酸性糖鎖を比較解析し、両検体群で発現状況が異なる糖鎖を特定した(研究項目 マイナー酸性 N-型糖鎖の解析、研究項目 マイナー酸性 O-型糖鎖の解析、研究項目 マイナー酸性糖脂質糖鎖の解析)。また、探査研究過程では二次元クロマトグラフィーの分析手法を実施していたが、スループット性が低いため多検体解析は困難に思われた。そのため、スピンカラムを用いた簡易精製法の検討及びキャピラリー電気泳動法を用いた高速分析手法の検討を実施した(研究項目 高スループット化検討)。また、マーカー候補として特定したマイナー酸性糖鎖と膵管腺癌の関連性を明らかにするため、マイナー酸性糖鎖のキャリアタンパク質の特定を試みた(研究項目 キャリアタンパク質特定の試み)。

各研究項目で使用した手法の詳細を以下に示す。

マイナー酸性 N-型糖鎖の解析

血清タンパク質を加熱変性させた後に、Peptide N-glycosidase Fで消化し、タンパク質からN-型糖鎖を遊離させた。遊離させたN-型糖鎖を2-aminobenzoic acid (2AA)で蛍光標識化し、血清由来の2AA標識化N-型糖鎖を調製した。得られた2AA標識N-型糖鎖をNeruminidaseで消化後、Serotonin-immobilized columnに導入し、マイナー酸性N-型糖鎖を濃縮した。濃縮したマイナー酸性N-型糖鎖をHILICカラムで分離し、血清中のマイナー酸性糖鎖プロファイルを取得した。クロマトグラム上で観察されるピーク中の糖鎖の構造はMALDI-QIT-TOF MSを用いて解析した。

マイナー酸性 O-型糖鎖の解析

検討で確立した前処理法を用いて血清を処理し、O-糖鎖結合タンパク質を濃縮した。その後、1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene及びHydroxylamineの混合水溶液を用いて、コアタンパク質からO-糖鎖を遊離させた。遊離させたO-糖鎖を2AAで蛍光標識後、N-型糖鎖と同様の手順

でマイナー酸性 O-型糖鎖のプロファイルを取得した。

マイナー酸性糖脂質糖鎖の解析

クロロホルムとメタノールの混液を血清に添加し、超音波破砕機を用いて脂質の抽出を行った。抽出した脂質画分を、Endoglycoceramidase I で消化し、スフィンゴ糖脂質糖鎖を遊離させた。遊離させた糖鎖を 2AA で蛍光標識後、N-型糖鎖と同様の手順でマイナー酸性糖脂質糖鎖のプロファイルを取得した。

高スループット化検討

血清から調製した 2AA 標識化 N-型糖鎖を用いて、スピンカラムを用いたマイナー酸性糖鎖の濃縮法を検討した。また、レーザー励起蛍光検出 / キャピラリー電気泳動法によるマイナー酸性糖鎖の分析法を検討した。

キャリアタンパク質の特定

血清タンパク質をトリプシン消化後、限外ろ過法を用いて糖ペプチドを濃縮した。濃縮した糖ペプチド画分を LC-MS で解析し、マイナー酸性糖鎖を有した糖ペプチドの特定を試みた。

4. 研究成果

研究項目 マイナー酸性 N-型糖鎖の解析

健常者と膵管腺癌患者血清中のマイナー酸性 N-型糖鎖の比較解析を実施した。血清中には、硫酸化複合型糖鎖、リン酸化ハイブリット型糖鎖に加えてグルクロン酸化複合型糖鎖が発現していた。これらの糖鎖の内、グルクロン酸化複合型糖鎖は健常者に比べて膵管腺癌患者では発現量が低下していた(図 1A)。一方、硫酸化複合型糖鎖については、健常者よりも膵管腺癌患者血清で増加傾向が見られた。これらの糖鎖の相対量を指標にすることで、健常者と膵管腺癌患者を識別できることが示唆された(図 1B)。この成果は、Journal of Proteome Research 誌上で報告した。(J Proteome Res. 19(8):3033-3043 (2020))

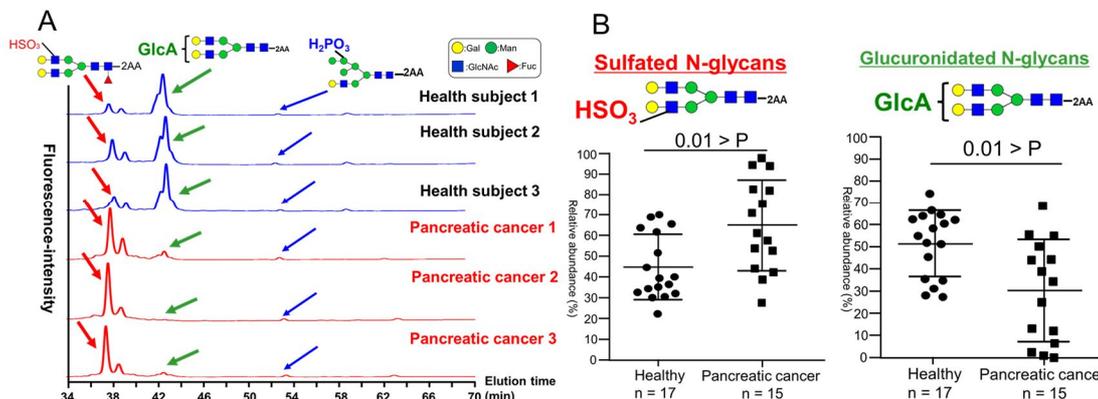


図 1. 健常者と膵管腺癌患者血清中のマイナー酸性 N-型糖鎖の比較解析結果

A) LC を用いたマイナー酸性 N-型糖鎖の分析結果の一部

B) 硫酸化 N-型糖鎖とグルクロン酸化 N-型糖鎖の相対量の比較解析結果

クロマトグラム上のピーク面積値から相対量を算出した。

研究項目 マイナー酸性 O-型糖鎖の解析

マイナー酸性 O-型糖鎖を解析するためには、前処理法の確立が必要になる。そこで、臨床試料中のマイナー酸性 O-型糖鎖を解析法の確立に取り組んだ。培養がん細胞をモデルとし、O-型糖鎖解析の前処理として必要となるコアタンパク質からの糖鎖切断方法及び、生体試料からの糖鎖精製法を検討し、効率的なマイナー酸性 O-型糖鎖の解析手法を確立した。本法を用いることで、培養癌細胞中の硫酸化 O-型糖鎖とリン酸化 O-型糖鎖の定量解析を可能にした。確立した手法は糖鎖機能研究を進める上で非常に有用な技術になると判断したため、本研究成果は第 41 回日本糖質学会(2022)で公表としており、論文投稿中である。確立したマイナー酸性 O-型糖鎖を血清に適用したところ、硫酸 O-糖鎖が観察された。一方リン酸化糖鎖やグルクロン酸化糖鎖は検出されなかった。これらの硫酸化 O-型糖鎖の発現パターンを健常者と膵管腺癌患者検体間で比較すると、膵管腺癌患者血清では硫酸化 core4 構造の増加傾向が観察された(図 2)。発現量が微量であるため、検出に労力を要するが、硫酸化 O-型糖鎖が膵管腺癌マーカーとして利用できる可能性があると考えられた。

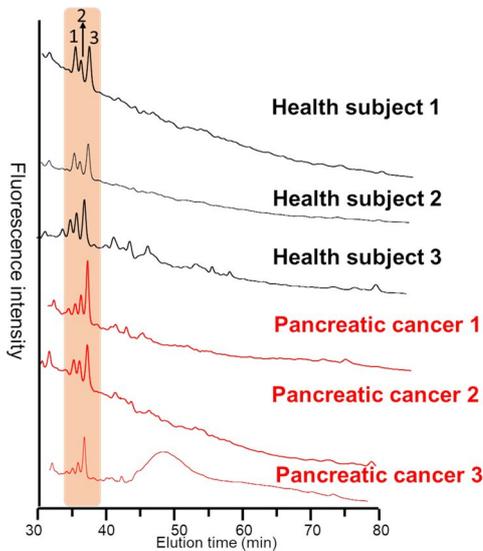


図 2. 健常者と膵管腺癌患者血清中のマイナー酸性 O-型糖鎖の解析結果

研究項目 マイナー酸性糖脂質糖鎖の解析

培養癌細胞をモデル試料として糖鎖脂質糖鎖解析法の検討を行い、糖脂質の抽出法を確立した。また、Endoglycoceramidase I で遊離される糖脂質糖鎖の中からマイナー酸性糖鎖を単離し、分析することに成功した。さらに、確立した手法を血清に適用し、血清中のマイナー酸性

糖脂質糖鎖の解析を行った。健常者と膵管腺癌患者血清中の糖脂質糖鎖を比較すると大きなプロファイルの差は観察されなかった。しかしながら、クロマトグラム上に観察された各ピークの面積値から各糖鎖の相対量を算出し比較すると、グルクロン酸を有する糖脂質糖鎖の発現量が有意に低下していた(図3)。

膵管腺癌患者でのグルクロン酸化糖鎖の発現量の低下は、前述した N-型糖鎖についても観察されているため、膵管腺癌患者では糖鎖のグルクロン酸化修飾が低下することが示唆された。

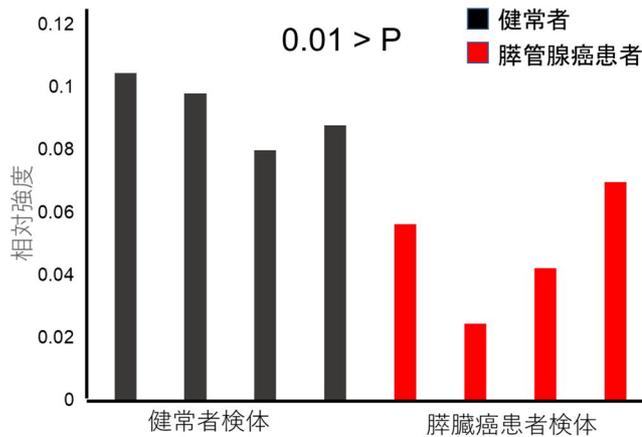


図 3. マイナー酸性糖脂質糖鎖の相対量の比較結果

健常者と膵管腺癌患者で有意に変化が見られた成分の結果を示す。

研究項目 マイナー酸性糖鎖解析の高スループット化検討

スピнкаラムによるマイナー酸性糖鎖の濃縮法を確立し、Serotonin-immobilized column による精製工程を簡略化することに成功した。スピнкаラムのコストも非常に低いため、複数の検体を同時並行で処理することが可能になった。さらに、キャピラリーゲル電気泳動法を用いることで、酸性糖鎖の分離分析に要する時間を 1/3 に短縮することに成功した。本法を用いることで、キャピラリーの前処理時間を含め 15 分以内に分析を完了させることが可能になった。また、キャピラリーアフィニティーゲル電気泳動法を利用することで、リン酸化糖鎖や硫酸化糖鎖の部分構造特定も可能にした。

研究項目 キャリアタンパク質特定の試み

一般的に使用されるグライコミクス的手法にし難いマイナー酸性糖鎖のキャリアタンパク質の特定を試みたが、特定は困難であった。そのため新規糖ペプチドの解析手法の確立に取り組み、

マイナー酸性糖鎖を有する糖ペプチドの濃縮に成功した。しかしながら、MS 測定での解析が不完全であり、キャリアタンパクの特定には至らなかった。

総括

血清中の *N*-型糖鎖、*O*-型糖鎖、糖脂質糖鎖の何れの糖鎖群の中にもマイナー酸性糖鎖が存在し、健常者と膵管腺癌患者では発現状況が異なっていた。したがってこれらの糖鎖が膵管腺癌マーカーと成り得ると考えられた。また、本研究を進めるにあたり、酸性糖鎖を分析するための複数の技術開発に成功した。今後、これらの技術を利用した多検体解析を実施し、本研究で見出されたマーカー候補糖鎖の診断性能及び実用性を評価する予定である。また、未特定に終わったマイナー酸性糖鎖のキャリアタンパク質についても、新たに開発した糖ペプチド解析技術を起点に解析を継続し、キャリアタンパク質の性質からマイナー酸性糖鎖の発現変動と膵管腺癌の関連性を明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Kinoshita Mitsuhiro, Yamada Keita	4. 巻 207
2. 論文標題 Recent advances and trends in sample preparation and chemical modification for glycan analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 114424 ~ 114443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpba.2021.114424	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 山田 佳太	4. 巻 44(4)
2. 論文標題 血液中糖鎖及び糖鎖抗体を標的としたバイオマーカー探索	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物試料分析	6. 最初と最後の頁 97 ~ 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kinoshita Mitsuhiro, Nakatani Yumi, Yamada Keita, Yamamoto Sachio, Suzuki Shigeo	4. 巻 195
2. 論文標題 A rapid and facile preparation of APTS-labeled N-glycans by combination of ion pair-assisted extraction and HILIC-SPE for routine glycan analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 113875 ~ 113875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpba.2020.113875	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 Higashi Kiyoshi, Maeda Keiko, Miyata Kaori, Yoshimura Saori, Yamada Keita, Konno Daijiro, Tachibana Taro, Saito Koichi	4. 巻 42
2. 論文標題 Carbohydrate 3 -sialyllactose as a novel target for theranostics in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tumor Biology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1010428320965279	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 Yamada Keita, Suzuki Koji, Hirohata Yoshihiko, Kinoshita Mitsuhiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Analysis of Minor AcidicN-Glycans in Human Serum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Research	6. 最初と最後の頁 3033 ~ 3043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.0c00079	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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山田 佳太、木下充弘
2. 発表標題 マイナー酸性O-型糖鎖の解析
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 山田 佳太
2. 発表標題 分離分析に支援されるグライコームマイナー成分の解析
3. 学会等名 第33回バイオメディカル分析科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田 佳太
2. 発表標題 マイナー酸性糖鎖解析手法の開発と応用
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 麻田 皓亮, 山田 佳太
2. 発表標題 マイナー酸性O-結合型糖鎖解析技術の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会(広島)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

体が発する病気のサインを糖から読み取る
https://www.osaka-ohtani.ac.jp/column//202009_7554.html
 衛生・毒性学講座紹介ページ
https://www.osaka-ohtani.ac.jp/department/pharmacy/lab/eisei_dokuseigaku.html

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