

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15700

研究課題名（和文）尿中遊離糖の腫瘍マーカー探索と臨床応用に向けた定量法の確立

研究課題名（英文）Investigation of free-glycan-based tumor markers and development of their quantification method

研究代表者

半澤 健（Hanzawa, Ken）

岐阜大学・糖鎖生命コア研究所・研究員

研究者番号：00808347

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：がん患者の尿中に排出される遊離糖鎖のうち、これまでに行われていない分子サイズの大きい糖鎖画分に焦点を当てて解析を行った。糖鎖構造はクロマトグラフィー分画と酵素・化学処理に基づいて解析した。糖鎖量比を一括して高感度かつ安定して測定するための、逆相高速液体クロマトグラフィー/質量分析（RP-LC/MS/MS）の選択反応モニタリング（SRM）による条件の構築も行い、これにより検体間の糖鎖量の比較を行った。結果として、一部のがん患者において多分枝型の遊離N-結合型糖鎖が増加傾向を示すことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖タンパク質の糖鎖は腫瘍マーカーとして利用され、研究も盛んに行われているが、遊離糖鎖に着目した研究はあまり行われていない。本研究では、遊離糖鎖と疾患との関連、およびその測定技術に関する新たな知見を提供する。

研究成果の概要（英文）：Urinary free-glycans of cancer patients were investigated focusing on the fractions of large molecular size, which have not been analyzed before. Glycan structures were analyzed based on detailed chromatographic fractionation and enzymatic and chemical treatments. Comparison of glycan levels between samples was performed by selective reaction monitoring of liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS/MS). As a result, it was found that multiply branched free-N-glycans showed an increasing trend in some cancer patients. In addition, conditions to improve the sensitivity and stability of LC/MS/MS for the multiplex measurement of glycans were investigated.

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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が、それらは糖タンパク質・糖脂質として存在するものである。一方、遊離糖鎖もまた、がん細胞における異常産生が確認されているものの、研究はあまり進められていない。以前に行った尿中遊離糖鎖のうち比較的分子量が低く存在量が多い2-10糖程度の遊離糖鎖画分における解析結果では、がん患者において増加する糖鎖が見出され、腫瘍マーカーとしての尿中遊離糖鎖の利用可能性を示唆するものとなった。一方で、がん患者の血中糖タンパク質やがん化した細胞では伸長・分枝をもつ糖鎖が増加することが知られている。本研究では、そのようなサイズの大きな遊離糖鎖を対象として解析することで、がんにおいて増加する糖鎖のさらなる発見が期待できる。

2. 研究の目的

尿中遊離糖鎖に関して、より大きなサイズ(10糖残基以上)の画分に焦点を当てて、がん関連変化を示す糖鎖を探索する。見つかった糖鎖群を質量分析に基づいて定量的に比較するための測定条件も改良し、高効率化された多項目同時測定による糖鎖の検体間比較評価を行う。

3. 研究の方法

尿中遊離糖鎖をピリジルアミノ(PA)化蛍光標識したものをを用いて解析を行った。尿検体を出発試料として陽イオン交換、グラファイトカーボンクロマトグラフィーによる前精製後、PA化蛍光標識し、その後フェノール・クロロホルム抽出および、さらなる陽イオン交換とグラファイトカーボンクロマトグラフィーによって精製することで調製した。検体間の比較の基準としては尿中クレアチニン濃度を用い、出発時の量を揃えたうえで調製を行った。

糖鎖の解析は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC; LC20A)による移動度の情報および分画操作、分画した個々の糖鎖画分の質量分析(LTQ-XL, QTRAP-4500)により行った。HPLCは、陰イオン交換(DEAE)、親水性相互作用液体クロマトグラフィー(Amide-HILIC)および逆相(C18)モードにより行った。また、糖鎖のグリコシダーゼ消化、アルキルアミド化および過ヨウ素酸酸化を組み合わせて構造の詳細を調べた。解析に用いる糖鎖は、HILICモードにおいてサイズの大きな糖鎖画分の含量が多い、一部のがん患者由来の検体から調製したものをを用いた。続いて、健常者とがん患者における糖鎖の差を逆相液体クロマトグラフィー/質量分析(RP-LC/MS/MS)による選択反応モニタリング(SRM)によって一括して測定した。今回示しているSRMの結果は、健常(非担がん)者21名、膵がん患者10名、大腸がん患者24名、胃がん患者22名によるものである。尿検体提供者には重度の腎障害を抱えた者が含まれないことを確認している。

SRMのためのLC/MS/MSを高感度に安定して行うための条件検討では、複数種類の内径、長さ、充填剤の逆相カラムを用いて行った。感度向上のためのポストカラム溶媒添加では、LC制御パソコンから独立した、追加のHPLCポンプを1台使用し、その配管はカラムの後に低容量T-コネクタを介して接続した。

PA化標識糖鎖調製の効率化検討では、遊離糖鎖標識の前後のそれぞれの精製における陽イオン交換、グラファイトカーボンおよびフェノール・クロロホルム抽出精製ステップの代わりに、市販の核酸精製用親水性磁性粒子を使ったHILIC精製を行った。

4. 研究成果

(1) 尿中遊離糖鎖の調製と解析

まず、糖鎖をおおよその分子サイズに基づいて分離するHILIC(Amide)カラムを用いたHPLC/蛍光検出により、調製した各検体の測定を行い、分子サイズの大きな糖鎖を含む検体のスクリーニングを行った。健常者の主要な遊離糖鎖で最も分子サイズが大きいdi-sialyl(6) biantennary 遊離N-結合型糖鎖を基準とすると、一部のがん患者では、それよりも溶出位置が後ろの糖鎖が顕著に多く見られる場合があった。基準とした糖鎖を含む領域以降に溶出される糖鎖を分画して、さらなる分析に用いた。HILIC分画後の試料を逆相HPLCによりさらに分離・分画し、質量分析、グリコシダーゼ消化、過ヨウ素酸酸化、シアル酸結合位置特異的アルキルアミド化(SALSA)を組み合わせて構造の解析を行った。結果として、増加していた糖鎖は大部分が遊離N-結合型糖鎖に相当し、分枝(三、四本鎖)、フコース修飾および/またはラクトサミンユニットの伸長構造を有していた。タンパク質から遊離しているという点以外では、血液中などでみられるものと同様の、分解を受けていない完全な形のものも多く見られ、分解途中で放出され

たように見受けられるサイズの小さな遊離 N-結合型糖鎖とは異なっていた。得られた構造と HPLC 溶出パターンの情報は、後に行う LC/MS/MS による定量測定のためのパラメータの作成にも用いられた。

(2) LC/MS/MS 測定条件の改良

見つかった糖鎖の検体間における差をより詳細に明らかにするために、LC/MS/MS による定量測定法である選択反応モニタリング (SRM) を検討した。蛍光検出とは異なり、糖鎖の溶出ピークの重なりがあったとしても、構造的に類似した異性体の分離が達成されていれば、迅速かつ特異的なサンプル比較が可能となる。LC/MS/MS 測定では、HPLC による分離と質量分析装置における検出の両方が測定結果の質に影響する。糖鎖の LC/MS 測定は、多くの場合 HILIC モードで行われるが、PA 化標識糖鎖異性体の分離の面で有利でありかつ糖鎖のカラムにおけるキャリーオーバーが起こりにくい逆相モードを採用した。

以前に行った、分子サイズの小さい尿中遊離糖鎖の逆相 LC/MS では、酢酸-トリエチルアミン (pH6.0) を添加した移動相が保持・感度の点で優れていた一方で、今回対象としたサイズの大きな糖鎖においては、保持が十分に強いものの、異性体の分離効率が悪い、多価イオンが生成されにくいため多くの糖鎖の m/z 値が質量分析器の測定上限を超えてしまうという問題があった。LC/MS においてより一般的な、ギ酸を添加した移動相では、遊離 N-結合型糖鎖を主とする分子サイズの大きな糖鎖の十分な保持、良好な分離を達成することができた。

しかし、感度の点ではさらなる検討が必要であった。PA 化標識糖鎖の逆相 HPLC 分離はアセトニトリル濃度 0-5% 程度相当の低有機溶媒濃度で行われ、水リッチであることから ESI イオンソースにおいて感度の低下と不安定化が生じた。イオンの価数が 1 価または 2 価で検出される低分子糖鎖とは異なり、3 価以上の価数で検出される分子量の大きい糖鎖はより重度の感度低下傾向が見られた。まず、感度向上のために内径 1 mm カラム、流速 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ というマイクロ/セミマイクロ HPLC の中間的条件で検討を開始した。しかし、使用していたのは一般仕様の HPLC 装置であったため、デッドボリュームが大きく試料の溶出とカラム洗浄・平衡化に時間がかかる、および溶出位置の安定性が低いという別の問題が生じた。最終的に、汎用的な内径 2.1 mm カラム、流速 0.2-0.25 mL/min のセミマイクロ条件で、カラムと MS イオンソースの間のラインに T-コネクターを設け、ポストカラムで 0.2 mL/min のアセトニトリルを添加し常時アセトニトリル濃度を 40% 以上に保つことで、ピーク分離に影響せず、感度の向上 (1.5-2.5 倍程度) と安定化が達成された。この手法は、感度が不安定になりやすい、シアル酸を 3 つまたは 4 つ有する多分枝型糖鎖において特に有効であった (図 1)。ポストカラム添加溶媒として、2-プロパノール、アセトニトリル/2-プロパノール混合液も試した。こちらの方が、多分枝かつシアル酸を複数有する糖鎖のイオン化効率を高めたものの、ノイズも増加することと配管の圧力が高くなりやすいことから採用には至らなかった。今後さらなる時間短縮も見込めるものの、最終的に 40 分/サイクル (糖鎖分離時間は約 25 分) を LC/MS/MS 用糖鎖測定条件とした。

(3) LC/MS/MS による検体間の比較

調製した尿中遊離糖鎖の混合物を逆相 LC/MS/MS による SRM 測定にかけ、同定された遊離糖鎖を SRM で一括して測定し、検体間の半定量的比較を行った。図 2 に代表的な構造の結果を示す。二本鎖の遊離 N-結合型糖鎖は健常者とがん患者において大きな差が見られず、一方で三、四本鎖遊離 N-結合型糖鎖および/または枝にフコース修飾 (Lewis X) を有する糖鎖はがん患者において増加傾向を示した。特に、Lewis X を有する三、四本鎖糖鎖は一部のがん患者において突出した増加が見られた。本研究で分析した尿検体は、進行がん患者から採取されたものであるため、より早期のがんにおける変化に関しては今後さらなる検証が必要であるが、今回増加が明らかになった遊離糖鎖は進行がん患者において治療効果の確認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。

(4) 調製の安定化と低コスト化

遊離糖鎖調製プロトコルに関して、現時点でも糖鎖の構造解析や検体間比較を行うことは十分可能である。しかし、今後の糖鎖研究の高効率化ひいては臨床的な現場における糖鎖の測定を行う可能性を踏まえると、さらなる改善が見込める部分である。そこで、糖鎖調製プロトコルについて、操作の単純化とコスト削減を目指した見直しを試みた。

現在使用している PA 標識において、他の糖鎖蛍光標識法 (2-AB, APTS) で報告されている、親水性磁性粒子を用いたバッチ法に基づく HILIC 精製手法を検討した。PA 化はその反応性の低さから、他の糖鎖蛍光標識試薬の場合の数倍から数百倍の濃度の試薬を標識反応時に添加する。しかし、親水性磁性粒子を用いた手法では、そのような高濃度の試薬も、HPLC/蛍光検出、LC/MS において問題ないレベルにまで除去でき、かつ従来の手法と同等の標識糖鎖の収率も達成された。また、標識反応前の遊離糖鎖の前精製 (脱塩・その他夾雑物除去) においても、磁性粒子を用いた HILIC 精製が有効であった。この方法により、これまでの複数回のイオン交換・グラファイトカラム精製とフェノール・クロロホルム液-液抽出精製を置き換えることで、糖鎖の調製の効率化が達成された。また、調製操作の一部は磁性粒子用の処理装置を用いることで将来的に一部操作の自動化へも対応可能となった。

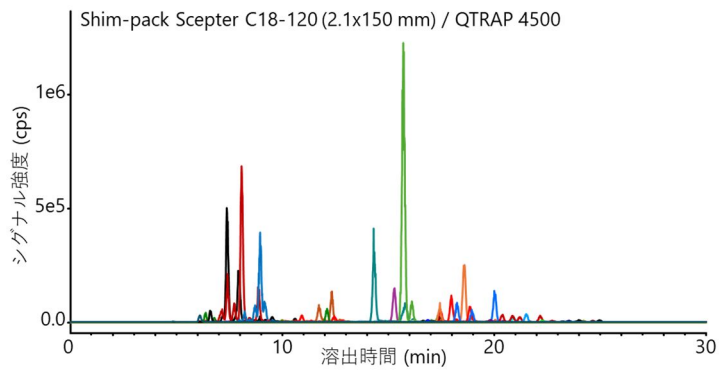


図1. SRMIによって測定された尿中遊離糖鎖のクロマトグラム.

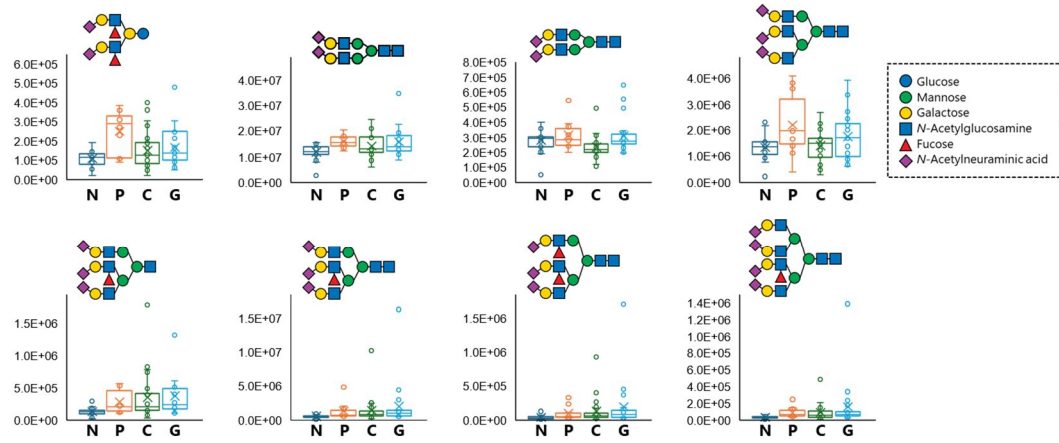


図2. 健常者 (N) および、がん患者 (膀胱がん (P), 大腸がん (C), 胃がん (G))における糖鎖の測定.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ken Hanzawa, Miki Tanaka-Okamoto, Hiroko Murakami, Noriko Suzuki, Mikio Mukai, Hidenori Takahashi, Takeshi Omori, Kenji Ikezawa, Kazuyoshi Ohkawa, Masayuki Ohue, Shunji Natsuka, Yasuhide Miyamoto	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 e0266927
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

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 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 Sialoglyco2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------