

201220056A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略 研究事業

平成24年度 総括研究報告書

肺癌糖鎖標的マーカーの実用化に向けた定量的

糖鎖構造変動解析システムの構築

研究代表者 植田 幸嗣

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略 研究事業

肺癌糖鎖標的マーカーの実用化に向けた定量的糖鎖構造変動解析システムの構築

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 植田 幸嗣

目 次

I. 総括研究報告

肺癌糖鎖標的マーカーの実用化に向けた定量的糖鎖構造変動解析システムの構築

植田 幸嗣 ----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 12

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 15

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

平成24年度総括研究報告書

肺癌糖鎖標的マーカーの実用化に向けた定量的 糖鎖構造変動解析システムの構築

研究代表者 植田幸嗣

独立行政法人理化学研究所 上級研究員

研究要旨：本研究は肺癌の早期診断を可能とする血清腫瘍マーカーを同定し、著しい増加を続ける肺癌死亡数を有意に減少させることを最終目標とする。同目標に対して、細胞の癌化や環境の変化に鋭敏に反応して構造が変化することが知られる糖鎖修飾に着目した「糖鎖標的バイオマーカー」候補は多数同定されるに至っているが、特定の糖鎖付加部位における糖鎖構造の変化を定量的に、かつ多検体を用いてバリデーションできる技術が存在しないため、糖鎖バイオマーカーの臨床、診断応用は長らく停滞していた。

この状況を打破するため、質量分析技術を応用して血清タンパク質上の各糖鎖付加部位について、個々に糖鎖構造変化を定量的にモニターできる Energy resolved oxonium ion monitoring technology (Erexim 法)を開発した。研究計画の二年目である平成24年度では、糖タンパク質上に付加された50種類以上のN型糖鎖構造のバリエーションを30 attomole (1 attomole = 10^{-18} mole) の超微量成分から10分間で定量化できる世界初の質量分析技術の開発に成功し、報告した。さらに、本開発システムを用いて種々のヒト血清糖タンパク質上糖鎖構造の定量バリエーション解析を実行し、精密糖鎖変動解析を行うのに必要な分析条件を精査、決定した。

A. 研究目的

本邦において肺癌は部位別がん死亡率で第一位を占めており、肺癌の罹患数、死亡者数を減少させることが急務となっている。そのためには喫煙対策などに加え、根治可能なより早い段階で肺癌、またはその前癌病変を発見できる診断技術の開発は重要な位置を占める。現状において肺癌の早期発見には胸部 X 線診断、CT 診断など画像診断技術が主軸となっているが、これらよりも早期に、かつ検査技師の技量にかかわらず腫瘍を発見する技術は現時点では存在せず、本研究で開発する非侵襲的で安価に行える血清質量分析診断法にて初期肺癌の検出やリスク診断までもが可能になれば、それに伴って治療成績は劇的に改善されると期待できる。

研究代表者はこれまで、血清による肺癌の早期診断を目指して様々なグライコプロテオーム解析技術を用い、早期肺癌において糖鎖構造に変化が認められる多数の糖鎖標的マーカー候補の同定を行ってきた。そこで本研究ではそれら全てのマーカー候補糖タンパク質上に付加されている糖鎖の癌性変化を高感度に定量化、統合することによって肺癌を「治療可能な段階で早期に発見すること」、さらには「症状が出る前でのリスクの把握を可能にすること」を目標とする。本診断技術は従来のイムノアッセイとは異なり、数十分間の 1 アッセイで 200 項目までのバイオマーカーを同時に定量化できる質量分析法、Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法を応用し、迅速に多岐にわたる早期癌関連情報を得ることができると期待されている。

B. 研究方法

a. 糖ペプチド標準品の精製

市販品のヒト IgG タンパク質を 8M Urea を含む変性バッファーで溶解させ、還元アルキル化を行った。PD-Miditrap 脱塩カラム (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて重炭酸アンモニウムバッファーに置換した後、トリプシン GOLD (Promega, Madison, WI) で 12 時間消化した。消化後のペプチドサンプルを Oasis HLB カートリッジ (Waters, Milford, MA) で脱塩精製し、次の二次元 HPLC 分画に供した。

4.6 mm x 500 mm Cadenza CD-C18 column (Imtakt Corporation, Kyoto, Japan) を用いて、溶媒 A [0.2% TFA]、溶媒 B [75% acetonitrile, 0.1% TFA]、溶媒 B% 5-20 90 分グラジエント、流速 0.6 ml/min の条件で IgG 由来ペプチドの分画を行った。

分取した各フラクションを完全乾燥し、0.1% TFA に再溶解した後、二段階目の 150 mm x 4.6 mm SunShell C18 column (Chromatik Corporation, Osaka, Japan) によるさらなる分画精製を行った。ここでは溶媒 A [0.1% TFA]、溶媒 B [12% acetonitrile, 0.1% TFA]、溶媒 B% 10-90 グラジエントの条件を用いた。分取した各フラクションは乾燥し、以降の実験に供した。

b. 蛍光 HPLC 分析

前項で単離精製した各種糖ペプチド表品の糖鎖構造を確定させるため、2-アミノピリジン蛍光標識法による HPLC 分析を行った。単離糖ペプチドを [0.5U

N-glycosidase F (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), 0.01% ProteaseMax (Promega, Madison, WI)]中で37°C、8時間消化を行い、糖鎖をペプチドから切断した。遊離糖鎖をセルロースカートリッジにて濃縮精製、乾燥後、2-アミノピリジンと混合して還元アミノ化反応によるラベル化を行った。

ラベル化糖鎖は MassPREP HILIC μ Elution plate (Waters, Milford, MA)を用いて脱塩精製を行い、Shimpack CLC-ODS column (0.6 x 15 cm)による逆相 HPLC 分析に供した。ここでは溶媒 A [10 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH = 3.8)]、溶媒 B [0.5% 1-ブタノールを含む溶媒 A]を用いた。溶媒 B 20%で平衡化を行った後、%B 50 まで75分間のグラジエントを作成し、励起波長 320 nm、吸収波長 400 nm で標識糖鎖を測定した。各糖鎖溶出時間は、PA-glucose oligomer (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を利用したグルコースユニット (GU) で補正、構造データベースとの相対比較を行えるようにした。

c. 抗体医薬品3種の分析前処理

80 μ g のトラスツズマブ (ハーセプチン)、ベバシズマブ (アバスタチン)、セツキシマブ (アービタックス) をそれぞれ 8M Urea を含む変性バッファーで溶解させ、還元アルキル化を行った後、4 μ g の endoproteinase Lys-C で37°C、2時間の消化を行った。この Lys-C 消化物をさらに Trypsin GOLD で37°C、4時間消化を行った。最終消化物を Oasis HLB カートリッジにて脱塩を行い、15% acetonitrile で溶出、糖

ペプチド画分を回収した。分析に際してはこれを0.1%酢酸で5倍に希釈したものをを用いた。

d. Multiple Reaction Monitoring (MRM)

MRM 分析には 4000QTRAP トリプル四重極型質量分析計 (AB Sciex, Foster City, CA) に Agilent 1200 nano-HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) を接続した LC/MS/MS システムを使用した。Nano-HPLC のカラムには 75 μ m x 200 mm ESI sprayer tip packed with 3 μ m C18 resin (Nikkyo Technos, Tokyo, Japan) を用い、溶媒 A [0.1% ギ酸]、溶媒 B [70% acetonitrile, 0.1% ギ酸]、流速 250 nl/min の条件で分離を行った。

4000QTRAP 質量分析計の設定は以下の通りである。2200 V ionization spray voltage; 12 psi curtain gas (N₂); CAD = 4; 70 V declustering potential; 10 V entrance potential; Q1 resolution, HIGH; Q3 resolution, LOW; 2 ms pause in between.

e. データ解析

MRM で得られたデータは MultiQuant version 2.02 (AB Sciex, Foster City, CA) ソフトウェアを用いてプロセッシング、定量解析を行った。

C. 研究結果

糖鎖構造バリエーション定量化法を開発するにあたって、我々が着目したのが図 1 に示すオキシニウムイオンである。オキ

ソニウムイオンはあらゆる糖ペプチドの衝突誘起解離 (CID) によって質量分析機内で生じることが知られ、元の糖鎖構造に依存した種類のイオンが観測される。(図 2) これらのオキシソニウムイオンパターンを定量的にモニターし、かつ衝突エネルギーによる連続的なスキャンを行うことで、ある糖鎖付加部位に結合していた糖鎖構造を構造異性体の区別まで含めて定量化できるようにしたのが Energy Resolved Oxonium Ion Monitoring Technology (Erexim 法) である。

Erexim 法の測定機序を図 3 に示した。トリプル四重極型質量分析計を用い、第一四重極 (Q1) で目的とする糖ペプチド全体の質量を指定し、特異的に通過させる。第二四重極 (Q2) で CID を行い、糖ペプチドを物理的に開裂させる。続いて第三四重極 (Q3) では、CID で生成したオキシソニウムイオンを全て定量的に検出する。ここで、質量が全く同じ糖鎖の構造異性体を区別するため、Q2 での衝突エネルギーを連続的に変化させ、オキシソニウムイオンの生成量をモニターする。すなわち、立体構造の違いによるある分岐鎖の「壊れやすさ」を調べることによって、例えば α -1,3 グリコシル結合のガラクトースと α -1,6 グリコシル結合のガラクトースが区別できる。

実際にヒト化モノクローナル抗体由来のトリプシン消化産物から精製した糖ペプチドを測定した例が図 4 である。ここでは質量が等しい 3 種類の糖鎖 (構造異性体) を持つペプチドの Erexim 曲線を見ると、それぞれの糖鎖構造でオキシソニウムイオンの

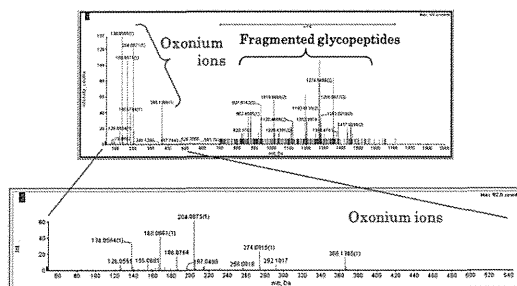
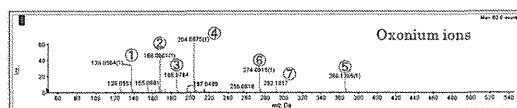


図 1 (上段) 代表的な糖ペプチドの LC/MS/MS スペクトル。高分子領域にペプチド鎖のフラグメントイオンが、低分子領域には糖鎖由来のフラグメントイオン (オキシソニウムイオン) が観測される。(下段) $m/z = 60 - 540$ の拡大図。



- | | | | | | | | | |
|--|--------------------------|---|----------|------------------|-------|------------|----------|--------------------------|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. 138.06 = [HexNAc · CH₂O + H]⁺ 2. 168.07 = [HexNAc · 2H₂O + H]⁺ 3. 186.08 = [HexNAc · H₂O + H]⁺ 4. 204.09 = [HexNAc + H]⁺ 5. 366.13 = [HexNAc + Hex + H]⁺ 6. 274.09 = [Neu5Ac · H₂O + H]⁺ 7. 292.09 = [Neu5Ac + H]⁺ | } | <table border="0"> <tr> <td>HexNAc :</td> <td>GlcNAc or GalNAc</td> </tr> <tr> <td>Hex :</td> <td>Man or Gal</td> </tr> <tr> <td>Neu5Ac :</td> <td>N-acetyl neuraminic acid</td> </tr> </table> | HexNAc : | GlcNAc or GalNAc | Hex : | Man or Gal | Neu5Ac : | N-acetyl neuraminic acid |
| HexNAc : | GlcNAc or GalNAc | | | | | | | |
| Hex : | Man or Gal | | | | | | | |
| Neu5Ac : | N-acetyl neuraminic acid | | | | | | | |

図 2 N 型糖鎖付加ペプチドの質量分析にて観測される代表的なオキシソニウムイオン。GlcNAc: N-アセチルグルコサミン、GalNAc: N-アセチルガラクトサミン、Man: マンノース、Gal: ガラクトース。

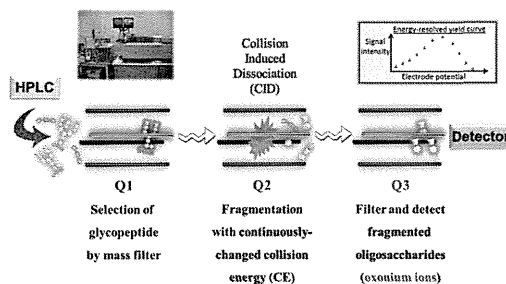


図 3 Erexim 法の分析機序。語句詳細は本文参照。

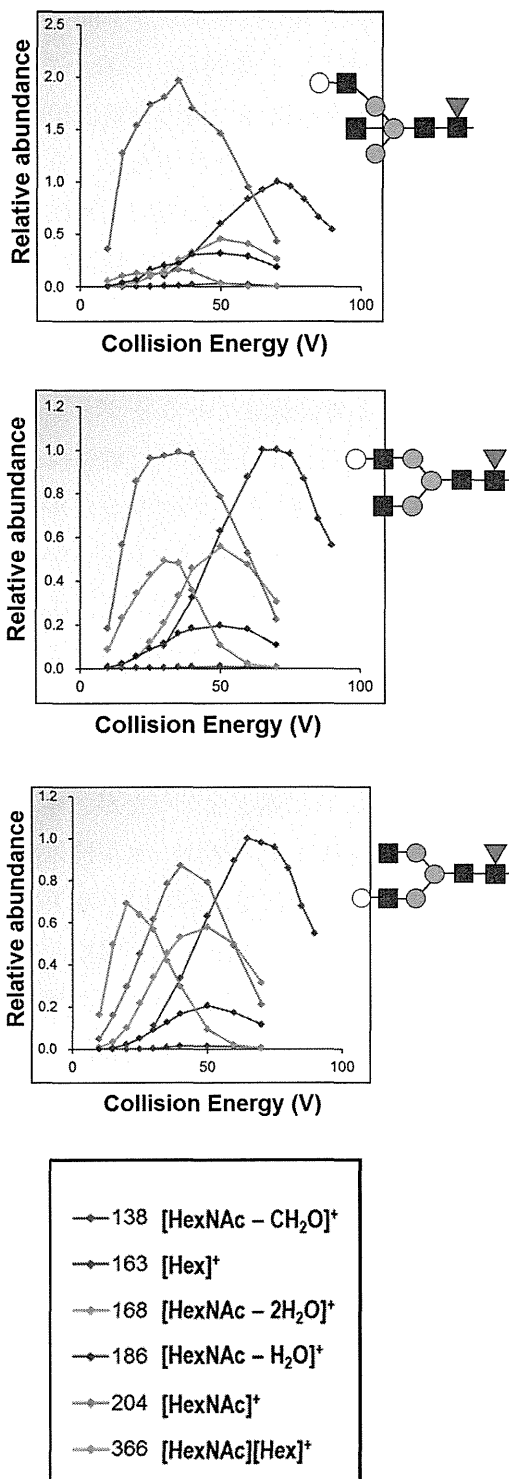


図4 3つの質量が等しい構造異性体の Erexim 曲線。ペプチド部分は表記省略してあるがヒト IgG 由来の共通配列。

衝突エネルギー依存崩壊パターンが異なることが分かる。本技術を使用し、質量、HPLC からの溶出時間、さらに Erexim 曲線のパターンの 3 種パラメータを組み合わせることで、最終的に 50 種類もの N 型糖鎖構造を既存抗体医薬品から検出、定量することに成功した。

衝突エネルギーースキャンと共に重要な発見であったのが、 $m/z = 138$ の質量を持つ特殊なオキシニウムイオンの定量特性である。このイオンは全ての N 型糖鎖が持つ、ペプチド結合部位に存在する N-アセチルグルコサミン残基に由来すると考えられ、いかなる構造の糖鎖が付加されていようとも、このオキシニウムイオンの生成量を最大とする衝突エネルギーは糖ペプチド全体の質量に比例し(図 5)、かつその時の $m/z = 138$ イオンの生成量は糖鎖の構造に関わらず元の糖ペプチドのモル量に比例する(図 6)。

従前の質量分析を用いた糖鎖定量分析には多くの報告があるが、必ず障壁となるのは糖鎖構造依存的なイオン化効率の変化であった。すなわち、付加している糖鎖構造が違えば、糖ペプチドのイオン化効率が変わってしまうために元の糖ペプチドモル比を反映した糖鎖構造含有率を求めることが不可能であった。これに対し、 $m/z = 138$ イオンの生成量を常に最大化する衝突エネルギーで定量を行う本手法は、酸性糖鎖、中性糖鎖など関係なく精密な相対定量が可能となった。また、図 6 が示すように、検出限界は 30 attomole、ダイナミックレンジは 4 桁を超え、感度、定量レンジ共に十分な性能を有していることも証明することが出来た。

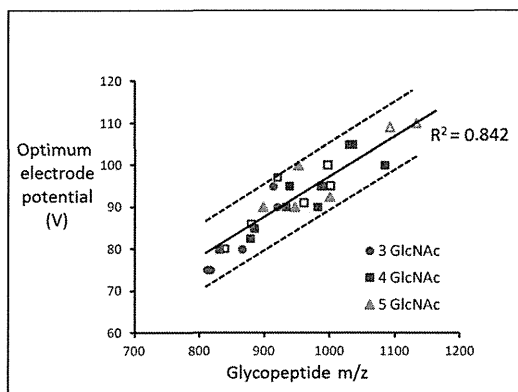


図5 m/z = 138 オキシニウムイオンによる糖鎖構造非依存的定量。

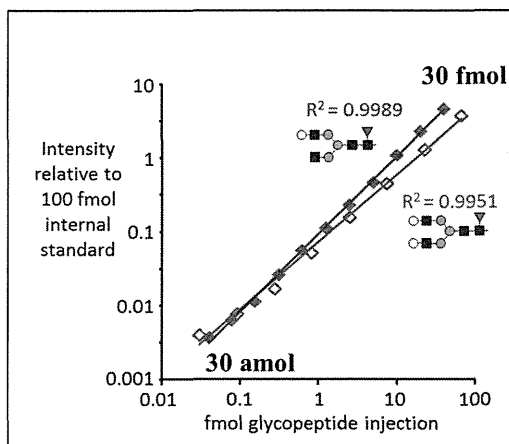


図6 Exerim 法による糖ペプチド検出感度と定量性の評価。糖鎖構造非依存的に4桁以上の定量直線性を示す。

複数の糖タンパク質サンプルで Exerim 法の有効性を評価するため、市販薬である Trastuzumab(ハーセプチン)、Bevacizumab(アバスタチン)の糖鎖構造プロファイルを取得した。本解析では4つの異なる製造ロットをそれぞれ4バイアルずつ分析に用いた。Exerim 解析の結果、それぞれの抗体医薬品から49種類のN型糖鎖が検出され、興味深いことに同一薬であるにも

関わらず、糖鎖構造は製造ロット間で有意に変動していることが明らかになった(図7)。本結果は新規開発技術の定量信頼性、網羅性を証明しているだけでなく、分析対象とした抗体医薬品の薬効や安全性に関する品質評価法にも追加試験の余地があることを意味している。

さらに、今回の解析では Trastuzumab 上に非ヒト型糖鎖構造であるN-グリコシルノイラミン酸(Neu5Gc)を含んだ糖鎖構造が複数検出された(図8)。N-グリコシルノイラミン酸は脊椎動物の中でヒトと一部の鳥類のみ持たない酸性糖であるため、これを含む糖タンパク質はヒトの体内で免疫原性を持つ危険がある。全 Trastuzumab 分子中、N-グリコシルノイラミン酸含有糖鎖を持つ分子は合計0.4%に過ぎなかったが、非ヒト型糖鎖構造を持つモノクローナル抗体が薬品に少量でも含まれているという事実は医薬品の安全性を考える上で大変重要な知見であると言える。その他、非ヒト型糖鎖構造としては、Gal(α-1,3)Gal 構造を含む糖鎖が両抗体医薬品から検出されている。

以上より、Exerim 法は非常に微量なサンプルから、頻度のごく低い糖鎖構造まで網羅的に定量化できる技術であると証明できた。簡便な前処理と分析の高速性も加えて、癌化に伴う微細な糖鎖構造の変化を再現性良く定量化する技法として大変有効な技術が構築できたと言える。

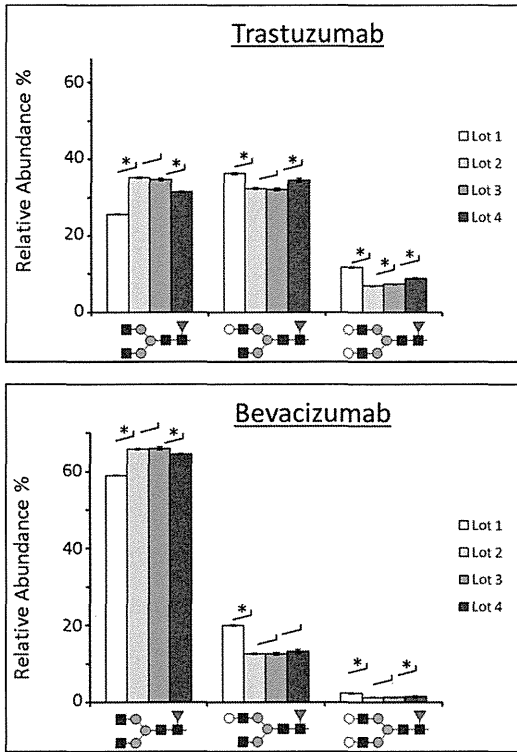


図7 Trastuzumab、Bevacizumab のロット間糖鎖品質安定性試験。代表的な3種の糖鎖構造付加頻度を示す。*: $p < 0.05$ (t検定)。Error bars: 標準誤差 ($n = 4$)。

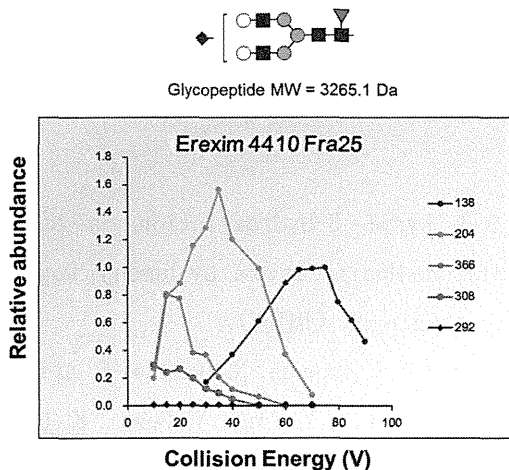


図8 Trastuzumab 上 Neu5Gc 含有糖鎖を示す観測データ。m/z = 308 が Neu5Gc 特異的なオキシニウムイオン。

D. 考案

本年度開発した糖鎖構造高速定量技術、Erexim法はすでに抗体医薬品をはじめとした各種糖タンパク質医薬品の開発と品質管理への応用が進んでいるが、現在は診断目的の上市に必要な専用解析ソフトウェアを作成中である。また、大規模な臨床検体の分析にはサンプル前処理のオートメーション化も必須であるので、自動分注装置を応用した全自動トリプシン消化、脱塩処理ロボット、およびそれに特化した前処理プロトコルの至適化も進めている。

今後は当分析システムを駆使し、研究代表者がこれまで同定してきた肺癌糖鎖標的腫瘍マーカー候補 (Proteome Sci 2011, 9, 18, Mol Cell Proteomics 2010, 9, (9), 1819, Proteomics 2009, 9, (8), 2182, Journal of proteome research 2007, 6, (9), 3475) に対してバイオバンクジャパン保存血清などを用いたバイオマーカー検証試験を行う。従来の技術では血清から目的の糖タンパク質を単離し、糖鎖を酵素的に切断、最終的に多段階 HPLC にて糖鎖構造の検証を行うしかなく、数百症例の分析は到底不可能であったが、本開発技術で初めて糖鎖マーカーの多検体検証試験が可能となると期待できる。

E. 結論

Erexim法のキーポイントはいかなる糖ペプチドの分析であっても、その糖鎖の構造決定、定量のためには、MS/MSでの衝突誘起解離 (CID) の過程で産生される7種類の糖由来オキシニウムイオンをモニターす

ればよい点である（中性糖鎖の場合はさらに5種類に絞ることが可能）。オキシニウムイオンは分子内の酸素原子に原子価より1つ多いプロトンが結合した陽イオンであり、糖鎖、または糖ペプチドを質量分析計で測定する際、CIDによって糖鎖が崩壊し、様々な単糖や、二糖由来のオキシニウムイオンが生成される。この崩壊パターンとシグナル強度が、元の糖鎖構造の特徴と量をよく反映し、糖鎖変動定量化アルゴリズムの構築に最適な新しい基礎原理となることを見だし、本研究計画二年目までの実験で実用可能技術としての開発に成功した。（特願2012-197908、Analytical chemistry 2012, 84, (22), 9655）

ここまでの進捗により、本研究の最終目標である肺癌糖鎖標的腫瘍マーカー候補の大規模検証試験実施に必要な、①血清タンパク質上糖鎖付加部位ごとの糖鎖変動解析、②数百検体の分析に耐えうるスループット（1分析あたり10分）、③糖鎖の微細な癌性変化を捉えることの出来る高感度（付加頻度0.1%の糖鎖構造まで定量化可能）、といった技術的課題を全てクリアすることが出来た。

当初の研究計画と比して年度目標は予定通り到達できていると評価でき、なおかつ要素技術開発課程で多くの分野に派生的応用が可能であることが判明した点は予想以上に大きな成果が得られたと言える。実際に、糖鎖改変タンパク質医薬品の開発、品質評価、さらには細胞表面糖鎖分化マーカーの精密同定など、これまでの糖鎖解析技術では達成し得なかった感度、スピード、定量信頼性、簡便性で応用糖鎖解析が使用

可能になった点で、糖鎖バイオマーカー実用化以外への波及効果も大いに期待できる成果となった。本研究では、計画最終年度にかけて Erexim 法を用いた肺癌バイオマーカーの実用化検証試験を進めていく。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Glycoproteomic strategies: from discovery to clinical application of cancer carbohydrate biomarkers.

K. Ueda, Proteomics Clin Appl 2013. In press.

2) Preapoptotic protease calpain-2 is frequently suppressed in adult T-cell leukemia.

M. Ishihara, N. Araya, T. Sato, A. Tatsuguchi, N. Saichi, A. Utsunomiya, Y. Nakamura, H. Nakagawa, Y. Yamano, and **K. Ueda**, Blood 2013. In press.

3) Lysyl 5-Hydroxylation, a Novel Histone Modification, by Jumonji Domain Containing 6 (JMJD6).

M. Unoki, A. Masuda, N. Dohmae, K. Arita, M. Yoshimatsu, Y. Iwai, Y. Fukui, **K. Ueda**, R. Hamamoto, M. Shirakawa, H. Sasaki, and Y. Nakamura, The Journal of biological chemistry 2013, 288, (9), 6053-62.

4) Quantitative structural characterization of local N-glycan microheterogeneity in therapeutic antibodies by energy-resolved oxonium ion monitoring.

A. Toyama, H. Nakagawa, K. Matsuda, T. A. Sato, Y. Nakamura, and K. Ueda, Analytical chemistry 2012, 84, (22), 9655-62.

5) Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PADI4 pathway.

C. Tanikawa, M. Espinosa, A. Suzuki, K. Masuda, K. Yamamoto, E. Tsuchiya, K. Ueda, Y. Daigo, Y. Nakamura, and K. Matsuda, Nature communications 2012, 3, 676.

6) Histone lysine methyltransferase SETD8 promotes carcinogenesis by deregulating PCNA expression.

M. Takawa, H. S. Cho, S. Hayami, G. Toyokawa, M. Kogure, Y. Yamane, Y. Iwai, K. Maejima, K. Ueda, A. Masuda, N. Dohmae, H. I. Field, T. Tsunoda, T. Kobayashi, T. Akasu, M. Sugiyama, S. Ohnuma, Y. Atomi, B. A. Ponder, Y. Nakamura, and R. Hamamoto, Cancer research 2012, 72, (13), 3217-27.

7) Identification of a novel oncogene, MMS22L, involved in lung and esophageal carcinogenesis.

M. H. Nguyen, K. Ueda, Y. Nakamura, and Y. Daigo, International journal of oncology 2012, 41, (4), 1285-96.

8) Critical function for nuclear envelope protein TMEM209 in human pulmonary carcinogenesis.

T. Fujitomo, Y. Daigo, K. Matsuda, K. Ueda, and Y. Nakamura, Cancer research 2012, 72, (16), 4110-8.

9) Development of an orally-administrative MELK-targeting inhibitor that suppresses the growth of various types of human cancer.

S. Chung, H. Suzuki, T. Miyamoto, N. Takamatsu, A. Tatsuguchi, K. Ueda, K. Kijima, Y. Nakamura, and Y. Matsuo, Oncotarget 2012, 3, (12), 1629-40.

2. 学会発表

国際会議

1) A focused proteomics technology QUEST-MS identified a novel plasma prostate cancer biomarker polypeptide complementing PSA test.

K. Ueda, A. Tatsuguchi, K. Tamura, T. Shuin, T.A. Sato, M. Nakayama, Y. Nakamura, and H. Nakagawa, American

Association for Cancer Research, 103rd Annual Meeting 2012 2012, Mar. 31, (Chicago, IL)

2) Evaluating the biosimilars: Energy Resolved Oxonium Ion Monitoring (Erexim) technology for the analysis of N-glycan microheterogeneity in therapeutic antibodies.

K. Ueda, A. Toyama, T.A. Sato, Y. Nakamura, and H. Nakagawa, HUP0 2012, 11th World Congress 2012, Sep. 11, (Boston, MA)

3) Quantitative proteome profiling of CD4+CD25+CCR4+ T-cells to identify potential therapeutic targets for adult T-cell leukemia (ATL) and Human T-lymphotropic virus type-1 associated myelopathy (HAM)

M. Ishihara, N. Araya, T. Sato, A. Utsunomiya, Y. Yamano, Y. Nakamura, H. Nakagawa, and **K. Ueda**, American Association for Cancer Research, 103rd Annual Meeting 2012 2012, Mar. 31, (Chicago, IL)

4) Quantitative proteome profiling of cerebrospinal fluid to identify potential diagnostic markers for human T-cell leukemia virus type 1 associated myelopathy.

M. Ishihara, N. Araya, T. Sato, Y. Yamano, Y. Nakamura, H. Nakagawa, and **K. Ueda**, HUP0 2012, 11th World Congress 2012, Sep. 11, (Boston, MA)

国内会議

1) Development of pancreatic cancer biomarkers by focused proteomics technologies.

K. Ueda, 第 71 回日本癌学会学術総会 2012, Sep. 20, (Sapporo, Japan)

2) 最先端プロテオミクスによる HTLV-1 関連疾患バイオマーカーの探索.

K. Ueda, 第 33 回 日本臨床薬理学会学術総会 2012, Nov. 31, (Okinawa, Japan)

3) 血中エクソソーム腫瘍マーカー探索のためのプロテオミクス.

K. Ueda, 第 3 回 癌研セミナー 2012, Oct. 22, (Tokyo, Japan)

4) 新規肺癌早期診断マーカー同定のための血中エクソソーム定量プロテオームプロファイリング.

K. Ueda, 第 4 回 RNAi 研究会 2012, Sep. 1, (Hiroshima, Japan)

5) A focused proteomics technology QUEST-MS identified a novel plasma

prostate cancer biomarker polypeptide
complementing PSA test.

K. Ueda, 第10回 日本ヒトプロテオーム
学会 2012年大会 2012, Jul. 26, (Tokyo,
Japan)

6) Erexim 法を用いた抗体医薬糖鎖構造の
高速定量評価.

K. Ueda, 第10回 日本糖鎖科学コンソー
シアムシンポジウム 2012, Nov. 30,
(Tokyo, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を 含む）

1) 「発明の名称：ヒトTリンパ球向性ウイ
ルス I 型関連疾患検出用ポリペプチドとそ
の利用」

出願番号：特願 2012-189318

出願日：2012/08/29

2) 「発明の名称：糖鎖構造の解析方法」

出願番号：特願 2012-197908

出願日：2012/09/07

3) 「発明の名称：前立腺癌の進行度の評
価方法、前立腺癌の検出方法、および検
査キット」

出願番号：特願 2013-061094

出願日：2013/03/22

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
植田幸嗣	プロテオーム解析から見たバイオマーカーとしてのエクソソームとその特徴	落谷孝広	細胞工学 vol. 32 No.1	株式会社学研メディカル秀潤社	日本	2013年	8
植田幸嗣	新規血清マーカー	有井滋樹	肝胆膵第66巻2号	株式会社アークメディア	日本	2013年	7

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>K. Ueda</u>	Glycoproteomic strategies: from discovery to clinical application of cancer carbohydrate biomarkers.	Proteomics Clin Appl	In press	In press	2013
M. Ishihara, N. Araya, T. Sato, A. Tatsuguchi, N. Saichi, A. Utsunomiya, Y. Nakamura, H. Nakagawa, Y. Yamano, and <u>K. Ueda</u>	Preapoptotic protease calpain-2 is frequently suppressed in adult T-cell leukemia.	Blood	In press	In press	2013
M. Unoki, A. Masuda, N. Dohman, K. Arita, M. Yoshimatsu, Y. Iwai, Y. Fukui, <u>K. Ueda</u> , R. Hamamoto, M. Shirakawa, H. Sasaki, and Y. Nakamura	Lysyl 5-Hydroxylation, a Novel Histone Modification, by Jumonji Domain Containing 6 (JMJD6).	The Journal of biological chemistry	288 (9)	6053-62	2013

<p>A. Toyama, H. Nakagawa, K. Matsuda, T. A. Satoh, Y. Nakamura, and K. Ueda</p>	<p>Quantitative structural characterization of local N-glycan microheterogeneity in therapeutic antibodies by energy-resolved oxonium ion monitoring.</p>	<p>Analytical chemistry</p>	<p>84 (22)</p>	<p>9655-62</p>	<p>2012</p>
<p>C. Tanikawa, M. Espinosa, A. Suzuki, K. Masuda, K. Yamamoto, E. Tsuchiya, K. Ueda, Y. Daigo, Y. Nakamura, and K. Matsuda</p>	<p>Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PADI4 pathway.</p>	<p>Nature communications</p>	<p>3</p>	<p>676</p>	<p>2012</p>
<p>M. Takawa, H. S. Cho, S. Hayami, G. Toyokawa, M. Kogure, Y. Yamane, Y. Iwai, K. Maejima, K. Ueda, A. Masuda, N. Dohmae, H. I. Field, T. Tsunoda, T. Kobayashi, T. Akasu, M. Sugiyama, S. Ohnuma, Y. Atomi, B. A. Ponder, Y. Nakamura, and R. Hamamoto</p>	<p>Histone lysine methyltransferase SETD8 promotes carcinogenesis by deregulating P19^{INK4} expression.</p>	<p>Cancer research</p>	<p>72 (13)</p>	<p>3217-27</p>	<p>2012</p>
<p>M. H. Nguyen, K. Ueda, Y. Nakamura, and Y. Daigo</p>	<p>Identification of a novel oncogene, MMS2L, involved in lung and esophageal carcinogenesis.</p>	<p>International journal of oncology</p>	<p>41 (4)</p>	<p>1285-96</p>	<p>2012</p>

T. Fujitomo, Y. Daigo, K. Matsuda, K. Ueda , and Y. Nakamura	Critical function for nuclear envelope protein TMEM209 in human pulmonary carcinogenesis.	Cancer research	72 (16)	4110-8	2012
S. Chung, H. Suzuki, T. Miyamoto, N. Takamatsu, A. Tatsuguchi, K. Ueda , K. Kijima, Y. Nakamura, and Y. Matsuo	Development of an orally-administrative MELK-targeting inhibitor that suppresses the growth of various types of human cancer.	Oncotarget	3 (12)	1629-40	2012

Glycoproteomic strategies: from discovery to clinical application of cancer carbohydrate biomarkers.

Koji Ueda

Laboratory for Biomarker Development, Center for Genomic Medicine, RIKEN, Japan

Correspondence: Dr. Koji Ueda, Laboratory for Biomarker Development, Center for Genomic Medicine, RIKEN, General Research Building 6F, Institute of Medical Science, 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo, Japan, 108-8639.

E-mail: k-ueda@riken.jp

Fax: +81-3-5449-5785

Abbreviations: **IGEL**, isotopic glycosidase elution and labeling on lectin-column chromatography; **MRM**, multiple reaction monitoring; **Erexim**, energy resolved oxonium ion monitoring

Key words

Biomarker, Cancer, Glycoproteomics, Mass spectrometry, Serum

Total number of words

7,304 words

Received: November 29, 2012; Revised: November 29, 2012; Accepted: December 27, 2013

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/prca.201200123

Abstract

Carbohydrate antigens are the most frequently and traditionally used biomarkers for cancer, such as CA19-9, CA125, DUPAN-II, AFP-L3, and many others. The diagnostic potential of them was simply based on the cancer-specific alterations of glycan structures on particular glycoproteins in serum/plasma. In spite of the facts that glycosylation disorders are feasible for cancer biomarkers and glycomic analysis technologies to explore them have been rapidly developed, it remains difficult to sensitively screen glycan structure changes on cancer-associated glycoproteins from clinical specimens. Moreover a lot of additional issues should be appropriately addressed for the clinical application of newly identified glycosylation biomarkers, including analytical throughput, quantitative confirmation of structural changes, and biological explanation for the alterations. In the last decade, significant improvement of mass spectrometric techniques is being made in the aspects of both hardware spec and pre-analytical purification procedures for glycoprotein analysis. Here we review potential approaches to perform comprehensive analysis of glycoproteomic biomarker screening from serum/plasma and to realize high throughput validation of site-specific oligosaccharide variations. The power and problems of mass spectrometric applications on the clinical use of carbohydrate biomarkers are also discussed in this review.

Accepted Article

1 Introduction

In order to survey tumor-derived biomarkers in serum, not only glycoproteomics but all other focusing technologies are essential, which effectively reduce the complexity of samples by removing unnecessary major serum proteins [1, 2]. Such focused proteomics approaches would include peptidomics [3-6], degradomics [7-11], immunodepletion of abundant proteins [12-16], ProteoMiner purification [17-22], and rare amino acid capturing (e.g. iCAT tag [23-28] for cysteine or 2-nitrobenzenesulfonyl tag for tryptophan [29-34]). Since concentration of biomarker molecules released from early-stage cancer tissues (generally less than 20 mm diameter) are extremely low, appropriate focused proteomics technologies can greatly help to detect such sub- $\mu\text{g/ml}$ proteins in sera. In particular, glycosylation-focused proteomics could contribute to both improving analytical depth and interpreting roles of carcinogenesis-associated glycosylations which might lead to further understanding molecular mechanisms of malignant transformation or metastasis. More importantly, particular alterations of glycan structures on secreted glycoproteins specifically reflect the site of original organs or cell types. This aspect of glycosylation biomarkers enforces the specificity of diagnosis in the cases distinguishing cancer from benign diseases (e.g. lung cancer from chronic obstructive pulmonary disease (COPD)) or defining origin of cancer. Despite the benefits described above, there have been lots of technical difficulties in the discovery of cancer-associated glycosylation microheterogeneities from clinical specimens as well as clinical application of those. Indeed, the latest series of mass spectrometers can provide much deeper and wider knowledge of proteins compared to those a decade ago. However it has been realized that mass spectrometric analysis of lectin-purified serum proteins, which is one of the simplest ways of