

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25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。

研究計画の三年目である平成25年度では、これまでに同定した肺癌糖鎖標的腫瘍マーカー候補分子に対して Erexim 法を用いた多検体検証試験を実施した。本解析により、血中の CD163 タンパク質に付加された3箇所のN型糖鎖が肺腺癌の病期依存的なフコシル化変動を示すことが証明された。さらに、この癌性糖鎖変動は肺腺癌ステージIIの段階から有意に観測され、早期肺癌の存在を示唆する有用なスクリーニングバイオマーカーとなり得ることが期待できる。

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。

本年度は、平成 24 年度に開発した Energy resolved oxonium ion monitoring technology (Erexim)法を使用して、上記既同定の肺癌糖鎖標的腫瘍マーカー候補分子に対してバイオマーカー検証試験を行い、以後の臨床試験に繋がる診断薬シーズを確

定することを目的とする。

B. 研究方法

a. 血清サンプルの分析前処理

87 症例（健常者 14 例、肺腺癌 I 期 10 例、II 期 15 例、III 期 28 例、IV 期 20 例）の血清サンプル各 5 μ l に [10M Urea, 200 mM ammonium bicarbonate] 20 μ l を添加して変性させた後、Dithiothreitol 終濃度 10 mM を追加して 37 $^{\circ}$ C、30 分間還元反応を行った。さらに Iodoacetamide 終濃度 25 mM を添加し、室温、暗所で 45 分間システイン残基のアルキル化を行った。アルキル化反応を Dithiothreitol 終濃度 10 mM 添加でクエンチし、[50 mM ammonium bicarbonate] 175 μ l、平衡化後の Immobilized Trypsin (Thermo Scientific 社) 10 μ l を順に加えて消化反応を恒温シェイカー内で 37 $^{\circ}$ C、6 時間行った。消化後のペプチドサンプルを C18 固相抽出カートリッジ(スリーエム社)で脱塩精製し、次の質量分析に供した。

b. 質量分析 (Erexim 法)

Erexim 法を用いた血清消化物の質量分析には 4000QTRAP トリプル四重極型質量分析計(AB Sciex 社)に Ultimate 3000 RSLC nano flow HPLC (Dionex 社)を接続した LC/MS/MS システムを使用した。ペプチド分離用のカラムには 75 μ m x 150 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.

第一四重極 Q1 チャンネルには各種バイオマーカー標的糖鎖付加サイトを含んだ糖ペプチドの質量電荷比(m/z)を設定した。ここで、2 分岐糖鎖までの考えられうる全ての糖鎖構造パターンについてチャンネルを設定し、報告のあるヒト N 型糖鎖構造全種類を定量的にモニターできるようにした。第三四重極 Q3 チャンネルには、N-アセチルグルコサミンフラグメントイオン m/z = 138、N-アセチルグルコサミンイオン m/z = 204、マンノース、またはガラクトースイオン m/z = 163、N-アセチルノイラミン酸イオン m/z = 292、N-アセチルノイラミン酸から水分子が脱離したイオン m/z = 274、ガラクトース + N-アセチルグルコサミンイオン m/z = 366 を設定し、各オキシニウムイオンの Exetim 曲線を描出した。

e. データ解析

前項の質量分析によって得られたデータは MultiQuant version 2.02 (AB Sciex 社)ソフトウェアを用いてプロセッシング、各 MS クロマトグラムの面積値を求める定量解析を行った。昨年度に報告した原著論文 (Anal Chem. 2012; 84 (22): 9655) に記載した手法通り、m/z = 138 のオキシニウムイオンを使用して各糖鎖コンポーネントの定量を、その他のオキシニウムイオンの Exetim 曲線パターン解析から糖鎖構造

の同定を実施した。

今年度の研究で対象としたコアフコースの付加頻度解析については、検出された全糖ペプチドの MS クロマトグラム面積値合計のうち、コアフコシル化糖鎖が付加されたペプチドの面積値合計が占める割合を算出した。Box plot など解析結果の集計には R ソフトウェア (Version 2.15.1) を使用した。

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。オキシ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 (Exetim 法) である。

Exetim 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 で生成したオキシニウムイオンを全て定量的に検出する。

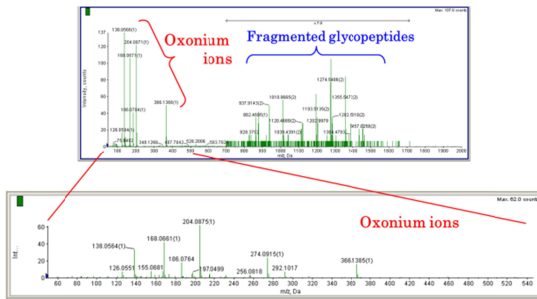
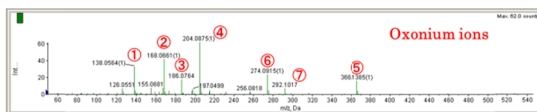


図1 (上段)代表的な糖ペプチドの LC/MS/MS スペクトル。高分子領域にペプチド鎖のフラグメントイオンが、低分子領域には糖鎖由来のフラグメントイオン(オキシニウムイオン)が観測される。(下段)m/z = 60 - 540 の拡大図。

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 -1,3 グリコシル結合のガラクトースと -1,6 グリコシル結合のガラクトースが区別できる。



- | | |
|--|---|
| <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]⁺ | $\left(\begin{array}{l} \text{HexNAc : GlcNAc or GalNAc} \\ \text{Hex : Man or Gal} \\ \text{Neu5Ac : N-acetyl neuraminic acid} \end{array} \right)$ |
|--|---|

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。

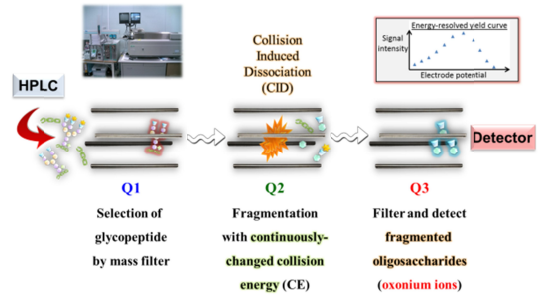


図3 Exetim 法の分析機序。語句詳細は本文参照。

この Exetim 法を駆使して、肺癌患者血清中にてコアフコースの付加頻度が有意に亢進している糖タンパク質として過去に同定した Haptoglobin、Orosomuroid-1、CD163 について、87 症例から成る検証試験セットを用いて糖鎖構造変化を定量化した。

実際にヒト血清タンパク質の消化物から肺癌糖鎖標的のマーカ候補分子である CD163 上の糖鎖構造存在比を定量化したものが図 4 である。1 箇所の糖鎖付加部位に 43 種類もの糖鎖構造が確認され、最も付加頻度が少ない糖鎖構造では存在率 0.00978% まで検出が可能であったことから、定量ダイナミックレンジは 4 桁以上であると言える。

ここで検出された 43 種類の糖鎖構造のうち、コアフコースが付加された糖鎖構造の割合を求め、87 症例間で比較試験を行った。その結果、図 5 に示すような病理群間の糖鎖付加変動が検出された。Haptoglobin については付加された 2 本の糖鎖ともに III 期以上の進行肺腺癌群で有意なタンパク質上フコシル化の亢進が検出された。

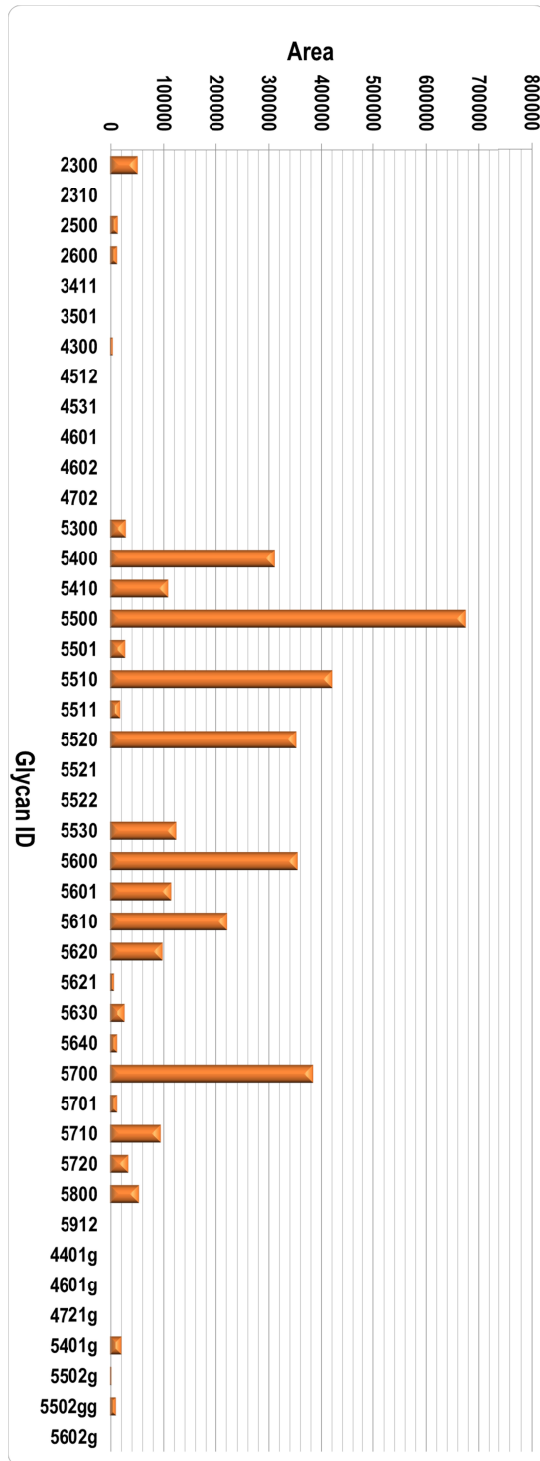


図5 m/z = 138 オキシニウムイオンによる糖鎖構造非依存的定量。4桁のGlycan IDは1桁目からそれぞれ [N-アセチルグルコサミン] [マンノース] またはガラクトース] [フコース] [シアル酸] の付加個数を表す。

Orosomuroid-1 に関しては 5 箇所の糖鎖付加部位について糖鎖構造の定量データが得られたものの、肺腺癌の早期診断に有効と考えられるフコシル化変動は確認できなかった。CD163-Asn105、Asn140、Asn1027 上糖鎖については、II 期以上の肺腺癌患者でコアコース付加頻度の有意な亢進が観察され、かつ病期依存的な付加頻度上昇が認められた。

D. 考察

従来の糖鎖解析技術では血清から目的の糖タンパク質を単離し、さらに糖鎖を酵素的に切断、最終的に多段階 HPLC か MALDI-TOF 型質量分析装置にて糖鎖構造の検証を行うしかなく、多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った。また、従来法の MALDI-TOF 型質量分析装置を用いた手法ではダイナミックレンジが 2 桁未満であったため、同レンジが 4 桁を超える Erexim 法は劇的な検出感度、定量性の向上を達成したと言える。

3 年計画の最終年度である本年度までに、本研究開始時に予定していた (1) 新規糖鎖構造変動高速定量技術の開発、および (2) それを使用した既同定の肺癌糖鎖標的腫瘍マーカー候補分子の多検体検証試験、の双方を完了することができた。さらに、本研究計画終了後に予定していた体外診断機器開発に向けたソフトウェア開発、質量分析計開発も民間企業と連携してすでに開始しており、Erexim 法自体は抗体医薬品をはじめとするあらゆるバイオ医薬品の

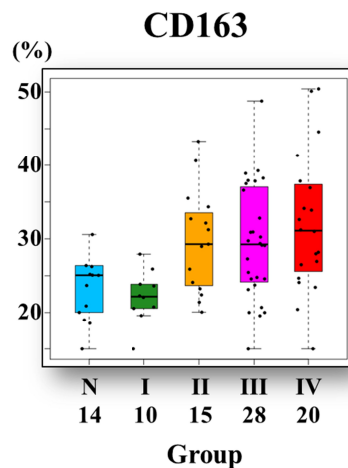
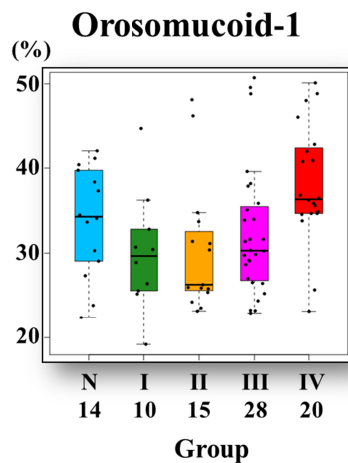
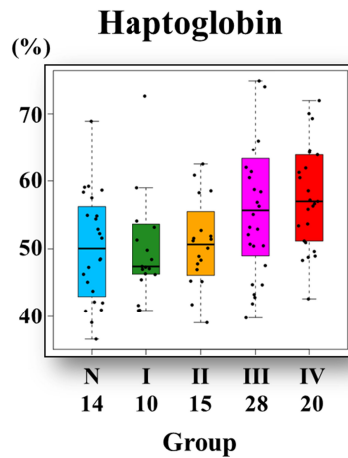


図6 87 症例を使用した肺癌糖鎖標的腫瘍マーカー候補分子3種に対する検証試験。縦軸：コアフコシル化頻度。横軸：病理群と症例数。N：健常者、I～IV：肺腺癌ステージI～IV。

品質評価試験、開発支援受託事業として実用化と普及が進んでいる。以上の進捗状況から鑑みて、当初想定された成果以上の診断薬化研究としての進展と幅広い医薬分野への波及効果が得られたと言える。

E. 結論

今後は本年度の検証試験で新規肺腺癌早期診断マーカーとして決定した CD163 タンパク質について、Erexim法を応用した質量分析診断技術による体外診断薬化を目指す。質量分析技術の診断応用は、2013年8月に病原微生物の一斉診断法としてFDAの認可を受けたVITEK MSをはじめ、今後急速に進展していくことが予想される。これは200種類以上の菌種を1分析で検出できるVITEK MS法に代表されるように、最新の質量分析装置では数十～数百の生体物質を短時間で同時定量することが可能になったことによる。

Erexim法は世界初のマルチサイト（複数の糖鎖付加部位）糖鎖構造一斉定量技術であるので、CD163以外にも検証試験を進める肺癌早期診断バイオマーカー候補から診断能の高いターゲットをできるだけ多く選出し、より高精度で多角的な肺癌の診断が可能な診断機器製造を目指す。検査項目が増えても質量分析に要する時間は20分程度であり、かつ抗体など高価な検査試薬は必要としないので大変安価でもある。最終的に非侵襲的で安価に行える血清診断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、肺癌による死亡率は劇的に改

善されると期待できる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. SMYD2-dependent HSP90 methylation promotes cancer cell proliferation by regulating the chaperonin complex formation.

G. Toyokawa, M. Yoshimatsu, M. Nakakido, V. Saloura, K. Sone, L. Piao, H. S. Cho, K. Ueda, Y. Maehara, Y. Nakamura, and R. Hamamoto

Cancer letters

2014, in press.

2. Identification of a nuclear protein, LRRC42, involved in lung carcinogenesis.

T. Fujitomo, Y. Daigo, K. Matsuda, K. Ueda, and Y. Nakamura

International journal of oncology

2014; 45 (1); 147-56.

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. Plasma Low-Molecular-Weight Proteome Profiling Identified Neuropeptide-Y as a Prostate Cancer Biomarker Polypeptide.

K. Ueda, A. Tatsuguchi, N. Saichi, A. Toyama, K. Tamura, M. Furihata, R. Takata, S. Akamatsu, M. Igarashi, M. Nakayama, T. A. Sato, O. Ogawa, T. Fujioka, T. Shuin, Y. Nakamura, and H. Nakagawa

Journal of proteome research

2013; 12 (10); 4497-4506.

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

K. Ueda

Proteomics Clin Appl

2013; 7 (9-10); 607-617.

6. 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; 121 (21); 4340-7.

7. The oncogenic polycomb histone methyltransferase EZH2 methylates

lysine 120 on histone H2B and competes ubiquitination.

M. Kogure, M. Takawa, V. Saloura, K. Sone, L. Piao, K. Ueda, R. Ibrahim, T. Tsunoda, M. Sugiyama, Y. Atomi, Y. Nakamura, and R. Hamamoto

Neoplasia

2013; 15 (11); 1251-61.

2. 学会発表

国際会議

1. Proteome-wide Profiling of Serum Exosomes Identified CD91 as an Exosomal Biomarker For Lung Adenocarcinoma.

K. Ueda

ISEV Workshop On EV Proteomics and Lipidomics

2014; Feb. 3 (Melbourne, Australia)

2. Current State of Early Detection Biomarker Development for Cancer in Japan.

K. Ueda

US-Japan Joint Meeting on Biomarkers for Early Cancer Detection

2014; Feb. 10 (NIH, Bethesda, MD)

国内会議

1. がんの早期発見に挑む質量分析計.

K. Ueda

よこはまサイエンスカフェ 2014

2014; Jan. 19 (横浜市立中央図書館)

2. 癌化に伴う血中エクソソームタンパク質の質的量的変化.

K. Ueda

第36回日本分子生物学会

2013; Dec. 5 (Yokohama, Japan)

3. 質量分析が明らかにする癌特異的エクソソーム表面抗原.

K. Ueda

Exosomes as Diagnostic Markers in Cancer (株式会社ダイアログセミナー)

2013; Nov. 25 (品川)

4. Development of glycoproteomic technologies and identification of glycan-targeting tumor markers.

K. Ueda

HUPO 2013, 12th World Congress

2013; Sep. 18 (Yokohama)

5. Erexim法を用いた抗体医薬品糖鎖構造の高速定量評価.

K. Ueda

BioJapan 2013

2013; Oct. 11 (Yokohama, Japan)

6. 大規模サンプル解析のための最先端ブ

口テオーム情報処理基盤.

K. Ueda

第 86 回日本生化学会

2013; Sep. 13 (Yokohama, Japan)

7. Proteomic Identification of
Tumor-derived Exosome Biomarkers.

K. Ueda

第 72 回日本癌学会学術総会

2013; Oct. 3 (Yokohama, Japan)

**H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む）**

1. 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

発明者：植田幸嗣

出願番号：特願 2013-061094

出願日：2013/3/22

登録日：2013/12/13

特許第 5429725 号

出願国：日本

2. 肺癌の検出方法および検出キット

発明者：植田幸嗣

出願番号：特願 2013-251548

出願日：2013/12/04

出願国：日本