

201449006A

厚生労働科学研究委託費

肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）

肝疾患病態指標血清マーカーの開発と  
低侵襲かつ効率的に評価・予測する新規検査系の実用化  
(H26-肝実-肝炎 - 一般-006)

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 成松 久

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、独立行政法人産業技術総合研究所（理事長 中鉢 良治）が実施した平成26年度「肝疾患病態指標血清マーカーの開発と低侵襲かつ効率的に評価・予測する新規検査系の実用化」の成果を取りまとめたものです。

## 目次

---

---

I. 委託業務成果報告（総括）	1
肝疾患病態指標血清マーカーの開発と低侵襲かつ効率的に評価・予測する 新規検査系の実用化	
＜業務主任者＞ 成松 久	
＜研究分担者＞ 溝上 雅史, 是永 匡紹, 武富 紹信, 髭 修平, 上野 義之, 伊藤 浩美, 末松 誠, 坂元 亨宇, 齋藤 英胤, 渡辺 純夫, 橋本 悦子, 泉 並木, 松本 晶博, 熊田 卓, 米田 政志, 伊藤 清顕, 日野 啓輔, 阿部 雅則, 調 憲, 八橋 弘, 梶 裕之, 久野 敦, 榎谷内 晶, 佐藤 隆	
＜研究協力者＞ 雄長 誠	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 病態病理・分子病理に基づいた肝がん特徴的な糖鎖変化の検出 および 肝がんマーカー候補糖タンパク質探索・検証のための技術開発	7
梶 裕之, 久野 敦, 佐藤 隆, 榎谷内 晶, 調 憲, 末松 誠, 坂元 亨宇, 伊藤 浩美, 是永 匡紹	
2. 微量迅速測定系開発に関連する研究開発	13
佐藤 隆, 榎谷内 晶, 調 憲	
3. 微量迅速測定系の多施設多検体解析	17
榎谷内 晶, 成松 久, 溝上 雅史, 是永 匡紹, 武富 紹信, 髭 修平, 上野 義之, 泉 並木, 渡辺 純夫, 齋藤 英胤, 橋本 悦子, 松本 晶博, 熊田 卓, 米田 政志, 伊藤 清顕, 日野 啓輔, 阿部 雅則, 調 憲, 八橋 弘	
＜研究協力者＞ 雄長 誠	
III. 学会等発表実績	23
IV. 研究成果の刊行物・別刷	29

---

---

# I . 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））  
委託業務成果報告（総括）

肝疾患病態指標血清マーカーの開発と低侵襲かつ効率的に評価・予測する新規検査系の実用化

業務主任者 成松 久 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 招聘研究員

研究要旨：

【研究目的】C型慢性肝炎患者の多くは、肝線維化が進展し、肝硬変を経て、やがて肝がんを発症する。この慢性肝炎の治療には抗ウイルス療法が適用されるが、その効果判定や肝硬変、肝がんハイリスク群の囲い込みには肝線維化の程度を知ることが重要である。しかしその判定は高侵襲性の生検によるため、臨床上の隘路となっている。また、現行の肝がんマーカーでは、早期発見は難しい。我々はこれまでに肝臓由来血清糖タンパク質の糖鎖構造が、肝疾患の進展に伴って変化することに着目し、独自の糖鎖バイオマーカー開発プラットフォームにより肝線維化マーカーを実用化してきた。本研究では、肝細胞がんなど異なる目的のマーカー開発のため、関連技術を改良・最適化すると共に、新たなマーカーの探索、正当性検証を経て、実用化することを目的とする。

【結果と考察】背景肝に影響されず、肝がん関連糖鎖変化を反映する新規レクチンNPAに対する反応性の高い肝がん培養細胞株2種を選択し、NPA反応性糖タンパク質（マーカー候補）を370種同定した。また、組織標本のレクチン染色よりNPA反応性は、がん部で強度が高いだけでなく、局在も変化していることが判明した。並行して、より疾患特異度の高い糖鎖マーカーを同定・検証するため、分析法の微量化など改善を進めた。開発の先行している肝硬変マーカー候補WFA+-CSF1Rについては、市販の抗体、レクチンを用いたELISA系を構築し、収集した検体約1,000件に対し正当性検証を進めた。その結果、このマーカーは肝がん高発がん群の同定、高危険患者囲い込みに有効である可能性が見いだされた。今後このマーカーを迅速測定するための分析キット開発を進め、分析キャリブレーター安定産生、供給系を確立した。このキャリブレーターは市販CSF1Rの約7.8倍の反応性を示した。

【結論】新規マーカーWFA+-CSF1Rの臨床的有用性（高発がん群の同定）の可能性が見出された。検証数を増やし、迅速測定系を確立して、有用性検証を進めると共に、新規肝がんマーカーの絞り込み、検証を進める。

研究分担者

溝上 雅史 国立国際医療研究センター  
肝炎・免疫研究センター長

是永 匡紹 国立国際医療研究センター  
肝炎・免疫研究センター 肝疾患  
患研修室長

武富 紹信	北海道大学大学院 医学研究科 外科学講座消化器外科学分野 I 教授
髭 修平	札幌厚生病院第三消化器内科 主任部長
上野 義之	山形大学医学部 内科学第二講座（消化器内科学）科長
伊藤 浩美	福島県立医科大学医学部 生化学講座 助教
末松 誠	慶應義塾大学医学部 医化学教室 教授
坂元 亨宇	慶應義塾大学医学部 病理学教室 教授
齋藤 英胤	慶應義塾大学大学院 薬学研究科 薬物治療学教室 教授
渡辺 純夫	順天堂大学医学部 消化器内科 科長
橋本 悦子	東京女子医科大学医学部 消化器内科 教授
泉 並木	武蔵野赤十字病院 消化器科 部長
松本 晶博	信州大学医学部附属病院 肝疾患診療相談センター 准教授
熊田 卓	大垣市民病院 副院長／消化器内科
米田 政志	愛知医科大学医学部 内科学講座（消化器内科）教授
伊藤 清顕	愛知医科大学医学部 内科学講座（消化器内科）准教授
日野 啓輔	川崎医科大学 肝胆膵内科学 教授
阿部 雅則	愛媛大学大学院医学系研究科 消化器・内分泌・代謝内科学 准教授
調 憲	九州大学大学院医学研究院 消化器・総合外科学分野（第二外科）准教授

八橋 弘	長崎医療センター臨床研究センター長
梶 裕之	産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター チーム長
久野 敦	産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 上級主任研究員
榎谷内 晶	産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員
佐藤 隆	産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員
研究協力者	
雄長 誠	産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 特別研究員

#### A. 研究目的

本邦には約 300 万人の B・C 型ウイルス性肝炎患者が存在し、肝炎関連疾患で年間約 4 万人が死亡している。現在肝がんは早期発見できれば 5 年生存率は 7 割を超えているが、現時点での肝がんマーカーである AFP, AFP-L3, PIVKA-II を駆使した早期がん検出の正診率は 7 割に留まり、高価な CT, MRI, 超音波機器を駆使しているのが現状である。正診率向上には 1 つのマーカーや診断技術に頼るのではなく、病変（病態）を細分化しそれぞれを定量的に検出できるマーカー（分子病態マーカー）の開発と、その実用化が必須である。本研究では、これら肝炎患者の、病態の進展や予後予測、治療効果を判定する検査薬を開発、実用化し、適切な治療の開始、治療法の選択による患者 QOL の向上に資することを目的とする。

本目的達成のため、①（病理解析を応用した肝がん糖鎖）マーカー探索班、②（微量迅速測定）キット開発班、③（多施設共同による）バ

リーダーシップ班の3つの開発班を設定し、それぞれに適切な人材・技術を配置すると同時に、役割を明確にする。具体的には

・先の肝炎マーカー研究班で開発された肝硬変の予後予測を可能とする血清バイオマーカーの簡便測定系を開発し(キット開発班)、臨床情報が整った収集済み血清 6000 検体から適切な検体を用い、すみやかにバリデーションする(バリデーション班)。

・既に構築されているバイオマーカー開発戦略と病理解析を効果的に組み合わせ、新規な肝がん病態特徴的糖鎖変化を発見し、分子マーカーを同定する(マーカー探索班)。有力マーカーに対する迅速検出系を構築後(キット開発班)、上述の 6000 検体によるバリデーションで臨床的意義を明確にする(バリデーション班)。

## B. 研究方法

### ①マーカー探索班

a. 病態病理・分子病理に基づいた肝がん特徴的な糖鎖変化の検出

分子病態マーカーを適宜併用し、客観的な指標によって病理学的に規定された組織標本のきわめて微小な領域(<0.5mm<sup>2</sup>)をレーザーマイクロダイセクションにより単離し、レクチンアレイによる比較糖鎖解析で、肝がんの特徴的な糖鎖変化を検出すると同時に、最適なプローブ(レクチン)を選抜する。選抜されたレクチンの妥当性は複数の異なる手法により検証する。妥当性検証には7種の肝細胞がん細胞株も用いる。その結果を基に、以後の探索フェーズでどの細胞株を対象に解析を進めるのかを決定する。

b. 肝がんマーカー候補糖タンパク質探索・検証のための技術開発

a.の疾患糖鎖プロファイルが微小試料から検出されるため、マーカー分子の探索、検証分析も、同様な分析スケールで進めなければならな

い。そこで、本年度は培養肝がん細胞やマウス肝臓をモデル試料として、質量分析による糖タンパク質同定、糖鎖構造分析技術の微小化、高感度化、高効率化を進める。また a.で適当なプローブレクチンが見出され、適用可能な組織試料が入手可能であるなら、標的糖タンパク質の同定と構造検証を行う。

### ②キット開発班

微量迅速測定系開発に関連する研究開発

肝硬変の予後予測を可能とする血清バイオマーカーの迅速測定系を開発する。本年度は安定な測定を可能にするキャリブレータを作製する技術を、特定糖鎖を有するリコンビナント糖タンパク質合成ノウハウをもとに開発する。

### ③バリデーション班

多施設多検体解析

国立国際医療研究センター肝炎情報センターを中核とした15施設の共同研究体制により、臨床情報が整った6000検体レベルのライブラリを維持する。検討されるマーカーに応じて使用する検体を組み替え、複数の検討項目を起案、実施する。本年度は肝硬変予後予測マーカーについてライブラリを構築する。

## C. 研究結果

### ①マーカー探索班

a. 病態病理・分子病理に基づいた肝がん特徴的な糖鎖変化の検出

NPAの反応性で説明される肝がんの特徴的な糖鎖変化は、肝細胞がん培養細胞株7種および肝がん患者組織を対象としたレクチンアレイで確認した。この実験より、マーカー探索に使用する細胞株として、HAK-1AとHLFが選択された。次に細胞、組織を対象として、自らが開発した多段階レクチン利用法、簡易レクチン評価法により、NPAレクチンが優れたプローブとな

りうることを確認した。レクチンアレイの結果として得られたシグナル強度の差を組織染色でも検証した。その結果、がん部・非がん部ともに蛍光を発する部位が存在することには変わらないが、興味深いことにその染色パターンおよび強度ががん部と非がん部では大きく異なることが判明した。

#### b. 肝がんマーカー候補糖タンパク質探索・検証のための技術開発

肝がん細胞株 HuH-7 細胞を対象に、IGOT-LC/MS 分析し、使用タンパク質量と同定数の関係を検証した。その結果、出発時のタンパク質量が 0.4 $\mu$ g 相当でも候補分子のリスト化に必要な 200 種の糖ペプチドが同定できることがわかった。次に実際の探索試料となる FFPE 簿切試料 1 枚 (約 80mm<sup>2</sup>、5 $\mu$ m 厚) を対象に、IGOT-LC/MS 分析し、必要最低面積を推定した。その結果、レクチンアレイで使用するのと同程度である 1mm<sup>2</sup> においても、約 200 種の糖ペプチドが同定できた。また、糖ペプチドの LC/MS 分析から、糖鎖付加位置ごとの糖鎖バラエティーをハイスループットに同定する分析手法を構築し、バイオマーカー候補における糖鎖変化を確認できることが分かった。

次に NPA 認識糖鎖を持つ糖タンパク質を、肝がん培養細胞株 HAK1A および HLF の細胞ペレットと培養上清より捕集、同定し、それぞれ 100~200 種、総数 370 種の糖タンパク質を同定した。遊離された糖鎖の MALDI-TOF-MS 分析から、NPA はハイマンノース型の糖鎖を優先的に結合することが確認された。

#### ②キット開発班

##### 微量迅速測定系開発に関連する研究開発

本年度は肝硬変を含む肝疾患の血清糖タンパク質マーカーとして見出された WFA+CSF1R の微量迅速測定キット用のキャリブレーション製技

術を開発した。CSF1R タンパク質の一次構造情報を基に、シグナル配列と細胞外領域からなるリコンビナント CSF1R(rCSF1R)発現ベクターを構築した。これらのプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、rCSF1R タンパク質をおよそ 100 $\mu$ g 精製した。rCSF1R の品質評価を兼ねて WFA+CSF1R 濃度を現行の ELISA 系により測定した結果、今回発現した rCSF1R-1 は市販のそれに比べて、7.76 倍 WFA との結合値が高く、優れていた。そこで rCSF1R を安定発現培養細胞株の樹立と精製法の改良を行い、ほぼ確立したため、次年度以降の供給体制は出来上がった。

#### ③バリデーション班

##### 多施設多検体解析

肝硬変マーカー WFA+CSF1R 実用化のための ②にあるキット開発に先立ち、マーカーの臨床的有効性を見出すために、市販抗体やレクチンを活用した簡易測定系 (マニュアル法によるサンドイッチ ELISA 系) を構築し、収集された臨床検体の一部について、バリデーション試験を実施した。この結果から、構築した測定は肝細胞がんの「高発がん群」の同定に有用であり、高危険群の囲い込みに有用となる可能性が示された。

#### D. 考察、結論

マーカー開発は対象疾患に特徴的な糖鎖変化を探索するフェーズから始まるが、この段階がクリアされない限りは、以後の開発は進められない。そのような点から、本年度の早い段階で背景肝に左右されない肝がんの特徴的な糖鎖変化をインジケートするレクチンが見出されたのは大きい。その変化の検証手段としては、これまでは組織標本のレクチン染色のみしか持ちえなかったが、多段階レクチン利用法や簡易レクチン評価法など、複数の独自手法を構築するこ



とができ、それを用いた妥当性検証からも、NPA  
レクチンの可能性が示された。

技術開発は、質量分析による糖タンパク質の  
同定の工程にも及んだ。FFPE 簿切試料微小部  
位 1mm<sup>2</sup> から、約 200 糖ペプチド (160 糖タン  
パク質) を同定できるようになったのは大きな  
進歩である。本年度は肝細胞がん細胞株からの  
糖タンパク質同定を行い、370 種を決めている  
が、次年度は候補分子の絞り込みを行うと同時  
に、肝細胞がん患者組織標本からの NPA 結合性  
糖タンパク質の同定にも挑戦していきたい。

本研究では肝細胞がんマーカーの実用化に先  
立ち、肝硬変を含む肝疾患の血清糖タンパク質  
マーカー WFA+CSF1R の実用化を先行して進  
めている。本年度の成果により微量迅速測定キ  
ットによる多検体測定に必要なだけ供給できる  
リコンビナントタンパク質生産安定発現株の取  
得もほぼできており、次年度に予定しているモ  
ノクローナル抗体の取得ができれば、in house  
の ELISA 系は完成し、実用化に必要な多検  
体測定は期間内に完了するであろう。

これまで肝硬変マーカーとして開発を進めてき  
た WFA+CSF1R は、今回の検証試験より、肝  
細胞がんの高危険群の囲い込みに有用となる可  
能性が見出された。しかし、分析検体が 1000  
に満たなかったため、今後はより多くの検体  
による測定・検討を通し、肝疾患における当該  
マーカー候補分子の臨床的有用性を明らかにす  
る。

## E. 健康危険情報

本研究課題に従事する者は、肝疾患関連患者  
の検体を取り扱うため、実験従事前の肝炎ウイ  
ルスワクチンの接種を義務づける。また、年 1  
回程度の抗体価検査の実施を行い、経時的なモ  
ニタリングを行うものとする。また、実験時の  
試料の取り扱い時には、白衣 (ディスポーザブル  
白衣)、防護メガネ、防護マスク、防護グロー  
ブ、安全キャビネット等を使用する、あるいは  
検体の不活化を行うものとする。現在までに感  
染事故等の発生は無い。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

業務項目報告書に記載した。

### 2. 学会発表

業務項目報告書に記載した。

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

### 1. 特許出願

久野敦、佐藤隆、梶裕之、調憲ら、「肝細胞がん  
マーカー」出願 1 件 (公開前のため特許番号の  
開示は致しません)

肝疾患病態指標糖鎖マーカー に関する特許  
審査請求 : 3 件 (特願 2011-522807、US  
13/384,031、CN 201080040973.8)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## II. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））  
委託業務成果報告（業務項目）

病態病理・分子病理に基づいた肝がん特徴的な糖鎖変化の検出 および  
肝がんマーカー候補糖タンパク質探索・検証のための技術開発

担当責任者 梶 裕之 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 研究チーム長  
久野 敦 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 上級主任研究員  
佐藤 隆 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員  
榎谷内 晶 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員  
調 憲 九州大学大学院 医学研究院 消化器・総合外科学分野 准教授  
末松 誠 慶應義塾大学 医化学教室 教授  
坂元 亨宇 慶應義塾大学医学部 病理学教室 教授  
伊藤 浩美 福島県立医科大学医学部 生化学講座 助教  
是永 匡紹 国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター肝疾患研修室長

研究要旨：組織標本を対象としたマーカー候補糖タンパク質を探索・検証するための技術を開発し、肝がんマーカーを開発することを目的とする。まず技術開発として、レクチンアレイで見出された糖鎖変化の妥当性を検証するための技術開発を行った。レクチンアレイをベースとする多段階レクチン利用法、簡易レクチン結合性評価法などを本研究のために最適化した。また、病理切片を試料とした糖タンパク質の同定技術、および糖鎖構造検証技術をスケールダウン及び高効率化のための技術開発にも着手した。試料調製過程を種々検討した結果、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）試料からレーザーマイクロダイクセクションにより切り出した  $1\text{mm}^2$ （厚さ  $5\mu\text{m}$ ）の試料を用い、約 200 種の糖ペプチド（約 160 糖タンパク質）が同定できるようになった。並行して、候補タンパク質の部位特異的糖鎖構造を高効率に解析する技術を開発した。以上の技術を活用し、肝がんマーカー開発を開始した。昨年度下期に前倒しで行った組織標本のレクチンアレイ解析により、背景肝に左右されず肝がんの特徴的な糖鎖変化を認識するレクチン NPA を見出しているため、まずはその妥当性を最適化した多段階レクチン利用法、簡易レクチン結合性評価法によりがん部での優位な NPA の反応性を再確認し、さらに組織上での反応性の局在はレクチン染色、免疫染色で確認した。以上の成果を特許出願した。肝がん細胞株 7 種の培養上清および細胞ライセートのレクチンアレイ解析により、NPA 結合性糖タンパク質分子の同定に適した細胞株を選出した。培養上清およびライセートから NPA に結合する分子を捕集し、LC/MS 法で約 350 種同定し、候補タンパク質としてリストアップした。

## A. 研究目的

現在、肝がんマーカーである AFP、AFP-L3、PIVKA-II による早期がん検出の正診率は 7-8 割に留まり、高価な CT、MRI、超音波機器を駆使しているのが現状である。申請者らは生体における各種糖タンパク質は、それを産生する組織・細胞の分化度や障害の程度により、結合している糖鎖の構造が異なることを明らかにしてきた。肝臓については、肝がんの発症リスクと強く相関する肝線維化の程度を見積もる血清糖鎖バイオマーカー (WFA<sup>+</sup>-M2BP) を実用化し、また同じ戦略で新規肝がん血清マーカー候補を見出し、検証を進めてきている。さらに、病態特異的な変化 (初期の線維化、及び肝がん発症) をとらえる新規マーカー候補を探索するため、病理診断のついた患者組織微小領域における糖鎖変化を検出するための技術開発を進めている。そこで、本課題では、検出された糖鎖変化の妥当性を評価するための手法開発、および糖鎖変化が検出された微小試料から候補糖タンパク質の同定手法の開発、および糖タンパク質同定と解析技術のスケールダウン (高感度化) を行い、より信頼性の高い肝がんマーカー候補分子を提供することを目的とする。また、実サンプルを用いて、組織のレクチンアレイ分析による、肝がん発症に関連する糖鎖プローブレクチンの同定、およびプローブレクチンを用いて肝がん培養細胞から候補タンパク質同定を試みる。

## B. 研究方法

(1) 肝がんにて特徴的な糖鎖変化の探索・検証前年度下期に実施したレクチンアレイによる実験を次の通りに再試した。肝細胞がんと周辺の非がん部を判別可能なマーカーを探索するため、肝がん患者の組織標本中ががん部位と線維化部位の両方を含むパラフィンブロックを協力機関より供与頂いた。これらの組織ブロックから 5  $\mu\text{m}$  厚薄切組織を作製して、ホルムコートスラ

イドへマウントした。これを脱パラ処理後、レーザーマイクロダイセクションを用い、そのがん部および非がん部肝実質細胞領域から 1mm<sup>2</sup> の領域ずつ組織片を単離し、1.5 mL 容マイクロチューブへ移した。チューブ内の組織片は松田ら (BBRC 2008) の手法に従い前処理し、タンパク質溶液を得た。Cy3 標識後、その一部をレクチンアレイ解析に用いた。シグナル取得後、画像解析ソフトにより数値化し、データを規格化後、GraphPad Prism5 により統計解析し、対応ありの 2 群比較により  $P < 0.05$  を示すレクチンを肝細胞がん検出候補レクチンとして選抜した。選抜されたレクチンの妥当性を評価するために、Tan ら (Mol BioSystems 2014) の方法にしたがい、レクチンアレイを応用した多段階レクチン利用法を行った。上述により取得した Cy3 標識組織タンパク質溶液を、予めストレプトアビジンコート磁気ビーズ (ベリタス社製) に結合させた NPA (選択されたレクチン) のビオチン化物 (Vector 社製) と反応させた。NPA 結合性組織タンパク質は磁石により回収され、残渣溶液をレクチンアレイにアプライした。対照としてレクチンを含まない磁気ビーズを用いても同様の実験を行った。スキャン後、数値解析により NPA 結合タンパク質の特徴を抽出した。レクチンアレイに頼らない評価法として、簡易レクチン反応性評価法を構築した。ストレプトアビジンコート ELISA プレート (Nunc 社製) にビオチン化 NPA を加え、一晚保温した。未反応レクチンを洗浄後、上述の Cy3 標識組織タンパク質溶液を添加し、37 度で 1 時間反応した。プレートに固定された NPA に結合したタンパク質の検出は抗 Cy3 マウスモノクローナル抗体をもちいた。抗体溶液を 37°C で 30 分間反応し洗浄後、抗マウス IgG 抗体—HRP をオーバーレイし、37°C で 20 分反応した。プレートに残存する HRP 量は TMB を用いて定量した。レクチン候補の有用性は肝がん患者組織切片を用いた

レクチン組織染色により確認した。脱パラ処理した組織切片に対し、最適濃度に希釈したビオチン化レクチンを添加し、洗浄後、Alexa488 標識ストレプトアビジンを加え、蛍光顕微鏡を用いて特異的なシグナルを検出した。

## (2) 糖タンパク質同定分析の微小化 (スケールダウン)

糖鎖バイオマーカー候補タンパク質の同定はこれまで、レクチンを用いて標的糖鎖を持つ糖ペプチドを選択的に捕集し、糖鎖切除後、ペプチド部分を質量分析 (LC/MS) 法で同定する手順で行ってきた。組織や細胞を試料とする場合、出発材料は湿重量で 1mg (含有タンパク質はその約 10%) を要していた。質量分析における感度向上は見込めないため、分析試料調製の過程で、いかにロスが少なく、選択的に標的糖ペプチドを回収するかが重要である。そこでまず、試料タンパク質をペプチドに断片化するまでの過程を見直し、還元アルキル化時の変性剤を透析で除く代わりに、希釈するなど、試料を別の容器に移動させる過程を排し、条件設定した。試料は、肝がん細胞株 HuH-7 の細胞約 1mg からタンパク質を抽出し (約 80ug)、上記の方法で、還元アルキル化、酵素消化した。消化物からの糖ペプチドの捕集は親水性相互作用クロマトグラフィー (アミドカラム使用) で行った。添加する試料量を段階的に減らしながら回収し、これを常法で同定し、その数を指標として、スケールダウンの可能性を検討した。

次いで、試料をマウス肝臓 FFPE 薄切試料とし、同様に分析スケールを下げながら、糖タンパク質同定数を追跡した。さらに、実際に微小な試料を出発材料とした試料調製工程を最適化するために、レーザーマイクロダイセクション (LMD) で切り出した、1mm 四方の試料から分析を行った。

## (3) 新規肝がんマーカーの探索

分化度や AFP 生産性、背景 (ウイルス感染の有無) の異なる複数種の肝がん患者薄切試料のレクチンアレイ比較糖鎖プロファイリングの結果、肝がんに関連するレクチンとして新たに NPA が選択された。そこで、このレクチンとの反応性 (アレイシグナル) の高い肝がん細胞を探索し、HAK-1A と HLF を選択した。この細胞、及び培養上清 (培地) から NPA 結合糖ペプチドを捕集し、IGOT-LC/MS 法で同定した。また、捕集された糖ペプチドから切除された糖鎖を完全メチル化の後、MALDI-TOF-MS で分析し、構造プロファイルを得た。

## (倫理面への配慮)

産業技術総合研究所においては、(班員らの臨床検体以外の) 市販されているヒト由来試料・ヒト細胞株を用いる実験についても、ヒト由来試料実験倫理委員会に諮った上で使用している。本倫理委員会は、厚生労働省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」あるいは「臨床研究に関する倫理指針」に準ずるものとして運営されているものである。

また、組換え DNA 実験、動物実験 (「動物実験等の実施に関する基本指針」に準ずる) を行う場合にも、産業技術総合研究所ライフサイエンス実験に関する倫理及び安全管理規程に従い、関連する委員会の承認を得た上で実施する。

## C. 研究結果

(1) 肝がんに関連する糖鎖変化の探索・検証  
NPA の反応性で説明される肝がんに関連する糖鎖変化は、肝細胞がん培養細胞株 7 種 (HuH-7, HepG2, KYN-1, KYN-2, HAK-1A, HAK-1B, HLF) および肝がん患者組織を対象としたレクチンアレイで確認した。細胞を用いた実験から、マーカー探索に使用する細胞株として、HAK-1A と HLF が選択された。次に細胞、組織を対象とし

て多段階レクチン利用法を行った。細胞の実験から、AFP 産生株、非産生株はシアル酸への反応性に顕著な違いがあるが、NPA への反応性を示すタンパク質に関しては、すべての細胞株で反応性を示し、NPA 反応性糖タンパク質はシアル酸への反応性を示さないことが示唆された。この傾向は組織を用いた実験でも一致した。

次に、簡易レクチン評価法による検討として以下の実験を行った。肝細胞がん培養細胞株 7 種 (HuH-7, HepG2, KYN-1, KYN-2, HAK-1A, HAK-1B, HLF) からそれぞれ調製した細胞ライセートのうち、タンパク質量として 200ng を Cy-3 ラベルし、そのうち 500pg 相当を 50 マイクロリットルの希釈液で希釈しウェルへ添加した。なお、ELISA では汎用性を高めるため、蛍光ではなく発色での検出を行った。その結果、NPA レクチン - 抗 Cy3 抗体サンドイッチ ELISA の測定値とレクチンアレイにおける NPA シグナルの強度と比較すると、細胞間の相対的な強度差は傾向が類似していることがわかった。次にレクチンアレイ解析で用いた組織ライセートを使って本実験を行った。すでに Cy3 標識している組織ライセート 23 症例分のうち、余剰液量が NPA レクチン - 抗 Cy3 抗体サンドイッチ ELISA の測定に十分耐えられるだけ存在する症例からランダムに 9 例を選択し、がん部及び非がん部由来ライセートの Cy3 ラベルサンプル (計 18 サンプル) を用い NPA レクチン - 抗 Cy3 抗体サンドイッチ ELISA を行った。なお、NPA 陽性細胞である CHO 細胞変異株 (Lec1) の細胞抽出液を標準糖タンパク質溶液として用い、サンプルと同じタイミングで 2 倍希釈系列を NPA レクチン - 抗 Cy3 抗体サンドイッチ ELISA し、それにより検量線を作成した。各サンプルの測定値はこの検量線から標準タンパク質量としての換算値として求められ、比較解析された。その結果、NPA レクチン - 抗 Cy3 抗体サンドイッチ ELISA においてもがん部が有意に高値を示した ( $P=0.0091$ )。なお、P 値は、

Wilcoxon の符号付順位検定により求めた。

次にレクチンアレイの結果として得られたシグナル強度の差を組織染色により検証するため、あらかじめ肝細胞がん患者の肝組織から連続的に薄切していた標本を用いてレクチン染色を行った。NPA レクチンを用いた蛍光染色像では、一見するとがん部及び非がん部が一樣に染色されているように見える。この傾向は DAB 染色による別の実験でも観察されており、さらに DAB 染色においてはむしろ非がん部の方が相対的にがん部よりも強い染色性を示す結果に至っていた。狭視野での観察像から、がん部・非がん部ともに蛍光を発する部位が存在することには変わらないが、興味深いことにその染色パターンおよび強度ががん部と非がん部では大きく異なることが判明した。すなわち、非がん部では肝実質細胞が一樣に弱い染色性を示し、かつ顆粒状の染色物が細胞中に内包されていた。それに対し、がん部ではむしろ細胞の膜に相当する部分と細胞の周辺に存在する間質に位置する部分に粒状の染色を示し、かつその染色強度は相対的に強かった。それに対し、LCA レクチンによる染色像は、NPA 染色によるそれとは大きくパターンが異なり、非がん部のがん周辺領域が強い染色性を示した。これは、レクチンアレイの結果を再現するものであった。

## (2) 糖タンパク質同定分析の微小化 (スケールダウン)

肝がん細胞株 HuH-7 細胞抽出物を還元アルキル化、トリプシン消化後、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) に供し、調製した糖ペプチドを、添加量を徐々に減少させながら IGOT-LC/MS 分析し、その同定数を比較した。出発時のタンパク質量、約 80ug 相当量では 1 度の分析で約 1,700 種の糖ペプチドが同定でき、出発量 0.4ug 相当 (最初の 1/200) でも 200 種の糖ペプチドが同定できた。この数はマーカー

探索における候補糖ペプチド（タンパク質）のリスト化に適用し得ると判断して、実際の探索試料となる FFPE 簿切試料に対する試料調製手順の改善を、マウスの FFPE 簿切試料をモデルに行った。簿切試料 1 枚（約 80mm<sup>2</sup>、5μm 厚）を、界面活性剤を含む緩衝液中で加熱し、還元アルキル化、消化後、1, 4, 9, 25mm<sup>2</sup>相当量を個々に HILIC に供し、得られた糖ペプチドを IGOT-LC/MS 分析した。25mm<sup>2</sup>では約 550 種の糖ペプチドが同定でき、1mm<sup>2</sup>においても、150 種の糖ペプチドが同定できた。そこで、最後に FFPE 試料から LMD で切り出した 1mm<sup>2</sup>の試料を 1-16 枚、個々に処理し、同様に同定したところ、この分析でも約 200 種の糖ペプチドが同定できた。

また、糖ペプチドの LC/MS 分析から、糖鎖付加位置ごとの糖鎖バラエティーをハイスループットに同定する分析アルゴリズムを考案し、これを実施するプログラムソフトを構築した。これを精製糖タンパク質に適用することで、バイオマーカー候補における糖鎖変化を確認できることが分かった。

### （3）新規肝がんマーカーの探索

NPA 認識糖鎖を持つ糖タンパク質を、肝がん培養細胞株 HAK1A および HLF より捕集、同定した。HAK1A 細胞より、216 種、培地より 109 種、HLF 株の細胞より 163 種、培地より 137 種、総数、370 種の糖タンパク質を同定した。遊離された糖鎖の MALDI-TOF-MS 分析から、NPA はハイマンノース型の糖鎖を優先的に結合することが確認された。

## D. 考察、結論

（1）肝がんの特徴的な糖鎖変化の探索・検証  
背景肝に左右されない肝がんの特徴的な糖鎖変化が見出された。その糖鎖は NPA というレクチンとの結合性として表現できた。多段階レクチ

ン利用法により NPA 反応性糖タンパク質群の特徴として、シアル酸修飾が少ないことが示唆された。この知見は血中から肝細胞がん由来タンパク質をエンリッチする際に有効である。次年度以降に実証実験を行いたい。

### （2）糖タンパク質同定分析の微小化（スケールダウン）

マウス肝臓の FFPE 簿切試料から微小部位 1mm<sup>2</sup>を切り取り、マーカー候補の選抜、検証へ進めるに足ると思われる、約 200 糖ペプチド（160 糖タンパク質）を同定できるようになった。この試料調製法にレクチン選別の過程を組み入れ、糖鎖モチーフ選択的な同定ができるかが、今後の課題であろう。実際のヒト試料で利用可能な面積は 1mm<sup>2</sup>以上有る場合も多く、レクチンとの組み合わせ次第であるが、マーカー候補の同定に適用可能な試料調製手順が確立されたと考えられる。また糖鎖付加部位ごとの糖鎖解析法が確立できた。この方法がどのくらいの試料量の糖タンパク質に適用できるかが今後の検討課題である。

（3）新規肝がんマーカーの探索：NPA 反応性糖タンパク質約 350 種を同定できた。これを基盤情報とし、引き続き患者試料からの同定を試み、マーカー候補の絞り込みと検証を進めていく。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

1) [Kuno A, Matsuda A, Unno S, Tan B, Hirabayashi J, Narimatsu H.](#) Differential glycan analysis of an endogenous glycoprotein: Toward clinical implementation. From sample pretreatment to data standardization. *Methods in Mol Biol* 1200, 265-285 (2014).

2) Zou X, Chi X, Pan Y, Du D, Sun H, Matsuda A, Li W, Kuno A, Zhang X, Narimatsu H, Niu J, Zhang Y. LecT-Hepa facilitates estimating treatment outcome during interferon therapy in chronic hepatitis C patients. *Clin Proteomics* **11**,44 (2014).

3) Hirabayashi J, Kuno A, Tateno H. Development and application of the lectin microarray. in “Topics in Current Chemistry: Sialoglyco-Biology and – Chemistry”, (editors)Schahn RG, Delannoy P, von Itzstein M, Springer. in press.

4) Noro E, Togayachi A, Sato T, Tomioka A, Fujita M, Sukegawa M, Suzuki N, Kaji H, Narimatsu H. *Proteome Research* (2015) submitted.

## 2. 学会発表

1) 久野敦、松田厚志、「組織標本を対象としたアレイ基盤グライコムクス～解析コンセプトと応用例～」，日本プロテオーム研究会年会シンポジウム（つくば）

2) Kaji H, Tomioka A, Noro E, Sogabe M, Sato T, Shikanai T, Narimatsu H. Development and application of a method for the

glycopeptide-based site-specific glycomic analysis. HUPO2014 (Madrid)

3) Noro E, Togayachi A, Sato T, Tomioka A, Fujita M, Sukegawa M, Suzuki N, Kaji H, Narimatsu H. Comprehensive identification of glycoproteins carrying Lewis x and site-specific glycan alteration in Fut9 knockout mice. HUPO2014 (Madrid)

4) 久野敦、松田厚志、「糖鎖微小環境の変化を捉える解析技術とその医学的分野への応用」，第 87 回日本生化学会大会（京都）

## F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1. 特許出願

久野敦、佐藤隆、梶裕之、調憲ら、「肝細胞がんマーカー」出願 1 件（公開前のため特許番号の開示は致しません）

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



### 微量迅速測定系開発に関連する研究開発

担当責任者 佐藤 隆 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員  
榎谷内 晶 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員  
調 憲 九州大学大学院 医学研究院 消化器・総合外科学分野 准教授

研究要旨：肝硬変・肝細胞がんの血清バイオマーカーとして開発した *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA)<sup>+</sup>-Colony Stimulation Factor Receptor-1 (CSF1R)の微量迅速測定 ELISA 系構築のための試薬開発を行った。本キットは血清中の CSF1R タンパク質上の糖鎖構造変化を検出するものであり、測定キットの精度管理のためには、アッセイキャリブレーターとなるリコンビナント糖タンパク質が必要である。WFA<sup>+</sup>-CSF1R の作製のために、CSF1R の糖鎖が付加している細胞外領域を発現ベクターにクローニングし、この遺伝子を WFA シグナル陽性の培養細胞で発現、精製した。作製した WFA<sup>+</sup>-CSF1R は市販の rCSF1R に比べて高い WFA 結合性を有し、現行の ELISA 系において、アッセイキャリブレーターとして使用可能であった。さらに、WFA<sup>+</sup>-CSF1R の大量生産のための安定発現系の構築も行った。

#### A. 研究目的

現在、血清マーカー (AFP、AFP-L3、PIVKA-II) を用いた血清診断による肝がんの正診率は 7-8 割に留まり、がんおよび前がん病変を検出するために高価な CT、MRI、超音波機器に変わる感度・特異度の高い血清バイオマーカーの開発が望まれている。申請者らは、肝疾患において特定の血清タンパク質上の糖鎖に生じる構造変化に着目し、肝線維化や肝硬変のバイオマーカーを開発することに成功してきた。

本課題では、先のプロジェクトにおいて肝硬変を含む肝疾患の血清糖タンパク質マーカーとして見出された WFA<sup>+</sup>-CSF1R の微量迅速測定キットの開発を行う。測定キットは、CSF1R タンパク質を検出するモノクローナル抗体、CSF1R 上の糖鎖変化を検出する WFA レクチン、アッセイのキャリブレーターとなる標準糖タン

パク質の 3 点から構成されが、現状の測定ではすべて市販試薬を用いている。本研究目的は、測定キットを構成するモノクローナル抗体とキャリブレーター糖タンパク質の自家製試薬を開発し、in house の測定キットを作成することである。本年度は、キャリブレーター糖タンパク質の生産系構築の検討を行った。

#### B. 研究方法

測定キットは抗体-レクチン・サンドイッチ検出系であるため、糖タンパク質標準品には、抗体とレクチンのそれぞれに反応するエピトープが必要となる。WFA に結合する糖鎖を持つ糖タンパク質の発現は、すでに肝線維化マーカー WFA<sup>+</sup>-M2BP の発現において確立しており、今回もそれに倣い HEK293 細胞で CSF1R の細胞外領域のタンパク質発現・精製を行い、キャリ

プレーターとしての力価を評価した。

#### (倫理面への配慮)

本項目では現時点では患者由来の臨床検体を直接に取り扱ってはいないが、産業技術総合研究所においては、(班員らの臨床検体以外の)市販されているヒト由来試料・ヒト細胞株を用いる実験についても、ヒト由来試料上で使用している。本倫理委員会は、厚生労働省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」あるいは「臨床研究に関する倫理指針」に準ずるものとして運営されているものである。

また、組換え DNA 実験、動物実験(「動物実験等の実施に関する基本指針」に準ずる)を行う場合にも、産業技術総合研究所ライフサイエンス実験に関する倫理及び安全管理規程に従い、関連する委員会の承認を得た上で実施する。

### C. 研究結果

CSF1R タンパク質は 972 アミノ酸からなる膜タンパク質であり、1-19 アミノ酸がシグナル配列、20-517 アミノ酸が細胞外領域、518-538 アミノ酸が膜貫通領域、539-972 アミノ酸が細胞内領域である。細胞外領域には 11 箇所の N 結合型糖鎖付加のコンセンサス配列が存在し、これらのすべてあるいは一部に N 結合型糖鎖が結合していることが考えられる。これらの情報を基に、リコンビナント CSF1R(rCSF1R)は、自身のシグナル配列と細胞外領域である 1-489 アミノ酸、1-512 アミノ酸の領域を発現させることとした。それぞれの領域をコードする cDNA を pCRII-Blunt ベクターにサブクローニングした後、両端の EcoRI で切断した領域を発現ベクター pcDNA3.1neo(+)-FLAG の FLAG-tag 配列前の EcoRI 部位に挿入し、pcDNA3.1-CSF1R-FLAG-1 (1-489) と pcDNA3.1-CSF1R-FLAG-2 (1-512) を構築した。これらのベクターから発現する rCSF1R は C 末

端に精製と検出のための FLAG tag 配列を持つことになる。

これらのプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、48 時間培養後の培養上清を 3 回繰り返し、合計およそ 30mL 回収し、これら上清から抗 FLAG 抗体カラムを用いて rCSF1R タンパク質を精製した。さらに、Amicon 10K を用いて、溶出に用いた FLAG peptide を除去し、タンパク質を濃縮して、rCSF1R-1 と rCSF1R-2 をおよそ 100  $\mu$ g それぞれ精製した。これらの rCSF1R は SDS-PAGE 後の CBB 染色にて 75-100 KDa の大きさにスミアのバンドとして検出された。これらのうち、rCSF1R-1 を用いて、WFA+CSF1R 濃度を現行の ELISA 系により測定した結果、rCSF1R-1/HEK293 は市販のリコンビナントタンパク質に比べて、7.76 倍 WFA との結合値が高く、糖タンパク質標準品として使用可能なことが確認された。

続いて、rCSF1R を安定的に大量生産するため、安定発現培養細胞株の樹立と精製法の改良を行った。まず、精製のタグを FLAG tag からより汎用性の高い HIS tag に変更した。1-489 アミノ酸をコードする cDNA を発現ベクター pcDNA3.1neo(+)-HIS の HIS tag 配列前の EcoRI 部位に挿入し、pcDNA3.1-CSF1R-HIS (1-489) を構築した。このベクターから発現する rCSF1R は C 末端に精製と検出のための HIS tag 配列を持つことになる。このプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に 1 mg/ml 濃度の G418 を添加して安定発現株を選択した。死細胞を除去しながら、3 週間 G418 添加培地で継代培養を継続し、安定発現株を樹立した。安定発現株は 10%FCS と抗生物質を含む DMEM 培地で培養され、3 日毎に培地を交換しながら 3 週間にわたって培養上清を回収した。この上清から抗 HIS 抗体カラムを用いて rCSF1R タンパク質を精製した。

## D. 考察

WFA シグナル陽性であるヒト培養細胞株 HEK293 を宿主細胞に用いて、CSF1R の細胞外領域をリコンビナントタンパク質として発現させることで、WFA<sup>+</sup>-CSF1R ELISA 系のキャリブレーターとして使用可能な rCSF1R 発現・精製に成功した。この rCSF1R は市販のリコンビナント CSF1R に比べて 7.76 倍高い WFA 反応性を有したが、これは両者の糖鎖構造の違いに起因するものと考えられる。実際に、両者の糖鎖構造に関しても質量分析装置を用いて解析を進めており、反応性の違いに関わる糖鎖構造の違いも検出されつつある。WFA<sup>+</sup>-CSF1R の発現系に関しては、既に、安定発現株の取得も行っており、大量生産への道筋もできつつある。次年度は、WFA<sup>+</sup>-CSF1R 精製の簡便化を行うとともに、CSF1R タンパク質に対するモノクローナル抗体の取得を進め、in house の ELISA 系の構築を行い、少数の患者サンプルセットを用いてキットの有効性を確認する予定である。

## E. 結論

HEK293 細胞を用いて rCSF1R の発現系を構築し、この rCSF1R が WFA<sup>+</sup>-CSF1R 測定系のキャリブレーターとして使用可能なことを確認した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 雄長 誠、榎谷内 晶. 肝疾患血清糖鎖バイオマーカーの開発 - グライコプロテオミクス技術の疾患糖鎖バイオマーカー開発への応用例 (Development of glycobiomarker for liver disease). 週刊 医学のあゆみ, 249 巻 8 号, 661-665, 医歯薬出版(株).

## 2. 学会発表

- 1) 榎谷内晶、梶裕之、久野敦、久保田智己、雄長誠、曾我部万紀、池原譲、成松久：グライコプロテオミクス技術を基盤とした血清糖鎖バイオマーカー開発戦略、日本プロテオーム学会 2014 年会、1L-p グライコプロテオミクスとその応用 / Glycoproteomics and Applications、筑波、2014 年 7 月
- 2) 雄長誠、榎谷内晶、梶裕之、久野敦、飯尾悦子、曾我部万紀、是永匡紹、後藤 雅式、田中靖人、池原譲、溝上雅史、成松久：グライコプロテオミクスを基盤とした肝硬変血清バイオマーカー “WFA(+)-CSF1R” の開発、日本プロテオーム学会 2014 年会、つくば、2014 年 7 月
- 3) Togayachi A, Ocho M, Kaji H, Kuno A, Iio E, Sogabe M, Tanaka Y, Ikehara Y, Mizokami M, Narimatsu H. Glycoproteomic Discovery of Serological Biomarker for Hepatitis B Virus Infection-associated Chronic Liver Disease. 2014 TAsL-Japan Hepatitis B Workshop (Second). Taipei (Academia Sinica), 19-20 Apr. 2014.
- 4) 佐藤隆、館野浩章、梶裕之、千葉靖典、久保田智己、平林淳、成松久：ノダフジレクチンの遺伝子同定と糖鎖結合特異性解析、日本生化学会、京都、2014 年 10 月
- 5) 佐藤隆、館野浩章、梶裕之、千葉靖典、久保田智己、平林淳、成松久：バイオマーカー検出プローブの開発～ノダフジレクチンの遺伝子同定と糖鎖結合特異性解析～、LS-BT、つくば、2015 年 2 月

**G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)**

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし