

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）

微量迅速測定系の多施設多検体解析

担当責任者 梶谷内 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  
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  
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 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  
泉 並木 武蔵野赤十字病院 消化器科 部長  
渡辺 純夫 順天堂大学医学部 消化器内科 科長  
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  
橋本 悦子 東京女子医科大学医学部 消化器内科 教授  
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 研究センター長  
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

研究要旨：国立国際医療研究センターを中核とした 15 施設の共同研究体制を構築し、臨床情報が整った血清、約 4000 検体（10 施設前後）を用いて糖鎖バイオマーカーの測定を行う。開発項目 2 より供給される測定系あるいは手動簡易測定系を使用して実測し、既存測定技術との統計学的な比較を行い、マーカー候補分子の有効性を検証する。今年度は肝疾患（肝硬変）糖鎖バイオマーカー・WFA<sup>+</sup>-CSF1R 分子を評価するための測定系の基礎検討（精度管理等）ならびに一部の臨床検体を用いた測定を行った。

A. 研究目的

現在肝がんは早期発見できれば 5 年生存率が 6 割を超えているが、肝がんマーカー 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、それを生成する組織・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、各種糖鎖関連解析技術を開発することで明らかにしてきた。さらに肝臓については、肝線維化の程度を反映する糖タンパク質を始めとした新規な肝疾患血清マーカーになりうる糖タンパク質候補分子を見出してきた。本課題項目では、肝疾患マーカー候補分子〔特に、肝硬変マーカー候補である、*Wisteria floribunda* agglutinin (ノダフジ凝集素; WFA) reactive colony stimulating factor 1 receptor (WFA 反応性マクロファージ刺激因子-1 受容体; WFA<sup>+</sup>-CSF1R)] について、迅速、簡便かつ安価な測定法・精度管理方法を確立し、そのマーカーとしての臨床的有効性を検証することを目的とする。

## B. 研究方法

(1) マーカー候補の簡易測定系の確立：血清肝疾患マーカー候補分子 WFA<sup>+</sup>-CSF1R に対する、手動での簡易測定系として、WFA レクチン（糖鎖プローブ）と抗体によるサンドイッチ ELISA 系（レクチン-抗体サンドイッチ ELISA）系を構築した。本レクチン-抗体サンドイッチ ELISA 系を用いることで、高い S/N 比が得られ、血中 WFA<sup>+</sup>-CSF1R の定量解析が可能である。また、糖鎖の有無に関係なく、CSF1R タンパク質の量を定量するための、Total CSF1R 測定 ELISA 系を構築した。WFA<sup>+</sup>-CSF1R 値ならびに Total CSF1R 値の比を取ることで、全体の CSF1R タンパク質のうち、肝疾患由来の糖鎖変化を起こした WFA<sup>+</sup>-CSF1R がどのくらいの割合になっているのかを計算することが出来る（考え方としては、既存マーカーの AFP-L3 が類するものとして挙げられる）。この WFA<sup>+</sup>-CSF1R 分子に対する抗体とレクチンとのサンドイッチ ELISA 系を構築し、適切に肝生検・病理診断された HCV 感染肝炎・肝硬変および肝細胞がん患者の血清を対象に小規模な有効性検証を行っており、その結果から血中

WFA<sup>+</sup>-CSF1R 量は慢性肝疾患の進行に伴って増加しており、特に肝硬変（F4）において顕著に増加する事を明らかにしている。

(2) 自動化による測定系の構築は進行中（開発項目 2 の項を参照）のため、既に構築された手動による簡易測定系を用いて、各臨床機関から収集された検体の一部について先行的に測定を行った。尚、後述するが、本研究課題項目での検証に用いた全ての血清サンプルは、インフォームドコンセントにより研究対象者（患者、試料提供者）から同意の得られたものである。またすべてサンプル収集機関および研究実施機関の各倫理審査委員会で承認されたものを用いている。

### （倫理面への配慮）

本研究の開始にあたり、本研究に参加する研究者は、産業技術総合研究所ならびに、各班員らの所属する臨床機関において、本研究実施計画書および研究対象者への説明文書が施設の倫理審査委員会もしくは治験審査委員会（IRB）で承認を得た上で検体を採取・収集し、研究に使用した。文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）」、遺伝医学関連 10 学会より提案された「遺伝学的検査に関するガイドライン」、厚生労働省・文部科学省「疫学研究に関する倫理指針」を遵守するものとした。

各臨床機関においては、研究対象者に対し下記に示す説明事項について十分説明した上で、本研究への参加について自由意思による同意を文書で得た〔説明事項; (1) 研究の目的および方法 (2) 予想される研究成果 (3) 研究試料の採取方法など (4) 研究への参加に同意しない場合であっても不利益は受けない旨 (5) 研究の参加に同意した場合でも何時でもこれを撤回できる

旨 (6) 人権の保護に関する配慮 (7) 研究担当者の氏名および連絡先など]。さらに研究対象者のプライバシーの保護と識別のため対象者の同定や照会は、登録時に発行される症例登録番号、患者イニシャル、生年月日を用いて行われ、患者名など第三者が直接患者を識別できる情報が本研究課題のデータベースに登録されることはないように行われた (以上の検体の集中管理ならびに二重匿名化などは国立国際医療研究センター・肝炎 免疫研究センターにて実施されている)。

本研究項目は多施設共同研究によって行うものであり、前述のように各臨床機関について諸手続きを経た上で収集された検体 (国立国際医療研究センター・肝炎 免疫研究センターで集中管理) は産業技術総合研究所に検体の一部を送付して、マーカー候補分子の測定・解析が行われた。産業技術総合研究所においても、医療機関から送られた検体はヒト由来試料実験倫理委員会に諮った上で使用されている。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。以上の様に、本研究課題において用いられた全ての臨床検体の収集は、インフォームドコンセントによる同意が得られている患者より提供されたものであり、また、全ての試料の使用については、検体収集機関および研究実施機関の各倫理審査委員会で承認されている。

また、組換えDNA実験、動物実験を行う場合には、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 (産業技術総合研究所の関連する倫理委員会は、「カルタヘナ法」あるいは「動物実験等の実施に関する基本指針」に準じている)。

## C. 研究結果

多施設多検体解析：肝疾患 (特に肝硬変) マーカー・WFA(+)-CSF1R および Total CSF1R の手動操作による簡易測定系 (マニュアル法によるサンドイッチ ELISA 系) を構築した。測定系の検討 (マニュアル測定での精度管理・プロトコルのブラッシュアップ) を進めた。当該の測定系では、1 検体あたり 2 連あるいは 3 連で測定しており、その (測定プレート間の) 精度管理としては Control 血清 (pool 血清) およびリコンビナント CSF1R タンパク質で評価している。C. V. 値が 10% 以内の誤差であれば、測定値を採用するものとした。

現在、より多検体を再現性良く測定するために、自動化を進めているところであるが、マーカー候補の臨床的有用性を明らかにするために、構築済みのマニュアル (手動) 操作による簡易測定系にて一部の臨床検体の測定を行うものとした。収集された臨床検体の一部 (大垣市民病院にて収集された約 800 検体) について、同測定系による WFA<sup>+</sup>-CSF1R のバリデーション試験を先行的に実施した。臨床検体を用いて、WFA(+)-CSF1R および Total CSF1R について測定した。発がんの診断時より 3 年前に遡った血清検体における 糖鎖マーカーの測定値より、WFA<sup>+</sup>-CSF1R/ total-CSF1R 比率値の発がん群 (vs 非発がん群) の AUC は 0.8379 (0.7756-0.8855) と、AFP など他のマーカーに比べて最も良好であることが明らかとなった。以上から、WFA<sup>+</sup>-CSF1R/ total-CSF1R の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。但し、マーカーの有効性について、より詳細に検体を分類して再検討する必要があると考えられたため、今後も検討を継続していく予定である。

## D. 考察

マーカー候補分子 WFA<sup>+</sup>-CSF1R 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を示した。その一方、臨床的な有用性については他の指標との比較を行うなど慎重な検討を必要とする。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のマーカー候補分子の臨床的有用性を明らかにする必要がある。

## E. 結論

新規肝疾患糖鎖バイオマーカー候補分子 WFA<sup>+</sup>-CSF1R は肝疾患（肝硬変あるいは高発がんリスク）患者のマーカーとしての可能性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 雄長誠、榎谷内晶：グライコプロテオミクス技術開発と医療への応用 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、医学のあゆみ、(2014年) 249 巻 8 号、661-665 ページ
- 2) Yamasaki K, Tateyama M, Abiru S, Komori A, Nagaoka S, Saeki A, Hashimoto S, Sasaki R, Bekki S, Kugiyama Y, Miyazoe Y, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Ocho M, Mizokami M, Narimatsu H, Yatsuhashi H. Elevated serum levels of WFA<sup>+</sup>-M2BP predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients. *Hepatology*. (2014) 60(5):1563-70. DOI: 10.1002/hep.27305.
- 3) Toshima T, Shirabe K, Ikegami T, Yoshizumi T, Kuno A, Togayachi A, Gotoh M, Narimatsu H, Korenaga M, Mizokami M, Nishie A, Aishima S, Maehara Y. A novel

serum marker, glycosylated *Wisteria floribunda*-positive Mac-2 binding protein (WFA<sup>+</sup>-M2BP), for assessing liver fibrosis. *J Gastroenterol*. (2015) 50(1):76-84. DOI: 10.1007/s00535-014-0946-y

- 4) Tamaki N, Kurosaki M, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Gotoh M, Nakakuki N, Takada H, Matsuda S, Hattori N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Mizokami M, Narimatsu H, Izumi N. *Wisteria floribunda* agglutinin positive human Mac-2-binding protein as a predictor of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res*. (2015) Jan 6. in press. DOI: 10.1111/hepr.12466.

### 2. 学会発表

- 1) 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 Virus Infection-associated Chronic Liver Disease. 2014 TASL-Japan Hepatitis B Workshop (Second). Taipei (Academia Sinica), 19-20 Apr. 2014.
- 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) 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

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

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

### Ⅲ. 学会等発表実績

## 学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目 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」

機関名 独立行政法人産業技術総合研究所

### 1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Glycoproteomic Discovery of Serological Biomarker for Hepatitis Virus Infection-associated Chronic Liver Disease (ポスター)	○Togayachi A, Ocho M, Kaji H, Kuno A, Iio E, Sogabe M, Tanaka Y, Ikehara Y, Mizokami M, Narimatsu H	2014 TASL-Japan Hepatitis B Workshop (Second) (Taipei, Taiwan)	2014年4月19日	海外
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 (ポスター)	○雄長 誠、 梅谷内 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	日本プロテオーム学会 2014 年会 (つくば)	2014年7月17日	国内

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
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（招待講演）	○梅谷内晶、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	日本プロテオーム学会 2014 年会（つくば）	2014 年 7 月 17 日	国内
組織標本を対象としたアレイ基盤グライコミクス～解析コンセプトと応用例～（招待講演）	○久野 敦、松田 厚志	日本プロテオーム学会 2014 年会（つくば）	2014 年 7 月 18 日	国内
Comprehensive identification of glycoproteins carrying Lewis x and site-specific glycan alteration in Fut9 knockout mice（ポスター）	○Noro E, Togayachi A, Sato T, Tomioka A, Fujita M, Sukegawa M, Suzuki N, Kaji H, Narimatsu H	HUPO2014 (Madrid, Spain)	2014 年 10 月 6 日	海外
Development and application of a method for the glycopeptide-based site-specific glycomic analysis（ポスター）	○Kaji H, Tomioka A, Noro E, Sogabe M, Sato T, Shikanai T, Narimatsu H	HUPO2014 (Madrid, Spain)	2014 年 10 月 7 日	海外



発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
ノダフジレクチンの遺伝子同定と糖鎖結合特異性解析（ポスター）	○佐藤 隆、 館野 浩章、 梶 裕之、千 葉 靖典、久 保田 智巳、 平林 淳、成 松 久	第 87 回日本生化学会 大会（京都）	2014 年 10 月 16 日	国内
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（依頼講演）	○久野 敦、 松田 厚志	第 87 回日本生化学会 大会（京都）	2014 年 10 月 18 日	国内
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～（ポスター）	○佐藤 隆、 館野 浩章、 梶 裕之、千 葉 靖典、久 保田 智巳、 平林 淳、成 松 久	第 14 回 LS-BT 合同研 究発表会（つくば）	2015 年 2 月 3 日	国内

## 2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
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)	雄長 誠、梅谷 内 晶	週刊 医学のあゆみ、 249 巻 8 号, 661-665	2014 年 5 月	国内
Differential Glycan Analysis of an Endogenous Glycoprotein: Toward Clinical Implementation-From Sample Pretreatment to Data Standardization	Kuno A, Matsuda A, Unno S, Tan B, Hirabayashi J, Narimatsu H	Methods Mol Biol. 2014;1200:265-85	2014 年 7 月	海外

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Elevated serum levels of WFA <sup>+</sup> -M2BP predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients	Yamasaki K, Tateyama M, Abiru S, Komori A, Nagaoka S, Saeki A, Hashimoto S, Sasaki R, Bekki S, Kugiyama Y, Miyazoe Y, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Ocho M, Mizokami M, Narimatsu H, Yatsunashi H	Hepatology. 2014 Nov;60(5):1563-70	2014年11月	海外
LecT-Hepa facilitates estimating treatment outcome during interferon therapy in chronic hepatitis C patients.	Zou X, Chi X, Pan Y, Du D, Sun H, Matsuda A, Li W, Kuno A, Zhang X, Narimatsu H, Niu J, Zhang Y	Clin Proteomics. 2014 Dec;11(1):44	2014年12月	海外

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
A novel serum marker, glycosylated <i>Wisteria floribunda</i> agglutinin-positive Mac-2 binding protein (WFA <sup>+</sup> -M2BP), for assessing liver fibrosis	Toshima T, Shirabe K, Ikegami T, Yoshizumi T, Kuno A, Togayachi A, Gotoh M, Narimatsu H, Korenaga M, Mizokami M, Nishie A, Aishima S, Maehara Y	J Gastroenterol. 2015 Jan;50(1):76-84	2015年1月	海外
<i>Wisteria floribunda</i> agglutinin positive human Mac-2-binding protein as a predictor of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients	Tamaki N, Kurosaki M, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Gotoh M, Nakakuki N, Takada H, Matsuda S, Hattori N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Mizokami M, Narimatsu H, Izumi N	Hepatol Res. 2015 Jan 6. in press	2015年1月 (in press)	海外

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Development and application of the lectin microarray.	Hirabayashi J, Kuno A, Tateno H.	“Topics in Current Chemistry: Sialoglyco-Biology and -Chemistry” , (editors)Schahn RG, Delannoy P, von Itzstein M, Springer. in press.	2015年 (in press)	海外
(仮) Large-scale identification of glycoproteins carrying Lewis x and site-specific glycan alterations in Fut9 knockout mice	Noro E, Togayachi A, Sato T, Tomioka A, Fujita M, Sukegawa M, Suzuki N, Kaji H, Narimatsu H	J. Proteome Research (2015)	Submitted	海外

## IV.研究成果の刊行物・別刷

## 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



雄長 誠(写真) 桐谷内 晶

Makoto Ocho and Akira TOGAYACHI

産業技術総合研究所糖鎖医工学研究センター(現・糖鎖創薬技術研究センター)標的糖鎖探索チーム

◎血清バイオマーカーは、被験者への侵襲性が低く、費用対効果が高いという優れた特性をもつ。しかし、優れた血清バイオマーカーを新しく発見・開発するのは一般的に非常に困難である。実際多くの研究者はいままで、プロテオミクス研究を応用して血清中のタンパク質の“量的変化”をとらえることでバイオマーカーを探索してきたが、実用化には多くの問題が山積していた。この状況を克服するために、“糖鎖バイオマーカー開発戦略”が提唱されている。これはグライコプロテオミクス技術を統合的に利用し、血清中の糖タンパク質の糖鎖構造の疾患状態に伴う“質的变化”をとらえてバイオマーカーを発見しようとする戦略である。著者らは最近、本戦略を用いて“肝硬変の進行を評価するための血清糖鎖バイオマーカー”を開発することに成功したので、本稿でその経緯を紹介する。



糖鎖バイオマーカー, 血清, グライコプロテオミクス, 肝硬変, CSF1R

バイオマーカー(biomarker)は、「生理反応や病気の進行、あるいは治療に対する薬理的な反応の指標として評価される項目」と定義されており、バイタルサイン(生命兆候)や生化学検査などの臨床検査値や画像診断データなどを含む<sup>1)</sup>。バイオマーカーは病気の診断だけでなく、個別化医療や効率的な医薬品開発にとって必要不可欠であるため、その開発研究は近年ますます活発化している。

そのなかでもとくに血清バイオマーカーは、被験者への侵襲性が低く、かつ費用対効果が高いという優れた特性があるため、もっとも開発が求められているもののひとつである。しかし、優れた血清バイオマーカーを新しく発見・開発するのは一般的に非常に困難とされており、「干し草のなかから針を見つける」とも表現されるほどである<sup>2)</sup>。実際多くの研究者はいままで、プロテオミクスを応用して、疾患の進行に伴って生じる血清

中のタンパク質の“量的変化”をとらえて血清バイオマーカーを発見しようとしてきた。しかし、疾患に対する特異性の低さなどが原因で、画期的なバイオマーカーの発見はきわめて困難な状況にあり、当初期待されていたほどの成果をあげていないのが現状である<sup>3)</sup>。このような状況のなか、近年とくに注目が高まっているのが糖鎖である。

糖鎖は細胞の“顔”と比喻されるように、細胞(組織)の種類の違いや病理的状态の違いを反映した非常に多様な構造を示すことが古くから知られてきた。血中を流れるタンパク質のほとんどが糖タンパク質であるといわれているが、それぞれの糖タンパク質は、由来する細胞ごとに糖鎖構造(glycan signature)がすこしずつ異なる。したがって、特定の糖タンパク質を修飾している病変部の細胞を反映する糖鎖構造をバイオマーカーとして利用することも可能であると考えられてい

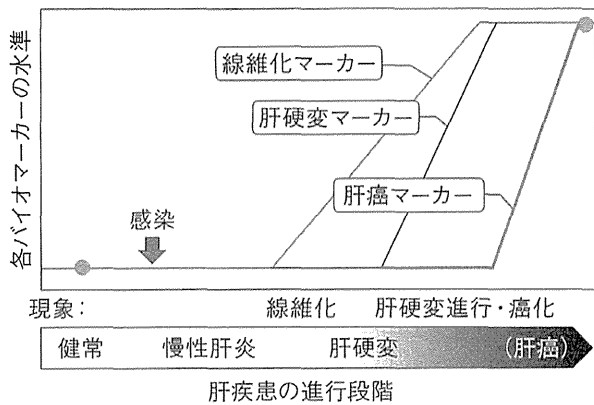


図 1 肝疾患の進行とバイオマーカー

る<sup>4)</sup>。著者らはこのような血中糖タンパク質を“血清糖鎖バイオマーカー”と定義してこれまで研究を進めている<sup>5)</sup>。実は古くから血清糖鎖バイオマーカーは臨床で利用されており、その一例が肝細胞癌マーカーとして利用されている $\alpha$ -fetoprotein L3分画(AFP-L3)である<sup>6)</sup>。AFP-L3は肝細胞癌マーカーであるAFPのレンズマメレクチン結合分画のことで、肝細胞癌に対する特異性が非常に高いので、しばしば偽陽性を示すAFPによる肝細胞癌診断を補助する目的で利用されている<sup>7)</sup>。このように、一般的に糖鎖バイオマーカーは疾患の特異的な診断に寄与すると考えられている。現在、世界中でグリコプロテオミクスを用いて新しい血清糖鎖バイオマーカーを発見・開発しようと試みられているが、糖鎖構造の複雑さや、その解析の難しさなどが原因となり、血清糖鎖バイオマーカーの開発はいぜんとして難しいのが現状であった<sup>8)</sup>。

このような状況のなか、著者の所属する(独)産業技術総合研究所では、従来からグリコプロテオミクス、糖鎖解析の技術開発を行ってきた。さらに近年、これらの技術を統合し、血清糖鎖バイオマーカーを系統立てて開発するための“血清糖鎖バイオマーカー開発戦略”を提唱している<sup>9)</sup>。著者らはこの開発戦略の実証研究を実施する過程で、新しい血清糖鎖バイオマーカーである *Wisteria floribunda* agglutinin(ノダフジ凝集素; WFA)-reactive colony stimulating factor 1 receptor(WFA 反応性マクロファージ刺激因子-1 受容体; WFA<sup>+</sup>-CSF1R)の開発に成功した。そ

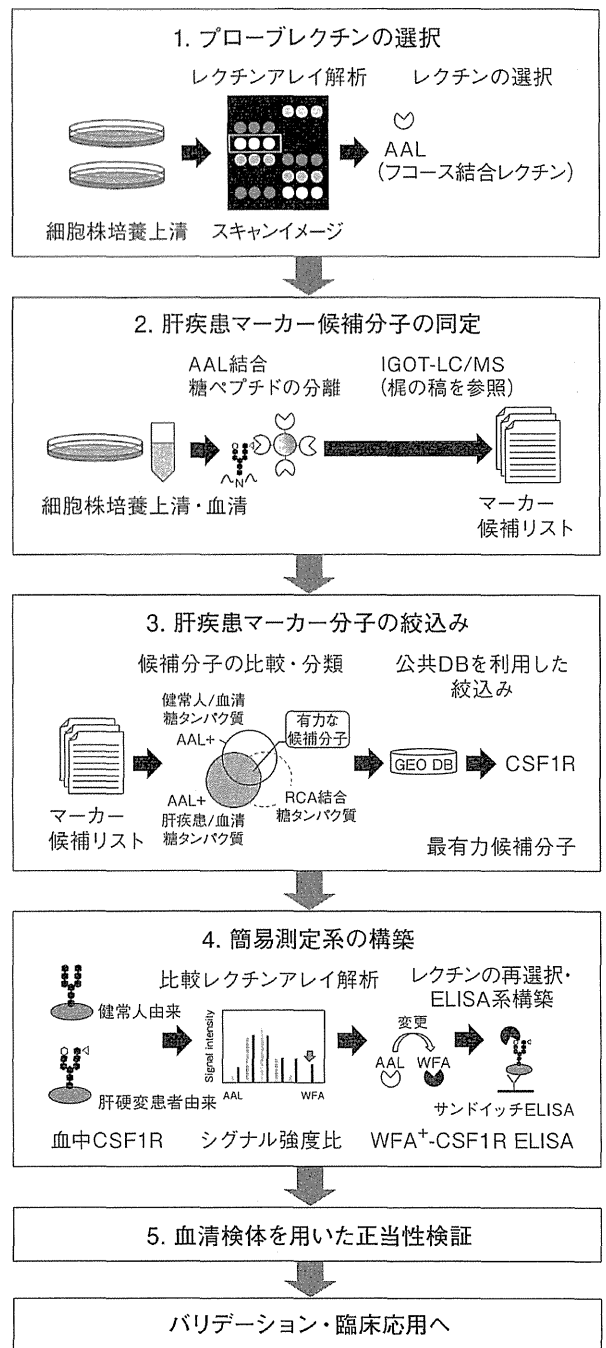


図 2 肝疾患血清糖鎖バイオマーカーの開発までの流れ

して正当性試験の結果、本血清糖鎖バイオマーカーは肝硬変を評価するための有効な指標であるとの結果が示された<sup>10,11)</sup>。以下に、著者らが行った血清糖鎖バイオマーカー開発までの経緯を紹介する。それぞれの項目は図 1, 2 に対応しているので、参照していただきたい。

### 肝疾患の進行とバイオマーカー

まず、マーカー開発の対象疾患を C 型慢性肝炎

に設定した。C型慢性肝炎は臨床的経過が比較的明らかになっている疾患であるからである。C型慢性肝疾患患者の場合、C型肝炎ウイルスの感染から数十年かけて肝線維化が進行し、最終的に肝硬変に至る。さらに、肝硬変になると年率5~8%という高率で肝癌を発症する<sup>12)</sup>。これらそれぞれのフェーズにおいて線維化や肝硬変、肝細胞癌を診断するための血清バイオマーカー開発が必要とされている。C型慢性肝炎から肝癌を発症した患者は、肝硬変を背景疾患にもつ場合が多い。したがって、こういった患者の血清では健常人と比べて線維化・肝硬変・肝癌マーカーなど、種々の血清バイオマーカーが軒並み上昇しているものと考えられる。

### 1. プロブレクチンの選択

血清の微量成分を標的とした疾患を評価するための血清バイオマーカー探索で重要なことは、大量に存在する主要な血清成分を除去することである。そのためにはまず、血中タンパク質のなかから肝疾患に由来する糖タンパク質をエンリッチメントする必要がある<sup>4)</sup>。エンリッチメントのためのプローブ(肝疾患糖鎖プローブ)としては、糖鎖を特異的に認識して結合するタンパク質であるレクチンが有用なツールとなる。しかし、レクチンにはさまざまな種類が存在し、その種類ごとに認識する糖鎖構造の特異性やその親和力が異なる。したがって、無数に存在するレクチンのなかから、肝疾患由来の糖タンパク質を捕集するために用いるレクチンを選択するのは容易ではない。

このプローブ選択を簡便かつ再現性高く行うことを可能にしたのが、エバネッセント波励起蛍光法の検出原理に基づくレクチンアレイシステム(レクチンアレイ)であった<sup>13)</sup>。本システムを利用して肝疾患の病変部で異所的に亢進している糖鎖変化を見出すために、高分化型肝癌細胞株であるHuH7、HepG2の分泌糖タンパク質(糖鎖セクレトーム)のアレイ解析を行った。その結果、肝細胞由来のセクレトームは、フコース結合レクチンである *Aleuria aurantia* lectin (AAL) にとくによく結合することが明らかになった。肝疾患(とくに肝癌)では糖鎖のフコシル化の亢進が知られており、今回の結果はそれらの知見と合致してい

た<sup>14)</sup>。

### 2. 肝疾患マーカー候補分子の同定

つぎに、“肝疾患糖鎖プローブ”であるAALを用い、IGOT-LC/MS法(本特集・梶の稿を参照)によって肝疾患血清糖鎖バイオマーカー候補分子を網羅的に同定した<sup>10)</sup>。同定した分子のなかから目的の分子を絞り込むので、この段階でできるかぎり多くの分子を同定することが重要である。

方法を簡単に述べると、①まず肝癌細胞株と肝癌患者(背景肝疾患は肝硬変)の血清中の糖タンパク質をプロテアーゼで分解した後、②親水性相互作用クロマトグラフィ(HILIC)を用いて、(糖)ペプチドを分離する。③つぎに分離した(糖)ペプチドのなかから、AALアフィニティークロマトグラフィによってAAL結合性糖ペプチドを分離し、④AAL結合性糖ペプチドをIGOT法によって標識した後に、⑤LC/MSでペプチド配列を決定し、糖タンパク質の同定を行った。

以上の方法で744分子もの肝疾患血清糖鎖バイオマーカーの候補分子を同定することができた。さらに検出したペプチドを調べてみると、ほとんどのペプチドがN-結合型糖鎖の付加部位を有していた。また、抗体を用いた方法でも同定した候補分子のAALへの結合性が確認できた。これらの結果は、本手法の高い網羅性と特異性を示している。上記のように同定した744種類の候補分子は398種類の遺伝子シンボルに相当していた。そのうち、80種類はすでにフコシル化について報告されていたので、これらを除き、318種類の新規候補分子を選び出した。一方、糖タンパク質の血中量や糖鎖付加部位の数を反映すると考えられる *Ricinus communis* agglutinin I (RCA120) 用いたIGOT-LC/MS解析により候補分子を同定し、AALで同定した候補分子と比較した。AALとRCA120を用いた方法で、どちらからも同定された候補分子は53種類であった。糖タンパク質の血中量や糖鎖付加部位の数が多いこれらの候補分子は、有用な血清バイオマーカーとなる可能性が高いと考えられた。

### 3. 肝疾患マーカー分子の絞り込み

上述した53種類の候補分子のなかには、肝疾患患者血清や肝癌細胞の培養上清から同定したため線



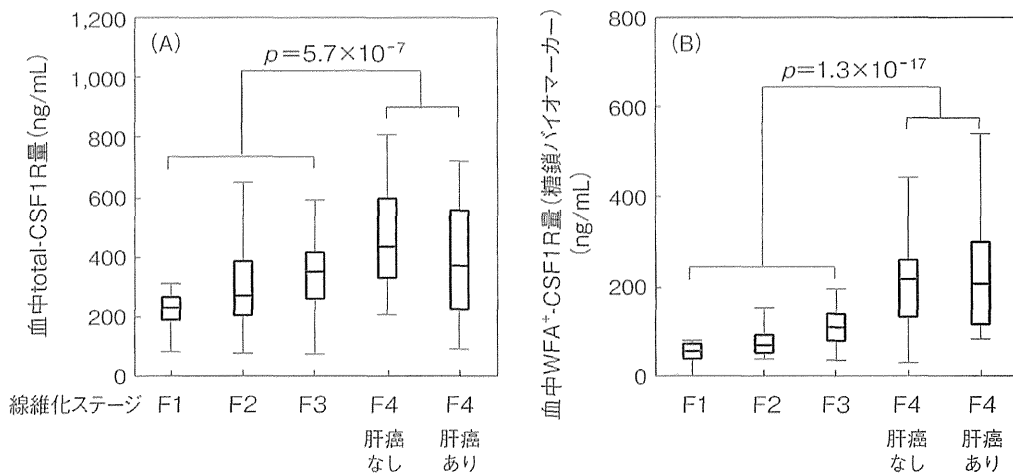


図 3 肝疾患患者間でのマーカー値の比較解析

A: 慢性肝疾患の進行と CSF1R の血中量との関係。

B: 慢性肝疾患の進行と WFA 結合性 CSF1R (WFA<sup>+</sup>-CSF1R) の血中量との関係。

A では慢性肝炎患者群 (F1~F3) と肝硬変患者群 (F4 肝癌あり/なし) との間で有意差 ( $p=5.7 \times 10^{-7}$ ) があることを示している。一方, B でも有意差 ( $p=1.3 \times 10^{-17}$ ) がみられるが, A よりも顕著である。線維化ステージは新犬山分類に従っている。

維化・肝硬変・肝癌マーカーが混在していると考えられる。このなかでも肝硬変の進行評価はとくに臨床ニーズが満たされていないので、肝硬変を評価するためのマーカーを絞り込むこととした。肝硬変マーカーの絞り込みには公共データベース (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) の遺伝子発現解析データを利用した。その結果、CSF1R をもっとも有力な候補分子として選び出すことができた。CSF1R は単球系の細胞の分化に必須な colony stimulating factor 1 (CSF1) のレセプターであり、肝ではおもに kuppfer 細胞を含む単球系の細胞で発現していることが知られている<sup>15)</sup>。CSF1R は細胞外メタロプロテアーゼによって細胞外ドメインが切り出されることが知られており、血中 CSF1R は切り出された細胞外ドメインであると考えられる<sup>16)</sup>。このように、候補分子の数を効率よく絞り込むことができたのは、近年のデータベース情報が急速に充実したためであると考えられる。

#### 4. 簡易測定系の構築

血清糖鎖バイオマーカーの簡易測定系として、レクチンと抗体によるサンドイッチ ELISA 系 (レクチンサンドイッチ ELISA) を想定した。しかも血清の前処理なしで測定ができ、S/N (signal/noise) 比も高い系が理想的である。しかし、AAL

を糖鎖プローブとして用いた場合、血中の抗体をはじめとするフコシル化糖タンパク質が AAL と肝疾患性糖鎖との選択的な結合を競合阻害することが原因となり、S/N 比が低下すると推測された。したがって、レクチンサンドイッチ ELISA 系を構築する際には、AAL からフコース以外の糖鎖に結合するレクチンにスイッチしたほうがより望ましいと思われた。そこで、健常人と肝硬変患者の血清からエンリッチメントした CSF1R をレクチンアレイに供し、それぞれのレクチンとの結合シグナルを比較することで、もっとも妥当な糖鎖プローブを再度探した。

結果として AAL よりもより良いものとして、WFA が選択されてきたので、WFA を用いたレクチンサンドイッチ ELISA 系を構築した。本レクチンサンドイッチ ELISA 系を用いることで、高い S/N 比が得られ、血中 WFA<sup>+</sup>-CSF1R の定量解析が可能となった。

このように、候補分子の同定の際に用いるレクチンと、最終的な検出系で用いるレクチンを変更することによって、より実用に近い血清糖鎖バイオマーカー検出系の開発が可能となる。このようなレクチンのスイッチについては以前、久野らによって報告されているが<sup>17)</sup>、今回の血清糖鎖バイオマーカーの検出系開発においても非常に効果的

であることが改めて示された。

### 5. 血清検体を用いた正当性検証

WFA<sup>+</sup>-CSF1R が肝硬変の発症・進行を評価するためのマーカーであることを確かめるため、C型肝炎ウイルス慢性患者 141 名の血中 WFA<sup>+</sup>-CSF1R 量と CSF1R 量 (total-CSF1R) を測定し、それぞれ肝疾患の進行との関係を調べた。その結果、図 3 に示すように、血中 WFA<sup>+</sup>-CSF1R 量は慢性肝疾患の進行に伴って増加しており、とくに肝硬変 (F4) において顕著に増加することが明らかになった。一方で total-CSF1R 量も測定したところ、慢性肝疾患の進行に伴い増加するものの、WFA<sup>+</sup>-CSF1R 量と比べると顕著な増加ではないことが明らかになった。このようにして、著者らは肝硬変血清糖鎖バイオマーカーの開発を行うことに成功した。

ちなみに現在、臨床的解析によって代償性肝硬変患者であっても、WFA<sup>+</sup>-CSF1R の水準が高い場合は有意に生存予後が悪いことや、WFA<sup>+</sup>-CSF1R が超早期発症予測マーカーになりうることなどが明らかになりつつある。これらの結果は、血清糖鎖バイオマーカー開発戦略全体の正当性を支持している。

### 課題と今後の展開

今後は、発見した血清糖鎖バイオマーカーの実用化へ向けて、測定自動化や多施設研究による大規模なバリデーション研究などの開発課題をひとつひとつ解決していく必要がある。当センターではすでに肝線維化の血清糖鎖バイオマーカーの実用化に成功しているので (本特集、久野「肝線維化の進展を定量的に判断するための糖鎖バイオマーカーの実用化」の稿参照)、そのノウハウを生かした課題解決を進めていきたいと考えている<sup>18)</sup>。一方で、治療が及ぼす WFA<sup>+</sup>-CSF1R 値の変動、肝硬変において WFA<sup>+</sup>-CSF1R が血中に分泌されるメカニズム、その糖鎖構造・機能の詳細を明らかにすることで、肝硬変の進行と血中 WFA<sup>+</sup>-CSF1R 値の上昇との因果関係を明らかにしていくことも重要な課題である。

### おわりに

これまでも血清糖鎖バイオマーカー開発に向けたグライコプロテオミクス研究が行われてきた。とくに、近年の質量分析計やアレイシステムを用いた血清糖鎖バイオマーカー開発手法の進歩はめざましい。たとえば、多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring: MRM) による血清糖ペプチドの定量分析法は、これまで行ってきたような、抗体の性能に依存した探索手法の問題点を解決する可能性がある。今回の研究で、いくつかの優れた技術を補完的に利用することにより、血清糖鎖バイオマーカー開発が可能であることが明らかになった。ただし今後、さらに血清糖鎖バイオマーカー開発の効率化をめざすためには、われわれの各要素技術に磨きをかけるだけでなく、あらたな探索手法や定量分析技術を確立し、それらの技術を統合して開発を進めることがポイントであろう。このようにいくつか改善の余地が残されてはいるが、本研究は以前提唱した開発戦略による糖鎖バイオマーカー開発の第一歩になったのではないかと思う。

### 文献

- 1) Hulka, B. S.: *Biological Markers in Epidemiology* (ed. by Hulka, B. S. et al.). Oxford Univ. Press, New York, 1990, pp.3-15.
- 2) Ludwig, J. A. et al.: *Nat. Rev. Cancer*, **5**: 845-856, 2005.
- 3) Rifai, N. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **8**: 971-983, 2006.
- 4) 梶 裕之・他: 臨床糖鎖バイオマーカーの開発—糖鎖機能の解明とその応用 (成松久監). メディカルドゥ, 2008, pp.73-80.
- 5) 成松 久: 臨床糖鎖バイオマーカーの開発—糖鎖機能の解明とその応用 (成松 久監). メディカルドゥ, 2008, pp.27-31.
- 6) Aoyagi, Y. et al.: *Cancer*, **83**: 2076-2082, 1998.
- 7) 望月 圭: 肝炎診療バイブル (三田英二, 加藤道夫監). メディカ出版, 2009, pp.238-245.
- 8) Ruhaak, L. R. et al.: *Mol. Cell Proteomics*, **12**: 846-855, 2013.
- 9) Narimatsu, H. et al.: *FEBS J.*, **277**: 95-105, 2010.
- 10) Kaji, H. et al.: *J. Proteome Res.*, **12**: 2630-2640, 2013.
- 11) Ocho, M. et al.: *J. Proteome Res.*, 2014. (in press)
- 12) Kudo, M. et al.: *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **40**: 19-27, 2010.
- 13) Kuno, A. et al.: *Nat. Methods*, **2**: 851-856, 2005.
- 14) Comunale, M. A. et al.: *PLoS One*, **5**: e12419, 2010.
- 15) Stanley, E. R. et al.: *Mol. Reprod. Dev.*, **46**: 4-10, 1997.
- 16) Downing, J. R. et al.: *Mol. Cell Biol.*, **9**: 2890-2896, 1989.
- 17) Kuno, A. et al.: *Clin. Chem.*, **57**: 48-56, 2011.
- 18) Kuno, A. et al.: *Sci. Rep.*, **3**: 1065, 2013.

## Differential Glycan Analysis of an Endogenous Glycoprotein: Toward Clinical Implementation—From Sample Pretreatment to Data Standardization

Atsushi Kuno, Atsushi Matsuda, Sachiko Unno, Binbin Tan, Jun Hirabayashi, and Hisashi Narimatsu

### Abstract

There are huge numbers of clinical specimens being stored that contain potential diagnostic marker molecules buried by the coexistence of high-abundance proteins. To utilize such valuable stocks efficiently, we must develop appropriate techniques to verify the molecules. Glycoproteins with disease-related glycosylation changes are a group of useful molecules that have long been recognized, but their application is not fully implemented. The technology for comparative analysis of such glycoproteins in biological specimens has tended to be left behind, which often leads to loss of useful information without it being recognized. In this chapter, we feature antibody-assisted lectin profiling employing antibody-overlay lectin microarray, the most suitable technology for comparative glycoanalysis of a trace amount of glycoproteins contained in biological specimens. We believe that sharing this detailed protocol will accelerate the glycoproteomics-based discovery of glyco-biomarkers that has attracted recent attention; simultaneously, it will increase the value of clinical specimens as a gold mine of information that has yet to be exploited.

**Key words** Glycoprotein, Glycan analysis, Lectin microarray, Clinical specimen, Biomarker

---

### 1 Introduction

It is evident that almost all secreted proteins are glycosylated via the glycosynthetic pathway in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. Because this glycosylation is characteristic of the extent of cell differentiation and the state of the cell, i.e., the origin of the tissue, its developmental stage, and the presence of malignancy, blood glycoproteins consist of a mixture of heterogeneous molecules derived from many origins [1, 2]. Thus, glycoproteins that are present in serum and that exhibit cancer-associated changes in glycosylation (glyco-alteration) have potential as biomarkers (glyco-biomarkers) for cancer diagnosis. Owing to the rapid advances in glycomics/glycoproteomics technologies, numerous glycoproteins

have now been identified as candidate glyco-biomarkers. These glyco-biomarkers have been attracting a great deal of attention in the “discovery phase” [3, 4], and are expected to move toward clinical implementation by a process similar to that followed for alpha-fetoprotein (AFP). In the early 1990s, increased fucosylation of complex-type *N*-glycans was detected in some glycoproteins from hepatocellular carcinoma (HCC) patients [5]. More than 30 % of all AFP glycoforms were found to react to a fucose-binding lectin, *Lens culinaris* agglutinin (LCA). This fraction, designated as AFP-L3, was subsequently approved by the US FDA in 2005 as the first glycoprotein biomarker. Such a scenario is the ideal for identification of subsequent candidate molecules; however, it requires a systematic verification procedure for selection of the most appropriate candidate from hundreds identified in the preceding discovery phase. The lack of such a system has been a major obstacle in the mass spectrometry-based development of glyco-biomarkers.

Lectin microarray is a twenty-first century technology for glycan analysis of proteins [6]. Although the early developments of the methodology focused on high-sensitivity analysis of the microheterogeneity of glycan structures on a target glycoprotein [7–9], the majority of its applications seem to have shifted to the comparative glycome analysis of crude samples, e.g., cultured cells [10–13], bacteria [14, 15], and viruses [16]. We note that direct labeling is mostly used as the detection principle, in which more than 100 ng of the glycoprotein is usually needed prior to Cy3 labeling to assure highly practical and reproducible analysis (although the analysis itself can be satisfactorily performed with even 1 ng of the analyte sample). This is clearly a serious disadvantage for the analysis of less available endogenous glycoproteins, e.g., those contained in clinical samples. To overcome this problem, antibody-overlay lectin microarray was developed as an alternative approach to detecting specific interactions between a target glycoprotein (analyte) and multiple lectins immobilized on a microarray. This is achieved with the aid of antibodies raised against the “core protein” moiety [17]. In addition, the only pretreatment or prior processing required with the use of a specific antibody (either polyclonal or monoclonal) is immunoprecipitation. This extreme simplicity allows us to analyze sub-picogram (nanogram) amounts of a target glycoprotein preparation by means of lectin microarray, with a much greater throughput. In fact, this technical modification of the lectin microarray was made specifically for glyco-biomarker verification [18], and enables high-throughput glycan analysis of over a hundred clinical samples targeting a particular candidate glycoprotein [19, 20]. However, despite the attention it has attracted, the use of this verification method has not been sufficiently popularized in the field of glyco-biomarker development. This can be demonstrated by the fact that there are few studies concerning glyco-biomarkers except those published by a small