

**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
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
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セクションにより切り出した 1mm^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関連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⁺-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、病態特異的变化(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が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) 肝がんの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に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 μm 厚薄切組織を作製して、ホイールコートスラ

イドヘマウントした。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 1mm² 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、一晩保温した。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 度で 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 度で 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至適化するために、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 80mm²、5um 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, 25mm² 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。25mm² では約 550 種の糖ペプチドが同定でき、1mm² 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 1mm² 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リエーション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 1mm² 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 1 mm² 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