

新規糖鎖腫瘍マーカー群の開発と臨床応用

大阪国際がんセンター研究所 分子生物学部
半澤 健

1.緒言

癌患者の生存率や Quality of Life は、発見の早期化や治療法の進歩等により徐々に改善している。しかし、癌は早期発見が困難なもの、有効な治療法がないものも多く、未だに死に至ることが多い難病である。癌の診断、治療効果判定、経過観察には画像診断の他に、腫瘍マーカー値に基づいた血清診断が利用されている。腫瘍マーカーは広く利用されているものの、決して十分ではなく、既存のマーカーの上昇が認められない患者も少なくないため、現在でも診断精度の向上のためにさらなる腫瘍マーカーの探索と検出方法の開発が求められている。

糖鎖は主にタンパク質や脂質に付加された複合糖質の形態で細胞表面などに存在し、様々な生命現象に関与する。さらに多くの疾患の病因、病態にも関与している。癌に関しては、転移や浸潤に深く関与することが知られていると共に、腫瘍マーカーとしても広く利用されている（例：CA19-9、SLX、STN など）。

糖鎖には他の分子に結合していない、遊離糖鎖（遊離オリゴ糖）として存在するものもある。そして、癌組織には正常組織と比較して多量の酸性遊離糖鎖が異常蓄積されていることが以前に報告されている^{1),2)}。しかし、癌と遊離糖鎖に関する研究はほとんど進められていない。癌患者において特異的に増加する遊離糖鎖を検出することができれば、腫瘍マーカーとして利用できる可能性がある（図 1）。ところで、疾患と遊離糖鎖が関連する例としては先天性糖鎖代謝異常症が挙げられる。その患者においては尿中の遊離糖鎖成分に変化が見られることが古くから知られている。これらの背景をふまえ、癌患者の尿中の遊離糖鎖を解析することにより、新規かつ非侵襲的に検出可能な腫瘍マーカーの発見が期待できると考えられた。

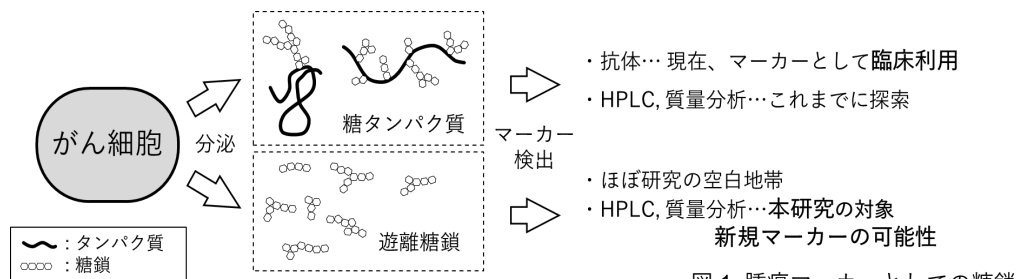


図 1. 腫瘍マーカーとしての糖鎖

2.方法

実験のワークフローイメージを図2に示す。膀胱癌・胃癌・肺癌患者および健常者コントロール（非担癌者）から得られた尿検体を出発試料とし、使用する尿の量はそのクレアチニン濃度を基準として補正を行った。陽イオン交換樹脂とグラファイトカーボン固相カートリッジにより尿試料の前精製を行い、遊離糖鎖を2-アミノピリジンとの還元的アミノ化により特異的に標識（PA化）した。その後は、以前

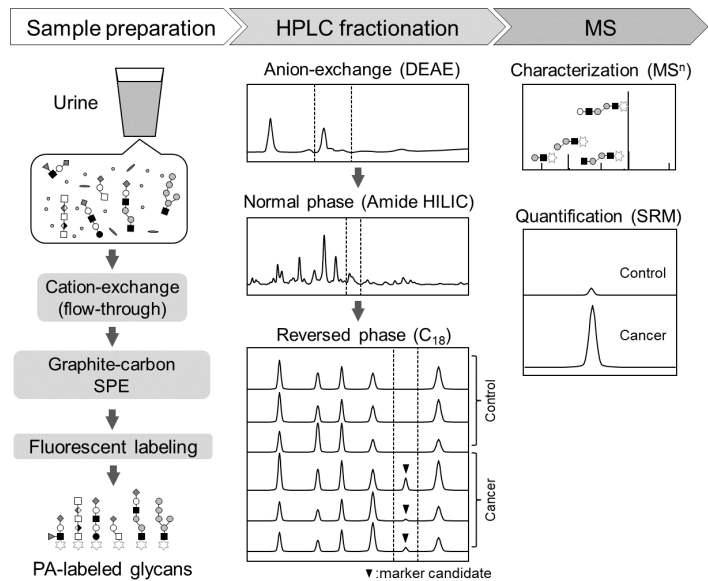


図2. がん患者の尿中遊離糖鎖マーカー探索のワークフローイメージ

に糖タンパク質糖鎖のマーカー探索において確立された手法に基づいて、遊離糖鎖分析を行った^{3),4)}。陰イオン交換、順相および逆相の多段階の高速液体クロマトグラフィー

(HPLC)によりPA化遊離糖鎖の分離を行った。糖鎖の構造（定性）分析は、各HPLCにおける標準化溶出位置（2次元HPLCマッピング法）、イオントラップ型質量分析装置におけるフラグメントパターン解析、酵素あるいは酸による加溶媒分解を組合せることにより行った。糖鎖の逆相HPLCにおける蛍光ピークをがん患者と健常者間で比較することで増加した糖鎖を見つけ出し、その糖鎖を腫瘍マーカー候補とした。そして、そのマーカー候補糖鎖を含む画分をトリプル四重極質量分析装置を使った選択反応モニタリング（SRM）による定量解析を行った⁵⁾。

3.結果

尿の遊離糖鎖分析にあたって、一つの大きな課題は、個人差が多く現れる尿検体から安定して糖鎖を回収し、検体間で比較することが出来るのかという点であった。これに関しては尿中クレアチニン濃度を基準とすることで遊離糖鎖の濃度がほぼ一定となることが確認できた。また、陽イオン交換樹脂とグラファイトカーボンによる前処理は糖鎖の安定した回収に必須であった。尿に含まれる遊離糖鎖の種類は非常に多く、一括した糖鎖解析は困難であった。そのため、今回は以前に癌組織中における蓄積が報告されている酸性糖鎖でかつ分子量500~2,000の範囲の比較的小さい糖鎖に焦点を当てて分析を進めた。

HPLCで糖鎖を分離した結果、一部の癌患者において増大するピークの存在が認められた。変化の見られた逆相HPLC蛍光クロマトグラムの一部を図3に示す。蛍光検出は簡便ではあるものの、感度が低いことに加え一部のピークが分離できずに重なってしまうため

定量性が低いという問題があった。そこで、より感度の高い検体間の比較を SRM により行った。結果として、一部の膵癌・胃癌患者において、特異的な増加傾向を示す糖鎖が見つかった。一方で、肺癌患者では目立った変化が認められなかった。また、それぞれのピークに含まれる糖鎖の構造解析に加え、増加傾向が見られた主な遊離糖鎖は、 $\text{Man}\alpha 1-3/6\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ コアを含む *N*-結合型糖鎖断片、ラクトース ($\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$) および *N*-アセチルラクトサミン ($\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$) をコアとして伸長された糖鎖のグループに大きく分けられた。これらの糖鎖は酸性基としてシアル酸および/または硫酸エステルを有していた。また、ルイス X/A 構造に関連したフコース修飾も頻繁に見られた。その中には腫瘍マーカー CA19-9 の実体とされる構造、シアリルルイス A ($\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{GlcNAc-R}$) を含む糖鎖も見られ、一部の膵がん患者において上昇が見られた (図 4)。

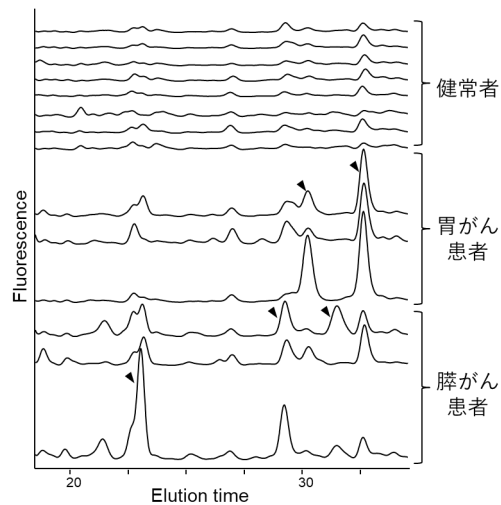


図3.がん患者の尿における遊離糖鎖変化
健康者、胃がんおよび膵がん患者の尿中遊離糖鎖の精製画分の一部のHPLC蛍光クロマトグラムを示す。
▼はがん患者において特に増加する糖鎖を示す。

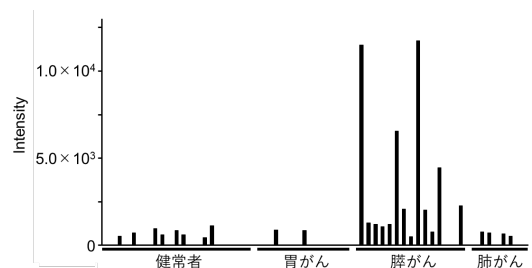


図4. シアリルルイスAを有する遊離糖鎖のSRM解析

4.考察

今回の研究で分析対象としたのは尿中遊離糖鎖のうち一部の比較的小さな糖鎖群であったが、そのような糖鎖であっても、癌患者において増加傾向が見られる構造が検出された。今後、より大きな構造に対象を広げ糖鎖の分枝、伸長および修飾構造に着目して解析を進めていくことで、より特異性の高い腫瘍マーカー糖鎖が見つかると考えられる。

産生される遊離糖鎖はその細胞・組織の代謝の状態を反映していると考えられている。遊離糖鎖の主要成分としてラクトースを基本構造としたものが多く見られた。ラクトース構造は母乳に多く含まれる遊離糖鎖として知られている。母乳中のラクトースは $\beta 4$ -ガラクトース転移酵素-1 と α -ラクトアルブミンが複合体を形成することで産生されることが知られている。しかし、癌患者におけるラクトース産生量の増加がどのように起こっているのは明らかにされていない。類似した *N*-アセチルラクトサミンも同様に増加傾向が見られたため、何らかの $\beta 4$ -ガラクトース転移酵素が関与している可能性がある。また、癌患者において増加が見られた別の糖鎖構造群である遊離型の *N*-結合型糖鎖であるが、こちらの生成機構の可能性の一つとしては、オートファジー機構の破綻による遊離 *N*-結合型糖鎖の異

常蓄積との関連が挙げられる⁶⁾。腫瘍マーカーとなり得る糖鎖の生成機構の解明は、癌と糖鎖の関連を理解する助けとなるかもしれない。

5.結語

今回の研究では、癌患者の尿中遊離糖鎖に着目した腫瘍マーカーの開発を開始し、実際に遊離糖鎖が腫瘍マーカーとなり得た。現在、尿中糖鎖の抽出、構造解析および定量解析に関する論文を作成中である（2020年11月時点において受理済み⁷⁾。今後、より広い範囲で糖鎖の探索を続けるとともに多検体解析・統計処理を行い、見つかった糖鎖が腫瘍マーカーとして有用であるかの判定へと進めていく予定である。糖鎖抽出・検出条件にはまだ改良の余地がある。将来的には検出の高感度化と分析時間の短縮を進めた上で、臨床的に有用と判断された多数の糖鎖腫瘍マーカー群を、一度に測定する（マルチプレックス解析）方法を確立し、臨床への応用を目指す。これらの取り組みは、癌の発見、治療効果の判定や再発の予測等に、広く役立つ可能性がある。

6.文献

- 1) Yabu M, Korekane H, Takahashi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Miyamoto Y. Accumulation of free Neu5Ac-containing complex-type *N*-glycans in human pancreatic cancers. *Glycoconj J.* (2013) 30:247–256.
- 2) Yabu M, Korekane H, Hatano K, et al. Occurrence of free deaminoneuraminic acid (KDN)-containing complex-type *N*-glycans in human prostate cancers. *Glycobiology.* (2013) 23:634–642.
- 3) Tanaka-Okamoto M, Mukai M, Takahashi H, Fujiwara Y, Ohue M, Miyamoto Y. Various sulfated carbohydrate tumor marker candidates identified by focused glycomic analyses. *Glycobiology.* (2017) 27:400–415.
- 4) Tanaka-Okamoto M, Hanzawa K, Mukai M, Takahashi H, Ohue M, Miyamoto Y. Identification of internally sialylated carbohydrate tumor marker candidates, including Sda/CAD antigens, by focused glycomic analyses utilizing the substrate specificity of neuraminidase. *Glycobiology.* (2018) 28:247–260.
- 5) Tanaka-Okamoto M, Hanzawa K, Mukai M, Takahashi H, Ohue M, Miyamoto Y. Correlation of serum sialyl Tn antigen values determined by immunoassay and SRM based method. *Anal Biochem.* (2018) 544:42–48.
- 6) Seino J, Wang L, Harada Y, et al. Basal autophagy is required for the efficient catabolism of sialyloligosaccharides. *J Biol Chem.* (2013) 288:26898–26907.
- 7) Hanzawa K, Tanaka-Okamoto M, Murakami H, Mukai M, Takahashi H, Omori T, Ikezawa K, Ohkawa K, Ohue M, Miyamoto Y. Investigation of acidic free-glycans in urine and their alteration in cancer. *Glycobiology.* (2020) cwaa100. doi: 10.1093/glycob/cwaa100. Epub ahead of print.