

# グライコプロテオミクスを基盤とした血清糖鎖バイオマーカー開発と実用化

## Application of the Glycoproteomics-based Strategy for Development of Serum Glycobiomarkers

梅谷内 晶  
Akira Togayachi

### 1. 研究背景と目的

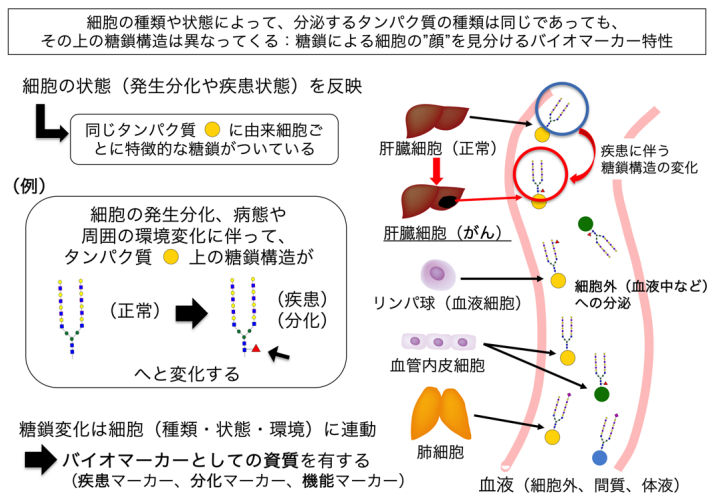
疾患バイオマーカーは、疾患の早期診断、組織型の診断、病態・進行のモニタリング、治療の方針決定や効果判定、再発の検出、創薬 (コンパニオン診断薬)、標的探索などの指標として利用されており、臨床において非常に重要なツールである。従来、タンパク質バイオマーカーの開発では、定量的なプロテオーム解析による網羅的探索のアプローチ、すなわち量的な変動を伴うタンパク質の検出が広く利用されている。

一方で、糖鎖の構造は種々の細胞状態を反映して変化し、数多くの機能を果たしていると考えられてきた。基盤的リソースや解析技術の開発が進んでいなかったこともあり、産業利用されている例も決して多くはない。しかしながら、糖鎖抗原が既存の多くの腫瘍マーカーや細胞分化マーカーとして利用されていることは良く知られている。糖鎖科学の観点からみたバイオマーカー開発の戦略は、従来のタンパク質の量的変動を中心に見るのではなく、特定のタンパク質上の糖鎖構造変化を質的に捉えることにより、新たなバイオマーカーを探索・開発するものである (図1)。そこで、疾患 (特に腫瘍) に伴う糖タンパク質上の糖鎖構造変化を指標として、

バイオマーカーを系統的に開発する戦略が考案 (Narimatsu et al. 2010)され、探索と検証が行われている。その大まかな流れを図2に示す。現在までに、(1) 疾患に伴って変動する糖鎖構造の予測・検出と捕集プローブの選択、(2) それらの糖鎖構造を持つキャリア糖タンパク質の同定 (3) キャリア糖タンパク質上の糖鎖構造変化の確認 (4) 検証・検査システムの確立、の戦略と技術解析法によって、様々な疾患に対する糖鎖バイオマーカー候補分子群の解析が進められている (Ocho et al. 2014, Togayachi et al. 2017)。

ここでは卵巣明細胞がんの糖鎖バイオマーカー開発、ならびに検査系の構築と有効性検証について御紹介する。卵巣がんは通常は無症状であることから、診断時には既に進行期であることが多く、予後も悪いことが知られている。卵巣がんのうち、近年日本で増加傾向にある卵巣明細胞がんは抗がん剤抵抗性であり、特に進行期の予後は他の組織型の卵巣がんよりも悪いとされている。内膜症性嚢胞の明細胞がんへのがん化は世界の中ではアジア人に多く、その中でも特に日本人に多いことが知られている。現在広く使われている既存の卵巣がんマーカーであるCA125は炎症性の偽陽性に加え、明細胞がんに対する偽陰性の頻度が高いため、現在の臨床の状況を鑑みると、より信頼性のある新たなマーカーが必要だと考えられる。

図1 糖鎖分子のバイオマーカーとしての利用



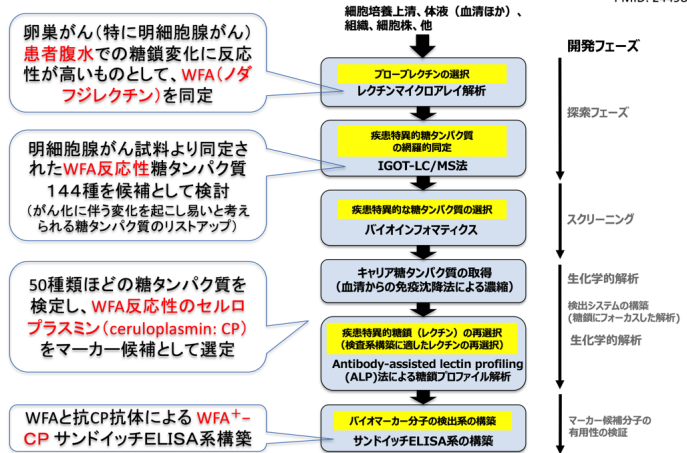
## 2. 研究結果

### 2.1. 先行研究について

詳細については紙面の関係上、割愛するが、先行研究(図2)では卵巣がん患者の腹水から、WFAというレクチンが認識する糖鎖構造が明細細胞腺がんを中心とする卵巣がんに特徴的に発現していることを同定した(Sogabe et al. 2014)。さらに卵巣がん患者の腹腔洗浄液のグライコプロテオミクス解析によって、卵巣がんの特異性を示すマーカー分子として、WFAレクチン反応性のセルロプラスミン(CP)分子を同定し、報告している(Sogabe et al. 2014)。以降はこの分子をWFA<sup>+</sup>-CPと省略する。ここでは、糖鎖変化を示す糖タンパク質の同定から、最終的にWFA<sup>+</sup>-CPを卵巣がんマーカー候補として選抜した。WFA<sup>+</sup>-CP分子を測定するための、手動によるサンドイッチELISA検出系を構築し、患者腹水を用いて測定を行った。その結果、WFA<sup>+</sup>-CPは明細細胞腺がんでは有意に高値を示し、明細細胞腺がんを背景疾患から鑑別できる可能性が示唆された。しかしながら、これらは腹水サンプルで検討されたデータであり、将来の臨床での実用化を考慮すると、血清サンプルでの検討が必要であるため、本研究では血清での検出と測定系の自動化を進めることとした。

図2 グライコプロテオミクス技術による卵巣がん糖鎖バイオマーカー探索の戦略

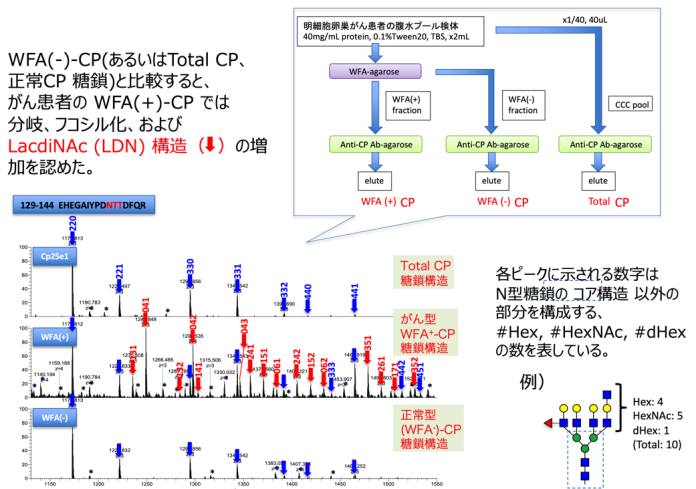
J Proteome Res. 2014. 13(3):1624-35. PMID: 24498956



### 2.2. 血清中にWFA<sup>+</sup>-CPについて

まずは血清中にWFA<sup>+</sup>-CPが存在するかを検討するために、血清と腹水のタンパク質をWFAアガロースにより分画し、WFA結合性画分にCPが存在するかを検討した。その結果、明細細胞腺がん患者の血清でも検出が出来、腹水のサンプルの場合と同様の傾向があることを確認した。このことから、WFA<sup>+</sup>-CPは血清バイオマーカーとして利用できる可能性が高いと判断し、以降の開発を進めた。

図3 WFA<sup>+</sup>-CPの分子上の糖鎖構造の解析 (Glyco-RIDGE法)



### 2.3. WFA<sup>+</sup>-CP糖鎖構造解析

糖鎖変化を正確に把握するために、卵巣明細細胞がん患者腹水より濃縮精製したWFA<sup>+</sup>-CPについて、質量分析装置(Glyco-RIDGE法) (Noro et al. 2015, Togayachi et al. 2018)を用いて付加部位特異的に糖鎖構造を解析した(図3)。その結果、正常なCP分子では見られていなかった糖鎖の分岐構造やフコシル化の増加のほか、LacdiNAc (LDN) 構造と呼ばれている特殊な糖鎖構造が増えていることが分かった(図3参照、LDNは赤矢印のピーク)。

### 2.4. WFA<sup>+</sup>-CP測定系の構築(抗体-レクチン サンドイッチELISA検出系)

従来測定系で使用していた野生型WFAはLDN糖鎖とGalactose(Gal)末端糖鎖の両方を認識するが、血中にはGal末端糖鎖を持つ糖タンパク質が大量に存在するために測定の際のバックグラウンドのシグナルが高くなる。そこで、構造

解析の結果に基づき、LDN糖鎖に対する特異性を向上させた改変型の組換えWFA (rWFA) (Sato et al. 2017)を用いることで、WFA<sup>+</sup>-CP測定系の特異性を向上させることとした。また、WFA<sup>+</sup>-CPサンドイッチアッセイに用いるマウスモノクローナル抗CP抗体(anti-CP mAb)と、標準品として用いるLDN糖鎖が修飾された組換えセルロプラスミン(rCP)も作製した。

rWFA (固相側)とanti-CP mAbの組み合わせによるサンドイッチELISAでは、野生型WFAと比較してバックグラウンドの低減効果があり、これによって特異性が向上したが感度不足であった。加えて、WFA<sup>+</sup>-CPの血中の存在量はかなり微量であり、更なる検出感度の向上が必要になると予想された。そこで、コニカミノルタ株式会社が開発した技術である、表面プラズモン共鳴励起増強蛍光分光(SPFS)技術による、高感度かつ自動化された検出系(Kaya et al. 2015)の構築を行った。このSPFS測定は、金属薄膜に光をプラズモン共鳴角で入射した際に発生する局在場光により、金属膜極近傍に配置された蛍光分子からの蛍光を測定する方法である。センサ表面にリガンド分子あるいは特定分子と結合する受容体分子を配置することにより、様々な対象物質の高感度蛍光検出が可能となる。そこで、SPFS測定システムにrWFAとanti-CP mAbを適用したところ、手動ELISA法より約100倍感度が向上し、血清試料からの検出が可能となった。

## 2.5. マーカー分子の有効性検証

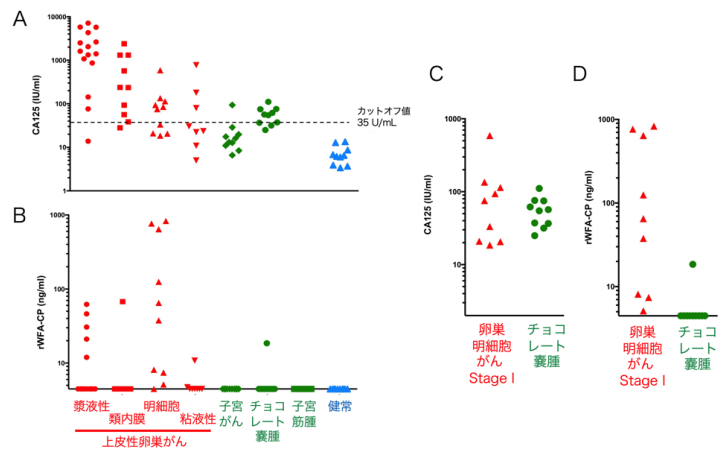
rWFAを用いたSPFS測定系を使用して、血清検体でのWFA<sup>+</sup>-CPマーカー分子の有効性検証を行うこととした。検体は、卵巣がん(漿液性 15例、類内膜性 10例、明細胞性 10例、粘液性 8例)および対照群(子宮体がん 10例、チョコレート嚢腫 [子宮内膜症] 10例、子宮筋腫 10例、健常人 10例)である。

まずは、使用臨床検体における既存マーカーCA125の測定結果を示す(図4)。明細胞腺がんの検体は、病期は主にステージI期のものが多かった。既存マーカーであるCA125値は卵巣がん患者では亢進していた。しかしながら、データ群の下方では背景疾患であるチョコレート嚢腫の測定値と重複していた(図4A)。また、早期の卵巣明細胞がんとチョコレート嚢腫を切り分けることは出来ていなかった(図4C)。

一方、このSPFS法によるrWFAとanti-CP mAbのサンドイッチ測定により、卵巣がんと対照群血清

のrWFA<sup>+</sup>-CPを測定したところ、卵巣がんは対照群と比較してrWFA<sup>+</sup>-CP値が有意に上昇した(図4B)。特に明細胞がん10例中9例はステージIでありながらもWFA<sup>+</sup>-CPの上昇が見られたのに対し、チョコレート嚢腫はほぼ全てが検出限界値以下であった(図4D)。

図4 少数臨床検体による評価 (有効性検証結果)



## 3. 考察

我々は卵巣がん患者の腹腔洗浄液のグライコプロテオミクス解析により卵巣がんの特異性を示すWFA<sup>+</sup>-CPを同定・報告(Sogabe et al. 2014)していたが、改変型組換えWFAレクチンと表面プラズモン共鳴励起増強蛍光分光(SPFS)技術による自動測定系により、血中rWFA<sup>+</sup>-CP検出も可能となった。今回の測定法による血中rWFA<sup>+</sup>-CP値は、ステージIの明細胞がんが高値を示したことから、チョコレート嚢腫の経過観察中に卵巣明細胞がん発生を検出することの出来る新規マーカーとなる可能性が示唆された (Sogabe et al. 2022)。

#### 4. 謝辞

本研究 (Sogabe et al. 2022) は、筆者が前所属である国立研究開発法人産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門 分子細胞マルチオミクス研究グループ(曾我部万紀、梶谷内晶、梶裕之、佐藤隆、千葉靖典、成松久)において、東海大学医学部 産婦人科(林優、三上幹男)、聖マリアンナ医科大学 産婦人科(鈴木直)およびコニカミノルタ株式会社(小島駿、彼谷高敏)とともに共同研究として実施したものである。

#### 5. 引用文献

- Kaya, T., T. Kaneko, S. Kojima, Y. Nakamura, Y. Ide, K. Ishida, Y. Suda, and K. Yamashita. (2015). High-sensitivity immunoassay with surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy using a plastic sensor chip: application to quantitative analysis of total prostate-specific antigen and GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc-linked prostate-specific antigen for prostate cancer diagnosis. *Anal Chem* 87(3):1797-1803.
- Narimatsu, H., H. Sawaki, A. Kuno, H. Kaji, H. Ito, and Y. Ikehara. (2010). A strategy for discovery of cancer glyco-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics. *FEBS J* 277(1):95-105.
- Noro, E., A. Togayachi, T. Sato, A. Tomioka, M. Fujita, M. Sukegawa, N. Suzuki, H. Kaji, and H. Narimatsu. (2015). Large-Scale Identification of N-Glycan Glycoproteins Carrying Lewis x and Site-Specific N-Glycan Alterations in Fut9 Knockout Mice. *J Proteome Res* 14(9):3823-3834.
- Ocho, M., A. Togayachi, E. Iio, H. Kaji, A. Kuno, M. Sogabe, M. Korenaga, M. Gotoh, Y. Tanaka, Y. Ikehara, M. Mizokami, and H. Narimatsu. (2014). Application of a glycoproteomics-based biomarker development method: alteration in glycan structure on colony stimulating factor 1 receptor as a possible glycobiomarker candidate for evaluation of liver cirrhosis. *J Proteome Res* 13(3):1428-1437.
- Sato, T., H. Tateno, H. Kaji, Y. Chiba, T. Kubota, J. Hirabayashi, and H. Narimatsu. (2017). Engineering of recombinant *Wisteria floribunda* agglutinin specifically binding to GalNAc $\beta$ 1,4GlcNAc (LacdiNAc). *Glycobiology* 27(8):743-754.
- Sogabe, M., S. Kojima, T. Kaya, A. Tomioka, H. Kaji, T. Sato, Y. Chiba, A. Shimizu, N. Tanaka, N. Suzuki, I. Hayashi, M. Mikami, A. Togayachi, and H. Narimatsu. (2022). Sensitive New Assay System for Serum *Wisteria floribunda* Agglutinin-Reactive Ceruloplasmin That Distinguishes Ovarian Clear Cell Carcinoma from Endometrioma. *Anal Chem* 94(5):2476-2484.
- Sogabe, M., H. Nozaki, N. Tanaka, T. Kubota, H. Kaji, A. Kuno, A. Togayachi, M. Gotoh, H. Nakanishi, T. Nakanishi, M. Mikami, N. Suzuki, K. Kiguchi, Y. Ikehara, and H. Narimatsu. (2014). Novel glycobiomarker for ovarian cancer that detects clear cell carcinoma. *J Proteome Res* 13(3):1624-1635.
- Togayachi, A., J. Iwaki, H. Kaji, H. Matsuzaki, A. Kuno, Y. Hirao, M. Nomura, M. Noguchi, Y. Ikehara, and H. Narimatsu. (2017). Glycobiomarker, Fucosylated Short-Form Secretogranin III Levels Are Increased in Serum of Patients with Small Cell Lung Carcinoma. *J Proteome Res* 16(12):4495-4505.
- Togayachi, A., A. Tomioka, M. Fujita, M. Sukegawa, E. Noro, D. Takakura, M. Miyazaki, T. Shikanai, H. Narimatsu, and H. Kaji. (2018). Identification of Poly-N-Acetylactosamine-Carrying Glycoproteins from HL-60 Human Promyelocytic Leukemia Cells Using a Site-Specific Glycome Analysis Method, Glyco-RIDGE. *J Am Soc Mass Spectrom* 29(6):1138-1152.