

〈総説〉

## 血液中糖鎖及び糖鎖抗体を標的としたバイオマーカー探索

山田 佳太

### Biomarker discovery targeting glycans and glycan antibodies in blood

Keita Yamada

**Summary** Because glycan structure and expression can change in response to a disease, research is being conducted to use glycans as biomarkers for diagnosis. In contrast, many types of natural antibodies use glycans as epitopes in the blood, and the levels of these antibodies can also change with disease. It is also possible that antibodies that bind to the characteristic glycans expressed in cancer tissues are expressed in the blood of cancer patients. Therefore, both glycans and glycan antibodies may be used as biomarkers. However, even though glycan analysis techniques have been greatly improved, several issues remain to be resolved; thus, certain glycans and glycan antibodies cannot be detected using conventional methods. Thus, novel analytical methods are needed to identify new glycan markers. In this paper, we introduced a glycan and glycan antibody analysis method and the results of our search for glycan and glycan antibody markers revealed their potential as pancreatic cancer markers using our method.

**Key words:** Glucuronidated glycans, Sulfated glycans, Phosphorylated glycans, natural antibody, pancreatic cancer, biomarker, 3'-sialyllactose

#### I. 緒言

糖鎖は、タンパク質、核酸に続く第3の生命鎖と呼ばれており、生命科学研究を進める上で無視できない分子である。また、インフルエンザウイルスをはじめとするウイルス感染症、がん、認知症、免疫疾患等の様々な疾患への糖鎖の関わりが明らかになりつつある。一方、生体中に存在する糖鎖は複雑な構造を持ち、生体環

境の変化に応じて、その構造を大きく変化させることが知られている。したがって何らかの疾患が発症し、体内の環境が変化すると、常時では観察されない糖鎖の発現や糖鎖発現量の変動が生じる。例えば、多くのがん組織ではセリン/スレオニン結合型（O-結合型）糖鎖の伸長反応が停止し、低分子のO-型糖鎖が高発現する<sup>1)</sup>。また、アスパラギン結合型（N-結合型）糖鎖についても、複数のがん組織でフコシル化が促進さ

大阪大谷大学薬学部衛生・毒性学講座  
〒584-8540 大阪府富田林市錦織北3-11-1  
E-mail: yamadakei@osaka-ohitani.ac.jp  
Tel: +81-721-24-9987  
Fax: +81-721-24-9890

The Laboratory of Toxicology, Faculty of Pharmacy  
Osaka Ohtani University, 3-11-1 Nishikiori-kita,  
Tondabayashi, Osaka 584-8540, Japan,

受付日：2021年9月11日  
採択日：2021年9月16日

れることが報告されている<sup>2,3)</sup>。このような糖鎖が有する「変化しやすい」という性質に着目し、糖鎖を標的とした診断技術やバイオマーカーの開発が進められている。特に、血中には多種多様な糖タンパク質糖鎖が存在するため、この多様な糖タンパク質糖鎖の中に優れたバイオマーカーが存在しう。実際に、古くから腫瘍マーカーとして使用されているCA19-9 (sialyl-Lwisa: NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-3 (Fuc  $\alpha$  1-4) GlcNAc-R)、DUPAN-2 (sialyl-Lwisa c: NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-3GlcNAc-R)、STN (sialyl-Tn: NeuAc  $\alpha$  2-6GalNAc-Thr/Ser) はそれぞれ血中タンパク質上の糖鎖を標的としたものである<sup>4)</sup>。また、 $\alpha$ フエトプロテイン (AFP) よりも肝がんへの特異性が高いAFP-L3は、癌化に伴うAFP上の糖鎖構造変化を評価することで見出されたものである<sup>5)</sup>。これらの他にも未だ発見されていない血中糖鎖マーカーが存在すると考えられる。

一方、血液中には糖鎖をエピトープとする100種類以上の自然抗体が発現している<sup>6)</sup>。有名な糖鎖抗体としては、A型抗原やB型抗原に対する血液型抗体や異種抗原である $\alpha$ -ガラクトース (Gal) 抗原に対する抗体が挙げられる<sup>7)</sup>。血液型抗体や $\alpha$ -Gal抗体の存在意義は明らかであるが、多くの糖鎖抗体についてはその機能については明らかにされていない。さらに、糖鎖自然抗体の種類や発現量は、人種や年齢、血液型やワクチンの接種歴などによって変動し、疾患に伴い発現量が変動するものも報告されている<sup>8,9)</sup>。また、前述のようにがん組織では、特徴的な糖鎖が発現するため、がん患者の血中には癌組織に発現する特徴的な糖鎖に対する抗体が分泌される可能性がある。実際に、Wangらは、肝臓がん組織で発現が増加するGlobo H (Globohexaosylceramide: Fuca1-2Galb1-3GalNAcb1-3Gala1-4Galb1-4Glc-ceramide) に対する糖鎖抗体が、肝臓がん患者の血清で有意に増加することを明らかにしている<sup>10)</sup>。以上の報告から、血中の糖鎖だけでなく糖鎖抗体をバイオマーカーとして利用することも期待されている。

前述の通り血液中の糖タンパク質糖鎖や糖鎖抗体はバイオマーカーとして魅力的な分子であり、多くの研究者が新たな糖鎖関連マーカーの特定を試みている。しかしながら、糖鎖解析技

術は未だ未成熟であり解決しなければならない技術課題も多く残されている。したがって既存の分析アプローチでは検出できない有用な糖鎖関連マーカーが存在する可能性も否定できない。このような背景から著者らは、新たな糖鎖分析手法の開発に取り組むと共に、開発した技術を用いて、未だ早期発見が困難な膵臓がんマーカーの探索に挑戦している。本論文では、著者らが新たに開発した糖鎖及び糖鎖抗体分析技術を紹介すると共に、それらの技術を用いて実施した血中糖タンパク質糖鎖と糖鎖抗体の2つの分子群を標的にした膵臓がんマーカー探索例を紹介する。

## II. 血中糖タンパク質糖鎖を標的としたマーカー探索

### 1. 分析手法の開発

糖タンパク質糖鎖は、糖鎖の非還元末端にシアル酸や硫酸及びリン酸等の酸性分子が付加した酸性糖鎖と、酸性分子を有さない中性糖鎖に大別される。これらの糖鎖内、シアル酸を有するシアロ糖鎖や中性糖鎖は生体中グライコームの主要な成分であり、優れた分析手法が確立している。したがって、血液中糖鎖マーカー探索研究においては中性糖鎖やシアロ糖鎖の構造変化や発現量の変動について議論されることが多い<sup>11-12)</sup>。一方、シアロ糖鎖以外の酸性糖鎖である硫酸化糖鎖やリン酸化糖鎖等はグライコームを構成する極僅かな成分であり、既存の分析手法では見逃されることが多く、血中マーカー探索研究で追跡されている例はほとんど見られない。しかしながら、これらのマイナーな酸性糖鎖についても、がん疾患と関わりが報告されているため<sup>13-14)</sup>、腫瘍マーカー探索においては評価すべき対象であると考えられる。著者らは、解析が進んでいないマイナー酸性糖鎖群の中に、今まで見出されていないマーカーが存在することを期待し、硫酸化・リン酸化糖鎖等のマイナー酸性糖鎖の解析手法の開発に取り組んだ。

血清糖タンパク質糖鎖を解析する場合、コアタンパク質から糖鎖を遊離し、遊離した糖鎖を蛍光標識試薬や質量分析用標識試薬により誘導体化する手法が用いられる。さらに誘導体化することで検出感度を向上させた糖鎖を、液体ク

ロマトグラフィーや電気泳動を用いた分離分析と質量分析を組み合わせる解析<sup>15)</sup>。この手法とは別に、糖鎖の部分構造に結合する複数のレクチンを基板上に固定化したレクチンアレイ法<sup>16)</sup>も実施されるが、硫酸化糖鎖やリン酸化糖鎖を網羅的に検出できるレクチンは見出されていない。そのため、前者の分離分析と質量分析を組み合わせる解析手法を進展させる方向で技術開発を進めた。この手法で硫酸化・リン酸化糖鎖を解析する場合、大きな問題が2つ生じる。1つ目の問題は、これらの糖鎖はグライコームのマイナー成分であるため、通常の分析手法を実施するとシアロ糖鎖や中性糖鎖等の主要な糖鎖に検出が妨害されるという点である。したがって、主要糖鎖による妨害を除くため、グライコームの中からマイナー酸性糖鎖を濃縮できる技術を確認しておく必要がある。もう1つの問題として硫酸化糖鎖とリン酸化糖鎖の識別が困難な点が挙げられる。微量糖鎖の構造解析の主力は質量分析であるが、糖鎖上に存在する硫酸基 ( $\text{HSO}_3^-$ ;  $M_w = 79.9568$ ) とリン酸基 ( $\text{H}_2\text{PO}_3^-$ ;  $M_w = 79.9663$ ) の質量差は僅かであるため、分離識別には労力を要する。高性能な質量分析装置を用いることで、単糖であれば識別可能であるが、分子量1000を超えるオリゴ糖で識別を達

成することは困難である。また、糖鎖上に存在するリン酸基はN-アセチルグルコサミンやリビトール等が付加したジエステル構造を形成することがあるため、Phos-Tagや金属アフィニティーを原理とする検出法<sup>17)</sup>では捕捉や標識ができない場合がある。著者らは、硫酸化-リン酸化糖鎖解析が抱えるこれらの問題を解決するために、種々の検討を行い、2種類の高速度液体クロマトグラフィー (HPLC) 法を利用した技術を確認した (Fig. 1)<sup>18)</sup>。

通常の糖鎖解析手法と同様に、タンパク質から遊離した糖鎖を、蛍光標識試薬により誘導体化する。その後、誘導体化糖鎖をノイラミナーゼで消化し、糖鎖の末端に存在するシアル酸を切除する。この操作により、糖鎖混合物の中で負電荷を有する酸性糖鎖は硫酸化やリン酸化糖鎖等のマイナー酸性糖鎖のみになる。この糖鎖混合物をセロトニン固定化カラムに導入すると負電荷を有するマイナー酸性糖鎖のみがカラムに捕捉され、糖鎖混合物の中からマイナー酸性糖鎖を濃縮することができる。セロトニンカラムにより濃縮したマイナー酸性糖鎖を $\text{NH}_2$ カラムに導入すると、質量分析では識別し難い硫酸化糖鎖とリン酸化糖鎖を分離することができる。Fig. 2に $\text{NH}_2$ カラムを用いた硫酸化糖鎖とリ

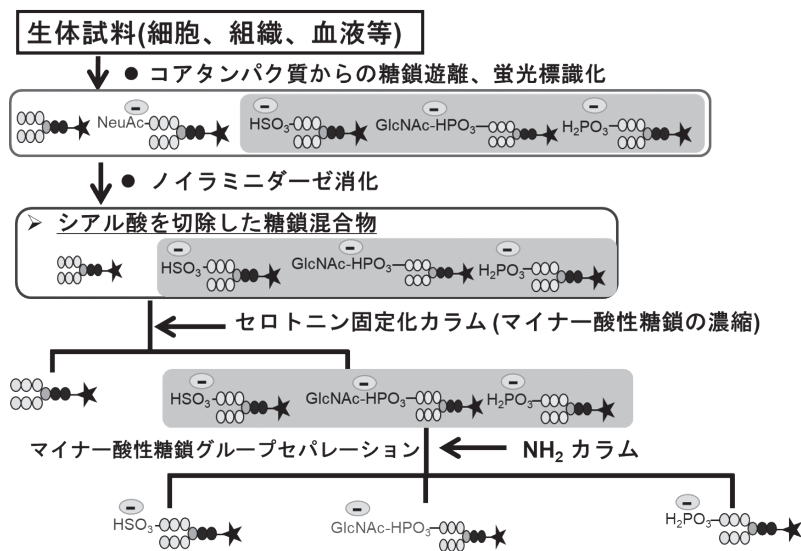


Fig. 1 生体試料中のマイナー酸性糖鎖を解析するための手法

ン酸化糖鎖の分離識別結果を示す。

リン酸化マンノースと硫酸化マンノースの質量差は0.01Daであるため質量分析での識別は困難であるが、NH<sub>2</sub>カラムで両者を分析すると、溶出時間が全く異なるため、リン酸化体と硫酸化体を識別することができる (Fig. 2A)。分離機構はFig. 2Bに示す通りで、溶液中で電離したリン酸基と硫酸基を比較すると、リン酸基は硫酸基よりも負電荷を1つ多く持つことになる。したがって正の電荷を帯びたNH<sub>2</sub>カラムに強く保持され、リン酸化糖鎖は硫酸化糖よりも遅く溶出されるものと考えられる。この条件でオリゴ糖鎖を分析すると、硫酸化糖鎖は溶出時間35分から41分に、リン酸化糖鎖は溶出時間50分以降に常に溶出される (Fig. 2C)。したがって本法を使用することで、未知試料中のリン酸化糖鎖と硫酸化糖鎖を溶出時間から同定することができる<sup>18)</sup>。この手法が確立したことで、血液試料等の生体試料中の微量なマイナー酸性糖鎖解析が実施可能となった。

## 2. 開発技術を用いたマーカー探索

前項で確立したマイナー酸性糖鎖解析手法をヒト血清中のN-結合型糖鎖の解析に適用した。血清から調製したマイナー酸性N-結合型糖鎖

を、NH<sub>2</sub>カラムで分析すると、硫酸化糖鎖溶出時間に相当する35分付近に2種類の硫酸化複合型2本鎖糖鎖が、溶出時間53分にはリン酸化ハイブリット型糖鎖が検出された (Fig. 3A)。

さらに、リン酸化糖鎖や硫酸化糖鎖と異なる溶出時間に、明瞭にピーク (ピークX) が観察された。このピークを分取し、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) で解析すると、硫酸化糖鎖やリン酸化糖鎖に相当しない分子イオンピークが観察された (Fig. 3B)。観察される各分子イオンピークをMS/MS解析すると共に、単糖組成解析を実施した結果、これらイオンピークは何れもグルクロン酸化されたN-型糖鎖に由来することが明らかになった<sup>19)</sup>。グルクロン酸化糖鎖は硫酸化糖鎖やリン酸化糖鎖と同じくマイナーな酸性糖鎖の1種であり、神経組織などに発現することが知られている<sup>20)</sup>。しかしながら、ヒト血清タンパク質上での存在は確認されていない。ヒト血清中のN-結合型糖鎖解析はこれまで多くの研究機関で実施されているが、これらのマイナー酸性糖鎖を報告しているものは少なく、リン酸化糖鎖やグルクロン酸化糖鎖が存在するのは我々の検討で初めて明らかになったものと考えられる。また、我々の解析

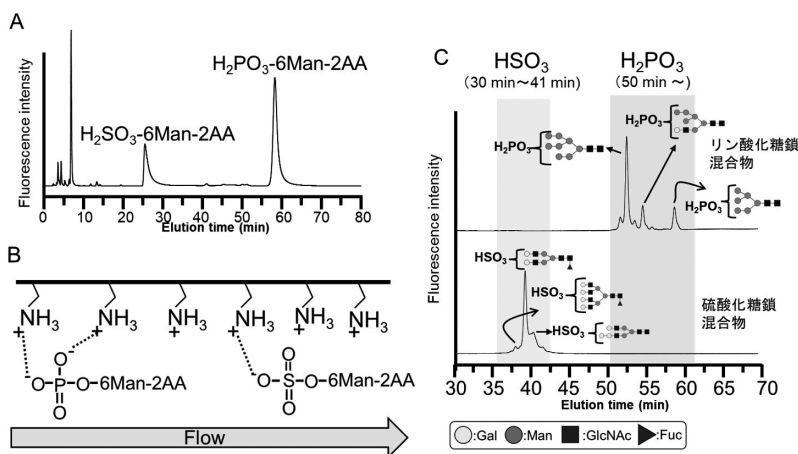


Fig. 2 NH<sub>2</sub>カラムによる硫酸化糖鎖とリン酸化糖鎖の識別  
 A) 2-アミノ安息香酸 (2-AA) で標識化した硫酸化マンノースとリン酸化マンノースの分離結果と、B) NH<sub>2</sub>カラムによるリン酸化糖と硫酸化糖の分離機構、C) 硫酸化オリゴ糖とリン酸化オリゴ糖の分離識別結果を示す。詳細な分析条件や分析結果は文献<sup>18)</sup>を参照頂きたい。



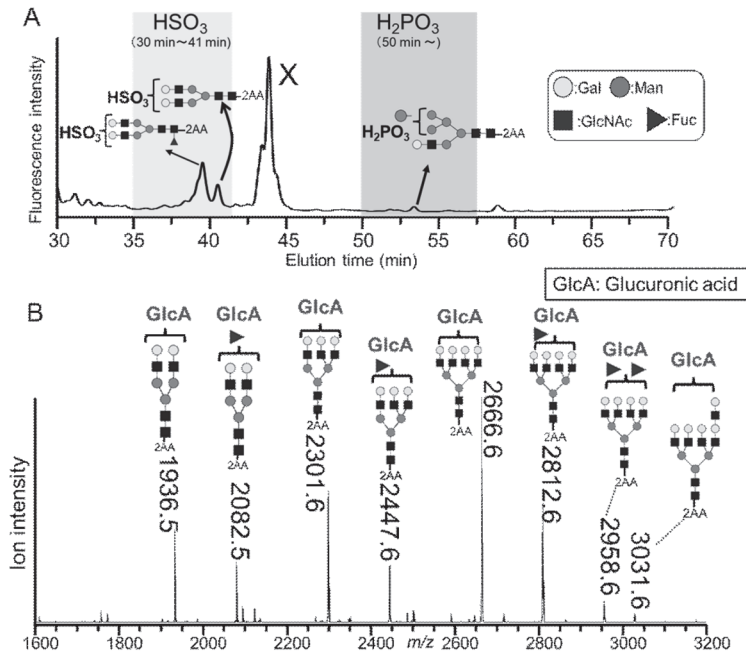


Fig. 3 ヒト血清中で観察されたマイナー酸性N-結合型糖鎖  
 A) NH<sub>2</sub>カラムを用いたヒト血清由来のマイナー酸性N-結合型糖鎖の分析結果と、B) ピークXのMALDI-TOF MS測定結果を示す。詳細な構造解析結果は文献19)を参照頂きたい。

手法が硫酸化、リン酸化糖鎖だけでなくグルクロン酸化糖鎖の解析も同時に行えることが明らかになった。さらに、ヒト血清で観察されたマイナー酸性糖鎖群の発現量を健常者と膵臓がん患者で比較した (Fig. 4A)。NH<sub>2</sub>カラムを用いた分析で観察されるマイナー酸性糖鎖由来のピークを比較すると、健常者では明瞭に検出されているグルクロン酸化糖鎖が、膵臓がん患者では著しく低下しており、マイナー酸性糖鎖のプロファイルに大きな変化があることが示唆された (Fig. 4A)<sup>19)</sup>。

クロマトグラム上で観察される硫酸化糖鎖、グルクロン酸化糖鎖、及びリン酸化糖鎖のピーク面積値から相対量を算出し、健常者17検体、膵臓がん患者15検体 (n = 1 for stage I, n = 7 for stage II, n = 4 stage III and n = 3 for stage IV) について比較解析すると、グルクロン酸化糖鎖の相対量が有意に低下していることが確認できた (Fig. 4B)。一方、硫酸化糖鎖については、膵臓がん患者で増加していた。硫酸化糖鎖の発現量

は炎症性疾患時に増加するという報告があるため<sup>21)</sup>、がん特異的な現象では無く、がん発症に伴う炎症による変化である可能性も考えられる。一方、グルクロン酸化糖鎖の変動に関する情報は無いが、一般的に薬物等のグルクロン酸抱合に関与するUDP-glucuronosyltransferaseの活性の低下は腫瘍のリスク要因となる<sup>22)</sup>。さらにいくつかの腫瘍組織ではUDP-glucuronosyltransferaseの活性が低下している<sup>23)</sup>。これらの報告例は、生体中のグルクロン酸化体が腫瘍マーカーとして利用できることを示唆している。本検討で特定した硫酸化糖鎖やグルクロン酸化糖鎖が膵臓がん特異的なマーカーとして利用できる否かを判断するためには、さらなる検討が必要であるため、今後膵炎患者血清や他臓器のがん患者血清について同様の解析を実施する予定である。また、現状の評価法では複数種のグルクロン酸糖鎖を分離せず混合物の状態と比較しているが、グルクロン酸化糖鎖をさらに分離し、個々のグルクロン酸化糖鎖の発現量に着目することで

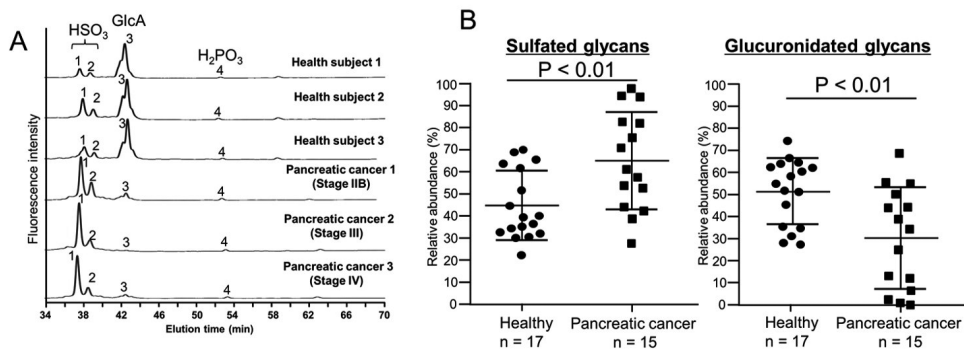


Fig. 4 膵臓がん患者と健常者血清中のマイナー酸性N-結合型糖鎖の比較解析  
 A) 健常者及び膵臓がん患者血清1  $\mu$ L相当から調製したマイナー酸性N-結合型糖鎖の比較解析と、B) 各検体で観察された硫酸化糖鎖及びグルクロン酸化糖鎖の相対量の比較結果を示す。A) に示すクロマトグラムはFig. 2のNH<sub>2</sub>カラムによる分析と同様の条件で測定した結果得られたものである。健常者と膵臓がん患者との間の統計的差異は、スチューデントのt検定を用いて評価した。さらに詳細データは文献19)を参照頂きたい。

診断精度を向上させることができると期待される。

リン酸化糖鎖については、健常者と膵臓がん患者血清間で有意な差は観察されなかった。しかしながら疾患に伴うリン酸化糖鎖の構造や発現量の変化については明らかにされていなため、硫酸糖鎖やグルクロン酸化糖鎖と共に、他臓器のがんや他の疾患に伴うリン酸化糖鎖の変動を追跡することも意義があるものと考えられる。

### Ⅲ. 血中糖鎖抗体を標的としたマーカー探索

#### 1. 糖鎖抗体測定技術の開発

糖鎖抗体をはじめとする糖鎖結合分子を検出する手法はアフィニティークロマトグラフィー法等も用いられるが、夾雑物の多い生体試料に適用することは難しい。一方夾雑物が多い生体試料でも実施できる手法が、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 等の免疫測定法である。免疫測定法により糖鎖抗体を検出する場合は、なんらかの基板上に糖鎖を固定化する必要があるが、この固定化の工程が問題となる。糖鎖抗体の中には、エピトープとなる糖がクラスター化することで初めて親和性を示すものがあるため<sup>24)</sup>、プレート上に高密度に糖鎖を固定化することが望ましい。そのため、ELISA

を実施する場合は固定化用の糖鎖を大量に要する。しかしながら市販されている糖鎖試薬で大量に入手でき、且つプレートへの固定化に適したスパーサーを有するものは限定されている。また、固定化用の糖鎖を化学合成するという選択もあるが、糖鎖は異性体や分岐構造を持つため、化学合成による調製は容易ではない。したがって、複数種の糖鎖に対する抗体をELISAでスクリーニングすることは困難に思われた。そこで著者らは、ELISAよりも低用量の糖鎖を用いて実施できる糖鎖アレイ法による測定系の構築を試みた。糖鎖アレイの場合は、ELISAよりも糖鎖固定化面積を1/10程度に縮小できるため固定化に要する糖鎖量を低減させることができる。しかしながら、固定化する糖鎖のバリエーションを増やす事ができないという問題点はELISAと同様である。また、市販の糖鎖アレイも存在するが、非常に高額であり、且つ安定的な供給は難しいため、継続した検討に使用することが困難であった。以上の背景から、糖鎖アレイのバリエーションを増加させるための手法について検討し、培養細胞や組織等の生体試料中に発現する糖鎖を単離し、直接アレイ化するという考えに至った (Fig. 5A)。

種々の方法を検討した結果、エポキシ基コーティングスライドを使用することで、糖鎖のHPLC解析で汎用される2-アミノ安息香酸 (2-

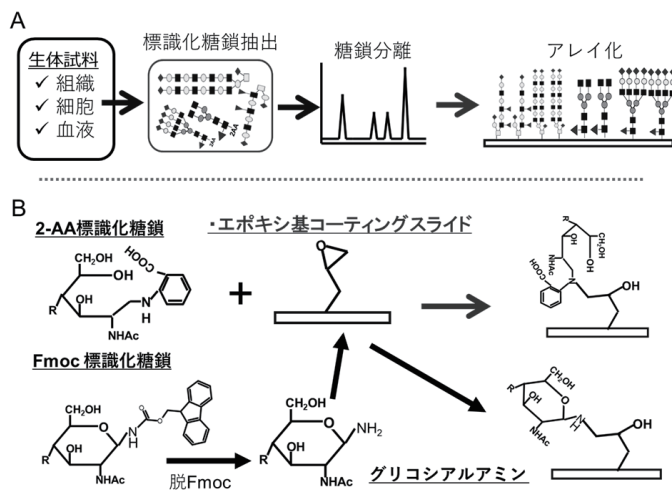


Fig. 5 糖鎖アレイ作成技術の開発

A) 著者らが実践する糖鎖アレイの作成方針と、B) アレイ基板上への2-AA標識化糖鎖及びFmoc標識化糖鎖の固定化法の原理を示す。2-AAで標識化された糖鎖が有する2級アミンとスライドガラス上のエポキシ基が反応し、スライド上に糖鎖が固定化される。また、Fmoc標識化糖鎖を脱Fmoc化操作することで生じるグリコシアルアミン型糖鎖を同様の原理で固定化することができる。

AA) 標識化糖鎖や9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) 標識化糖鎖を簡便にスライド上に固定化することに成功した (Fig. 5B)<sup>25)</sup>。この方法を利用することで、培養がん細胞やがん組織等で観察された糖鎖をHPLCで測定すると同時にアレイ化することが可能である。また、これまでスパーサーの問題から基板上への固定化が困難であった市販の糖鎖標品等も上記の標識化反応を適用することで、簡易にアレイ化することができた。この技術が確立したことで、複数の糖鎖-分子間相互作用解析や糖鎖抗体のスクリーニングが可能となった。

## 2. 膵臓がんマーカーの探索

バイオマーカーとなりうる血中糖鎖抗体の探索は、「がん組織中に特徴的に観察される糖鎖に対する抗体が、がん患者血液中で発現する」という検証からスタートした。著者らは、前項で記載した血清中の糖鎖以外にも、培養がん細胞や組織中の糖鎖解析を進めており、この取り組みの中で、膵臓がん細胞中でNeuAc  $\alpha$  2-3Gal-残基を有する糖鎖のクラスター化が促進している事を明らかにした<sup>24,26)</sup>。この成果から、NeuAc

$\alpha$  2-3Galのクラスター構造に結合する糖鎖抗体が膵臓がん患者血清中で発現すると考え、血清中糖鎖抗体の測定を実施した (Fig. 6A)。糖鎖抗体測定用にエポキシ基コーティングスライドに3'-sialyllactose (3'-SL: NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-4Glc)、 $\alpha$ -Galエピトープ (Gal  $\alpha$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc) 糖鎖を固定化した簡易な糖鎖アレイを作成した。 $\alpha$ -Galエピトープはヒト血清中に存在する $\alpha$ -Gal抗体が結合するものであり、本測定系ではポジティブコントロールの役割を担う。この糖鎖チップに100倍に希釈した健常者血清及び膵臓がん患者血清を80  $\mu$ L添加し、2時間インキュベートした。反応後、血清をチップ上から除去し、蛍光標識化 (Cy3化) された抗ヒトIgG抗体を添加し、チップ上に結合している糖鎖抗体と反応させた。その後、アレイ表面の蛍光を専用のスキャナーで測定した (Fig. 6B)。

測定の結果、当初の予測に反して、健常者では3'-sialyllactoseのスポット位置に強い蛍光シグナルが観察された。一方、膵臓がん患者では3'-sialyllactoseのスポット位置の蛍光シグナルが消失或いは減少していた。この結果は3'

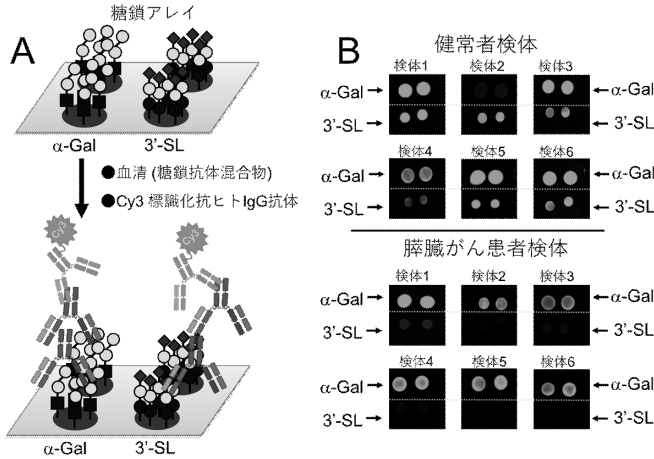


Fig. 6 糖鎖アレイ法による健康者と膵臓癌患者血清中の3'-sialyllactose 抗体の測定結果  
 A) 糖鎖アレイ法による血中糖鎖抗体の測定手法及び、B) 3'-sialyllactose 抗体の測定結果を示す。図中の3'-SLは3'-sialyllactose を表す。

-sialyllactose抗体は自然抗体の一種としてヒト血液中に常時存在しているが、膵臓がんが発症するとその発現量が低下することを示唆している。さらに、同様の検体に対して、代表的な腫瘍糖鎖抗原であるCA19-9、DUPAN-II、STN等を含む40種類ほどの糖鎖をアレイ化し、血清中でのこれらの糖鎖抗体の発現状況を健康者と膵臓がん患者で比較した。いくつか膵臓がん患者と健康者で発現量に差がみられるものがあったが、3'-sialyllactose抗体が最も顕著に変動していた。CA19-9やDUPAN-II構造では3'-sialyllactoseと同じくNeuAc α 2-3Gal構造を有するが、抗体発現量に関して健康者と膵臓癌患者で顕著な変動は見られなかった。この結果から3'-sialyllactose構造をエピトープとする抗体が重要であると考えられる。また、自然抗体であることが伺われるため、3'-sialyllactoseに対する血中IgM抗体による評価も試みたが、IgG程の精度が得られなかった。

以上の検討結果から3'-sialyllactoseのIgG抗体(3'-sialyllactose-IgG)を標的とし、多くの研究機関で測定できるようにELISAによる3'-sialyllactose-IgGの測定系を構築した。また、3'-sialyllactoseを担体上に固定化したアフィニティーカラムを作成し、ヒト血清IgG画分から3'-sialyllactose-IgGを単離した。この単離した抗体を標品とす

ることで血中3'-sialyllactose-IgGの濃度を求め、健康者と膵臓がん患者血清間で比較した。

健康者血清43検体、膵臓癌患者血清55検体 (n = 15 for stage I, n = 15 for stage II, n = 11 stage III and n = 14 for stage IV) 間を比較すると、膵臓がん患者で3'-sialyllactose-IgGの有意な減少が観察された (Fig. 7A)。さらに、膵臓がんの各Stage間で比較すると、Stage依存的な3'-sialyllactose-IgGの減少が観察された (Fig. 7B)<sup>27)</sup>。また、Stage Iの段階でも本抗体発現量の低下傾向が伺えるため、3'-sialyllactose-IgG早期診断マーカーとしての利用が期待される。膵臓がん患者の血清でこの抗体量が低下する原因については明らかにすることはできていないが、膵臓がん組織あるいは膵臓がんから分泌される複合糖鎖質に抗体が結合し消費されたと考えられる。また、少し飛躍するが、腫瘍等の異物が発生した際の防御機構として3'-sialyllactose-IgGが発現しているとも考えられるため、今後3'-sialyllactose-IgGの抗腫瘍効果等も評価したいと考えている。

興味深い事に、3'-sialyllactose-IgG抗体と既存のマーカーであるCA19-9を同時に測定し両試験の測定値を組み合わせることで、膵臓がんの診断性能が向上した。Fig. 8はStage Iの膵臓がん患者血清14検体について、縦軸にCA19-9の測定値を、横軸に3'-sialyllactose-IgGの測定値を



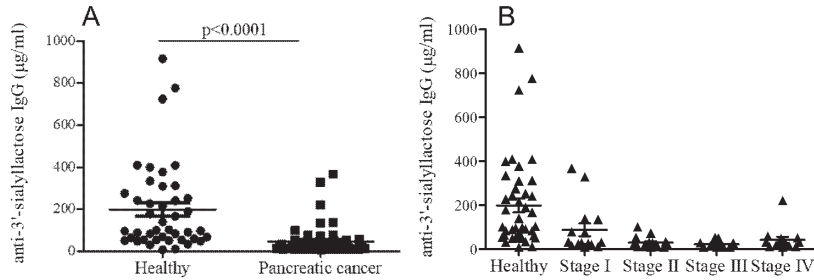


Fig. 7 多検体中の3'-sialyllactoseIgGの測定結果  
 A) 健常者43検体と膵臓がん患者血清55検体間の比較解析結果、B) 膵臓がんの各ステージにおける3'-sialyllactose抗体の発現量の比較結果を示す。健常者と膵臓がん患者との間の統計的差異は、スチューデントのt検定を用いて評価した。本結果は文献27) で報告した結果の一部を編集したものである。

プロットしたものである。

本検討によって求めた3'-sialyllactose-IgG及びCA19-9のカットオフ値を基にStage Iの14検体の判定を行うと、CA19-9のみで評価した場合に陰性と判定される3検体を本法では膵臓がん陽性と判定することができた。一方3'-sialyllactose-IgG抗体で陰性と判定された5検体について、CA19-9では陽性と判定された。両検体で陽性と判定されたものは6検体であり、両検体で陰性と判定されたのは1検体のみであった<sup>27)</sup>。これらの解析から3'-sialyllactose-IgG抗体及びCA19-9を同時に測定することでより正確な判定が可能になると考えられる。特にルイス式血液型抗原陰性者は、膵臓がんを発症してもCA19-9の濃度は上昇しないため、併用できるマーカーは有用であると考えられる。

以上の結果から、複数の糖鎖関連因子を組み合わせることで精度の高い診断が実現できる可能性が示唆された。本論文では結果は示していないが、糖鎖アレイ法で血清抗体をスクリーニングした際に、3'-sialyllactoseIgG以外の糖鎖抗体についても膵臓がんで変動することが確認されている。これらの複数の糖鎖抗体を同時に評価できる測定系を構築すれば、さらに精度の高い診断が可能になると期待される。

IV. 結語

著者らが開発したマイナー酸性糖鎖解析技術と糖鎖アレイ法を用い、血中糖タンパク質糖鎖と糖鎖抗体の2種類の分子群を標的とした膵臓

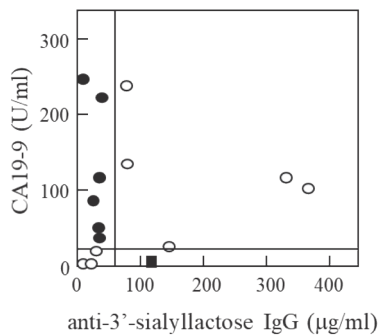


Fig. 8 3'-sialyllactoseIgGとCA19-9の2種の指標を組み合わせた膵臓がん検体の評価  
 縦軸にCA19-9濃度、横軸に3'-sialyllactose抗体濃度とし、14検体の膵臓がんステージIの患者血清をプロットした。●は3'-sialyllactose抗体とCA19-9両者で膵臓がんと判定された検体、○は3'-sialyllactose抗体とCA19-9のどちらか片方の評価で膵臓がんと判定された検体、■は両者の評価で陰性と判定された検体を示す。本結果は文献27) で報告した結果の一部を編集したものである。

がんマーカー探索を実施した。糖タンパク質糖鎖を標的とした解析では、既存の糖鎖分析手法では検出することが出来なかったグルクロン酸化N-結合型糖鎖を検出し、それらが膵臓がん患者血清中で減少することを見出した。また、硫酸化N-型糖鎖が膵臓がん血清中で増加することを見出した。一方、糖鎖抗体を標的とした解析では、3'-sialyllactoseに対する自然抗体が膵臓がん患者血清で減少することを見出した。また3'-sialyllactose抗体とCA19-9を併用することでよ

り膵臓がん診断の精度を高めることができた。この成果から複数の糖鎖関連マーカーを同時に評価することで精度の高い診断が実施できると期待される。今後の検討で、膵臓がんの診断に有用な血中糖鎖抗体や糖鎖が複数見だされた場合、スループット性を向上させるため、同一測定系で複数の糖鎖関連分子を測定できるようにデバイスの開発等も必要になると考えられる。

一方、今回の検討では、マイナー酸性糖鎖解析法と糖鎖アレイ法を別個に使用することで血中マーカーを探索しているが、両手法を組み合わせたマーカー探索も有効であると考えられる。例えば、マイナー酸性糖鎖解析手法を用いてがん組織やがん細胞が発現している糖鎖を解析すれば、今まで検出されなかったがん特有の糖鎖が検出される可能性がある。解析で見出された糖鎖に対する血中抗体の発現状況を糖鎖アレイ法で解析することで、新たな糖鎖抗体を標的としたマーカー探索を進めることができる。したがって今後も確立した技術を用いて生体試料中の糖鎖解析例を増やしていく予定である。

糖鎖解析技術は未だ技術開発の要素が多く残されているため、現状で検出されていない糖鎖や糖鎖抗体は当然存在しうる。したがって、既に確立された解析手法を用いたマーカー探索と共に、さらなる糖鎖解析技術の開発を進めることも重要である。未だ解析が困難であり未知の領域があるという点は非常に魅力的であり、新規解析手法による新しいアプローチでの糖鎖マーカーの発見が期待される。

## 謝 辞

血清マイナー酸性糖鎖解析を進めるに当たり、ご助言や分析機器をお貸しいただいた近畿大学薬学部創薬科学科分析学研究室の木下充弘准教授に御礼申し上げます。また血中糖鎖抗体の解析を進めるに当たり、多大なるご支援を頂きました住友化学株式会社先端材料開発研究所の斎藤幸一様、東清史様に心より感謝申し上げます。また、本研究の一部は、JSPS科研費20K07004の助成を受けて実施したものです。

本論文内容に関連する著者の利益相反：  
血液中糖鎖抗体を指標としたマーカー探索は、

住友化学株式会社との共同研究により進められたものである。

## 略語説明

Glc: グルコース、Gal: ガラクトース、Man: マンノース、GlcNAc: *N*-アセチルグルコサミン、GalNAc: *N*-アセチルガラクトサミン、NeuAc: *N*-アセチルノイラミン酸、Fuc: フコース

GlcA: グルクロン酸

## 文献

- 1) Fu C, Zhao H, Wang Y, Cai H, Xiao Y, Zeng Y, Chen H: Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen. *Hla*, 88 (6): 275-286, 2016
- 2) West C A, Wang M, Herrera H, Liang H, Black A, Angel PM, Drake RR, Mehta AS: *N*-Linked Glycan Branching and Fucosylation Are Increased Directly in Hcc Tissue As Determined through in Situ Glycan Imaging. *Journal of proteome research*, 17 (10): 3454-3462, 2018
- 3) Holst S, Wuhrer M, Rombouts Y: Glycosylation characteristics of colorectal cancer. *Adv Cancer Res*, 126: 203-256, 2015
- 4) Kondo N, Murakami Y, Uemura K, Nakagawa N, Takahashi S, Ohge H, Sueda T: Comparison of the prognostic impact of pre- and post-operative CA19-9, SPan-1, and DUPAN-II levels in patients with pancreatic carcinoma. *Pancreatology*, 17 (1): 95-102, 2017
- 5) Nakagawa T, Miyoshi E, Yakushijin T, Hiramatsu N, Igura T, Hayashi N, Taniguchi N, Kondo A: Glycomic analysis of alpha-fetoprotein L3 in hepatoma cell lines and hepatocellular carcinoma patients. *Journal of proteome research*, 7 (6): 2222-2233, 2008
- 6) Bovin NV: Natural antibodies to glycans. *Biochemistry. Biokhimiia*, 78 (7): 786-797, 2013
- 7) Macher BA, Galili U: The Galalpha1, 3Galbeta1, 4GlcNAc-R (alpha-Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochimica et biophysica acta*, 1780 (2): 75-88, 2008
- 8) Muthana SM, Gildersleeve JC: Factors Affecting Anti-Glycan IgG and IgM Repertoires in Human Serum. *Scientific reports*, 6: 19509, 2016
- 9) Rodríguez-Zhurbenko N, Martínez D, Blanco R, Rondón T, Griñán T, Hernández AM: Human antibodies reactive to NeuGcGM3 ganglioside have cytotoxic antitumor properties. *European journal of immunology* 43 (3): 826-837, 2013

- 10) Wang CC, Huang YL, Ren CT, Lin CW, Hung JT, Yu JC, Yu AL, Wu CY, Wong CH, Glycan microarray of Globo H and related structures for quantitative analysis of breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (33): 11661-11666, 2008
- 11) Chen CC, Engelborghs S, Dewaele S, Le Bastard N, Martin JJ, Vanhooren V, Libert C, De Deyn PP, Altered serum glycomics in Alzheimer disease: a potential blood biomarker? *Rejuvenation Res*, 13 (4): 439-444, 2010
- 12) Doherty M, Theodoratou E, Walsh I, Adamczyk B, Stockmann H, Agakov F, Timofeeva M, Trbojevic-Akmacic I, Vuckovic F, Duffy F, McManus CA, Farrington SM, Dunlop MG, Perola M, Lauc G, Campbell H, Rudd PM, Plasma *N*-glycans in colorectal cancer risk. *Scientific reports*, 8 (1): 8655, 2018
- 13) Sangadala S, Bhat UR, Mendicino J: Structures of sulfated oligosaccharides in human trachea mucin glycoproteins. *Molecular and cellular biochemistry*, 126 (1): 37-47, 1993
- 14) Sundblad G, Kajiji S, Quaranta V, Freeze HH, Varki A: Sulfated *N*-linked oligosaccharides in mammalian cells. III. Characterization of a pancreatic carcinoma cell surface glycoprotein with *N*- and *O*-sulfate esters on asparagine-linked glycans. *The Journal of biological chemistry*, 263 (18): 8897-8903, 1998
- 15) Yamamoto S, Kinoshita M, Suzuki S: Current landscape of protein glycosylation analysis and recent progress toward a novel paradigm of glycoscience research. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 130: 273-300, 2016
- 16) Matsuda A, Kuno A, Nakagawa T, Ikehara Y, Irimura T, Yamamoto M, Nakanuma Y, Miyoshi E, Nakamori S, Nakanishi H, Viwatthanasittiphong C, Srivatanakul P, Miwa M, Shoda J, Narimatsu H, Lectin Microarray-Based Sero-Biomarker Verification Targeting Aberrant *O*-Linked Glycosylation on Mucin 1. *Analytical chemistry*, 87 (14), 7274-7281, 2015
- 17) Markandran K, Xuan J, Yu H, Shun LM, Ferenczi MA: Mn(2+) -Phos-Tag Polyacrylamide for the Quantification of Protein Phosphorylation Levels. *Current protocols*, 1 (8): e221, 2021
- 18) Yamada K, Kayahara H, Kinoshita M, Suzuki S: Simultaneous Analysis of Sulfated and Phosphorylated Glycans by Serotonin-Immobilized Column Enrichment and Hydrophilic Interaction Chromatography. *Analytical chemistry*, 90 (14): 8387-8395, 2018
- 19) Yamada K., Suzuki K, Hirohata Y, Kinoshita M: Analysis of Minor Acidic *N*-Glycans in Human Serum. *Journal of proteome research*, 19 (8): 3033-3043, 2020
- 20) Garcia-Ayllon MS, Botella-Lopez A, Cuchillo-Ibanez I, Rabano A, Andreasen N, Blennow K, Avila J, Saez-Valero J: HNK-1 Carrier Glycoproteins Are Decreased in the Alzheimer's Disease Brain. *Mol Neurobiol*, 54 (1): 188-199, 2017
- 21) Wang JR, Gao WN, Grimm R, Jiang S, Liang Y, Ye H, Li ZG, Yau LF, Huang H, Liu J, Jiang M, Meng Q, Tong TT, Huang HH, Lee S, Zeng X, Liu L, Jiang ZH: A method to identify trace sulfated IgG *N*-glycans as biomarkers for rheumatoid arthritis. *Nat Commun*, 8 (1): 631, 2017
- 22) Hu DG, Mackenzie PI, McKinnon RA, Meech R: Genetic polymorphisms of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) genes and cancer risk. *Drug Metab Rev*, 48 (1): 47-69, 2016
- 23) Margailan G, Rouleau M, Fallon JK, Caron P, Villeneuve L, Turcotte V, Smith PC, Joy MS, Guillemette C: Quantitative profiling of human renal UDP-glucuronosyltransferases and glucuronidation activity: a comparison of normal and tumoral kidney tissues. *Drug Metab Dispos*, 43 (4): 611-619, 2015
- 24) Higashi K, Asano K, Yagi M, Yamada K, Arakawa T, Ehashi T, Mori T, Sumida K, Kushida M, Ando S, Kinoshita M, Kakehi K, Tachibana T, Saito K: Expression of the clustered NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  *O*-glycan determines the cell differentiation state of the cells. *The Journal of biological chemistry*, 289 (37): 25833-25843, 2014
- 25) Yamada K, Hirabayashi J, Kakehi K: Analysis of *O*-glycans as 9-fluorenylmethyl derivatives and its application to the studies on glycan array. *Analytical chemistry*, 85 (6): 3325-333, 2013
- 26) Yamada K, Kinoshita M, Hayakawa T, Nakaya S, Kakehi K: Comparative studies on the structural features of *O*-glycans between leukemia and epithelial cell lines. *Journal of proteome research*, 8 (2): 521-537, 2009
- 27) Yamada K, Higashi K, Nagahori H, Saito K: Circulating natural antibodies against 3'-sialyllactose complement the diagnostic performance of CA19-9 for the early detection of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 27 (1): 121-128, 2020