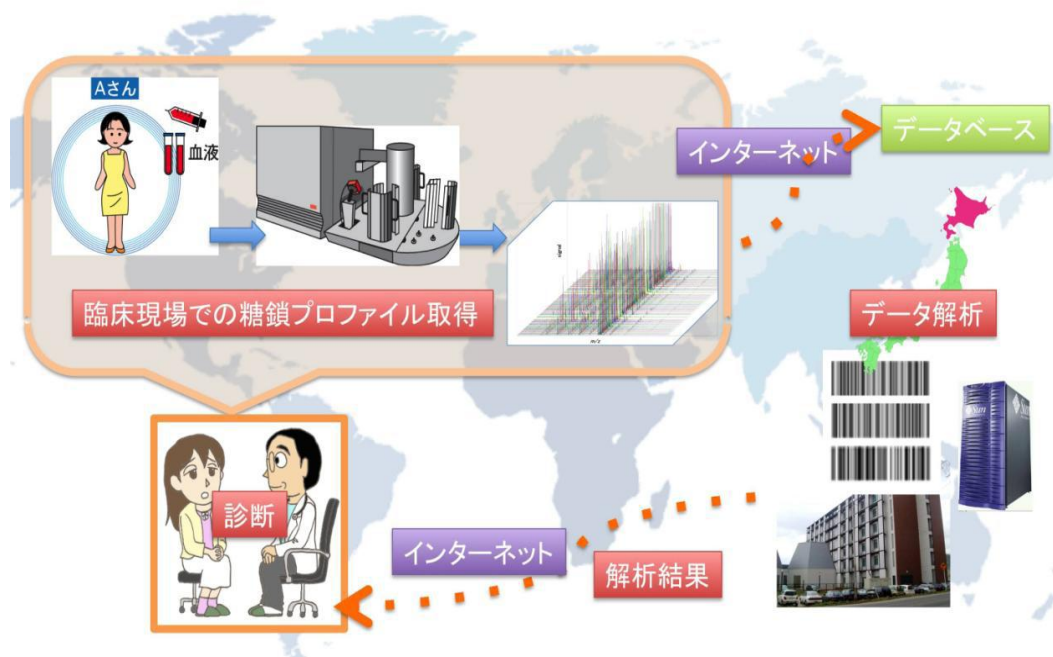


全自動糖鎖プロファイル診断システムの開発

実証・実用化開発の目標：

JST先端計測分析技術・機器開発事業機器開発プログラム「疾患早期診断のための糖鎖自動分析装置開発」で開発された糖鎖自動前処理装置(装置名SweetBlot[®])をプロトタイプ機として、さらに測定・解析装置部を統合させることにより、血清試料から糖鎖を精製・分析し、糖鎖の定量的発現プロファイルに基づいて診断情報を与えることが可能な全自動糖鎖プロファイル解析装置を開発し、さらに取得したデータの処理から管理までを一括するソフトウェア環境を開発することを目標としている。

糖鎖プロファイルによるグローバル診断システム



(出典：JST先端計測分析技術・機器開発プログラム 北海道大学西村研究室資料より)



平成23年11月1日

システム・インスツルメンツ株式会社
北海道大学
科学技術振興機構（JST）

生体試料から糖鎖を自動抽出する装置の実用化に成功

JST 研究成果展開事業（先端計測分析技術・機器開発プログラム）の一環として、システム・インスツルメンツ株式会社と北海道大学大学院先端生命科学研究院の開発チームは、生体試料から糖鎖^{注1)}のみを自動で抽出できる装置の実用化に成功しました。この装置は、遊離の糖鎖分子が持つヘミアセタールと呼ばれる部分とヒドラジド・オキシアミン担持ポリマー^{注2)}が化学的に結合する反応を利用して、様々な分子が混在した生体試料の中から糖鎖だけを選択的に抽出するグライコプロテイング法^{注3)}を自動化したものです。補足した糖鎖は切り離したのちに質量分析で糖鎖を測定しますが、測定のためレーザーを当てイオン化する場合、一部の糖鎖の脱落や他のイオンの付加などが起こり、定量性が失われる事がありますが簡易な修飾法を検討した結果、定量性を維持したまま種々の糖鎖の一斉解析が可能となりました。従来、糖鎖を分析するには手作業で糖鎖の抽出を行っていたため、1検体を分析するには3日間もの時間を要していました。本装置では、96検体を半日で処理できる上、従来法と比較して2倍にのぼる種類の糖鎖を検出できます。

糖鎖は、細胞の分化・成長や臓器形成、免疫及び老化などの基本的な生命現象や病気において、広く深く関わっています。たとえば、癌や糖尿病をはじめとする多くの疾患に罹患すると、糖鎖の構造が変化します。こうした糖鎖の変化を網羅的に研究する分野はグライコミクスと呼ばれており、成長・疾病・感染症などが起こるメカニズムの解明や、診断などに役立つと考えられています。しかし、従来から行われてきた糖鎖の精製操作は非常に難しく、熟練した研究者が数日かけて作業する必要がありました。そのため、糖鎖研究の重要性が知られていたにもかかわらず、糖鎖を研究する研究者も限られ、グライコミクス分野の研究もなかなか進みませんでした。開発した糖鎖自動抽出装置は、血清から全自動で迅速かつ網羅的に糖鎖抽出を行うことができます。北海道大学大学院先端生命科学研究院の西村 紳一郎教授は、本装置を用いて腎癌^{文献3)}などの疾患に関連する糖タンパク質由来の糖鎖を解析したところ、腎癌患者において血清N-結合型糖鎖に特徴的な変化が生じていることが分り、臨床病期、腎摘除術後の再発・転移などに関連する糖鎖構造も同定されました。

本成果は、疾患関連糖鎖データベースをもとにして疾患予測・判定する際のアルゴリズムの開発なども含めて臨床検査機器としての全自動糖鎖解析システムの展開も期待されます。

本開発成果は、以下の開発課題によって得られました。

事業名：JST 研究成果展開事業（先端計測分析技術・機器開発プログラム）
プロトタイプ実証・実用化タイプ

開発課題名：「全自動糖鎖プロファイル診断システムの開発」

チームリーダー：濱田 和幸（システム・インスツルメンツ株式会社 取締役社長）

サブリーダー：西村 紳一郎（北海道大学 大学院先端生命科学研究院 新薬探索研究分野 教授）

開発期間：平成21～23年度

担当開発総括：尾形 仁士（三菱電機エンジニアリング株式会社 相談役）

JSTはこのプログラムのプロトタイプ実証・実用化タイプで、プロトタイプ機の性能の実証ならびに高度化・最適化、あるいは汎用化するための応用開発を行い、実用化可能な段階まで仕上げることを目的としています。

<開発の背景と経緯>

タンパク質や脂質に共有結合している糖鎖は、細胞の分化、臓器形成、老化、免疫さらに疾患（病態）を含む多くの生命現象において重要な役割を担っています。糖鎖の構造は、疾患（病態）を含む様々な環境要因によって敏感に影響されます。糖鎖はタンパク質と違って、その構造自体が短時間のうちに変化します。例えば、あるタンパク質に糖鎖が結合している（糖タンパク質）場合、タンパク質そのものに変化はなくても、それを修飾している糖鎖の構造は様々です。これは、同じ糖タンパク質であっても、成長の過程や疾病の有無などに応じて、修飾する糖鎖の構造に違いがあることを示します。このように変化の顕著な糖鎖を網羅的に分析し、「いつ、どこで、どのように」糖鎖構造が変化したのかを分析すれば、極めて感度の良いバイオマーカー^{注4)}を発見できると期待されます。例えば、血清中の主要な糖タンパク質由来のN-グリカン^{注5)}と呼ばれる分子のプロファイルから、多くの疾患の早期発見や病態観察、予後の予測などが可能となることがわかってきました。これを受け、臨床の現場でも導入可能な「実用的な自動糖鎖解析システム」が求められています。

糖鎖を分析するためには、糖鎖のみをより分け、かつ必要な量を確保することが不可欠です。しかし、糖鎖の場合は分子を直接増幅させる方法はありません。そのため、糖鎖の構造解析や定量化を行うには、血液、尿、組織や細胞などの生体試料から、分析に必要な量以上の糖鎖を直接精製しなければなりません。北海道大学の西村 紳一郎教授をリーダーとする開発チームは、アミノオキシ基やヒドラジド基を表面にもつ担体（ビーズ）はアルデヒド基を速やかに吸着する性質があること、また多くの生体分子のうち、分子内にアルデヒド基を持つのはほぼ遊離の糖鎖だけであることを見出しました。この原理を利用し、生体試料中のアルデヒド化合物群を選択的に捕捉することで糖鎖のみが特異的に回収できる「グライコブロットティング (Glycoblotting) 法」を開発しました。

平成16～21年度にJSTの「研究成果展開事業（先端計測分析技術・機器開発プログラム）（現事業名）」 機器開発タイプで実施した「疾患早期診断のための糖鎖自動分析装置開発」では、グライコブロットティング法を利用した糖鎖自動抽出装置の試作機を開発しました。この試作機について同プログラムのプロトタイプ実証・実用化タイプで使い勝手や温度・湿度の管理など、実用機としての安定性を高めました。さらに現在、糖鎖自動抽出から質量分析までの工程を全自動化した装置の開発を進めています。

<開発の内容>

血清のような生体由来の試料には、糖タンパク質の他、核酸や脂質などの様々な分子が含まれています。グライコブロットティング法では、まず、分析対象である糖鎖からタンパク質を切り離します。切り出した糖鎖にはアルデヒド基が含まれています。これと特異的に反応して共有結合するアミノオキシ基やヒドラジド基を持ったビーズを試料に混合すると、切り離された糖鎖のみが化学的にビーズに結合します。このビーズを洗浄すると、結合した糖鎖以外の分子を完全に除去することができます。こうして捕まえた糖鎖は、選択的な条件でビーズから切り離すことができるので、質量分析によって糖鎖のみを分析することが可能です。また、糖鎖を切り出す効率の最適化、ブロットティング担体の改良、糖鎖捕獲用ビーズ上でのメチル化、MALDI-TOFMS測定感度を向上させるため、オキシム^{注6)} 交換反応等でタグ^{注7)}を導入する方法もそれぞれ開発しました（図1）。開発した糖鎖自動抽出装置は、これらの一連の反応を全自動で行います。

本装置を用いることにより、従来の解析方法では1検体測定するのに3～4日掛かっていたのが、96検体を半日で測定可能となりました。これは、従来法と比較して数百倍もの速さで糖鎖分析が可能となったことを示します。また、検出できる糖鎖数も従来法では25種類であったのに対し、51種類も検出できるようになりました（表1）。

実際に、糖鎖自動抽出装置を使って健常者20人と肝細胞癌患者83人の血清を分析し、網羅的に糖鎖の分析を行いました。各人の血清から、3つの糖鎖について得られたイオン強度の比を取り、データ解析を行ったところ、健常群と疾患群を100%区別できることを見出しました（図2）。

また、大規模解析用の糖鎖自動抽出装置の一部の機能に特化した小型の汎用機（写真2）も開発しました。これは試料数の少ない研究者向けの装置で、最大96個までの試料を同時に化学修飾することが可能です（表2）。

<今後の展開>

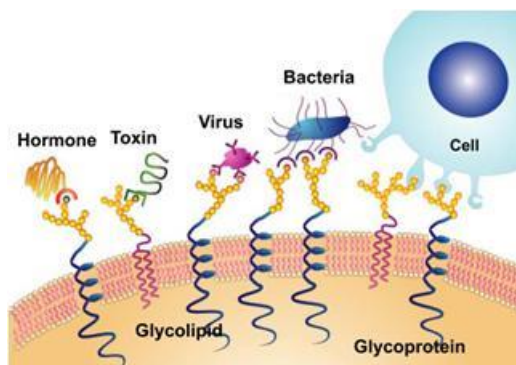
糖鎖自動抽出装置を用いることで網羅的な糖鎖解析であるグライコミクスを進めることが可能となりました。本装置は、糖鎖が関与していると考えられていたにもかかわらず、研究が進んでいなかった分野の発展に、大きく寄与することが期待されます。具体的には、再生医療分野における細胞の品質管理、あるいは抗体医薬などのバイオ医薬品の品質管理などへの応用を目指します。

また、今回開発した糖鎖自動抽出装置と質量分析装置を一体化し、抽出・解析工程を全自動化した装置（全自動型糖鎖解析装置）の開発によって、測定対象の血清を装置にセットするだけで、翌日には糖鎖解析の結果を出すことが可能となります。今後は臨床検査分野への展開を図り、糖鎖プロファイル情報が従来とは全く性質の異なる臨床検査値として健康診断や治療の予後診断などに活用され、個の医療（テーラーメイド医療）の普及・浸透に大きく貢献することを目指します。

<用語解説>

注1) 糖鎖

細胞などの表面にあり、アンテナのような働きをしていて、その先端が触れることで様々な情報を細胞内に取り入れる。例えば、免疫細胞では、細菌やウイルス、毒素、癌細胞、その他様々な異物がやって来た時、そのアンテナの先端が触れることで情報を取り入れてそれが何者なのかを判断している。また最も重要なホルモン情報も、糖鎖のアンテナが取り入れる。また、細胞同士も、アンテナが触れ合うことで、互いに話し合いをしている。細胞同士が連絡し合うことで、初めて正常に働けるようになる。また、神経細胞の表面に糖鎖がないと脳のネットワークがうまく作れない。

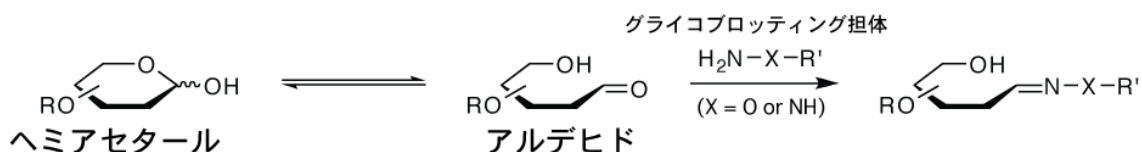


注2) ヒドラジド・オキシアミン担持ポリマー

ヒドラジド (RCONHNH_2) またはオキシアミノ (RONH_2) を先端に有するポリマー。グライコブロットティング用担体として用いている。

注3) グライコブロットティング法

生体内においてアルデヒド (=ヘミアセタール) を持つ分子はほぼ遊離の糖鎖だけなので、アルデヒドを選択的に捕捉すれば糖鎖を特異的に回収できるという原理に基づいている。



注4) バイオマーカー

様々な生理的な状態、疾患の病態の変動や、様々な治療に対する反応などと相関する血液、尿、組織などの生体試料から得られる客観的な指標である。例えば、健康診断などで調べる肝臓のGOTやGTPの値やがんマーカーなどはバイオマーカーである。

注5) N-グリカン

糖タンパク質糖鎖にはN-結合型糖鎖 (N-グリカン) とO-結合型糖鎖 (O-グリカン) があり、アスパラギン (Asn) の側鎖に結合しているのをN-グリカンという。なお、O-グリカンはセリン (Ser)/スレオニン (Thr) の側鎖に結合している。

注6) オキシム

オキシム (oxime) は分子内に >C=N-OH で表される構造を有する有機化合物。

注7) タグ

目印を付けること。蛍光標識などを付け、感度を上昇させる。

<参考文献>

- 1) 西村紳一郎:「全自動糖鎖解析システムの開発—臨床検査バイオマーカーとしての糖鎖の可能性—」、医療と検査機器・試薬 第34巻第1号 (2011年2月) 別冊 機器・試薬 34 (1): 53~60, 2011
- 2) Nishimura S.-I, *et al.* High-throughput protein glycomics: combined use of chemoselective glycoblotting and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2005) 44, 91-96.

3) 畠山真吾. *et al.*

腎細胞癌における血清N-結合型糖鎖の網羅的解析による新規バイオマーカーの検索
日本泌尿器科学会雑誌 (0021-5287) 102巻2号 Page299 (2011. 03)

<参考図>



写真1 大規模解析用の糖鎖自動抽出装置

ヒト血清を96穴プレートにセットすれば、酵素による糖鎖切り出しからグリコプロッティング、洗浄と溶媒置換、さらにビーズ上での化学的変換反応の後、最終的に標識された糖鎖試料はMALDI-TOFMS用のプレート上に点着される。

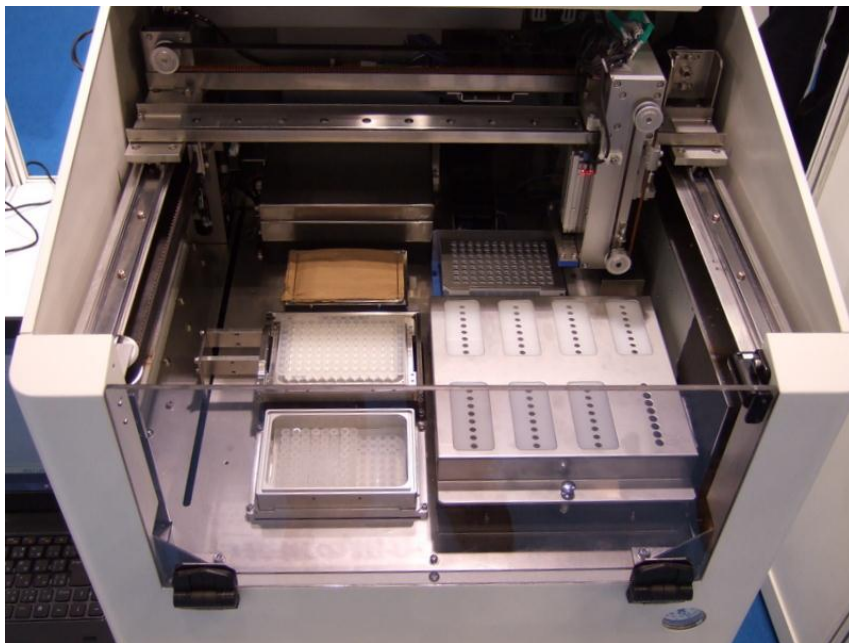


写真2 研究者向け小型汎用機

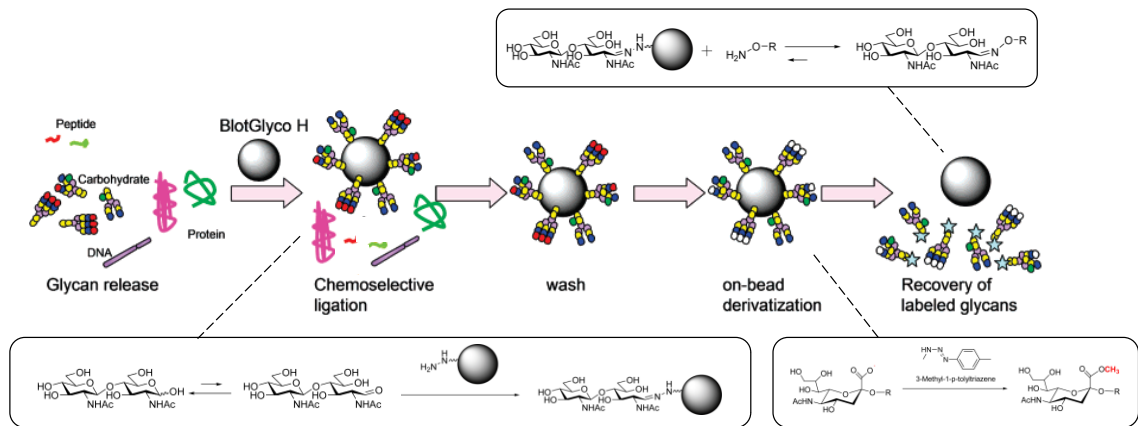


図1 グライコプロット法の原理と基本的なプロトコル

ビーズに捕捉された糖鎖はシアル酸のメチル化、次いで構造解析のための標識化の後に質量分析による構造解析に供せられる。

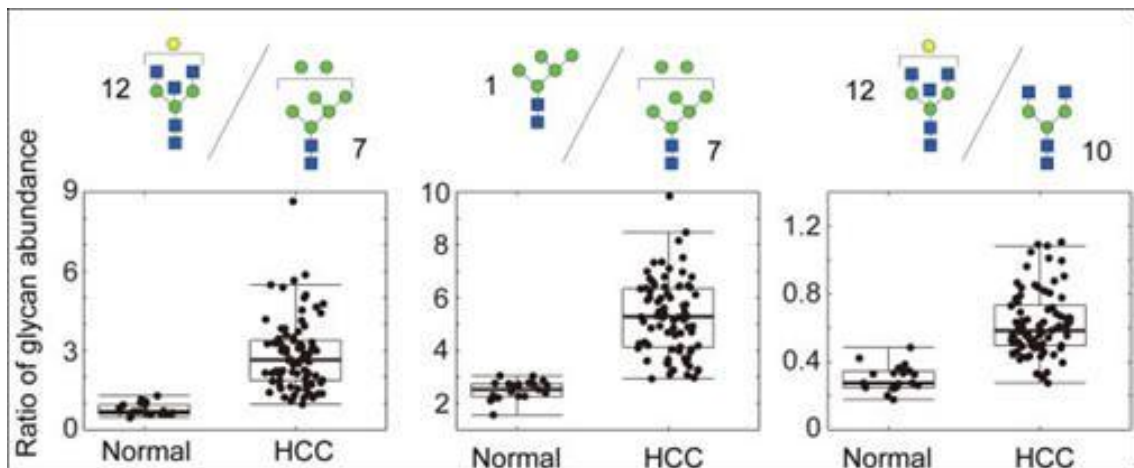


図2 臨床検体の大規模グライコミクス例
多変量解析による患者と健常者の差別化の例

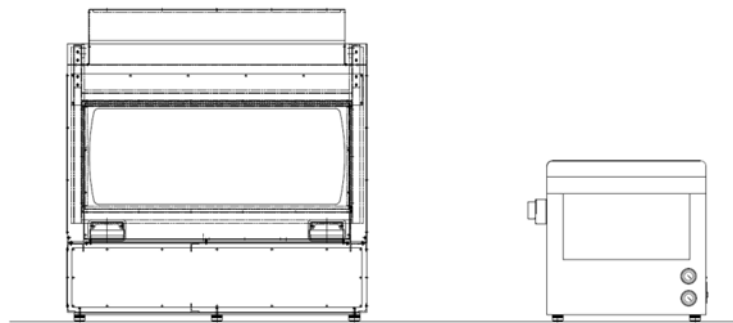
表 1 従来法とGlycoblotting法の比較

手順	従来法	Glycoblotting法
血清からの糖鎖遊離	5 hr (全糖鎖遊離不可)	5 hr (96検体) (全糖鎖遊離)
不純物除去・ラベル化・メチル化・精製・乾燥	3日間	4 hr
分析	2 hr	2 hr (96検体)
合計 (検体処理能力)	3~4日/1検体 (熟練研究者による)	11 hr (96検体) [7 min/1検体] (オペレーターによる)
糖鎖の検出数 (例: ハトの卵白)	25種 Lee Y. C. et al. <i>PNAS</i> , 2004, 24, 9023-9028	51種 Amano M. & Nishimura S., in prep.

従来法より数百倍のスピード

従来法より倍以上検出

表 2 大規模解析用糖鎖自動抽出装置 と 汎用機 との比較



	大規模解析用糖鎖自動抽出装置	汎用機
血清からの糖鎖遊離	5hr(96 検体)	不可
不純物除去・ラベル化・メチル化・精製・乾燥	4hr(96 検体)	4hr (96 検体) (MALDI プレート点着機能無し)
過剰試薬の除去 (HPLC 対応)	不可	0.5hr(96 検体) (2-AB 化)
装置寸法(体積)	1 m ³	0.25 m ³