

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5431360号  
(P5431360)

(45) 発行日 平成26年3月5日(2014.3.5)

(24) 登録日 平成25年12月13日(2013.12.13)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/483	(2006.01)	GO 1 N 33/483	E
GO 1 N 27/62	(2006.01)	GO 1 N 27/62	V
GO 1 N 33/574	(2006.01)	GO 1 N 33/574	B
GO 1 N 30/88	(2006.01)	GO 1 N 30/88	N

請求項の数 8 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2010-541349 (P2010-541349)	(73) 特許権者	000173924 公益財団法人野口研究所 東京都板橋区加賀 1-8-1
(86) (22) 出願日	平成21年12月3日 (2009.12.3)	(74) 代理人	100125748 弁理士 高橋 徳明
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/070311	(72) 発明者	平野 清子 東京都板橋区加賀一丁目8番1号 公益財 団法人野口研究所内
(87) 国際公開番号	W02010/064683	(72) 発明者	中村 紀夫 東京都板橋区加賀一丁目8番1号 公益財 団法人野口研究所内
(87) 国際公開日	平成22年6月10日 (2010.6.10)	(72) 発明者	天野 純子 東京都板橋区加賀一丁目8番1号 公益財 団法人野口研究所内
審査請求日	平成24年11月22日 (2012.11.22)		
(31) 優先権主張番号	特願2008-309012 (P2008-309012)		
(32) 優先日	平成20年12月3日 (2008.12.3)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺癌の判定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者由来の試料中の P S A の糖鎖構造を分析する工程を含み、LacdiNAc ( N - アセチルガラクトサミン - N - アセチルグルコサミン ) を有する糖鎖 ( LacdiNAc ( + ) ) の量が、LacdiNAc を持たないが LacNAc ( ガラクトース - N - アセチルグルコサミン ) を有する糖鎖 ( LacdiNAc ( - ) ) の量の 30 % を超える際に前立腺癌であると判定することを特徴とする前立腺癌を判定するためのデータを提供する方法。

【請求項 2】

被験者由来の試料中の P S A の糖鎖構造を分析する工程を含み、LacdiNAc ( N - アセチルガラクトサミン - N - アセチルグルコサミン ) を有する糖鎖 ( LacdiNAc ( + ) ) の量が、LacdiNAc を持たないが LacNAc ( ガラクトース - N - アセチルグルコサミン ) を有する糖鎖 ( LacdiNAc ( - ) ) の量の 30 % を超える際に前立腺癌であると判定し、30 % 以下である際に良性前立腺肥大症であると判定することを特徴とする請求項 1 に記載の前立腺癌を判定するためのデータを提供する方法。

【請求項 3】

上記 P S A の糖鎖構造の分析を、上記 P S A に対してレクチンを作用させる方法、上記 P S A に対して抗体を作用させる方法、高速液体クロマトグラフィー法もしくは質量分析法、またはこれらを組み合わせた分析手段により行うことを特徴とする請求項 1 に記載の前立腺癌を判定するためのデータを提供する方法。

【請求項 4】

上記 P S A の糖鎖構造の分析を、上記 P S A に対してレクチンを作用させる方法、上記 P S A に対して抗体を作用させる方法、高速液体クロマトグラフィー法もしくは質量分析法、またはこれらを組み合わせた分析手段により行うことを特徴とする請求項 2 に記載の前立腺癌を判定するためのデータを提供する方法。

【請求項 5】

( 1 ) 被験者由来の試料から P S A を精製する工程と、  
 ( 2 ) 工程 ( 1 ) で精製した P S A から P S A 誘導体を調製する工程と、  
 ( 3 ) 工程 ( 2 ) で得られた P S A 誘導体を標識する工程と、  
 ( 4 ) 工程 ( 3 ) で得られた標識化 P S A 誘導体を質量分析法により分析する工程を含み、LacdiNAc の構造の有無に起因する質量差 4 1 で示される一対のシグナルを選定し、LacdiNAc を有する糖鎖 ( LacdiNAc ( + ) ) に由来するシグナルの強度が、LacdiNAc を持たないが LacNAc を有する糖鎖 ( LacdiNAc ( - ) ) に由来するシグナルの強度の 3 0 % を超える際に前立腺癌であると判定することを特徴とする請求項 3 に記載の前立腺癌を判定するためのデータを提供する方法。

10

【請求項 6】

( 1 ) 被験者由来の試料から P S A を精製する工程と、  
 ( 2 ) 工程 ( 1 ) で精製した P S A から P S A 誘導体を調製する工程と、  
 ( 3 ) 工程 ( 2 ) で得られた P S A 誘導体を標識する工程と、  
 ( 4 ) 工程 ( 3 ) で得られた標識化 P S A 誘導体を質量分析法により分析する工程を含み、LacdiNAc の構造の有無に起因する質量差 4 1 で示される一対のシグナルを選定し、LacdiNAc を有する糖鎖 ( LacdiNAc ( + ) ) に由来するシグナルの強度が LacdiNAc を持たないが LacNAc を有する糖鎖 ( LacdiNAc ( - ) ) に由来するシグナルの強度の 3 0 % を超える際に前立腺癌であると判定し、3 0 % 以下である際に良性前立腺肥大症であると判定することを特徴とする請求項 4 に記載の前立腺癌を判定するためのデータを提供する方法。

20

【請求項 7】

上記工程 ( 2 ) において調製される P S A 誘導体が、P S A 由来の糖鎖または P S A 由来の糖ペプチドであることを特徴とする請求項 5 に記載の前立腺癌を判定するためのデータを提供する方法。

【請求項 8】

上記工程 ( 2 ) において調製される P S A 誘導体が、P S A 由来の糖鎖または P S A 由来の糖ペプチドであることを特徴とする請求項 6 に記載の前立腺癌を判定するためのデータを提供する方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、前立腺癌の新規な判定方法に関し、特に前立腺癌と良性前立腺肥大症とを判定する新規な方法に関する。特に本発明は、前立腺特異抗原の糖鎖構造の差異に基づき、前立腺癌と良性前立腺肥大症とを判定する新規な方法に関する。

【背景技術】

【0002】

前立腺癌 ( prostate carcinoma : 以下「 P C 」と称する ) は男性の主要な死亡原因の 1 つである。前立腺特異抗原 ( prostate specific antigen : 以下「 P S A 」と称する ) は P C に対する最も重要な腫瘍マーカーとして認識されている ( たとえば、非特許文献 1 参照 ) 。 P S A は、約 2 6 k D a の分子量を有する 2 3 7 個のアミノ酸残基からなるタンパク部分と、該タンパク部分のアミノ酸残基 ( 4 5 番目の A s n など ) に結合した糖鎖部分とから構成される約 3 0 k D a の分子量を有する糖タンパク質、またはその誘導体である。糖鎖部分は、P S A の分子量の約 8 % を示す。

40

【0003】

P C の初期診断に対する血清 P S A 濃度試験の有用性は既に多くの文献に記載されているが、良性前立腺肥大症 ( benign prostatic hyperplasia : 以下「 B P H 」と称する ) に

50

罹患している男性とPCに罹患している男性との間に、グレーゾーン (gray zone) と呼ばれるPCまたはBPHの何れとも判断できないPSA濃度領域がある (たとえば、非特許文献2参照)。

【0004】

この問題を解決するために、これまでにいくつかの試み (たとえば、PSA密度、PSA勾配 (年間増加度)、遊離PSA / 全PSAの比などによる識別) が実施されてきたが、2つの病変 (lesions) の間にはかなり重複する点がある。

【0005】

最近、コンカナバリンA、植物凝集素E4 (PHA-E4) およびPHA-L4を用いた連続的レクチンアフィニティークロマトグラフィー法を用いた研究において、PSAのアスパラギン (N) に結合する糖鎖の構造が、PC組織とBPH組織との間で相違するという結果が報告された (非特許文献3参照)。この報告は、PSA中のN-結合糖鎖がヒト前立腺における癌化の過程で変化すること、ならびにPSA中のN-結合糖鎖がPCの診断ツールとして役立つ可能性があることを記載している。

【0006】

PSAの構造を検出する方法として、PSAの糖鎖に結合する結合分子を用いるいくつかの免疫学的方法が提案されてきている。たとえば、PSAをレクチンと接触させ、PSAの糖鎖とレクチンとの親和性に基づいて分別されたPSAを測定することによって、PCとBPHとを識別する方法が報告されている (特許文献1参照)。この報告において、PSAの糖鎖とレクチン (イヌエンジュ (Maackia amurensis) レクチンなど) との親和性の差異は、糖鎖末端のシアル酸のコンフォメーションに基づくことと記載されている。しかしながら、PCまたはBPHに罹患した被験者のPSA糖鎖の具体的構造を決定していない。

【0007】

また、PSA中に少なくとも三分岐の糖鎖が存在するかどうかに基づいてPCを検定する方法が報告されている (特許文献2参照)。この方法においては、少なくとも三分岐の糖鎖に結合するが、一分岐および二分岐の糖鎖とは結合しない結合分子を用いることができる結合分子は、レクチン (PHA-Lなど) および抗体を含む。

【0008】

さらに、PSA中のN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の含有量に注目した報告がなされている (非特許文献4参照)。該報告は、PSA糖鎖の構造を詳細に検証し、精漿由来PSA糖鎖におけるGalNAc含有量が25%なのに対し、前立腺癌細胞株 (LNCaP) のPSA糖鎖にはGalNAcが65%程度含まれる事を記載している。この著者らは膀胱ガン由来細胞株 (Capan-1) においても同様の变化を観察しており (非特許文献5参照)、そこからGalNAcの含有量変化は癌性変異に起因するものであると類推している。

【0009】

また、特異的抗体と多数のレクチンからなるアレイを用いてPSAを含む対象タンパク質の糖鎖を網羅的に解析する手法が報告されている (非特許文献6参照)。この方法において、前立腺癌細胞株に由来するPSAの糖鎖構造上の非還元末端にはLacdiNAc構造 (N-アセチルガラクトサミン-N-アセチルグルコサミン構造) が多く存在する事が明らかにされている。しかしながら、PCまたはBPHに罹患した被験者のPSA糖鎖を対象にはしていない。

【0010】

関連して、LacdiNAc構造を癌細胞に特異的に発現されるオリゴ糖配列であると開示し、生物学的試料中に検出されるその存在を指標に癌の検出を行なう方法について特許出願がなされている (特許文献3参照)。しかしながらその検出に関する具体的な手法は記載されておらず、さらにはPCとBPHの判定を対象にしていない。

【0011】

あるいはまた、PSAを含む標的糖タンパク質の糖鎖の糖プロファイルを決定することにより、被験者の臨床状態を評価する方法が提案されている (特許文献4参照)。該文献

10

20

30

40

50

は、MALDI-MS法を用いた解析において、PCに罹患した被験者のPSA糖鎖が、正常なPSA糖鎖とは異なることを記載している。しかしながら、PCに罹患した被験者のPSA糖鎖の具体的構造を記載していない。

【0012】

上記のように、PSA糖鎖構造が疾患により変化するという事象は多数報告されているが、BPHに罹患した被験者のPSA糖鎖の構造に関する詳細な報告は少なく、PC患者においてもPSA糖鎖の網羅的な解析は未だ例を見ない。さらに、具体的な糖鎖構造に基づいてBPHとPCとを判定することは、これまでなされていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【0013】

【特許文献1】特開2002-055108号公報

【特許文献2】特表2000-514919号公報

【特許文献3】特表2005-500057号公報

【特許文献4】特表2006-515927号公報

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】Stamey他, N. Engl. J. Med., 317, 909-916(1987)

【非特許文献2】Catalona他, j. Am. Med. Assoc., 279, 1542-1547(1998)

【非特許文献3】Sumi他, J. Chromatogr. B, 727, 9-14 (1994)

20

【非特許文献4】Peracaula他, Glycobiology, 13(6), 457-470 (2003)

【非特許文献5】Peracaula他, Glycobiology, 13(4), 227-244 (2003)

【非特許文献6】Kuno他, Mol. Cell. Proteomics, 8(1), 99-108 (2009)

【非特許文献7】Tabares他, Glycobiology, 16(2), 132-145 (2006)

【非特許文献8】Bindukumar他, J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci., 813(1-2), 113-120 (2004)

【非特許文献9】Zhang他, Clin. Chem., 41(11), 1567-1573(1995)

【非特許文献10】Okada他, Biochim. Biophys. Acta, 1525(1-2), 149-160 (2001)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0015】

したがって、本発明の課題は、被験者のPSA糖鎖を検出し、特に、BPHまたはPCに罹患した被験者のPSA糖鎖を検出し、PSAの糖鎖構造に基づいて、BPHとPCとを的確に判定する方法などを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者らは、PSA糖鎖において、LacdiNAc構造の存在のみを指標にするのではなく、LacdiNAcを有する糖鎖とLacdiNAcを持たない糖鎖の比率に着目することによって、前立腺癌であることの判定、特に、前立腺癌と良性前立腺肥大症とを判定できることを見出し、本発明を完成した。

40

【0017】

すなわち、本発明は以下の方法である。

[1]

被験者由来の試料中のPSAの糖鎖構造を分析する工程を含み、LacdiNAc(N-アセチルガラクトサミン-N-アセチルグルコサミン)を有する糖鎖(LacdiNAc(+))の量が、LacdiNAcを持たないがLacNAc(ガラクトース-N-アセチルグルコサミン)を有する糖鎖(LacdiNAc(-))の量の30%を超える際に前立腺癌であると判定することを特徴とする前立腺癌の判定方法。

[2]

被験者由来の試料中のPSAの糖鎖構造を分析する工程を含み、LacdiNAc(N-アセチ

50

ルガラクトサミン - N - アセチルグルコサミン) を有する糖鎖 (LacdiNAc (+)) の量が、LacdiNAcを持たないがLacNAc (ガラクトース - N - アセチルグルコサミン) を有する糖鎖 (LacdiNAc (-)) の量の30%を超える際に前立腺癌であると判定し、30%以下である際に良性前立腺肥大症であると判定することを特徴とする [ 1 ] に記載の前立腺癌の判定方法。

[ 3 ]

上記P S Aの糖鎖構造の分析を、上記P S Aに対してレクチンを作用させる方法、上記P S Aに対して抗体を作用させる方法、高速液体クロマトグラフィー法もしくは質量分析法、またはこれらを組み合わせた分析手段により行うことを特徴とする [ 1 ] に記載の前立腺癌の判定方法。

10

【 0 0 1 8 】

[ 4 ]

上記P S Aの糖鎖構造の分析を、上記P S Aに対してレクチンを作用させる方法、上記P S Aに対して抗体を作用させる方法、高速液体クロマトグラフィー法もしくは質量分析法、またはこれらを組み合わせた分析手段により行うことを特徴とする [ 2 ] に記載の前立腺癌の判定方法。

【 0 0 1 9 】

[ 5 ]

( 1 ) 被験者由来の試料からP S Aを精製する工程と、  
 ( 2 ) 工程 ( 1 ) で精製したP S AからP S A誘導体を調製する工程と、  
 ( 3 ) 工程 ( 2 ) で得られたP S A誘導体を標識する工程と、  
 ( 4 ) 工程 ( 3 ) で得られた標識化P S A誘導体を質量分析法により分析する工程を含み、LacdiNAc ( N - アセチルガラクトサミン - N - アセチルグルコサミン ) の構造の有無に起因する質量差 4 1 で示される一対のシグナルを選定し、LacdiNAcを有する糖鎖 (LacdiNAc (+)) に由来するシグナル強度が、LacdiNAcを持たないがLacNAc (ガラクトース - N - アセチルグルコサミン) を有する糖鎖 (LacdiNAc (-)) に由来するシグナル強度の30%を超える際に前立腺癌であると判定することを特徴とする [ 3 ] に記載の前立腺癌の判定方法。

20

【 0 0 2 0 】

[ 6 ]

( 1 ) 被験者由来の試料からP S Aを精製する工程と、  
 ( 2 ) 工程 ( 1 ) で精製したP S AからP S A誘導体を調製する工程と、  
 ( 3 ) 工程 ( 2 ) で得られたP S A誘導体を標識する工程と、  
 ( 4 ) 工程 ( 3 ) で得られた標識化P S A誘導体を質量分析法により分析する工程を含み、LacdiNAc ( N - アセチルガラクトサミン - N - アセチルグルコサミン ) の構造の有無に起因する質量差 4 1 で示される一対のシグナルを選定し、LacdiNAcを有する糖鎖 (LacdiNAc (+)) に由来するシグナル強度がLacdiNAcを持たないがLacNAc (ガラクトース - N - アセチルグルコサミン) を有する糖鎖 (LacdiNAc (-)) に由来するシグナル強度の30%を超える際に前立腺癌であると判定し、30%以下である際に良性前立腺肥大症であると判定することを特徴とする [ 4 ] に記載の前立腺癌の判定方法。

30

40

[ 7 ]

上記工程 ( 2 ) において調製されるP S A誘導体が、P S A由来の糖鎖またはP S A由来の糖ペプチドであることを特徴とする [ 5 ] に記載の前立腺癌の判定方法。

[ 8 ]

上記工程 ( 2 ) において調製されるP S A誘導体が、P S A由来の糖鎖またはP S A由来の糖ペプチドであることを特徴とする [ 6 ] に記載の前立腺癌の判定方法。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 1 】

本発明によれば、上記した問題点と課題を解決できる。すなわち、前立腺特異抗原 ( P S A ) の糖鎖構造を検出し、その構造の差異を基に、前立腺癌であるか否かを的確に判定

50

でき、特に、前立腺癌であるか良性前立腺肥大症であるかを的確に判定する方法を提供できる。

【0022】

具体的には、上記のような工程を採ることによって、血清などの中のP S A濃度がほぼ同レベルの被験者についても、そのP S A糖鎖に含まれる一連のLacdiNAc(+)糖鎖構造およびLacdiNAc(-)糖鎖構造のシグナル強度比百分率R値を測定することによって、P CとB P Hとを高精度で識別判定できる。また、P CおよびB P Hの両方において、LacdiNAc(+)/LacdiNAc(-)のシグナル強度比百分率R値は、血清P S A濃度に相関せず、P Cにおいては少なくとも閾値Rより大きく、B P Hにおいては閾値R以下であるため、P S A濃度によらず閾値Rの数値を設定するだけで、高精度でP Cか否かを判定できる。

10

【0023】

したがって、現行のP Cのスクリーニングに繁用されている血清中P S A濃度を測定する方法において高いP S A値(例えば、4 ng/mL以上)を示し、苦痛な2次検査である針生検を受けていた被験者についても、本発明を適用することによって、不必要な検査を回避することができる。

【0024】

また、血清中P S A濃度は年齢とともに上昇する傾向があることが知られている。よって、特に、今後の高齢化社会において、高精度でP Cか否かを判定し、特にP CとB P Hとを判定する本発明手法は、医学的な貢献のみならず、医療経済にも良好な効果を奏する。

20

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】実施例1で得られたネガティブイオンMSスペクトルを示す図である。

【図2】実施例1において $m/z = 2118$ で得られたシグナル $P_{2I}$ をプリカーサーイオンとして得られるネガティブイオンMS/MSスペクトルを示す図である。

【図3】実施例4で得られたポジティブイオンMSスペクトルを示す図である。

【図4】実施例5で得られたポジティブイオンMSスペクトルを示す図である。

【図5】実施例6で得られたポジティブイオンMSスペクトルを示す図である。

【図6】実施例7で得られたポジティブイオンMSスペクトルを示す図である。

30

【発明を実施するための形態】

【0026】

以下、本発明について説明するが、本発明は以下の実施の具体的態様に限定されるものではなく、任意に変形して実施することができる。

【0027】

本発明に係るP Cの判定方法、特にP CとB P Hとの判定方法は、対象をレクチン、特異的抗体といった特異的結合分子、高速液体クロマトグラフィー、質量分析法、あるいはその組み合わせにより分析する工程において、標準閾値 $R_{(S)}$ を適応した際に、該検出対象のLacdiNAc(+)糖鎖構造を含む集合がLacdiNAc(-)糖鎖構造を含む集合の30%を超える際に前立腺癌であると判定し、特に30%以下である際に良性前立腺肥大症であると判定する事を特徴とする。

40

【0028】

本発明においては、「N-アセチルガラクトサミン-N-アセチルグルコサミン」を「LacdiNAc」と略記し、「ガラクトース-N-アセチルグルコサミン」を「LacNAc」と略記する。また、LacdiNAcを有する糖鎖を「LacdiNAc(+)」と略記し、LacdiNAcを有さないがLacNAcを有する糖鎖を「LacdiNAc(-)」と略記する。

また、本発明において用いられる「被験者由来の試料」は、血液(血清、血漿などを含む)、尿、精液(精漿)などの体液、細胞・組織などを含む。

【0029】

特に好ましくは、本発明に係るP Cの判定方法、特にP CとB P Hとの判定方法は、質

50

量分析法により分析する工程において、

- (1) 被験者由来の試料から P S A を精製する工程と、
- (2) 工程 (1) で精製した P S A から P S A 誘導体を調製する工程と、
- (3) 工程 (2) で得られた P S A 誘導体を標識する工程と、を含み、
- (4) 工程 (3) で得られた標識化 P S A 誘導体を分析し、標準閾値  $R_{(S)}$  を適応した際に、該標識化 P S A 誘導体中の LacdiNAc ( + ) 糖鎖構造に由来するシグナル強度が、LacdiNAc ( - ) 糖鎖構造に由来するシグナル強度の 30 % を超える際に前立腺癌であると判定する事を特徴とし、特に 30 % 以下である際に、前立腺癌ではない、または良性前立腺肥大症であると判定する事を特徴とする。

【 0 0 3 0 】

工程 (1) において、被験者由来の試料から、P S A を精製する。工程 (1) は、当該技術において知られている任意の方法で実施することができる。

【 0 0 3 1 】

あるいは、工程 (1) において被験者由来の血清を試料として用いる場合、数種のアフィニティークロマトグラフィーを組み合わせた方法を用いることができる。たとえば、被験者由来の血清に対して、親イオウ吸着に基づくアフィニティ担体であるフラクトゲル (Fractogel) (登録商標) EMD TA) や Cibacron Blue 3GA など、あるいは、プロテイン A セファロース CL-4B、HiTrap ヘパリンカラム H P L C などを行う (非特許文献 7 参照)。その溶離液をエタノールアミンで処理して、遊離の P S A を得る。得られた P S A を前述の免疫沈降法を用いて処理し、P S A 誘導体を得る。前述の文献によれば、得られた P S A 誘導体の解析を行うために、被験者由来の試料中に約 63  $\mu$ g の P S A が必要であった。

【 0 0 3 2 】

さらに、工程 (1) における試料として被験者由来の血清以外を用いる場合、工程 (1) の親イオウ吸着に基づく親和性担体を用いて、P S A の精製を実施することができる (非特許文献 8 参照)。たとえば、3S,T-gel スラリー (フラクトゲル (登録商標) EMD TA) を用いるクロマトグラフィーによって、ヒト精液、前立腺癌患者の血清、前立腺癌細胞 (L N C a P) 培養液の上清から P S A を精製し、ウェスタンブロット法を用いて、P S A 単体または 1 - アンチキモトリプシン (A C T) などとの複合体を同定することができる。

【 0 0 3 3 】

あるいはまた、被験者由来の精液を試料として用いる場合、親イオウ吸着に基づくアフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過を組み合わせることによって、P S A を精製してもよい (非特許文献 8 参照)。たとえば、フラクトゲル (登録商標) TA 650(S) と、ゲル濾過担体である Ultrogel AcA-54 とを組み合わせることができる。この組み合わせ方法では、遊離の P S A を 72 % の収率で回収することができた。

【 0 0 3 4 】

あるいはまた、工程 (1) における試料として被験者由来の精液を用いる場合、以下の方法を用いて P S A の精製を行うことができる (非特許文献 9 および 10 参照)。たとえば、硫酸アンモニウムの添加による沈殿、疎水性相互作用クロマトグラフィー (Phenyl-S epharose-HP カラム)、ゲル濾過 (Sephacryl S-200 カラム)、およびアニオン交換クロマトグラフィー (Resource Q カラム) を順次行うことによって、P S A を精製することができる。この方法において、試料中に 33.9 mg の P S A が含まれる場合、最終的な P S A の回収率が 30.1 % であったことが報告されている。

【 0 0 3 5 】

さらに、工程 (1) における試料として被験者由来のアンドロゲン依存性の L N C a P を用いる場合、限外濾過と各種クロマトグラフィーとを組み合わせた方法によって、P S A を精製することができる (非特許文献 5 参照)。たとえば、適切な手段で培養した L N C a P を含む培養液の限外濾過 (5 k D a カットオフ・ポリスルホン膜 (Millipore))、アフィニティークロマトグラフィー (Cibacron Blue 3GA)、ゲル濾過 (Biogel P60)、

10

20

30

40

50

アフィニティークロマトグラフィー (Cibacron Blue 3GA)、および逆相クロマトグラフィー (214TP-RP C4、HPLC使用) を順次行うことによって、P S Aを精製することができる。

【0036】

次いで、工程(2)において、精製されたP S AからP S A誘導体を調製する。本発明における「P S A誘導体」とは、P S A由来の糖鎖または糖ペプチドを意味し、具体的には、P S Aから分離される糖鎖または糖ペプチドを意味する。たとえば、P S Aに対して、エンドプロテアーゼ(サーモリシン、エンドプロテイナーゼArg-C、エンドプロテイナーゼLys-C、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、プロリン特異的エンドペプチダーゼ、プロテアーゼV8、プロテイナーゼK、アミノペプチダーゼM、カルボキシ

10

【0037】

別法として、P S Aを酵素的に処理して遊離の糖鎖を形成してもよい。あるいはまた、P S Aから誘導された前述の糖ペプチドを酵素的に処理して遊離の糖鎖を形成してもよい。このようにして得られた糖鎖を工程(3)で使用してもよい。この酵素的処理においては、たとえば、ペプチドN-グリカナーゼ(PNGase F、PNGase A)、エンドグリコシダーゼ(EndoH、EndoF)、および/または、1つまたは複数のプロテアーゼ(トリプシン、エンドプロテイナーゼLys-Cなど)を用いることができる。あるいはまた、P S AまたはP S Aから誘導された糖ペプチドを化学的手段(無水ヒドラジンによる分解、還元的または非還元的-脱離など)を用いて処理して、遊離の糖鎖を形成してもよい。このようにして得られる遊離の糖鎖を、以下の工程(3)で使用してもよい。また、シアリダーゼ処理または酸加水分解を行なってシアリ酸を除去した糖鎖または糖ペプチドを用いてもよい。

20

【0038】

また、工程(1)の最終段階で電気泳動を行い、P S Aのバンドを切り出した場合、切り出したバンドに対して上記の反応剤を作用させてゲル内消化を行い、糖ペプチドおよび/または糖鎖を生成してもよい。

【0039】

工程(3)において、P S A誘導体を標識する。標識化合物としては、ナフタレン、アントラセン、ピレンなどの縮合多環炭化水素部分と、分析対象の分子と結合することが可能である反応性官能基と、必要に応じて該縮合多環炭化水素部分と該反応性官能基とを連結するスペーサー部分とを有する化合物を用いることができる。

30

【0040】

縮合多環炭化水素部分は、好ましくはピレンである。反応性官能基は、シアリ酸のカルボキシ基または糖の還元末端との反応性を有し、たとえばジアゾメチル基、アミノ基、ヒドラジド基などを含む。スペーサー部分は、たとえば直鎖または分岐状のアルキレン基などを含む。本発明において用いることができる標識化合物は、1-ピレニルジアゾメタン(PDAM)、1-ピレンブタン酸ヒドラジド(PBH)、1-ピレン酢酸ヒドラジド、1-ピレンプロピオン酸ヒドラジド、アミノピレン(構造異性体を含む)、1-ピレンメチルアミン、1-ピレンプロピルアミン、1-ピレンブチルアミンなどを含む。最も好ましく用いられる標識化合物は、PDAMである。

40

【0041】

工程(3)は、P S A誘導体および標識化合物を混合し、加熱することによって行うことができる。加熱は、たとえば40~50の範囲内の温度で実施することができる。任意選択的に、水溶性カルボジイミドまたはN-ヒドロキシスクシンイミドなどの促進剤の存在下で、標識を行ってもよい。より好適には、MALDI法にて用いられるターゲットプレート上にP S A誘導体の溶液を滴下して乾燥させ、その上に標識化合物の溶液を滴下して加熱乾燥させることによって、標識を実施することができる。

【0042】

50

本発明は、標識された P S A 誘導体を質量分析法により分析する方法に関する。以下、「質量分析法による分析」を「M S 分析」と略記することがある。工程 ( 4 ) の M S 分析において用いることができるイオン化部は、マトリクス支援レーザー脱離イオン化 ( M A L D I ) 型、またはエレクトロスプレーイオン化 ( E S I ) 型の装置を含む。

【 0 0 4 3 】

本発明においては、ピレンなどの縮合多環炭化水素基を結合することによって、M A L D I 法における標識された P S A 誘導体のイオン化効率が、未標識の P S A 誘導体と比較して向上する。また、本発明の標識された P S A 誘導体は、E S I 法の適用がより容易である。なぜなら、P S A 誘導体は親水性が高く、E S I 法に用いる試料の有機溶液を得るのが困難であるのに比較して、本発明の標識された P S A 誘導体は、縮合多環炭化水素基の導入によって有機溶媒に可溶性となっているためである。

10

【 0 0 4 4 】

工程 ( 4 ) の M S 分析において用いることができる分離部は、飛行時間型 ( T O F 型 ) 、二重収束型、四重極収束型などの当該技術において知られている任意の装置を含む。特に、M S <sup>n</sup> ( n = 2 ) 分析を行うことを考慮して、イオントラップを有する装置を用いることが便利である。特に好適な装置は、四重極イオントラップ - 飛行時間型 ( Q I T - T O F ) である。ここで、飛行時間型装置として、リニア型、リフレクトロン型または周回型のいずれの装置を用いてもよい。

【 0 0 4 5 】

次いで、得られた M S スペクトルにおいて、LacdiNAc 構造の存在 / 非存在に起因する、1 分子の N - アセチルガラクトサミン ( GaINAc ) / ガラクトース ( Gal ) 置換に相当する質量差 4 1 のシグナル P 1 および P 2 の対を選定する。ここで、P 2 は GaINAc 置換糖鎖 ( LacdiNAc ( + ) 糖鎖 ) に相当するシグナルを意味し、P 1 は GaINAc 非置換糖鎖 ( LacdiNAc ( - ) ) に相当するシグナルを意味する。そして、LacdiNAc ( - ) 糖鎖に相当するシグナルの強度 S ( P 1 ) 、および、LacdiNAc ( + ) 糖鎖に相当するシグナルの強度 S ( P 2 ) を求め、そのシグナル強度比百分率 R 値を下記式で計算する。なお、本発明における「シグナル強度」は、例えば、M S スペクトルにおける、モノアイソトピック質量シグナル、最大強度質量シグナル、モノアイソトピック質量シグナル及び同位体イオンシグナルにおける任意の選択の和、あるいはその平均の強度などを挙げることができる。

20

以下、「シグナル強度比百分率 R 値」を単に「R 値」と略記する場合がある。

30

$$R \text{ 値} = [ S ( P 2 ) / S ( P 1 ) ] \times 1 0 0$$

【 0 0 4 6 】

標準閾値 R ( <sub>s</sub> ) = 3 0 % を適応した際、得られた R 値が 3 0 % より大きい場合、「被験者が P C に罹患している。」と判定し、得られた R 値が 3 0 % 以下である場合、「被験者が P C に罹患していない。」または「B P H に罹患している。」と判定する。閾値 R は標準閾値 R ( <sub>s</sub> ) = 3 0 % を基準に該判定対象の量に起因する検出感度および / または判定精度に関連して、上下 1 0 % 程度の幅で設定する事ができる。閾値 R は高精度判定であれば 2 0 % 程度、該判定対象が微量である場合には 4 0 % 程度に設定する事が好ましい。

【 0 0 4 7 】

本工程において得られる M S スペクトルにおいて、質量差 4 1 の複数のシグナルの対を選定して、上記の判定手順を実施してもよい。あるいはまた、標識化合物および / またはシアル酸残基などが質量分析装置中で脱離したシグナル中で、質量差 4 1 のシグナルの対を選定し、上記の判定手順を実施してもよい。

40

【 0 0 4 8 】

本発明は、上記したように、被験者由来の試料中の P S A の糖鎖構造を質量分析法により分析する前立腺癌の判定方法であると共に、上記の P S A の糖鎖構造の分析を、上記の P S A に対してレクチンを作用させる方法、上記の P S A に対して抗体を作用させる方法、高速液体クロマトグラフィー法もしくは上記した質量分析法、またはこれらを組み合わせた分析手段により行う前立腺癌の判定方法でもある。

【 0 0 4 9 】

50

本発明における「PSA」とは、被験者由来の試料そのものでもよいし、それから抽出したり精製したりしたものでよい。さらに、「PSA」は、アンチキモトリプシンなどと複合体を形成したPSAでもよいし、遊離PSAでもよいし、それらから調製した糖鎖、糖ペプチドでもよい。

【0050】

本発明は、PSAの分析手段として、高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」と略記する場合がある）を用いる方法に関する。例えば、Amideカラムなどに代表される順相HPLCにより検出対象の分子量に依存した分離、あるいはODSカラムなどに代表される逆相HPLCにより検出対象の構成糖鎖配向に依存した分離を行なう。分析で得られるクロマトグラムから、LacdiNAc(+)糖鎖およびLacdiNAc(-)糖鎖に相当するピークの対を選択し、そのピーク高さまたは面積から算出したR値により判定をおこなう。検出には任意の吸光波長を用いることができ、あるいは選択した標識化合物に特定の蛍光波長を用いることができる。

10

【0051】

あるいは、本発明は、PSAに対して特異的結合分子を作用させ、その組み合わせによる分析手法を用いる方法に関する。特異的結合分子は、数種のレクチン、抗体およびそれらの断片を含む。例えば、ELISAプレート、ポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜、ガラスあるいはシリコン製アレイチップなどに固相化した検出対象に特異的結合分子を反応させ、LacdiNAc構造、および対象物全体を定量的に検出する。

【0052】

検出には、アルカリフォスファターゼやホースラデッシュペルオキシダーゼといった酵素を結合させたレクチンや抗体を用い、酵素反応を介してプロモクロロインドリルリン酸(BCIP)またはニトロブルーテトラゾリウム(NBT)を用いた化学発色、あるいはルミノール試薬を用いた化学発光を用いることができ、あるいはまた、表面プラズモン共鳴を用いることができる。関連して、固相化した特異的結合分子に対して該検出対象を結合させ、そこに別種の特異的レクチン、または特異的抗体を反応させて、一連の検出を行う事ができる。本発明では、「特異的抗体」を単に「抗体」と、「特異的レクチン」を単に「レクチン」と略記する場合がある。

20

【0053】

特異的結合分子としてレクチンを用いる場合、例えば、非還元末端GalNAcを認識するWFAレクチン(*Wisteria floribunda agglutinin*)をPSAに作用させることで、LacdiNAc(+)糖鎖を検出する事ができる。特異的結合分子として抗体を使用する際、PSAに対する抗体は、市販のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用することができる。

30

【0054】

特異的結合分子として特定の糖鎖構造を認識する抗体を使用する方法に関連して、本発明は、LacdiNAc構造を認識するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製する次の工程に関する。まず、LacdiNAc構造を含む糖鎖構造、その類似体、あるいは誘導体を、生物試料から調製あるいは化学的若しくは生化学的に合成し、同構造の多価結合体を作製する。次に、免疫反応活性化物質と共に多価結合体で動物を免疫する。この時、多価結合体は免疫反応活性化物質に結合していることが好ましく、結合体は、単独で、あるいは更なる免疫反応活性化物質と共に免疫に用いる。より好ましくは、多価結合体を少なくとも一種のアジュバント分子と共に抗体産生生物に注射、あるいは粘膜投与する。

40

【実施例】

【0055】

以下に、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は、その要旨を超えない限りこれらの実施例に限定されるものではない。

【0056】

実施例 1

(a) 工程(1) PSAの単離

50

最初に血清中の免疫グロブリンの除去を行った。4 mLのプロテインAアガロース(PIERCE)をディスポーザブルプラスチックカラム(PIERCE)に充填し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて平衡化した。プロテインAアガロース充填カラムに対して、BPHと診断された被験者(T-16)の血清およびPBSの混合物を添加し、2倍のカラムボリューム(CV)のPBSにて洗浄した。この担体に結合しないPSAを含む画分を採取し、最終濃度が1Mになるように $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を加えた。

【0057】

次に、血清中の主要タンパクであるアルブミンの除去を行った。1 mLのフラクトゲル(登録商標) EMD TA(S)(Merck)を、ディスポーザブルプラスチックカラムに充填し、20 mMリン酸緩衝液(pH 7.4、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (1M)含有)にて平衡化させた。フラクトゲル充填カラムに対して上述のPSAを含む画分を添加し、送液ポンプを用いて7 CVの同緩衝液でカラムを洗浄した。次いで、吸着したタンパクを20 mMリン酸緩衝液(pH 7.4、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  不含)にて溶出し、PSAを含む画分を得た。

10

【0058】

次に、血清中のPSAと $\alpha_1$ -アンチキモトリプシンとの複合体(PSA-ACT)から、PSAを遊離させた。前述のPSAを含む画分に同量の4 Mエタノールアミン溶液(pH 10.5)を加え、最終のエタノールアミン濃度を2 Mとし、25 において14時間にわたって振盪して、反応させた。その後、反応混合物を氷浴で冷却しながら、2 Mの塩酸を加え、反応混合物を中和した。

【0059】

次に、PSA抗体を用いた免疫沈降を行った。最初に、ダイナビーズ(登録商標)プロテインG(Invitrogen)に対して、市販の抗ヒトPSA・ウサギポリクローナル抗体(DAKO社製)を結合させ、続いてジメチルピメルイミデート(DMP、PIERCE)を用いて処理して、抗体と磁気ビーズを架橋させて、抗体磁気ビーズを得た。前述の中和された反応混合物に対して、PSA抗体磁気ビーズを添加し、4 にて1時間にわたって振盪した。続いて、PSA抗体磁気ビーズを、0.02%のTween-20を含むPBSで3回、およびPBSで1回洗浄した。さらに、PSA抗体磁気ビーズに1 Mプロピオン酸を加え、4 にて40分間にわたって振盪し、PSA抗体磁気ビーズに吸着したタンパクを溶出させて回収した。溶出したタンパクを遠心式濃縮機(SpeedVac)により乾固させた。

20

【0060】

乾固させたタンパクを、酵素免疫定量法(ELISA、栄研化学)および電気泳動にて分析した結果、最初の血清中に含まれていたPSAの約50%を回収できることが判明した。

30

【0061】

0.125 MのTris-HCl緩衝液(pH 6.8)に対して、10質量%のメルカプトエタノール、4質量%のSDS、10質量%のショ糖、0.004質量%のプロモフェノールブルーを添加して、サンプルバッファーを調製した。20  $\mu$ Lのサンプルバッファーに対して工程(1)で精製したPSAを添加し、3分間にわたって100 に加熱し、そして氷浴中に静置して冷却した。得られたサンプルを、10質量%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動により分離した。電気泳動による分離後、ポリアクリルアミドゲルを純水で軽く洗浄し、引き続いてSYPRO(登録商標) Ruby(Invitrogen)による染色を行なった。染色されたタンパク質を含むゲルを切り出し、1.5 mLチューブに移した。切り出したゲルを、純水、50%アセトニトリル水溶液、およびアセトニトリルを用いて順次洗浄し、そしてゲルを乾燥させた。

40

【0062】

また、別途、4~10 ng/mLのPSA濃度を有する血清1 mLを用いて上記の手順を繰り返したところ、ウェスタンブロットにてPSAのバンドが強く観察された。この結果から、このように低い濃度のPSAであっても、前述の方法によって効率よく精製することが可能であることが証明された。

【0063】

50

## (b) 工程(2) 糖鎖(P S A 誘導体)の調製

工程(1)で得られた乾燥ゲルの入ったチューブに対して、10 mMのジチオトレイトール(DTT)および25 mMの炭酸水素アンモニウムを含む水溶液(pH 8.0)を加え、遮光条件下1時間にわたって56 で振盪して還元反応を行い、チューブ内の溶液を除去した。チューブに対して55 mMのヨードアセトアミドを含む水溶液を加えて、遮光条件下45分間にわたって室温で振盪してアルキル化反応を行い、チューブ内の溶液を除去した。還元およびアルキル化を行ったゲルを、25 mMの炭酸水素アンモニウム水溶液(pH 8.0)、およびアセトニトリルで洗浄し、その後、ゲルを乾燥させた。

## 【0064】

上記により得られたゲルに、リシルエンドペプチダーゼ(登録商標)溶液(250 ng、和光純薬(質量分析グレード)、25 mM炭酸水素アンモニウム水溶液(pH 8.0))を加えて、45分間にわたって氷中で静置し、ゲルを膨潤させた。その後、18時間にわたって37 において、反応混合物を緩やかに攪拌した。75%アセトニトリル水溶液(0.1%トリフルオロ酢酸を含む)を加えて、20分間にわたって振盪して抽出を行い、溶液を回収した。

## 【0065】

回収した溶液を遠心濃縮機によって乾固させた。残渣に対して、1 μgのフェタブロックSC(ロシュ・ダイアグノスティクス)を含む50 mM炭酸水素アンモニウム水溶液(pH 8.0)を加え、引き続いて1単位(1単位/μL)のペプチドN-グリコシダーゼF(Sigma)を加えて、18時間にわたって37 で振盪した。振盪終了後、反応混合物に1 μLのトリフルオロ酢酸1%水溶液を添加した。オクタデシル(C18)シリカ担体が充填されたC18チップを用いた反応混合物の吸引および排出を繰り返して、ペプチドを吸着させて、反応混合物中の糖鎖と分離し、糖鎖画分を得た。続いて、70%アセトニトリル0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を用いて、C18チップからペプチドを溶出させて、ペプチド画分を得た。得られたペプチド画分からは、P S Aに由来するペプチドが検出された。

## 【0066】

マイクロスピカラムに30 mgのカーボングラファイト(GLサイエンス)を充填して洗浄した。グラファイト充填マイクロスピカラムに対して糖鎖画分を加え、さらに洗浄液として5%アセトニトリル水溶液(0.1%トリフルオロ酢酸)を加え、遠心分離(300 × g、1分~2分)により洗浄した。洗浄液を除去した後に、50%アセトニトリル水溶液(0.1%トリフルオロ酢酸)を加え、遠心分離(300 × g、1分~2分)を行い、糖鎖を溶出させ、糖鎖溶出液を得た。回収した糖鎖溶出液を、遠心濃縮機を用いて乾固させ、2 μLの純水に再溶解させて、糖鎖溶液を得た。

## 【0067】

## (c) 工程(3) 糖鎖(P S A 誘導体)の標識

MALDI用ターゲットプレートの上に、工程(2)で得られた糖鎖溶液0.5 μLを滴下し、風乾させた。次に、ターゲットプレート上に、1-ピレニルジアゾメタン(PDAM、500 pmol)のDMSO溶液0.25 μLを滴下し、約25分間にわたって40 に加熱し、乾燥させた。この操作によって、ターゲットプレート上に、PDAMで標識された糖鎖が得られた。

## 【0068】

## (d) 工程(4) MS分析

工程(3)で得られた標識糖鎖を担持したターゲットプレートに対して、2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHBA)の50%アセトニトリル溶液(濃度10 mg/mL)0.5 μLを滴下し、室温において乾燥させた。

## 【0069】

得られたターゲットプレートをMALDI-QIT-TOFMS装置AXIMA-QIT(島津製作所/Kratos社製)に設置し、MS分析を行った。定量的な比較を行うために、ターゲットプレート上の試料の広がりよりも大きい外周で囲まれた領域をラスタースキ

10

20

30

40

50

ヤンシ、有意な全シグナルを積算した。得られたMSスペクトルの代表例を図1に示す。

【0070】

別途、 $m/z = 2077$ および $m/z = 2118$ で得られるイオンをプリカーサーイオンとして用いたMS<sup>2</sup>分析を行った結果、図1中の $m/z = 2077$ のシグナルP1が(化1)Aに示すLacdiNAc(-)糖鎖に相当し、 $m/z = 2118$ のシグナルP2が(化1)Bに示すLacdiNAc(+)糖鎖に相当することが判明した。なお、式中、「Sia」はN-アセチルノイラミン酸を示し、「Glc」はグルコース、「Gal」はガラクトース、「Man」はマンノースをそれぞれ示し、「Fuc」はフコースを示す。また、式中括弧は2ヶ所の非還元末端のいずれかへの結合を示す。他の化学式においても以下同様である。

【0071】

$m/z = 2118$ のシグナルをプリカーサーイオンとして用いたMS<sup>2</sup>分析を行った結果を図2に示した。Sia-[Gal-GlcNAc-Man-(GalNAc-GlcNAc-Man-)Man-GlcNAc]の存在を示す、 $m/z = 1751$ のフラグメント(イオン $b_6$ )をはじめ、Sia-GalNAc-GlcNAc-Man構造である、 $m/z = 858$ のフラグメント(イオン $b_4$ )などが検出され、さらにLacdiNAc構造を含むSia-GalNAc-GlcNAcである $m/z = 696$ のフラグメント(イオン $b_3$ )も確認された。その結果、プリカーサーイオンの構造が、Sia-[Gal-GlcNAc-Man-(GalNAc-GlcNAc-Man-)Man-GlcNAc-(Fuc-)GlcNAc]である事が確認された。

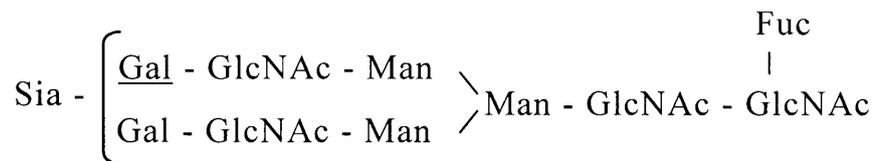
【0072】

シグナルP1およびP2の強度 $S(P1)$ および $S(P2)$ を求め、その比 $R$ 値 $= [S(P2)/S(P1)] \times 100$ を計算して、 $R$ 値 $= 12(\%)$ という数値が得られた。

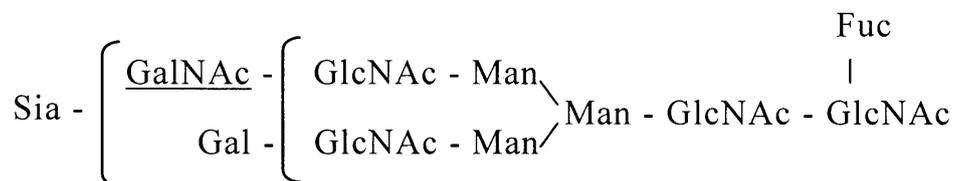
【0073】

【化1】

A) [P1] Sia ( $m/z = 2077$ )



B) [P2] ( $m/z = 2118$ )



【0074】

実施例2~4

BPHと診断され、匿名化され識別コードを付した2名の被験者の血清(実施例1および2)、ならびに、生検によりPCと診断され、匿名化され識別コードを付した2名の被験者の血清(実施例3および4)を用いて、実施例1の手順を繰り返した。なお、手順の実施に際し医療機関の倫理審査の承認を受け、被験者にはインフォームドコンセントを行った。

【0075】

それぞれの被験者の血清中PSA濃度およびLacdiNAc(-) ( $m/z = 2077$ )、LacdiNAc(+) ( $m/z = 2118$ )のシグナル強度比百分率R値を、以下の第1表に示す。

【0076】

10

20

30

40

50

## 【表 1】

第 1 表: 実施例 1~4 の評価結果

No.	識別コード	病名	血清中 PSA 濃度 (ng/mL)	R 値
実施例 1	T-16	BPH	40.4	12.0
実施例 2	T-13	BPH	112.6	18.4
実施例 3	T-17	PC	1450.0	65.0
実施例 4	N-18	PC	769.3	95.0

10

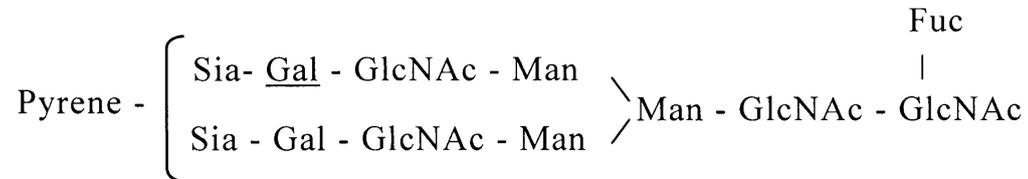
## 【0077】

PC と診断された被験者の血清を用いた場合の代表例として、実施例 4 で得られた MS スペクトルを図 3 に示す。実施例 1 と同様の手順による MS<sup>2</sup> 分析によって、実施例 4 においては、(化 1) A、B の他に、(化 2) C、D に示した構造を有する糖鎖の存在が確認された。式中の「Pyrene」は、PDAM によるピレン標識 (1-ピレニルメチル基) を示す。また、式中括弧は、2 箇所の N-アセチルノイラミン酸のうちの何れかへの結合を示す。

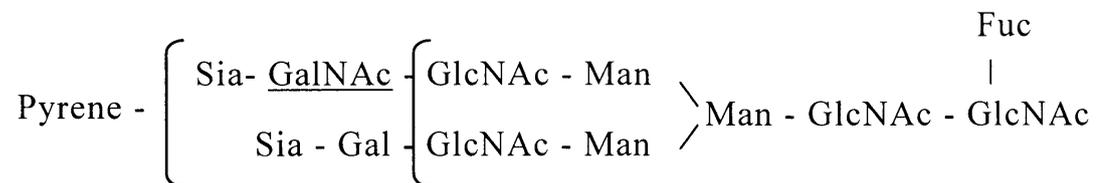
20

## 【0078】

## 【化 2】

C) [P1<sub>II</sub>] (*m/z* = 2582)

30

D) [P2<sub>II</sub>] (*m/z* = 2623)

## 【0079】

(評価)

表 1 に示したように、PC と診断された被験者の血清に由来する試料の LacdiNAc (+) / LacdiNAc (-) のシグナル強度比百分率 R 値は 30% (R<sub>(S)</sub>) 以上を示し、GalNAc 置換糖鎖を多く含有することを見出した。それに対して、BPH と診断された被験者の血清に由来する試料のシグナル強度比百分率 R 値は 30% (R<sub>(S)</sub>) 以下であった。すなわち、PC と診断された被験者の血清 PSA 糖鎖は、BPH と診断された被験者の血清 PSA に比較して多くの LacdiNAc 構造が存在することが初めて明らかとなった。

40

## 【0080】

さらに、PC において、LacdiNAc (+) / LacdiNAc (-) のシグナル強度比 R 値は、血清 PSA 濃度とは相関がないことが見いだされた。この結果は、本発明の方法が、PSA 濃度に依存することなしに PC と BPH とを区別できる可能性を示している。したがって

50

、本発明の方法は、広範囲の血清 P S A 濃度の試料に適用できる。特に、本発明の方法は、グレーゾーンと呼ばれる血清中 P S A 濃度の範囲 ( 4 ~ 1 0 n g / m L ) において、高精度での P C と B P H との区別に有効である可能性がある。

【 0 0 8 1 】

実施例 5

本実施例は、前述の実施例における糖鎖に代えて糖ペプチドを用いることができることを示す例である。

【 0 0 8 2 】

実施例 1 の、工程 ( 1 ) に記載の P S A 単離、工程 ( 2 ) に記載の D T T による還元およびヨードアセトアミドによるアルキル化を実施せずに、標準品 P S A - A C T ( C O R T E X B I O C H E M ) 1 0 0 n g に対して 5 0 単位のサーモリシン ( Calbio ) の 5 0 m M 炭酸水素アンモニウム水溶液 ( p H 8 . 0 ) を直接加え、1 8 時間にわたって 5 6 で静置反応させた。反応混合物を遠心濃縮機によって乾固させた。得られた固形物を 0 . 8 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、4 0 分間にわたって 8 0 で静置し、脱シアル酸反応を行った。反応サンプルを遠心濃縮機で乾固させた。

【 0 0 8 3 】

続いて、カーボングラファイト充填カートリッジである Intersep GC 50mg ( GLサイエンス ) を用いて、得られたサンプルから糖ペプチドの粗精製および脱塩を行った。最初に、カートリッジに対して、1 M の N a O H 水溶液、蒸留水、3 0 % 酢酸水溶液、ならびに「 5 % アセトニトリルおよび 1 % トリフルオロ酢酸を含有する水溶液」を順次送液し、カーボングラファイトの洗浄、ならびに平衡化を行った。次に、乾固した糖ペプチドサンプルを、「 5 % アセトニトリルおよび 1 % トリフルオロ酢酸を含有する水溶液」に溶解し、カートリッジに送液した。カートリッジに吸着させた糖ペプチドに対して、蒸留水、「 5 % アセトニトリルおよび 1 % トリフルオロ酢酸を含有する水溶液」を順次送液し、洗浄を行った。その後、「 8 0 % アセトニトリルおよび 1 % トリフルオロ酢酸を含有する水溶液」をカートリッジに送液して、吸着した糖ペプチドを溶出した。得られた糖ペプチド画分を回収し、遠心濃縮機を用いて乾固させた。

【 0 0 8 4 】

Sepharose CL4B ( シグマアルドリッチ社 ) を用いて、糖ペプチドの精製を行った。使用前に、Sephарose を 5 0 % エタノール水溶液で 5 回洗浄し、次いで、「ブタノール : 蒸留水 : エタノール = 4 : 1 : 1」で 5 回洗浄した。乾固させた粗精製糖ペプチド画分を同混合溶液に溶解し、その溶液に対して洗浄済みの Sepharose を 6  $\mu$ L 加え、1 時間にわたって室温にて振盪する事で糖ペプチドを Sepharose に吸着させた。次いで、前述の混合溶液を用いて 9 回にわたって Sepharose を洗浄した。糖ペプチドの吸着した Sepharose に対して 5 0 % エタノール水溶液を加え、3 0 分間にわたって室温で振盪する事により糖ペプチドの溶離を行った。溶離した糖ペプチドを含む溶液を回収し、遠心濃縮機にて乾固させた。次いで、乾固させた糖ペプチドを 5 % アセトニトリル水溶液 4  $\mu$ L に溶解した。

【 0 0 8 5 】

得られた糖ペプチド溶液に対して実施例 1 の工程 ( 3 ) 、および工程 ( 4 ) を適用して M S 解析を行った。得られた M S スペクトルを図 4 に示した。P S A に由来するペプチド 4 3 - 4 7 に糖鎖が付加したスペクトルが得られ、G a I N A c / G a I 置換に対応する 4 1 の質量差を有する 2 種類の糖ペプチド、P 1 および P 2 が 2 対検出された。それぞれの構成を、( 化 3 ) の E および G ( P 1 ) 、F および H ( P 2 ) に示す。なお、式中の「 P e p t i d e 」は P S A に由来するペプチド断片を示す。

【 0 0 8 6 】

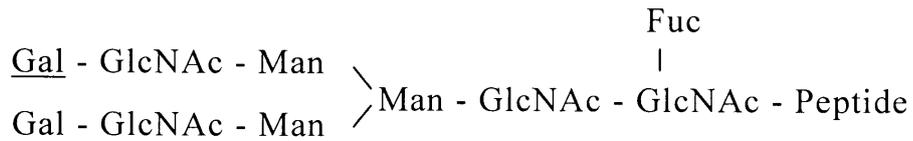
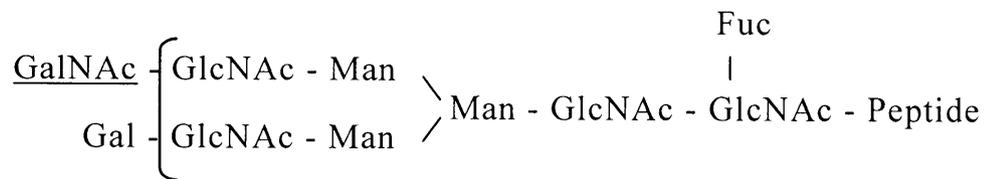
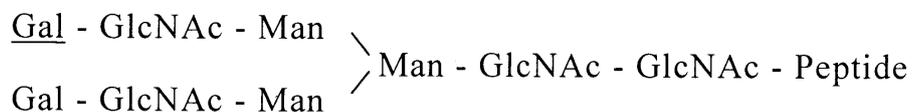
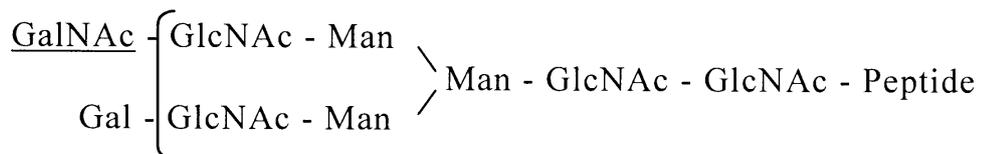
10

20

30

40

## 【化3】

E) [P1<sub>a</sub>] ( $m/z = 2386$ )F) [P2<sub>a</sub>] ( $m/z = 2427$ )G) [P1<sub>b</sub>] ( $m/z = 2240$ )H) [P2<sub>b</sub>] ( $m/z = 2281$ )

## 【0087】

精漿に由来する標準品 P S A - A C T の LacdiNAc ( + ) / LacdiNAc ( - ) のシグナル強度比百分率 R 値の平均は 25 % であった。

## 【0088】

以上のように、標準品 P S A の LacdiNAc ( + ) / LacdiNAc ( - ) のシグナル強度比百分率 R 値は、B P H の被験者に対する糖鎖解析の結果に近く 30 % 以下であり、P C の被験者に対する糖鎖解析 R 値とは異なっていた。また、糖ペプチドを用いる場合、糖鎖にペプチドが結合していることによって、P S A の同定および糖鎖付加位置の確認が可能となる。このことによって、他の糖タンパク質が混在する場合であっても、LacdiNAc ( + ) / LacdiNAc ( - ) のシグナル強度比百分率 R 値を正確に求めることが可能となる。

## 【0089】

## 実施例 6

実施例 4 に示した P C 罹患の被験者 ( N - 18 ) の血清を対象に糖ペプチド解析を行った。該被験者の血清を用いて、実施例 1 の工程 ( 1 ) および工程 ( 2 ) に記載の D T T による還元、ヨードアセトアミドによるアルキル化、洗浄および乾燥の工程を実施し、乾燥ゲルを得た。

## 【0090】

10

20

30

40

50

次に、乾燥ゲルに対して、1～100単位のサーモリシン (Calbio Chem) の25 mM炭酸水素アンモニウム水溶液 (pH 8.0) を加えて、45分間にわたって氷浴中で静置して、ゲルを膨潤させた。膨潤したゲルを18時間にわたって56で軽く攪拌した。ゲルに対して、抽出液「70～80%アセトニトリルおよび0.1%トリフルオロ酢酸を含有する水溶液」を加えて20分間にわたって振盪し、溶液を回収した。

【0091】

洗浄した25 mgのZIC (登録商標) HILIC固相カラム充填剤 (SeQuant) に対して、回収した溶液を加えた。続いて、「80%アセトニトリルおよび0.1%トリフルオロ酢酸を含有する水溶液」を加えて洗浄し、そして0.1%トリフルオロ酢酸の水溶液を用いて糖ペプチドを溶出させた。糖ペプチド溶出液を遠心濃縮機によって乾固させ、次いで、固形物を2 μLの純水に溶解させて糖ペプチド溶液を得た。

10

【0092】

得られた糖ペプチド溶液に対して、実施例1の工程(3)と同様の手順を適用して、糖ペプチドの標識を行った。次いで、得られたターゲットプレートに対して実施例1の工程(4)の手順を適用して、MS分析を行った。

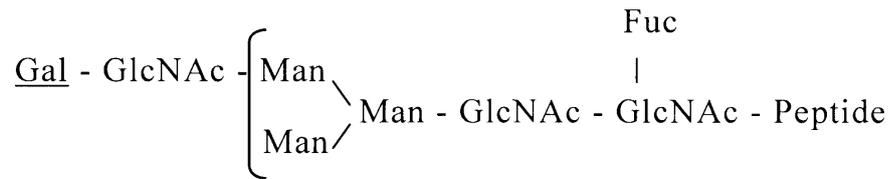
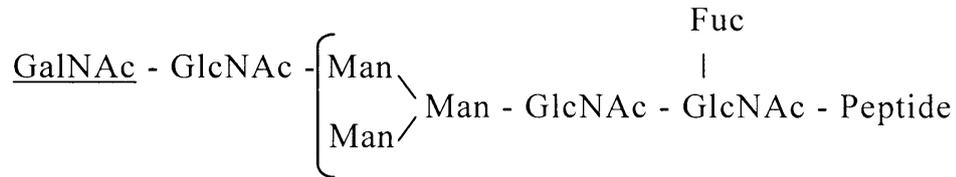
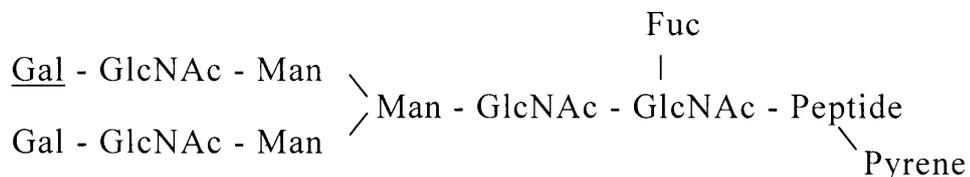
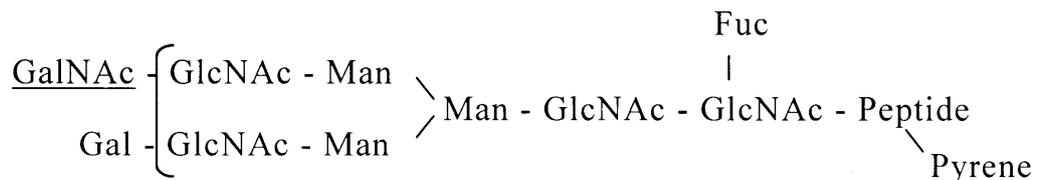
【0093】

MS分析によって、PSA由来のペプチド43-47に糖鎖が結合した糖ペプチドが検出された。得られたMSスペクトルを図5に示した。図5に示すように、GalNAc/Galの置換に対応する41の質量差を有する、4つのLacdiNAc(-)糖ペプチド(P1)およびLacdiNAc(+)糖ペプチド(P2)の対が見いだされた(化4)。

20

【0094】

## 【化4】

I) [P1<sub>b</sub>] (*m/z* =2021)J) [P2<sub>b</sub>] (*m/z* =2062)K) [P1<sub>d</sub>] (*m/z* =2600)L) [P2<sub>a</sub>] (*m/z* =2641)

## 【0095】

いずれの対においても、LacdiNAc (+) / LacdiNAc (-) 糖ペプチドのシグナル強度比百分率R値が30%以上であった。また、本実施例で得られたR値と該血清サンプルに対して糖鎖解析を行った実施例4のR値は同様な数値であった。

## 【0096】

以上のように、PSA誘導体として糖ペプチドを用いた場合であっても、標識後のMS分析において、GalNAc / Gal置換の有無に相当する質量差41を有する糖ペプチドのシグナルの対を検出することができた。さらに、糖ペプチドのシグナル対の強度比百分率R値は114% ± 2%となり、糖鎖のシグナル対の強度比百分率R値である95% ± 3%と同等の結果を示した。したがって、実施例1~4に示したLacdiNAc (+) / LacdiNAc (-) 糖鎖のシグナル強度比R値と同様に、LacdiNAc (+) / LacdiNAc (-) 糖ペプチドのシグナル強度比百分率R値を求めることによって、PCとBPHとを高精度で判別することが可能であると考えられる。

## 【0097】

## 実施例7

実施例7は、実施例1の工程(1)に記載のPSAの単離、および工程(2)に記載のDTTによる還元、ヨードアセトアミドによるアルキル化の工程を実施する事なしに患者

10

20

30

40

50

血清の分析を行った例である。

【0098】

最初にPCに罹患している患者(N-122、PSA濃度186ng/mL)の血清から免疫グロブリンの除去を行った。3mLのプロテインAアガロース担体(PIERCE)を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて平衡化した。これをディスポーザブルプラスチックカラム(PIERCE)に充填し、該被験者の血清およびPBSの混合物を添加し、4にて30分間振盪した。この担体に結合しないPSAを含む画分を回収し、さらに担体の3倍体積(3CV)のPBSにてプロテインAアガロース担体を洗浄した画分を回収後、両画分の混合溶液に最終濃度が1Mになるように $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を加えた。

【0099】

次に、PSA含有画分から血清中の主要タンパクであるアルブミンの除去を行った。2.5mLのフラクトゲル(商標)EMD T A (S)(Merck)を、ディスポーザブルプラスチックカラムに充填し、20mMリン酸緩衝液(pH7.4、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ (1M)含有)にて平衡化させた。フラクトゲル充填カラムに対して上記にて得られた画分を添加し、ポンプを用いて7CVの同緩衝液を送液し、アルブミンの除去を行った。次いで、フラクトゲル(商標)に吸着したタンパク質を20mMリン酸緩衝液(pH7.4、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 不含)にて溶出し、PSAを含む画分を得た。引き続き、この画分をPBSにて平衡化させた2mLのプロテインAアガロース担体に添加し、4にて30分間振盪することにより除去しきれなかった免疫グロブリンを除去した。プロテインAアガロース担体に結合しないPSAを含む画分および3CVのPBSにて洗浄した画分の混合溶液を次の免疫沈降に用いた。

【0100】

引き続き、免疫沈降に用いる抗PSA抗体ビーズの作製をおこなった。NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (GEヘルスケアバイオサイエンス社)を1mMのHClで3回洗浄した。次に、洗浄したビーズに対して、市販の抗ヒトPSA・ウサギポリクローナル抗体(DAKO社)を添加し、室温にて30分間にわたって振盪することで、抗体とビーズの架橋を行った。続いて、0.5MのNaClを含む0.5Mのモノエタノールアミン水溶液を加え、室温にて30分間にわたって振盪することで、残余活性基の不活化を行った。得られた抗PSA抗体ビーズを、0.5MのNaClを含む0.1Mの酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)、および0.5MのNaClを含む1Mのトリス緩衝液(pH9.0)で交互に3回洗浄した。次いで、抗PSA抗体ビーズをPBSで3回洗浄した。最後に、同ビーズを、0.02%アジ化ナトリウムを含むPBSで洗浄し、使用時まで4にて保存した。

【0101】

次いで、免疫沈降を行った。前述のPSAを含む混合溶液画分に対して、0.1mLの抗PSA抗体ビーズを添加し、4にて1時間にわたり振盪した。続いて、抗PSA抗体ビーズをMicro Bio-Spinクロマトグラフィーカラム(バイオ・ラッドラボラトリーズ社)に移した。抗PSA抗体ビーズカラムを、PBSで4回、0.02%のTween-20を含むPBSで3回、および蒸留水で2回洗浄した。さらに、抗PSA抗体ビーズカラムに1Mのプロピオン酸水溶液を加え、ビーズに吸着したタンパク質を溶出させて回収した。プロピオン酸水溶液による溶出は全10回にわたって行い、その溶離液を混合して遠心濃縮機を用いて乾固させた。

【0102】

得られたタンパク質画分の一部をウェスタンブロット法に供し、半定量的な解析を行ったところ、最初の血清に含まれていたPSAの70%以上を回収できる事が判明した。

【0103】

続いて、実施例5に従い、サーモリシン消化、脱シアル酸反応、カーボングラファイト充填カートリッジによる粗精製、およびSepharose CL4Bを用いた精製を順次行い、糖ペプチド画分を得た。得られた糖ペプチド溶液に対して実施例1の工程(3)と同様の手順を適用して、糖ペプチドの標識を行った。次いで、得られたターゲットプレートに対して実

10

20

30

40

50

実施例 1 の工程 ( 4 ) の手順を適用して、MS 分析を行った。

【 0 1 0 4 】

MS 分析によって、PSA 由来のペプチド 43 - 47 に糖鎖が結合した糖ペプチドが検出された。得られた MS スペクトルを図 6 に示した。MS 分析により、LacdiNAc 構造の有無に相当する 41 の質量差を有する糖ペプチドのシグナル対、P1 および P2 を検出することができた。

【 0 1 0 5 】

実施例 8 ~ 12

生検により PC と診断され、識別コードを付した 5 名の被験者の血清 ( 実施例 8 ~ 12 )、を用いて、実施例 7 の手順を繰り返した。なお、手順の実施に際し医療機関の倫理審査の承認を受け、被験者にはインフォームドコンセントを行なった。

【 0 1 0 6 】

実施例 5、6 および実施例 7 を含むそれぞれの被験者の血清中 PSA 濃度および LacdiNAc ( - ) 糖ペプチド ( m / z = 2386 )、LacdiNAc ( + ) 糖ペプチド ( m / z = 2427 ) のシグナル強度比百分率 R 値を、以下の第 2 表に示す。

【 0 1 0 7 】

【表 2】

第 2 表 : 実施例 5 ~ 12 の評価結果

No.	識別コード	病名	血清中 PSA 濃度 (ng/mL)	R 値
実施例 5	標品 PSA-ACT	—	—	25.0
実施例 6	N-18	PC	769.3	114.0
実施例 7	N-122	PC	186.2	86.0
実施例 8	T-15	PC	32.1	52.0
実施例 9	T-33	PC	45.7	64.0
実施例 10	N-86	PC	53.7	136.0
実施例 11	T-23	PC	62.2	43.0
実施例 12	N-99	PC	90.3	44.0

【 0 1 0 8 】

以上のように、32 ng / mL の低い PSA 濃度を有する前立腺癌患者の血清から糖ペプチドを精製し、MS によって検出するに至った。また、低血清 PSA 濃度である前立腺癌患者の R 値も、PSA を多く有する前立腺癌患者血清の R 値と同様に 30 % を大きく上回る事が明らかとなった。

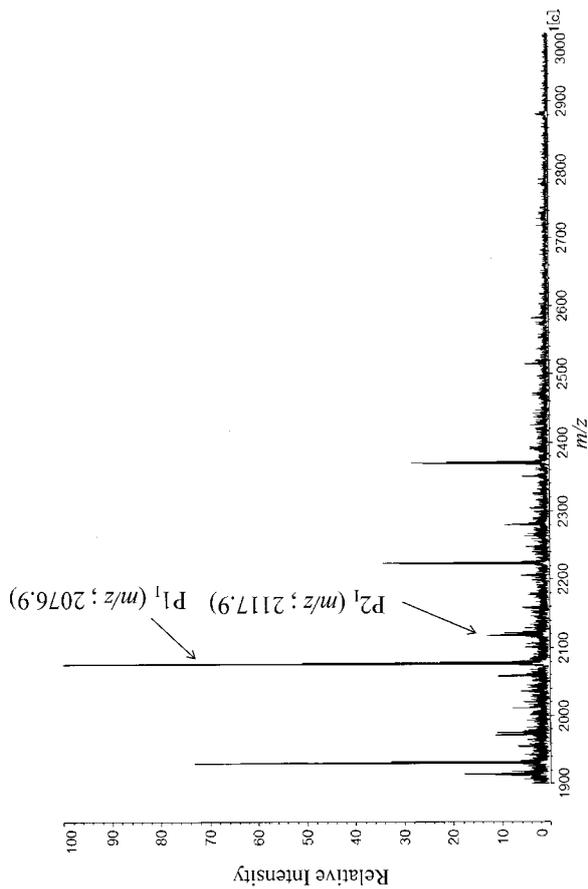
【 0 1 0 9 】

このように、実施例 1 に示す手法のように PSA - ACT 複合体から遊離 PSA を調製することなく、血清中の複合体および遊離 PSA から糖ペプチドを直接的に調製して、PSA の LacdiNAc ( + ) 糖ペプチド、および LacdiNAc ( - ) 糖ペプチドを検出することができた。この方法は、工程が少なくなるので、簡便迅速となる上、糖ペプチドの回収率が向上する。したがって、この方法は臨床試料への適用に好ましい。

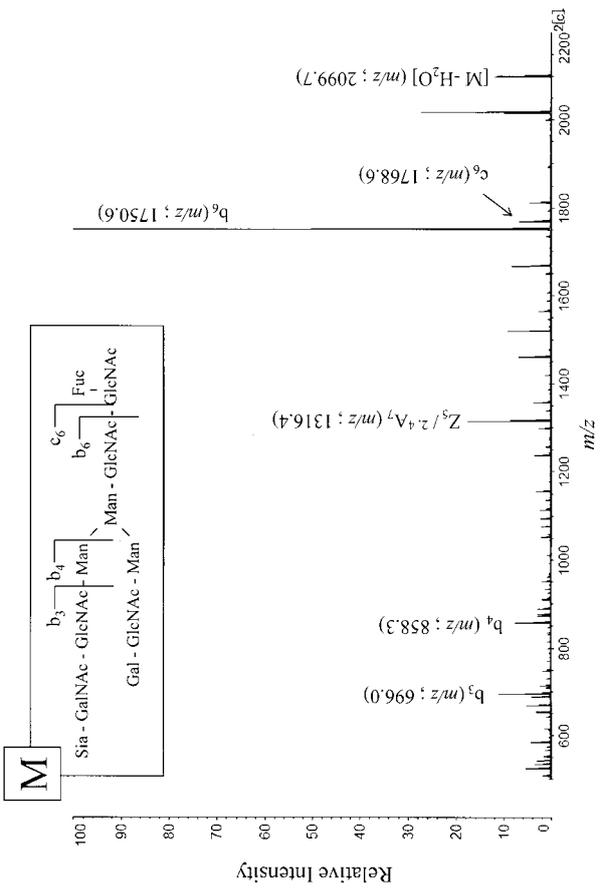
【 0 1 1 0 】

本願は、2008年12月3日に出願した日本の特許出願である特願2008-309012に基づくものであり、その出願の全ての内容はここに引用し、本願発明の明細書の開示として取り込まれるものである。

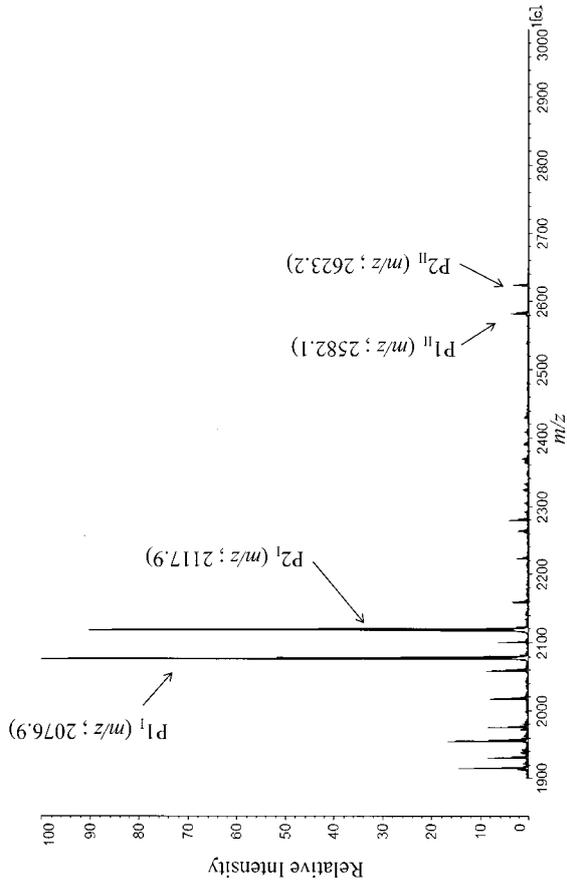
【図1】



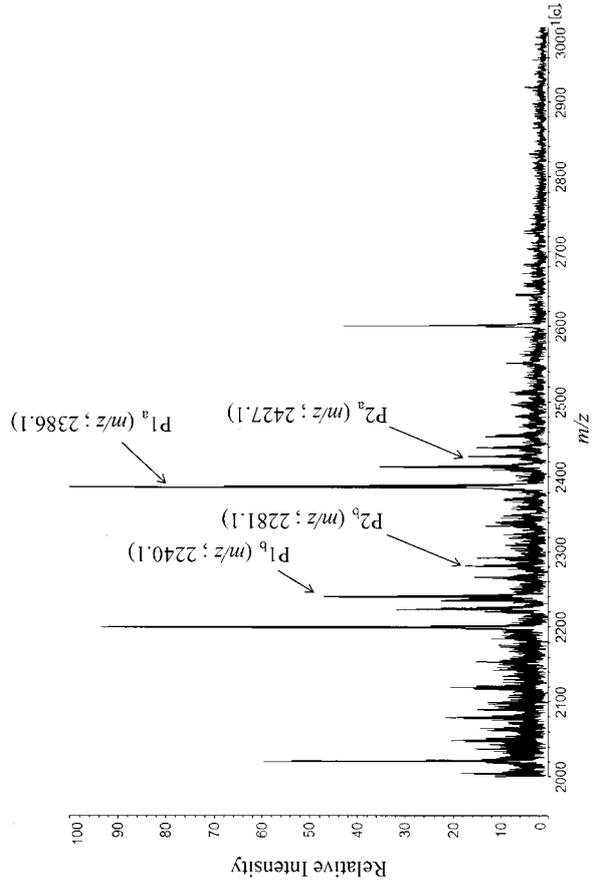
【図2】



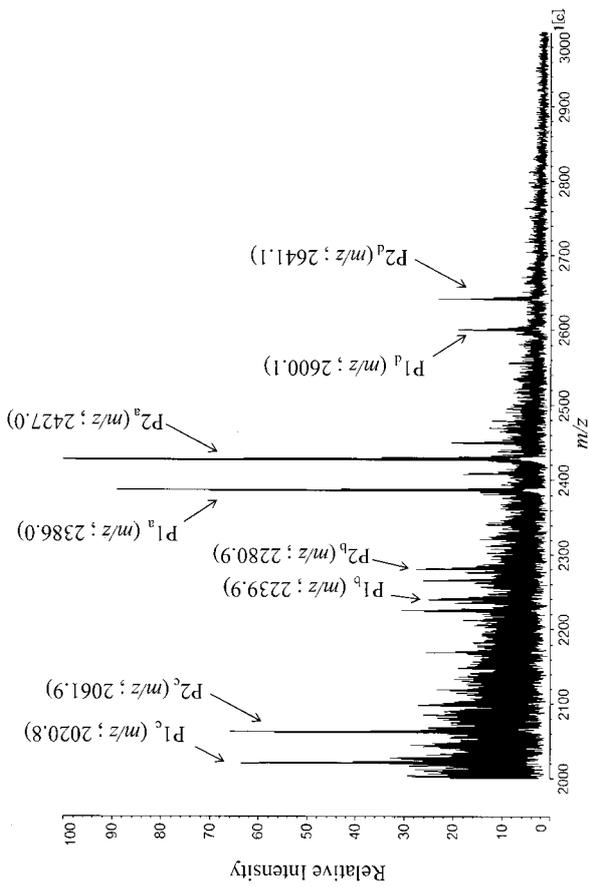
【 3 】



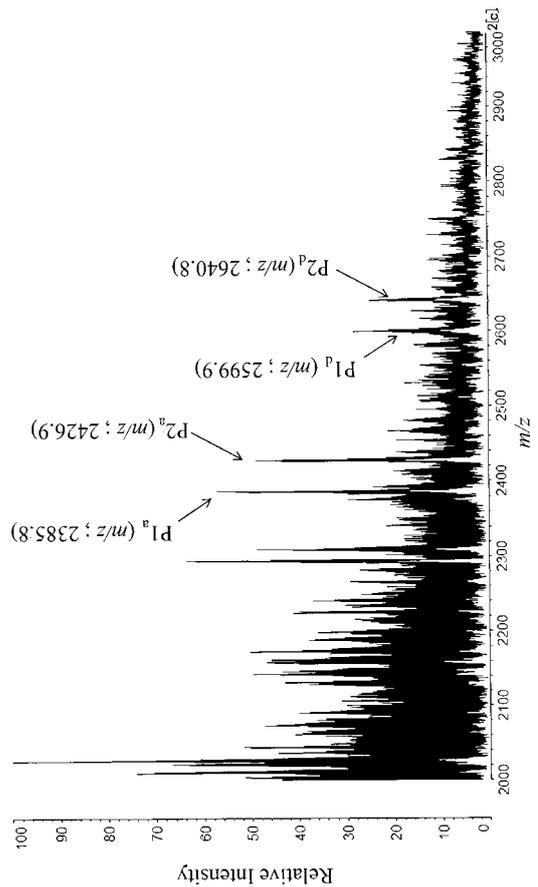
【 4 】



【 5 】



【 9 】



---

フロントページの続き

審査官 加々美 一恵

- (56)参考文献 特表2005-500057(JP,A)  
特開2002-055108(JP,A)  
Glycobiology, 2004年, Vol. 14, No. 8, p671-679  
Glycobiology, 2006年, Vol. 16, No. 2, p132-145  
Journal of Chromatography B, 1999年, Vol. 727, p9-14  
Glycobiology, 2003年, Vol. 13, No. 6, p457-470  
生物物理化学, 2002年, Vol.46, p51-54

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

G01N 27/62

G01N 30/88

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Cinii