

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5284958号
(P5284958)

(45) 発行日 平成25年9月11日(2013.9.11)

(24) 登録日 平成25年6月7日(2013.6.7)

(51) Int.Cl.		F I		
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 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68		

請求項の数 3 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2009-522632 (P2009-522632)	(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20年7月4日(2008.7.4)	(74) 代理人	100077481 弁理士 谷 義一
(86) 国際出願番号	PCT/JP2008/062217	(74) 代理人	100088915 弁理士 阿部 和夫
(87) 国際公開番号	W02009/008381	(74) 復代理人	100133721 弁理士 主代 静義
(87) 国際公開日	平成21年1月15日(2009.1.15)	(72) 発明者	天野 純子 東京都板橋区加賀1丁目8番1号 財団法人野口研究所内
審査請求日	平成23年6月22日(2011.6.22)	(72) 発明者	平野 清子 東京都板橋区加賀1丁目8番1号 財団法人野口研究所内
(31) 優先権主張番号	特願2007-178676 (P2007-178676)		
(32) 優先日	平成19年7月6日(2007.7.6)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2007-341090 (P2007-341090)		
(32) 優先日	平成19年12月28日(2007.12.28)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺癌と良性前立腺肥大症とを識別する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(1) 被験者由来の試料からPSAを精製する工程と、
 (2) 工程(1)で精製したPSAからPSA誘導体を調製する工程と、
 (3) 工程(2)で得られたPSA誘導体を標識する工程と、
 (4) 工程(3)で得られた標識化PSA誘導体を質量分析法により分析する工程と
 を含み、該標識化PSA誘導体中のフコース非結合糖鎖のシグナル強度とフコース結合糖鎖のシグナル強度との比が1.0を越える際に前立腺癌であると識別し、1.0以下である際に良性前立腺肥大症であると識別することを特徴とする、前立腺癌と良性前立腺肥大症とを識別する方法。

【請求項2】

工程(2)において調製されるPSA誘導体が、PSA由来の糖鎖であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

工程(2)において調製されるPSA誘導体が、PSA由来の糖ペプチドであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、前立腺癌と良性前立腺肥大症とを識別する新規な方法に関する。より詳細に

は、本発明は、前立腺特異抗原（PSA）の糖鎖構造の差異に基いて、前立腺癌と良性前立腺肥大症とを識別する新規な方法に関する。

【背景技術】

【0002】

前立腺癌（prostate carcinoma：以下「PC」と称する）は男性の主要な死亡原因の一つである。前立腺特異抗原（prostate specific antigen：以下「PSA」と称する）はPC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）。PSAは、約26kDaの分子量を有する237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（たとえばAsn⁴⁵など）に結合した糖鎖部分とから構成される約30kDaの分子量を有する糖タンパク、またはその誘導体もしくは類似体である。糖鎖部分は、PSAの分子量の約8%を示す。PCの初期診断に対する血清PSA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「BPH」と称する）に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領域がある（たとえば、非特許文献2参照）。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。

10

【0003】

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。

20

【0004】

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。また、PSA糖鎖に対するフコース付加に関しては、PCおよびBPH間で相違を見いだしていない。

30

【0005】

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。

40

【0006】

別のアプローチとして、PSA糖鎖中のフコースに注目したいいくつかの報告がなされている。たとえば、PSA糖鎖中のフコースの含有量を測定し、該含有量が異常に増加している際にPCと診断する方法が提案されている（特許文献3参照）。

【0007】

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糖鎖とは異なるフコシル化構造を有す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。

50

【 0 0 0 8 】

さらに、P S A 中のフコース結合糖鎖およびフコース非結合糖鎖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、顕著に高い血清中の P S A 濃度（ $1.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）を有する被験者の 1 例のみの P S A 糖鎖構造を H P L C にて解析し、フコース非結合糖鎖 / フコース結合糖鎖の含有量の比が $5.25 (84/16)$ であることを記載している。一方で、さらに高濃度の血清 P S A 濃度（ $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上）を有する P C に罹患している被験者 2 名の血清 P S A から調製された糖ペプチドの M A L D I - Q I T - T O F M S による解析が発表されている（非特許文献 11 参照）。ここで、フコース結合糖鎖の含有量はそれぞれ 100% 及び 64% を示し、フコース結合糖鎖の方がフコース非結合糖鎖に比べて多いと発表されている。

10

【 0 0 0 9 】

しかしながら、B P H に罹患した被験者の P S A 糖鎖の構造は未だ解明されておらず、P S A 糖鎖の具体的な構造に基づいて B P H と P C とを識別することは、これまでなされていない。

【 0 0 1 0 】

【特許文献 1】特開 2002 - 55108 号公報

【特許文献 2】特表 2000 - 514919 号公報

【特許文献 3】英国特許出願公開第 2361060 号明細書

【特許文献 4】特表 2006 - 515927 号公報

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

20

【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)

【非特許文献 4】Tabares 他, Glycobiology, 16(2), 132-145 (2006)

【非特許文献 5】Peter 他, Anal. Biochem., 273(1), 98-104 (1999)

【非特許文献 6】Kawinski 他, Prostate, 50(3):145-153 (2002)

【非特許文献 7】Bindukumar 他, J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci., 813(1-2), 113-120 (2004)

【非特許文献 8】Zhang 他, Clin. Chem., 41(11), 1567-1573 (1995)

【非特許文献 9】Okada 他, Biochim. Biophys. Acta, 1525(1-2), 149-160 (2001)

【非特許文献 10】Peracaula 他, Glycobiology, 13(6), 457-470 (2003)

30

【非特許文献 11】Tajiri 他, Glycobiology Advance Access published October 23, 2007 <<http://glycob.oxfordjournals.org/cgi/reprint/cwm117v1>>

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 1 】

したがって、本発明の課題は、B P H または P C に罹患した被験者の P S A 糖鎖の具体的な構造を決定することにより、P S A の糖鎖構造に基づいて B P H と P C とを的確に識別する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 2 】

本発明に係る P C と B P H との識別方法は、(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とを含み、該標識化 P S A 誘導体中のフコース非結合糖鎖のシグナル強度とフコース結合糖鎖のシグナル強度との比が 1.0 を越える際に前立腺癌であると識別し、1.0 以下である際に良性前立腺肥大症であると識別することを特徴とする。ここで、工程 (2) で調製される P S A 誘導体は、P S A 由来の糖鎖または糖ペプチドであってもよい。

40

【発明の効果】

【 0 0 1 3 】

50

以上のような工程を採ることによって、血清中 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 糖鎖中のフコース非結合糖鎖 / フコース結合糖鎖とのシグナル強度比 R を測定することによって、P C と B P H とを高精度で識別できる。また、P C および B P H の両方において、フコース非結合糖鎖 / フコース結合糖鎖のシグナル強度比 R は血清 P S A 濃度とは全く相関がなく、P C においては R は 1 . 0 より大きく、B P H においては R は 1 . 0 以下である。

【 0 0 1 4 】

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 (4 n g / m L 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。また、年齢とともに血清中 P S A 濃度が上昇することが知られている。よって、特に高齢化社会において、本発明の方法によって高精度で P C と B P H とを識別することは、医学に貢献するのみならず、医療経済にも良好な効果を奏する。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 5 】

【 図 1 】 図 1 は、実施例 1 で得られたネガティブイオン M S スペクトルを示す図である。

【 図 2 】 図 2 は、実施例 1 において、 $m / z = 2077$ のピーク P_{2A} 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 M S ² スペクトルを示す図である。

【 図 3 】 図 3 は、実施例 1 において、 $m / z = 1931$ のピーク P_{2B} 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 M S ² スペクトルを示す図である。

20

【 図 4 】 図 4 は、実施例 1 5 で得られたネガティブイオン M S スペクトルを示す図である。

【 図 5 】 図 5 は、実施例 1 7 で得られたポジティブイオン M S スペクトルを示す図である。

【 図 6 】 図 6 は、実施例 2 0 で得られたポジティブイオン M S スペクトルを示す図である。

【 図 7 A 】 図 7 A は、実施例 2 1 で得られた、P S A 由来の糖ペプチドのポジティブイオン M S スペクトルを示す図である。

【 図 7 B 】 図 7 B は、実施例 2 1 で得られた、P S A - A C T 複合体由来の糖ペプチドのポジティブイオン M S スペクトルを示す図である。

30

【 図 8 】 図 8 は、実施例 2 2 で得られたポジティブイオン M S スペクトルを示す図である。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 6 】

本発明に係る P C と B P H との識別方法は、(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とを含み、該標識化 P S A 誘導体中のフコース結合糖鎖のシグナル強度とフコース非結合糖鎖のシグナル強度との比が 1 . 0 を越える際に前立腺癌であると識別し、1 . 0 以下である際に良性前立腺肥大症であると識別することを特徴とする。

40

【 0 0 1 7 】

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) において用いられる被験者由来の試料は、血液 (血清および血漿を含む)、尿、および精液 (精漿) などの体液、および前立腺細胞を含む。好ましくは、試料は血清である。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 1 8 】

たとえば、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、磁性ビーズを用いた免疫沈降法を用いて P S A の精製を行うことができる (非特許文献 5 参照)。たとえば、(a) ストレプトアビジン被覆された磁性ビーズにビオチン化ジゴキシゲニン抗

50

体を結合させた抗体磁性ビーズを作製し、(b)抗体磁性ビーズに対してジゴキシゲニン標識されたP S A抗体を添加してインキュベーションを行い、(c)被験者由来の血清を添加して免疫沈降を行う。次いで、ジゴキシゲニンリジン塩酸塩を加えて、沈降させた抗体磁性ビーズに結合した化合物を溶出させ、次いでドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(S D S - P A G E)を用いてP S Aを分離し、P S A由来ペプチドを得る。前述の文献によれば、得られたP S A由来ペプチドのM A L D I - T O F M S法による解析を行うために、被験者由来の試料中に約7.6 μgのP S Aが必要であった。

【0019】

あるいはまた、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ークロマトグラフィー(フラクトゲル(Fractogel)(登録商標)EMD TA)、アフィニティークロマトグラフィー(Cibacron Blue 3GA)、アフィニティークロマトグラフィー(プロテインAセファロースCL-4B)、およびアフィニティークロマトグラフィー(HiTrapヘパリンカラムH P L C)を行う(非特許文献4参照)。得られた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。遊離の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 μgのP S Aが必要であった。

【0020】

さらに、工程(1)における試料として被験者由来の血清を用いる場合、1工程の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6参照)。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、遊離形態または1-アンチキモトリプシン(A C T)等との複合体状態を同定することができる。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7参照)。たとえば、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(フラクトゲル(登録商標)TA 650(S))と、ゲル濾過(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。

【0021】

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8および9参照)。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-Sepharose-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。

【0022】

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10参照)。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(Cibacron Blue 3GA)、ゲル濾過(Biogel P60)、アフィニティークロマトグラフィ(Cibacron Blue 3GA)、および逆相クロマトグラフィ(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。

【0023】

次いで、工程(2)において、精製されたPSAからPSA誘導体を調製する。本発明における「PSA誘導体」とは、PSAから分離される糖鎖および糖ペプチドを意味する。たとえば、PSA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、カルボキシペプチダーゼBなど)またはペプチド結合開裂剤を作用させて糖ペプチドを形成し、糖ペプチドを工程(3)で使用してもよい。

【0024】

別法として、PSA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、PSA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、PSAまたはPSA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および糖ペプチドを用いてもよい。

10

【0025】

また、工程(1)の最終段階で電気泳動を行い、PSA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。

20

【0026】

工程(3)において、PSA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。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。

30

【0027】

工程(3)は、PSA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PSA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。

40

【0028】

工程(4)において、標識されたPSA誘導体を質量分析法(MS)により分析する。MS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(MALDI)型、またはエレクトロスプレーイオン化(ESI)型の装置を含む。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、MALDI法における標識されたPSA誘導体のイオン化効率が、未標識のPSA誘導体と比較して向上する。また、本発明の標識されたPSA誘導体は、ESI法の適用がより容易である。な

50

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。

【0029】

M S 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、四重極収束型等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 ⁿ (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。

10

【0030】

次いで、得られた M S スペクトルにおいて、フコースの有無に相当する分子量差 1 4 6 D a のピーク P ₁ および P ₂ の対を選定する。ここで、P ₁ はフコース結合糖鎖に相当するより大きな分子量のピークを意味し、P ₂ はフコース非結合糖鎖に相当するより小さな分子量のピークを意味する。そして、フコース結合糖鎖およびフコース非結合糖鎖に相当するピークのシグナル強度 S (P ₁) および S (P ₂) を求め、その比 R = S (P ₂) / S (P ₁) を計算する。得られた R が 1 より大きい場合、被験者が P C に罹患していると識別し、得られた R が 1 以下である場合、被験者が B P H に罹患していると識別する。本工程において得られる M S スペクトルにおいて、分子量差 1 4 6 D a の複数のピーク対を選定して、上記の識別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

20

【実施例】

【0031】

(実施例 1)

(a) 工程 1 P S A の単離

最初に血清中の免疫グロブリンの除去を行った。4 m L のプロテイン A アガロース (P I E R C E) をディスパーザブルプラスチックカラム (P I E R C E) に充填し、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 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、B P H と診断された被験者 (T - 1 3) の血清および P B S の混合物を添加し、2 倍のカラムボリューム (C V) の P B S にて洗浄した。この担体に結合しない P S A を含む画分を採取し、最終濃度が 1 M になるように N a ₂ S O ₄ を加えた。

30

【0032】

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 m L のフラクトゲル (商標) E M D T A (S) (M e r c k) をディスパーザブルプラスチックカラムに充填し、2 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 4 、 N a ₂ S O ₄ (1 M) 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 P S A を含む画分を添加し、送液ポンプを用いて 7 C V 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 2 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 4 、 N a ₂ S O ₄ 不含有) にて溶出し、P S A を含む画分を得た。

【0033】

次に、血清中の P S A と γ - アンチキモトリプシンとの複合体 (P S A - A C T) から、P S A を遊離させた。前述の P S A を含む画分に同量の 4 M エタノールアミン溶液 (p H 1 0 . 5) を加え、最終のエタノールアミン濃度を 2 M とし、2 5 において 1 4 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。

40

【0034】

次に、P S A 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 (I n v i t r o g e n) に対して市販の抗ヒト P S A ・ウサギポリクローナル抗体 (D A K O 社製) を結合させ、続いてジメチルピメルイミデート (D M P 、 P I E R C E) 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

50

対して、P S A 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、P S A 抗体磁気ビーズを、0.02%のT w e e n - 2 0 を含むP B S で3回、およびP B S で1回洗浄した。さらに、P S A 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、P S A 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) を用いて乾固させた。

【0035】

乾固させたタンパクを、酵素免疫定量法 (E L I S A、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P S A の約50%を回収できることが判明した。以上の工程は2日以内に完了することができ、簡便かつ迅速な工程でありながら、高収率である。

10

【0036】

0.125 M の T r i s - H C l 緩衝液 (p H 6.8) に対して、10%のメルカプトエタノール、4%のS D S、10%のショ糖、0.004%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 μ L のサンプルバッファーに対して工程1で精製したP S A 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%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動による分離した。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。

20

【0037】

また、別途、4 ~ 10 n g / m L の P S A 濃度を有する血清 1 m L を用いて上記の手順を繰り返したところ、ウエスタンブロットにてP S A 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P S A 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。

【0038】

(b) 工程2 糖鎖 (P S A 誘導体) の調製

工程(a)で得られた乾燥ゲルの入ったチューブに対して、10 m M のジチオトレイトール (D T T) および25 m M の炭酸水素アンモニウムを含む水溶液 (p H 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 m M 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 m M の炭酸水素アンモニウム水溶液 (p H 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。

30

【0039】

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 n g、和光純薬 (質量分析グレード)、25 m M 炭酸水素アンモニウム水溶液 (p H 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。

40

【0040】

回収した溶液を遠心式濃縮機によって乾固させた。残渣に対して、1 μ g のフェタブロック S C (ロシュ・ダイアグノスティックス) を含む50 m M 炭酸水素アンモニウム水溶液 (p H 8.0) を加え、引き続いて1単位 (1単位 / μ L) 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 μ L のトリフルオロ酢酸1%水溶液を添加した。オクタデシル (C 18) シリカ担体が充填されたC 18 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

50

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、PSA に由来するペプチドが検出された。

【0041】

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式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。

10

【0042】

(c) 工程3 糖鎖 (PSA 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。

【0043】

(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。

20

【0044】

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ャンし、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。

【0045】

別途、種々のイオンをプリカーサーイオンとして用いた MS² 分析を行った結果、図1中の $m/z = 2582$ のピーク P_{1A} が式Aに示すフコース結合糖鎖に相当し、 $m/z = 2436$ のピーク P_{2A} が式Bに示すフコース非結合糖鎖に相当することが判明した。なお、式中の「Pyrene」は、PDAMによるピレン標識部 (1-ピレニルメチル基) を示し、左中括弧 (open brace) は、左側に示した部分構造が、右側に示した部分構造のいずれかに結合していることを示す。また、式中、Neu5Ac は N-アセチルノイラミン酸を示し、Gal はガラクトースを示し、GlcNAc は N-アセチルグルコサミンを示し、Fuc はフコースを示し、および Man はマンノースを示す。

30

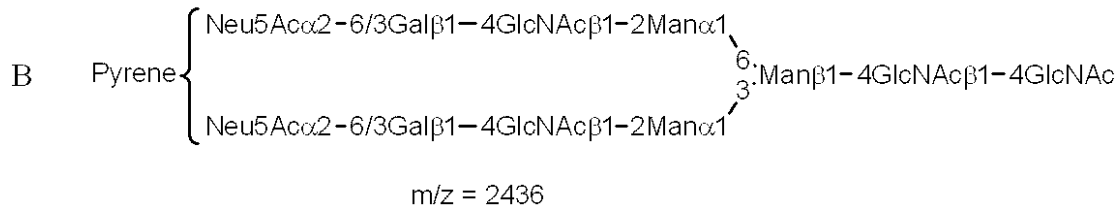
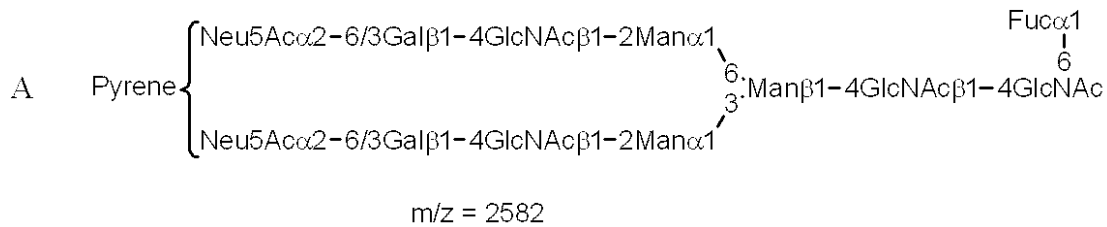
【0046】

ピーク P_{1A} および P_{2A} のシグナル強度 $S(P_{1A})$ および $S(P_{2A})$ を求め、その比 $R = S(P_{2A}) / S(P_{1A})$ を計算して、 $R = 0.69$ という数値が得られた。

40

【0047】

【化1】



10

【0048】

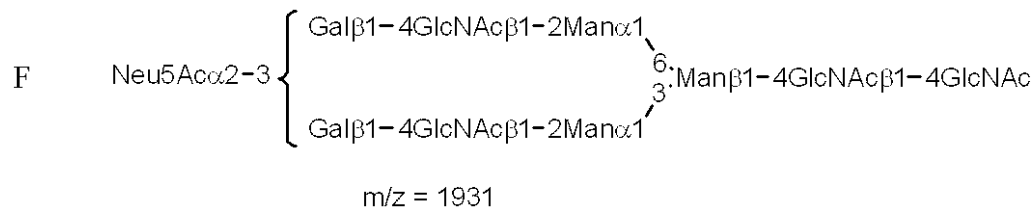
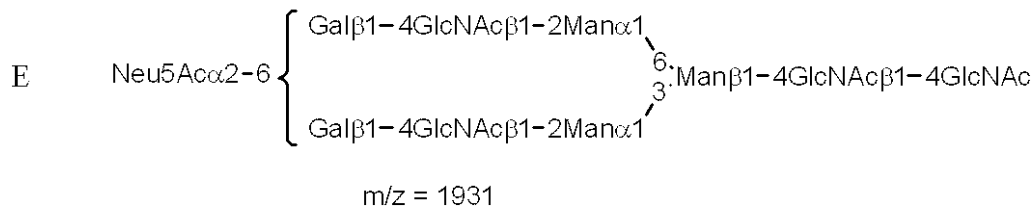
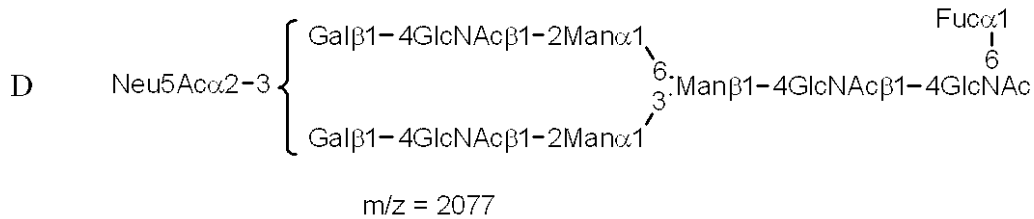
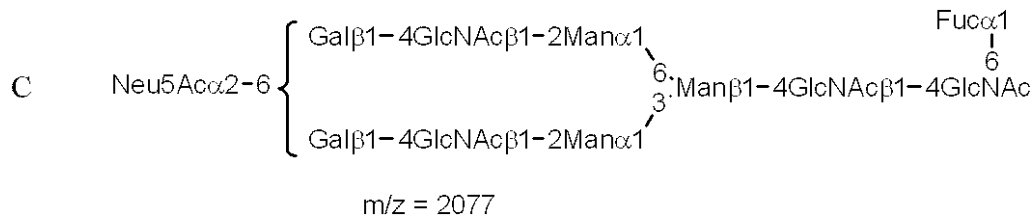
図1中の $m/z = 2077$ のピーク P_{2A} をプリカーサーイオンとして得られる MS^2 スペクトルを図2に示す。ピーク P_{2A} のイオンは、N-アセチルノイラミン酸およびフコースが1個ずつ結合した2本鎖構造を有することが推定された。さらに、以下の考察に基づいて、それらの付加位置を決定した。図2のスペクトルにおいて、Fuc-GlcNAcが遊離した $m/z = 1709$ のピークが検出されたが、GlcNAcのみが遊離した $m/z = 1856$ のピークが検出できなかったことから、フコースは還元末端のGlcNAcに結合していることが分かった。また、図2のスペクトルにおいて、Neu5Ac-Gal-GlcNAcに相当する $m/z = 655$ のピーク、およびNeu5Ac-Gal-GlcNAc-Manに相当する $m/z = 817$ のピークなどが検出されたことから、N-アセチルノイラミン酸は、非還元末端に結合していることが分かった。さらに、ダイオンであるNeu5Ac-Gal-GlcNAc-Man-Manに相当する $m/z = 961$ のピークが検出されたことから、Manの6位側の分岐構造にN-アセチルノイラミン酸が結合する異性体が存在することも明らかとなった。加えて、 $m/z = 1316$ 、 $m/z = 1113$ 、および $m/z = 799$ などのピーク群を検出したことにより、N-アセチルノイラミン酸が2-6結合している異性体(式Cに示す構造)と、N-アセチルノイラミン酸が2-3結合している異性体(式Dに示す構造)とが混在していることが判明した。

20

30

【0049】

【化2】



【0050】

図1中の $m/z = 1931$ のピーク P_{2B} をプリカーサーイオンとして得られる MS^2 スペクトルを図3に示す。ピーク P_{2B} のイオンは、フコースを持たず、N-アセチルノイラミン酸が1個結合した2本差構造を有することが推定された。Dイオンである Neu5Ac-Gal-GlcNAc-Man-Man に相当する $m/z = 961$ のピークがほとんど検出され無いことから、Manの3位側の分岐構造にN-アセチルノイラミン酸が結合する異性体が主であることが分かった。また、 $m/z = 1316$ および $m/z = 799$ などのピーク群に代って $m/z = 835$ のピークが顕著に検出されたことから、N-アセチルノイラミン酸が2-3結合している異性体(式Fに示す構造)と、N-アセチルノイラミン酸が2-6結合している異性体(式Eに示す構造)が主であることが解明できた。

【0051】

加えて、式A~Fに示した構造の他に、Gal残基がN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)残基に置換されている構造も検出された。

【0052】

このように、本発明の方法により、BPH患者由来の血清PSAの糖鎖構造の詳細が初めて明らかとなった。

【0053】

(実施例2~16)

BPHと診断され、匿名化され識別コードを付した3名の被験者の血清(実施例2~4)、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12名の被験者の血清(実施例5~16)を用いて、実施例1の手順を繰り返した。なお、医療機関の倫理審査を受け承認され、被験者には説明をし同意を得ている。

【0054】

10

20

30

40

50

それぞれの被験者の血清中 P S A 濃度およびフコース非結合糖鎖 (m / z = 2 4 3 6) / フコース結合糖鎖 (m / z = 2 5 8 2) のシグナル強度比 R を、以下の第 1 表に示す。また、ピレン標識部および 1 つの N - アセチルノイラミン酸残基が脱離したフコース非結合糖鎖 (m / z = 1 9 3 1) / フコース結合糖鎖 (m / z = 2 0 7 7) のシグナル強度比も同様の R 値を示した。

【 0 0 5 5 】

【表 1】

第1表：実施例 1 ～ 1 6 の評価結果

	識別 コード	病名	血清中PSA濃度 (n g / m L)	R
実施例 1	T-13	BPH	1 1 2 . 6	0 . 6 9
実施例 2	N-9	BPH	3 4 . 7	1 . 0 0
実施例 3	N-10	BPH	3 6 . 3	0 . 7 9
実施例 4	T-16	BPH	4 0 . 4	0 . 7 5
実施例 5	N-52	PC	1 8 . 2	1 . 6 0
実施例 6	N-32	PC	2 6 . 3	2 . 3 0
実施例 7	N-27	PC	3 0 . 3	3 . 2 0
実施例 8	N-28	PC	3 0 . 6	1 3 . 3 0
実施例 9	T-10	PC	3 6 . 4	6 . 8 9
実施例 1 0	N-41	PC	4 0 . 4	5 . 2 0
実施例 1 1	N-14	PC	5 4 . 2	1 . 3 0
実施例 1 2	N-23	PC	6 0 . 4	2 . 8 0
実施例 1 3	N-24	PC	6 6 . 0	6 . 1 0
実施例 1 4	T-31	PC	1 0 1 . 5	1 . 8 7
実施例 1 5	T-11	PC	1 4 1 . 8	5 . 7 2
実施例 1 6	N-17	PC	1 1 4 0 . 0	3 . 1 3

10

20

【 0 0 5 6 】

P C 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 1 で用いた血清と同程度の血清中 P S A 濃度を有する血清を用いた実施例 1 5 で得られた M S スペクトルを図 4 に示す。実施例 1 と同様の手順による M S ² 分析によって、実施例 1 5 においても式 A ~ F に示した構造を有する糖鎖の存在が確認された。

【 0 0 5 7 】

加えて、式 A ~ F に示した構造の他に、G a l 残基が G a l N A c 残基に置換されている構造も検出された。また、P C と診断された被験者の血清からは、2 本鎖構造の糖鎖に加えて、より高度に分岐した 3 本鎖および 4 本鎖の糖鎖も検出された。さらに、2 本鎖、3 本鎖および 4 本鎖の糖鎖のいずれにおいても、G a l 残基が G a l N A c 残基に置換されている構造も検出された。

【 0 0 5 8 】

(評価)

表 1 に示したように、P C と診断された被験者の血清に由来する試料は、1 . 0 より大きいフコース非結合糖鎖 / フコース結合糖鎖のシグナル強度比 R を示し、フコース非結合糖鎖を多く含有することを見出した。それに対して、B P H 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 R は 1 . 0 以下であった。すなわち、B P H と診断された被験者の血清中には、フコース結合糖鎖がフコース非結合糖鎖よりも多く存在することが初めて明らかになった。

【 0 0 5 9 】

さらに、実施例 2 ~ 4 および 9 ~ 1 0 の比較、ならびに実施例 1 と実施例 1 4 との比較

30

40

50

から明らかなように、血清中 P S A 濃度がほぼ同レベルの試料であっても、その P S A 上の糖鎖中のフコース非結合糖鎖およびフコース結合糖鎖の量の関係は、P C の場合と B P H の場合とでは全く異なるという結果を見出した。

【 0 0 6 0 】

さらに、驚くべきことに、P C においても B P H においても、フコース非結合糖鎖 / フコース結合糖鎖のシグナル強度比 R は血清 P S A 濃度とは全く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、P S A 濃度に依存することなしに P C と B P H とを精度よく区別できることを示している。したがって、本発明の方法は、1 ~ 1 2 0 0 n g / m L、好ましくは 1 ~ 1 0 0 n g / m L、さらに好ましくは 4 ~ 5 0 n g / m L の血清中 P S A 濃度の範囲の試料に適用できる。特に、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) においてさえ、本発明の方法は高精度での P C と B P H との区別に有効である。

10

【 0 0 6 1 】

(実施例 1 7)

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 6 2 】

標準品 P S A (CHEMICON) を用いて、実施例 1 の工程 1 に記載の第 5 の段階の電気泳動、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。この時、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行なわなくてもよい。

20

【 0 0 6 3 】

次に、乾燥ゲルに対して、1 ~ 1 0 0 単位のサーモリシン (Calbio Chem) の 2 5 m M 炭酸水素アンモニウム水溶液 (p H 8 . 0) を加えて、4 5 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 1 8 時間にわたって 5 6 で軽く攪拌した。ゲルに対して、抽出液 (7 0 ~ 8 0 % 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 2 0 分間にわたって振盪し、溶液を回収した。

【 0 0 6 4 】

洗浄した 2 5 m g 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、8 0 % 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式濃縮機によって乾固させ、次いで固形物を 2 μ L の純水に溶解させて糖ペプチド溶液を得た。

30

【 0 0 6 5 】

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、M S 分析を行った。M S 分析によって、P S A 由来のペプチド 4 3 - 4 7 に糖鎖が結合した糖ペプチドが検出された。得られた M S スペクトルを図 5 に示した。図 5 に示すように、フコースの有無に対応する 1 4 6 D a の分子量差を有する、4 つのフコース結合糖ペプチド (P ₁) およびフコース非結合糖ペプチド (P ₂) の対が見いだされた。

40

【 0 0 6 6 】

P _{1 A} (m / z = 2 8 9 1 . 2) / P _{2 A} (m / z = 2 7 4 5 . 2)
 P _{1 B} (m / z = 2 6 7 7 . 2) / P _{2 B} (m / z = 2 5 3 1 . 2)
 P _{1 C} (m / z = 2 4 2 7 . 1) / P _{2 C} (m / z = 2 2 8 1 . 0)
 P _{1 D} (m / z = 2 3 8 6 . 1) / P _{2 D} (m / z = 2 2 4 0 . 0)

【 0 0 6 7 】

いずれの対においても、フコース非結合糖ペプチド / フコース結合糖ペプチドのシグナル強度比 R ' が 1 . 0 以下であった。また、本実施例で用いた標準品 P S A に対して実施例 1 の工程 1 に記載の第 5 の段階の電気泳動、および工程 2 ~ 4 と同様の手順を適用して

50

糖鎖構造を解析した。得られたフコース非結合糖鎖/フコース結合糖鎖のシグナル強度比 R は 1.0 以下であった。

【0068】

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、フコースの有無に相当する 146 Da の分子量差を有するフコース非結合糖ペプチドおよびフコース結合糖ペプチドのピーク対を検出することができた。さらに、糖ペプチドのピーク対のシグナル強度比 R' は、糖鎖のピーク対のシグナル強度比 R と同様の結果を示した。したがって、実施例 1 ~ 16 に示したフコース非結合糖鎖/フコース結合糖鎖のシグナル強度比 R と同様に、フコース非結合糖ペプチド/フコース結合糖ペプチドのシグナル強度比 R' を求めることによって、PC と BPH とを高精度で区別することが可能であると考えられる。

10

【0069】

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、PSA 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、フコース非結合糖ペプチド/フコース結合糖ペプチドのシグナル強度比 R' を正確に求めることが可能となる。

【0070】

(実施例 18)

サーモリシンの炭酸水素アンモニウム水溶液に代えて、200 ng のエンドプロテイナーゼ Arg-C (ロシュ・ダイアグノスティクス) を含む緩衝液 (50 mM の Tris-HCl、pH 7.6、5 mM の DTT、および 0.5 mM の EDTA を含有する) を用い、ゲル内消化の反応温度を 37 に変更したことを除いて、実施例 9 の手順を反復した。

20

【0071】

MS 分析において、PSA 由来のペプチド 45 - 53 に糖鎖が結合した糖ペプチドが検出された。実施例 17 と同様にフコースの有無に相当する 146 Da の分子量差を有するフコース非結合糖ペプチド/フコース結合糖ペプチドのピーク対を検出することができた。

【0072】

(実施例 19)

BPH または PC に罹患している患者の血清から、実施例 1 にしたがって工程 1 を実施して PSA を精製し、その後、実施例 17 または 18 の手順にしたがって工程 2 を実施することによって、糖ペプチドを調製することができる。さらに実施例 17 または 18 の手順にしたがって工程 3 および 4 を実施することによって、フコースの有無に相当する 146 Da の分子量差を有するフコース非結合糖ペプチド/フコース結合糖ペプチドのピーク対を検出することができる。

30

【0073】

(実施例 20)

実際に PC に罹患している患者 (N-46、PSA 濃度 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の血清をもちいて、実施例 17 の手順にしたがって、ゲル内でサーモリシン処理を行なった。ゲル抽出液を遠心式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、80、30 分にわたって静置し、脱シアル酸化反応を行った。脱シアル酸化されたサンプルを遠心式濃縮機によって乾固させた。得られた固形物を 5% 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に溶解した。オクタデシル (C18) シリカが充填された 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糖ペプチド画分を得た。得られた糖ペプチド画分にアセトニトリルを加えて、アセトニトリルの最終濃度を 80% になるように調整し、ZIC (登録商標) HILIC 固相カラム充填剤 (SeQuant) による精製、引き続き工程 3 および 4 を実施例 17 と同様に行なった。その結果、得られた MS スペクトルを図 6 に示す。フコース非結合糖鎖/フコース結合糖鎖のシグナル強度比は確かに 1.0 より大きい値を示した。この結果は

40

50

、糖鎖解析の結果と一致していた。

【0074】

(実施例21)

実施例1の工程1に記載のPSA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せずに、市販品PSA (CHEMICON) 50 ngまたはPSA - ACT複合体 (CORTEX BIOCHEM) 50 ngに対して、10単位のサーモリシン (Calbio) の25 mM炭酸水素アンモニウム水溶液 (pH 8.0) を直接加えて、18時間にわたって56℃で静置反応させた。

【0075】

サーモリシン消化された溶液を遠心式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、80℃、30分にわたって静置し、脱シアル酸化反応を行った。脱シアル酸化されたサンプルを遠心式濃縮機によって乾固させた。得られた固形物を5%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に溶解した。オクタデシル (C18) シリカが充填された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ペプチドと分離し、糖ペプチド画分を得た。得られた糖ペプチド画分にアセトニトリルを加えて、アセトニトリルの最終濃度を80%になるように調整した。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、糖ペプチド画分を加えた。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式濃縮機によって乾固させ、次いで固形物を2μLの純水に溶解させて糖ペプチド溶液を得た。

【0076】

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。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PSA及びPSA - ACT複合体から同様に検出された。得られたMSスペクトルを図7Aおよび図7Bに示した。図7AはPSA由来の糖ペプチドのMSスペクトルを示す図であり、図7BはPSA - ACT複合体由来の糖ペプチドのMSスペクトルを示す図である。図7Aおよび図7Bに示すように、フコースの有無に対応する146Daの分子量を有する、2つのフコース結合糖ペプチド (P₁) およびフコース非結合糖ペプチド (P₂) の対が見いだされた。

【0077】

P_{1A} (m/z = 2386.1) / P_{2A} (m/z = 2240.0)
P_{1B} (m/z = 2600.1) / P_{2B} (m/z = 2454.0)

【0078】

このように、実施例1のようにPSA - ACT複合体から遊離PSAを調製しなくても、複合体から糖ペプチドを直接的に調製して、PSAのフコース結合糖ペプチドおよびフコース非結合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。

【0079】

(実施例22)

本実施例は、実施例21と同様に、実施例1の工程1に記載のPSA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ことなしに、患者血清の分析を行った例である。

【0080】

最初に、PCに罹患している患者 (N-99、PSA濃度90.3 ng/mL) の血清から、免疫グロブリンの除去を行った。3 mLのプロテインAアガロース担体 (PIERCE) をPBSを用いて平衡化した。これをディスパーザブルプラスチックカラム (PIERCE)

10

20

30

40

50

に充填し、被験者(N-99)の血清およびPBSの混合物を添加し、4にて30分間にわたって振盪した。この担体に結合しないPSAを含む画分を回収した。さらに、分離したプロテインAアガロース担体を、担体の3倍の体積(3CV)のPBSにて洗浄し、洗浄液をPSA含有画分に加えた。PSA含有画分に対して、最終濃度が1Mになるように Na_2SO_4 を加えた。

【0081】

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を除去した。2.5mLのフラクトゲル(商標)EMD TA(S)(Merck)をディスパ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、 Na_2SO_4 (1M)含有)にて平衡化させた。フラクトゲル(商標)充填カラムに対して上記にて得られた画分を添加し、送液ポンプを用いて7CVの同緩衝液をカラムに送液し、アルブミンを流出させた。次いで、20mMリン酸緩衝液(pH7.4、 Na_2SO_4 不含)を用いて、フラクトゲル(商標)充填カラムから吸着したタンパクを溶出させ、PSAを含む画分を得た。

10

【0082】

次いで、PBSにて平衡化させた2mLのプロテインAアガロース担体に対してこの画分を添加し、4にて30分間にわたって振盪することにより、免疫グロブリンのさらなる除去を行った。プロテインAアガロース担体に結合しないPSAを含む画分を回収した。さらに分離したプロテインAアガロース担体を、担体の3倍の体積(3CV)のPBSにて洗浄し、洗浄液をPSA含有画分に加えた。この画分を、次の免疫沈降に用いた。

【0083】

20

引き続き、免疫沈降に使用する抗PSA抗体ビーズの作製を行った。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、洗浄後のビーズに対して、市販の抗ヒトPSA・ウサギポリクローナル抗体(DAKO社製)を添加し、その混合物を室温にて30分間にわたって振盪し、抗体とビーズとの架橋を行った。続いて、0.5MのNaClを含む0.5Mのモノエタノールアミン溶液を加え、30分間にわたって振盪して、残余の活性基のマスクングを行った。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0.1M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、抗PSA抗体ビーズを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。

30

【0084】

次に、免疫沈降を行った。前述のアルブミンおよびグロブリンを除去したPSA含有画分に対して、0.1mLの抗PSA抗体ビーズを添加し、4にて1時間にわたって振盪した。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プロピオン酸を加え、抗体ビーズに吸着したタンパクを溶出させて回収した。1Mプロピオン酸での溶出を10回にわたって行い、合わせた溶出液を遠心式濃縮機(SpeedVac(SAVANT))を用いて乾固させた。

40

【0085】

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70%を回収できることが判明した。以上の工程は2日以内に完了することができ、簡便かつ迅速な工程でありながら、高収率である。

【0086】

次に、サーモリシンによるタンパク質の酵素消化を行った。乾固させたタンパクを50mM炭酸水素アンモニウム水溶液(pH8.0)に溶解し、50単位のサーモリシン(Calbio)を加えて、18時間にわたって56で静置した。反応混合物を遠心式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、40分間

50

にわたって80で静置し、脱シアル酸化反応を行った。脱シアル酸化されたサンプルを遠心式濃縮機によって乾固させて、糖ペプチド画分を得た。

【0087】

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、得られた糖ペプチド画分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、1MのNaOH水溶液、蒸留水、30%酢酸水溶液、蒸留水、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、ならびに5%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順次送液し、充填されたカーボングラファイトの洗浄および平衡化を行った。次に、乾固した糖ペプチド画分を、5%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に溶解し、カートリッジに送液した。糖ペプチド画分を吸着させたカートリッジに対して、蒸留水、5%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順次送液し、糖ペプチド画分の粗精製および脱塩を行った。その後、カートリッジに対して、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送液して、吸着した糖ペプチドを溶出した。この糖ペプチドを含む溶出液を回収し、遠心式濃縮機によって乾固させた。

10

【0088】

Sepharose CL-4B (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50%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の混合溶液で5回洗浄した。乾固させた粗精製の糖ペプチドを、同混合溶液に溶解させた。その溶液に対して、洗浄したSephарoseを6μL加え、1時間にわたって室温にて震盪して、糖ペプチドをSephарoseに吸着させた。続いて、前述の混合溶液を用いて、9回にわたってSephарoseを洗浄した。糖ペプチドの吸着したSephарoseに50%エタノール水溶液を加え、30分間にわたって室温で震盪して、糖ペプチドを溶離させた。溶離した糖ペプチドを含む溶液を回収し、遠心式濃縮機によって乾固させた。次いで、得られた固形物を5%アセトニトリル水溶液4μLに溶解した。

20

【0089】

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。MS分析によって、確かに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8に示した。フコスの有無に対応する146Daの分子量を有する、2つのフコース結合糖ペプチド(P₁)およびフコース非結合糖ペプチド(P₂)が見いだされた。

30

【0090】

$P_1 (m/z = 2386.4) / P_2 (m/z = 2240.3)$

【0091】

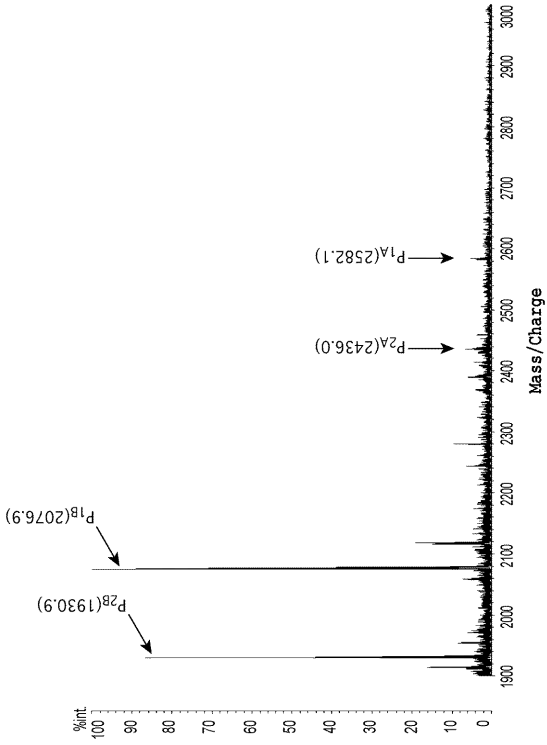
被験者の血清中PSA上のフコース非結合糖鎖(m/z = 2240.3) / フコース結合糖鎖(m/z = 2386.4)のシグナル強度比Rは1.23であった。

【0092】

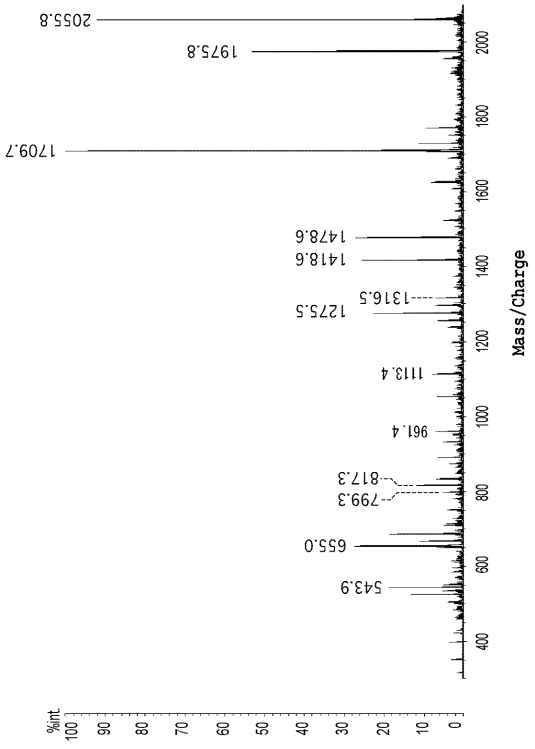
以上のように、90.3ng/mLの低いPSA濃度を有する前立腺癌患者の血清からの糖ペプチドを、MSによって検出することに初めて成功した。また、低いPSA濃度を有する前立腺癌患者の血清中のPSAにおいても、1000ng/mL以上という高いPSA濃度を有する前立腺癌患者の血清中のPSAと同様に、フコース非結合糖鎖 / フコース結合糖鎖のシグナル強度比が1.0より大きいことが明らかになった。

40

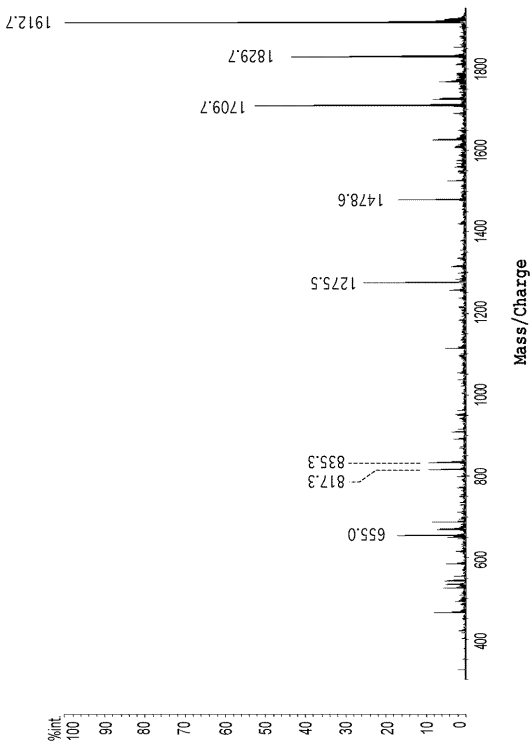
【 1 】



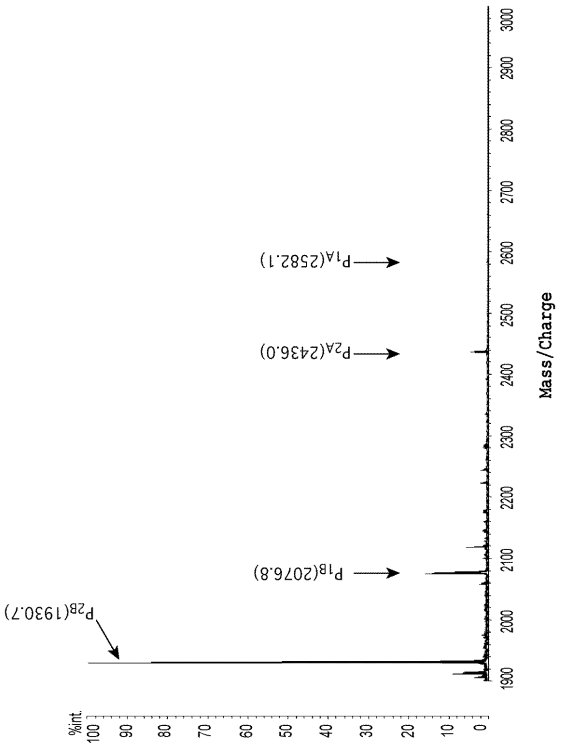
【 2 】



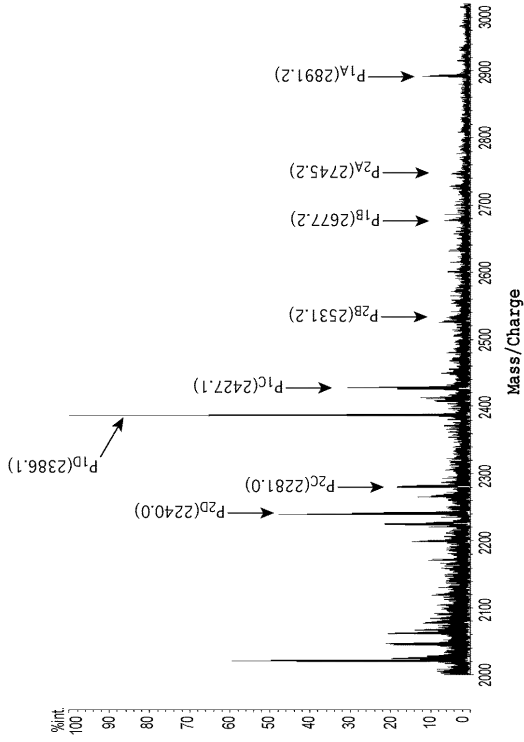
【 3 】



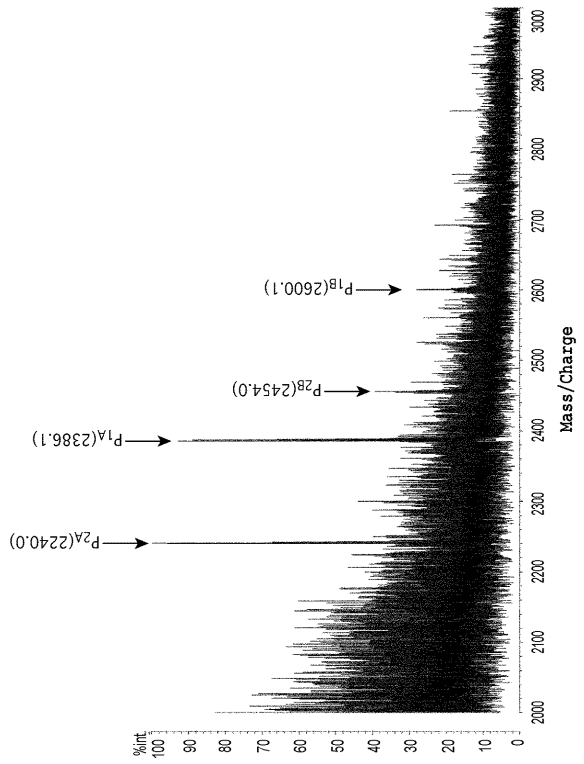
【 4 】



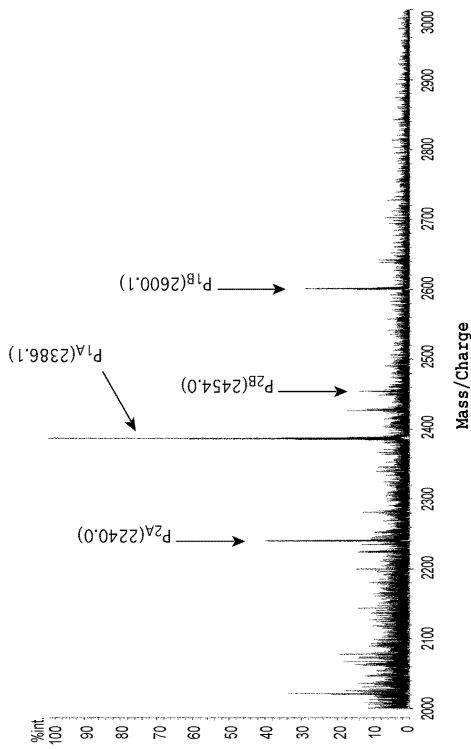
【 5 】



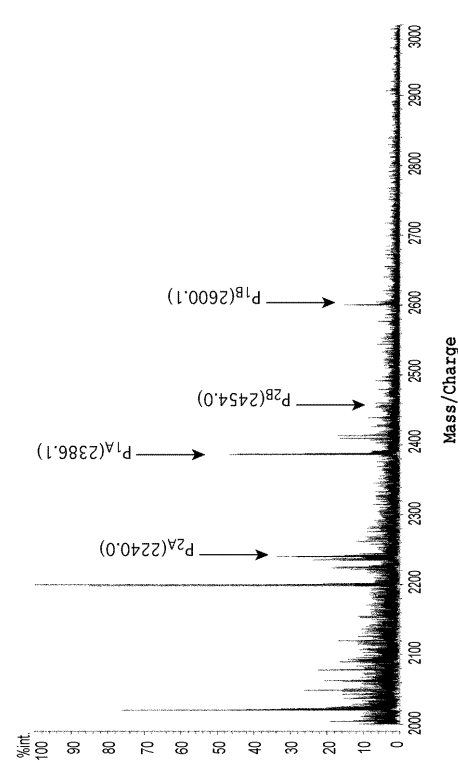
【 9 】



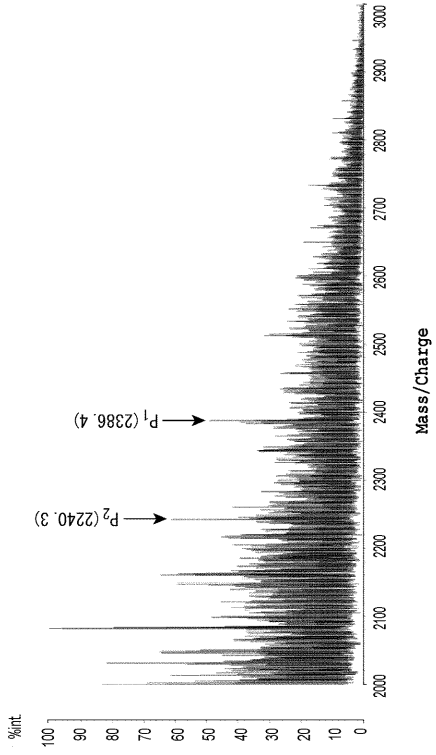
【 7 A 】



【 7 B 】



【 8 】



フロントページの続き

(出願人による申告)平成19年度、独立行政法人科学技術振興機構、大学発ベンチャー創出推進に係る委託研究契約、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(72)発明者 杉本 一路
東京都板橋区加賀1丁目8番1号 財団法人野口研究所内

審査官 廣田 健介

(56)参考文献 特表2006-515927(JP,A)
Gloria Tabares et al., Different glycan structures in prostate-specific antigen from prostate cancer sera in relation to seminal plasma PSA, Glycobiology, 2006年, vol. 16, no. 2, 132-145
石村 他9名, 糖ペプチド構造解析によって判明したPSA糖鎖の癌性変化, 日本泌尿器科学会雑誌, 2007年 2月20日, vol. 98, no. 2, 222(256)
山本, JST「大学発ベンチャー創出推進」採択にあたって, 野口研究所時報, 2006年, 49, 43-45

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/60 - 27/70

G01N 33/48 - 33/98

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)