

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(糖鎖利用による革新的創薬技術開発事業)
事後報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) Erexim法と超臨界流体クロマトグラフ質量分析による高速高分解能糖鎖構造一斉定量法の開発

(英語) Development of a rapid glycoform profiling technology using super critical fluid chromatography mass spectrometer and the Erexim method.

研究開発実施期間: 平成28年9月1日 ~ 令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 植田 幸嗣
(英語) Koji Ueda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 公益財団法人がん研究会・がんプレシジョン医療研究センター・がんオーダーメイド医療開発プロジェクト・プロジェクトリーダー

(英語) Project Leader, Cancer Precision Medicine Center, Project for Realization of Personalized Cancer Medicine, Japanese Foundation for Cancer Research

II 研究開発の概要

本研究は創薬標的となりうる特定のタンパク質に付加した糖鎖構造変動を、微量で複雑な生体試料から極めて高感度に、かつ多検体定量評価可能な新規分析技術「SFC-Erexim 質量分析システム」の構築と創薬応用を目的として研究開発を実施した。

超臨界流体クロマトグラフで溶媒として使用する超臨界二酸化炭素は極性の低い、すなわち疎水性の高い溶質をよく溶解させることが知られており、糖ペプチドのみを特異的に疎水化することができれば、特別な糖ペプチド濃縮精製を行わずとも非糖ペプチドを不溶状態に維持しつつ糖ペプチドだけを可溶化、分析することが可能となる。したがって、すべての水酸基、アミノ基を高疎水性基に置換する糖ペプチド特異的疎水化ラベル法の開発を試みた。本法は有機溶媒中で室温下 15 分間の反応にて 99.98%以上の標的官能基を疎水化することができる非常に簡便で効率の良い反応系であり、マンノース 5 残基、GlcNAc 2 残基から成るハイマンノース型糖鎖が付加した RNaseB タンパク質由来糖ペプチドを同ラベル化後に MALDI-TOF MS 分析を行って糖鎖部分、アミノ酸部分を合わせたラベル化効率を検証した結果では、想定ラベル標的水酸基、アミノ基 24 か所すべてに疎水性基が導入されたプロダクトの割合は 98.3%となり、十分な反応効率であることが示された。

次に、開発した「糖ペプチド特異的疎水化ラベル法」に加えてプロトンアクセプターとなる官能基を高効率に導入する「高感度化ラベル反応」を開発、条件の至適化を行った。当誘導体化を施すことにより糖ペプチドイオンの電荷 (z) を増加させることが可能となり、質量電荷比を低減して測定対象糖ペプチドを増加させることができるだけでなく感度的な向上も期待できる。本反応はペプチド上に存在する第一級アミン全てをマイルドな条件で置換できる反応である。実際に RNaseB タンパク質由来糖ペプチドに対するラベル導入効率を調べたところ、100%の反応効率が確認できた。また、2 価体に比べて 3 価体での検出率が増加しており、プロトンアクセプターの増加効果も確認できた。さらに、ラベル化前後の糖ペプチドサンプルを等量連続分析して感度向上効果について検討を行ったところ、約 2.5 倍の感度上昇が確認できた。これは同ラベル化によるイオン化効率の向上効果であると考えられる。

以上の前処理を行った複数の糖タンパク質由来糖鎖サンプルについて SFC-MS による分析を実施し、使用カラム、溶媒、SFC グラジエント、モディファイア（超臨界二酸化炭素溶媒への添加物質）、トリプル四重極型質量分析装置 (LCMS-8060、島津製作所) のパラメータといった分析条件を最適化した。その結果、モデル糖鎖であるラフィノースの分析において検出下限値が 5 atto-mole (amol) ($\text{atto} = 10^{-18}$) となり、従来法に比べて極めて高い検出感度を持つ分析系であることが示された。また、わずか 5 分間の分析時間（ラフィノースの保持時間は約 2.8 分）であるため、多数のサンプルであっても大変効率のよいハイスループット分析が可能となった。さらにこの低濃度領域において 4 桁以上の定量直線性を持つことも示されたため、微量試料由来の精密な糖鎖定量解析にも十分耐えうるダイナミックレンジを保持していることが分かった。

また、本法を用いて実際に臨床で用いられている抗体医薬品ベバシズマブ（商品名アバスタ）上の糖鎖構造定量プロファイリングを試行したところ、過去の報告を 2 倍以上上回る 126 構造もの構造が定量的に検出された。このように、RNaseB や IgG といった糖タンパク質から調製した独自ラベル化糖鎖サンプルミクスチャーの SFC-MS 分析においても atto-mole オーダーの検出感度を達成でき、2 桁多い pmol オーダーのサンプルを必要とする従来技術に比べて圧倒的に高い感度の遊離糖鎖分析が可能となった。

一方で、2013年に開発したナノフローHPLCを分離に用いるLC-MS-Erexim法についても技術革新を継続しており、遊離糖分析を行ったペバシズマブに対してLC-MS-Erexim法による糖ペプチド分析を実施したところ、85種類の糖鎖構造が定量検出された。この手法でも存在率0.01%程度の非常にレアな糖鎖構造まで各種 oxonium ion の検出と共に堅牢な同定が可能となっている。LC-MS-Erexim法はトリプシン消化のみの前処理により、糖鎖付加部位特異的な糖構造プロファイルが得られる点で大きなメリットがある。LC-MS-Erexim法のさらなる実用性を検証する目的で血清中PSAタンパク質上糖鎖の定量プロファイリングを試行した。ここで用いられた30検体は全て血中PSA濃度が4-10 ng/mlのものであり、カットオフ値である4 ng/mlに近いレベルのPSA陽性患者群を選出した。本手法を用いて血清100 μ lからPSAを免疫沈降により回収、トリプシン消化後にLC-MS-Erexim分析を行った。その結果、存在率1.5%の糖鎖構造においても1 ng/mlのPSA濃度を持つ症例から定量的に検出が可能であり、少なくとも診断時のPSAカットオフ値である4 ng/mlにおいては存在率0.3%の大変含有量の少ない糖鎖構造でも検出可能であることが分かった。本検出系を用いて網羅的な血中PSA上糖鎖構造の定量プロファイルを作成したところ、67種類の構造が検出された。血清検体からのPSA上糖鎖分析における過去の報告では、18,000 ng/mlのPSA濃度を示す検体500 μ lから24構造を検出したというものが最大であるため、われわれのLC-MS-Erexim法は極めて高感度で多検体分析にも使用可能な各種スペックも持っていると評価できた。

一連の開発、実験成果を研究分担者である株式会社島津製作所にフィードバックし、Erexim™ Application Suiteソフトウェアパッケージを上市した。本ソフトウェアの「Profile Database Manager」を用いると任意のペプチド、糖鎖情報を質量分析データと関連付けるデータベースを簡易に構築することが出来る。また、「MRM Method Maker」機能により上で指定した糖ペプチド上糖鎖構造を網羅的にプロファイリングするための非常に複雑な質量分析メソッドを自動的に作成、速やかに同社製LCMS-8060などトリプル四重極型質量分析装置での分析を開始できる。さらに「Data Analyzer」モジュールによって質量分析Raw dataからEreximカーブの描画や各糖鎖構造の存在量比較グラフの描画を自動で行うことが可能である。

本研究で開発した糖鎖分析技術の応用実施例として、抗PD-L1抗体医薬品の親和性に影響を与えるPD-L1上糖鎖付加部位、糖鎖構造の同定を行った。肺腺癌4種、肺扁平上皮癌5種、肺小細胞癌5種、肺大細胞癌1種の細胞株からPD-L1タンパク質を単離精製し、Erexim法を用いてPD-L1上4カ所のN型糖鎖付加部位(Asn35, Asn192, Asn200, Asn219)それぞれについて糖鎖構造の種類と相対付加量を計測した。本過程におけるPD-L1の免疫捕捉には、PD-L1の細胞外ドメインに存在する糖鎖群に親和性の影響を受けない、抗PD-L1細胞内ドメイン抗体を使用した。また、糖鎖修飾は特定の部位に100%糖鎖が付加するわけではなく、糖鎖付加有無の割合も細胞種の違いなどの要因で変動するため、各付加部位における糖鎖の付加頻度も定量化した。一方で、臨床実用化されている2種の抗PD-L1抗体医薬品について上記15種細胞株に対する親和性をフローサイトメトリーによる計測に基づいてEC50値として算出を行った。

これらの解析で得られたPD-L1上糖鎖構造情報と抗PD-L1抗体医薬品EC50データセットを用いて、これら抗体医薬品のがん細胞上PD-L1への親和性に影響を及ぼす糖鎖付加部位、および糖鎖構造の同定を行った結果、一方の抗PD-L1抗体医薬品の肺がん細胞上PD-L1に対する親和性を大きく阻害する糖鎖付加部位、糖鎖構造が見出された。なお、この付加部位、構造は他方の抗PD-L1抗体医薬品に対しては結合親和性に影響を与えないことも分かった。これらの解析からは同薬の有効なコンパニオン診断技術を確立できる可能性があるだけでなく、今後あらゆる細胞表面タンパク質を標的とする抗体医薬品開発を行う過程において本課題で開発した糖鎖構造精密プロファイリング技術がR&Dで活用、実装可能な事例となりうると期待できる。

The aim of this study was to develop a novel glycoproteomic technology for rapid and sensitive quantification of glycoforms on any glycoproteins.

For that purpose, here we integrated our patented mass spectrometric application Erexim (Energy-resolved oxonium ion monitoring) (Haga Y, Anal Chem, 2019) with the supercritical fluid chromatography mass spectrometry (SFC-MS) and achieved establishment of a rapid glycoform profiling technology (SFC-Erexim) with the highest sensitivity ever reported. Indeed, from the 8-minute SFC-Erexim analysis of bevacizumab, nivolumab, ramucirumab, rituximab, and trastuzumab detected 102 glycoforms in total with the lower limit of detection of 5 attomole. The dynamic range of glycan abundance was over 6 orders of magnitude in the analysis of bevacizumab by SFC-Erexim, while the conventional fluorescence HPLC analysis covered 3 orders of magnitude. Through the lot-to-lot evaluation of these mAbs by SFC-Erexim analysis, a series of structural fluctuations were found in pharmacologically important glycan structures. By collaborating with Shimadzu Corporation, the Erexim Application Suite software package was commercialized, which enabled automated construction of mass spectrometric parameters for Erexim analysis and also sophisticated illustration of analysis results.

Next, we applied this technology to exploration of glycan structures on PD-L1 protein, which critically affect the affinity of anti-PD-L1 therapeutic antibodies. We optimized the protocol for isolation of PD-L1 from total cell lysates and the mass spectrometric parameters for Erexim analysis of PD-L1-derived glycopeptides. Then 15 lung cancer cell lines (5 adenocarcinoma, 5 squamous cell carcinoma, 4 small cell lung cancer, and 1 large cell lung cancer) were subjected to the Erexim-based comprehensive glycoform quantification analysis. In this analysis the quantitative glycoform profiles were acquired for each glycosylation sites on PD-L1 (Asn35, Asn192, Asn200, Asn219). Simultaneously, the EC50 values of these 15 cell lines against a couple of clinically-available anti-PD-L1 antibodies were calculated by flow cytometry analysis. From the statistical comparison of glycoform profiles on PD-L1 with EC50 values of antibody drugs, we successfully found that the specific glycan structures on one of the glycosylation sites of PD-L1 had significant inhibitory effect to the affinity of the anti-PD-L1 antibody drug.

Thus, our glycoform profiling method could provide an ideal platform for in-depth analysis of precise glycan structures for drug design, process optimization, manufacturing, and quality control of therapeutic drugs.