

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) 超高効率濃縮法に基づく CE-LIF-MS 微量糖鎖分析システムの開発  
(英語) Trace-level Glycan Analysis System by CE-LIF-MS and Ultra-efficient Preconcentration 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) 川井 隆之  
(英語) Takayuki Kawai

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・客員研究員  
(英語) RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research / Visiting Scientist

## II 研究開発の概要

がんなどの疾患において病変細胞は組織の微小領域に局在することが多く、このような微量病変細胞から糖タンパク質の糖鎖構造変化を検出することが糖鎖創薬の第一歩として必須である。しかし従来のプロテオーム解析は感度が低く、通常は一万細胞以上の大量の試料が必要である。また十分な試料が確保できても、糖鎖の変異ではなくタンパク質発現量の変化ばかりが検出されてしまうことから、糖鎖構造変化を有する糖タンパク質を発見することが難しい。そこで本研究では、極微量の試料中の糖鎖を世界最高感度で分析する技術を開発し、100細胞程度の病変細胞から糖鎖標的を25分子以上を発見することを提案した。

まず感度の問題を解決するため、新たな超高効率試料濃縮法 large-volume dual preconcentration by isotachopheresis and stacking (LDIS) 法を開発した。LDIS 濃縮法は、電場増強スタッキングの原理に基づく large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump (LVSEP) 法による第一段階濃縮の後、過渡的等速電気泳動 (tITP) 法に基づく第二段階濃縮を行うことにより、糖鎖を約 2000 倍程度濃縮することが可能な手法である。糖鎖の濃縮後、キャピラリー電気泳動 (CE) によってサイズ分離を行い、レーザー励起蛍光 (LIF) および質量分析 (MS) で検出することで、超高感度に糖鎖を定量・定性することができる。

さらに LIF 検出において、市販システムで採用されている励起レーザーの波長・出力および検出波長は 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS) 色素に最適な値ではなかったことから最適化を実施し、最終的に世界最高感度となる 65 fmol/L (91 zmol) の糖鎖検出感度を実現した。

MS 検出においては、CE の分離に用いる熔融石英キャピラリーの先端部分をフッ化水素酸でエッチングして壁厚を 10  $\mu\text{m}$  以下まで薄くした後、さらに CO<sub>2</sub> レーザープレーによって先端を先鋭化して先端径を 5  $\mu\text{m}$  程度に加工した nanoCESI イオン化システムを開発した。これにより、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法における初期液滴サイズを最小化してイオン化効率を向上させ、さらに薄い壁厚によって conductive segment を形成することによりシース液を用いない低流速の CE-MS 分析を実現した。その結果、従来の最高感度の CE-MS システムと比較して最大 5 倍程度高感度な分析を実現した。

さらに CE-MS 用にカスタマイズした LDIS 濃縮システムを開発した。CE-MS ではアウトレット末端をオープンにしなければ ESI によるイオン化が実施できないが、LDIS 濃縮ではアウトレット末端から泳動液を引き込みながら試料を濃縮しなければならず、その両立は困難であった。そこで LDIS 濃縮の際にだけアウトレット末端部に泳動液の液滴を形成し、アウトレットからキャピラリー内部への泳動液の引き込みを可能とする新システムを開発した。これにより LDIS-CE-MS 分析システムを実現し、LIF 同様に世界最高感度となる 450 fmol/L (540 zmol) の検出感度を実現した。

続いて、微量かつ信頼性の高い多検体分析を実現するため、LDIS 濃縮プロセスの自動化用ソフトウェアおよびデータ解析用のアルゴリズムを開発した。LDIS 濃縮においては、濃縮を行いながらアウトレットから泳動液を引き込む際、電気浸透流に加えて圧力補助を行うことで濃縮再現性を高めているが、濃縮完了のタイミングで圧力を停止する必要があるため、その指標となる電流値をモニタリングする必要がある。電流値が急激に上昇するタイミングで圧力を停止する必要があるが、このような複雑な操作を実現するソフトウェアが存在しないため、本研究では目視およびマニュアル操作で実施している作業を画像認識ソフトウェアを用いて自動化することで、96 検体の連続分析を自動で行うことに成功した。一方で、ここで得られた検出時間・ピーク面積から糖鎖構造の決定および定量を行うが、 $n=96$  スケールにて得られる値はどうしても徐々に変化するため、これらの補正が必要であった。そこで、内部標準としてマルトース、マルトトリオース、マルトデカペンタオースを用いた新たな補正アルゴリズムを開発した。これにより、最終的に検出時間およびピーク面積の相対標準偏差を 0.11%・5.8%まで向上することに成功した。

続いて本分析技術を微量細胞に含まれる遊離糖鎖の解析に応用した。まず *in vitro* 分析として、HeLa, MCF-7, HepG2 の 3 種類の腫瘍由来培養細胞をそれぞれ約 100 細胞程度採取し、溶解・糖鎖遊離・蛍光標識・精製を行って解析した結果、1 万細胞以上のバルクスケールで得られた分析結果と同様の糖鎖プロファイルが得られた。さらに最適化を実施することで、最終的に HeLa 細胞 1 細胞であってもバルクスケールと同様の糖鎖プロファイルを得ることに成功した。

さらに *in vivo* 分析として、マウス腎臓および肝臓組織の FFPE 切片から最小で 100  $\mu\text{m}$ ×100  $\mu\text{m}$ ×5  $\mu\text{m}$  程度の領域 (10 細胞相当量) をレーザーマイクロダイセクション (LMD) で採取し、上記同様の手法で前処理して解析を行った。腎臓の皮質・髄質や肝臓などの角組織領域で異なる糖鎖プロファイルが得られた。また各組織領域で採取面積を面積を変化させたところ、ほぼ切断面積に比例したピーク面積値が得られ、高い定量性と定性能が示された。同様にヒト臨床検体への応用を行い、間質が多いすい臓がんおよびスキルス胃がんを対象に、マウスと同様の解析を実施した結果、がん細胞・間質領域・正常細胞でそれぞれ異なる糖鎖プロファイルを得ることに成功した。がん細胞・がん間質特有の糖鎖として、合計で 31 分子を見出すことに成功した。

最後に遊離糖鎖解析で得られたデータをバリデーションするため、ショットガンプロテオーム解析を行った。まず微小液滴を混合することでタンパク質の吸着ロスを抑制した世界初の前処理システムを構築し、1 細胞 LDIS-CE-MS/MS プロテオーム解析を実現した。続いてこの技術を用いてすい臓がん・スキルス胃がんのプロテオーム解析を行ったところ、各微小領域で 100-1000 種類程度のタンパク質を同定することに成功した。しかし糖ペプチドを MS/MS で検出することはできなかったことから、現在新たな微量分析パイプラインを構築することで、微量試料からの糖ペプチド解析を実現するべく研究を継続している。

In pathogenesis like cancers, abnormal cells are often localized within a microscale segment, which is called as "tumor microenvironment". It is essential to detect the mutated glycan structure from such pathogenic cells; however, conventional proteome analysis lacks sensitivity, requiring more than 10,000 cells. Even if enough cells are available, it is not easy to detect only the change in the glycan structure, but not in the proteins expression level. Thus, it is not easy to find glycoproteins that change their glycan structure. In this study, therefore, we proposed to develop the most sensitive analysis method in the world that could find more than 25 glycan molecules from around 100 pathogenic cells.

To address the lack of sensitivity in the current analysis system, a novel online sample preconcentration technique "large-volume dual preconcentration by isotachopheresis and stacking (LDIS)" was developed. LDIS could enrich the glycans by around 2,000-fold in the capillary electrophoresis (CE) platform. After the size separation in CE, laser-induced fluorescence (LIF) and/or mass spectrometry (MS) detections were performed, so that ultra-sensitive qualification and quantitation of trace glycans would be achieved. After the optimization of excitation/emission wavelengths, world's most sensitive glycan detection with limit of detection (LOD) of 65 fM (91 zmol) was achieved in the LIF detection. In the MS detection, a novel electrospray ionization (ESI) emitter named "nanoCESI" was developed. The nanoCESI emitter was fabricated by etching the few-cm segment from the outlet of the fused silica capillary until the wall thickness reached less than 10  $\mu\text{m}$ , followed by the tapering with the CO<sub>2</sub> laser puller. With this structure, LOD of 450 fM (540 zmol) was achieved.

For the routine analysis, automation of LDIS preconcentration and data processing was performed. Since the currently available software does not meet such requirement, an image-recognition software was utilized for automate the procedure that researchers have been doing manually. As the result, automated LDIS-CE-LIF analyses of 96 samples were achieved with relative standard deviations of 0.11% and 5.8% for the migration time and peak area, respectively, which were obtained with our newly developed calibration method with both internal/external standards.

The developed method was applied to the analysis of N-linked glycans from cultured cells. Three cell lines of HeLa, MCF-7, and HepG2 were analyzed after the cell lysis, protein lysis, peptide-N-glycanase reaction, fluorescent derivatization, and purification, where 100-cells sample exhibited almost same glycan profile as that obtained from bulk samples with more than 10,000 cells. Finally, even a single HeLa cell was analyzed with good sensitivity to detect tens of N-glycans.

For the *in vivo* analysis, formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) mouse kidney and liver were analyzed. From their slice, 100  $\mu\text{m}$   $\times$  100  $\mu\text{m}$   $\times$  5  $\mu\text{m}$  microsections (equivalent to 10 cells in calculation) were isolated with a laser-microdissection (LMD) instrument. As the result, different glycan profiles were obtained from kidney cortex, kidney medulla, and liver. When the dissected area was changed, the obtained peak area of representative glycans were almost same as the ratio of the dissected slice area. Similarly, the LDIS-CE-LIF-MS was applied to the human clinical samples. Pancreas and gastric cancers were selected because they have developed stroma area surrounding the cancer cells. As the analysis result, different profiles were obtained from cancer cells, cancer stroma, and normal cells. As the cancer cell or cancer stroma-specific glycans, we discovered totally 31 molecules.

Finally, the obtained analysis results were validated with the shotgun proteome analysis. By conducting the sample preparation within the microdroplets, we could minimized the loss of protein molecules by surface adsorption. We discovered 100-1,000 proteins from each tissue microsections; however, no glycopeptides could be detected in the information dependent MS/MS analysis. We are still continuing this study to develop a new pipeline that achieve further higher sensitivity in the analysis of glycopeptides.