

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-11978

(P2019-11978A)

(43) 公開日 平成31年1月24日(2019.1.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	V 4 B O 6 3
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/53	S
C 1 2 Q 1/34 (2006.01)	GO 1 N 33/53	U
	GO 1 N 33/574	
	C 1 2 Q 1/34	
審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 14 頁)		

(21) 出願番号 特願2017-127432 (P2017-127432)
 (22) 出願日 平成29年6月29日 (2017. 6. 29)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. Tween-20
2. Tween-80

(71) 出願人 504145364
 国立大学法人群馬大学
 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地
 (74) 代理人 100126505
 弁理士 佐貫 伸一
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (72) 発明者 矢澤 伸
 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 国立大
 学法人群馬大学内
 (72) 発明者 浅尾 高行
 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 国立大
 学法人群馬大学内
 Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ67 QQ79 QR15
 QS33 QX02

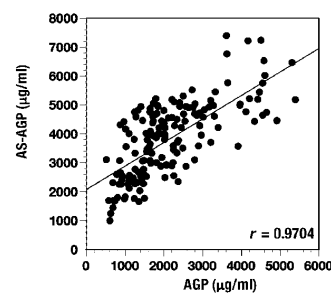
(54) 【発明の名称】 糖タンパク質におけるフコシル糖鎖の量を測定する方法およびキット

(57) 【要約】

【課題】従来法に比べて、簡便かつ迅速に、より正確に、AGPにおけるフコシル糖鎖の量を測定する方法およびキットの提供。

【解決手段】検体中のヒト α_1 -酸性糖タンパク質 (AGP) におけるフコシル糖鎖の量を測定する方法であって、検体中のAGPを脱シアリル化する工程、及び基材に固定され、糖鎖が脱フコシル化された抗AGP抗体と、前記脱シアリル化されたAGPのフコシル基を認識するレクチンとを用いて、酵素免疫測定法 (EIA法) によりフコシル糖鎖の量を測定する工程を含む、方法。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検体中のヒト α_1 - 酸性糖タンパク質 (AGP) におけるフコシル糖鎖の量を測定する方法であって、

検体中の AGP を脱シアリル化する工程、及び

基材に固定され、糖鎖が脱フコシル化された抗 AGP 抗体と、前記脱シアリル化された AGP のフコシル基を認識するレクチンとを用いて、酵素免疫測定法 (EIA 法) によりフコシル糖鎖の量を測定する工程を含む、方法。

【請求項 2】

前記脱シアリル化がシアリダーゼ処理による、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記脱フコシル化が過ヨウ素酸酸化による、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記レクチンがヒドロチャワンタケレクチン (AAL) である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

さらに、以下の工程を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

前記検体中の AGP を定量する工程、及び

前記フコシル糖鎖の量を前記 AGP 量で規格化する工程。

【請求項 6】

検体中のヒト α_1 - 酸性糖タンパク質 (AGP) におけるフコシル糖鎖の量を測定するためのキットであって、下記の要素を含むキット：

20

(A) 脱シアリル化用試薬、

(B) 抗 AGP 抗体が固定された EIA 用基材、および

(C) EIA 用基材に固定化された抗 AGP 抗体を脱フコシル化するための試薬。

【請求項 7】

さらに、(D) 標識レクチンを含む、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 8】

前記レクチンがヒドロチャワンタケレクチン (AAL) である、請求項 7 に記載のキット。

30

【請求項 9】

標識レクチンがビオチン標識レクチンである、請求項 7 又は 8 に記載のキット。

【請求項 10】

さらに、(E) アビジン標識酵素を含む、請求項 9 に記載のキット。

【請求項 11】

さらに、

(F) 検体中の AGP を定量するための、抗 AGP 抗体が固定されたサンドイッチ ELISA 用基材、及び

(G) 酵素標識抗 AGP 抗体を含む溶液

を含む、請求項 6 ～ 10 のいずれか 1 項に記載のキット。

40

【請求項 12】

前記脱シアリル化用試薬がシアリダーゼを含む、請求項 6 ～ 11 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 13】

前記脱フコシル化試薬が過ヨウ素酸ナトリウムを含む、請求項 6 ～ 12 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 14】

がんの診断用である、請求項 6 ～ 13 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 15】

がん治療の予後診断用である、請求項 6 ～ 14 のいずれか 1 項に記載のキット。

50

【請求項 16】

がん治療ががんに対する手術、化学療法、免疫療法、抗体療法及び放射線療法から選択される、請求項 15 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖タンパク質におけるフコシル糖鎖の量を測定する方法およびキットに関する。より詳細には、該糖タンパク質は、ヒト α_1 - 酸性糖タンパク質 (AGP) である。

【背景技術】

【0002】

天然に存在するタンパク質の大部分は糖鎖の修飾を受けている。糖タンパク質の中には、主として血中に存在し、種々の疾患や病態と関連があつて臨床への応用の対象となっているものも多い。

非特許文献 1 には、血中 AGP の測定法が記載されており、多くのがん腫で担がん患者での AGP 濃度は有意に高値を示すこと、術後の予後予測には AGP 濃度との相関はないものの、AGP 糖鎖の高フコシル化がその判定に強く関連することが明らかにされている。特許文献 1 には、術後がん患者の予後予測判定方法が示されている。

【0003】

また、悪性腫瘍における臨床病理や種々の治療効果に対応して、AGP 糖鎖のフコシル化が変動することも明らかになってきた。例えば、本発明者らは、機能糖鎖としてよく知られるシアリル Le^x 構造 (NANA $\alpha_2,3\text{Gal}\beta 1,4[\text{Fuc}\alpha 1,3]\text{GlcNAc}$) の AGP 糖鎖への付加ががん・非がんで有意に変わること、またフコシル化量が予後予測や化学療法の効果判定に極めて有用な診断マーカーになり得ることを明らかにしてきた (非特許文献 2)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特許第 4253233 号明細書

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】Hashimoto, S. et al., Cancer, 101:2825-2836, 2004

【非特許文献 2】Yazawa, S. et al., PLoS ONE 11(6): e0156277 (2016)

【非特許文献 3】Biomed. Res. Inter., Vol 2013, Artical ID, 834790, 2013

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

AGP のフコシル糖鎖の量を用いてがん患者における術後の予後予測や化学治療効果の評価をする際には、血清から、N 型糖鎖の分岐度とフコシル化量を区別する 2 種のレクチンを含むゲルで血清蛋白を別々に泳動・分離した後、抗 AGP 抗体で特異的にそれぞれの糖鎖フォームをもつ AGP を捕捉してそれぞれの量比をもとめる交叉親和性免疫電気泳動法 (crossed-affinoimmuno electrophoresis (CAIE 法)) (非特許文献 1) や、血清から非特許文献 3 に記載の方法で AGP を精製し、その糖タンパク質から分離・精製した糖鎖について、質量分析法により糖鎖を網羅的に解析すること等が行われている (非特許文献 2)。また血中の AGP 量については、抗 AGP 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法が一般的である。

しかしながら、本発明者らは、従来法では、例えば、悪性腫瘍と関連して AGP が高シアリル化している場合、AGP の量は実際よりも低値を示すことを見出した。つまり、従来法では、AGP の正確な量が測定できないことを見出した。

本発明は、上記課題に鑑み、従来法に比べて、簡便かつ迅速に、より正確に、AGP におけるフコシル糖鎖の量を測定する方法およびキットの提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【0007】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、検体中のAGPを脱シアリル化すること、基材に固定され、糖鎖が脱フコシル化された抗AGP抗体によって血清中のAGPを捕捉し、AGPの糖鎖のフコシル基を、フコース結合レクチンで検出することで上記課題が解決できることを見出し、本発明に到達した。本発明は下記の通りである。

【0008】

〔1〕 検体中のヒト α_1 -酸性糖タンパク質（AGP）におけるフコシル糖鎖の量を測定する方法であって、

検体中のAGPを脱シアリル化する工程、及び

基材に固定され、糖鎖が脱フコシル化された抗AGP抗体と、前記脱シアリル化されたAGPのフコシル基を認識するレクチンとを用いて、酵素免疫測定法（EIA法）によりフコシル糖鎖の量を測定する工程を含む、方法。

〔2〕 前記脱シアリル化がシアリダーゼ処理による、〔1〕に記載の方法。

〔3〕 前記脱フコシル化が過ヨウ素酸酸化による、〔1〕又は〔2〕に記載の方法。

〔4〕 前記レクチンがヒドロチャワンタケレクチン（AAL）である、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の方法。

〔5〕 さらに、以下の工程を含む、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法。

前記検体中のAGPを定量する工程、及び

前記フコシル糖鎖の量を前記AGP量で規格化する工程。

〔6〕 検体中のヒト α_1 -酸性糖タンパク質（AGP）におけるフコシル糖鎖の量を測定するためのキットであって、下記の要素を含むキット：

（A）脱シアリル化用試薬、

（B）抗AGP抗体が固定されたEIA用基材、および

（C）EIA用基材に固定化された抗AGP抗体を脱フコシル化するための試薬。

〔7〕 さらに、（D）標識レクチンを含む、〔6〕に記載のキット。

〔8〕 前記レクチンがヒドロチャワンタケレクチン（AAL）である、〔7〕に記載のキット。

〔9〕 標識レクチンがビオチン標識レクチンである、〔7〕又は〔8〕に記載のキット。

〔10〕 さらに、（E）アビジン標識酵素を含む、〔9〕に記載のキット。

〔11〕 さらに、

（F）検体中のAGPを定量するための、抗AGP抗体が固定されたサンドイッチELISA用基材、及び

（G）酵素標識抗AGP抗体を含む溶液

を含む、〔6〕～〔10〕のいずれかに記載のキット。

〔12〕 前記脱シアリル化用試薬がシアリダーゼを含む、〔6〕～〔11〕のいずれかに記載のキット。

〔13〕 前記脱フコシル化試薬が過ヨウ素酸ナトリウムを含む、〔6〕～〔12〕のいずれかに記載のキット。

〔14〕 がんの診断用である、〔6〕～〔13〕のいずれかに記載のキット。

〔15〕 がん治療の予後診断用である、〔6〕～〔14〕のいずれかに記載のキット。

〔16〕 がん治療ががんに対する手術、化学療法、免疫療法、抗体療法及び放射線療法から選択される、〔15〕に記載のキット。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、従来法に比べて、簡便かつ迅速に、より正確に、AGPにおけるフコシル糖鎖の量を測定する方法およびキットの提供が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図 1】本発明の一実施態様における、血清検体の脱シアリル化による A G P 量測定への影響を示す図である。横軸は従来の AGP の測定値で、縦軸は同一検体を脱シアリル化して測定した A G P (AS-AGP) の濃度を示す。

【図 2】本発明の一実施態様における、脱フコシル化による抗 A G P 抗体の抗原結合能への影響を示す図である。基材に固定したそれぞれの抗体について、一定量の A G P 抗原に対する結合能を比較したものであり、a は、抗 A G P 抗体を脱フコシル化しなかった場合を示し、b は、抗 A G P 抗体を脱フコシル化した場合を示す。

【図 3】本発明の一実施態様における、脱フコシル化による抗 A G P 抗体に対するヒドロキサンタケレクチン (A A L) の結合への影響を示す図である。基材に固定したそれぞれの抗体について、a は、抗 A G P 抗体を脱フコシル化しなかった場合を示し、b は、抗 A G P 抗体を脱フコシル化した場合を示す。

【図 4】本発明の一実施態様における、脱フコシル化後の還元処理による抗 A G P 抗体の抗原結合能への影響を示す図である。基材に固定した抗 A G P 抗体について、一定量の A G P 抗原を加え、ヒドロキサンタケレクチン (A A L) でフコシル基を測定した場合であって、a は、抗 A G P 抗体を脱フコシル化せず、かつ還元処理もしなかった場合を示し、b は、抗 A G P 抗体を脱フコシル化したが還元処理をしなかった場合を示し、c は抗 A G P 抗体を脱フコシル化した後に還元処理をした場合を示す。

【図 5】本発明の一実施態様における、フコシル糖鎖を有する A G P の濃度を測定するのに際して用いた検量線を示す図であって、高フコシル化されている A G P を含む血清から非特許文献 3 に記載の方法で精製し脱シアリル化した A G P を用いた場合のものである。

【図 6】本発明の一実施態様における、化学療法を施行したがん患者の予後と血清 AGP のフコシル糖鎖量の推移を示す図である。この内、A、B、C では 3 種類、D では 2 種類のレジメンによる化学療法を施行した。A は食道がん (ステージ I)、B は大腸がん (ステージ IV) 症例で予後不良を示し、C は胃がん (ステージ II)、D は大腸がん (ステージ II) 症例で、予後良好を示す。

【図 7】本発明の一実施態様における、抗 P D - 1 抗体を投与された肺がん患者における、投与前と 3 回目投与前 (1 ヶ月目) における血清中のフコシル化 A G P 量について、画像診断による腫瘍の変化別に示した図である。A、B はいずれも腫瘍の大きさの和が (20 % 以上) 増大 (PD, progressive disease)、C は腫瘍の大きさの和が (30 % 以上) 減少 (PR, partial response) した場合である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明は、検体中のヒト α_1 - 酸性糖タンパク質 (A G P) におけるフコシル糖鎖の量を測定する方法およびキットを含む。

尚、本明細書において、ヒト α_1 - 酸性糖タンパク質を「A G P」と記載することがある。また、ヒドロキサンタケレクチンを「A A L」と記載することがある。

【0012】

[検体中の A G P を脱シアリル化する工程]

本発明の一実施態様に係る測定方法は、検体中の A G P を脱シアリル化する工程を含む。

検体中の A G P の糖鎖が高シアリル化されたままであると、後工程における E I A 法における抗 AGP 抗体による AGP の捕捉及びレクチンによるフコシル基の検出が阻害されてしまう。

【0013】

(検体)

検体の由来動物は、ヒトやラットなどのほ乳動物が好ましく、ヒトがより好ましい。検体としては、ヒト由来の体液が好ましく、例えば、血液、リンパ液、髄液、尿などが挙げられる。採取や保存は常法に従うことができる。また、血液の場合、血漿、血清が好ましく、その調製や保存は常法に従うことができる。

【0014】

(脱シアリル化)

脱シアリル化は、A G P糖鎖の非還元末端のシアル酸結合である $\alpha 2,3$ 及び $\alpha 2,6$ のシアル酸残基を遊離できるものであれば特に制限されない。脱シアリル化酵素を用いて行われることが好ましく、例えば、シアリダーゼ（別名：ノイラミニダーゼ）が挙げられる。

シアリダーゼとしては、A G P糖鎖で非還元末端に存在する $\alpha 2,3$ 及び $\alpha 2,6$ のシアリル基に対して特異性を持つエキソ型であれば特に限定されない。また、種々の生物由来のシアリダーゼを使用することもできる。シアリダーゼは1種単独で用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよいが、両シアリル結合を効率よく加水分解するアルスロバクター・ウレアファシエンス (*Arthrobacter ureafaciens*) 由来のシアリダーゼを用いることが好ましい。

10

【0015】

シアリダーゼによる脱シアリル化処理におけるシアリダーゼの使用量は、糖鎖の非還元末端からシアル酸残基を十分に遊離できれば特に制限されないが、A G P $1 \mu\text{g}$ あたり、好ましくは0.005 mU以上、より好ましくは0.01 mU以上、さらに好ましくは0.02 mU以上である。一方、好ましくは2 mU以下、より好ましくは1.5 mU以下、さらに好ましくは1 mU以下である。

尚、基質としてシアリルラクトースを使用し、pH 5.0、37℃において1分間に1 μmol のシアル酸を分解するのに要する酵素量を1 U（ユニット）とする。

【0016】

また、シアリダーゼによる脱シアリル化の処理時間は、糖鎖の非還元末端からシアル酸残基を十分に遊離できれば特に制限されないが、好ましくは20分以上、より好ましくは30分以上、さらに好ましくは1時間以上である。一方、好ましくは16時間以下、より好ましくは12時間以下、さらに好ましくは6時間以下である。

20

【0017】

また、シアリダーゼによる脱シアリル化における処理温度は、糖鎖の非還元末端からシアル酸残基を十分に遊離できれば特に制限されないが、好ましくは室温（例えば、25℃）以上、より好ましくは30℃以上、さらに好ましくは35℃以上である。一方、上限はシアリダーゼが活性を保つ温度であって、好ましくは40℃以下、より好ましくは38℃以下である。

【0018】

また、シアリダーゼによる脱シアリル化における緩衝液としては、生化学的手法を用いる場合の一般的な緩衝液を用いることができる。例えば、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）等が挙げられる。緩衝液の濃度も、生化学的手法を用いる場合の一般的な濃度を用いることができる。

30

【0019】

緩衝液のpHは、脱シアリル化が進行すれば特に制限されないが、好ましくは6.0以上、より好ましくは6.5以上、さらに好ましくは6.8以上である。一方、好ましくは8.0以下、より好ましくは7.5以下、さらに好ましくは7.2以下である。

【0020】

シアリダーゼによる脱シアリル化後にはシアリダーゼを失活させることが好ましい。失活は常法に従うことができる。例えば、血清10 μl 当たり90 μl のPBSで希釈された状態で、90℃で5分間の処理をすること等が挙げられる。

40

【0021】

[EIA法によりフコシル糖鎖の量を測定する工程]

本発明に係る測定方法は、上記検体中のA G Pを脱シアリル化する工程の後、基材に固定され、糖鎖が脱フコシル化された抗A G P抗体と、前記脱シアリル化されたA G Pのフコシル基を認識するレクチンとを用いて、酵素免疫測定法（EIA法）によりフコシル糖鎖の量を測定する工程を含む。

【0022】

50

本工程において、該 E I A 法に用いる、基材に固定された抗 A G P 抗体は、その糖鎖が脱フコシル化されたものである。

【0023】

抗 A G P 抗体 (F c 領域) の糖鎖がフコシル化されたままであると、E I A を行った際に、前記脱シアリル化された A G P のフコシル基を認識するレクチンが、該 A G P のフコシル基のみならず、基材に固定された抗 A G P 抗体のフコシル基にまで結合してしまい、該 A G P 糖鎖のフコシル基の量を正確に測定することができない。

【0024】

該基材としては、例えば、プレートに設けられたウェルや、ビーズなどが挙げられる。

E I A に用いる、基材に固定され、糖鎖が脱フコシル化された抗 A G P 抗体は、脱フコシル化前の抗 A G P 抗体を基材に固定した後に該基材上で脱フコシル化したものであってもよいし、基材に固定する段階で予め糖鎖が脱フコシル化されているものであってもよい。脱フコシル化前の抗 A G P 抗体でも、予め糖鎖が脱フコシル化された抗 A G P 抗体でも、基材に固定する方法は、従来の E I A 法で用いられる方法を用いることができる。

【0025】

(脱フコシル化)

E I A に用いる基材に固定された脱フコシル化前の抗 A G P 抗体に対して脱フコシル化を行う場合、その方法は特に制限されないが、脱フコシル化用溶液を用いた処理によることが好ましく、例えば、過ヨウ素酸ナトリウム溶液を用いた過ヨウ素酸酸化が挙げられる。

【0026】

過ヨウ素酸を用いる場合のその濃度は、脱フコシル化が十分になされれば特に制限されないが、好ましくは 5 m M 以上、より好ましくは 7 m M 以上、さらに好ましくは 8 m M 以上である。一方、好ましくは 2 0 m M 以下、より好ましくは 1 5 m M 以下、さらに好ましくは 1 2 m M 以下である。

【0027】

また、過ヨウ素酸を用いる脱フコシル化の処理時間は、脱フコシル化が十分になされれば特に制限されないが、好ましくは 2 0 分以上、より好ましくは 3 0 分以上、さらに好ましくは 5 0 分以上である。一方、好ましくは 1 6 時間以下、より好ましくは 1 2 時間以下、さらに好ましくは 6 時間以下である。

【0028】

また、過ヨウ素酸を用いる脱フコシル化における処理温度は、脱フコシル化が十分になされれば特に制限されないが、好ましくは 1 5 ℃ 以上、より好ましくは 2 0 ℃ 以上、さらに好ましくは 2 5 ℃ 以上である。一方、好ましくは 4 0 ℃ 以下、より好ましくは 3 5 ℃ 以下、さらに好ましくは 3 0 ℃ 以下である。

【0029】

また、過ヨウ素酸を用いる場合の緩衝液としては、生化学的手法を用いる場合の一般的な緩衝液を用いることができる。例えば、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、トリス緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 等が挙げられる。また、該緩衝液は、適宜、ウシ血清アルブミン (B S A) や、T w e e n - 2 0 や T w e e n - 8 0 などの界面活性剤を含んでいてもよい。緩衝液および界面活性剤の濃度としては、生化学的手法を用いる場合の一般的な濃度を用いることができる。

【0030】

緩衝液の p H は、脱フコシル化が進行すれば特に制限されないが、好ましくは 6 . 0 以上、より好ましくは 6 . 5 以上、さらに好ましくは 6 . 8 以上である。一方、好ましくは 8 . 0 以下、より好ましくは 7 . 5 以下、さらに好ましくは 7 . 2 以下である。

【0031】

過ヨウ素酸を用いる脱フコシル化は遮光下で行われることが好ましい。

また、過ヨウ素酸を用いる脱フコシル化の後には、基材を緩衝液で洗浄し、1 % B S A 含有 P B S で室温 2 時間乃至は 4 ℃ 一晚保温し、洗浄液 (例えば、0.05 % Tween 20 含有 P B S) で洗浄して

10

20

30

40

50

から E I A を行うなど、従来の E I A に用いる基材の調製と同様の調製をすることができる。

【0032】

また、一般に、過ヨウ素酸を用いる脱フコシル化の後に還元処理をすることで抗体の活性を保護することがあるが、本発明に係る測定方法では、該還元処理をしてもしなくても、A G P におけるフコシル糖鎖の定量結果に有意差がないことから、脱フコシル化後に還元処理工程を含まないことが好ましい。

【0033】

(脱シアリル化された A G P のフコシル基を認識するレクチン)

該レクチンは、AGP糖鎖に存在するFuc α 1,3GlcNAc糖鎖に結合するものであればよく、好ましくはヒイロチャワンタケレクチン(A A L)である。これらは、天然のものでもよく人工的に作製されたものでもよい。また、天然のA A Lと相同性の高い組換えタンパク質でもよく、相同性が高いとは、例えば、80%以上の相同性であることを指す。該A A Lは、従来のE I A法に用いられる標識や修飾がなされていてもよい。

【0034】

(検出)

脱シアリル化されたA G Pのフコシル基を認識するレクチンが該フコシル基を認識してA G Pに結合したことを検出する方法としては、従来のE I Aを用いることができる。レクチン自体を標識して使用してもよいし、あるいは、例えば、レクチンを予めビオチン標識しておいて、A G Pのフコシル基と該ビオチン標識レクチンとを結合させた後、アビジン標識した酵素を結合させ、該酵素の反応による発色または発光を用いて検出してもよい。

【0035】

上記酵素としては、いずれの場合も、従来のE I A法に用いられる一般的な酵素を用いることができる。例えば、ホースラデッシュ・ペルオキシダーゼ(H R P)やアルカリ・フォスファターゼ(A L P)などが挙げられる。

【0036】

基質としては、使用する酵素に対応するものであればよく、例えば、H R Pの基質であれば3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(T M B)や2, 2'-アジノビス[3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸]-ジアンモニウム塩(A B T S)、o-フェニレンジアミン二塩酸塩(O P D)などが挙げられる。A L Pの基質であれば、パラニトロフェニルリン酸(P N P P)などが挙げられる。

【0037】

(E I A)

本工程におけるE I Aは、従来法と同様に行うことができる。反応温度や反応時間のほか、試薬の種類や試薬の濃度、蛍光や発色の検出方法等のいずれも常法に従うことができる。

一例として、脱シアリル化されたA G Pのフコシル基を認識して結合するレクチンをビオチン標識A A Lとし、アビジン標識酵素H R Pを加えて基質T M Bに対する発色によりその結合を検出する場合を記載する。

【0038】

まず、前述したように、過ヨウ素酸酸化で脱フコシル化された抗A G P抗体が固定されたE I A用基材を準備する。基材への非特異的吸着を防ぐために、常法で用いられるブロッキング用緩衝液、例えば3%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBSによってブロッキングを行ってもよい。

次に、脱シアリル化されたA G Pを含む試料を用いて、基材に固定され、脱フコシル化された抗A G P抗体と、該脱シアリル化されたA G Pとを結合させた後、結合しなかった成分を洗浄液(例えば、0.05%Tween20を含むPBS)で洗浄して除去する。

次に、ビオチン標識A A Lを用いて、該抗A G P抗体に結合した脱シアリル化A G Pにおけるフコシル糖鎖と、該ビオチン標識A A Lとを結合させ、結合しなかったビオチン標

10

20

30

40

50

識 A A L を洗浄液による洗浄で除去する。

次に、アビジン標識酵素 H R P を用いて、該ビオチン標識 A A L とアビジン標識酵素 H R P とを結合させ、結合しなかったアビジン標識酵素 H R P を洗浄液による洗浄で除去する。

次に、該酵素 H R P の基質 T M B を加え、従来の抗体 - レクチン E I A 法と同様にして発色を検出する。

本発明に係る測定方法では、さらに、前記発色量からフコシル化 A G P の量を換算する工程を含むことが好ましい。

本工程で用いる方法としては、上記 E I A で測定された発色量または発光量から、検量線を用いて検体中のフコシル化 A G P 量を換算する方法が挙げられる。

検量線は、例えば、血清または腹水から非特許文献 3 に記載された方法で得た高フコシル化 A G P に対して脱シアリル化を行い、これに対して同様の E I A 法によって得たフコシル化 A G P 量と発色量または発光量との関係から作成することが好ましい。

【0039】

本発明に係る測定方法は、さらに、前記検体中の A G P を定量する工程、フコシル糖鎖の量を前記 A G P 量で規格化する工程を含むことが好ましい。

【0040】

〔検体中の A G P を定量する工程〕

本発明に係る測定方法は、検体中の A G P を定量する工程を含むことが好ましい。

検体中の A G P を定量する方法は制限されないが、例えば、検体中の A G P を脱シアリル化した後、それを希釈して得た溶液を用いて、基材に固定された抗 A G P 抗体と酵素標識した抗 A G P 抗体とを用いたサンドイッチ E L I S A 法を行い、検量線を用いて酵素反応に基づく発色量または発光量から検体中の A G P の濃度に換算する方法等が挙げられる。

検量線は、例えば、標準試料とする市販の A G P （濃度が既知）に対して脱シアリル化を行い、これを用いて、基材に固定された抗 A G P 抗体と酵素標識した抗 A G P 抗体とを用いたサンドイッチ E L I S A 法を行い、A G P 量（濃度）と発色量または発光量との関係から作成することが好ましい。

【0041】

〔フコシル糖鎖の量を A G P 量で規格化する工程〕

本発明に係る測定方法は、さらに、上記で得られた検体中のフコシル糖鎖の量を、上記「検体中の A G P を定量する工程」で得られた A G P 量で規格化する工程を含むことが好ましい。

従来法では、N 型糖鎖に付加したフコースの分析が CAIE 法や MALDI-TOF-MS により可能であったが、その操作は煩雑であり、結果を迅速に得ることができず、その定量化は困難であるのに対し、本工程により、簡便かつ迅速に、検体中の A G P の単位量あたりのフコシル糖鎖の量を算出することができる。

【0042】

〔A G P におけるフコシル糖鎖の量を測定するためのキット〕

本発明の他の実施態様は、検体中のヒト α_1 - 酸性糖タンパク質（A G P）におけるフコシル糖鎖の量を測定するためのキットであって、下記の要素（A）～（C）、好ましくは（A）～（D）、より好ましくは（A）～（E）を含むキットである。

（A）脱シアリル化用試薬、

（B）抗 A G P 抗体が固定化された E I A 用基材

（C）E I A 用基材に固定化された抗 A G P 抗体を脱フコシル化するための試薬、

（D）ビオチン標識レクチンなどの標識レクチン（例えば、A A L）、及び

（E）アビジン標識酵素（例えば、H R P）。

【0043】

該キットは、さらに、（F）検体中の A G P を定量するための、抗 A G P 抗体が固定化されたサンドイッチ E L I S A 用基材、および（G）酵素（例えば、H R P）標識抗 A G

10

20

30

40

50

P抗体を含む溶液を含むことが好ましい。

また、該キットは、さらに、希釈用緩衝液、ブロッキング用緩衝液を含むことが好ましい。

【0044】

前記(A)、(C)乃至(E)、(G)の好ましい種類や濃度、標識、使用時の条件等としては、前述の本発明に係る測定方法の説明に記載した説明が援用される。また、各溶液については、使用前には適宜濃縮されていてもよく、使用直前に水等で適宜希釈することができる。

また、前記(A)、(C)乃至(E)、(G)のいずれも、複数の溶媒や溶液を含む場合には、それらは混合されて一の容器に収容されていてもよいし、別々の容器に収容されていてもよい。

10

また、前記(B)及び(F)の好ましい態様としては、前述の本発明に係る測定方法の説明に記載した態様が挙げられる。

【0045】

該キットは、がんの診断用であることが好ましく、また、がん治療の予後診断用であることも好ましい。がんとしては、AGPにおけるフコシル糖鎖の量の増減に影響を与えるがんであることが好ましいが、これまでの研究から対象とするがんの臓器特異性は低く、幅広いがん腫へ適用できる。

がん治療としては、手術、化学療法、放射線療法、抗体療法及び免疫療法からなる群から選択される1以上が挙げられる。好ましくは、手術、化学療法、及び放射線療法からなる群から選択される1以上である。免疫療法としては、抗体医薬や分子標的薬を用いた免疫療法が挙げられる。

20

【0046】

また、該キットは、さらに、前述の本発明に係る測定方法を記載した説明書等を含めることもできる。

【実施例】

【0047】

以下に実施例を用いて本発明を説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0048】

30

<実施例1>

[脱シアリル化]

検体であるヒト血清8 μ lに2mUのシアリダーゼを含む92 μ lのPBSを加え、37℃で2時間保温後、90℃で5分間の加熱によりシアリダーゼを失活させ、脱シアリル化サンプルを得た。そして、抗AGP抗体とHRP標識抗AGP抗体を用いた従来のサンドイッチELISA法を用いてAGP濃度を測定した。具体的には、96ウェルプレートのウェルに1ウェル当たり0.2 μ gの抗AGP抗体(DAKO社)を加え固定化後、適宜希釈液(2%BSA及び0.1%Tween20を含むPBS)で希釈したサンプルを加えて室温で2時間保温し、次いでHRP標識AGP抗体を用いた。

ここで、AGP濃度を測定するのに際して検量線を用いた。検量線は、濃度が既知の精製AGP(シグマ-アルドリッチ社)を上記同様にシアリダーゼ処理し、これを標準物質として、上記同様のサンドイッチELISA法を行って作成した。

40

【0049】

(脱シアリル化によるAGP検出への影響)

脱シアリル化によるAGP検出への影響を検討した。具体的には、上記のようにして脱シアリル化処理をしてAGP濃度を測定した場合と、同一血清試料を用いて従来法として脱シアリル化しなかった場合とで比較した。

【0050】

その結果を図1に示す。両測定値には強い相関が認められたが、脱シアリル化処理をした場合の測定値は、従来法による測定値に比べ、全体で2.04 $\pm$ 0.79の高値を示し

50

た。従って、脱シアリル化処理をしない場合の A G P 量測定では本来検出されるべき A G P が十分検出されないことが示された。

【0051】

<実施例 2-1>

〔ウェルへの抗 A G P 抗体の固定〕

96 ウェルプレートのウェルに 1 ウェル当たり 2 μ g の抗 A G P 抗体 (D A K O 社) を加え、37℃で 1 時間保温後または 4℃で一晩放置した。洗浄液でウェルを洗浄後、該ウェルに 3% B S A を含む P B S を加え、室温で 2 時間静置した。

【0052】

〔抗 A G P 抗体の脱フコシル化〕

洗浄液で該ウェルを 3 回洗浄後、10 mM の過ヨウ素酸ナトリウム (N a I O₄) を含む 0.1 M の T - P B S (p H 7.0) を加えて、室温で遮光下、1 時間静置し、抗 A G P 抗体の糖鎖を酸化した (脱フコシル化)。

該ウェルを洗浄液で再び 3 回洗浄し、1% B S A を含む P B S を加え、室温で 2 時間、または 4℃で一晩反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄して、後述する E I A に用いた。

該脱フコシル化により、抗体に一般に存在する、ヒドロキノンタケレクチン (A A L) が結合するフコシル糖鎖 (Fuc α 1,6GlcNAc) は分解される。すなわち、プレートに固定された抗 A G P 抗体の重鎖の F c 部位には、一般に N 型 2 本鎖の糖鎖が 2 本存在するため、それぞれに α 1,6 フコシル基が付加することがあるが、該過ヨウ素酸酸化により該糖鎖は分解される。

【0053】

(脱フコシル化による抗 A G P 抗体の抗原結合能への影響)

過ヨウ素酸酸化による抗 A G P 抗体の脱フコシル化による、抗 A G P 抗体の抗原 (A G P) 結合能への影響を検討した。具体的には、抗 A G P 抗体を過ヨウ素酸酸化したものとしなかったものに対し、精製 A G P (シグマ - アルドリッチ社) の一定量を抗原として、H R P 標識抗 A G P 抗体を用いたサンドイッチ E L I S A により測定した。

その結果を図 2 に示す。a は、無処理抗 A G P 抗体、b は過ヨウ素酸酸化処理した抗 A G P 抗体で一定量の A G P を捕捉した場合であり、両 A G P 量は全く変わらず、過ヨウ素酸酸化処理の抗体活性への影響は認められなかった。

【0054】

<実施例 2-2>

(脱フコシル化による抗 A G P 抗体に対するレクチンの結合への影響)

過ヨウ素酸酸化処理した抗 A G P 抗体に対するレクチンへの結合の有無を検討した。具体的には、過ヨウ素酸酸化処理をした抗 A G P 抗体、又はしなかった抗 A G P 抗体が固定されたプレートを用いて、一定量の A G P を該抗 A G P 抗体に結合させ、これにビオチン標識 A A L を反応させた後、H R P 標識アビジンを加えてその発色量を比較した。

その結果を図 3 に示す。a は抗 A G P 抗体を過ヨウ素酸酸化処理しなかった場合、b は抗 A G P 抗体を過ヨウ素酸酸化処理した場合であり、A A L の結合を比較すると、過ヨウ素酸酸化によって著しい減弱が認められた。フコース結合レクチンである A A L は α 1,6 フコシル基に最も強く親和性を持つが、抗体に存在するフコシル基は α 1,6 フコシル基のみであることから、抗 A G P 抗体のフコシル基 (Fuc α 1,6GlcNAc) の脱フコシル化が示された。

【0055】

<実施例 2-3>

(脱フコシル化後の還元処理の有無による抗 A G P 抗体の抗原結合能への影響)

抗 A G P 抗体の過ヨウ素酸酸化処理後の還元保護化の必要性の有無を検討した。具体的には、(a) 無処理抗 A G P 抗体、(b) 過ヨウ素酸酸化処理抗 A G P 抗体、又は (c) 過ヨウ素酸酸化と還元処理をした抗 A G P 抗体が固定されたプレートを用いて、一定量の脱シアリル化 A G P を捕捉させて、ビオチン標識 A A L を用いた E I A の結果を比較した。還元処理は、0.25 M ジメチルアミンボランおよび 0.5% B S A を含む P B S 溶液

10

20

30

40

50

で室温 90 分処理を行った（対照として b は 0.5% BSA を含む PBS 溶液で室温 90 分処理）。

その結果を図 4 に示す。a、b より、過ヨウ素酸酸化処理をするとビオチン標識 AAL の結合が著しく減弱するものの、b、c より、その後の還元処理による結果の差は殆ど認められなかった。従って、過ヨウ素酸酸化処理抗 AGP 抗体の還元保護は不要とした。

【0056】

<実施例 3>

[EIA]

脱シアリル化したサンプルを、希釈液で $1\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ に調製し、脱フコシル化された抗 AGP 抗体が固定されているウェルに添加して室温で 2 時間反応させた。

反応後、洗浄液で 3 回洗浄し、希釈液で $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製したビオチン標識 AAL を加えて、室温で 1 時間反応させた。

反応後、洗浄液で 3 回洗浄し、希釈液で $100\text{ng}/\text{ml}$ に調整したホースラデッシュ・ペルオキシダーゼ (HRP) で標識したアビジンを加えて、室温で 30 分間反応させた。

反応後、洗浄液で 3 回洗浄し、基質として TMB Blue Substrate Chromogen 液 (DAKO 社) $100\mu\text{l}$ を加えて、室温で 5 分間静置した。

その後、1N の硫酸 $50\mu\text{l}$ を加えて反応を停止し、比色定量（検出波長 450nm ）を行った。

【0057】

ここで、高フコシル化 AGP を含むプール血清から非特許文献 3 に記載の方法で高フコシル化 AGP を精製し、上記シアリダーゼ処理から EIA までの一連の操作を行い、これを標準物質として検量線を作成した。検量線は図 5 の通りである。更に、該検量線から、フコシル化 AGP 量として $100\mu\text{g}/\text{mL} = 100\text{U}$ と定義し、被検体中の $1\mu\text{g}$ の AGP についてのフコシル化 AGP 量を求めた。

【0058】

<実施例 4>

[化学療法施行症例におけるがん患者の予後予測]

術後（術前も含む）抗がん剤の化学療法施行症例における予後と血清のフコシル化 AGP 量の経時的解析を行った。

その結果を図 6 に示す。

A（食道がんステージ I）では、術前に 1st line、術後 2nd 及び 3rd line の化学療法を施行した。術後 99 日目（POD）でがんの転移が認められ、334 日目（POD）にがん死した。血清フコシル化 AGP 量は化学療法 2nd line 以降漸次上昇を続けた。

B（大腸がんステージ IV）では術後 311 日目（POD）に再発を認め、713 日目（POD）にがん死した。再発直後の化学療法開始直後に一旦は低下した血清フコシル化 AGP 量はその後上昇に転じ、いずれも著しい高値を示した。

一方、C（胃がんステージ II）では術後の 1st line、及び再発が認められた術後 370 日目以降の 2nd、3rd line の化学療法施行で奏功が認められたが、血清フコシル化 AGP 量も長期間低値であった。

更に、D（大腸がんステージ II）では長期間の follow-up でがんの再発・転移は認められていない。術後 1st line 及び 2nd line の化学療法が施行されたが、血清フコシル化 AGP 量はいずれも低値を維持した。従って、化学療法施行症例の予後については、予後不良（A、B）と良好（C、D）とで血清中のフコシル化 AGP 量の変動にはっきりとした相違が示され、血清中のフコシル化 AGP 測定の化学療法の効果判定への応用が示唆された。

【0059】

<実施例 5>

[抗 PD-1 抗体投与肺がん患者の予後予測]

免疫チェックポイント阻害剤としての抗 PD-1 抗体の臨床応用が進んでいるが、化学療法同様、免疫療法など、とりわけ膨大な医療費負担に繋がる治療法についてはその効果

10

20

30

40

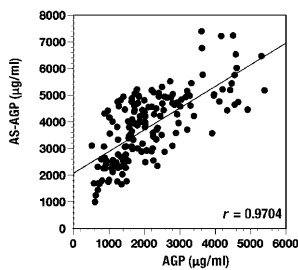
50

判定のためのバイオマーカーの開発が急務とされている。そこで、オブジーボ投与の肺がん患者における血清フコシル化AGP量の変動を調べた。

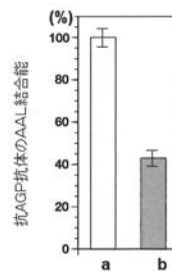
その結果を図7に示す。肺がん患者A～Cに対するオブジーボ投与開始前（図中の「pre.」）と3回目投与直前の投与開始1ヶ月目（図中の「1M」）のそれぞれの血清フコシル化AGP量を測定した。A及びBは1ヶ月目の腫瘍の画像診断からPD (progressive disease)、つまり腫瘍の大きさの和が20%以上増加し、一方、CではPR (partial response)、つまり腫瘍の大きさの和が30%以上減少したことが認められた。それぞれの血清フコシル化AGP量は、A、B共に高値が変わらなかったが、Cでは極めて高い値は投与によって急速に低下した。化学療法同様、免疫療法においても、フコシル化AGP量測定の治療効果判定への有用性が示された。

10

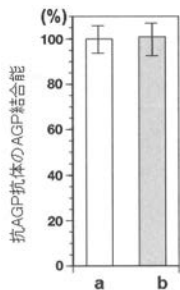
【図1】



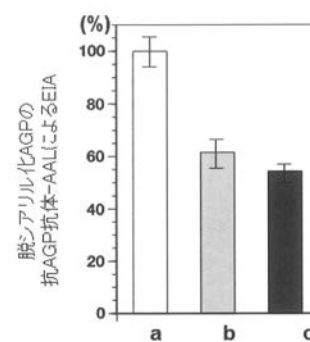
【図3】



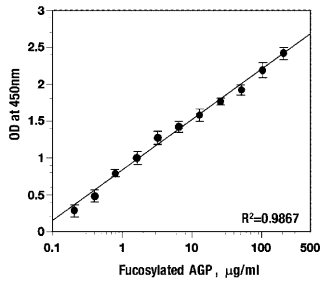
【図2】



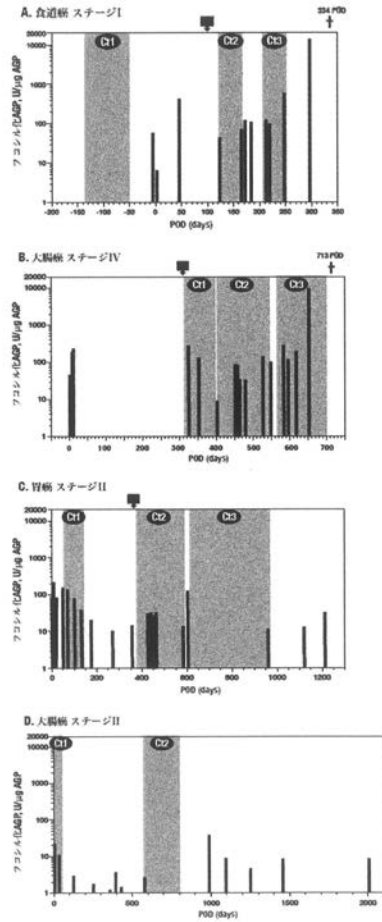
【図4】



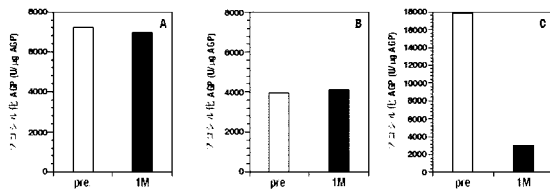
【図 5】



【図 6】



【図 7】



专利名称(译)	测量糖蛋白中岩藻糖糖链量的方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2019011978A	公开(公告)日	2019-01-24
申请号	JP2017127432	申请日	2017-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人群馬大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人群馬大学		
[标]发明人	矢澤伸 浅尾高行		
发明人	矢澤 伸 浅尾 高行		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 C12Q1/34		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/53.S G01N33/53.U G01N33/574 C12Q1/34		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ67 4B063/QQ79 4B063/QR15 4B063/QS33 4B063/QX02		
代理人(译)	川口义行		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种方法和试剂盒，用于简单，快速，准确地测量AGP中岩藻糖糖链的数量，而不是传统方法。 解决方案：这种测量样品中人 α 1-酸性糖蛋白（AGP）中岩藻糖糖链含量的方法包括将样品中的AGP脱唾液酸化，固定在底物上并具有去糖基化糖链的AGP抗体和识别脱唾液酸化AGP的岩藻糖基的凝集素，岩藻糖糖链（EIA法）通过酶免疫测定法（EIA法）测定包括以下步骤：点域1

