

令和元年6月11日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10736

研究課題名（和文）高感度糖鎖解析システムを用いた新たな子宮頸部腺癌診断・治療バイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Development of new diagnostic and therapeutic biomarkers for cervical adenocarcinoma using high sensitivity sugar chain analysis system

研究代表者

戸澤 晃子（Tozawa-Ono, Akiko）

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90569865

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：高感度レクチンマイクロアレイを用いて子宮頸部腺癌を検出できる可能性がある新たなマーカーの候補を同定した。現在は候補レクチンを利用して、検体として頸管粘液、血液、子宮がん検査細胞診の残りの検体などのいずれの検体が検査の検体として適切かを検討している。それに伴いいくつかの検査方法の試案を検討している段階である。具体的な検査方法が確立した段階で特許申請の予定であるため、本報告では具体的な物質名などの公表は控える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸部腺癌は近年増加傾向で若年の罹患数が増加しており社会的に問題となっている。また子宮頸がん検診は早期発見の方法として科学的根拠のある方法であるが、国内外の研究結果から子宮頸部腺癌は子宮頸がん検診（細胞診）での早期発見、罹患率減少効果が乏しいことが知られている。そこで子宮頸部腺癌検出の新たな方法の開発が必要と考えている。本研究では子宮頸部腺癌検出検査法の開発を主に進めているが、この検査方法が実現すると若年女性の子宮頸部腺癌の早期発見が可能になり、妊孕性温存（子宮温存）が可能になる。

研究成果の概要（英文）：We identified novel marker candidates that could potentially detect cervical adenocarcinoma using high sensitivity lectin microarrays. Currently, candidate lectins are being used to determine which specimens, such as cervical mucus, blood, and the remaining specimens of cytology, are suitable as specimens for examination. At the same time, it is in the way of considering some test methods. We will not refer to any specific content in this report, as we will apply for a patent after establishing a specific inspection method.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：子宮頸がん 子宮頸部腺癌 診断キット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、子宮頸癌は世界で新規罹患患者が年間 30 - 50 万人、女性の悪性腫瘍では世界で第 2 位にランクされるほど頻度の高い疾患であり、本邦でも罹患率は年間 1 万人を超え増加傾向にあり、25 - 40 歳での若年発症も増加し問題となっている。更に子宮頸がんの組織別にみると扁平上皮癌と腺癌に大別され、腺癌は扁平上皮癌に比較して検診での細胞診診断が難しいことや扁平上皮癌に比べて放射線治療に抵抗性であることも知られている。これまでは腺癌は全体の 10% 台にとどまっていたが近年増加傾向にあり 20% を超えるようになってきた。

レクチンマイクロアレイは平成 15 - 22 年に独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発 (NEDO) による健康安心プログラム「糖鎖機能活用技術開発」プロジェクトで開発された糖鎖プロファイリング・システムで、世界初の糖鎖解析システムとして、2005 年に Nature Methods に発表された (A. Kuno et al. 2005)。この技術の構成要素であるレクチンマイクロアレイ (LecChip® Ver.1.0) には、天然型レクチン 45 種類が搭載されており、微弱な糖鎖とレクチンの相互作用も逃さず捉えることの出来るエバネッセント波蛍光励起プロファイラー (GlycoStation® Reader 1200) と組み合わせられることで、世界で最も高感度でハイスループットな糖鎖プロファイリング・システムとなっている (図 1)。さらにレクチンマイクロアレイでは 45 種類の特異性の異なるレクチン (糖鎖結合性タンパク質) を組合せることで、複雑な糖鎖構造であっても、そのバイオロジカルな糖鎖のエピトープ像を検出することができる。質量分析法や HPLC 法とは異なり、糖鎖の微細構造を完全同定することはできないが、その高感度で簡便な操作性により、微量サンプルでハイスループットな糖鎖のプロファイリング解析が可能である。本技術の特徴は数十 ng 程度の糖タンパク質を生体成分から簡易精製し、比較解析できることにある。既存技術である質量分析や液体クロマトグラフィーを用いての比較糖鎖解析の場合、少なくとも 10 μ g の精製糖タンパク質が必要であるが、本システムが開発されたことで、血清や組織などに微量にしか存在せず分析が不可能であった糖タンパク質の比較糖鎖解析が初めて可能になった。

肝癌の分野ではこのシステムを活用し、マーカー候補分子である糖タンパク質分子 (1 酸性糖タンパク質 (AGP)) の糖鎖構造変化が、肝線維化の進展をマーカーとなるかどうかを検証した結果、最終的に血清より検出した 2 種のレクチン (AOL, MAL) が慢性肝炎 (F3) と肝硬変 (F4) の鑑別が可能であることが明らかになった (A. Kuno et al. 2011)。また診断が困難な肝内胆管癌の早期診断に WFA が有用であることを示している (A. Matsuda et al. 2013)。

申請者は、この高感度糖鎖解析システムを用いて、世界初の臨床検体を用いた高感度子宮頸部腺癌解析による新規バイオマーカーの探索に着目した。

2. 研究の目的

本研究は、近年増加傾向にある子宮頸部腺癌を対象に高感度糖鎖解析システムであるレクチンマイクロアレイを用いた診断・治療における新規バイオマーカーの探索を目的としている。子宮頸部腺癌のホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin fixed-paraffin embedded: FFPE) 組織のレクチン解析によって 診断が困難な子宮頸部腺癌の確定診断を可能にするか。進行が早くかつ難治性の子宮頸部腺癌の治療標的となる標的タンパク質の検出は可能か。また、同様の検討が 臨床細胞診、組織診検体、血清において可能かを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

子宮頸部腺癌の FFPE 組織を用いてレクチンマイクロアレイを行う。レーザーマイクロダイセクションにて顕微鏡下に子宮頸部正常円柱上皮、腺癌の病変部分を選択的に採取し、レクチンマイクロアレイ解析によって候補糖レクチンを同定する。候補レクチンで診断バイオマーカーとして有用性を解析する。候補レクチンから糖鎖解析を行い、糖タンパク質を同定する。平成 28 年度は同じ症例での子宮頸部腺癌の FFPE 組織、細胞診検体、頸管粘液、血清での解析結果の相互関係の評価する。

平成 27 年度は、まず発癌リスク因子としての候補レクチン、糖タンパク質の探索を行う。子宮頸部正常円柱上皮、子宮頸部腺癌検体でのレクチンマイクロアレイ解析を行う。

1. レーザーマイクロダイセクション

子宮頸部正常円柱上皮、子宮頸部腺癌の FFPE 組織より病変の直径 1.5mm、10 μ m 厚をレーザーマイクロダイセクションにて病変部を採取する。

2. レクチンマイクロアレイ解析

採取した組織をタンパク溶解液に調整し、子宮頸部正常円柱上皮、子宮頸部腺癌 (各 10 例) でのレクチンマイクロアレイを施行する。

試料の調整

タンパク質溶解液に蛍光標識 (Cy3 Mono-Reactive dye pack: GE Healthcare) をする。室温、暗所で 1 時間反応させ、脱塩カラムにのせ遠心する。脱塩カラムに TBS をアプライし、さらに遠心し、廃液を廃棄する。標識試料の全量をアプライし、TBS 25 μ l を加え遠心する。脱塩カラムを捨て、試料を回収する。(標識試料 1 μ g/45 μ l) レクチンマイクロアレイに反応させたい最も高濃度に合わせて、サンプルを調整する。

レクチンマイクロアレイの反応

96 ディープウェルプレート上で、各標識試料を Probing Solution で反応させる濃度に調製し、

各ウェルに 100 μ L ずつ Probing Solution を加える(アレイ洗浄は計 3 回)。1 種類の試料につき LecChip® 1 枚使用して、ウェルにアプライし、攪拌させながら反応させる。

レクチンマイクロアレイの測定 スキャナーにアレイにセットし、測定する。

3. バリデーション

子宮頸部正常円柱上皮、子宮頸部腺癌(各 10 例)を比較し腺癌に特徴的なレクチン候補から糖タンパク質を解析する。解析はサンドイッチ ELISA、レクチンオーバーレイ抗体アレイ、抗体オーバーレイレクチンアレイを行う予定である。マーカーとして適正かどうかの統計解析を行い、候補糖たんぱく質を選定する。

4. 研究成果

高感度レクチンマイクロアレイを用いて子宮頸部腺癌を検出できる可能性がある新たなマーカーの候補を同定した。現在は候補レクチンを利用して、検体として頸管粘液、血液、子宮がん検査細胞診の残りの検体などのいずれの検体が検査の検体として適切かを検討している。それに伴いいくつかの検査方法の試案を検討している段階である。具体的な検査方法が確立した段階で特許申請の予定であるため、本報告では具体的な物質名などの公表は控える。

5. 主な発表論文等

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 0 件)

なし

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

未

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 梶谷内 晶

ローマ字氏名: TOGAYACHI, AKIRA

所属研究機関名: 国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名: 生命工学領域

職名：主任研究員

研究者番号（8桁）：60392635

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。