

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15501

研究課題名(和文) N型糖鎖を用いた膵臓癌特異的癌腫瘍マーカーの開発

研究課題名(英文) Search of organ specific tumor markers by N-glycan expression in pancreatic cancer

研究代表者

夏越 祥次 (Natsugoe, Shoji)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：70237577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓癌患者を対象とし、血清中の糖鎖の網羅的解析を行い、膵臓癌に特異的な糖鎖マーカーを検索した。健常者群と膵臓癌患者群との間でOPLS法による層別化が有意に可能であった。膵臓癌患者17例と健常者の11例の血漿から、タンパク質と修飾N型糖鎖の質量分析を行った。膵臓癌患者における血清中の糖鎖の網羅的解析を行い、6糖鎖を抽出し、そのうち4糖鎖は再現可能であった。今後これらの糖鎖測定により膵臓癌の早期発見や再発の発見に有用になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the serum N-glycan in 17 pancreatic cancer patients and 11 healthy volunteers. N-glycan expression by using OPLS method was stratified between pancreatic cancer patients and healthy volunteers on the base of glycan expression pattern. We extracted six N-glycan with statistical significance between pancreatic cancer patients and healthy volunteers. According to these six markers, four markers was ascertained by duplication test. These results show that these N-glycan may be a useful markers in early detection of pancreatic cancer and relapse disease.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵臓癌 N型糖鎖 腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

現在、消化器癌において測定されている腫瘍マーカーのほとんどは糖鎖関連分子である。しかし、消化器の臓器特異的な腫瘍マーカーは存在せず、癌の存在以外の要因で上昇することがあり、また進行した悪性腫瘍の動態を把握するために使用されていることが多く、腫瘍マーカーを利用した癌の検出・診断方法として、早期診断に使用できるものは確立されていない。また、単体でのマーカーを測定しても陽性率は低いが、複数のマーカーで測定を行う方が、その確診率は高くなることは多くの報告されているものの、どの組み合わせがよいかについてのコンセンサスは、まだ得られていない。

そこで、各臓器の癌に特異的なマーカーを検出するためにN結合型糖鎖に着目し検討を進めてきた(特許出願番号 2010-82438 号)。この方法が確立できれば、早期に、簡便に、各臓器の消化器癌を判定しうる方法を提供することが可能になる。すでに食道癌患者 71 例の採血から得られた血漿から、N-グリコシダーゼF及びトリプシンにより処理し、タンパク質と修飾N型糖鎖を遊離、ヒドラジド基を有するビーズで遊離N型糖鎖を標識した後に精製分離、MALDI-TOF MS による質量分析を行った。得られたデータを多変量解析し、癌患者と健常者との2群間で解析し、有意に存在量が変化しているN型糖鎖を同定することが可能であった。本研究では難治性癌である膵臓癌の対する特有な腫瘍マーカーの開発をめざすものである。

研究代表者らはこれまでに消化器癌のリンパ節微小転移の臨床的意義について検討してきた。(Cancer 83:858,1998, Oncology 58:38,2000; Ann Surg Oncol. 8:158,2001; Surgery;131:630,2002, Am Surg 69:573,2003, Br J Surg 90:563,2003, World J Surg 27:455,2003)。胃癌、食道癌、膵臓癌で術中血中遊離癌細胞が高頻度に存在し、再発と密接な関係があることを報告してきた(Am J Surg 177:475, 1999. Ann Surg 233:189, 2001. Ann Surg Oncol 9:364, 2002. Surgery 133:162, 2003. Clin Cancer Res 10:3807, 2004 など)。また外来 follow-up 中に血中に遊離癌細胞が出現する症例は予後が不良であることを見出し報告した(Clin Cancer Res 12:5972, 2006)。また最近、CellSearch system を用いた血中遊離癌細胞の臨床的意義に関して、胃癌で検討した結果、遊離癌細胞の存在は再発と強く関連しており、唯一の予後因子であることを報告した(Cancer, Aug 20, 2013) これらは有用なマーカーであるが、腫瘍上皮を認識しており、各臓器の癌に特有ではない。したがって今後は臓器特有な腫瘍マーカーの開発が急務と考え、血液サンプルに含まれる糖タンパク質の

糖鎖との関連の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、「糖鎖はがん化に伴い糖鎖構造が変化し、血漿中の糖鎖を腫瘍マーカーとして臨床応用できる」という知見から、「血漿中の臓器特異度が高い糖鎖マーカーの測定により、早期癌の発見、転移、再発の早期予測が可能となる」という仮説をたて、これまでの研究代表者らの実績と手技を応用して、高い精度で本仮説を検証するものである。特に本研究では「N結合型糖鎖を利用した消化器癌の新規腫瘍マーカーの開発」を中心に臨床応用可能にすることを目的とする。これまでに食道癌で検討を進めてきたが、さらに胃癌、膵臓癌に拡大応用していく。臓器特異度が高い糖鎖マーカーが明らかとなれば、癌の早期発見および早期の転移・再発の発見に結びつくことが期待できる。

3. 研究の方法

研究代表者らはヒドラジド基(NHNH₂)高密度含有ポリマー微粒子である BlotGlyco を用いて、糖鎖を効率よく捕捉回収する方法を行っている(特願 2010-82438 号)(図 1)

◇BlotGlycoによる糖鎖精製スキーム

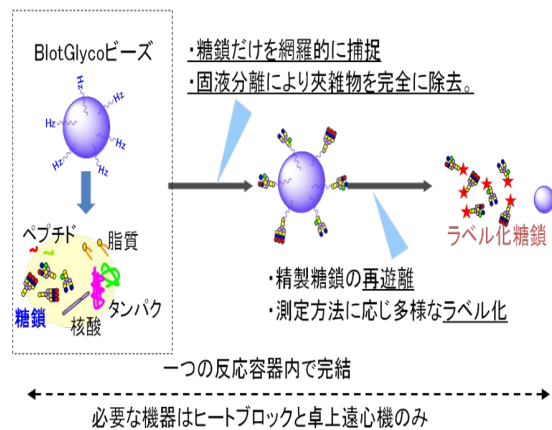


図 1

本研究方法は BlotGlyco を用いた新しい概念に基づく N 型糖鎖の同定方法である。

この手法はわずか 5 時間で結果を得ることができ、操作は平易であり正確な精製と多検体を並列に処理できる利点がある。

消化器癌の早期発見、転移、再発の早期発見を可能とする糖鎖を発見するために、以下の調査研究を行う。

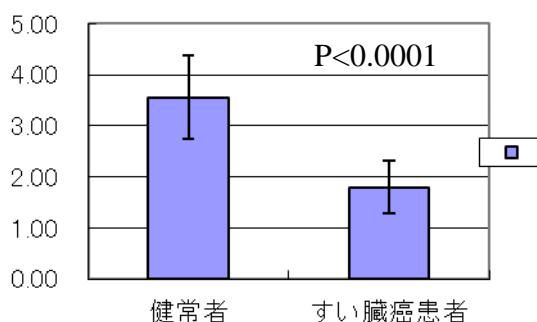
1) 治療前消化器癌患者と健常者との間で糖鎖発現の検討：鹿児島大学病院消化器センター消化器外科において、治療前の膵臓癌で、画像検査により臨床病理学的因子の検索のなされた症例を対象とした。対象症例は膵臓

が癌 100 例，バランティア健常者 100 例とした。

2) 治療前の糖鎖パターンを解析した膵臓癌症例を対象とし，治療前に得られた糖鎖発現パターンと治療経過中での糖鎖パターンと治療経過中の糖鎖発現パターンを解析する。経過観察の中で治療効果別に，また再発症例についても糖鎖パターンを比較検討した。特に，根治切除を施行例については，治療前と糖鎖発現パターンについて比較検討した。また，画像検査により，再発を認める症例については，画像所見より以前に糖鎖に変化が認められなかったかどうかについて検索し，より早期に再発診断可能となる糖鎖の検索を行った。

4. 研究成果

今回，膵臓癌患者を対象とし，血清中の糖鎖の網羅的解析を行い，膵臓癌に特異的な糖鎖マーカーを検索した。得られた糖鎖発現プロファイル解析で，診断の可能性を検討した。同意の得られた膵臓癌患者 17 例と健常者の 11 例の血漿から，タンパク質と修飾 N 型糖鎖を遊離，ヒドラジド基を有するビーズで遊離 N 型糖鎖を標識した後に精製分離，質量分析を行った。糖鎖を調整して MALDI-TOF から多変量解析という方法は定量性に乏しいと考えられたため，定量性のある LC-MS で再測定を実施した。得られたデータを SIMCA-P+ を使用し多変量解析した。網羅的解析を実施し，802 個のイオン中 9 個のイオンが糖鎖マーカー候補として挙がった。得られた糖鎖の発現パターンをもとに，健常者群と膵臓癌患者群との間で OPLS 法による層別化が有意に可能であった。また，健常者群と膵臓癌患者群間で，両者の層別化が可能な発現糖鎖が 9 つ抽出可能であっ



Labeled glycan m/z	Free glycan M.W.	Candidate N-glycan composition	of
2521.98	2092.77	(Hex)2 (HexNAc)2 (Deoxyhexose)1 (NeuAc)1 (Man)3(GlcNAc)2	+

た。以前に検討した 6 個の候補糖鎖のうち，今回の LC-MS で再測定解析では 5 個は有意差が認められ，再現性が確認された。膵臓癌患者における血清中の糖鎖の網羅的解析を行い，6 糖鎖を抽出し，そのうち 4 糖鎖は再現可能であった。

今後これらの糖鎖測定により膵臓癌の早期発見や再発の発見に有用になることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

① Kurahara H, Maemura K, Mataki Y, Sakoda M, Iino S, Hiwatashi K, Kawasaki Y, Arigami T, Ishigami S, Kijima Y, Shinchi H, Takao S, Natsugoe S. Prognostication by inflammation-based score in patients with locally advanced pancreatic cancer treated with chemoradiotherapy. *Pancreatology*. 2015 Nov-Dec;15(6):688-93. (査読あり)

Maemura K¹, Shinchi H, Mataki Y, Kurahara H, Iino S, Sakoda M, Ueno S, Takao S, Natsugoe S. Assessment of percutaneous laparoscopic ultrasonography-guided core needle biopsy for the advanced diagnosis of unresectable pancreatic cancer. *JOP*. 2015 Jan 31;16(1):45-9. (査読あり)

Maemura K, Mataki Y, Kurahara H, Shinchi H, Natsugoe S. Radiotherapy for metastatic lesion of pancreatic cancer. *Nihon Rinsho*. 2015 Mar;73 Suppl 3:163-7 (査読あり)

[学会発表](計 3 件)

① 蔵原弘、局所進行膵癌に対する化学放射線療法の効果予測因子、第 70 回日本消化器外科学会、2015 年 7 月 16 日、アクトシティ浜松 (静岡県浜松市)

蔵原弘、切除不能局所進行膵癌に対する化学放射線療法、第 46 回日本膵臓学会、2015 年 6 月 19 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋)

蔵原弘、切除症例からみた膵癌に対する術前化学放射線療法および術前化学療法、第 115 回日本外科学会、2015 年 4 月 17 日、名

古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 1 件）

名称：N 型結合型糖鎖を利用した消化器癌の
検査方法
発明者：鹿児島大学 住友ベークライト
権利者：同上
種類：特許
番号：US 8,932,866,B2
取得年月日：2016 年 10 月 13 日
国内外の別：国外

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

夏越 祥次 (Natsugoe Shoji)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号：70237577

(2) 研究分担者

又木 雄弘 (Mataki Yuko)
鹿児島大学・附属病院・特任講師
研究者番号：10444902

前村 公成 (Maemura Kousei)
鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授
研究者番号：30398292

橋口 照人 (Hashiguti Teruto)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号：70250917

上之園 芳一 (Uenosono Yoshikazu)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教
授
研究者番号：60398279

内門 泰斗 (Uchikado Yasuto)
鹿児島大学・附属病院・特例准教
授
研究者番号：30464465

蔵原 弘 (Kurahara Hiroshi)
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教
研究者番号：70464469