

平成30年6月17日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15602

研究課題名(和文) 婦人科癌の血清診断法の開発研究

研究課題名(英文) Research and development of serological diagnosis of gynecological cancer.

研究代表者

杉原 一廣 (Sugihara, Kazuhiro)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00265878

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)：婦人科領域の悪性腫瘍に特異的に発現する分子をスクリーニングした。候補となる分子に関して、様々な条件を設定して「診断薬・診断法」として、臨床応用の可能性を念頭に精査を継続的に実施し、平成29年度、婦人科癌(卵巣癌)に特異的に発現する分子を同定することができた。同定した分子は、婦人科領域の癌：卵巣癌の様々な組織で発現していることを確認できた。最終年度では、倫理委員会の承認を得て、ヒトの血清で癌のバイオマーカーとなり得るか、検証中である。

研究成果の概要(英文)：The molecule which specifically expressed for malignant tumors of the field of gynecology and obstetrics was screened. We carried out close inspection in mind in possibilities of the clinical application continuously. In 2018, we identified the molecule which specifically expressed for gynecologic cancer. The molecule expressed with various tissues of ovarian cancer. After the approval of the Ethical Review Board, we are investigating whether it can be the biomarker.

研究分野：産婦人科学

キーワード：バイオマーカー

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

上皮細胞の表面は、一般に糖衣（グライコカリックス）と呼ばれる多量の糖蛋白質、糖脂質、ムコ多糖などに覆われている。上皮細胞が癌化すると、これらの糖鎖は量的・質的な変化を起こす。そこで、細胞表面の糖鎖構造の変化を正確に検出すれば、癌の診断に繋がると考えられてきた。一方、糖鎖に着目すると、糖蛋白質・プロテオグリカンや糖脂質などの複合糖質は、生命現象において、きわめて重要な役割を担っているにも関わらず糖鎖研究は、ゲノミクスやプロテオミクスからのアプローチに比べて大きく立ち遅れている。その理由は第一に、糖鎖修飾は、遺伝子による直接制御を受けない「翻訳後修飾」であるため、PCR法によりそれ自体を増幅したり、そのもののリコンビナントを作成したりすることが出来ない点が決定的である。さらに、体組織は、核酸、タンパク質や多糖類に代表される高分子から、脂質や多様な代謝中間体などの低分子までの様々な化合物が存在する系であり、複合糖質の糖鎖はその中の蛋白質や脂質に結合した状態で存在している。そのため、この多種多様な混じり物が含まれる混合物の中から糖鎖のみを抽出し解析を行うためには、多段階の精製が必要となる。場合によっては、精製法の最適化が必要とされる上、わずかしか存在しないものや安定性を欠くものは、この精製を繰り返す過程で取りこぼしてしまう可能性も高い。よって、糖鎖構造を網羅的に解析可能なグライコミクスを臨床に応用した場合、健常人と比較して癌患者さんの血清に含まれる糖鎖の量的な変化をとらえることは可能であるが、「コストが高い」、「サンプルの精製が容易でない」ため、簡便な診断法としての普及は極めて困難である。そこで、以前より、患者さんの血清中に存在する癌関連の糖鎖抗原を認識する腫瘍マーカーとしてモノクロナール抗体が使われている。上皮細胞のグライコカリックスを形成する糖蛋白質の一部は血中に移行する。血中には蛋白分解酵素が存在するが、グリコシル化された糖蛋白質は容易に分解されず、安定な状態で血液循環中に存在する。よって、癌を発症した患者さんの血清中には、癌化した細胞由来の糖蛋白質が含まれており、これらの糖蛋白質を癌細胞表面の糖鎖抗原に対するモノクロナール抗体の一部が認識する。しかしながら、本来、“モノクロナール抗体は血清中の糖蛋白質に対して作成されたものではない”ので、癌の血清マーカーとしては最小限の効率しか有していない。癌患者さんの血清をプロテオミクスや質量分析で解析することが可能である。しかしながら、膨大な種類の蛋白質が同定され、血中へ移行してきた癌細胞特有の糖蛋白質を選別することは不可能である。我々は長年、糖鎖に対する研究を進めてきた（*Science*. 295(5552):124-7. 2002, *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(49):19587-92. 2011, *J Biol Chem*.

287(9):6592-6602. 2012.）。また、本研究で使うファージライブラリー・スクリーニング技術を応用して着床機構の研究、新規癌治療薬や子宮内膜症の根治を目指す薬剤を研究・開発を進めている（*Proc Natl Acad Sci USA*. 6:104(10):3799-3804, 2007, 3:106(9):3095-3100, 2009, 108(49):19587-19592. 2011, *Nature communications*. 22;5:4478 2014.）。これらの経験と技術を生かし、診断薬の現状を背景として、研究を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究では、subtractive phage display library screeningにより、血清に移行する婦人科癌特異的な糖蛋白質に結合するペプチドを選択・同定を試みた。我々の研究チームは、子宮内膜症に対する血清診断ができるペプチドを既に同定しており、同様の手技で血清中に移行してきた癌細胞表面特異的な糖蛋白質に結合するペプチドをスクリーニングし、婦人科癌の早期診断や治療効果の指標となり得る感度・特性共に優れた診断法を開発することを目的とした。優れた診断法を開発することにより、血液検査による的確な診断が可能となり、今後、癌患者さんが顕著に増加する事が予想される社会に対する大きな波及効果が期待できる。本研究では、subtractive phage display library screeningやプロテオミクス、最新の分子生物学的手法を駆使して、産婦人科領域の癌患者さんの血清に移行する癌特異的な糖蛋白質を同定し、癌の早期診断や治療効果の指標となり得る診断薬の開発・研究に挑戦した。

### 3. 研究の方法

我々は、斬新な方法である subtractive phage display library screening の手法を用い、腹膜には結合しないが子宮内膜症組織に特異的に結合するペプチドを同定し、子宮内膜症の分子標的治療薬を研究・開発中である（Sugihara K, et al., *Nature communications*. 22;5:4478 2014）。さらに、子宮内膜症の血清マーカーの候補とペプチドの受容体を同定した（福田未発表）。これらの新しい方法論を進展させて婦人科癌の血清マーカーの同定にチャレンジした。

### 4. 研究成果

研究期間中（平成 27 年度～平成 29 年度）、subtractive phage display library screening により、婦人科領域の悪性腫瘍に特異的に発現する分子をスクリーニングした。候補となる分子に関して、様々な条件を設定して「診断薬・診断法」として、臨床応用の可能性を念頭に精査を継続的に実施し、平成 29 年度、婦人科癌（卵巣癌）に特異的に発現する分子を同定することができた。

#### (1)

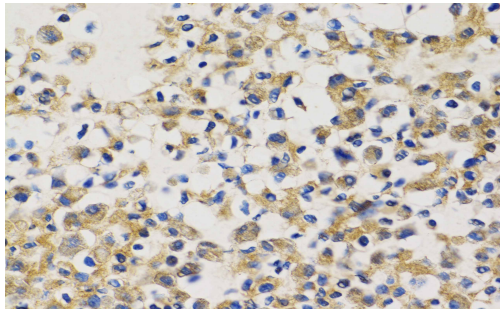
平成 27 年度、平成 28 年度

条件設定を広範囲に変えてスクリーニングを繰り返し挑戦したが、診断薬への応用を見込める分子の同定には至らなかった。

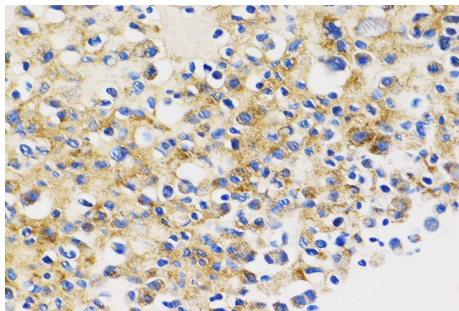
(2) 平成 29 年度

悪性腫瘍特異的に発現する分子を同定することができた。同定した分子に対する複数の抗体を精査して、免疫組織学的解析が可能な抗体を選別した(図1)。選別した抗体を用いて婦人科領域の癌組織(卵巣癌)での発現を確認した(図2)。

図1

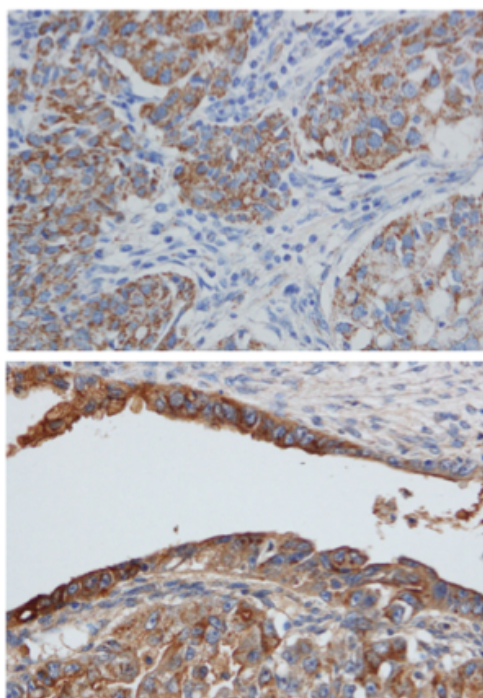


抗体A



抗体B

図2 卵巣癌



さらに、ヒト悪性腫瘍組織アレイを用いた詳細な検討により、様々な組織系の卵巣癌で、発現していることを新たに見いだすことができた(図3)。(特許出願済)

図3 Ovary cancer tissue arrayを用いたヒト卵巣癌組織の免疫組織染色

V20811	Gene	Stage	Sex	V20811	Gene	Stage	Sex
1	Adenocarcinoma	1	b	169	Endometrial adenocarcinoma (Serous)	-	b
2	Adenocarcinoma	1	b	170	Endometrial adenocarcinoma	-	b
3	Adenocarcinoma (serous)	-	b	171	Endometrial adenocarcinoma (serous)	-	b
4	Endometrioid adenocarcinoma	2	b	172	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
5	Endometrioid adenocarcinoma	2	b	173	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
6	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	174	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
7	Endometrioid adenocarcinoma (fibrous tissue and blood vessels)	-	b	175	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
8	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	176	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
9	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	177	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
10	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	178	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
11	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	179	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
12	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	180	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
13	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	181	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
14	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	182	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
15	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	183	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
16	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	184	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
17	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	185	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
18	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	186	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
19	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	187	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
20	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	188	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
21	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	189	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
22	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	190	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
23	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	191	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
24	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	192	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
25	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	193	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
26	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	194	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
27	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	195	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
28	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	196	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
29	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	197	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
30	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	198	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
31	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	199	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
32	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	200	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
33	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	201	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
34	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	202	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
35	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	203	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
36	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	204	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
37	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	205	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
38	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	206	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
39	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	207	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
40	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	208	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
41	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	209	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
42	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	210	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
43	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	211	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
44	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	212	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
45	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	213	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
46	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	214	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
47	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	215	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
48	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	216	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
49	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	217	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
50	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	218	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
51	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	219	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
52	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	220	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
53	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	221	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
54	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	222	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
55	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	223	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
56	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	224	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
57	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	225	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
58	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	226	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
59	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	227	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
60	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	228	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
61	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	229	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
62	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	230	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
63	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	231	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
64	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	232	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
65	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	233	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
66	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	234	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
67	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	235	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
68	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	236	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
69	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	237	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
70	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	238	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
71	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	239	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
72	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	240	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
73	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	241	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
74	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	242	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
75	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	243	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
76	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	244	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
77	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	245	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
78	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	246	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
79	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	247	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
80	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	248	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
81	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	249	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
82	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	250	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
83	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	251	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
84	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	252	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
85	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	253	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
86	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	254	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
87	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	255	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
88	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	256	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
89	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	257	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
90	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	258	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
91	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	259	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
92	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	260	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
93	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	261	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
94	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	262	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
95	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	263	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
96	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	264	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
97	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	265	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
98	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	266	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
99	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	267	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
100	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	268	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
101	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	269	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
102	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	270	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
103	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	271	Endometrioid adenocarcinoma	1	b
104	Endometrioid adenocarcinoma	1	b	272	Endometrioid adenocarcinoma	1	b

(3) 今後の方針

倫理委員会の承認を得て、ヒトの血清で癌のバイオマーカーとなり得るか、様々な条件を設定し検証中である。至適条件を確定して、「診断薬・診断法の実用化」を目指して挑戦を継続する。

5. 主な発表論等

(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) Farhana M, Tamura N, Mukai M, Ikuma K, Koumura Y, Furuta N, Yaguchi C, Uchida T, Suzuki K, Sugihara K, Ioh H, Kanayama N:

Histological characteristics of the myometrium in the postpartum hemorrhage of unknown etiology -A possible involvement of local immunereactions.

*J Reprod Immunol*. 査読あり, 110:74-80. 2015.  
doi: 10.1016/j.jri.2015.04.004. Epub 2015 May 21.

(2) Matsuya M., Sugihara K, Yaguchi C, Ito H, Kitamura H, Kanayama N, Arahori K: Leiomyomatosis peritonealis disseminata with aromatase cytochrome P450 expression in a postmenopausal woman: a case study with literature review. *European journal of gynaecological oncology*. 査読あり, in press.

(3) Yaguchi C, Itoh H, Tsuchiya KJ, Furuta-Isomura N, Horikoshi Y, Matsumoto M, Jeenat FU, Keiko MK, Kohmura-Kobatashi Y, Tamura N, Sugihara K, Kanayama N.: Placental pathology predicts infantile physical development during first 18 months in Japanese population: Hamamatsu birth cohort for mothers and children (HBC Study). *PLoS One*. 査読あり, 2018. 10;13(4): e0194988.  
doi:10.1371/journal.pone.0194988. eCollection 2018.

[学会発表] (計7件)

(1)  
発表者名: 杉原 一廣  
発表課題: ペプチド創薬  
学会名: 第2回中日本産婦人科セミナー (招請講演)  
発表年月日: 2015年7月4日  
発表場所: 富山

(2)  
発表者名: 杉原 一廣  
発表課題: 子宮内膜症に対するペプチド治療薬の探索  
学会名: 第32回日本DDS学会学術集会  
発表年月日: 2016年6月30日~7月1日  
発表場所: 静岡

(3)  
発表者名: 杉原 一廣  
発表課題: ペプチド創薬  
学会名: 藤田保健衛生大学セミナー (招請講演)  
発表年月日: 2016年8月22日  
発表場所: 名古屋

(4)  
発表者名: Shibata T, Sugihara K

発表課題: Pro-apoptotic peptides as potential treatment for endometriosis. 5th Asian Conference on Endometriosis.

学会名: 5th Asian Conference on Endometriosis.

発表年月日: September 22-24, 2016.

発表場所: Osaka, Japan.

(5)  
発表者名: 杉原 一廣  
発表課題: 産婦人科生殖腫瘍分野のトランスレーショナルリサーチ  
学会名: 社会医療法人蘇西厚生会学術講演会 (招請講演)

発表年月日: 2016年10月18日

発表場所: 岐阜

(6)  
発表者名: 杉原 一廣  
発表課題: 腫瘍血管新生、VEGF、ベバシズマブ  
学会名: 第2回婦人科腫瘍勉強会  
発表年月日: 2016年11月30日  
発表場所: 静岡

(7)  
発表者名: Shibata T, Sugihara K  
発表課題: Enhancement of human sperm motility by novel recombinant endo- $\beta$ -galactosidases.  
学会名: The society for reproductive investigation's 64<sup>th</sup> annual scientific meeting (SRI 2017).  
発表年月日: March, 2017.  
発表場所: Orland USA.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

(1)  
名称: 細胞殺傷剤  
発明者: 杉原 一廣、金山 尚裕、小野寺雄一郎、福田 道子、野中 元裕  
権利者: 浜松医科大学、産業技術総合研究所  
種類: 特許  
番号: 特願 2017-161556

(2)  
名称: 細胞殺傷剤  
発明者: 杉原 一廣、金山 尚裕、柴田 俊章、小野寺 雄一郎  
権利者: 浜松医科大学  
種類: 特許

番号： 特願 2018-001063

6. 研究組織

(1)

研究代表者

杉原 一廣 (SUGIHARA, Kazuhiro)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00265878

(2)

研究分担者

村上 浩雄 (MURAKAMI, Hirotake)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10432212

柴田 俊章 (SHIBATA, Toshiaki)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：50529568