

令和元年6月21日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05226

研究課題名(和文)糖鎖バイオマーカーを組み合わせた非侵襲的診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of non-invasive diagnosis methods, using combination of glyco-biomarkers

研究代表者

三善 英知 (MIYOSHI, EIJI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20322183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖は、タンパク質の翻訳後修飾を担う重要な生体分子で様々なライフサイエンスの分野と融合研究が進んでいる。本研究では、私たちがこれまで開発してきた糖鎖バイオマーカーを使って、画像診断との組み合わせで潜在性の慢性膵炎や脂肪肝からNASH(脂肪肝)へと進行するようなハイリスク群をどこまで診断できるか否か検討した。そして、糖鎖バイオマーカー測定系の改良や糖鎖とペプチド(タンパク質)を同時に認識する次世代型糖鎖抗体の開発を行った。さらに、これまでの消化器系疾患だけでなく、糖鎖解析技術を他の領域の研究へと応用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵がんや脂肪肝由来の肝硬変は、診断時に進行していることが多く、治療の選択肢が限られている。本研究では、糖鎖バイオマーカーと画像診断の組み合わせによって、潜在性の慢性膵炎や脂肪肝ハイリスク群を絞り込むことができた。これによって、最大の難治がんである膵がんや近年増加している脂肪肝に対して、先制医療の可能性を示した。

また、糖鎖研究の分野で最大のトピックスの1つと考えられる次世代型糖鎖抗体の作製に成功し、炎症性腸疾患の新しい発症機序解明なども含めて、ライフサイエンス分野全体における大きな学術的貢献をした。最近増加傾向にある前立腺がんの非侵襲的診断法開発の糸口を見出した。

研究成果の概要(英文)：Glycosylation is one of the most important post-translational modification of proteins and fusion research of glycobiology with other life science fields. We have succeeded in the identification of novel glyco-biomarkers and its assay systems. In the present study, we investigated whether or not subclinical chronic pancreatitis and non-alcoholic steatohepatitis can be diagnosed with combination study of image diagnosis and glyco-biomarkers. In addition, we improved our assay systems of glyco-biomarkers and established novel glycan antibodies, which recognize both characteristic oligosaccharide and peptides. Furthermore, we applied our glyco-technology to other research fields such as prostate cancer and bile duct cancer studies.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 脂肪肝 慢性膵炎 膵がん ハプトグロビン フコシル化 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

健康の維持は、高齢化社会を迎える我が国にとって最も重要な課題であり、生活習慣病予防に対する人間ドック、健診システムの貢献は非常に大きい。がんの早期診断や近年のメタボリック症候群に対する取り組みから、より多くの健診データの異常者が拾い上げられるようになった。申請者はこれまで、糖鎖解析技術を駆使して、いくつかの糖鎖バイオマーカーの発見と測定キットの開発を行ってきた。糖鎖は、タンパク質の翻訳後修飾を担う重要な生体分子で様々なライフサイエンスの分野と融合研究が進んでいる。近年の糖鎖微量解析術の進歩によって、新しい腫瘍マーカーの開発が可能となり、国内外で非常に多くの糖鎖バイオマーカーが報告されている。しかし単一の糖鎖バイオマーカーで診断できる疾患は殆どなく、他のバイオマーカーや画像診断との組み合わせ診断が必須である。侵襲的な病理検査なしで治療方針が決定できるケースは極めて稀と言える。また、糖鎖バイオマーカーを測定する技術としては、主としてレクチンを使った方法が主体であり、さらなる糖鎖解析技術の開発や他領域との共同研究が重要と思われる。

2. 研究の目的

私たちがこれまで開発してきた糖鎖バイオマーカーであるフコシル化ハプトグロビンや Mac-2 binding protein (Mac-2bp) を使って、画像診断との組み合わせで潜在性の慢性膵炎や脂肪肝から NASH (脂肪肝) へと進行するようなハイリスク群をどこまで診断できるか否か検討する。そして、糖鎖バイオマーカー測定系の改良や糖鎖とペプチド(タンパク質)を同時に認識する次世代型糖鎖抗体の開発を行う。さらに、これまでの消化器系疾患だけでなく、糖鎖解析技術を他の領域の研究へと応用する。

3. 研究の方法

これまで糖鎖バイオマーカーの測定に使ってきたフコース全般を認識する AAL(*Aleuria aurantia lectin*)に加えて、コアフコースを特異的に認識する PhoSL(*Pholiota squarrosa lectin*)の有用性の検討や、フコシル化ハプトグロビンが異常低値を示す原因についても解析する。健診受診者の中から、どの程度の頻度で NASH 危険群が存在するか、Mac-2bp の値から検討する。また脂肪肝が、どの程度慢性膵炎のリスクをもつのか、健診受診者の腹部超音波検査の結果を経年の見ることによって統計学的に解析し、将来の糖鎖バイオマーカーとの併用でどの程度の潜在性慢性膵炎を拾えることができるか検討する。前立腺がんの PSA の糖鎖異常が、特異性の高いバイオマーカーになりかどうか検討する。

4. 研究成果(主な研究成果に関して、論文業績を中心にまとめる)

独創的なスクリーニング法を使ってフコシル化ハプトグロビンに対する次世代型糖鎖抗体 10-7G mAB の作製に成功し、膵がん/大腸がん患者で 10-7G 値が増加し、特に肝臓への転移した症例で高いことがわかった(論文業績 1 および特許出願 特願 2016-106844; PCT/JP2018/030758)。この論文では、フコシル化ハプトグロビンの産生臓器として、がんの肝転移周囲の肝臓組織であることを特定した。AAL や 10-7G 抗体を使ったフコシル化ハプトグロビンの測定で、膵がん症例でも低値を示す群があり、その原因としてハプトグロビンの表現型が Hpt1-1 であることを見出した(論文業績 3)。Hpt1-1 は日本人の 3-9%存在すると言われ、この結果は膵がんの腫瘍マーカー CA19-9 が Lewis 陰性の人(日本人の約 10%)で測定できない結果に似ている。AAL に変えて PhoSL を使ったフコシル化ハプトグロビンの測定系では、健康人に比較して慢性膵炎/膵がんで上昇していた(論文業績 15)。しかし、従来のハプトグロビンのポリクローナル抗体に代えて、モノクローナル抗体を使用すると膵がん血中フコシル化ハプトグロビンが特異的に上昇していた(論文業績 8)。しかも、尿素を測定系に加えることによって、測定感度が上昇した。

肝生検を施行した 510 症例の非アルコール性脂肪性肝疾患患者の血中 Mac-2bp を測定したら、Mac-2bp は肝臓の線維化と非常に高い相関関係を示した。すでに臨床応用されている肝線維化マーカーである M2BPGi では、早期の線維化症例をひろうことができなかった。また健診受診者 1291 例の脂肪肝患者において、20%程度の人血中 Mac-2bp が肝線維化 F3 相当の値をとることがわかった(論文業績 10)。NASH に関しては、数理的な解析によって肝臓の風船様肝細胞を同定する方法を鈴木貴教授との共同研究によって発明し、特許出願した(PCT/JP2018/030758)。

糖鎖の基礎的研究として、コアフコースという糖鎖が B 型肝炎ウイルスの感染に重要な糖鎖であること(論文業績 21)や、T 細胞の活性化に T 細胞受容体上のコアフコースが重要で炎症性腸疾患の新たな発症機構解明につながることを発見した(論文業績 16)。

海外との共同研究によって、フコシル化フェツイン A が胆管癌の新たなバイオマーカーになること(論文業績 9)、阪大泌尿器科との共同研究によって尿中フコシル化 PSA 低下は PSA ボーダーライン患者における前立腺癌ハイリスク群を判定できる新しいバイオマーカーであることを見出した(論文業績 22 および特許出願 特願 2016-022325)。消化器外科との共同研究によって、膵がん・慢性膵炎の進展に腸球菌の感染が関与することを発見し、その血中での測定系を開発した(論文業績 4; 特許出願 特願 2016-245964)。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 英文原著 26 件、英文総説 3 件、和文総説 14 件(紙面の関係で記載せず))

1. Nonomura Y, Sawamura S, Hanazawa K, Nishikaze T, Sekiya S, Higuchi T, Nin F, Uetsuka S, Inohara H, Okuda S, Miyoshi E, Horii A, Takahashi S, Natsuka S, Hibino H. (2019) Feb 7, Characterization of N-glycans in the epithelial-like tissue of rat cochlea. *Sci Reports*(9) 1, 1551. (査読あり)
2. Nakayama K, Wakamatsu K, Fujii H, Shinzaki S, Takamatsu S, Kitazume S, Kamada Y, Takehara T, Taniguchi N, Miyoshi E. (2019) Core fucose is essential glycosylation for CD14-dependent Toll-like receptor 4 and Toll-like receptor 2 signaling in macrophages. *J Biochem*.165 (3), 227-237. (査読あり)
3. Maekawa T, Fukaya R, Takamatsu S, Itoyama S, Fukuoka T, Yamada M, Hata T, Nagaoka S, Kawamoto K, Eguchi H, Murata K, Kumada T, Ito T, Tanemura M, Fujimoto K, Tomita Y, Tobe T, Kamada Y, Miyoshi E. (2018) Possible involvement of Enterococcus infection in the pathogenesis of chronic pancreatitis and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 506 (4) 962-969. (査読あり)
4. Morishita K, Ito N, Koda S, Maeda M, Nakayama K, Yoshida K, Takamatsu S, Yamada M, Eguchi H, Kamada Y, Miyoshi E. (2018) Haptoglobin phenotype is a critical factor in the use of fucosylated haptoglobin for pancreatic cancer diagnosis. *Clin. Chim. Acta*. 487, 84-89. (査読あり)
5. Sobajima T, Yoshimura S, Maeda T, Miyata H, Miyoshi E, Harada A. (2018) The Rab11-binding protein RELCH/KIAA1468 controls intracellular cholesterol distribution. *J. Cell Biology* 217(5), 1777-1796. (査読あり)
6. Nishino K, Koda S, Kataoka N, Takamatsu S, Nakano M, Ikeda S, Kamamatsu Y, Morishita K, Moriwaki K, Eguchi H, Eiko Y, Kikkawa F, Tomita Y, Kamada Y, Miyoshi E. (2018) Establishment of an antibody specific for cancer-associated haptoglobin: A possible implication of clinical investigation. *Oncotarget* 9(16), 12732-44. (査読あり)
7. Manabe Y, Kasahara S, Takakura Y, Yang X, Takamatsu S, Kamada Y, Miyoshi E, Yoshidome D, Fukase K. (2017) Development of 1,6-fucosyltransferase inhibitors through the diversity-oriented syntheses of GDP-fucose mimics using the coupling between alkyne and sulfonyl azide, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 25(11), 2844-2850. (査読あり)
8. Kusama K, Okamoto Y, Saito K, Kasahara T, Murata T, Ueno Y, Kobayashi Y, Kamada Y, Miyoshi E. (2017) Reevaluation of *Pholiota squarrosa* lectin-reactive haptoglobin as a pancreatic cancer biomarker using an improved ELISA system. *Glycoconjugate J*, 34(4), 537-54. (査読あり)
9. Betesh L, Comunale MA, Wang M, Liang H, Hafner J, Karabudak A, Giama NH, Moser CD, Miyoshi E, Roberts LR, Block TM, Mehta A. (2017) Identification of fucosylated Fetuin-A as a potential biomarker for cholangiocarcinoma. *Proteomics Clin Appl*. 2017 May 31. doi: 10.1002/prca.201600141 (査読あり)
10. Kamada Y, Ono M, Hyogo H, Fujii H, Sumida Y, Yamada Y, Mori K, Tanaka S, Maekawa T, Ebisutani Y, Yamamoto A, Takamatsu S, Yoneda M, Kawada N, Chayama K, Saibara T, Takehara T, and Miyoshi E. (2017) Use of Mac-2 binding protein as a biomarker for nonalcoholic fatty liver disease diagnosis. *Hepatology Communications* 1(8), 780-791. (査読あり)
11. Iijima J, Kobayashi S, Kitazume S, Kizuka Y, Fujinawa R, Korekane H, Shibata T, Saitoh SI, Akashi-Takamura S, Miyake K, Miyoshi E, Taniguchi N. (2017) Core fucose is critical for CD14-dependent Toll-like receptor 4 signaling. *Glycobiology* 27(11), 1006-1015. (査読あり)
12. Hata T, Kawamoto K, Eguchi H, Kamada Y, Takamatsu S, Maekawa T, Nagaoka S, Yamada D, Iwagami Y, Asaoka T, Noda T, Wada H, Gotoh K, Masamune A, Miyoshi E, Mori M, Doki Y. (2017) Fatty Acid-Mediated Stromal Reprogramming of Pancreatic Stellate Cells Induces Inflammation and Fibrosis That Fuels Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 46(10), 1259-1266. (査読あり)
13. Furukawa K, Tanemura M, Miyoshi E, Eguchi H, Nagano H, Matsunami K, Nagaoka S, Yamada D, Asaoka T, Noda T, Wada H, Kawamoto K, Goto K, Taniyama K, Mori M, Doki Y. (2017) A practical approach to pancreatic cancer immunotherapy using resected tumor lysate vaccines processed to express -gal epitopes. *PLoS One*. 2017 Oct 27;12(10):e0184901. doi: 10.1371/journal.pone.0184901. (査読あり)
14. Iwata A, Kamada Y, Ebisutani Y, Yamamoto A, Ueda Y, Arai H, Fujii H, Takamatsu S, Maruyama N, Maeda M, Takehara T, Miyoshi E. Establishment of mouse Mac-2 binding protein enzyme-linked immunosorbent assay and its application for mouse chronic liver disease models. *Hepatol Res*. (2017) 47(9):902-909. doi: 10.1111/hepr.12819 (査読あり)
15. Ueda M, Kamada Y, Takamatsu S, Shimomura M, Maekawa T, Sobajima T, Fujii H, Nakayama K, Nishino K, Yamada M, Kobayashi Y, Kumada T, Ito T, Eguchi H, Nagano H, Miyoshi E. (2016) Specific increase in serum core-fucosylated haptoglobin in patients with chronic pancreatitis.

- Pancreatology* 16(2) :238-43. (査読あり).
16. Fujii H, Shinzaki S, Iijima H, Wakamatsu K, Iwamoto C, Sobajima T, Kuwahara R, Hiyama S, Hayashi Y, Takamatsu S, Uozumi N, Kamada Y, Tsujii M, Taniguchi N, Takehara T, Miyoshi E. (2016) Core Fucosylation on T cells, Required for Activation of T-cell Receptor Signaling and Induction of Colitis in Mice, is Increased in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 150(7):1620-32. (査読あり)
 17. Tawara S, Tatsumi T, Iio S, Kobayashi I, Shigekawa M, Hikita H, Sakamori R, Hiramatsu N, Miyoshi E, Takehara T. (2016) Evaluation of Fucosylated Haptoglobin and Mac-2 Binding Protein as Serum Biomarkers to Estimate Liver Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C. *PLoS One*. 2016 Mar 22;11(3):e0151828. doi: 10.1371/journal.pone.0151828. eCollection 2016. (査読あり)
 18. Hasegawa K, Tanaka S, Fujiki F, Morimoto S, Nakano K, Kinoshita H, Okumura A, Fujioka Y, Urakawa R, Nakajima H, Tatsumi N, Nakata J, Takashima S, Nishida S, Tsuboi A, Oka Y, Oji Y, Miyoshi E, Hirata T, Kumanogoh A, Sugiyama H, Hosen N. (2016) Glycosylation Status of CD43 Protein Is Associated with Resistance of Leukemia Cells to CTL-Mediated Cytolysis. *PLoS One*. 2016 Mar 24;11(3):e0152326. doi: 10.1371/journal.pone.0152326. eCollection 2016. (査読あり)
 19. Seino J, Fujihira H, Nakakita SI, Masahara-Negishi Y, Miyoshi E, Hirabayashi J, Suzuki T. (2016) Occurrence of free sialyl oligosaccharides related to N-glycans (sialyl FNGs) in animal sera. *Glycobiology* 26(10) :1072-1085. (査読あり)
 20. Maekawa T, Kamada Y, Ebisutani Y, Ueda M, Hata T, Kawamoto K, Takamatsu S, Mizutani K, Shimomura M, Sobajima T, Fujii H, Nakayama K, Nishino K, Yamada M, Kumada T, Ito T, Eguchi H, Nagano H, Miyoshi E. (2016) Serum Mac-2 binding protein is a novel biomarker for chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 22(17) :4403-10. (査読あり)
 21. Takamatsu S, Shimomura M, Kamada Y, Maeda H, Sobajima T, Hikita H, Iijima M, Okamoto Y, Misaki R, Fujiyama K, Nakamori S, Kanai Y, Takehara T, Ueda K, Kuroda S, Miyoshi E. (2016) Core fucosylation plays a pivotal role in hepatitis B pseudo virus infection: a possible implication fro HBV glyco-therapy. *Glycobiology* 26(11) :1180-1189. (査読あり)
 22. Fujita M, Hayashi T, Matsuzaki K, Nakata W, Kawashima A, Ujike T, Nagahara A, Tsuchiya M, Masuda M, Kobayashi Y, Nojima S, Uemura M, Morii E, Miyoshi E, Nonomura N. (2016) Decreased fucosylated PSA as a urinary marker for high-Gleason prostate cancer. *Oncotarget* doi: 10.18632/oncotarget.10987. (査読あり)
 23. Carvalho S, Oliveira T, Bartels MF, Miyoshi E, Pierce M, Taniguchi N, Carneiro F, Seruca R, Reis CA, Strahl S, Pinho SS. (2016) O-mannosylation and N-glycosylation: two coordinated mechanisms regulating the tumour suppressor functions of E-cadherin in cancer. *Oncotarget* doi: 7(40):65231-65246. (査読あり)
 24. Kamada Y, Kida S, Hirano KI, Yamaguchi S, Suzuki A, Hashimoto C, Kimura A, Sato M, Fujii H, Sobajima T, Yamamoto A, Ebisutani Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Yoshida Y, Yamada M, Nagasaka H, Takehara T, Miyoshi E. (2016) Hepatic aberrant glycosylation by N-acetylglucosaminyltransferase V accelerates HDL assembly. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 311(5) :G859-G868. (査読あり)
 25. Shinzaki S, Ishii M, Fujii H, Iijima H, Wakamatsu K, Kawai S, Shiraishi E, Hiyama S, Inoue T, Hayashi Y, Kuwahara R, Takamatsu S, Kamada Y, Morii E, Tsujii M, Takehara T, Miyoshi E. (2016) N-Acetylglucosaminyltransferase V exacerbates murine colitis with macrophage dysfunction and enhances colitic tumorigenesis. *J Gastroenterol*;51(4):357-69 (査読あり)
 26. Kamada Y, Ebisutani Y, Kida S, Mizutani K, Akita M, Yamamoto A, Fujii H, Sobajima T, Terao N, Takamatsu S, Yoshida Y, Takehara T, Miyoshi E. (2016) Ectopic expression of N-acetylglucosaminyl transferase V (GnT-V) accelerates hepatic triglyceride synthesis. *Hepatol Res*; 46: E118-29 (査読あり)
 27. Sawanobori A, Moriwaki K, Takamatsu S, Kamada Y, Miyoshi E. (2016) A glycoproteomic approach to identify novel glycomarkers for cancer stem cells. *Proteomics* 16(24) :3073-3080 (review) (査読あり)
 28. Taniguchi N, Kizuka Y, Takamatsu S, Miyoshi E, Gao C, Suzuki K, Kitazume S, Ohtsubo K. (2016) Glyco-redox, a link between oxidative stress and changes of glycans: Lessons from research on glutathione, reactive oxygen and nitrogen species to glycobiology. *Arch Biochem Biophys*. 595, 72-80. (review) (査読あり)
 29. Miyoshi E, Kamada Y (2016) Application of glyco-science to the early detection of pancreatic cancer. *Cancer Science* 107(10), 1357-1362. (review) (査読あり)

[学会発表] (計 国際学会 14 件、国内学会 101 件)

紙面の都合で、掲載できず。主な学会としては、アメリカ癌学会、HUPO、日本肝臓学会、日本膵臓学会、日本癌学会、日本生化学会、日本臨床検査学会、生化学会近畿支部会など

〔図書〕(計 3 件)

1. 未来を創るグライコサイエンスー我が国のロードマップ 分担執筆 三善英知 肝臓がん、膵臓がん、健康モニタリング 日本糖鎖科学コンソーシアム 2018 年、全 334 ページ
2. グライコフォーラム 肝臓と糖鎖 企画ならびにイントロダクションの執筆 三善英知 生化学工業と水谷財団 インターネットグライコフォーラム
3. BIO Clinica 32(4) April 2017 グライコバイオロジーの新展開 特集編集 三善英知 北隆館 全 102 ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 6 件)

名称: Gastrointestinal cancer determination method

発明者: 三善英知、鎌田佳宏、高松真二、片岡直也、西野公博、木戸脇佳代子、秋長歩、黒澤竜雄

権利者: 国立大学法人大阪大学/富士フィルム和光純薬株式会社

種類: 特許

番号: PCT/JP2018/030758

出願年: 2018 年 11 月 27 日

国内外の別: 国外

名称: 病理診断装置、画像処理方法及びプログラム

発明者: 三善英知、鎌田佳宏、鈴木 貴、板野景子

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2018/030758

出願年: 2018 年 8 月 23 日

国内外の別: 国内

名称: 慢性膵炎、膵がんの診断法

発明者: 三善英知、戸邊 亨、江口英利、高松真二、前川友裕

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-245964

出願年: 2017 年 12 月 19 日

国内外の別: 国内

名称: NASH の検出方法

発明者: 三善英知、鎌田佳宏、伊藤行夫、南 俊夫

権利者: 国立大学法人大阪大学/特殊免疫研究所

種類: 特許

番号: 特願 2016-221813

出願年: 2017 年 11 月 14 日

国内外の別: 国内

名称: 消化器癌の判定方法

発明者: 三善英知、鎌田佳宏、高松真二、片岡直也、西野公博、木戸脇佳代子、秋長歩、黒澤竜雄

権利者: 国立大学法人大阪大学/富士フィルム和光純薬株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2016-106844

出願年: 2016 年 5 月 27 日

国内外の別: 国内

名称: 高リスク前立腺癌の検出方法、バイオマーカー及び診断薬

発明者: 特願 2016-022325

権利者: 藤田和利、野々村祝夫、三善英知、小林夕香

種類: 特許

番号: 特願 2016-022325

出願年: 2016 年 2 月 9 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

(その他)
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 鎌田 佳宏
ローマ字氏名: Yoshihiro Kamada
所属研究機関名: 大阪大学
部局名: 医学系研究科
職名: 准教授
研究者番号(8桁): 30622609

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 山田 真
ローマ字氏名: Makoto Yamada
研究協力者氏名: 熊田 卓
ローマ字氏名: Takashi Kumada
研究協力者氏名: 伊藤 敏文
ローマ字氏名: Toshifumi Ito
研究協力者氏名: 大野 ゆう子
ローマ字氏名: Yuko Ohno
研究協力者氏名: 野々村 祝夫
ローマ字氏名: Norio Nonomura
研究協力者氏名: 藤田 和利
ローマ字氏名: Kazutoshi Fujita

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。