

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16768

研究課題名(和文) 前立腺がん鑑別および悪性度評価に有用な糖鎖性マーカーアレイの開発

研究課題名(英文) Development of glycan markers for evaluation of prostate cancer malignancy

研究代表者

小島 由太 (Kojima, Yuta)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00792334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌診断においてPSA検査の特異度が低く、過剰診断、過剰治療が問題となっている。前立腺癌鑑別だけでなく悪性度を正確に反映するバイオマーカーの必要性が高まっている。近年、尿中の糖転移酵素の発現検出やレクチン-抗体法によるPSA 癌性糖鎖変異の検出法が前立腺癌鑑別および悪性度評価に寄与する可能性が示されている。本研究では、前立腺尿中においてGal 1-3/4Gal糖鎖を認識するPA-I-Lレクチンに反応性を有する糖鎖変異PSAの前立腺癌鑑別精度が(AUC 0.8131)と既存PSA検査よりも診断精度が有意に高く、前立腺癌の診断に寄与するバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PSAの癌性糖鎖変異の検出を目的とした組み換えレクチンアレイは、生検時あるいは、術前の前立腺尿検体でがんの鑑別および悪性度を評価可能であると考えられる。不必要な針生検による感染症などのリスクを伴わない診断法になると予想され、過剰治療の是正とともに簡便かつ検査を受ける患者のQOL向上につながり、社会的に大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：Although prostate-specific antigen (PSA) is widely used in all the main phase of prostate cancer (PC) detection and patients management such as for screening, risk stratification for recurrence, active surveillance follow-up and monitoring therapy, it will remain the important issues leading to unnecessary prostate biopsies, overdiagnosis and overtreatment of indolent PC due to low specificity of PSA test. Therefore, the most effective and inexpensively detection strategy for PC would be to triage those men needing to perform prostate biopsy before mpMRI using more effective biomarkers. In this study we developed detection system of cancer associated aberrant glycosylated PSA (PA-I-L lectin reactive PSA, PA-I-L-PSA) in urine after DRE by using recombinant lectin array system. The diagnostic performance of PA-I-L-PSA (AUC 0.8131) much superior to conventional PSA test. PA-I-L-PSA test is useful for discriminating prostate cancer.

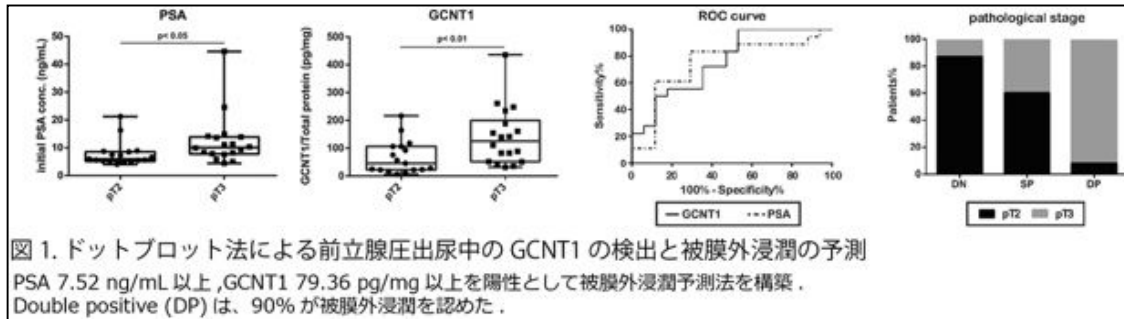
研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：前立腺癌 前立腺特異抗原 癌性糖鎖変異

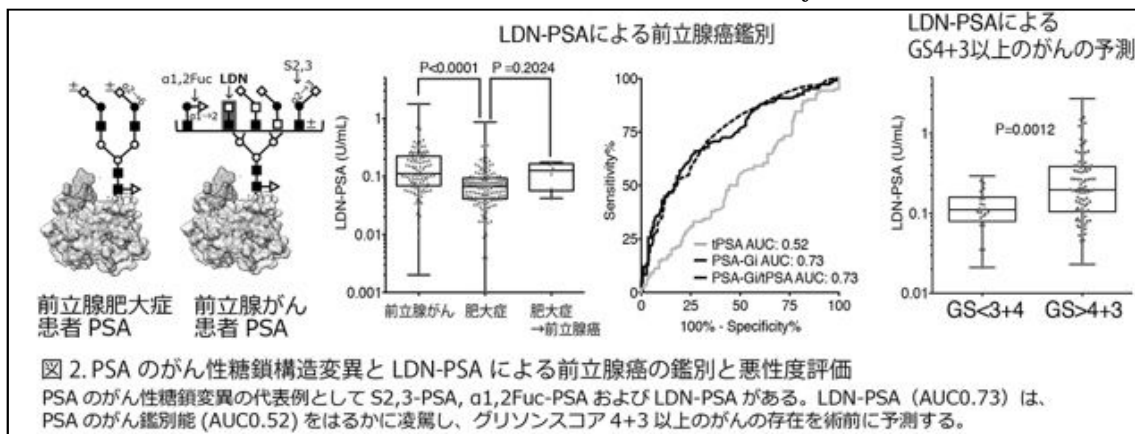
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

PSA 検査をベースにした前立腺がん検診の普及により癌が早期に発見される件数は急増しているが、治療法の選択基準は明確になっていない。その理由は、前立腺がんの悪性度および治療後の再発率を正確に反映するマーカーが現状の検診では存在しないからである。我々は、前立腺がん悪性度と関連する糖転移酵素である GCNT1 に関する研究から前立腺圧出後の尿中の GCNT1 を抗 GCNT1 モノクローナル抗体により、ドットプロット法で検出する方法を開発し、術前の尿中 GCNT1 と PSA 値が被膜外浸潤を予測しうる悪性度評価マーカーになりうることを報告した(Kojima et al. PLOSone, 2015)(図 1)。



また近年、抗 PSA 抗体とレクチンによって PSA のがん性糖鎖変異を検出することで前立腺がんの鑑別や悪性度評価マーカーとして利用する研究開発が行われている。PSA のがん性糖鎖変異の例として末端が Siaα2,3Gal に変異した PSA(S2,3PSA)(Yoneyama et al. *BBRC*, 2014)、

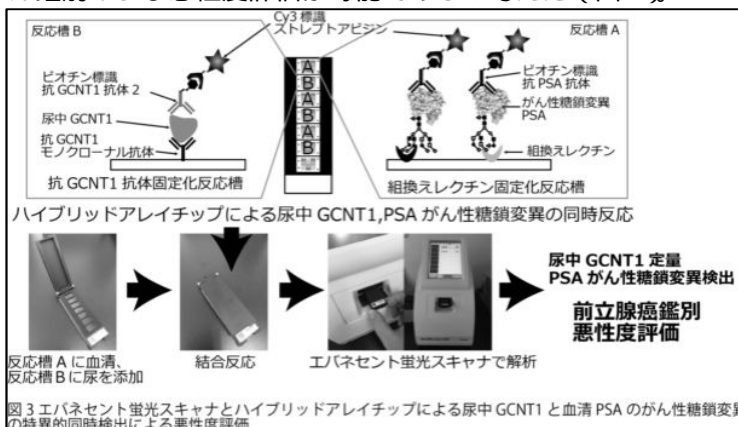


α1,2Fucose 構造を有する PSA(Fukushima et al. *Glycobiology*. 2010)および LacDiNAc (LDN) 構造(GalNAcβ1,4 GlcNAcβ1-)を有する PSA(LDN-PSA) (Kaya et al. *Anal. Chem.* 2015) が報告されており、**PSA のがん性糖鎖変異は、前立腺がんの鑑別、悪性度評価に有用であるとされている (図 2)**

このことから尿中 GCNT1 の検出や PSA のがん性糖鎖構造変異をレクチンで検出する手法は、前立腺がんの鑑別および悪性度評価に非常に有効であることが明らかである。しかし、これらはいずれも糖転移酵素の発現変動やがん性糖鎖変異の一部を検出しているに過ぎず、これらを一度に評価する方法は検討されていない。

2. 研究の目的

マイクロアレイをベースにした方法により樹立済みの抗 GCNT1 抗体と組換えレクチンを 1 枚のスライドガラスにプリントしたハイブリッドアレイによる前立腺圧出尿中の GCNT1 糖転移酵素の検出と血清 PSA のがん性糖鎖変異を同時に検出することでより、精度の高い前立腺がん鑑別および悪性度評価が可能であると考えた (図 3)。



3. 研究の方法

本研究では、すでに樹立済みの抗 GCNT1 モノクローナル抗体を固定化したアレイによる前立腺圧出尿中の GCNT1 の検出法を構築する。さらに組換えレクチンアレイによる PSA 特異的がん性糖鎖変異の検出法を構築する。臨床検体を用いた上記の前立腺癌の鑑別および悪性度評価性能を検討する。これらの測定系の検討結果から、GCNT1 抗体および組換えレクチンを 1 枚のスライドガラスに固定化したハイブリッドアレイを作製し、前立腺癌鑑別および悪性度評価に最適なアレイパネルセットを構築する。

4. 研究成果

平成 29 年度の研究から当初の予定であったすでに樹立済みの抗 GCNT1 モノクローナル抗体を固定化したアレイによる前立腺圧出尿中の GCNT1 の検出法を構築および組換えレクチンアレイによる血清 PSA 特異的がん性糖鎖変異の検出法について、いずれも使用するエバネッセントスキャナーの感度不足により、前立腺圧出尿中の GCNT1 および血清中の PSA の検出ができなかった。そこで、エバネッセントスキャナーの感度不足を考慮し、前立腺圧出尿中のタンパク質でエバネッセントスキャナーでも検出可能な mg 単位のタンパク質として前立腺圧出尿中 PSA に注目した。前立腺圧出尿中 PSA の癌性糖鎖変異をリコンビナントレクチンアレイで検出を試みた結果、十分な検出シグナルが得られることが明らかとなった (図 4)。

確立したリコンビナントレクチンアレイを用いて、実際に前立腺針生検にて診断が確定している前立腺癌患者 (105 例) および前立腺肥大症患者 (107 例) 臨床検体計 212 症例の前立腺圧出尿中 PSA 糖鎖のレクチンプロファイルを検討した。患者背景を表 1 に示す。

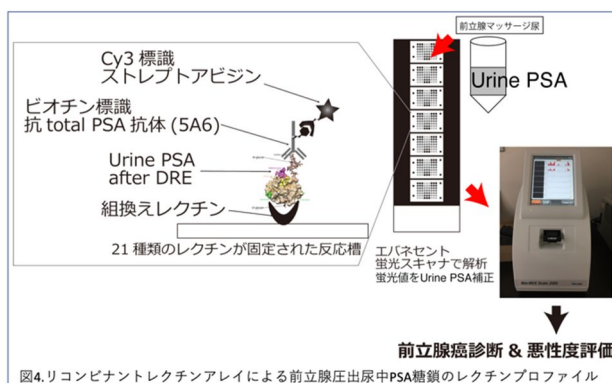


図4. リコンビナントレクチンアレイによる前立腺圧出尿中PSA糖鎖のレクチンプロファイル

表1. 患者背景

(2008-2018年に弘前大学で前立腺生検を施行した212症例の生検時前立腺圧出尿.)

n = 212	BPH (n=107)	PCa (n=105)	p value
	median (range)	median (range)	
Age, (IQR)	68 (64-75)	71 (65-74)	0.2691
Prostate vol.	37.9 (27.2-135.3)	25.0 (7.7-179.0)	<0.0001
PSA, ng/mL	7.81 (1.60-65.73)	11.20 (2.78-102.5)	<0.0001
F/T	0.28 (0.07-0.75)	0.17 (0.00-0.96)	<0.0001
prostate biopsy GS		n=174 (%)	
GS 3 + 3		20 (13.6)	
GS 3 + 4		47 (32.0)	
GS 4 + 3		15 (10.2)	
GS 4 + 4, GS 3 + 5		26 (17.7)	
GS 4 + 5, GS 5 + 4		39 (26.5)	
pathological GS		n= 78 (%)	
GS 3 + 3		11 (14.1)	
GS 3 + 4		22 (28.2)	
GS 4 + 3		18 (23.1)	
GS 4 + 4, GS 3 + 5		13 (16.7)	
GS 4 + 5, GS 5 + 4, GS 5 + 5		14 (17.9)	

その結果、前立腺圧出尿中において 21 種類のリコンビナントレクチンのうち 10 種類のレクチンに反応する PSA が検出可能であった。特に Galα1-3/4Gal 糖鎖を認識する PA-I-L レクチンに反応性を有する糖鎖変異 PSA (PA-I-L-PSA) および Fucose 含有糖鎖を認識する RS-Fuc に反応性を有する糖鎖変異 PSA (RS-Fuc-PSA) が前立腺癌患者で有意に減少し、ROC 解析から、前立腺癌診断に関する AUC は、それぞれ、0.7181、0.8379 と高値であった(図 5 および図 6)。

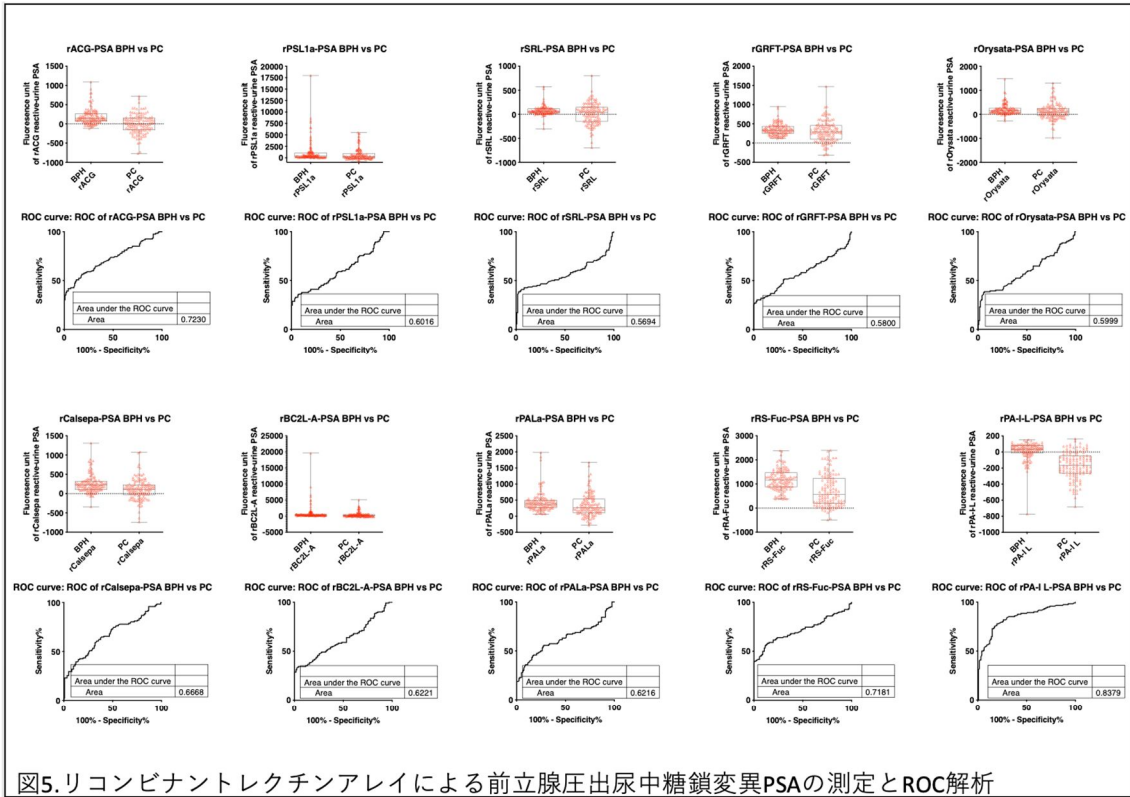


図5.リコンビナントレクチンアレイによる前立腺圧出尿中糖鎖変異PSAの測定とROC解析

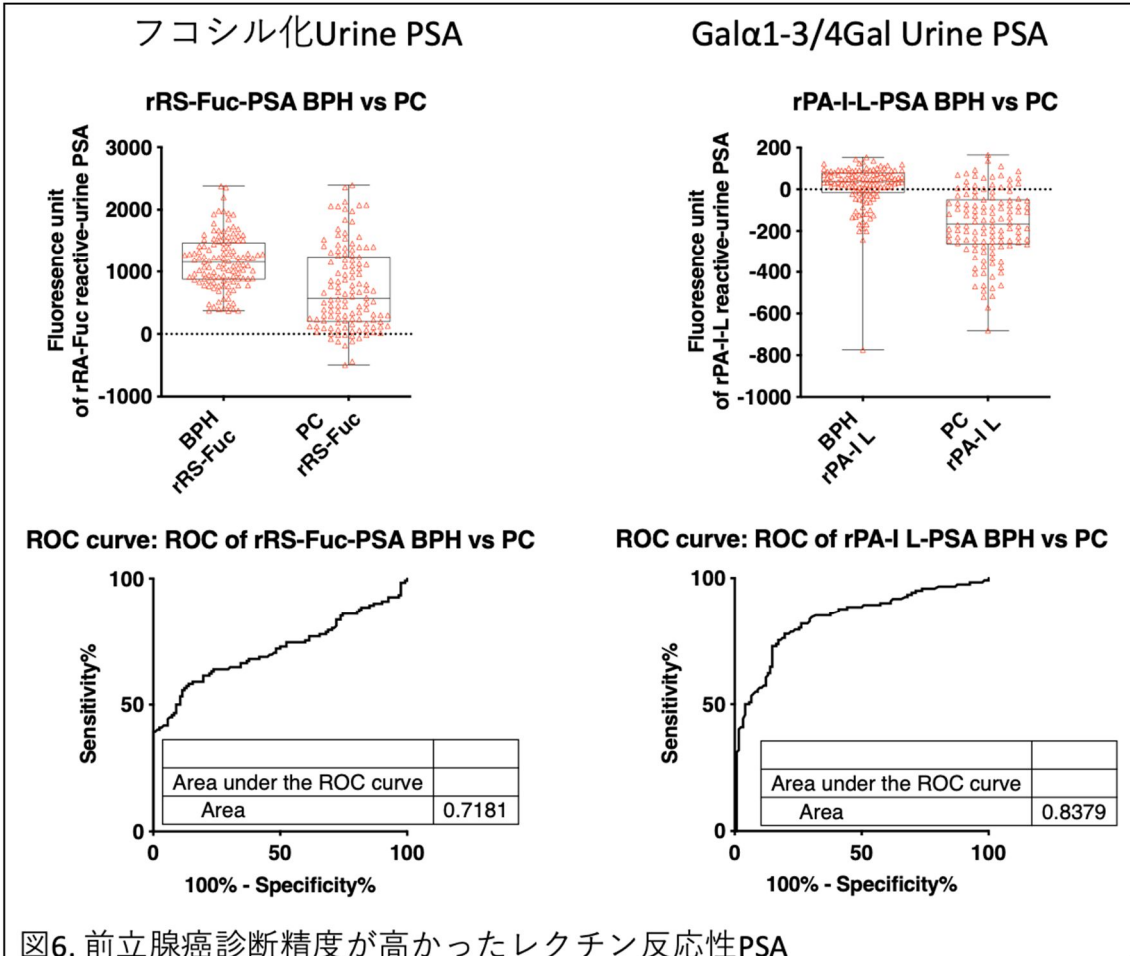


図6. 前立腺癌診断精度が高かったレクチン反応性PSA

上記、2種のレクチン反応性PSA (PA-I-L-PSA および RS-Fuc-PSA) と既存検査である血清 total PSA 検査のROC解析から、AUCを比較した結果、PA-I-L-PSA (AUC 0.8379)、RS-Fuc-PSA (AUC 0.7181) および PSA (AUC 0.7001) となり、PA-I-L-PSA および RS-Fuc-PSA のAUCが有意に高く、既存検査よりも診断精度が高いことが示唆された(図7)

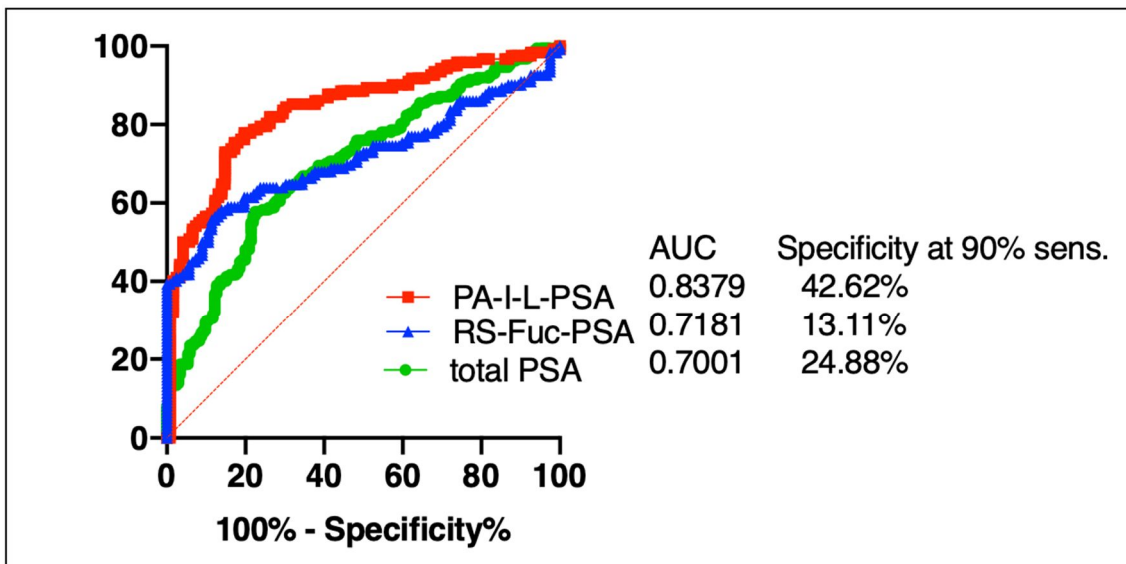


図7. 前立腺癌診断精度が高かったレクチン反応性PSAと既存PSA検査のAUC比較

さらに2種類の糖鎖変異PSA値の病理学的悪性度（グリーソンスコア, GS）との関連性を検討した（図8）。その結果、有意差は認めないが、PA-I-L-PSAでは、GS7以上の癌患者で測定値が高値傾向であった。GS7以上の癌検出例は、積極的治療介入の対象となるため、PA-I-L-PSAでは、前立腺癌の検出と同時に積極的治療介入の指標となる可能性が示唆された。

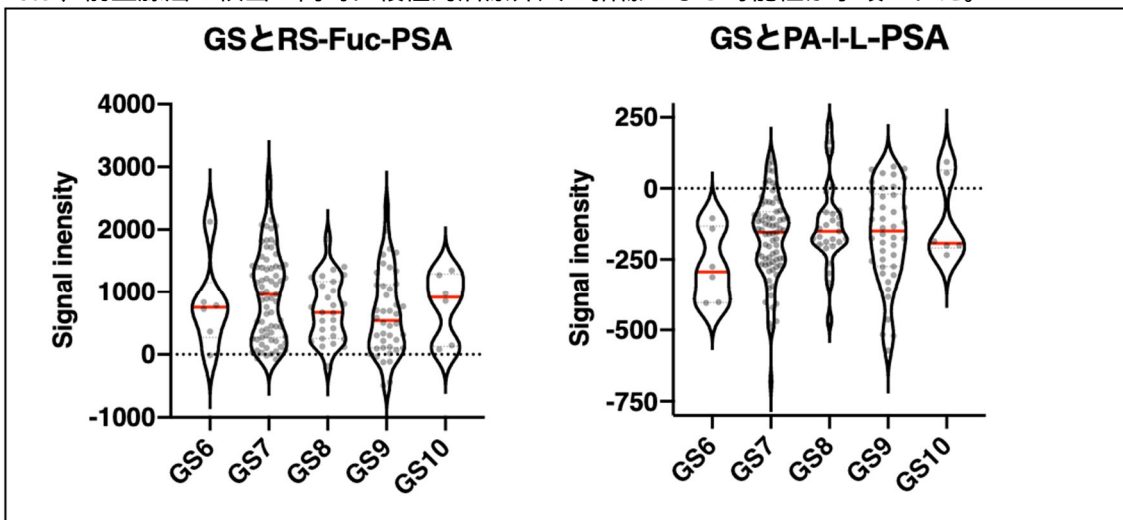


図8. レクチン反応性PSAと病理学的悪性度（グリーソンスコア）の関連

以上の結果から、2種類のレクチンのうち特にPA-I-L-PSAは、前立腺癌の診断および悪性度評価に寄与するバイオマーカーとなり得ることが示唆された。これらの研究成果をもとに論文作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島由太, 飛澤悠葵, 米山 徹, 畠山真吾, 盛 和行, 米山高弘, 橋本安弘, 古家琢也, 大山 力
2. 発表標題 前立腺マッサージ尿中Core2 -1, 6-N-acetylglucosaminyltransferaseの検出は前立腺癌の被膜外浸潤予測に有効である
3. 学会等名 第1回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tanaka T, Yoneyama T, Noro D, Kojima Y, Imanishi K, Yamamoto H, Tobisawa Y, Mori K, Imai A, Hatakeyama S, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Tanaka M, Nishimura S, Kurauchi S, Takahashi I, Ohyama C
2. 発表標題 Aberrant N-glycosylation profile of serum immunoglobulins is a urothelial calcinomas.
3. 学会等名 米国泌尿器科会議2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tanaka T, Yoneyama T, Noro D, Imanishi K, Kojima Y, Hatakeyama S, Tobisawa Y, Mori K, Yamamoto H, Imai A, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Tanaka M, Nishimura S, Kurauchi S, Takahashi I, Ohyama C
2. 発表標題 berrant N-glycosylation profile of serum immunoglobulins is a diagnostic biomarker of urothelial carcinomas
3. 学会等名 第33回欧州泌尿器学会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小島由太, 及川真亮, 西村祥二, 日下 歩
2. 発表標題 尿路再建術後（Boari flap作成、尿管尿管端側吻合）の両側水腎症に対し軟性膀胱鏡にて逆行性に尿路観察し両側ステントを留置し得た1例
3. 学会等名 第47回青森県泌尿器科研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 5. 小島由太、及川真亮、西村祥二：アキシチニブが原因と考えられる腸管気腫症を発症した腎細胞癌の1例
2. 発表標題 アキシチニブが原因と考えられる腸管気腫症を発症した腎細胞癌の1例
3. 学会等名 第50回青森県泌尿器科研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----