

令和 3 年 4 月 8 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16717

研究課題名(和文) GCNT2糖転移酵素による前立腺癌悪性度のリキッドバイオプシー評価法の開発

研究課題名(英文) Development of GCNT2 glycosyltransferase-based liquid biopsy marker for evaluation of prostate cancer malignancy

研究代表者

三上 穰太郎(Mikami, Jotaro)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：10792319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Cell free DNA (cfDNA)における糖転移酵素定量検出Liquid biopsy法が前立腺癌悪性度評価、治療効果のサロゲートマーカーとなり得るか検証した。cfDNA中の糖転移酵素の発現検討から、LacdiNAc糖鎖構造の合成に関連するB4GALNT4遺伝子の発現のみ、去勢抵抗性前立腺癌症例の予後予測、治療反応性を反映するマーカーとなる可能性が示唆された。当初の目的であった悪性度に関連するI抗原の合成に関与するGCNT2遺伝子は、残念ながら、前立腺癌の診断や悪性度評価に関して、有意差を認めず有用なバイオマーカーとならなかった

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では前立腺癌診断や悪性度評価に関わるマーカーを同定するには至らなかったが、cfDNA中の糖転移酵素の発現定量による去勢抵抗性前立腺癌の予後予測に関連する遺伝子を同定した。特に骨転移が多く、針生検による、組織検体採取が難しい去勢抵抗性前立腺癌の予後予測および治療効果モニタリングには、低侵襲なLiquid biopsyベースのバイオマーカーが非常に有用であると考えられる。cfDNA中の糖転移酵素バイオマーカーは、これまでに報告されておらず、学術的意義は高く、本バイオマーカーの実用化は、去勢抵抗性前立腺癌の治療効果の向上、患者のQOL向上および医療費軽減につながり、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluate the glycosyltransferase gene expression in cell free DNA as a biomarker of prostate cancer malignancy or as a surrogate biomarker of treatment of prostate cancer. The expression level of LacdiNAc-glycan synthesis related B4GALNT4 gene significantly correlate with castration resistant status of prostate cancer suggesting the B4GALNT4 gene expression in cfDNA as a prognostic biomarker of castration resistant prostate cancer. The expression level of I antigen-glycan synthesis related GCNT2 gene was not significant correlation in prostate cancer detection and evaluation of its malignancy.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：リキッドバイオプシー 前立腺癌 糖転移酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌検診の普及により早期前立腺癌が発見される件数が急増しているが、治療法の選択基準は明確になっていない。その理由は癌の悪性度を正確に反映するバイオマーカーが存在しないからである。私たちは前立腺癌細胞表面の *O* 結合型糖鎖やその合成に関わる GCNT2 糖転移酵素の変化が前立腺癌の悪性化に重要であることを明らかにしてきた。本研究では、Cell free DNA (cfDNA)や Circulating tumor Cell (CTC)上の *O* 結合型糖鎖構造や GCNT2 糖転移酵素を定量検出する新規 Liquid biopsy 法の確立とその手法が悪性度評価マーカーとなりうるか検証する。

現状の PSA 検査では、積極的治療介入が必要な高悪性度癌の存在や治療後の再発率を正確に反映できず、治療を要しない前立腺癌に対する過剰治療が問題である。これを解決するために、4KScore などの血清検査や Decipher genomic classifier など組織ベースの前立腺癌悪性度評価法が開発され、検証が行われているが、multifocal で不均一であるという前立腺癌の特徴から生検や手術検体を用いた遺伝子やタンパク質レベルでの解析では「採取した時点」の腫瘍の一部分の状況を反映しているに過ぎないと考えられる。このことから、患者の全身状況の「現状」を反映し、癌の分子プロファイル全体のモニタリングが可能となる Liquid biopsy による、より非侵襲的な前立腺癌悪性度評価マーカーの実用化は過剰治療の是正と患者の QOL 向上および医療費軽減につながり、その開発は急務である。

私たちは、前立腺癌の悪性化に関わる I 抗原修飾 *O* 型糖鎖 (I 抗原 *O*-glycan) とその合成に関与する GCNT2 糖転移酵素 (Mikami et al. *Cancer Sci*(107):359-368. (2016)) に関する研究 (図 1) から、I 抗原という糖鎖構造で修飾された *O* 結合型糖鎖 (I 抗原 *O*-glycan) とその合成に関与する GCNT2 糖転移酵素が前立腺癌の細胞遊走能、浸潤能を調節し、悪性化に重要であることを明らかにした。

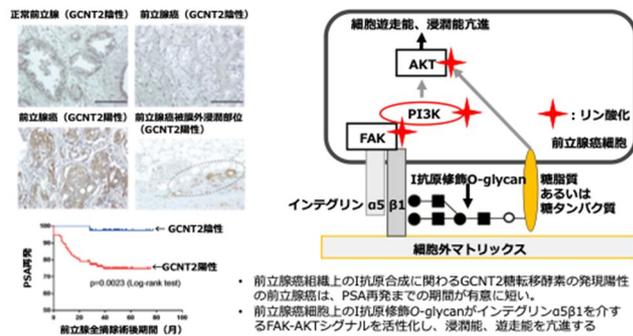


図1. GCNT2によって合成されるI抗原修飾O-glycanを介した前立腺癌の悪性化機構

2. 研究の目的

本研究では、前立腺癌細胞表面の I 抗原 *O*-glycan の定量や I 抗原の合成に関与する GCNT2 糖転移酵素を Liquid biopsy の手法を用いてより簡便に定量する方法 (図 2) が、前立腺癌の悪性度評価あるいは、再発予測に有用であるか否かを検証することを目的とする。

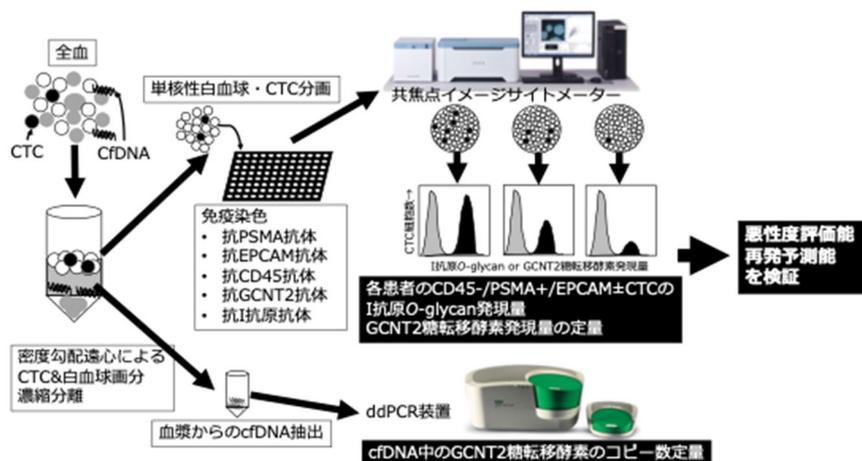


図2. GCNT2 糖転移酵素およびI抗原修飾O-glycanを標的としたLiquid biopsyによる悪性度、再発予測マーカー

3. 研究の方法

Liquid biopsy による前立腺癌細胞表面の I 抗原 O-glycan の定量や I 抗原の合成に關与する GCNT2 糖転移酵素 の発現定量法の確立とそれを用いた悪性度評価、再発予測との関連を明らかにするために以下の計画で検討を進めた。

平成 30 年度の計画

I. 共焦点イメージサイトメーターによる前立腺癌患者の全血からの CTC 検出法の確立

1. 健常人の全血に前立腺癌細胞を任意の個数 spike した検体を密度勾配遠心法にて濃縮し、得られた単核性白血球/CTC 分画を抗 CD45 抗体、抗 EpCAM 抗体あるいは抗 PSMA 抗体でラベルし、共焦点顕微鏡とフローサイトメーターの長所を併せ持つハイスループット共焦点定量イメージサイトメーターにより、CD45-/PSMA+/EpCAM±前立腺癌細胞を可視化する。最初に spike した前立腺癌細胞数と比較し、CTC としての検出率を検証する。
2. 前立腺癌と診断された患者（術前、術後、転移性ホルモン感受性前立腺癌患者、去勢抵抗性前立腺癌患者）の全血から密度勾配遠心法にて濃縮した CTC を 1 と同様に抗体でラベルし、前立腺癌由来 CTC(PCa-CTC)が検出可能かどうかを検証する。
3. 2 で確立した条件下で細胞表面の I 抗原 O-glycan 糖鎖構造に特異的抗体あるいは GCNT2 糖転移酵素抗体でさらにラベルし、PCa-CTC 上の I 抗原 O-glycan や GCNT2 の発現を共焦点イメージサイトメーター（CQ1, 横河電機株式会社）で発現解析する。

II. 前立腺癌患者の全血から分離した cfDNA 中の糖転移酵素の ddPCR による発現量検出法の確立

1. 健常人あるいは、種々の前立腺癌患者の末梢血検体から cfDNA を抽出し、droplet digital PCR により、I 抗原 O-glycan の合成に關連する GCNT2 糖転移酵素の発現を検出可能かどうか検証する。コントロールとして、ハウスキーピング遺伝子やアンドロゲンレセプターの発現コピー数の検出の有無を確認する。ハウスキーピング遺伝子やアンドロゲンレセプター遺伝子の発現コピー数で normalize する。

平成 31 年度以降の計画

前年度に確立した Liquid biopsy の手法を用いて以下の前立腺癌患者の CTC 上の I 抗原 O-glycan 糖鎖あるいは、GCNT2 糖転移酵素の発現量や cfDNA 中の GCNT2 糖転移酵素コピー数をモニタリングし、前立腺癌の悪性度、再発予測に有用かどうかを検証する。

- I. 前立腺癌と診断され、手術予定の患者の術前検体と術後検体から CTC および cfDNA を分離し、I 抗原 O-glycan あるいは、GCNT2 糖転移酵素の発現量や cfDNA 中の糖転移酵素コピー数をモニタリングし、全摘した前立腺の病理学的悪性度とその後の再発の有無との関連を検討する。

4. 研究成果

平成 30 年度の計画であった以下の I. II.項目の実験から、II.の全血からの cfDNA 中の糖転移酵素発現の検出が実施可能であった。

I. 共焦点イメージサイトメーターによる前立腺癌患者の全血からの CTC 検出法の確立

健常人の全血に前立腺癌細胞を 0~100 の個数 spike した検体を密度勾配遠心法にて濃縮し、

得られた単核性白血球/CTC 分画を抗 CD45 抗体、抗 EpCAM 抗体あるいは抗 PSMA 抗体でラベルし、ハイスループット共焦点定量イメージサイトメーターにより、CD45-/PSMA+/EpCAM±前立腺癌細胞を可視化を試みたが、CTC を検出することはできなかった。そのため、cfDNA による糖転移酵素の発現解析方法 (II) に焦点をあて、その後の研究を実施した。

II. 前立腺癌患者の全血から分離した cfDNA 中の糖転移酵素の ddPCR による発現量検出法の確立

良性疾患コントロールとして、前立腺肥大症患者 (n=10)、種々の前立腺癌患者 (局所前立腺癌 n=57、アンドロゲン遮断療法中の前立腺癌 n=97、去勢抵抗性前立腺癌 n=97) の末梢血検体から cfDNA を抽出し、droplet digital PCR により、GCNT2 の他に悪性度と関連すると報告されている GCNT1 および B4GALNT4 糖転移酵素の発現が検出可能かどうかを検証した。コントロールとして、AQP5 遺伝子の発現コピー数で normalize した (図 1、図 2)。

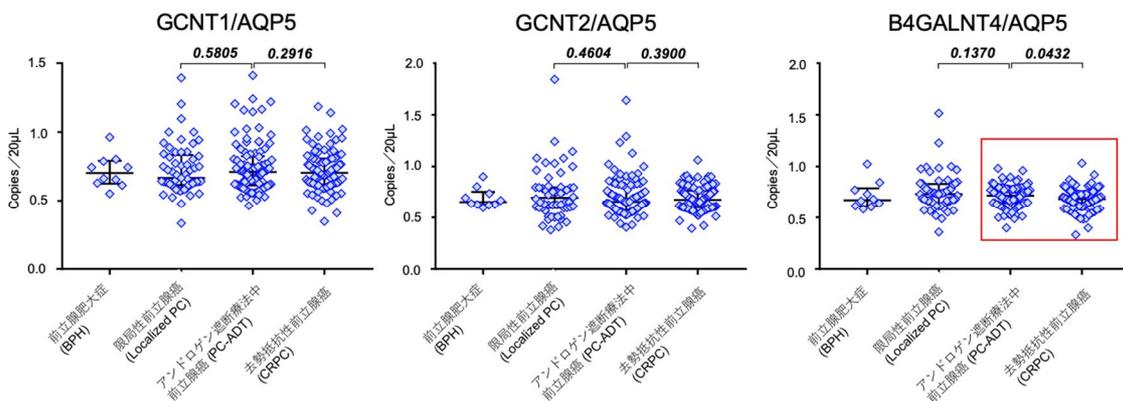


図 3 種々の前立腺癌患者における cfDNA 中の糖転移酵素の発現



図 4 種々の前立腺癌患者における cfDNA 中の B4GALNT4 糖転移酵素の発現

その結果、図 3 に示すように GCNT1 および GCNT2 遺伝子は、各患者集団間で有意差を認めなかったが、B4GALNT4 遺伝子の発現は、去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)で有意に減少することが明らかとなった。また前立腺肥大症患者 (BPH)、限局性前立腺癌患者 (Localized PC) およびアンドロゲン遮断療法中の患者 (PC-ADT) 集団間では、優位な差は、認められなかった (図 4)。有意差が認められた cfDNA 中の B4GALNT4 遺伝子発現を用いた去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) の検出に関する AUC は、0.618 であった。

当初、前立腺癌と診断され、手術予定の患者の術前検体と術後検体から CTC および cfDNA を分離し、I 抗原 O-glycan あるいは、GCNT2 糖転移酵素の発現量や cfDNA 中の糖転移酵素コピー数をモニタリングし、全摘した前立腺の病理学的悪性度とその後の再発の有無との関連を検討する予定であったが、前年度の結果から、CTC の検出法の確率ができなかったこと、および図 1, 2 の結果より、cfDNA 中の糖転移酵素のうち、GCNT1, GCNT2 発現においては、各患者集団間で有意差を認められなかったことから、本研究で標的としていた GCNT1,GCNT2 遺伝子の cfDNA 中の発現は癌の有無や悪性度を反映しないことが示唆された。唯一、有意差が認められた B4GALNT4 遺伝子の発現に関しては、CRPC 症例を対照に予後との関連を調査した(図 5)。

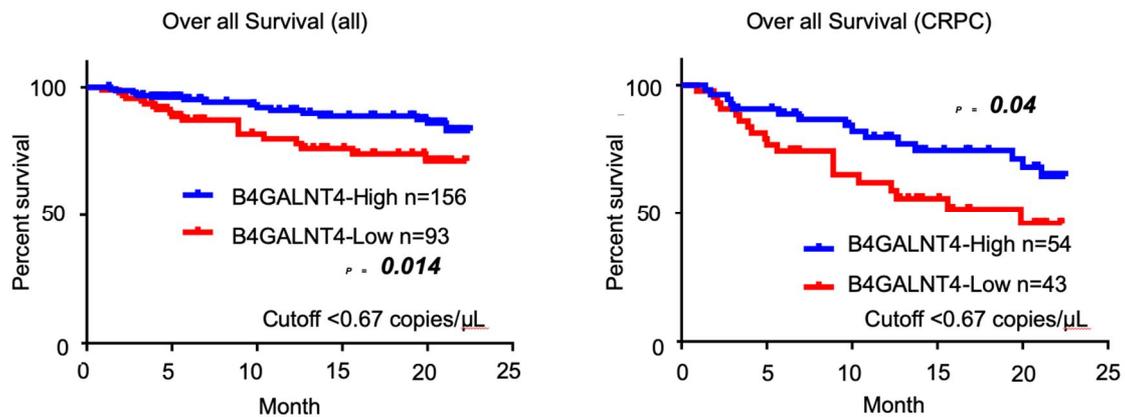


図 5 B4GALNT4 遺伝子の発現と全生存率に関する Kaplan-Meier プロット

その結果、検討した全前立腺癌患者 (n=249 症例) のうち、cfDNA 中の B4GALNT4 遺伝子の発現が 0.67 copies/μL より小さい患者群(n=93 例)で有意に全生存率が短く、対象を CRPC 群のみに絞ると B4GALNT4 遺伝子の発現が、0.67 copies/μL より小さい CRPC 患者群で有意に予後不良である可能性が示唆された。我々のこれまでの研究から、B4GALNT4 遺伝子によって合成される LacdiNAc 糖鎖構造は、Gleason パターン 4,5 の悪性度が高い前立腺癌患者で有意に増加することが明らかとなっている (Hagiwara K. et al., *Int J Mol Sci* ;18(2), E261, 2017) が、本研究で得られた、cfDNA 中の B4GALNT4 遺伝子の発現は、発現量が低いほど予後良好であるという逆の結果であった。これは、B4GALNT4 遺伝子が高発現した悪性度が高い前立腺癌細胞由来の cfDNA が予後不良例であまり循環中に放出されていない結果を反映している可能性が考えられる。すなわち、cfDNA 中の B4GALNT4 遺伝子発現が高くなればなるほど悪性度が高い前立腺癌細胞が種々の治療によって殺されている状況を反映していると考えられる。本研究では、各種治療に対する反応についての検討ができていないため、上記可能性についてさらなる検討が必要と考えられた。

研究開始当初は、末梢血中の CTC を解析する手法が限られていたため、イメージサイトメーターによる CTC 検出を試みたが、その検出法の確立には至らなかった。現在は、希少細胞を口入することなく検出するための技術が進歩しており、CTC 表面の糖鎖抗原の発現を検出することも可能であろうと考えられる。一方、cfDNA 中の 3 種類糖転移酵素 (GCNT2,GCNT1 および B4GALNT4) の発現は、前立腺癌の診断や悪性度評価に関して、有意差を認めず有用なバイオマーカーとならなかった。今後、前立腺癌の悪性度に関わる他の糖鎖構造や、糖転移酵素遺伝子の検索が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Anan Go, Kaiho Yasuhiro, Iwamura Hiromichi, Ito Jun, Kohada Yuki, Mikami Jotaro, Sato Makoto	4. 巻 20
2. 論文標題 Preoperative pelvic floor muscle exercise for early continence after holmium laser enucleation of the prostate: a randomized controlled study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Urology	6. 最初と最後の頁 3-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12894-019-0570-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Anan Go, Yoneyama Tohru, Noro Daisuke, Tobisawa Yuki, Hatakeyama Shingo, Sutoh Yoneyama Mihoko, Yamamoto Hayato, Imai Atsushi, Iwamura Hiromichi, Kohada Yuki, Mikami Jotaro, Ito Jun, Kaiho Yasuhiro, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Sato Makoto, Ohyama Chikara	4. 巻 21
2. 論文標題 The Impact of Glycosylation of Osteopontin on Urinary Stone Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 93 ~ 93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21010093	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------