

令和 3 年 5 月 16 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：18K16719

研究課題名(和文)画像評価法とリキッドバイオプシーの併用による腎癌治療効果判定バイオマーカーの開発

研究課題名(英文)Development of kidney cancer biomarker for therapeutic efficacy by using imaging and liquid biopsy

研究代表者

細越 正吾 (Hosogoe, Shogo)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00815798

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)：進行性/転移性腎癌は予後不良の疾患であるがバイオマーカーが存在しない。本研究では、網羅的血清糖鎖析、Cell free DNA (cfDNA)を用い、治療効果や治療抵抗性を反映する糖鎖や遺伝子を定量検出するLiquid biopsy法の確立を目的としている。約100例のsampleを解析し候補分子(糖鎖・遺伝子)の絞り込みを行った。糖鎖を用いた腎癌診断N型糖鎖スコアを作成すると、腎癌を高精度に判別することが可能であった。また、cfDNAに関しては、腎癌特異的とされるG250遺伝子は有用ではないことがわかり、糖鎖を用いたバイオマーカーが画像と相関するかを今後検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、有効なバイオマーカーがない腎細胞癌において、血清糖鎖測定が診断に有効であることを示した研究である。一般に糖鎖解析には専門的な知識だけでなく質量分析装置が必要になるため、実臨床での多数検体を測定することはかなり困難であった。しかし本研究では、糖鎖解析にキャピラリー電気泳動法を応用することで、扱いが煩雑な質量分析装置を用いずとも糖鎖解析が可能であり、更にそのスコア化により、疾患の診断が可能であることを示唆することができた。cfDNAや循環腫瘍細胞、画像評価との相関はこれからであるが、本研究の研究成果の学術的意義や社会的意義は大きいものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Advanced/metastatic renal cell carcinoma (RCC) is a disease with a poor prognosis without useful biomarkers. In this study, we aimed to establish a liquid biopsy-based biomarkers using comprehensive glycosylation of serum and cell free DNA (cfDNA). We analyzed 100 samples to select the candidate molecules (glycans and genes). We developed diagnostic N-glycan score to detect RCC. We found diagnostic N-glycan score were useful to detect RCC with a high accuracy. We found the G250 gene, which is specific for RCC, was not useful. Further study is necessary to examine whether biomarkers using glycans correlate with images in the future.

研究分野：腎細胞癌

キーワード：腎細胞癌 糖鎖解析

1. 研究開始当初の背景

局所進行性もしくは転移性の腎癌は予後不良の疾患である。腎癌には有効なバイオマーカーがないため、その診断は画像に頼らざるを得ない。治療効果も画像にて行うが、内部壊死を伴うことが多く、標準評価法である RECIST では正しく評価できていないことが多い。そのため画像評価のみでは全体像を把握できず、評価法としては限界がある。そのような状況下、患者の全身状況のモニタリングが可能となる Liquid biopsy が普及してきており、研究段階ではあるがいくつかの癌種で血清糖鎖の網羅的解析、cell free DNA (cfDNA)、循環腫瘍細胞 (CTC) を用いた診断や治療効果予測などが可能になっている。現在、悪性度や治療後の再発、あるいは治療効果を適切に反映するバイオマーカーは開発されていない。以上より、画像評価法と Liquid biopsy を併用した治療効果予測マーカーの実用化は治療効果向上および医療費軽減につながる可能性があり、その開発は急務である。

2. 研究の目的

本研究では、網羅的血清糖鎖析、droplet digital PCR による cfDNA 解析、共焦点定量イメージサイトメーターによる CTC 上の細胞表面糖鎖構造と糖転移酵素の発現定量を併用し、診断・悪性度評価・再発予測・治療効果のサロゲートマーカーとしての有用性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

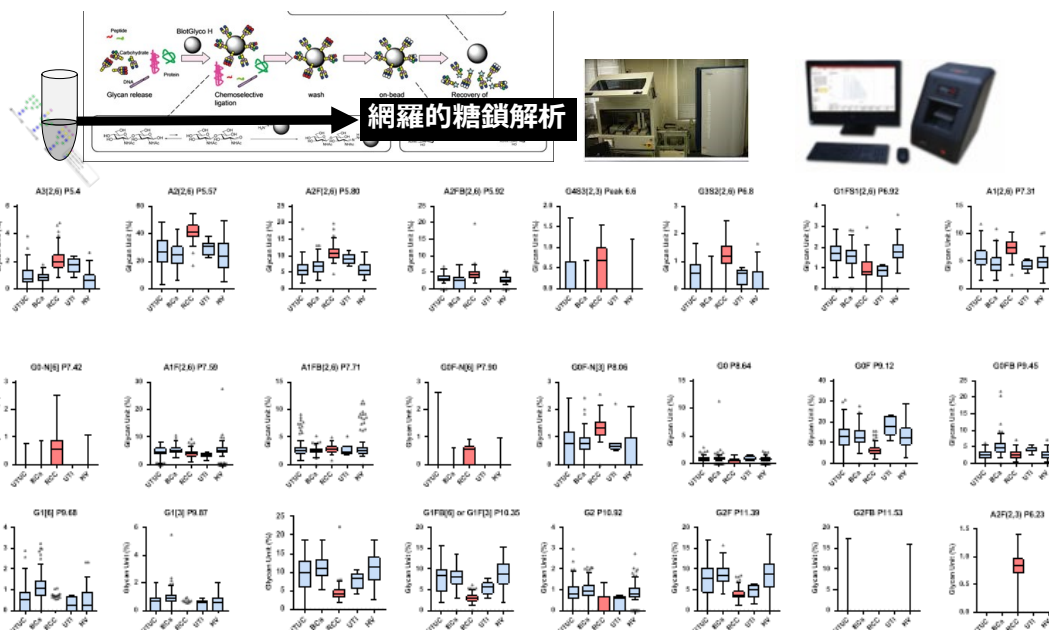
3-1 網羅的血清糖鎖析: 糖鎖結合ビーズ BlotGlyco®を用いて、腎癌患者血清中の免疫グロブリン付加糖鎖を抽出し、その糖鎖をキャピラリー電気泳動法 (GlyQ) で分離し、含まれる糖鎖構造とその量を同定し、それら糖鎖を用いた腎癌診断N型糖鎖スコア (dNGScore) を作成し、腎癌の有無と関連するスコアを作成した。

3-2 cfDNA 解析: 腎癌患者の血漿を用いて、droplet digital PCR による cfDNA 総量解析と G250 の腎癌マーカーとしての有効性を検討した。

3-3 CTC 検出: 臨床サンプルを用いて、共焦点定量イメージサイトメーターによる CTC を同定し、糖鎖構造発現量、糖転移酵素発現量の定量化が可能かを検討した。

4. 研究成果

4-1 網羅的血清糖鎖析: 102 例の腎癌患者における血清 IgG 糖鎖の免疫グロブリンを網羅的に解析した。コントロール群として、他の泌尿器癌 (膀胱癌: BCa、上部尿路上皮癌 UTUC)、尿路感染症 (UTI)、健常コントロール群を用いた。その結果、いくつかの糖鎖が腎癌特異的に高い傾向がみられたが、単一糖鎖のみでは判別困難であること示唆された。

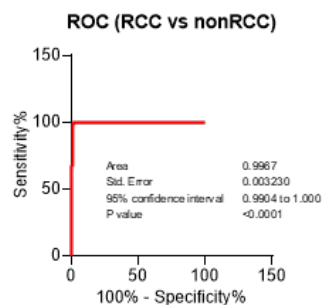
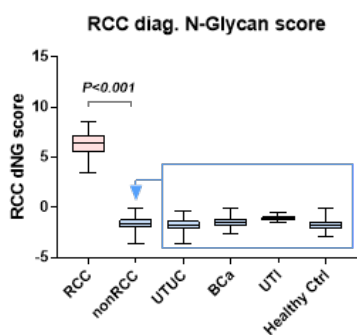


そのため、複数の糖鎖を用いて判別解析を行い、コントロール群と判別するための dNGScore を作成した。その結果、受信者操作特性 (ROC) 曲線で Area Under the Curve (AUC) 0.997 (P<0.001) と高精度に腎癌を診断できるモデルを作成することが出来た。

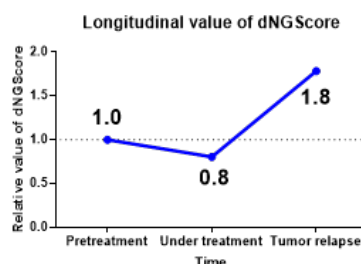
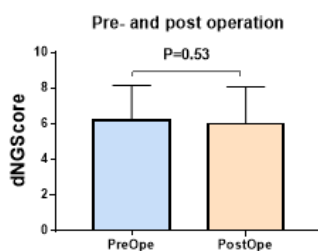
このモデルを用いて術前と術後 7 日目の検体がある症例の dNGScore と比較すると、大きな変

化はなく、免疫グロブリンの半減期からも 1 ヶ月以上の間隔が必要であることが示唆された。また、縦断的にスコアを測定した再発症例をみても、再発時に上昇傾向があるが、再発を容易に指摘できるわけではないようであった。そのため、現在再発を指摘できる再発スコアの作成を検討している。

腎癌診断 N型糖鎖スコア (dNGScore)



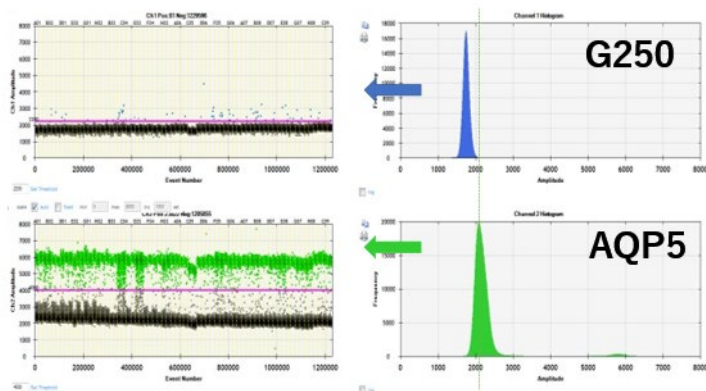
dNGScore 縦断的解析



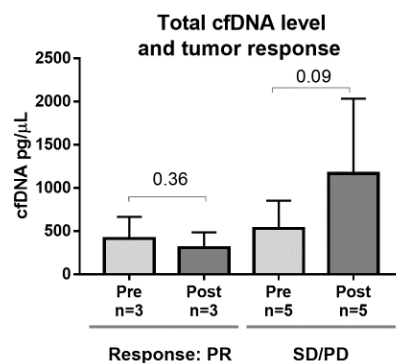
4-2 cfDNA 解析 :

腎癌患者の血漿を用いて、droplet digital PCR による cfDNA 総量解析と G250 の腎癌マーカーとしての有効性を検討した。しかし、G250 の増幅はコントロールのアクアポリン-5 (AQP5) と比べて有意な増幅は無く、G250 は有効でない可能性が示唆された。しかし、cfDNA 総量は、画像上の治療経過と相関する傾向がみられ、有効性が示唆されたが、非特異的なマーカーであり今後の検討が必要である。

cfDNA-G250解析 (コントロール : AQP5)



cfDNA総量の縦断的解析



4-3 CTC 検出 : 臨床サンプルを用いて、共焦点定量イメージサイトメーターによる CTC の同定を試みたが、存在比率の問題もあり、CTC の同定は容易ではなく、かなり進行した状態でないと困難であることが判明した。そのため、この検討は CTC の濃縮が必要となるため、条件検討から再開している段階である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okamoto Teppei, Hatakeyama Shingo, Hosogoe Shogo, Tanaka Yoshimi, Imanishi Kengo, Takashima Toru, Saitoh Fumitada, Suzuki Tadashi, Ohyama Chikara	4. 巻 13
2. 論文標題 Proton pump inhibitor as an independent factor of progression of abdominal aortic calcification in patients on maintenance hemodialysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0199160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0199160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okamoto Teppei, Hatakeyama Shingo, Kodama Hirotake, Horiguchi Hirotake, Kubota Yuka, Kido Koichi, Momota Masaki, Hosogoe Shogo, Tanaka Yoshimi, Takashima Tooru, Saitoh Fumitada, Suzuki Tadashi, Ohyama Chikara	4. 巻 19
2. 論文標題 The relationship between poor nutritional status and progression of aortic calcification in patients on maintenance hemodialysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Nephrology	6. 最初と最後の頁 71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12882-018-0872-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hamaya Tomoko, Hatakeyama Shingo, Tanaka Toshikazu, Kubota Yuka, Togashi Kyo, Hosogoe Shogo, Fujita Naoki, Kusaka Ayumu, Tokui Noriko, Okamoto Teppei, Yamamoto Hayato, Yoneyama Tohru, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Ohyama Chikara	4. 巻 -
2. 論文標題 Trends in the use of neoadjuvant chemotherapy and oncological outcomes for high risk upper tract urothelial carcinoma: a multicentre retrospective study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BJU International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bju.15346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kido Koichi, Hatakeyama Shingo, Numakura Kazuyuki, Tanaka Toshikazu, Oikawa Masaaki, Noro Daisuke, Hosogoe Shogo, Narita Shintaro, Inoue Takamitsu, Yoneyama Takahiro, Ito Hiroyuki, Nishimura Shoji, Hashimoto Yasuhiro, Kawaguchi Toshiaki, Habuchi Tomonori, Ohyama Chikara	4. 巻 26
2. 論文標題 Comparison of nivolumab plus ipilimumab with tyrosine kinase inhibitors as first-line therapies for metastatic renal-cell carcinoma: a multicenter retrospective study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 154 ~ 162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-020-01797-5	査読の有無 有
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 Tanaka Toshikazu, Hatakeyama Shingo, Numakura Kazuyuki, Kido Koichi, Noro Daisuke, Oikawa Masaaki, Hosogoe Shogo, Tokui Noriko, Yamamoto Hayato, Narita Shintaro, Ito Hiroyuki, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Kawaguchi Toshiaki, Habuchi Tomonori, Ohyama Chikara	4. 巻 27
2. 論文標題 Efficacy and safety of first line nivolumab plus ipilimumab in patients with metastatic renal cell carcinoma: A multicenter retrospective study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 1095 ~ 1100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14363	査読の有無 有
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
---------	---------