

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16748

研究課題名（和文）イムノグロブリン糖鎖変異による尿路上皮癌診断マーカーの開発

研究課題名（英文）Development of aberrant glycosylation of serum immunoglobulin for urothelial carcinoma diagnosis

研究代表者

田中 壽和（Tanaka, Toshikazu）

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：50793650

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：尿路上皮癌（膀胱癌および腎盂・尿管癌）の診断は尿細胞診、画像診断、侵襲を伴う膀胱鏡、尿管鏡下生検によって行われているが、感度、特異度ともに十分な状態ではなく、低侵襲かつ有効なバイオマーカーもない。本研究では、キャピラリー電気泳動型迅速糖鎖解析装置を用いてイムノグロブリン（Ig）分画の26種類N型糖鎖を定量し、AIデータロボットを用いた網羅的パスウェイ解析により尿路上皮癌の診断あるいは再発予測スコアを構築した。後方視的解析から、構築した診断スコアは、AUC 0.95以上、再発予測スコアは、0.78以上と既存マーカーより高い精度を示した。現在前向きに本診断・再発スコアの有用性を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路上皮癌（膀胱癌および腎盂・尿管癌）の診断は尿細胞診、画像診断、侵襲を伴う膀胱鏡、尿管鏡下生検によって行われているが、感度、特異度ともに十分な状態ではなく、低侵襲かつ有効なバイオマーカーもない。本研究で構築された診断および再発予測スコアの有用性が明らかになることで、は尿路上皮癌、特に進行状態で発見される腎盂・尿管癌の早期発見に寄与し、治療効果向上のみならず不必要な侵襲的検査の減少につながる可能性がある。尿路上皮癌の早期発見および再発予測による適切な治療介入が可能となり、より適切な尿路上皮癌のマネジメントを可能にする学術的にも社会的にも意義が高い研究である。

研究成果の概要（英文）：Diagnosis of upper tract urothelial carcinoma (bladder and renal pelvis/ureteral carcinoma) is performed by urine cytology, imaging, invasive cystoscopy, and ureteroscopic, but both sensitivity and specificity are not sufficient and there is no minimally invasive and effective biomarker. In this study, we quantified 26 N-type glycans of immunoglobulin (Ig) fractions using a capillary electrophoresis rapid glycan analyzer and constructed a diagnosis or recurrence prediction score of upper tract urothelial carcinoma by comprehensive pathway analysis using an AI data robot. Retrospective analysis showed that the AUC of constructed diagnostic score was more than 0.95 and the recurrence prediction score was more than 0.78, showing higher accuracy than conventional markers. The usefulness of this diagnostic and recurrence score is currently under prospective investigation.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿路上皮癌 イムノグロブリン N型糖鎖 糖鎖変異

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

尿路上皮癌(膀胱癌および腎盂・尿管癌)診断において、尿細胞診は中核となる診断法の一つであるが、その感度は低く、進行度との相関関係も低いとされている。近年、CTurographyが尿路上皮癌診断の第一選択とされているが、CISや小径腫瘤では偽陰性の危険性が高い。また、膀胱鏡・尿管鏡検査も癌の検出、確定診断に有用であるが、侵襲を伴う膀胱鏡・尿管鏡下腫瘍生検の癌確定における陽性的中率は決して高いものではない。さらに尿路上皮癌のうち腎盂・尿管癌では、約60%が発見段階で、局所進行性もしくは転移性であることが多く、予後不良の疾患であり、既存検査の診断精度を凌駕する低侵襲診断バイオマーカーにより、膀胱癌あるいは腎盂・尿管癌の早期診断が可能かを明らかにすることは解決すべき極めて重要な課題であると考えられる。近年、抗体の糖鎖品質管理に使用されるキャピラリー電気泳動型N型糖鎖解析装置が実用化され、Ig N型糖鎖を測定時間2分/検体と短時間で、網羅的に解析することが可能となった。血漿検体の処理時間は、2時間程度であり、処理時間を含めても2時間強でIg糖鎖変異を定量可能になったことから、臨床応用への道が開けた。申請者は、予備解析として、膀胱癌患者176例、腎盂・尿管癌患者104例、尿路感染症患者21例および健常者104例の血漿IgのN型糖鎖をキャピラリー電気泳動法にて解析した。その結果、先行研究で同定された5種の糖鎖を含む26種類のN型糖鎖が同定された。判別分析により、膀胱癌あるいは、腎盂・尿管癌の検出に寄与するIg N型糖鎖濃度に重み付けして、それぞれ膀胱癌スコア、腎盂・尿管癌スコアを算出した。膀胱癌検出に関する膀胱癌スコアのAUCは0.9791および腎盂・尿管癌患者検出に関する腎盂・尿管癌スコアのAUCは0.8307であり、いずれのスコアも尿細胞診所見および肉眼的血尿所見のAUCよりも有意に鑑別精度が優れていた。さらに両スコアを組み合わせることで尿路上皮癌のうち、膀胱癌と腎盂・尿管癌を鑑別可能であることが示され、キャピラリー電気泳動による糖鎖解析法が膀胱癌と腎盂・尿管癌を含む尿路上皮癌診断バイオマーカーに有望であると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、Ig N型糖鎖を短時間で、網羅的に解析可能なキャピラリー電気泳動装置を用いて尿路上皮癌の新規糖鎖診断マーカーの臨床応用を目指す。質量分析法と比較して、測定コストが1/10程度であり、短時間で26種類の糖鎖が定量可能であることから汎用性が高い。臨床応用に向けたデータの蓄積が重要と考えられる。尿路上皮癌の診断マーカーとしてIgの糖鎖変異に注目した研究は我々の研究グループ以外、ほとんど報告されていないため、申請者の研究チームがPriorityを有する独創的な研究である。尿細胞診、肉眼的血尿所見を凌駕する低侵襲な尿路上皮癌診断マーカーの実用化は尿路上皮癌、特に進行状態で発見される腎盂・尿管癌の早期発見に寄与し、治療効果向上のみならず不必要な侵襲的検査の減少につながる可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### 令和2年度の計画

#### I. キャピラリー電気泳動 Ig N型糖鎖解析による尿路上皮癌診断マーカーの有用性の解明

弘前大学泌尿器科にて保存されている膀胱癌、腎盂・尿管癌、尿路感染症、健常血漿試料および他の癌患者血漿(各100検体以上)のキャピラリー電気泳動Ig N型糖鎖解析を実施する。得られた26種類のIg N型糖鎖定量データから、予備解析で得られた診断スコアを算出し、膀胱癌、腎盂・尿管癌の鑑別に関する有用性をROC解析、Decision Curve解析、ロジスティック解析にて検討し、腎盂・尿管癌診断能を尿細胞診所見および肉眼的血尿所見を含む既存診断モデルと比較する。さらに得られた26種類のN型糖鎖濃度の変化をシアリル化、フコシル化、バイセクト型、2分岐、3分岐、4分岐など各糖鎖合成経路を加味した網羅的パスイ解析を実施し、膀胱癌患者、腎盂・尿管癌患者において、亢進、抑制されている合成経路を同定し、それらの合成に關与する糖転移酵素の発現と膀胱癌あるいは、腎盂・尿管癌の発がん、悪性化との関連についてin silico解析を実施する。

#### II. キャピラリー電気泳動 Ig N型糖鎖解析による尿路上皮癌の再発・予後予測マーカーの有用性の解明

弘前大学泌尿器科にて保存されている膀胱癌、腎盂・尿管癌血漿試料(各100検体以上)のキャピラリー電気泳動Ig N型糖鎖解析を実施する。得られたデータから、ROC解析、Decision Curve解析、Cox比例ハザード解析にて、膀胱癌、腎盂・尿管癌の再発や予後に最も関連する糖鎖候補を検討する。26種類のN型糖鎖構造を定量可能なため、解析結果から、単一の糖鎖構造で再発・予後予測マーカーの同定が困難な場合には、判別分析を行い、複数の糖鎖構造を組み合わせたスコア化による予後予測マーカーの検討を行う。

#### 令和3年度以降の計画

前年度までに確立した診断あるいは、再発・予後予測に関連した糖鎖マーカーについて、膀胱

癌あるいは、腎盂・尿管癌が疑われ、採血、尿細胞診および尿管鏡検査を実施予定の患者で本研究に同意が得られた患者で前向き臨床性能試験を実施し、後ろ向き試験の Validation を行う。

#### 4. 研究成果

キャピラリー電気泳動 Ig N 型糖鎖解析による尿路上皮癌診断マーカーの有用性および尿路上皮癌の再発・予後予測マーカーの有用性の解明の解明

弘前大学泌尿器科にて保存されている膀胱癌、腎盂・尿管癌、尿路感染症、健常血漿試料および他の癌患者血漿（各 100 検体以上 合計 1312 例）のキャピラリー電気泳動 Ig N 型糖鎖解析を実施した。1312 例の患者背景を表 1 に示す。

表 1. 1312 例の患者背景

	Total	HSPC	CRPC	RCC	BCa	UTUC	GCT	BPH	US	UTI	HV	P
HV :健常	n = 1,312	234	94	100	176	105	73	95	145	21	269	-
UTI :尿路感染症	Age, yrs (IQR)	74 (67,78)	74 (64,78)	67 (59,77)	70 (62,75)	72 (63,76)	38 (25,45)	67 (61,71)	79 (69,87)	76 (63,90)	29 (23,65)	*
US :UTIに伴う重症敗血症	Gender n, m/f	234/0	94/0	64/36	147/29	69/36	73/0	95/0	60/85	12/9	173/96	*
BPH :前立腺肥大症	Urine cytology Class<IV/≥IV /NA	-	-	-	100/64/12	46/44/12	-	-	-	-	-	-
GCT :精巣腫瘍	tPSA, ng/mL (median, IQR)	1.00 (0.04-6.21)	-	-	-	-	-	5.8 (4.74-7.18)	-	-	-	*
UTUC :上部尿路上皮癌	wADT /woADT, n	107 /127	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BCa :膀胱癌	SGCT /NSGCT, n	-	-	-	-	-	36/37	-	-	-	-	-
RCC :腎細胞癌	Pathological T stage, n (%)											
HSPC :ホルモン感受性前立腺癌	Ta, Tis	-	-	0 (0)	0 (0)	6 (6)	-	-	-	-	-	-
CRPC :去勢抵抗性前立腺癌	T1	-	-	66 (66)	108 (61)	21 (20)	-	-	-	-	-	-
	T2	-	-	10 (10)	27 (15)	14 (13)	-	-	-	-	-	-
	T3	-	-	17 (17)	30 (17)	44 (42)	-	-	-	-	-	-
	T4	-	-	3 (3)	11 (6)	3 (3)	-	-	-	-	-	-
	N/A	-	-	4 (4)	0 (0)	16 (15)	-	-	-	-	-	-

1312 例の血漿から Ig 分画の 26 種の N-glycan をキャピラリー電気泳動システム Gly-Q により定量した結果を図 1 に示す。

Figure 3

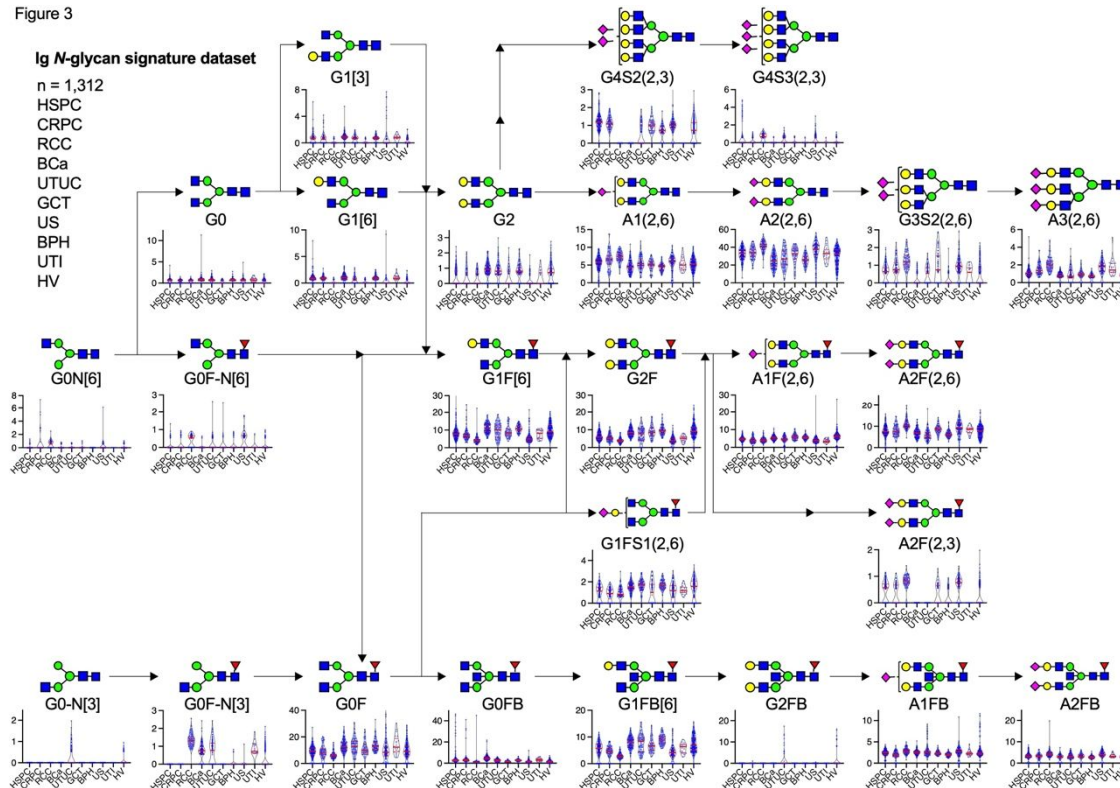


図 1 各疾患における Ig 分画の 26 種の N-glycan 濃度と合成経路

得られた 26 種類の Ig N 型糖鎖定量データから、AI データロボットにより、26 種類の N 型糖鎖濃度の変化を各糖鎖合成経路を加味した網羅的パスウェイ解析を実施し、上部尿路上皮癌の診断には、図 2 の青で示した 2 分岐シアリル化糖鎖が関与することが示唆され、再発では、図の赤で示したバイセクト型糖鎖合成経路が関与することが示唆された。（図 2）

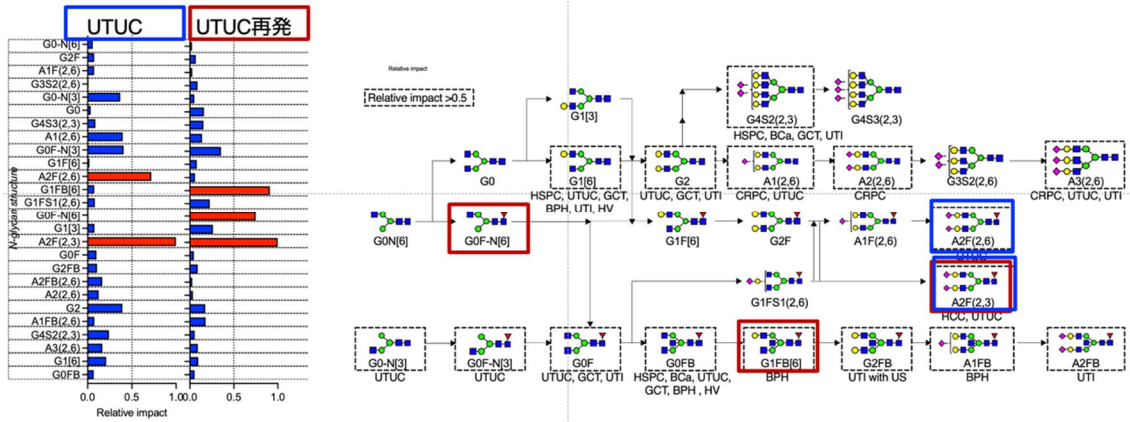


図2 尿路上皮癌の診断および再発予測に関する糖鎖

さらに AI データロボットで構築した診断アルゴリズムにより、血漿の 26 種類の N 型糖鎖濃度のみで高い精度で予測できる腎盂・尿管癌の鑑別に特異的診断スコア構築した。(図3)

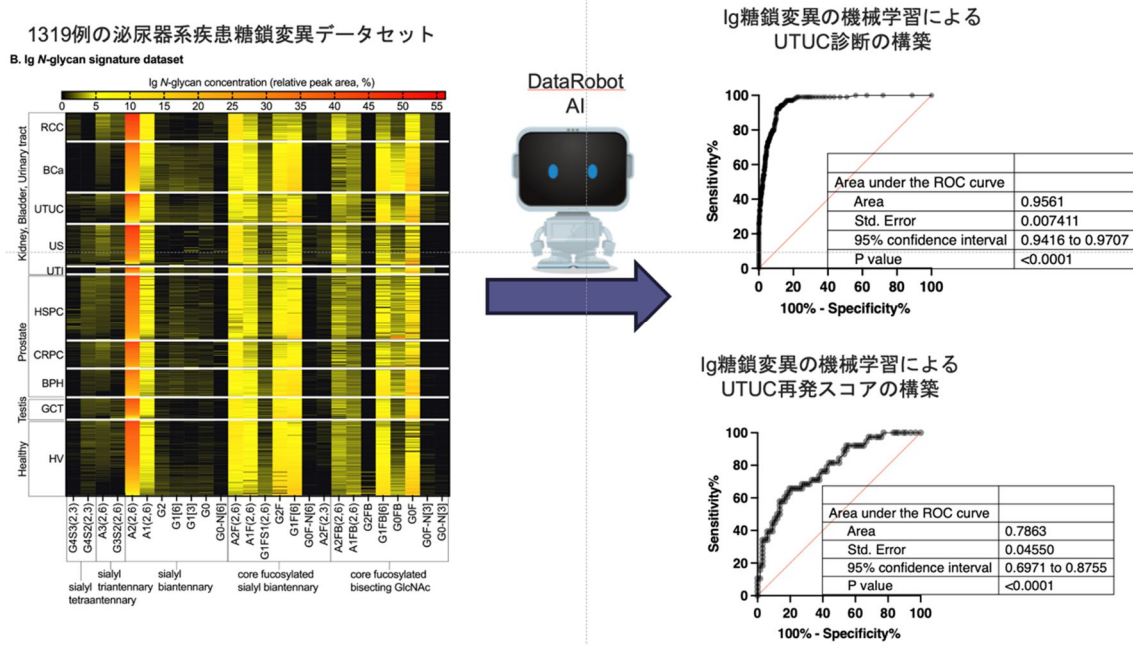


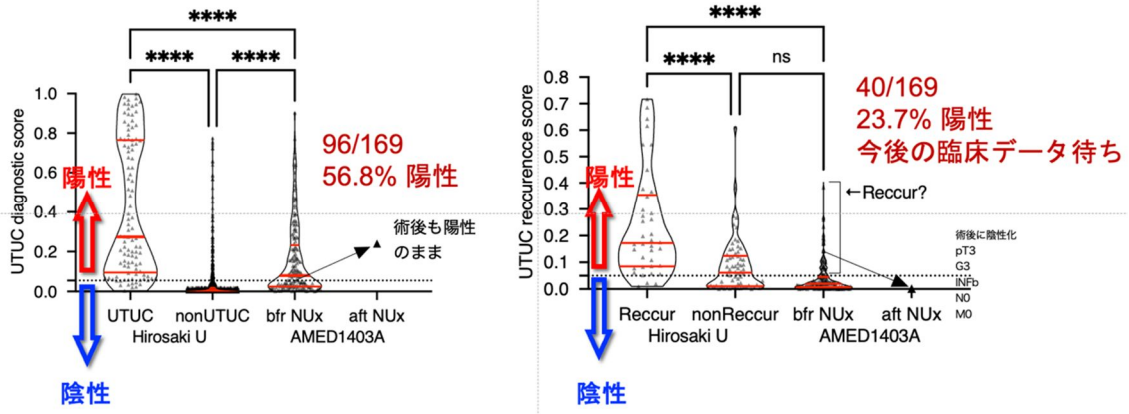
図3に示すように、上部尿路上皮癌の診断に関する AUC は、0.9561 であり、再発に関する AUC は、0.7863 であり、いずれも高い精度で予測できることが示唆された。

令和3年度以降の計画について

前年度までに確立した診断あるいは、再発・予後予測に関連した糖鎖マーカーについて、膀胱癌あるいは、腎盂・尿管癌が疑われ、採血、尿細胞診および尿管鏡検査を実施予定の患者で本研究に同意が得られた患者で前向き臨床性能試験を実施し、後ろ向き試験の Validation を行う。

AI データロボットにより構築した尿路上皮癌診断および再発予測アルゴリズムの Validation 実施するため、Jcog1403 試験に登録された上部尿路上皮癌に対して腎盂尿管全摘を実施した 172 例の術前血漿の Ig 分画の 26 種類の N 型解析を実施した。得られた Ig 分画の 26 種類の N 型糖鎖濃度を前年度に構築した診断アルゴリズムおよび再発アルゴリズムに入力し、各診断スコアおよび再発予測スコアを算出した。(図4)

その結果、術前の血漿の IgN 型糖鎖解析において診断スコアは、56.9%が上部尿路上皮癌診断陽性と判定され、AUC は、0.8462 と比較的高い精度で上部尿路上皮癌を検出できる可能性が示唆された。一方、再発予測スコアは、腎盂尿管全摘術後の最終予後データの解析完了を待っている状態だが、現時点で 23.7%が陽性と判定されており、今後、Jcog1403 試験の最終予後データと照らし合わせ、再発予測に有用か否かについて検討を進める予定である。



ROC curve: ROC of 診断スコア

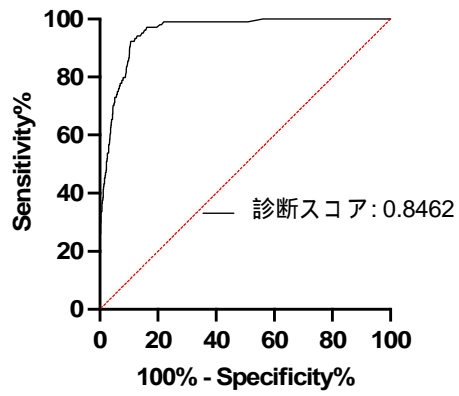


図4. Jcog1403 試験に登録された 172 例の血漿検体における診断および再発スコアの前向き試験

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Iwamura H, Mizuno K, Akamatsu S, Hatakeyama S, Tobisawa Y, Narita S, Narita T, Yamashita S, Kawamura S, Sakurai T, Fujita N, Kodama H, Noro D, Kakizaki I, Nakaji S, Itoh K, Tsuchiya N, Ito A, Habuchi T, Ohyama C, Yoneyama T	4. 巻 113
2. 論文標題 Machine learning diagnosis by immunoglobulin N-glycan signatures for precision diagnosis of urological diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2434-2445
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15395	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 Okuyama Yoshiharu, Hatakeyama Shingo, Tabata Ryuji, Fujimori Daiji, Kawashima Yohei, Tanaka Toshikazu, Fujita Naoki, Okamoto Teppei, Mori Kazuyuki, Yamamoto Hayato, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Matsuoka Toshimitsu, Sato Satoshi, Ohyama Chikara	4. 巻 30
2. 論文標題 Impact of nephroureterectomy on postoperative renal function in upper tract urothelial carcinoma: A multicenter retrospective study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 649 ~ 657
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iju.15192	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米山 徹, 岩村 大径, 水野 桂, 藤田 尚紀, 田中 壽和, 畠山 真吾, 赤松 秀輔, 柿崎 育子, 大山 力
2. 発表標題 血清免疫グロブリン分画のN-glycanプロファイルを基盤とした機械学習アプローチによる泌尿器疾患診断モデルの開発
3. 学会等名 第17回 糖鎖研究会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------