

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592350

研究課題名(和文) がん特異的な糖鎖修飾ペプチド抗体を用いた前立腺がんの早期診断法

研究課題名(英文) Early diagnosis of prostate cancer using cancer-specific the glycosylated peptide antibody

研究代表者

藤村 務 (Fujimura, Tsutomu)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70245778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：[目的]悪性前立腺がん患者由来の血清中からがん特異的な糖鎖修飾を受けたハプトグロビンを見出した。がん患者血清由来ハプトグロビンから糖鎖修飾ペプチドを精製し抗体を作製する。がん特異的な糖鎖修飾抗体の特異性を検討し、PSA値を補完する前立腺がんの早期診断法を目指した。

[結果]作製した糖鎖抗体は悪性前立腺がん患者と健常人、良性疾患患者と悪性前立腺がん患者を区別することが可能であった。また、抗体の特異性も確認でき十分な感度も得られた。今回作製したELISA法(プロトタイプ)はPSA値の欠点を補完できる可能性を示した。更に検体数を増やし早期診断法への精度を高めたい。

研究成果の概要(英文)：[Purpose] I found haptoglobin who received sugar chain modification cancer-specific from malignant prostate cancer patients serum. The antibody was produced to antigen glycosylated peptide from a cancer patient serum-derived haptoglobin. I aimed at the early diagnosis of prostate cancer. [Result] Antibody produced was possible to distinguish healthy control and malignant prostate cancer patients. To also distinguish between malignant prostate cancer and benign disease patients was also possible. The prototype that can be measured by ELISA was able to sufficient sensitivity is obtained. It was detectable the number ng/ml sugar chain haptoglobin in serum. I was able to produce ELISA to make up for the shortcomings of PSA levels. Furthermore, we want to raise the accuracy of the early diagnosis method by increase the number of samples.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：悪性前立腺がん ハプトグロビン 糖鎖修飾ペプチド ペプチド抗体 がん特異的抗体 シアル酸化
フコシル化 ELISA

1. 研究開始当初の背景

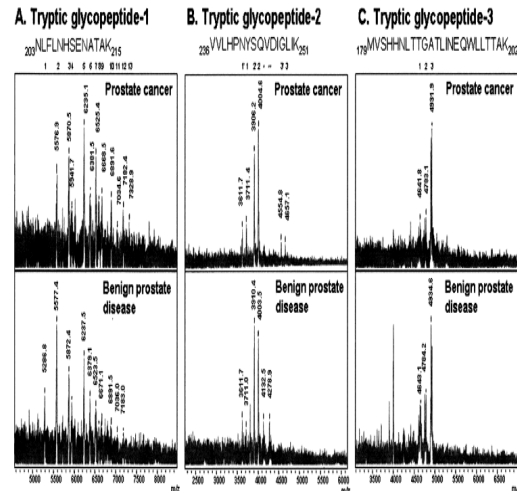
男性における前立腺がんは高齢化や食生活の欧米化等に伴い急増しているがんであり、初期症状がほとんどないため、転移を伴う進行がんの状態で見られることが多い。将来はがん死亡原因の上位になると予想されており早期発見の重要性が高まっている。従来、前立腺がんの早期診断マーカーとしては PSA が知られている。しかし、PSA は前立腺がんだけでなく良性前立腺疾患においても上昇し、特異性に欠ける。順天堂病院において検査を実施したところ Gleason Score 4+4 においてもグレーゾーン(4-10ng/ml)値を有するがん患者は 25%以上存在していた。また、良性前立腺疾患の 68%はグレーゾーン値を示していた。従ってがんの確定診断は患者への負担が大きい針生検に依存しているのが現状である。この問題を克服し PSA 値を補完する簡便で低侵襲ながん診断法の確立が患者の救済と医療費負担の両面で大きく貢献することになる。がんなどの疾患を反映した糖転移酵素の発現に由来する血清糖蛋白質の糖鎖修飾変化が各種がんでは報告されている。先の研究で私は、健常人、良性前立腺疾患よりも悪性前立腺がん患者血清中にハプトグロビン上昇に加え糖鎖修飾の割合が著しく上昇していることを見出した(表 1、図 1)その後、詳細な糖鎖修飾の解析を行った結果、3種類の糖鎖修飾ペプチドを確認した。特に糖鎖修飾ペプチド-1(Glycopeptide -1)においてがん特異的な糖鎖修飾の増加が見られた。

(表 1) ウエスタンブロットによる血清中ハプトグロビンの定量

	n	mean ± SD	Significance of difference
β-chain			
Normal	9	8049 ± 2063	p < 0.01
Benign prostate	9	6866 ± 1647	
Prostate cancer	12	13462 ± 1487	
α2-chain			
Normal	9	8108 ± 2767	p < 0.01
Benign prostate	9	7673 ± 1825	
Prostate cancer	12	13084 ± 3064	

健常人、良性前立腺疾患よりも悪性前立腺がん患者血清中のハプトグロビンが上昇していた。

(図 1)ハプトグロビン 鎖の糖鎖解析



Glycopeptide-1 が悪性前立腺がん患者で増加していた。そこで、がん患者血清由来ハプトグロビン糖鎖修飾ペプチドを抗原に抗体を作製し、がん特異的な糖鎖修飾抗体を作製することにより、PSA 値を補完する簡便で低侵襲ながん診断法 (ELISA 法) の確立を目指した。

2. 研究の目的

私は、悪性前立腺がん患者由来の血清中からがん特異的な糖鎖修飾を受けたハプトグロビンを見出した。糖鎖解析によりハプトグロビン 鎖のアミノ酸残基 Asn207、211 に多岐化、シアル酸化、フコシル化などがん化による特異的な糖鎖の増加 (異常) が認められた。そこで、がん患者および健常人血清由来ハプトグロビンから糖鎖修飾ペプチドを精製し (ハプトグロビン 鎖 203 から 215 残基) それぞれを抗原に抗体を作製する。がん特異的な糖鎖修飾抗体の特異性を検討し、PSA 値を補完する ELISA 法の確立を目指した。

3. 研究の方法

血清からハプトグロビンを精製する。具体

的には、悪性前立腺がん患者(49人)、健常人(11人)、良性前立腺疾患(64人)由来血清をヘモグロビンアフィニティーカラムにかけてハプトグロビンを精製し、還元アルキル化後、ゲル濾過にてハプトグロビン鎖を単離する。単離したハプトグロビン鎖をトリプシン消化後、Sephrose CL4Bを用いる和田らの方法に従って Glycopeptide-1,2,3 を分離精製する。

分離精製した Glycopeptide-1,2,3 を抗原にしてウサギ或いはマウスに免疫を行い抗体を作製する。作製した抗体の特異性の評価を一次スクリーニングとして、悪性前立腺がん患者、健常人、良性前立腺疾患由来の血清を用いてウエスタンブロットを行う。がん患者、健常人、良性疾患由来のハプトグロビン鎖に対する反応性からがん患者由来の Glycopeptide-1,2,3 抗体の特異性の評価を行う。さらに、Gleason Score (がんの悪性度の指標)との相関関係も評価する。ダイレクトあるいはサンドイッチ ELISA 法により健常人と比較してがん患者に対する特異性と感度の評価を行う。

4. 研究成果

(1) 平成23年度

a) 悪性前立腺がん患者、健常人由来の血清からハプトグロビン鎖を単離した。単離したハプトグロビン鎖をトリプシン消化後、Sephrose CL4Bを用い Glycopeptide-1,2,3 を分離精製した。抗体を作製するのに必要な Glycopeptide の量を得るのに予定よりも時間を要した。

b) Glycopeptide 抗体の作製

精製した抗原 Glycopeptide をキャリア担体に結合させた。ウサギへの免疫キャリア担体に結合させたペプチド 50ug/100ul を Freund's complete adjuvant 100ul と混ぜてエマルジョン化しウサギ背皮下数か所に注入した。追加免疫は同量の抗原と

incomplete Freund's adjuvant を用いて2週間(3~4回)ごとに行った。最後の免疫から10日後に耳静脈より採決し血清を分離した。ELISA あるいはウエスタンブロットで抗体の確認。血清を硫酸分画後、プロテイン A/G アフィニティーカラムにて IgG を精製した。ウエスタンブロット等で抗体の特異性を評価したところ悪性前立腺がん患者血清に強い反応性を示した。

マウスへの免疫

ウサギの時と同じ抗原をマウスの腹腔内に注射した。追加免疫は同量の抗原と incomplete Freund's adjuvant を用いて2週間(3~4回)ごとに行った。試験採血、ELISA あるいはウエスタンブロットで抗体の確認。血清を硫酸分画後、プロテイン A/G カラムにて IgG を精製した。ウエスタンブロット等で抗体の特異性を評価したところ悪性前立腺がん患者血清に強い反応性を示したが、ウサギの抗体よりも感度が得られなかった。

(2) 平成24年度

Glycopeptide 抗体の評価

a) ウサギで作製した抗体の評価：前年度に作成した抗体の特異性と感度を評価した。ウエスタンブロット法で評価した結果、悪性前立腺がん患者と健常人を優位に区別することが可能であった。しかし、良性前立腺疾患の患者と悪性前立腺がん患者の間では不十分であった。原因として、作製した抗体の精製が不十分であったため、血清中に非特異的に反応するタンパク質が存在した。抗体の精製度を上げるために、プロテイン A/G アフィニティーカラムで精製した後イオン交換クロマトグラフィーを行い、更に、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。その結果、良性前立腺疾患血清中に対する非特異的な反応が減少した。また、数十 ug の血清由来糖鎖ハプトグロビンを検出可能であることから、

十分な感度が得られた。ELISA 法に用いるために、抗体の濃度、ビーズの種類、ブロッキング緩衝液、洗浄液、反応温度、時間等のプロトコルや反応条件を検討した。

b) マウスで作製した抗体の評価: ウェスタンブロット法で評価した結果、特異性は、ウサギの抗体より高い傾向を示したが、感度が不十分であった。ELISA 法で測定可能なプロトコルや反応条件を検討した。

最終的には、それぞれの抗体（ウサギ或いはマウス）で ELISA 法を構築するのではなく、特異性の高いマウス抗体をキャプチャー抗体にし、感度の高いウサギ抗体を検出用の抗体に用いる方法がベストである結論に至った。ELISA 法を構築する上でより有効で、実用的な方法を 25 年度で、更なる検討を重ねた。

(3) 平成25年度

糖鎖修飾ペプチド抗体の評価: 「ウサギおよびマウスで作製した抗体の評価」ウェスタンブロット法で評価した結果、ウサギおよびマウスで作製した抗体は悪性前立腺がん患者と健常人を優位に区別することが可能であった。また、良性疾患患者と悪性前立腺がん患者の間でも区別することが可能であった。ウサギで作製した抗体は感度が高く、マウスで作成した抗体は特異性が高かった。結果的にマウスで作製した抗体をキャプチャー抗体として、ウサギで作製した抗体を検出用抗体に用いてサンドイッチ ELISA 法の構築を行った。マルチプレックス蛍光ビーズにマウス抗体をアミンカップリング（キャプチャー抗体）させたビーズを作製した。このビーズに健常人、良性前立腺疾患及び悪性前立腺がん患者血清を 4 μ l、一晩反応させた。その後ビオチン化したウサギ抗体を室温、1 時間反応させた後ストレプトアビジン フィコエリスリン（蛍光発色団）にてハプトグロビン糖鎖修飾ペプチドを検出した。この

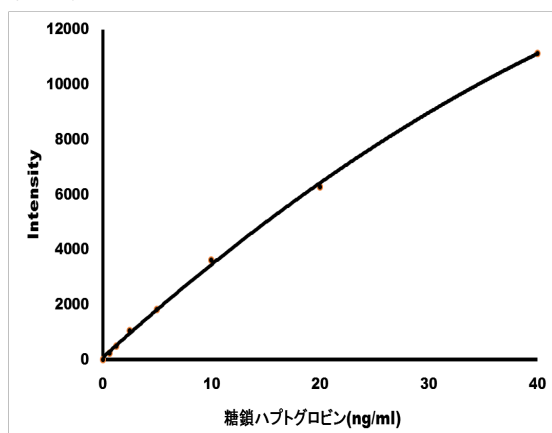
がん患者由来ハプトグロビン糖鎖修飾ペプチド抗体は多岐化、シアル酸化、フコシル化などがん化による特異的な糖鎖構造の増加を検出した。この結果は、現在、PSA 値による疑陽性の問題及び針生検に依存している現状の確定診断及を克服、補完する簡便で低侵襲ながん診断法の可能を示した。最終的に数 ng/ml の検出感度があった。

[結論]

悪性前立腺がん患者、健常人由来の血清からハプトグロビン糖鎖を精製し、目的の抗原糖鎖修飾ペプチドを精製できた。これらを抗原に作製した抗体は悪性前立腺がん患者と健常人を優位に区別することが可能であった。また、良性疾患患者と悪性前立腺がん患者の間でも区別することも可能であり、抗体の特異性が確認できた。血清中の糖鎖修飾ハプトグロビンをキャプチャー抗体（特異性の高いマウス抗体）- 検出用抗体（感度の高いウサギの抗体）とする二段階方法が最良である結論に至った。ELISA 法を構築する上でより高特異性、高感度で、実用的な方法を探り検討を重ねた。その結果、数 ng/ml で検出可能で、十分な感度も得られた ELISA 法が作製できた（プロトタイプ、図 2）。従来の前立腺がんの診断マーカーとして用いられている PSA 値の欠点である グレーゾーン（4-10ng/ml）値を有するがん患者が存在。PSA 値が 10ng/ml 以上である良性疾患患者が存在。今回作製したプロトタイプの ELISA 法はこれらの欠点を補完できる可能性を示した。悪性前立腺がん患者と健常人の区別はもちろんのこと良性疾患患者と悪性前立腺がん患者を区別することへの期待が持てる。これにより、針生検を必要としない高感度、高精度な診断法を目指し、患者への身体的負担と医療経済的負担の軽減を図り、前立腺がんの早期診断、治療、予後経過に役立てたい。更に検体数を増やし早期診断法への精度

を高め、患者への負担を軽減したい。

(図2) ELISAによる血中糖鎖ハプトグロビン量



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Ogawa Y, Sugawara S, Fujimura T, Kanaly RA, Kawsar SM, Ozeki Y, et al. Sialyl-glycoconjugates in cholesterol-rich microdomains of P388 cells are the triggers for apoptosis induced by *Rana catesbeiana* oocyte ribonuclease. *Glycoconj J*. 2014, 31,171-84
doi: 10.1007/s10719-013-9513-7.

Hayashi T, Saito T, Fujimura T, Kazuno S, Oh S, Ueno T, Suzuki K, Yao T, et al. Galectin-4, a novel predictor for lymph node metastasis in lung adenocarcinoma. *PLOS ONE*. 2013, 10, 8(12):e81883.
doi: 10.1371/journal.pone.0081883.

Ouchi T, Tomita T, Horie A, Yoshida A, Taka H, Fujimura T, Kosono S, Nishiyama C, Masui R, Kuramitsu S, Albers SV, Nishiyama M. et al. Lysine and arginine biosyntheses mediated by a common carrier protein in *Sulfolobus*. *Nat Chem Biol*. 94, 2013,277-283
doi: 10.1038/nchembio.1200.

Ito M, Kajino K, Abe M, Fujimura T, Mineki R, Ikegami T, Ishikawa T, Hino O. et al. NP-1250, an

ABCG2 inhibitor, induces apoptotic cell death in mitoxantrone-resistant breast carcinoma MCF7 cells via a caspase-independent pathway. *Oncol Rep*. 29, 2013, 1492-1500

doi: 10.3892/or.2013.2249.

Nara T, Hashimoto M, Fujimura T, Taka H, Kita K, Aoki T, et al. Molecular interaction of the first 3 enzymes of the de novo pyrimidine biosynthetic pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun*. 418, 2012, 140-143

doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.148.

Kazuno S, Fujimura T, Arai T, Ueno T, Nagao K, Fujime M, Murayama K. Multi-sequential SPR-analysis of haptoglobin-lectin complex in sera of patients with malignant and benign prostate diseases. *Anal Biochem*. 419, 2011, 241-249

doi: 10.1016/j.ab.2011.08.029.

Ezaki J, Komatsu M, Takahashi K, Fujimura T, Tanaka K, Kominami E, Ueno T, et al. Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels.

Autophagy. 7, 2011, 727-736

[学会発表](計10件)

Metabolic shift in hypoxia-adapted CML cells and mechanisms of acquired dasatinib resistance uncovered by proteomic iTRAQ profiling. 第55回アメリカ血液学会、米国、2013年12月
呼気中のがんマーカーの探索、第1回がん代謝研究会、山形県鶴岡市、2013年10月
Search for new urothelial cancer biomarkers. 12th, HUPO World Congress、パシフィコ横浜、2013年9月

Oligosaccharide structure analysis of Acute Phase Protein in the serum of the prostate

cancer patient. 12th、HUPO World Congress、
パシフィコ横浜、2013年9月

前立腺がん患者血清中の IgG の糖鎖構造
解析、第86回日本生化学会大会、パシフ
ィコ横浜、2013年9月

Analysis of Dasatinib-Induced Molecular
Mechanisms of Apoptosis in
Hypoxia-Adopted CML Cells Utilizing
Quantitative Proteomics Technology.

第54回アメリカ血液学会、米国、2012
年12月

白血病細胞のメタボロミクス解析、第85
回日本生化学会大会、福岡県福岡市、2012
年10月

尿路上皮がんにおける新規バイオマーカ
ーの探索、第85回日本生化学会大会、福
岡県福岡市、2012年10月

リンパ系腫瘍細胞のメタボロミクス解析、
第7回メタボロームシンポジウム、
山形県鶴岡市、2012年10月

前立腺癌患者血清に含まれる Acute Phase
Protein の糖鎖構造解析、第84回日本生
化学会大会、京都、2011年9月

〔図書〕(計1件)

富野康日己、藤村 務 他、中外医学社、
臓病実験法ハンドブック、2013、168

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.juntendo.ac.jp/graduate/labo
ratory/labo/seitai_bunshi/k3.html](http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/seitai_bunshi/k3.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 務 (FUJIMURA, Tsutomu)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)

准教授

研究者番号：70245778