

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659618

研究課題名(和文) N型糖鎖を用いた臓器特異的癌腫瘍マーカーの開発

研究課題名(英文) Search of organ specific tumor makers by N-glycan expression

研究代表者

夏越 祥次 (NATSUGOE, SHOJI)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70237577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：健常者11検体と食道癌患者63検体をGlycoModを用いて糖鎖構造の中から18糖鎖を選択した。これらの18糖鎖による多変量解析を行い、有意差が認められた糖鎖を4つ抽出した。このうち3つは、過去に行ったMALDI-TOF-MSで抽出された糖鎖構造と一致し、新たに1つの糖鎖が発見された。これらの糖鎖は食道癌に特異的で精度の高い糖鎖マーカーとして利用できると考えられた。また、健常者群と膵臓癌患者群間で、両者の層別化が可能な発現糖鎖が9つ抽出可能であった。4個の候補糖鎖で有意差が認められ、再現性が確認された。膵臓癌に特異的な糖鎖マーカーとしてさらに症例を増やして検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the serum N-glycan by Profiling Solution in 63 esophageal cancer patients and 11 healthy volunteers. We selected 18 N-glycan by GlycoMod method. When performing by multivariate analysis in these N-glycan, 4 glycan had a significant difference. Three of these four N-glycan was in accord with structure of N-glycan which was previously extracted by MALDI-TOF-MS method. Thus new one N-glycan was found. These N-glycans are useful markers to detect esophageal cancer.

In pancreas cancer, we found 9 N-glycans which was stratified between esophageal cancer patients and healthy volunteers. In four of these 9 N-Glycans, significant difference was identified. We should collect many cases and analyze the useful markers for detection of pancreas cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：消化器癌 N結合型糖鎖 食道癌 膵臓癌

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに胃癌,食道癌,膵臓癌で術中に血中遊離癌細胞が高頻度に存在し,再発と親密な関係があることを報告してきた (Am J Surg 177:475,1999,Ann Surg 233:189,2001,Ann Surg Oncol 9:364,2002, Surgery 133:162,2003, Clin Cancer Res 10:3807,2004 など). また外来 follow-up 中に血中に遊離癌細胞は有用なマーカーであるが,腫瘍上皮を認識しており,各臓器の癌に特有ではない. さらに他の上皮の contamination や psuedogene の発現で false positive の結果が懸念される. したがって, 今後は各臓器の特有な腫瘍マーカーの開発が急務と考え,血液サンプルに含まれる糖タンパク質の糖鎖との関連の着想に至った.

2. 研究の目的

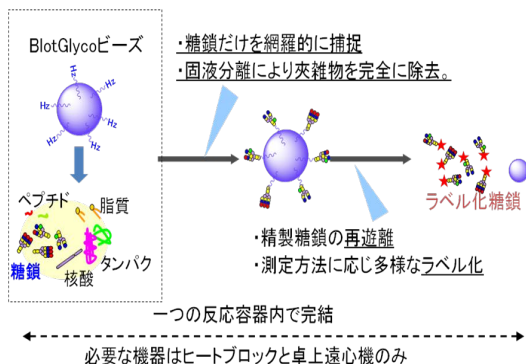
本研究は,これまで申請者が研究してきた「糖鎖はがん化に伴い糖鎖構造が変化し,血漿中の糖鎖を腫瘍マーカーとして臨床応用できる」という知見から,「各臓器で血漿中の臓器特異度が高い糖鎖マーカーの測定により早期癌の発見,再発の早期予測が可能となる」という仮説をたてた. これまでの申請者らの実績と手技を応用して,高い精度で本仮説を検証するものである. 本研究では「N型結合型糖鎖を利用した消化器癌の新規腫瘍マーカーの開発」を中心に臨床応用可能にすることを目的とする. これが明らかとなれば,予防医学の境界領域の新たな分野が開発され,消化器癌の早期発見と早期治療が期待出来る.

3. 研究の方法

現在は次世代ポストゲノム研究の時代に入り,糖鎖,糖蛋白,糖脂質の構造・機能解析が行われている. 申請者らはヒドラジド基 (NHNH<sub>2</sub>) 高密度含有ポリマー微粒子である BlotGlyco を用いて,糖鎖を効率よく捕捉回収する方法を行った. BlotGlyco は 1mg のビーズ当たり 1 μmol 異常であり,1 測定に用いるビーズ量は 5mg である. 通常のヒドラジド基含有ビーズと比べ,数 10 倍の官能基密度を有するため,糖鎖を効率良く捕捉回収可能である. (図 1)

図 1

◇BlotGlycoによる糖鎖精製スキーム



血清をトリプシン処理し,糖鎖遊離酵素で処理する. BlotGlyco により,糖鎖を精製した. 糖鎖の解析は,下記の 2 方法で行った.

MALDI-TOF MS により,糖鎖を分析する.

LCMS-IT-TOF 測定(島津製作所)を用いて, Profiling Solution (データ抽出ソフト) による網羅的な観測イオンの抽出を行い,マン・ホイットニーの U 検定によるマーカー候補の探索を行った.

今回,食道癌患者と膵臓癌患者を対象として血清中の糖鎖の網羅的解析を行った. 同意の得られた食道癌患者 71 例,膵臓癌患者 17 例であり,コントロールとして健常者 11 例を用いた. 食道癌患者での糖鎖解析は上述の

MALDI-TOF MS の方法と LCMS-IT-TOF の方法の両者でおこなった. 膵臓癌患者は MALDI-TOF MS の方法で行った.

4. 研究成果

これまでに食道癌患者血清(37 検体)と健常者血清(11 検体)に含まれる糖鎖を BlotGlyco を用いて精製・ラベル化し, MALDI-TOF-MS で測定・解析した. その結果,6 個の糖鎖が候補として挙げられた.

この 6 糖鎖を利用し,健常者と食道癌患者の半数症例との間で判別モデルを構築し,残り半分の食道癌患者で判別可能かを検証した(図 2).

図 2 食道癌例の判別モデル

ID	C	NE
C-1	1.04792	-0.0479221
C-2	0.891363	0.108637
C-3	1.1708	-0.170798
C-4	0.831936	0.168064
C-5	0.933749	0.0662509
C-6	0.854898	0.145102
C-7	0.581725	0.418275
C-8	1.04697	-0.0469689
C-9	0.731799	0.268201
C-10	0.78594	0.21406
C-11	0.661107	0.338893
NE-1	0.136873	0.863127
NE-2	0.0324084	0.967592
NE-3	0.0725845	0.927415
NE-4	-0.322246	1.32225
NE-5	0.0428761	0.957124
NE-6	0.226762	0.773238
NE-8	-0.0641614	1.06416
NE-9	0.0939843	0.906016
NE-10	0.297709	0.702291
NE-11	0.0623523	0.937648
NE-12	0.268911	0.731089
NE-13	0.684778	0.315222
NE-14	-0.030421	1.03042
NE-16	0.204086	0.795914
NE-17	0.0882622	0.911738
NE-18	-0.104786	1.10479
NE-19	-0.253436	1.25344
NE-20	0.0252563	0.974744
NE-21	0.22881	0.77119
NE-22	0.2808	0.7192
NE-23	0.472495	0.527505
NE-24	0.00814556	0.991854
NE-25	0.269095	0.730905
NE-26	0.140017	0.859983
NE-27	-0.0672208	1.06722
NE-28	0.0630495	0.936951
NE-29	0.788864	0.211136
NE-30	0.109752	0.890248
NE-31	0.337032	0.662968
NE-33	0.647114	0.352886
NE-34	0.392359	0.607641
NE-35	-0.00834113	1.00834
NE-36	0.075029	0.924971
NE-37	0.0733716	0.926628

■ モデル構築に使用

■ モデル検証に使用

■ 予測当たり

■ 予測はずれ

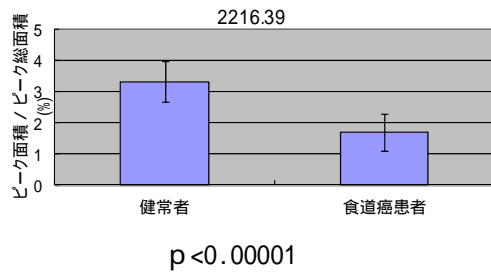
C1 ~ C11, NG1 ~ NG12 はモデル構築に使用された。NG13 ~ NG23 はモデルの検証に使用された。図 3 に示す緑色の症例 (C1 ~ C6, C8, C10, 11, NG1 ~ NG6, NG9 ~ 12, NG15 ~ NG18, NG20) では、食道癌の予測が可能であった。一方、赤色で示す症例 (C7, C9, NG7 ~ 8, NG13 ~ 14, NG19, NG21 ~ 23) は食道癌の予測が不可能な症例であった。

Sensitivity は 45.5%, Specificity は 81.8% で 6 マーカーすべてを用いた Accuracy rate は 69.7% であった。予測が外れた症例の特徴を解析すると、深達度が粘膜下層までの食道表在癌であり、Stagel, II の症例であった。

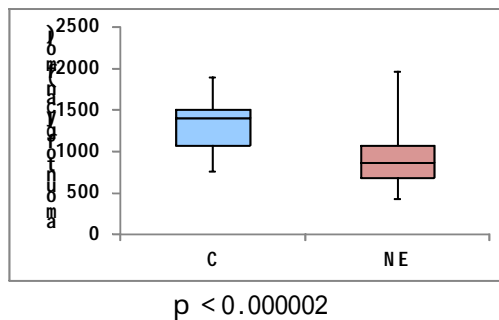
次に MALDI-TOF MS の方法と LCMS-IT-TOF の方法の両方で比較検討した。

図 3 MALDI-TOF MS 法と LCMS-IT-TOF 法

MALDI-TOF MS 法



LCMS-IT-TOF 法



上記 (図 3) のように有意差が見られる糖鎖が 4 個みられたが、このうち 3 糖鎖は両者の方法で一致していた。LCMS-IT-TOF 法で新たに新規候補の糖鎖が発見された。

膵臓癌では特異的な N 型糖鎖のピークを 6 種類確認できた。その中で統計解析により 2 種類の糖鎖に絞り込んだ。この 2 糖鎖を利用し、健常者と膵臓癌患者の半数症例との間で判別モデルを構築し、残り半分の膵臓癌患者で判別可能かを検証した。膵臓癌の判別正確性は約 70% であった (図 4)。

図 4 膵臓癌例の判別モデル

Sample No	Class label	Mean Number of N-Glycans in classifier	3K-Nearest Neighbor	1K-Nearest Neighbor	Support Vector Machine	CEA(基準値 0 ~ 4)
C1	noncancer	2	Y	Y	Y	
C2	noncancer	2	Y	Y	Y	
C3	noncancer	2	Y	Y	Y	
C4	noncancer	2	Y	Y	Y	
C5	noncancer	2	Y	Y	Y	
C6	noncancer	2	Y	Y	Y	
C7	noncancer	2	Y	Y	Y	
C8	noncancer	2	Y	Y	Y	
C9	noncancer	2	Y	Y	Y	
C10	noncancer	2	Y	Y	Y	
C11	noncancer	2	Y	Y	Y	
NP1	cancer	2	Y	Y	Y	21.7
NP2	cancer	2	Y	Y	Y	3.2
NP3	cancer	2	Y	Y	Y	1.0
NP4	cancer	2	Y	Y	N	1.9
NP5	cancer	2	Y	Y	Y	27.8
NP6	cancer	2	Y	Y	Y	6.9
NP7	cancer	2	Y	Y	Y	3.3
NP8	cancer	2	Y	Y	N	3.7
NP9	cancer	2	Y	Y	Y	8.3
NP10	cancer	2	Y	Y	Y	934.1
NP11	cancer	2	Y	Y	Y	10.2
NP13	cancer	2	Y	Y	Y	2.8
NP14	cancer	2	Y	Y	N	16.7
NP15	cancer	2	N	N	N	3.3
NP16	cancer	2	N	N	N	10.4
NP17	cancer	2	Y	Y	N	1.4
NP18	cancer	2	Y	Y	Y	50.1
NP19	cancer	2	Y	Y	Y	230.2

■ 予測当たり ■ 予測はずれ

図 5 膵臓癌のマーカー候補の 1 例

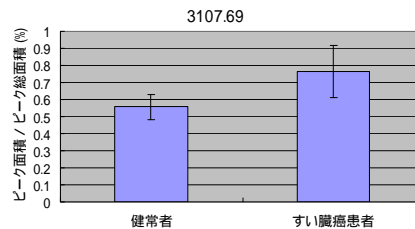


図 5 に膵臓癌のマーカー候補の 1 例を示す。有意差を持って膵臓癌患者で上昇がみられた。

今回、食道癌では MALDI-TOF MS 法と LCMS-IT-TOF 法を用いて検討した。これまでの MALDI-TOF MS 法と新たに解析した LCMS-IT-TOF 法で抽出された 4 個の糖鎖のうち 3 個が一致し、新たに 1 個の新規候補が同定された。これらの糖鎖は食道癌に特異的糖鎖として有用と考えられた。

膵臓癌では MALDI-TOF MS 法で解析した結果、2 個の有意な糖鎖が発見され、膵臓癌検出に特異的になることが期待された。

今後さらに症例の蓄積を行い、精密度を検証する必要があるが、新たな腫瘍マーカーとして、早期癌の検出、再発の早期発見に有用であると考えられた。

## 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 9 件)

1. Okumura H, Uchikado Y, Setoyama T, Matsumoto M, Owaki T, Ishigami S, Natsugoe S: Biomarkers for predicting the response of esophageal squamous cell carcinoma to neoadjuvant chemoradiation therapy. *Surg Today*. 44:421-8, 2014 (査読有)
2. Natsugoe S, Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Nakajo A, Matsumoto M, Okumura H, Kijima Y, Sakoda M, Mataki Y, Uchikado Y, Mori S, Maemura K, Ishigami S.: Lymph node micrometastasis in gastrointestinal tract cancer-a clinical aspect. *Int J Clin Oncol*. 18:752-761, 2013. (査読有)
3. Natsugoe S.: Where will the concept of lymph node micrometastasis advance? *Int J Clin Oncol*. 18:751, 2013. (査読有)
4. Okumura H, Uchikado Y, Matsumoto M, Owaki T, Kita Y, Omoto I, Sasaki K, Sakurai T, Setoyama T, Nabeki B, Matsushita D, Ishigami S, Hiraki Y, Nakajo M, Natsugoe S. Prognostic factors in esophageal squamous cell carcinoma patients treated with neoadjuvant chemoradiation therapy. *Int J Clin Oncol*. 18:329-34, 2013 (査読有)
5. Okumura H, Uchikado Y, Matsumoto M, Owaki T, Kita Y, Setoyama T, Omoto I, Sasaki K, Megumi K, Minami K, Ishigami S, Natsugoe S: Surgical treatment for esophageal cancer patients with myelodysplastic syndrome *Esophagus* 10:149-152, 2013 (査読有)
6. Uenosono Y, Arigami T, Kozono T, Yanagita S, Hagihara T, Haraguchi N, Matsushita D, Hirata M, Arima H, Funasako Y, Kijima Y, Nakajo A, Okumura H, Ishigami S, Hokita S, Ueno S, Natsugoe S: Clinical significance of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer. *Cancer* 119:2398-2991. 2013. (査読有)
7. Shinchi H, Maemura K, Mataki Y, Kurahara H, Sakoda M, Ueno S, Hiraki Y, Nakajo M, Natsugoe S, Takao S.: A phase II study of oral S-1 with concurrent radiotherapy followed by chemotherapy with S-1 alone for locally advanced pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 19:152-8, 2012. (査読有)
8. Owaki T, Matsumoto M, Okumura H, Uchikado Y, Kita Y, Setoyama T, Sasaki K, Sakurai T, Omoto I, Shimada M, Sakamoto F, Yoshinaka H, Ishigami S, Ueno S, Natsugoe S. Endoscopic ultrasonography is useful for monitoring the tumor response of neoadjuvant chemoradiation therapy in esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Surg*. 203:191-197, 2012. (査読有)

9. Kurahara H, Takao S, Maemura K, Mataki Y, Kuwahata T, Maeda K, Ding Q, Sakoda M, Iino S, Ishigami S, Ueno S, Shinchi H, Natsugoe S. Epithelial-mesenchymal transition and mesenchymal-epithelial transition via regulation of ZEB-1 and ZEB-2 expression in pancreatic cancer. *J Surg Oncol*. 105: 655-661, 2012. (査読有)

[学会発表](計 6 件)

1. Natsugoe S, Matsushita D, Uenosono Y, Arigami T, Haraguchi N, Yanagita S, Hagihara T, Ishigami S. Circulating Tumor Cells Predict Peritoneal Dissemination in Patients with Gastric Cancer. 9th International Symposium on Minimal Residual Cancer September 25-27, 2013. Paris, France.
2. Uenosono Y, Arigami T, Yanagita S, Matsushita D, Hirahara S, Ishigami S, Natsugoe S.: Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood from Patients with Gastric Cancer, 10th International Gastric Cancer Congress, Verona Italy, Jun 21, 2013.
3. Okumura H, Uchikado Y, Matsumoto M, Owaki T, Kita Y, Omoto I, Sasaki K, Sakurai T, Setoyama T, Nabeki B, Matsushita D, Ishigami S, Suenaga T, Natsugoe S.: Prognostic factors in esophageal squamous cell carcinoma patients treated with neoadjuvant chemoradiation therapy and determination of an appropriate strategy for their evaluation. Venice, ISDE, Oct 16, 2012
4. 内門泰斗, 松本正隆, 奥村 浩, 大脇哲洋, 喜多芳昭, 佐々木健, 尾本 至, 橋口照人, 石神純也, 夏越祥次: 食道癌診断に血清中N型糖鎖を利用した新規腫瘍マーカーとしての可能性(シンポジウム), 第66回日本食道学会学術集会, 軽井沢, Jun 22, 2012年
5. Natsugoe S, Uenosono Y, Arigami T, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Kita Y, Owaki T, Aridome K, Hokita S, Ishigami S.: Minimally Invasive Treatment for Adenocarcinoma of Esophago-Gastric Junction (Symposium). 10th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society. Seoul, June 15, 2012.
6. Okumura H, Uchikado Y, Matsumoto M, Owaki T, Kita Y, Omoto I, Sasaki K, Sakurai T, Setoyama T, Nabeki B, Matsushita D, Ishigami S, Natsugoe S.: The useful histological evaluation method for assessing prognosis of ESCC patients treated with neoadjuvant CRT. Oral presentation, 10th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society Jun 13, 2012, Seoul.

4.

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：消化器癌診断用マーカー，および消化器癌の検査方法

発明者：夏越 祥次

権利者：鹿児島大学

種類：特願

番号：2011-222353

出願年月日：平成 23 年 10 月 6 日

国内外の別：国内

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

夏越 祥次（NATSUGOE SHOJI）

鹿児島大学・医歯学総合研究科・

教授

研究者番号：70237577

##### (2)研究分担者

上野 真一（UENO SHINICHI）

鹿児島大学・医歯学総合研究科・

特任教授

研究者番号：40322317

又木 雄弘（MATAKI YUKOU）

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・

助教

研究者番号：10444902

前村 公成（MAEMURA KOUSEI）

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・

准教授

研究者番号：30398292

迫田 雅彦（SAKODA MASAHIKO）

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・

助教

研究者番号：40411851

上之園 芳一（UENOSONO YOSHIKAZU）

鹿児島大学・医歯（薬）学総合研究科・

特任准教授

研究者番号：60398279

橋口 照人（HASHIGUCHI TERUTO）

鹿児島大学・医歯（薬）学総合研究科・

教授

研究者番号：70250917