

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：11101
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24659708
 研究課題名(和文)糖鎖バイオマーカーを用いた癌の総合力評価により前立腺癌の過剰治療を回避する方法

 研究課題名(英文)A new glyco-biomarker for comprehensive evaluation of malignant potential in prostate cancer

 研究代表者
 大山 力(Ohyama, Chikara)

 弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

 研究者番号：80282135

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖転移酵素Core2 beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT)は糖タンパク質に分岐型コア2糖鎖構造を形成する酵素である。我々は新たに抗C2GnTモノクローナル抗体を作成して以下の検討を行った。まず、前立腺全摘で得られたパラフィン包埋切片を用いた免疫組織学的検討では、C2GnTの染色性は術後のPSA再発の独立した予測因子であった。さらに、前立腺マッサージ後尿を検体とするドットプロット法によるアッセイ系を開発し、前立腺癌の被膜外浸潤を予測する新規悪性度マーカーとしての有用性を確認した。

研究成果の概要(英文)：We newly established a monoclonal antibody against core2 beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase(C2GnT).Using this monoclonal antibody, we immunohistochemically evaluated relationship between C2GnT expression and biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. C2GnT expression was a significant and independent predictor of biochemical recurrence. We then developed a new assay system for C2GnT using post prostate massage urine sample by dot-blot method. C2GnT expression in urine sample detected by this new assay system was a significant and independent predictor for capsular invasion in prostate cancer. We now on our way to examine the potential of urine C2GnT expression as a predictor for PSA recurrence after radical prostatectomy. Further validation study is warranted.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 バイオマーカー 悪性度診断法 糖タンパク

1. 研究開始当初の背景

現在、日本における前立腺癌の罹患率は、胃癌、肺癌、大腸癌に次いで第4位であるが、近年急激な増加傾向を見せており、数年後には男性の癌罹患率の第1位になると予測されている(下図)。すでに欧米では、前立腺癌は男性の癌罹患率の第1位であり、米国では毎年10万人以上の新規前立腺癌患者が診断されている。前立腺癌は高齢者に多く、その進行は比較的マイルドであることが多い。我が国は急速な少子高齢化を迎えており、高齢者の増加と相まって、急増する高齢前立腺癌患者に適切な治療を提供することは急務である。

また、比較的マイルドとは言え、前立腺癌の悪性度は個々の患者によって差が大きい。このため、症例によっては手術や放射線治療がよい適応となるし、腫瘍マーカーPSA(前立腺特異抗原)を測定しながら経過を見て治療を開始するPSA監視療法も選択されることがある。しかし、この治療に適格な症例を選択するための信頼できる基準がない。

現在、前立腺癌の治療を選択する上で悪性度の指標として様々なリスク分類が使用されているが、そのパラメーターはPSA、臨床病期、組織学的悪性度(Gleason score)であり、必ずしも個々の症例の悪性度を確実に反映するわけではない。このため、欧米ではいわゆる“過剰治療”の問題が大きな研究課題として注目されている。当然、様々なバイオマーカーが過剰治療回避のための指標として検討されているが、未だに臨床現場で使用できる“悪性度マーカー”は存在しない。我々が着目している抗C2GnTモノクローナル抗体はそのbreakthroughとなる可能性が極めて高い。

本研究課題は、すでに欧米で罹患者数が一番多く、また近い将来日本でも罹患率がトッ

プとなることが予想される前立腺癌の悪性度を的確に判断し、個々の癌の特徴に適した治療法選定につながることを予想される。適切な治療法により過剰治療を抑制することは医療費の適正使用へつながらるとともに、患者の不利益を最低限にしてQOLを向上させることで早期の社会復帰も実現させることが可能となり、少子高齢化先進国としての持続性確保に貢献することが期待できる。

2. 研究の目的

糖転移酵素 Core2 β -1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT)は糖タンパク質に分岐型コア2糖鎖構造を形成する酵素であり、我々は本酵素の発現が前立腺癌の悪性度と極めて密接に関連することを見出した。我々が独自に開発したモノクローナル抗体を利用し、血液および尿中のC2GnT量を定量することで個々の患者に特化した前立腺癌悪性度判定システムを開発し、臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

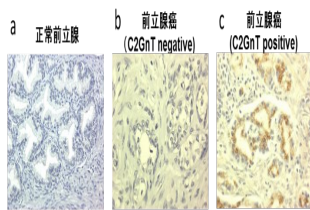
個々の前立腺癌症例に対して適切な治療選択を行う上で、前立腺癌の悪性度を反映するバイオマーカーの開発は重要な研究課題となっている。糖転移酵素 Core2 β -1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT)は糖タンパク質に分岐型コア2糖鎖構造を形成する酵素であり、私達の研究グループは、その発現が肺癌、大腸癌、精巣腫瘍、膀胱癌、前立腺癌の悪性度と相関することを報告してきた。しかしながら、これまでの報告はC2GnTの検出にウサギに免疫することにより得られたポリクローナル抗体を使用しており、その特異性、抗体の安定性に欠ける部分もあった。そこで、新たにマウスに免疫することで得たC2GnT特異的なモノクローナル抗体を作製し、前立腺癌の悪性度とC2GnT発現の相関を免疫

組織化学的に検討した。

次に、新規に作成した抗 C2GnT モノクローナル抗体を用いて、前立腺癌の悪性度を評価するための体液アッセイ系の開発を行った。

4. 研究成果

作製した抗 C2GnT モノクローナル抗体により前立腺全摘除術で得られた前立腺癌パラフィン切片を用いて組織染色を行ったところ、正常前立腺組織では C2GnT 発現は見られず、前立腺癌組織においては C2GnT 発現陰性例と陽性例が存在した。そこで、C2GnT の染色性により 2 群に分け、臨床データと照らし合わせたところ、C2GnT 陽性例は癌の前立腺外への進展率が優位に高く、腫瘍サイズが有意に大きいことが明らかとなった (図 2a)。さらに、C2GnT 陽性群は陰性群に比べ術後 PSA 再発率が有意に高く ($p < 0.001$)、RM、iPSA、High Risk と共に独立した術後 PSA 再発の危険因子であることが明らかとなった。



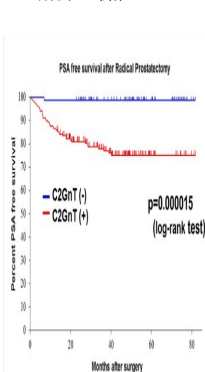
Blown; C2GnT, Blue; 核
図1 前立腺癌抽出切片の染色

患者背景

	C2GnT negative	C2GnT positive	p value
Number of Patient	80	170	
Age (years old)	67.79 ± 15.16	68.82 ± 15.38	$p = 0.098$
PSA	8.22 ± 4.30	8.42 ± 5.17	$p = 0.091$
bi Gleason score (GS)	6.99 ± 0.48	7.05 ± 0.65	$p = 0.104$
Clinical stage (cT) (%)			$p = 0.009$
cT1	52/65 (78.4%)	107/169 (63.3%)	
cT2	28/70 (40.0%)	64/70 (91.4%)	
cT3	3/11 (27.3%)	8/11 (72.7%)	
cT4	0/1 (0%)	1/1 (100%)	
GS	7.33 ± 0.74	7.54 ± 0.88	$p = 0.017$
Prostate cancer risk stratification (%)			$p = 0.008$
Low	5/18 (27.8%)	13/18 (72.2%)	
Intermediate	67/107 (62.6%)	130/167 (78.0%)	
High	8/18 (44.4%)	23/18 (127.8%)	
Final pathological stage (%)			$p < 0.001$
pT2	61/63 (96.8%)	32/63 (50.8%)	
pT3	19/66 (28.8%)	77/66 (116.7%)	
pT4	0/1 (0%)	1/1 (100%)	
Perineural Invasion status (%)			$p = 0.002$
pi (+)	62/100 (62.0%)	138/168 (82.1%)	
pi (-)	18/11 (16.4%)	21/10 (21.0%)	
tumor volume (cm ³)	1.84 ± 1.98 (n=72)	2.64 ± 2.91 (n=147)	$p < 0.001$

図2 C2GnT発現と前立腺癌悪性度との関連

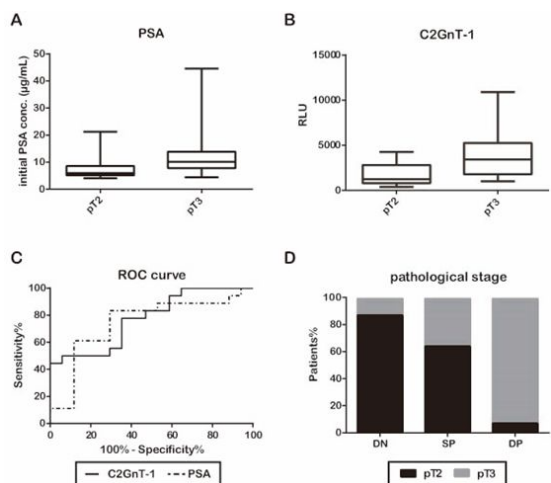
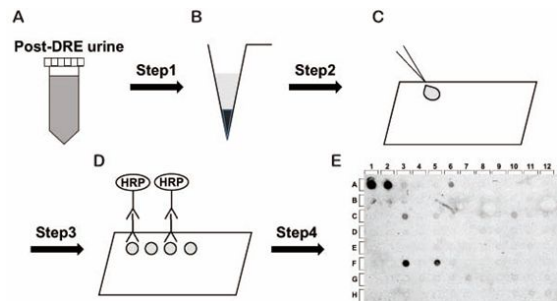
C2GnT発現と前立腺全摘後 PSA再発率との関係



Cox比例ハザードモデルでの解析 PSA failureに及ぼす独立因子

多変量	有意確率	Exp (B)	95.0% CI
			下限 上限
iPSA	0.015	1.052	1.010 1.096
HighRisk	0.010	0.407	0.206 0.805
RM	0.001	0.316	0.163 0.614
C2GnT	0.008	0.067	0.009 0.495

また、前立腺マッサージ後の尿を検体としてドットプロット法で C2GnT の定量化を試みたところ、C2GnT の発現は前立腺癌の被膜浸潤を予測する独立した因子であることが判明した。



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 17 件)

1. Kanda S, Tsuchiya N, Narita S, Inoue T, Huang M, Chiba S, Akihama S, Saito M, Numakura K, Tsuruta H, Satoh S, Saito S, Ohyama C, Arai Y, Ogawa O, Habuchi T: Effects of functional genetic polymorphisms in the CYP19A1 gene on prostate cancer risk and survival. Int J Cancer. 2015 Jan 1;136(1):74-82. doi:

10.1002/ijc.28952.

- Okamoto T, Yoneyama MS, Hatakeyama S, Mori K, Yamamoto H, Koie T, Saitoh H, Yamaya K, Funyu T, Fukuda M, Ohyama C, Tsuboi S: Core2 O-glycan- expressing prostate cancer cells are resistant to NK cell immunity. Mol Med Rep, 7:359-364, 2013.
- Tsuboi S, Hatakeyama S, Ohyama C, Fukuda M: Two opposing roles of O-glycans in tumor metastasis. Trends Mol Med, 18:224-232, 2012.

[学会発表](計21件)

- Tobisawa Y, Yoneyama T, Hatakeyama S, Yamamoto H, Sugiyama N, Suzuki Y, Okamoto A, Okamoto T, Imai A, Yoneyama T, Hashimoto Y, Oikawa M, Narita T, Hagiwara K, Koie T, Ohyama C: Immunohistochemical detection of core2 β -1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase is an independent risk factor for PSA recurrence after radical prostatectomy. 2013年米国泌尿器科学会議 (AUA 2013) 平成25年5月4-8日 サンディエゴ
- Tobisawa Y, Hatakeyama S, Yoneyama T, Okamoto T, Sugiyama N, Suzuki Y, Okamoto A, Yamamoto H, Imai A, Yoneyama T, Hashimoto Y, Narita T, Koie T, Ohyama C: Core2 β -1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase over-expression in prostate cancer induces secretion of growth factors via enhanced adhesion to prostate stromal cells. 2013年米国泌尿器科学会

議 (AUA 2013) 平成25年5月
4-8日 サンディエゴ

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計1件)

名称: ヒトコア2 β -1,6-N-アセチルグルコサ
ミニルトランスフェラーゼ1を特異的に認識
するモノクローナル抗体
発明者: 大山 力
権利者: 弘前大学
種類: 特許
番号: 特願 2012-232564
出願年月日: 平成24年10月22日
国内外の別: 国内特許

取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

研究者番号:

(1)研究代表者

大山 力 (OHYAMA, Chikara)
弘前大学・医学研究科・教授
研究者番号: 80282135

(2)研究分担者

畠山 真吾 (HATAKEYAMA, Shingo)
弘前大学・医学研究科・助教
研究者番号: 10400136

(3)研究分担者

坪井 滋 (TSUBOI, Shigeru)
弘前大学・医学研究科・研究員
研究者番号: 20526727

(4)研究分担者

盛 和行 (MORI, Kazuyuki)
弘前大学・医学研究科・助教
研究者番号: 40266903

(5)研究分担者

米山 徹 (YONEYAMA, Tohru)
弘前大学・医学研究科・助教
研究者番号: 50587649

(6)研究分担者

古家 琢也 (KOIE, Takuya)
弘前大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 60321965