

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462491

研究課題名(和文) シアリル T 発現糖蛋白の腎癌血清マーカーとしての可能性

研究課題名(英文) The glycoprotein carrying sialyl T as a possible marker for renal cell carcinoma

研究代表者

齋藤 誠一 (SAITO, Seiichi)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80235043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腎癌患者血清を非癌患者のそれと比較する過程で、淡明腎癌患者血清で減少するシアリル酸を有する糖蛋白(GP-RCC)を同定した。淡明腎細胞癌患者63名、非癌良性疾患患者53名と比較したところ、癌患者でGP-RCCの血清レベルが有意に低下していた($p=0.0004$)。現在までに6例の術前術後のレベル変化を検討したが、6例中5例で術後のGP-RCCの濃度が上昇していた。一方、腎癌細胞株における存在様式は、血清における存在様式(45-50kDa)よりも分子量が低下した状態(約38kDa)であった。グリコシダーゼ処理で低分子量化したため、血清とがん細胞内では糖鎖の付加に違いがあることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：GP-RCC, which has been identified in the process of searching the glycoprotein carrying sialyl T antigen, decreased in the patients with clear cell renal cell carcinoma (RCC). Serum level of GP-RCC was significantly lower in 63 patients with clear cell RCC than in 53 having benign urologic diseases without RCC ($p=0.0004$). Increase of serum GP-RCC level was confirmed after radical nephrectomy for clear cell RCC in five out of six patients. Molecular size (45kDa) of serum GP-RCC was larger than that (38kDa) extracted from RCC cell lines. Molecular size was decreased by glycosidase treatment of serum GP-RCC, suggesting serum GP-RCC is heavily glycosylated compared to GP-RCC existing in RCC cell lines. From the results, it was indicated that a decrease of GP-RCC was a new marker for clear cell RCC.

研究分野：泌尿器系癌

キーワード：腎細胞癌 血清マーカー 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

現在、腎癌には、臨床的に有用な血清マーカーが存在しないため、存在診断や治療効果判定を画像診断に頼らざるを得ない。CT は被爆の問題もあり、繰り返し施行するには限界がある。したがって、新しいマーカーの探索は、腎癌患者の早期発見、再発診断や治療開発のために必須の研究課題である。なかでも、糖鎖を有する糖蛋白は蛋白分解酵素に抵抗性であり、血清マーカーとしての potential がある。

2. 研究の目的

申請者らは、長年の糖鎖研究により、シアル酸転移酵素 ST3Gal II mRNA の発現が腎癌症例の大部分で亢進することを見いだした (Saito S, et al: J Biol Chem 2003; 278: 26474-9.)。ST3Gal II は、分泌型糖タンパク上にも発現可能な sialyl T を合成するため、sialyl T を有する糖蛋白は腎癌の新たな血清マーカーとしての可能性がある。そこで、sialyl T を特異的に認識するモノクローナル抗体 (mAb) を作成し、sialyl T を搭載する糖蛋白 (マーカー) を同定、糖鎖と蛋白部に対する抗体でサンドイッチアッセイを構築し、多数の患者における当該マーカーの臨床的有用性を検証する

3. 研究の方法

(1) 糖鎖 sialyl T に対するモノクローナル抗体 (mAb) の作成： 国内外で sialyl T に対して mAb を作成した報告はまだ無いため、mAb を確立できれば独創的な研究になる。得られた mAb が特異的か否かを数多くの糖脂質に対する反応をみることで検証する。

(2) 血清糖蛋白 (マーカー) の同定と腎細胞癌の血清診断： mAb が認識する腎癌血清中の糖蛋白 (マーカー) を同定し、当該糖蛋白に対するもう一つの mAb を作成するか、または市販の抗体を入手する。2つの mAb にてサンドイッチアッセイを構築し、当該糖蛋白 (マーカー) の血清診断における有用性を検証する。同時に、2つの抗体で腎癌の組織免疫染色を行う。

(3) sialyl T への mAb の治療薬としての可能性 (革新的な治療の可能性) を探索する。

(4) 当該血清マーカーの生物学的役割について研究する。

4. 研究成果

腎癌患者血清中においてシアリル T を有する糖蛋白を同定する目的で、まずはシアリル T に対するモノクローナル抗体の

作成のため、シアリル T を有する既知の糖脂質 (GD1a) を抗原として抗体作成を試みるも失敗に終わった。

次善策として、シアリル T を有する別な糖鎖 (SSEA-4) に対するモノクローナル抗体 RM1 を用いて、腎癌患者血清を非癌患者のそれと比較した。複数の症例で変化するバンドが 45-50kDa 付近に観察されたため、患者血清を電気泳動し、45-50kDa を含むバンドを切り出し、洗浄後、トリプシン消化を行い、LC-MS/MS 分析を行った。

主な糖蛋白として3種類同定され、それぞれの抗体を用いて腎癌患者と非癌患者におけるレベルを比較したところ、そのうちの一つのシアル酸を有する糖蛋白 (GP-RCC) が淡明腎癌患者血清で減少していた (図 1a)。

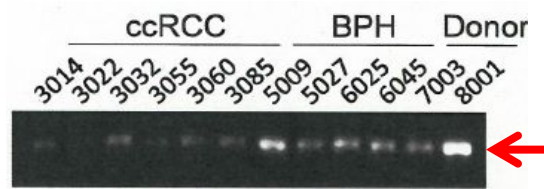


図 1a: ccRCC, BPH および Donor における GP-RCC レベルの比較

ccRCC: clear cell renal cell carcinoma, BPH: benign prostatic hyperplasia, Donor: living-donor for kidney transplantation

そこで、淡明腎細胞癌患者 63 名、非癌良性疾患患者 53 名で血清レベルを比較したところ、淡明腎細胞癌患者で有意に減少しているのが観察された (p=0.0004) (図 1b)。

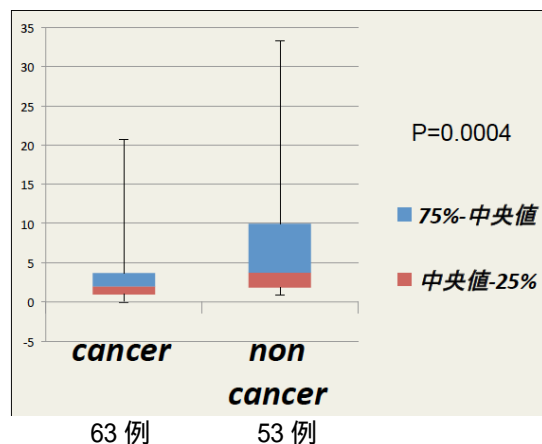


図 1b ccRCC と non-RCC における GP-RCC レベルの比較

現在までに6例の術前術後のレベル変化を検討したが、6例中5例で術後のGP-RCCの濃度が上昇していることがわかったため(図1c) 現在、より多くの症例で確認すべく、術前術後の患者血清を集積している。

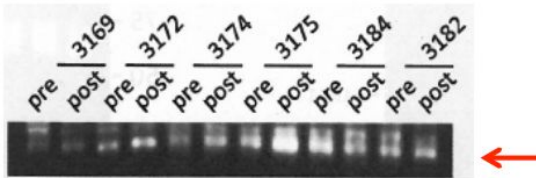


図1c 術前・術後の比較

一方、腎癌細胞株における存在様式を調べたところ、血清における存在様式(45-50kDa)よりも分子量が低下した状態(約38kDa)であることがわかった(図2)。

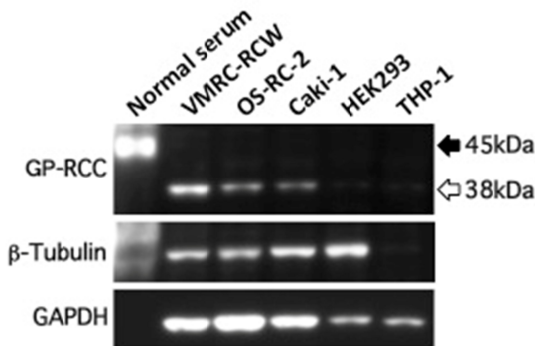


図2 血清中と腎癌細胞株中のGP-RCCの分子量の違い

血清をグリコシダーゼ処理したところ、やはりGP-RCCが低分子量になったことから、血清とがん細胞内では糖鎖の付加に違いがあること、すなわち血清において糖鎖がより多く付加していることが明らかとなった。

以上を総合すると、GP-RCCは腎細胞癌内に取り込まれ、糖鎖や蛋白部分がシグナリングなどの自己の生存に合目的になるよう、血清中のGP-RCCを利用していていると考えられた。

現在、GP-RCCの動態を調べるため、GP-RCCのラベリングを試みている段階であるが、血清から糖鎖が多く付加した状態の45-50kDaのGP-RCCをintactな形で単離することが困難であり、別な方法によるGP-RCCの動態調査を予定している。以上の研究により、GP-RCCは淡明腎細胞癌において低下する血清マーカーとなりうる可能性がある。今後、さらにその役割を解明することで治療の可

能性にもつなげたい。

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 11件)

Kanda S, Tsuchiya N, Narita S, Inoue T, Huang M, Chiba S, Akihama S, Saito M, Numakura K, Tsuruta H, Satoh M, 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; 136: 74-82. doi: 10.1002/ijc.28952. 査読有

Miyazato M, Tohyama K, Tohyama M, Nakamura H, Oshiro T, Ueda S, Saito S. Effect of continuous airway pressure on nocturnal urine production in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *NeuroUrol Urodyn* 2015 Dec 3. doi: 10.1002/nau.22936. 査読有

Oshiro T, Miyazato M, Saito S. Relationship between connexin43-derived gap junction proteins in the bladder and age-related detrusor underactivity in rats. *Life Sci* 116: 37-42, 2014. doi: 10.1016/j.lfs.2014.08.009. 査読有

Shimada S, Ito A, Kawasaki Y, Kakoi N, Taima T, Mitsuzuka K, Watanabe M, Saito S, Arai Y: Ganglioside disialosyl globopentaosylceramide is an independent predictor of PSA recurrence-free survival following radical prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2014; 17: 199-205. doi: 10.1038/pcan.2014.9. 査読有

Miyazato M, Tana T, Higa A, Oshiro T, Namitome R, Nezu U, Ueda S, Saito S: Prevalence and risk factors for nocturia in an outpatient clinic. *LUTS* 2014; 6: 167-171. doi: 10.1111/luts.12039. 査読有

Miyazato M, Kaiho Y, Mitsuzuka K, Yamada S, Namiki S, Saito H, Ito A, Nakagawa H, Ishidoya S, Saito S, Arai Y: Impact of prostatic size on quality of life scores after open radical

prostatectomy: A single-center experience. Scand J Urol 2014; 48: 146-152. doi: 10.3109/21681805.2013.836723. 査読有

呉屋真人、齋藤誠一： 前立腺癌と骨合併症 西日泌尿; 78(1): 3-11. 総説 査読無

宮里実, 大城琢磨, 齋藤誠一. 加齢と排尿筋低活動. 西日泌尿. 2015; 77(12): 427-35. 総説 査読無

宮里実, 齋藤誠一. 手術手技 女性泌尿器科の手術-基本手技とコツ6: 膀胱腫瘍閉鎖術 臨床泌尿器科. 2015; 69(2): 200-3. 査読有

宮里実, 大城琢磨, 齋藤誠一. 特集 夜間頻尿を診る-これを読めば解決! 疫学 夜間頻尿の疫学. 臨床泌尿器科. 2015; 69(6): 444-7. 査読無

仲西昌太郎、宮里実、米盛勸、玉城智子、吉見直己、齋藤誠一： 右腎周囲から発生した Malignant PEComaの1例. 泌尿紀要60: 627-630, 2014. 症例報告 査読有

〔学会発表〕(計 6件)

- 1) Miyazato M, Oshiro T, Ashikari A, Saito S. Effect of the Continuous Positive Airway Pressure on the Nocturnal Urine Volume in Patients with Obstructive Sleep Apnea Syndrome. 45th annual meeting of the International Continence Society in Montreal, Oct 7, 2015.
- 2) Oshiro T, Miyazato M, Saito S. Age-related detrusor underactivity is associated with down regulation of biological clock of connexin43-derived gap junctions in the bladder in rats. AUA Meeting in Orlando, May 18, 2014.
- 3) Miyazato M, Kaiho Y, Mitsuzuka K, Yamada S, Namiki S, Saito H, Ito A, Nakagawa H, Ishidoya S, Arai Y, Saito S. Impact of Prostate Size on Urinary Quality of Life Scores after Open Radical Prostatectomy. The 4th Congress of Asian Pacific Prostate Society. Okinawa, March 21, 2014.

4) Miyazato M, Oshiro T, Namitome R, Saito S, Chancellor MB, de Groat WC, Yoshimura N. Failure of enhancement of the somatic and sympathetic nerve induced continence reflex after duloxetine, a norepinephrine and serotonin reuptake inhibitor, in rats with cerebral infarction. AUA Meeting in Orlando, May 18, 2014.

5) Oshiro Y, Kohagura K, Ashimine S, Miyazato M, Goya M, Saito S. Tonsillectomy and IgA nephropathy recurrence after kidney transplantation. World Transplant Congress. San Francisco, July 26, 2014.

6) Yamada S, Oshiro Y, Shiohira H, Akamine Y, Uehara H, Hokama N, Saito S, Ueda S. A predictive factor for the mycophanolic acid area under the curve in Japanese renal transplant recipients under maintenance therapy. World Transplant Congress. San Francisco, July 26, 2014.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
齋藤 誠一 (SAITO Seiichi)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80235043

(2)研究分担者

呉屋 真人 (GOYA Masato)

琉球大学・医学部附属病院・講師

研究者番号： 50295317

(3)連携研究者

()

研究者番号：