

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 24 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830106

研究課題名(和文)糖鎖修飾の差異に基づいた既存の卵巣癌血清診断マーカーの臨床的再評価

研究課題名(英文) Glyco-alteration-based clinical re-evaluation of existing serum biomarkers for ovarian carcinoma

研究代表者

秋田 薫 (AKITA, Kaoru)

京都産業大学・総合生命科学部・助教

研究者番号：10449506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：上皮性卵巣癌は婦人科癌の中で最も死亡数が多い悪性腫瘍である。卵巣癌の血清診断マーカーの中で、CA125は代表的なマーカーとして利用されているが、子宮内膜症などの良性疾患に対して高い偽陽性率を示す。本研究では、卵巣癌の診断精度の向上を目的として、子宮内膜症と卵巣癌患者におけるCA125の質的差異を検出する新たなアッセイ方法の開発に取り組んだ。この結果、卵巣癌患者由来のCA125は子宮内膜症患者由来の同分子と比較して、メソテリン結合能が有意に高いことを見いだした。つまり、メソテリンへの結合能は両疾患における本腫瘍マーカーの質的差異を評価する上での有用な指標となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The epithelial ovarian carcinoma (EOC) is an aggressive malignant tumor, and is currently the leading cause of gynecologic cancer death. CA125 is the most commonly used serum marker for EOC, but shows a high-false positive rate for several benign diseases such as endometriosis. The purpose of this study is therefore to identify a useful biochemical tool for detecting qualitative differences between CA125 from patients with endometriosis and EOC, and to facilitate differential diagnosis of these diseases. In this study, we found that the mesothelin-binding ability of serum CA125 was significantly higher in patients with EOC than in patients with endometriosis. Our results suggest that the mesothelin-binding ability may be a useful indicator for qualitatively evaluating CA125 in patients with endometriosis and EOC.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：卵巣癌 子宮内膜症 腫瘍マーカー 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌は婦人科癌の中で最も死亡数が多い悪性腫瘍である。この理由としては、卵巣が骨盤内臓器であるため、癌が生じても自覚症状が少なく、その多くが進行した段階で発見されることが挙げられる。現在、卵巣癌の診断では、超音波検査、画像診断、腫瘍マーカーを用いた血清診断が重要な役割を担っている。

上皮性卵巣癌の代表的な血清診断マーカーであるCA125は約80%の卵巣癌患者で発現亢進が認められる。しかしながら、CA125は子宮内膜症などの良性疾患においても増加することから、偽陽性率の高いマーカーであることが認知されている。

2. 研究の目的

近年、我々を含めいくつかの研究グループは、卵巣癌患者由来のCA125と健常人あるいは良性疾患の患者由来のCA125を比較した場合、糖鎖修飾の違いがあることを見いだしている(Int J Gynecol Cancer 2012;22:531-8, J Proteome Res 2013;12:1408-18, Int J Mol Sci 2013;14:15636-54)。我々は、この糖鎖修飾の違いを利用して、CA125の質的差異を定量化できるアッセイ手法を開発することにより、既存の測定方法(量的差異の測定)における上述の問題点を改善できる可能性があるのではないかと考え、本研究に着手した。

3. 研究の方法

(1)アッセイシステムの構築

①CA125上の糖鎖抗原(シアリル Tn 抗原など)の発現レベル、②シグレック/セレクトリン/メソテリンへの結合能を持つCA125レベル、③2種の糖鎖マーカーの共発現レベル、を測定するプレートアッセイシステムの構築に着手した。

具体的には、抗CA125抗体、抗糖鎖抗原認識抗体、レクチンあるいは組み換えタンパク質をマイクロタイタープレートに固相化後、ブロッキング、検体との反応、洗浄、ビオチン標識分子(ビオチン標識抗CA125抗体、ビオチン標識抗糖鎖抗原認識抗体あるいはビオチン標識レクチン)との反応、洗浄、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンとの反応、洗浄、TMB基質試薬を用いてのシグナルの検出を行い、検出感度およびlinearityをチェックした。なお、既存のCA125アッセイ法ではカットオフ値として35 U/mlのCA125濃度が用いられていることから、構築したアッセイ系に関しても、本濃度での測定が可能であることを感度の判断基準とした。また、アッセイ系確立の為の予備実験には、卵巣癌培養細胞株であるOVCAR3細胞のコンディショントメディアムをゲルろ過クロマトグラフィーにより分画、部分精製したCA125画分を用いた。

(2)卵巣癌診断手法としての有用性の評価

アッセイ系が構築出来た系に関して、ヒト血清検体を用いての測定、ならびに卵巣癌の診断手法としての有用性(卵巣癌への陽性率、子宮内膜症への偽陽性率、卵巣癌の進行度との相関性、卵巣癌の組織型の違いによる発現レベルの差異)を調べた。本研究では、京都産業大学研究倫理委員会および京都府立医科大学医学倫理審査委員会の承認のもと、ヒト血清検体として、子宮内膜症(59症例)、卵巣癌(36症例)、子宮筋腫(17症例)、子宮体癌(15症例)、子宮頸癌(4症例)を使用した。

4. 研究成果

前述のアッセイシステムの構築およびその有用性の評価を試みた結果、以下に述べるメソテリンへの結合能が卵巣癌と子宮内膜症におけるCA125の質的差異を評価する上で、有用な指標となることを見いだした。

(1)メソテリンへの結合能を持つCA125(CA125<sup>meso</sup>)のアッセイシステム

メソテリン組み換えタンパク質とビオチン標識抗CA125抗体を組み合わせたCA125<sup>meso</sup>レベルのアッセイシステムを構築した(図1)。OVCAR3細胞から調製したCA125画分、子宮内膜症および卵巣癌患者血清(各2症例)を0-100 U/mlのCA125濃度にて反応させ、CA125<sup>meso</sup>レベルを測定した結果、本手法は高い感度(6.25 U/ml以上のCA125濃度にて測定可能)と安定したlinearityを持っていることが明らかになった。

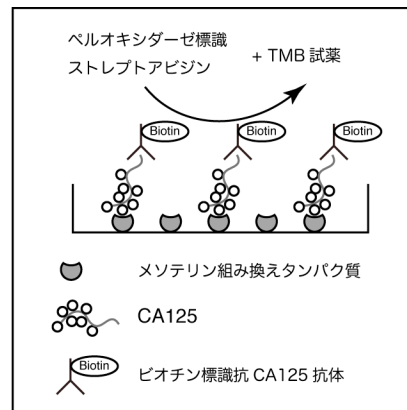


図1: CA125<sup>meso</sup>アッセイの模式図

(2)子宮内膜症と卵巣癌患者における血清CA125<sup>meso</sup>レベルの測定

今回使用した子宮内膜症および卵巣癌患者における血清CA125レベルの平均値(中央値)±SDはそれぞれ138.0(71.8)±255.6 U/ml、1033.3(226.6)±2073.3 U/mlであり、卵巣癌において有意な増加が認められた(p=0.001)。同検体における血清CA125<sup>meso</sup>レベルの平均値(中央値)±SDはそれぞれ64.6(13.4)±207.2 U/ml、3341.2(209.7)±10353.9 U/mlであり、CA125レベルと同様に卵巣癌にて有意な増加が認められたが(p=0.00001)、統計

学的に両者の差はCA125<sup>meso</sup> レベルの方が大きいことが明らかになった(図2)。また、CA125 レベルのカットオフ値を 35 U/ml に設定した場合、卵巣癌の陽性率は 83.3%、子宮内膜症への偽陽性率は 79.7%であった。一方、CA125<sup>meso</sup> レベルのカットオフ値を 15 U/ml に設定した場合、CA125 アッセイで評価した場合とほぼ同じ割合(77.8%)の卵巣癌患者が陽性であったが、子宮内膜症への偽陽性率は顕著に減少した(47.5%)。さらに、ROC 曲線による解析からも、CA125 アッセイ(AUC = 0.697)と比較して、CA125<sup>meso</sup> アッセイ(AUC = 0.771)は精度高く子宮内膜症と卵巣癌の鑑別できることが示唆された。

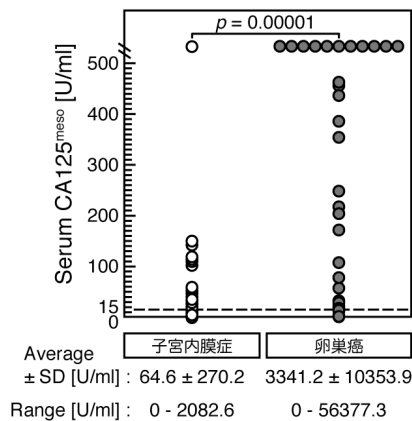


図2: 子宮内膜症と卵巣癌患者における血清 CA125<sup>meso</sup> レベル

(3) 子宮内膜症と卵巣癌患者における血清 CA125<sup>meso</sup> レベルと血清 CA125 レベルの相対比 (CA125<sup>meso</sup>/CA125 レベル) の比較  
今回開発したアッセイにおいて、血清 CA125<sup>meso</sup> レベルは血清 CA125 レベルと CA125 のメソテリン結合能の双方の要因に依存して変動する。本研究では CA125 のメソテリン結合能を評価する指標の 1 つとして、CA125<sup>meso</sup>/CA125 レベルを算出、評価した。図3に示すように、子宮内膜症と卵巣癌患者における CA125<sup>meso</sup>/CA125 レベルの平均値±SD はそれぞれ 0.27±0.27、1.29±1.86 であり、有意な差が認められた(p=0.0000006)。この結果は CA125 のメソテリン結合能が両疾患にて異なっていることを示唆している。

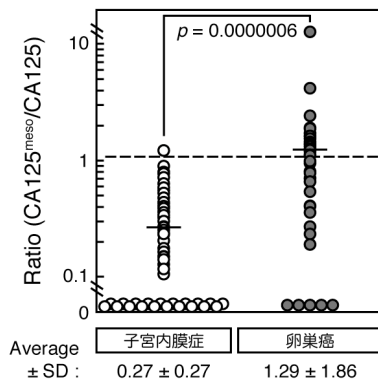


図3: 子宮内膜症と卵巣癌患者における CA125<sup>meso</sup>/CA125 レベル

(4) 卵巣癌の臨床診断ステージおよび組織型の違いと血清 CA125<sup>meso</sup>/CA125 レベルの関連性  
卵巣癌患者を臨床診断ステージに従って分類し、CA125<sup>meso</sup>/CA125 レベルを比較した結果、ステージ I/II とステージ III/IV における CA125<sup>meso</sup>/CA125 レベルはそれぞれ 1.57±2.41、0.93±0.66 であり、癌の進行度合いの違いによる有意な差は認められなかった。よって、癌の初期の段階にても、高い頻度で CA125 のメソテリン結合能が変化している可能性が示唆された。また、漿液性、類内膜、明細胞および粘液性癌における CA125<sup>meso</sup>/CA125 レベルはそれぞれ 1.27±1.11、0.76±0.63、2.84±4.60、0.80±0.64 であり、組織型の違いによる有意な差も認められなかった。

以上、CA125<sup>meso</sup> アッセイは卵巣癌に対して従来の CA125 アッセイとほぼ同レベルの感度を保持し、かつ、子宮内膜症に対して低い偽陽性率を示すことが明らかになった。従来の CA125 アッセイの改良法として、CA125<sup>meso</sup> アッセイの有用性を見いだせたことは本研究における大きな成果であると考えている。

一方、CA125<sup>meso</sup> アッセイにおいて 47.5%の子宮内膜症患者が依然として陽性となることから、シアルル Tn 抗原や HE4 などの CA125 以外の腫瘍マーカーを用いての診断の必要性は残っている。とりわけ、シアルル Tn 抗原は卵巣癌と子宮内膜症などの良性疾患を鑑別する有用なマーカーであることが見いだされており、近年、我々は CA125 上のシアルル Tn 抗原レベルを測定するアッセイシステム (sTn/CA125 アッセイ) を構築している(Int J Gynecol Cancer 2012;22:531-8)。本アッセイを用いて、sTn/CA125 レベルの測定を行った結果、子宮内膜症および卵巣癌患者の陽性率はそれぞれ 5.8%と 46.8%であった。卵巣癌への陽性率の低さから、sTn/CA125 アッセイ単独での測定に有用性は見いだせなかったが、蛍光ベースのプレートアッセイシステム(抗 CA125 抗体を捕捉抗体として血清中の CA125 をキャッチした後、検出抗体として励起波長の異なる 2 種の蛍光物質にて各々標識した抗 CA125 抗体および抗シアルル Tn 抗原抗体を用いて、CA125 レベルと sTn/CA125 レベルを同時測定する)への応用も今後検討したいと考えている。

## 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 1 件)

A. Sasaki\*, K. Akita\*, F. Ito, T. Mori, J. Kitawaki, H. Nakada: Difference in mesothelin-binding ability of serum CA125 between patients with endometriosis and epithelial ovarian cancer. *Int. J. Cancer*. 2015. 136(8), 1985-1990 (\*These authors contributed equally to this work), DOI: 10.1002/ijc.29185, 査読有

〔学会発表〕(計 1件)

秋田 薫、佐々木 綾、菅沼 泉、森 泰輔、  
北脇 城、中田 博：子宮内膜症患者と卵巣  
癌患者間における血清CA125のメソテリン結  
合能の違い。第87回日本生化学会大会、国  
立京都国際会館(京都府・京都市)、  
2014.10.15-18

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称：卵巣癌の検出方法、卵巣癌と子宮内膜  
症との鑑別方法、並びに、キット

発明者：中田 博、秋田 薫、北脇 城、佐々  
木 綾

権利者：学校法人京都産業大学

種類：特許

番号：特願2014-159753

出願年月日：平成26年8月5日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~kakita/nakadaken/Home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋田 薫 (AKITA, Kaoru)

京都産業大学・総合生命科学部・助教

研究者番号：10449506