

平成 31 年 2 月 15 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26710007

研究課題名(和文)糖鎖サブタイプ分析による高特異度腫瘍マーカーの開発

研究課題名(英文)Development of cancer specific glycosylation subtype biomarkers

研究代表者

植田 幸嗣(Ueda, Koji)

公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター がんオーダーメイド医療開発プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：10509110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は独自の高感度糖鎖構造質量分析技術を利用して高特異度腫瘍マーカーを開発することを目的とした。7割近い偽陽性を示すPSA値4-10 ng/mlの前立腺肥大(BPH)患者、前立腺癌患者血清サンプルを対象とし、67種類のPSA上糖鎖構造を定量可能な分析技術を確立した。BPH患者15例、前立腺癌患者15例を用いた分析結果より二種の癌高特異的糖鎖構造を同定することに成功し、これらを用いたロジスティック回帰診断式(PSA G-index)を構築した。上記と同数の独立検体を用いてブラインドのPSA G-index診断試験を行った結果PSAでは区別不可能なこれら全例を正しい疾患群に識別することができた。

研究成果の概要(英文)：To develop a specificity-enhanced tumor diagnostic system, we constructed a quantitative and sensitive glycan structure profiling technology based on mass spectrometry. Comprehensive glycoform analysis of 30 serum samples (15 benign prostate hyperplasia (BPH) and 15 prostate cancer, PSA = 4-10 ng/ml) revealed that, among 67 glycan structures, a couple of glycoforms on PSA had highly cancer-specific expressions patterns. Then we established a logistic regression-based diagnostics using expression frequencies of these structures (PSA G-index). Importantly, when we performed a blinded validation test using 15 BPH and 15 prostate cancer samples, PSA G-index allowed classification of all samples into correct clinical groups (sensitivity and specificity were 100%). Thus, PSA G-index could serve as a definitive secondary test for PSA test, leading to significant reduction of false positive diagnosis of prostate cancer.

研究分野：腫瘍診断学

キーワード：糖鎖 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

本邦において癌は死因の3分の1を占め、2050年には半数の国民が癌で死亡すると推測されている。中でも本研究の分析対象とする肺癌や大腸癌、そして前立腺癌は近年著しい罹患数、死亡数の増加傾向を示している(図1)

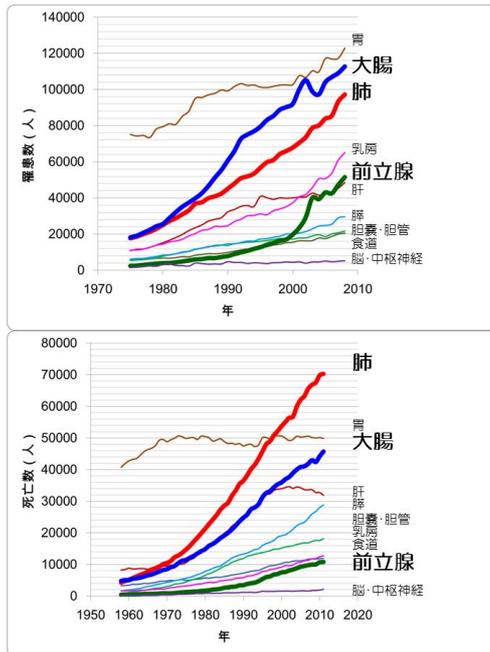


図1 部位別がん罹患数(上)、死亡数(下)の年次推移(厚生労働省人口動態統計より)

これらの癌に対するスクリーニング検査や再発・治療効果判定などを目的として、腫瘍マーカーは癌の早期発見、治療成績の向上に大きな貢献を果たしてきた。癌胎児性抗原 CEA は進行消化器癌を中心に有意な血中濃度高値を示し、世界で最も高頻度に測定されている腫瘍マーカーである。前立腺特異抗原 PSA は 1979 年に発見されて以来、前立腺癌の早期発見率を劇的に向上させ、PSA スクリーニング群では、非スクリーニング群と比べて前立腺癌死亡率が 21%低いことも証明された(N Engl J Med 2012; 366:981)。

しかしながら両腫瘍マーカーとも実用上大きな課題も残っている。CEA は肺、大腸、胃、膵、乳房など多くの癌で高値を示すが、弱陽性(5~10 ng/ml)程度の上昇は慢性閉塞性肺疾患(COPD)、喫煙、潰瘍性大腸炎(UC)、膵炎などでもしばしば観測され、スクリーニング用途での癌確定診断力は大変弱い。PSA は早期癌検出感度が高い反面、前立腺肥大症(BPH)や前立腺炎でも高頻度に高値(>4 ng/ml)を示す。特にグレーゾーンと言われる4~10 ng/mlの領域では実際に前立腺癌である確率は30%ほどしかなく、70%の擬陽性被験者は苦痛や入院を伴う不要な前立腺針生検の対象になる。前立腺癌罹患率が世界一多い北米では PSA 検査擬陽性例に対する無駄な検査・入院費が年間数十億ドルに上り、国家的な医療費問題になっている。

こうした既存マーカーの診断精度を向上させるため、新規バイオマーカー探索研究が数多く行われてきた。しかし、現代のゲノミクス、プロテオミクス技術を用いて発見された肺癌、大腸癌、前立腺癌マーカーが CEA や PSA に置き換わって実用化された例は一つもなく、依然として不完全な診断が続けられている現状である。しかし、最新の糖鎖医学技術がバイオマーカーの疾患特異性を劇的に改善できる可能性が示唆され始めた。肝細胞癌バイオマーカー AFP は肝炎、肝硬変でも陽性を示すことが知られていたが、1,6-フコースが付加された AFP は肝癌細胞でしか産生されないことが明らかとなり、AFP-L3 として臨床実用化されている。

2. 研究の目的

申請者が独自に開発を行ってきた Energy Resolved Oxonium Ion Monitoring (Erexim)法(以下エレクシム法)を用いた腫瘍マーカーの糖鎖サブタイプ分析を通じて既存腫瘍マーカーの癌特異性向上(BPH 型 PSA、前立腺癌型 PSA など)や、産生細胞の特定(Lung_CEA、Colon_CEA、Smoke_CEA など)までもが可能となれば、この数年で急激に世界的競争が激しくなってきた臨床グライコミクス研究において、基礎糖鎖生物学研究に引き続き日本が世界をリードしてゆくマイルストーンとなり得る。

2012 年に申請者が開発したエレクシム法は、10 分間の分析で、特定の糖タンパク質において最大 50 種類の糖鎖構造が何%ずつの構成比で付加されているかを付加部位ごとに定量できる革新的な糖鎖分析法である(図 2)。本エレクシム法は抗体医薬品の薬効や安全性を大きく左右する糖鎖構造を高速に定量スクリーニングすることも可能にしたため、医薬品の受託分析サービス事業として株式会社三菱化学メディエンスによって産業実用化されている実績と信頼性もある(日経産業新聞2013年9月20日10面など)。

一方で、患者血液中の微量な PSA や CEA を測定するには、かなり効率の良い濃縮前処理も鍵となる。PSA の質量分析前処理については、96 ウェルフィルタ処理で血清・血漿から低分子量タンパク質を高率精製できる Quick Enrichment of Small Targets (QUEST)法を開発し、116 症例の血漿から PSA の高感度検出はもちろん、Neuropeptide-Y など新たな前立腺癌バイオマーカー発見にも成功している。また、CEA についてはすでに血中からの免疫沈降効率を追求した特異的ポリクローナル抗体を作成済みである。こうした実験結果と申請者がこれまでの糖鎖研究から得てきた知見から、良質な多数の臨床検体と適切な前処理技術、そして最先端のエレクシム分析法を組み合わせれば、これまで誰も精密に調査することができなかった腫瘍マーカー上糖鎖構造の疾患(癌化)による相違、産生母地による相違

までもが統計学的に評価できると考え、本研究の着想に至った。

Energy-Resolved Oxonium Ion Monitoring (Erexim)

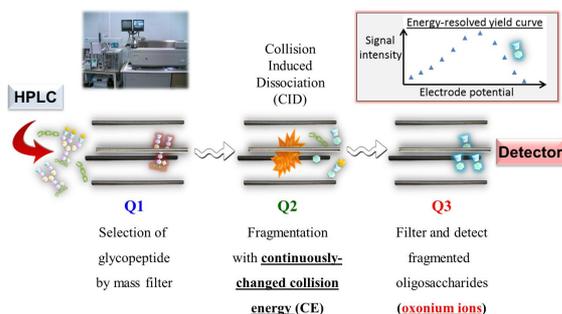


図2 Erexim法の原理。四重極(Q)1で標的糖ペプチドを指定し、Q2で衝突解離した糖断片オキソニウムイオンをQ3で定量する。

エレクシム法がもたらす糖鎖分析における感度、定量性、分析速度の飛躍的なブレイクスルーにより、本研究結果から世界初の精密な疾患・臓器特異的糖鎖プロファイルが得られ、基礎糖鎖生物学の発展に大きく寄与できるだけでなく、既存腫瘍マーカーの偽陽性排除、効率的な診断から治療への指針策定、医療費の大幅削減など医療社会への波及効果も大きい。さらには同定された各癌種特異的糖鎖構造を持つ新たな高感度腫瘍マーカーの発見に繋げられる研究開発としても期待できる。

3. 研究の方法

PSAの血中濃度が特に高い血清サンプルから当腫瘍マーカーを濃縮精製、トリプシン消化し、4000 QTRAP 質量分析計 (AB Sciex 社) のパラメータ最適化試験を行う。具体的には Nano-flow HPLC のグラジエント、各標的糖ペプチドごとに最適な衝突エネルギースキャン範囲、その他質量分析装置の各種電圧条件の決定を行う。どのような糖鎖構造を測定すればよいかに関しては、理論上考えられる全ての糖鎖構造に対応できるだけの質量条件を測定パラメータに組み込んでスクリーニングを行うので、未報告の糖鎖構造でもキャッチできるように工夫している。

で決定したエレクシム法を用いての腫瘍マーカー糖鎖サブタイプスクリーニングを開始する。使用する血清は、大阪大学泌尿器科を受診し、診断が確定した BPH 患者 15 例、前立腺癌患者 15 例を用いる。ただし、これら全ての症例の診断時 PSA 検査値が 4-10 ng/ml であるものを選出した。また血清タンパク質全体に大きな変動が起きている可能性のある疾患を併発している症例、肝、腎機能に異常が認められる症例はスクリーニングサンプルから除外した。

上記 30 症例に対して個別にエレクシム分析を行い、各糖鎖付加部位ごとに検出される全

ての N 型糖鎖がどのような割合で付加されているかの網羅的定量プロファイルを得る。この定量情報から、BPH と前立腺癌を区別できる糖鎖サブタイプを t-test によって抽出し、ロジスティック回帰分析を使って診断モデルを構築する。

上記スクリーニングで構築された前立腺癌高特異度診断モデルに対して、独立症例セットを用いたブラインド診断能検証試験、Gleason スコアとの相関解析、および組織中の標的糖鎖構造発現解析を実施した。現行の PSA 検査において高い疑陽性率が問題となっているグレーゾーン (PSA 4-10 ng/ml) に該当する前立腺癌 15 症例、BPH 15 症例を含む 30 サンプルをランダム化し、前年度までに確立した Mass spectrometric oxonium ion monitoring 法による分析、PSA G-index による診断を試みる。また、糖鎖サブタイプマーカーの標的となった部分構造を特異的に認識するレクチン 2 種を用いて 152 症例からなる組織アレイレクチン染色を行い、前立腺組織中における当該糖鎖の分布と発現量を調べた。

4. 研究成果

至適化した質量分析条件を用いてヒト PSA 精製標品の Erexim 分析を実施した結果、図 3 のように 67 種類の糖鎖が PSA に付加していることが明らかとなった。

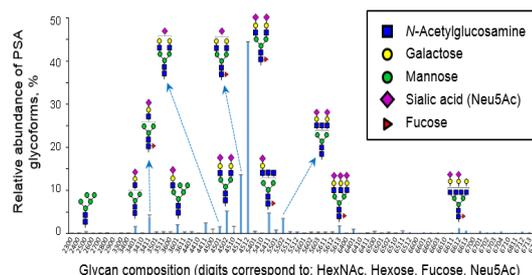


図3 PSA 上 67 糖鎖構造プロファイル

この糖鎖構造同定数は過去の報告と比して圧倒的に最大数であり、相対存在比 1% 未満の非常にレアな糖鎖構造まで定量化することが可能となった。

また、定量ダイナミックレンジを調べるために PSA 精製標品を用いて標準曲線を描画したところ、図 4 のように 10^5 に及ぶ定量直線性を得た。さらに血清からの PSA 免疫抽出、分析定量再現性を評価する目的で、同一の血清サンプルを 6 回にわたって、それぞれ $n=4$ で処理、分析を行った。その結果、糖鎖存在比の多寡を問わず $CV < 10\%$ を示し、十分に高い再現性を持つことも証明できた。

以上より、グレーゾーンとされる PSA 濃度を持つ血清検体からも十分に高感度で再現性よい糖鎖サブタイプ分析が可能であることが分かったため、BPH 患者 15 例、前立腺癌

患者 15 例からなるスクリーニングセットを用いて癌特異的糖鎖構造の探索を実施した。

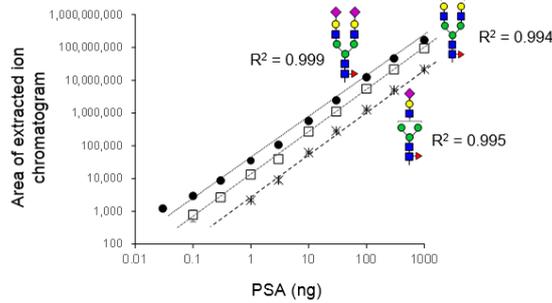


図 4 PSA 上糖鎖構造の定量ダイナミックレンジ評価

その結果、図 5 のように 52 種類の PSA 上糖鎖構造が定量的に検出され、BPH 患者群と前立腺癌患者群に有意な存在頻度差を示す構造が複数検出された。(図 5)

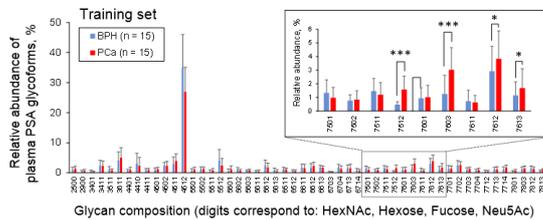


図 5 BPH、前立腺癌患者血清由来 PSA 糖鎖構造の定量プロファイル

中でも図 6 に示す LacdiNAc 構造、シアル酸構造に特徴的な相違が確認された。具体的にはシアル酸を 2 つ以上持つ LacdiNAc 構造がとりわけ前立腺癌患者血清由来 PSA に多く含まれることが判明した (Multi-sialylated LacdiNAc 構造)。

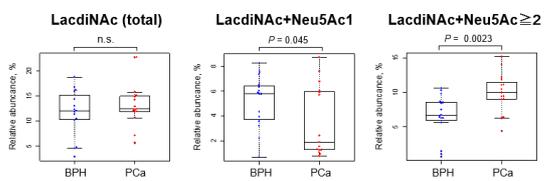
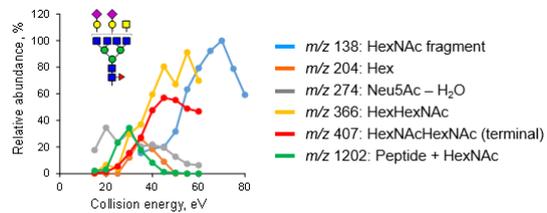


図 6 LacdiNAc 構造、シアル酸構造を持つ糖鎖の疾患群別分布

なお、検出された全種類の糖鎖構造については Erexim 分析によって構造の照明を行った。例として、本解析で癌特異的糖鎖サブタイプマーカーとして使用した 7512 糖鎖の Erexim プロファイルを図 7 に示す。LacdiNAc 構造特異的な Signature ion である $m/z = 407$ が検出されている。これらの知見に基づいて、t-test の結果において最も両疾患群の間で付加頻度の差があった 2 構造、7512、7603 を以降の診断アルゴリズム構築に使用した。



(図 8)
図 7 7512 糖鎖の Erexim プロファイル

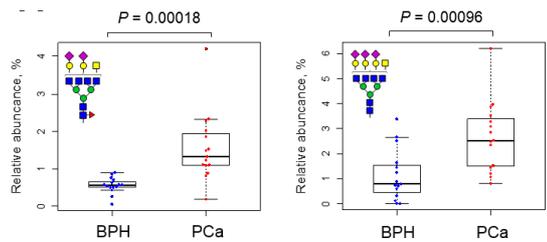


図 8 7512、7603 糖鎖の疾患群別付加頻度分布

上記 2 構造の実測値を利用して、ロジスティック回帰式を構築し、2 疾患群をよりの確に診断できる式 (PSA G-index) を作成した。前出のスクリーニング症例セットを PSA G-index によって評価した結果が図 9 左である。ここに示すとおり、一例の偽陰性を除き残り 29 症例は全て正しい疾患群に診断されることが分かる。

さらに、構築した前立腺癌高特異度糖鎖サブタイプマーカー-PSA G-index について、独立症例セットを用いたブラインド診断能検証試験、Gleason スコアとの相関解析、および組織中の標的糖鎖構造発現解析を実施した。現行の PSA 検査において高い疑陽性率が問題となっているグレーゾーン (PSA 4-10 ng/ml) に該当する前立腺癌 15 症例、前立腺肥大症 (BPH) 15 症例を含む 30 サンプルをランダム化し、確立した Mass spectrometric oxonium ion monitoring 法による分析、PSA G-index による診断を実施した結果、全例が病理診断による確定診断結果と一致した (図 9 右)。

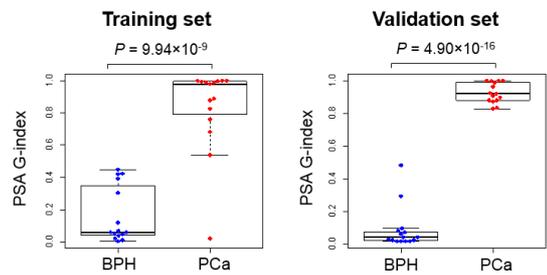


図 9 PSA G-index による診断結果

同症例群を現行の PSA 検査、PSA f/T 比検査によって診断した結果を ROC 曲線で評価すると、曲線下面積 (AUC) がそれぞれ 0.50、0.60 となり、PSA G-index の 1.00 はそれら

より遥かに診断精度が高いことを示す結果となった(図10)。

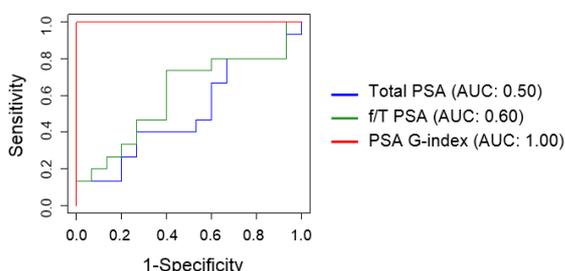


図10 Validation set を用いた Total PSA テスト、f/T PSA テスト、PSA G-index による診断結果の ROC 曲線

また、Gleason スコア 6-9 の前立腺癌患者 77 症例の血清を用いて PSA G-index の構築に使用した 2 糖鎖構造の付加頻度を調べたところ、Jonckheere-Terpstra テストにおいて $p = 3.34 \times 10^{-8}$ 、 $p = 2.56 \times 10^{-9}$ の有意差をもって両者が強い相関を示すことが分かった。

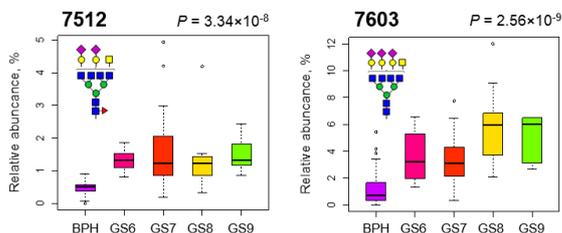


図11 7512、7603 糖鎖付加頻度と Gleason スコアの相関

さらに、これら 2 構造の部分構造を特異的に認識するレクチン 2 種を用いて 152 症例からなる組織アレイレクチン染色を行った結果、正常前立腺組織 10 例と BPH 組織 31 例からなるコントロール群と比べて、前立腺癌組織 111 例において、上記 2 種レクチン強染色例の割合が 9.00、2.24 倍高いことが示された。

今後本研究の成果を診断薬企業などと協同して臨床実用化することで、擬陽性の排除による患者の肉体的精神的苦痛の低減、的確で迅速な治療介入による治療成績の向上、さらに劇的な医療費の削減が期待できる。

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 23 件)

1) Proteomic Analysis of Extracellular Vesicles for Cancer Diagnostics. Wu, A.Y., Ueda, K., and Lai, C.P. *Proteomics*, (2019)

19, e1800162.

2) Prospective exosome-focused translational research for afatinib study of non-small cell lung cancer patients expressing EGFR (EXTRA study). Okuma, Y., Morikawa, K., Tanaka, H., Yokoyama, T., Itani, H., Horiuchi, K., Nakagawa, H., Takahashi, N., Bessho, A., Soejima, K., Kishi, K., Togashi, A., Kanai, Y., Ueda, K., Horimoto, K., Matsutani, N., and Seki, N. *Thorac Cancer*, (2019) 10, 395-400.

3) Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1 promotes tumorigenesis in RCC. Jingushi, K., Uemura, M., Nakano, K., Hayashi, Y., Wang, C., Ishizuya, Y., Yamamoto, Y., Hayashi, T., Kinouchi, T., Matsuzaki, K., Kato, T., Kawashima, A., Ujike, T., Nagahara, A., Fujita, K., Ueda, K., Tsujikawa, K., and Nonomura, N. *Oncol Rep*, (2019) 41, 1293-1303.

4) Identification of Multisialylated LacdiNAc Structures as Highly Prostate Cancer Specific Glycan Signatures on PSA. Haga, Y., Uemura, M., Baba, S., Inamura, K., Takeuchi, K., Nonomura, N., and Ueda, K. *Analytical chemistry*, (2019) 91, 2247.

5) Citrullination of RGG Motifs in FET Proteins by PAD4 Regulates Protein Aggregation and ALS Susceptibility. Tanikawa, C., Ueda, K., Suzuki, A., Iida, A., Nakamura, R., Atsuta, N., Tohnai, G., Sobue, G., Saichi, N., Momozawa, Y., Kamatani, Y., Kubo, M., Yamamoto, K., Nakamura, Y., and Matsuda, K. *Cell Rep*, (2018) 22, 1473-1483.

6) Extracellular vesicles isolated from human renal cell carcinoma tissues disrupt vascular endothelial cell morphology via azurocidin. Jingushi, K., Uemura, M., Ohnishi, N., Nakata, W., Fujita, K., Naito, T., Fujii, R., Saichi, N., Nonomura, N., Tsujikawa, K., and Ueda, K. *Int J Cancer*, (2018) 142, 607-617.

7) Critical Role of Estrogen Receptor Alpha O-Glycosylation by N-Acetylgalactosaminyltransferase 6 (GALNT6) in Its Nuclear Localization in Breast Cancer Cells. Deng, B., Tarhan, Y.E., Ueda, K., Ren, L., Katagiri, T., Park, J.H., and Nakamura, Y. *Neoplasia*, (2018) 20, 1038-1044.

8) Effects of SMYD2-mediated EML4-ALK methylation on the signaling pathway and growth in non-small-cell lung cancer cells. Wang, R., Deng, X., Yoshioka, Y., Vougiouklakis, T., Park, J.H., Suzuki, T., Dohmae, N., Ueda, K., Hamamoto, R., and Nakamura, Y. *Cancer Sci*, (2017) 108, 1203-1209.

9) Regulation of tubular recycling

endosome biogenesis by the p53-MICALL1 pathway. Takahashi, Y., Tanikawa, C., Miyamoto, T., Hirata, M., Wang, G., Ueda, K., Komatsu, T., and Matsuda, K. *International journal of oncology*, (2017) 51, 724-736.

10) EPSIN 3, A Novel p53 Target, Regulates the Apoptotic Pathway and Gastric Carcinogenesis. Mori, J., Tanikawa, C., Ohnishi, N., Funachi, Y., Toyoshima, O., Ueda, K., and Matsuda, K. *Neoplasia*, (2017) 19, 185-195.

11) Argininosuccinate synthase 1 is an intrinsic Akt repressor transactivated by p53. Miyamoto, T., Lo, P.H.Y., Saichi, N., Ueda, K., Hirata, M., Tanikawa, C., and Matsuda, K. *Sci Adv*, (2017) 3, e1603204.

12) MiR-21-5p in urinary extracellular vesicles is a novel biomarker of urothelial carcinoma. Matsuzaki, K., Fujita, K., Jingushi, K., Kawashima, A., Ujike, T., Nagahara, A., Ueda, Y., Tanigawa, G., Yoshioka, I., Ueda, K., Hanayama, R., Uemura, M., Miyagawa, Y., Tsujikawa, K., and Nonomura, N. *Oncotarget*, (2017) 8, 24668-24678.

13) p53-independent p21 induction by MELK inhibition. Matsuda, T., Kato, T., Kiyotani, K., Tarhan, Y.E., Saloura, V., Chung, S., Ueda, K., Nakamura, Y., and Park, J.H. *Oncotarget*, (2017) 8, 57938-57947.

14) GALNT6 Stabilizes GRP78 Protein by O-glycosylation and Enhances its Activity to Suppress Apoptosis Under Stress Condition. Lin, J., Chung, S., Ueda, K., Matsuda, K., Nakamura, Y., and Park, J.H. *Neoplasia*, (2017) 19, 43-53.

15) Morphological Changes, Cadherin Switching, and Growth Suppression in Pancreatic Cancer by GALNT6 Knockdown. Tarhan, Y.E., Kato, T., Jang, M., Haga, Y., Ueda, K., Nakamura, Y., and Park, J.H. *Neoplasia*, (2016) 18, 265-272.

〔学会発表〕(計 52 件)

1) エクソソームの高深度プロテオミクス解析による癌微小環境ネットワークの解明. 植田幸嗣. *ConBio2017*, (2017)

2) A proteome-wide catalog of extracellular vesicles, toward development of cancer liquid biopsy diagnostics. Ueda, K. *第 76 回日本癌学会学術総会*, (2017)

3) Exosomal Liquid Biopsy for Early Detection of Kidney Cancer. Ueda, K. *The 4th Annual US Japan Workshop on Cancer Biomarkers*, (2017)

4) Microenvironmental communications within gastrointestinal cancer tissue illustrated by proteome analysis of

exosomes. Ueda, K. *第 75 回日本癌学会学術総会*, (2016)

5) Proteogenomic profiling of neoantigens for personalized cancer immunotherapy. Ueda, K. *HUPO 2016*, (2016)

6) Mass spectrometric characterization of exosomes for realization of cancer liquid biopsy. Ueda, K. *RIKEN-Max Planck Joint Research 5th Annual Symposium*, (2016)

7) Proteome-wide Profiling of Circulating Exosomes for Identification of Scirrhous Gastric Cancer Biomarkers. Ueda, K. *International Society for Extracellular Vesicles 2015*, (2015)

〔図書〕(計 10 件)

1) 糖鎖構造の不均一性を定量化する - Exxim 法によるバイオ医薬品エンジニアリング. 芳賀淑美, and 植田幸嗣. *実験医学別冊 (35)9*, (2017) 羊土社, 1428-1433.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 前立腺がん診断インデックス、及びこれをを用いた検査方法

発明者: 植田幸嗣、芳賀淑美

出願番号: 特願 2018-131774

出願日: 2018/7/11

出願国: 日本

取得状況 (計 1 件)

名称: 糖鎖構造の解析方法

発明者: 植田幸嗣、遠山敦彦

権利者: 国立研究開発法人理化学研究所, 株式会社島津製作所

種類: 特許権

番号: 6222630 (JP) 10-1498801 (KR) 8822917 (US)

取得年月日: 2017/10/13

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ

<https://biomarker.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 幸嗣 (UEDA, Koji)

公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター がんオーダーメイド医療開発プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号: 10509110