

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861277

研究課題名(和文)糖鎖抗原RM2に基づく糖蛋白を指標とした新規前立腺癌診断マーカーの探索

研究課題名(英文) Investigation of novel diagnostic biomarkers for prostate cancer based on RM2 antigen

研究代表者

須田 哲司(SUDA, Tetsuji)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40423347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌の糖鎖抗原RM2は、免疫組織学的解析の結果、前立腺癌特異的で悪性度を反映し、新しいマーカーとなり得る。しかし、この抗原を持つ前立腺癌特異的な糖蛋白は未だ明らかとなっていない。我々は、RM2抗体が強く認識する50kDaの糖蛋白を中心にアミノ酸解析を行い、各標的蛋白の診断マーカーとしての有用性を解析した。前立腺癌の免疫組織学的解析により、この標的蛋白はグリーンスコアと相関し、悪性度を反映した。また、その他の臨床病理学的所見とも相関し、診断補助因子となり得ることが示唆された。標的糖蛋白の一つは、前立腺癌患者において尿中蛋白量が減少し、体外診断マーカーとなり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although RM2 antigen is a new histological marker for prostate cancer that may reflect the tumor stage, the target proteins carrying RM2 antigen are yet unclear. To identify the target proteins, we focused on amino acid sequence of the 50kDa protein that reacts strongly to RM2 antibody. Histological expression of several candidate proteins in prostate cancer was significantly associated with Gleason score. Among these, urine level of a candidate protein in the patients with prostate cancer decreased compared to those with benign prostate. These results suggested that these candidate proteins would be useful as a new histological or urine marker of prostate cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：前立腺癌 糖鎖 糖蛋白

1. 研究開始当初の背景

現在、前立腺癌の診断に用いられている PSA レベルは良性前立腺肥大症や前立腺炎でも増加するため、悪性度の高い癌のみを診断出来ない欠点がある。従って、「臨床的に有用な新しい前立腺癌特異的診断マーカーの探索」が急務である。

これまでに我々は、前立腺癌特異的な糖鎖に着目した解析から、新規糖鎖である β 1,4-GalNAc-diacetyl Lc4 (RM2 抗原) を同定し、その RM2 抗原に対する糖鎖抗体 (RM2 抗体) を作製した。免疫組織学的解析の結果、RM2 抗原は前立腺癌細胞特異的で、グリーンスコア (GS) と強い相関を示し、悪性度を反映する新しいマーカーとなり得ることを明らかにした。この RM2 抗原を持つ糖蛋白を明らかにするため、RM2 抗体が認識する血清中蛋白をアミノ酸解析した結果、その一つはハプトグロビン β 鎖であった。更に、前立腺癌細胞株によるウエスタンブロット解析の結果、RM2 抗体はハプトグロビン β 鎖の約 40kDa 以外に、50kDa の分子も強く認識していることが明らかとなった (図 1)。

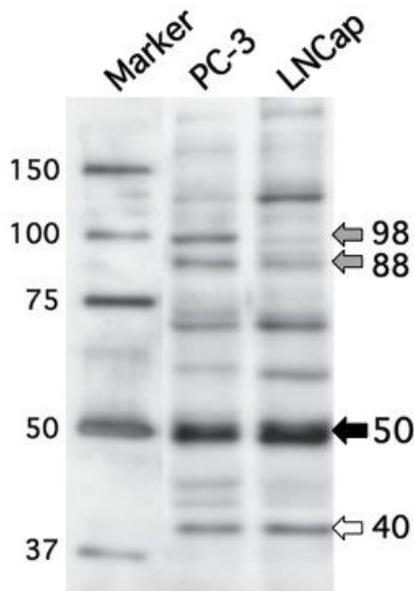


図 1 RM2 認識糖蛋白

また、98kDa と 88kDa の糖蛋白はアンドロゲン非依存性細胞株 PC-3 において強く発現し、ホルモン抵抗性の増殖シグナルに関わっていると考えられた。

これらの結果から、RM2 抗原を持つ糖蛋白は前立腺癌の有用な診断マーカー候補と考えられ、当該糖蛋白の腫瘍組織における発現量や細胞内局在の違いは前立腺癌の増殖や悪性度の違いを反映している可能性が考えられた。しかし、未だこれらの糖蛋白は同定されておらず、詳細は不明なままである。

2. 研究の目的

本研究において、RM2 抗原を持つ 50kDa 糖

蛋白を明らかにし、多検体の前立腺癌患者を対象とした尿中・血中濃度と臨床所見との関連性解析から、新規診断マーカーとしての有用性を検証する。更に、腫瘍組織における臨床病理学的解析から悪性度やホルモン療法抵抗性との関連性を明らかにすることを目的とした。これらの解析から、RM2 糖蛋白と悪性度との関連性が明らかとなれば、従来の PSA の欠点を補う新たなスクリーニング検査としての発展が予想される。また、当該糖蛋白が関与する増殖や転移に関わるシグナル分子の解析により、これらも診断補助として利用出来るのみならず、新たな治療標的となり得、従来のホルモン療法や抗癌剤との併用へと展開できる。

3. 研究の方法

(1) RM2 抗体の精製

これまで解析は、RM2 ハイブリドーマ培養細胞の培養上清を利用してきた。本研究ではハイブリドーマ培養上清中の RM2 抗体以外の夾雑物による非特異反応を減らすため、まず RM2 抗体産生細胞を大量培養し、培養上清から RM2 モノクローナル抗体を精製する。

(2) RM2 抗原を持つ前立腺癌特異的糖蛋白の同定

前立腺癌由来細胞株 (DU145, PC-3, LNCaP) と正常前立腺由来細胞株 (PrEC) から蛋白質を抽出し、RM2 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行う。その後、正常前立腺由来細胞株と比較して、前立腺癌由来細胞株で RM2 抗体により強く認識される分子量の糖蛋白をゲルから切り出し、LC-MS/MS を用いたアミノ酸解析によって候補蛋白群を同定する。更に、データベース解析および文献的報告から、新規診断マーカーとなり得る候補蛋白を絞り込む。

(3) 候補蛋白の特異性解析と標的蛋白の決定

アミノ酸解析から明らかとなる候補蛋白に対する抗体を入手し、前立腺癌細胞株および正常前立腺由来細胞株を用いたウエスタンブロット解析を行い、発現パターンから腫瘍特異的な糖蛋白を決定し、標的蛋白とする。

(4) 組織・血清・尿検体における診断マーカーとしての有用性の検討

前立腺癌細胞株の解析から明らかになる標的糖蛋白の抗体を用いて、前立腺癌患者および良性疾患患者由来の血清および尿中の標的蛋白濃度を ELISA 解析により測定し、PSA レベルや生化学検査所見および臨床所見との関連性を解析する。本 ELISA は当該標的蛋白に対する抗体のみを用いた解析のため、RM2 抗原を持つ糖鎖と持たない糖鎖との両方を検出すると考えられる。そこで、標的抗体と RM2 抗体とのサンドイッチ ELISA を構築し、同様に解析し、RM2 搭載糖蛋白量と臨床所見との関連性を明らかにする。以上の解析に基づき、当該糖蛋白の体外診断マーカーとしての有用性を評価する。

組織における診断マーカーとしての有用性の解析は、前立腺癌の病理組織切片を用いた免疫組織学的解析を行う。標的蛋白に対する抗体を用いた免疫組織学的解析により、蛋白局在、発現量、腫瘍特異性および Gleason score 等臨床病理学的所見と悪性度との関連性を解析する。これらの解析結果を基に、当該糖蛋白が病理組織学的な診断マーカーおよび臨床的な血清・尿診断マーカーとして妥当か否か統計学的に解析し、有用性を評価する。

4. 研究成果

RM2 抗体によって強く認識される分子量の糖蛋白群をアミノ酸解析し、数十種の候補蛋白を同定した。データベース解析および文献的報告から候補蛋白を絞り込んだ後、候補蛋白に対する抗体を用いて、前立腺癌由来細胞株および正常前立腺由来細胞株に対するウエスタンブロット解析を行った。本解析により、P18, P57, P58, P64, P121 (仮称) 等、発現量に差のある糖蛋白が複数同定され、これらを標的蛋白とした (図 2)。

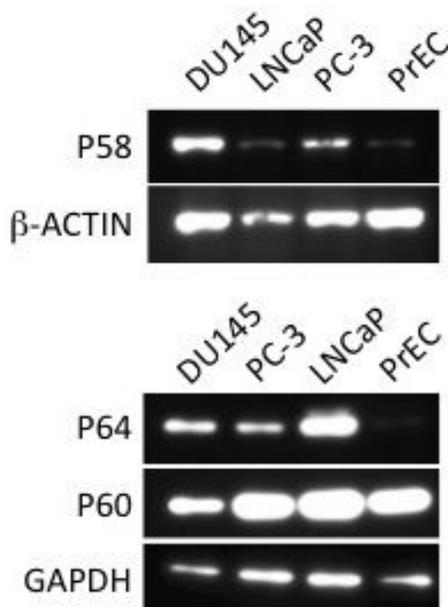


図 2. 前立腺癌細胞株における候補蛋白の発現解析

これらの標的蛋白に対する抗体を用い、前立腺癌の病理組織切片に対する免疫組織学的解析の予備的検討を行った。まず、腫瘍細胞上での発現が確認され、かつ、発現量と悪性度とが関連する傾向の認められた蛋白に候補を絞り、次に検体数を増やして免疫組織学的解析を行った。各検体の染色強度と臨床病理学的所見との関連性を解析した結果、P18 および P121 の免疫組織染色の染色強度とグリーソンスコアとが統計的に有意に相関した (表 1)。

表 1. P18, P121 免疫組織染色の染色強度とグリーソンスコア. p: 2 検定による

	P18 (n=69)		P121 (n=70)	
	Low	High	Low	High
グリーソンスコア				
5-7(3+4)	39	0	23	12
7(4+3)-10	9	21	12	23
	(p<0.001)		(p=0.008)	

そのため、これらの糖蛋白は悪性度を反映するマーカーとなり得ることが示唆された。更に P18 の高発現は臨床病理学的 T ステージ、前立腺外進展の有無、切除断端における癌浸潤の有無、精嚢浸潤の有無等とも相関し、治療方針を考える上で有用な指標となり得ることが示唆された。また、これらの結果から、当該糖蛋白の病理組織学的な解析は、患者の予後予測へと展開可能になるものと考えられ、現在、患者予後、生存期間ならびに再発の有無等の臨床所見との関連性を解析している。

また、本解析における標的蛋白の体外診断マーカーとしての有用性を明らかにするため、当該糖蛋白の細胞外分泌を解析した。ウエスタンブロット解析で細胞培養上清中に検出された P58, P64 に関して、標的糖蛋白を認識する 2 種類の抗体を用いた ELISA により、前立腺癌患者血清中の蛋白濃度を定量した。その結果、P58 は他の報告に比べ全体的に低濃度で、かつ、約半数の検体では検出限界以下となり、検出感度に課題が残った。P64 の ELISA においても低濃度の蛋白を検出出来ず、検出感度を向上する必要があった。さらに、この解析方法では RM2 搭載糖蛋白も非搭載糖蛋白も検出するため、RM2 特異的糖蛋白のみを検出出来ない欠点がある。そこで、現在検出感度と特異性の向上を目指した、当該糖蛋白の抗体と RM2 抗体とを用いた ELISA 検出系の樹立を試みている。

同様に、P57 の細胞外分泌を ELISA にて解析した。その結果、P57 の血清中への分泌は認められなかったが、尿中において検出された。尿中 P57 陽性患者は、前立腺癌患者と比較して良性疾患患者に多く、更に、前立腺癌患者の中では生検時のグリーソンスコアが高い患者ほど尿中 P57 濃度が低い傾向が認められた (図 3)。検体数は少ないが、同一患者における前立腺マッサージ前とマッサージ後との尿中 P57 濃度を比較解析した結果、前立腺マッサージ後において尿中量が増加したことから、この P57 は前立腺から分泌され、尿中に流入していると考えられた。前立腺組織における P57 の発現を明らかにするため、免疫組織学的解析を行った結果、P57 蛋白は前立腺腺管構造における腺上皮細胞に発現しており、基底層の細胞では陰性または弱い発現であった。

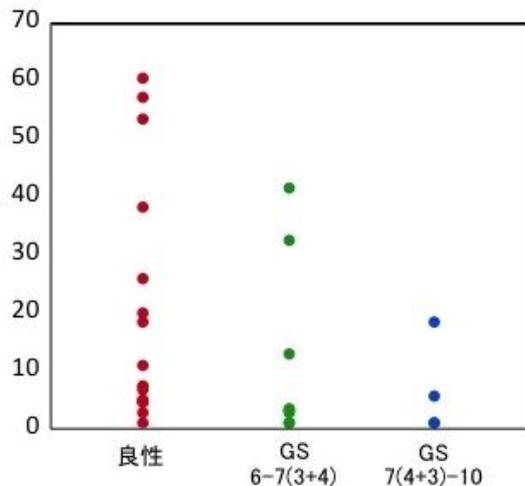


図3. 良性疾患患者および前立腺癌患の尿中 P57 濃度 (ng/ml)

前立腺癌組織においては、ELISA の結果と異なり、悪性度の高い癌組織ほど強く発現する傾向が認められた。しかし、腺管構造を取らない癌細胞と比べ、きれいな腺管構造を維持した癌細胞の細胞質では P57 染色強度が弱かった (図4)。

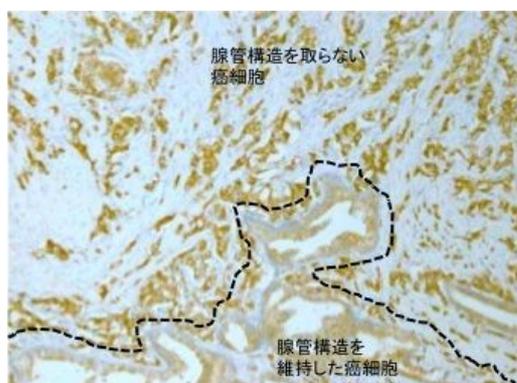


図4 .P57 抗体を用いた免疫組織染色像

この結果は癌の進行に伴い腺管外への分泌が抑えられる ELISA の結果に矛盾せず、当該糖蛋白は体外診断マーカーとなり得る可能性がある。しかし、P57 は全ての良性疾患患者の尿中において検出出来るわけではなく、臨床的な悪性度を反映するものであるかも明らかではないため、今後、検体数を増やした解析を進めると共に、RM2 糖鎖や PSA レベル等の因子を組み合わせると共に、診断精度を向上させる必要がある。

今回、前立腺癌特異的な糖鎖に着目した、新規診断マーカーとして有用な RM2 抗体認識糖蛋白の探索解析から、前立腺癌の悪性度を反映し病理診断マーカーとして有望な標的蛋白を同定した。また、良性疾患患者と前立腺癌患者における尿中蛋白の解析から、体外診断マーカーとして有望な標的蛋白を同定した。

今後は、これらの標的蛋白について検出感度と特異性を向上させ、診断補助因子として

の有用性を検証すると共に、他の検査結果と組み合わせて診断精度の向上を目指す。また、当該糖蛋白の前立腺癌における機能を明らかにし、治療標的としての有用性を検討していく。

<引用文献>

Saito S, Lavery SB, Salyan ME, Goldberg RI, Hakomori S. Common tetrasaccharide epitope NeuAc alpha 2-->3Gal beta 1-->3(Neu-Ac alpha 2-->6)GalNAc, presented by different carrier glycosylceramides or O-linked peptides, is recognized by different antibodies and ligands having distinct specificities. J Biol Chem, 1994,269: 5644-5652.

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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

<http://www.cc.u-ryukyu.ac.jp/~uro/katudou/index.html>

<http://www.med.u-ryukyu.ac.jp/category/research-brief>

6. 研究組織

(1)研究代表者

須田 哲司 (SUDA, Tetsuji)

琉球大学・医学研究科・助教
研究者番号：40423347

(2)研究分担者
無し

(3)連携研究者

斎藤 誠一 (SAITO, Seiichi)
琉球大学・医学研究科・教授
研究者番号：80235043

仲西 昌太郎 (NAKANISHI, Shotaro)
琉球大学・医学研究科・助教
研究者番号：40725321

(4)研究協力者

兼行 綾子 (KANEYUKI, Ayako)
須川 愛 (SUGAWA, Ai)