

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870002

研究課題名(和文) 血漿タンパク質LRGの翻訳後修飾に着目した膵癌早期診断マーカーの解析

研究課題名(英文) Protein expression analysis of leucine-rich alpha-2-glycoprotein in serum as a new diagnostic marker of pancreatic cancer focusing on the posttranslational modification

研究代表者

柿坂 達彦 (Kakisaka, Tatsuhiko)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：40583092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：早期診断が困難で予後不良な疾患である膵癌患者の血清を使用して、leucine-rich alpha-2-glycoprotein (以下LRG)が診断マーカーをなり得るかを検討した。膵癌患者68例、健常者10例の血清を使用し、ELISAによりLRGの発現量を検討した結果、健常者と比較して膵癌患者において有意にLRG値が高値であった。ステージ0- の症例でも健常者より高値を呈していた。さらにCA19-9が陰性の膵癌患者25症例中22例でLRGが高値を示しており、膵癌診断マーカーとしての可能性が示唆された。今後、LRGを血清から単離して、LRGに結合している糖鎖解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)： The prognosis of pancreatic cancer (PC) is extremely poor and it is difficult to diagnose PC in early stage. We analyzed leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LRG) in serum as a new diagnostic marker of PC. We used the serum of PC patients (n=68) and healthy volunteer (n=10) and analyzed the serum concentration of LRG by ELISA. We found that LRG levels of PC patients in all stages were significantly up-regulated compared with those of healthy volunteers. Moreover, LRG concentrations were highly expressed in 22 of 25 PC patients whose serum levels of CA19-9 were low. LRG is a candidate of new diagnostic marker of PC. We plan to isolate LRG from serum and analyze differentially expressed glycans of LRG in future research.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：膵癌 バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は発症早期に症状を呈さないことが多く、診断時には約8割がstageIVであり手術不能な場合も多く、予後不良な疾患である。早期診断マーカーの発見が望まれているが、現在汎用されているCA19-9は膵炎、胆管炎といった良性疾患で上昇する場合がある。さらに、日本人の約10%で認められるルイス式血液型抗原陰性例ではCA19-9が上昇しないといった問題点がある。

申請者はプロテオミクス的手法を用いて、血漿中のタンパク質を網羅的に解析しleucine-rich alpha-2-glycoprotein (以下LRG)が膵癌患者血漿中で有意に発現量が増加していることを発見した(Kakisaka T, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007)。LRGは約50kDaの血漿タンパク質であり、主に肝臓で産生される。LRGは血漿中のcytochrome Cと結合し、cytochrome Cによる細胞障害性を緩和していると報告されている。現在まで肺癌、卵巣癌、胆管癌といった他の癌種、あるいは潰瘍性大腸炎、クローン病、関節リウマチといった炎症性疾患においても血液中のLRGが上昇すると報告されている。血液検体以外でも、正常圧水頭症で髄液中のLRGが上昇するといった報告や、膀胱癌、肺癌、急性虫垂炎で尿中のLRGが上昇するといった報告がある。また近年、TGF- $\beta$ あるいはTNF- $\alpha$ シグナル下で血管新生に関わると報告されている。

### 2. 研究の目的

以上から、血液中のLRGは、特定の悪性疾患で上昇するというより、C-reactive protein(以下CRP)と同じような急性期タンパク質の一つであると考えやすい。しかし、申請者らの報告では炎症性タンパク質CRP低値の膵癌症例においてLRGの上昇を認めており、癌の存在がLRG産生を促している可能性を示唆している。

一方、糖タンパク質であるLRGには糖鎖結合によるアイソフォームが存在する。肝細胞癌におけるalpha fetoprotein (AFP)のL3分画が肝細胞癌に特異的であるように、膵癌に特異的なLRGのアイソフォームが存在する可能性がある。

本研究計画はLRGの翻訳後修飾に注目し、膵癌に特異的なLRGアイソフォームを発見しようとするものである。それにより、LRGが膵癌の革新的な早期発見マーカーとなる可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### (1) 膵癌患者血清中のLRG量の測定

ELISAの手法を用い、膵癌患者(n=68)健常者(n=10)のLRG量を測定した。測定には

Human LRG Assay Kit (IBL, Japan)を使用した。カテゴリカルデータはFisher's exact testを用いて比較し、また連続データの比較はStudent's t-testを用いた。p<0.05を有意とした。

#### (2) LRGの単離

膵癌患者血清の混合サンプルと健常者血清の混合サンプルを用い、高容量タンパク質であるAlbumin、IgGを取り除いた後、抗LRG抗体とprotein Gを用いてLRGを単離・生成する。

#### (3) LRGの糖鎖解析

単離したLRGからグライコプロットングの手法を用いて糖鎖を単離し、質量分析で糖鎖解析を行う。それにより、膵癌患者に特異的な糖鎖を同定する。

### 4. 研究成果

(1) 膵癌患者、健常者の背景をTable 1に示した。膵癌患者の内訳はStage 0、I、II、III、IVa、bがそれぞれ1、6、2、21、38人で、stage Iの割合が高かった(膵癌取り扱い規約第6版)。健常者が有意に若いという結果であった。膵癌患者で上昇するとされるCA19-9が<1U/ml以下を呈する患者を8人(11.8%)認めた。

Table 1 患者背景

		膵癌患者 (n=68)	健常者 (n=10)	p
年齢		63.9±9.0	33.6±4.5	<0.0001*
性別	男	39	8	0.30 <sup>†</sup>
	女	29	2	
T	0	1	n/a	
	1	6		
	2	2		
	3	21		
	4	38		
N	0 / 1 / 2	45 / 4 / 19		
	M	0 / 1	57 / 11	
Stage	0	1	n/a	
	I	6		
	II	2		
	III	10		
	IVa	30		
	IVb	19		
LRG	(ng/ml)	29.6±4.4	20.8±4.5	<0.0001
CEA	(ng/ml)	8.3±15.5	n/a	
CA19-9	(U/ml)	272.9±585.3	n/a	

\* Student's T test, <sup>†</sup>Fisher's exact test

次いで採取した血清に対してELISAの手法を用いてLRG量の測定を行った。健常者のLRG量は20.8±4.5ng/mlであるのに対し、膵癌患者のLRG量は296±4.4ng/mlと有意に膵癌患者血清中でLRG濃度が高かった(Figure 1)。ROC曲線を作成し、cut-off値を25.6ng/mlに設定した場合、感度83.3%、特異度100%、AUC 0.94という結果であった(Figure 2)。

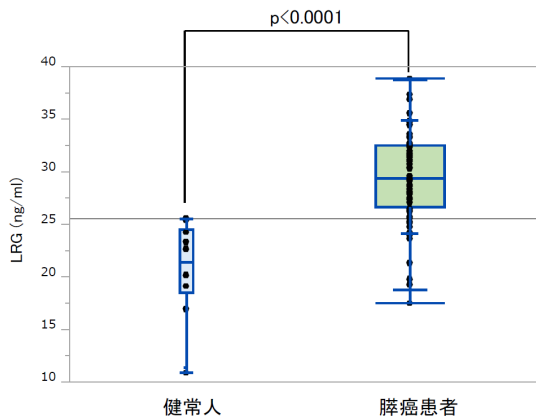


Figure 1 LRG 濃度測定結果

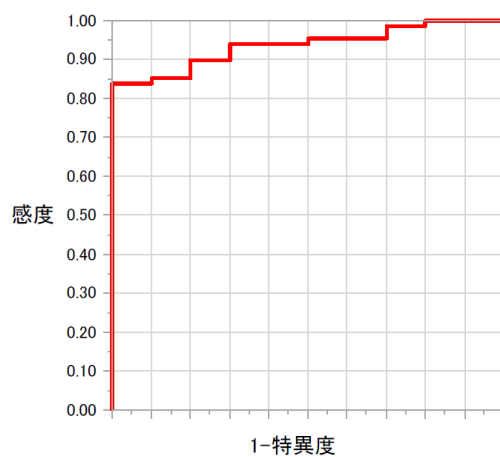


Figure 2 LRG 濃度測定に関する ROC curve

さらに、膵癌 stage ごとに LRG 発現量を比較検討した。Stage 0、I、II に関しては症例数が少ないため、同一群として解析を行った。各群とも、健常者の LRG 濃度と比較して有意に発現量が増加していることが示された。膵癌の stage 0-I 群と他の stage 群で発現量を比較すると、stage II 群との間で有意差を認められたものの、他の群との有意差を認めなかった (Figure 3)。

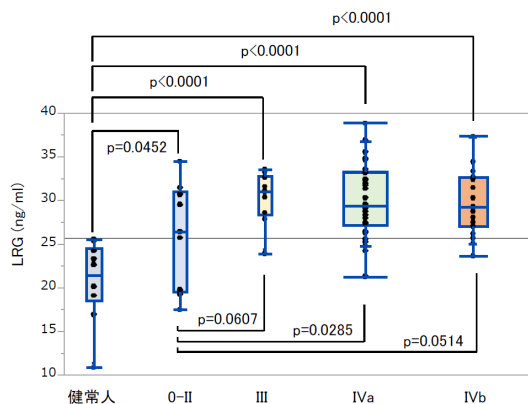


Figure 3 LRG 濃度の stage 間比較

この結果から、LRG 測定により局所進展、他臓器転移といった進行度予測は困難であるが、膵癌診断に関しては早期の stage から上昇を認めており、膵癌診断マーカーとしての可能性が示唆された。

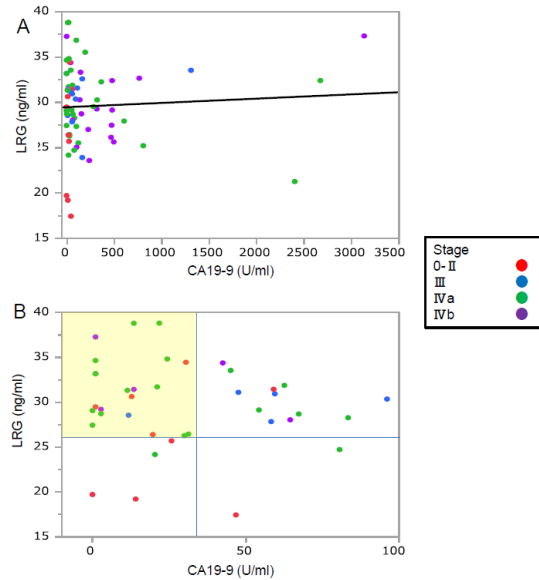


Figure 4 A : LRG と CA19-9 の相関関係、B : CA19-9 <math>< 100</math> U/ml の拡大図

さらに、LRG と CA19-9 関係をみてみると、相関係数 0.062、 $p=0.62$  であり、有意な相関は認めなかった (Figure 4A)。また、CA19-9 陰性 (37 U/ml) 症例 25 例中、22 例 (88%) が LRG 陽性 (25.6 ng/ml) であった (Figure 4B 黄色の範囲)。この結果から CA19-9 陰性膵癌を術前診断できる可能性があると考えられた。

実験 (2) に関しては、LRG 単離の手法の確立に時間を要しており、現在実験が進行中の段階である。十分量の LRG が単離された後、(3) に記載したグライコプロッティングの手法を用い、糖鎖解析を行い、膵癌特異的な糖鎖の解析を施行する予定である。

### 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 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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

柿坂 達彦 (KAKISAKA, Tatsuhiko)  
北海道大学・大学院医学研究院・客員研  
究員  
研究者番号：40583092

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし