

令和 2 年 4 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16770

研究課題名(和文) 血清N-結合型糖鎖の網羅的質量解析による腎盂・尿管癌の糖鎖バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Aberrant N-Glycosylation Profile of Serum Immunoglobulins is a Diagnostic Biomarker of Urothelial Carcinomas

研究代表者

今西 賢悟 (Imanishi, Kengo)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：10793648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎盂・尿管癌の診断は尿細胞診、画像診断、侵襲を伴う尿管鏡によって行われているが、感度、特異度ともに十分な状態ではなく、低侵襲かつ有効なバイオマーカーもない。本研究では血清イムノグロブリンN型糖鎖構造の網羅的質量解析により、尿細胞診を凌駕する腎盂・尿管癌診断バイオマーカーとして有用なイムノグロブリンの糖鎖変異を同定した。質量分析法を使用するため、汎用性に欠け、臨床応用を前に停滞していたため、さらに短時間で網羅的にイムノグロブリンN型糖鎖を解析可能なキャピラリー電気泳動N型糖鎖解析装置を用いた腎盂・尿管癌の新規診断マーカーの臨床応用を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎盂・尿管癌の診断において、尿細胞診は中核となる診断法の一つであるが、その感度は低く、進行度との相関関係も低いとされている。近年、CT urographyが腎盂・尿管癌診断の第一選択とされているが、CISや小径腫瘍では偽陰性の危険性が高い。また、尿管鏡検査も癌の検出、確定診断に有用であるとされているが、尿管鏡下腫瘍生検の癌確定における陽性的中率は決して高いものではない。さらに約60%が発見段階で、局所進行性もしくは転移性であることが多く、予後不良の疾患であり、早期発見が極めて重要である。尿細胞診を凌駕する低侵襲な腎盂・尿管癌診断マーカーの実用化は治療効果向上につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Urothelial carcinomas (UCs) are the eighth-most lethal cancer in men in the United States. The standard examinations are performed, involving urine cytology, urinary tract imaging and cystoscopy, which are powerful diagnostic tools for UCs. However, Urine cytology is not reliable in patients with early stage UCs, including UTUC, and it is difficult to visualise small tumors via imaging modalities, such as ultrasound or computed tomography. Thus, more sensitive and non-invasive biomarkers, such as serum-based biomarkers, to avoid under-detection in patients at high risk of UCs is required. In the present study, we performed N-glycomics of serum Igs fractions between healthy volunteers (HVs), prostate cancer (PC) and UCs patients to identify the UC-specific aberrant N-glycosylated Igs. Furthermore, for clinical applications, we established a diagnostic NGScore (dNGScore) based on a combination of five N-glycans of Igs associated with detection of UCs.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：腎盂・尿管癌 糖鎖バイオマーカー 質量解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎盂・尿管癌の診断において、尿細胞診は中核となる診断法の一つであるが、尿細胞診の感度は低く、進行度との相関関係も低いとされている。近年、CT urography が腎盂・尿管癌診断の第一選択とされているが、CIS や小径腫瘤では偽陰性の危険性が高い。また、尿管鏡検査も癌の検出、確定診断に有用であるとされているが、尿管鏡下腫瘍生検の癌確定における養成的中率は決して高いものではない。最近、血清中 N-結合型糖鎖の構造を網羅的に質量解析する方法が開発され、弘前大学泌尿器科では様々な病態を予知するバイオマーカー開発への応用を試みてきた。腎盂・尿管癌の診断は尿細胞診、画像診断、尿管鏡などによって行われているが、感度、特異度ともに十分な状態ではない。

2. 研究の目的

本研究では、健常者、腎盂・尿管がん患者血清から、Melon Gel によってイムノグロブリン分画を精製し、全自動糖鎖前処理装置および質量分析装置を用いて血清イムノグロブリンの N-結合型糖鎖の網羅的質量解析を実施する。得られた疾患特異的糖鎖候補を選択し、これらの糖鎖を組み合わせた diagnostic N-glycan score を算出し、腎盂・尿管癌の診断精度を ROC 解析によって検証する。

3. 研究の方法

腎盂・尿管癌と関連する N-結合型糖鎖を同定するために、全自動糖鎖解析前処理装置 (SweetBlot) 及質量分析装置を使用して、血清 N-結合型糖鎖の網羅的質量解析を行う。

4. 研究成果

膀胱癌(UCB, 177 例)、上部尿路上皮癌(UTUC, 60 例)および前立腺癌(PC, 96 例)患者の血清、および岩木町住民検診より採取された健常人(339 例)の血清のイムノグロブリン (Ig)分画を精製し、質量分析法による N-glycomics により、血清 Ig 由来 32 種の N-glycan プロファイルを同定した。患者背景を表 1 に示す。

表 1 患者背景

	Non-UC ^a		UC ^b	p Value a vs. b	
	HV	n, (%)	PC		n, (%)
Total patients (n)		339	96	237	
Sex (Male, %)		122 (36.0)	96 (100)	191 (80.6)	<0.001
Median age (IQR ¹)		68.0 (63–73)	74.0 (68–78)	70.0 (62–75)	0.700
Former or current smoker		75 (22.1)	18 (18.8)	71 (29.9)	0.101
Stone former		4 (1.2)	0 (0)	0 (0)	0.184
BPH ²		7 (2.1)	0 (0)	0 (0)	0.145
HSPC ³		0 (0)	96 (100)	0 (0)	<0.001
hematuria+		0 (0)	0 (0)	186 (78.5)	<0.001
Urine Cytology Class					
I, II				81 (34.2)	
III				58 (24.5)	
IV				16 (6.7)	
V				82 (34.6)	
Tumor Location of UC					
Bladder				177 (67.6)	
Renal pelvis				27 (11.4)	
Ureter				28 (11.8)	
Multiple				4 (1.7)	
Tumor Grade of UC					
Low grade noninvasive				68 (28.7)	
High grade noninvasive				43 (18.1)	
Muscle invasive				109 (45.9)	
Lymph node stage N1			0 (0.0)	20 (8.4)	0.115
Metastatic disease			4 (4.2)	47 (19.8)	0.010

¹ IQR, Interquartile range; ² BPH, benign prostatic hyperplasia; ³ HSPC, hormone sensitive prostate cancer; HV: healthy volunteers; PC: prostate cancer. ^a non-urothelial carcinoma; non-UC: ^b urothelial carcinoma; UC.

判別分析により UC 検出に関連する 5 種の N-glycan 濃度と判別分析により得られた判別関

数を乗算し、積算したスコアを diagnostic N-glycan score(dNGScore)として以下の計算式で算出した(計算式(1)、表2および図1)。

表2. 判別分析による UC の予測.

Variables	Wilks' Lambda	F Value	ODF ¹	TDF ²	p Value	Discriminant Function
<i>m/z</i> 1606	0.9742	17.72	1	670	<0.001	0.1925
<i>m/z</i> 1769	0.9707	20.24	1	670	<0.001	0.4932
<i>m/z</i> 2074	0.9377	44.54	1	670	<0.001	0.4941
<i>m/z</i> 2118	0.5894	466.73	1	670	<0.001	-3.2460
<i>m/z</i> 2423	0.9984	1.04	1	670	<0.001	0.6179
Constant term						-0.4905

¹ ODF, one degree of freedom; ² TDF, two degrees of freedom.

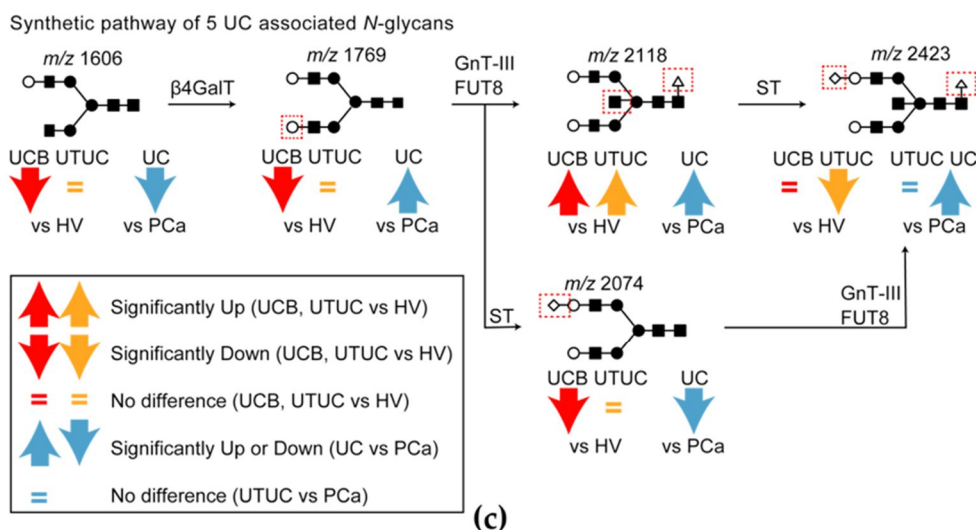
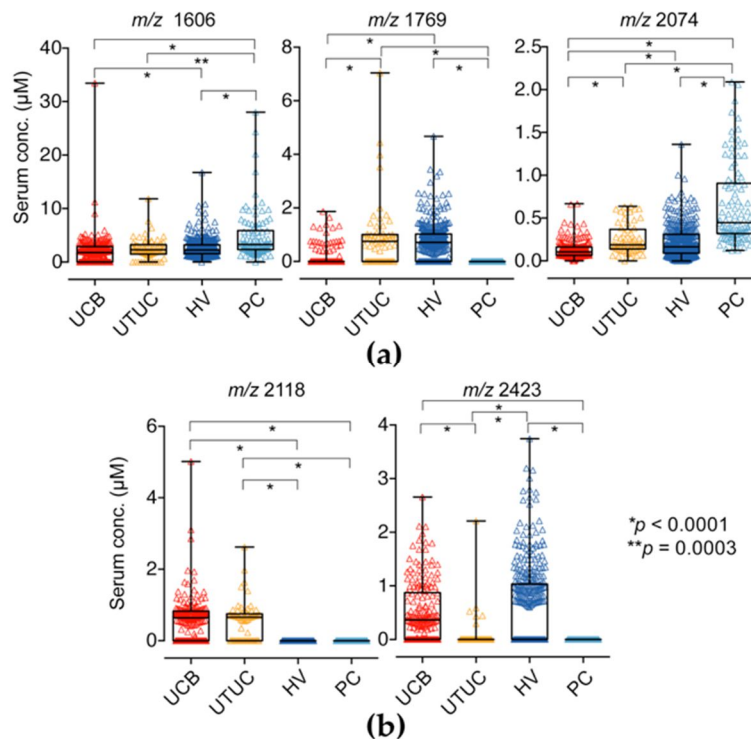


図1. UCに関連する5種の糖鎖修飾イムノグロブリン (a) 複合型2分岐N型糖鎖 (*m/z* 1606, 1769 and 2074)の血清濃度(b) フコシル化バイセクティングGlcNAc N型糖鎖 (*m/z* 2118 and 2423)の血清濃度. (c) UCに関連する5種合成経路と濃度変動。イコールは健常者群あるいは、前立腺癌患者と比較して、濃度変動なし、上向き矢印は、有意に濃度、下向き矢印は、有意に濃度減少したことを示す。

5種のN-glycanがUCの検出に関連する糖鎖として選択された。5種のN-glycanの血中濃度と合成経路の関係から、特に asialo bisecting N-glycan(*m/z* 2118)および(*m/z* 2118)、monosialyl bisecting N-glycan (*m/z* 2423)糖鎖修飾血清IgがUCB患者で蓄積することが明ら

かとなった。さらに UTUC では、asialo bisecting N-glycan(m/z 2118)が顕著に蓄積し、UCB と UTUC のイムノグロブリン N-glycan プロファイルが少し異なることが明らかとなった (図 1)。dNGScore による UC の診断に関する ROC 解析から UC の診断精度 (AUC 0.969) は、既存検査を遥かに凌駕した (図 2、表 3)。

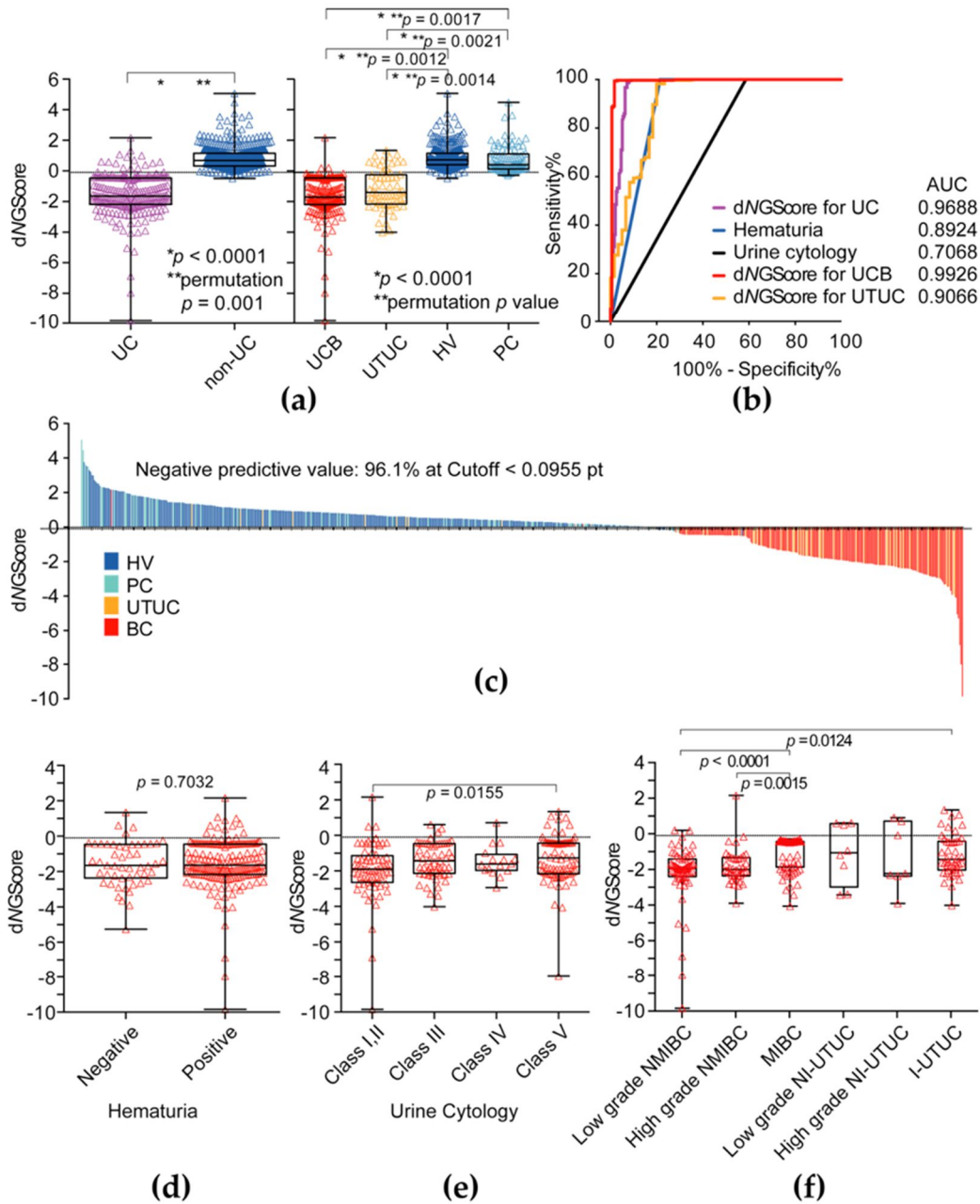


図 2. dNGScore による UC 検出に関する臨床有用性 (a) 各患者群における dNGScore 値 (b) dNGScore 値、血尿、尿細胞診による腎盂尿管がん (UC)、膀胱がん (UCB)、上部尿路上皮癌 (UTUC) の ROC 解析 (c) 各患者群における dNGScore 値のウォーターフォールプロット (d) dNGScore 値と血尿有無 (e) dNGScore 値と尿細胞診 (f) dNGScore 値と癌深達度の関連

表 3. 各検査法における UC 診断能の比較

Variables	AUC	95% CI	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Hematuria	0.892	0.861–0.924	78.5	100.0	100.0	89.5
Urine cytology	0.707	0.661–0.753	41.4	100.0	100.0	75.8
dNGScore ¹ for UC	0.969	0.952–0.986	92.8	97.2	94.8	96.1
dNGScore for UCB	0.993	0.982–1.000	98.3	97.2	93.5	99.3
dNGScore for UTUC	0.907	0.854–0.959	77.1	97.2	79.7	96.8

¹ dNGScore, diagnostic N-glycan score.

さらに dNGScore は、血尿陰性あるいは、尿細胞診陰性の患者でも癌検出が可能であり、癌

の深達度との関連は、認められなかった(図 2d,e,f)。

以上の結果から 5 種類の血清イムノグロブリン糖鎖濃度から、算出した dNGScore は、腎盂・尿管癌の診断において、既存検査である尿細胞診の診断精度を遥かに凌駕し、臨床的に有用であることが示された。しかしながら、質量分析法では、臨床応用が難しいため、今後、GlyQ キャピラリー電気泳動装置による迅速糖鎖解析法を用いて臨床応用を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okamoto Teppei, Tsutaya Chikako, Hatakeyama Shingo, Konishi Sakae, Okita Kazutaka, Tanaka Yoshimi, Imanishi Kengo, Takashima Tooru, Saitoh Fumitada, Suzuki Tadashi, Ohyama Chikara	4. 巻 50
2. 論文標題 Low serum butyrylcholinesterase is independently related to low fetuin-A in patients on hemodialysis: a cross-sectional study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Urology and Nephrology	6. 最初と最後の頁 1713 ~ 1720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11255-018-1957-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Okamoto Teppei, Hatakeyama Shingo, Hosogoe Shogo, Tanaka Yoshimi, Imanishi Kengo, Takashima Toru, Saitoh Fumitada, Suzuki Tadashi, Ohyama Chikara	4. 巻 13
2. 論文標題 Proton pump inhibitor as an independent factor of progression of abdominal aortic calcification in patients on maintenance hemodialysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0199160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0199160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Okamoto Teppei, Hatakeyama Shingo, Tanaka Yoshimi, Imanishi Kengo, Takashima Tooru, Saitoh Fumitada, Koie Takuya, Suzuki Tadashi, Ohyama Chikara	4. 巻 22
2. 論文標題 Butyrylcholinesterase level as an independent factor of erythropoiesis-stimulating agent resistance in patients on maintenance hemodialysis: a single-center cross-sectional study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 1174 ~ 1181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-018-1569-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tanaka Toshikazu, Yoneyama Tohru, Noro Daisuke, Imanishi Kengo, Kojima Yuta, Hatakeyama Shingo, Tobisawa Yuki, Mori Kazuyuki, Yamamoto Hayato, Imai Atsushi, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Koie Takuya, Tanaka Masakazu, Nishimura Shin-Ichiro, Kurauchi Shizuka, Takahashi Ippei, Ohyama Chikara	4. 巻 18
2. 論文標題 Aberrant N-Glycosylation Profile of Serum Immunoglobulins is a Diagnostic Biomarker of Urothelial Carcinomas	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2632 ~ 2632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18122632	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Hagiwara K, Hatakeyama S, Oikawa M, Tanaka T, Narita T, Noro D, Imanishi K, Yoneyama T, Mori K, Imai A, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Tshuchiya N, Habuchi T, Arai Y, Ohyama C
2. 発表標題 Cost effectiveness comparison between neoadjuvant chemo-hormonal therapy and extended lymph node dissection in patients with high-risk prostate cancer .
3. 学会等名 第32回欧州泌尿器科学会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shingo Hatakeyama, Imanishi K, et al
2. 発表標題 Aberrant serum N-Glycosylation in Immunoglobulins is a Biomarker of Upper tract urothelial carcinoma
3. 学会等名 Urological Research Symposium（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tanaka T, Yoneyama T, Noro D, Imanishi K, Kojima Y, Hatakeyama S, Tobisawa Y, Mori K, Yamamoto H, Imai A, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Tanaka M, Nishimura S, Kurauchi S, Takahashi I, Ohyama C
2. 発表標題 Aberrant N-glycosylation profile of serum immunoglobulins is a diagnostic biomarker of urothelial carcinomas
3. 学会等名 第33回欧州泌尿器学会議（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Imanishi K, Hatakeyama S, Imai A, Matsumoto T, Soma O, Tokui N, Yamamoto H, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Nakaji S, Ohyama C
2. 発表標題 Association of nocturia, sleep disorder, and quality of life in community-dwelling population: Results from Iwaki health promotion project in Japan
3. 学会等名 第33回欧州泌尿器学会議（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tanaka T, Yoneyama T, Noro D, Kojima Y, Imanishi K, Yamamoto H, Tobisawa Y, Mori K, Imai A, Hatakeyama S, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Tanaka M, Nishimura S, Kurauchi S, Takahashi I, Ohyama C
2. 発表標題 Aberrant N-glycosylation profile of serum immunoglobulins is a urothelial calcinomas
3. 学会等名 米国泌尿器科会議 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----