

令和元年6月14日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06858

研究課題名(和文) 確定前立腺がん診断を可能にするマルチプレックス診断法の開発

研究課題名(英文) Development of the multiplex diagnostic method able to make a definitive diagnosis of prostate cancer

研究代表者

数野 彩子 (Kazuno, Saiko)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00338344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は生検に依存しないPSA値を補完する低侵襲な前立腺がん診断法の確立を目的とし、患者血清蛋白質の糖鎖構造に着目して解析を行い、O型糖鎖認識レクチンが前立腺がん患者と健常者の識別に重要であるという新たな知見を得た。さらになん特異的O型糖鎖構造変化を提示するキャリア糖蛋白質としてclusterinを同定した。clusterinが前立腺で生成・分泌されることに鑑み、患者血清中のclusterinを標的として蛍光ビーズ結合抗体-レクチン検出法を開発。ROC分析から特にPSA値10ng/ml以下の患者においてPSA値より優れた結果が得られた。本法によって有意に前立腺がん患者を識別できると結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺がんマーカーであるPSA値はがん特異性が低い問題点がありグレーゾーンといわれる範囲に悪性と良性患者が混在し、生検に依存しないPSA値を補完する低侵襲ながん診断法の確立が望まれる。本研究は抗体結合ビーズ-レクチン検出法によるPSA値診断の問題克服を目指した。clusterinをターゲットとして開発した蛍光ビーズ結合抗体-レクチン検出法はROC分析から特にPSA値10ng/ml以下のグレーゾーン患者においてPSA値より優れた結果が得られた。本法は有意に前立腺がん患者を識別できることを確認し、PSA値による診断の問題点を補完する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our study is to develop a low invasive, definitive diagnostic method to overcome frequent errors of PSA, a widely used diagnostic marker for prostate cancer. Using lectin array, we first characterized glycosylation status of serum glycoproteins and found that O-glycans were more enriched in patients' sera. O-glycan-bearing serum glycoproteins were comprehensively collected using O-glycan-specific lectins and subsequently analyzed by the quantitative proteomic analysis. It was found that clusterin in malignant sera was more O-glycosylated than that in benign patients or control subjects. We further developed a new method to quantify O-glycosylated clusterin in the serum: serum clusterin that had been adsorbed on anti-clusterin IgG-immobilized fluorescent beads was probed with another fluorescent O-glycan-specific lectin beads using a Luminex 200. The method is more reliable to distinguish prostate cancer patients from benign prostate disease and healthy person.

研究分野：プロテオミクス解析

キーワード：前立腺がん プロテオーム解析 糖鎖 バイオマーカー レクチン 糖タンパク質 マルチプレックス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は、50歳以上に多く発症し近年急増傾向にある。将来はがん死亡原因の上位になると予想されており早期発見の重要性が高まっている。臨床現場では、前立腺がんマーカーとして組織特異性の高い PSA 値が用いられているが、がん特異性が低く、グレーゾーンといわれる PSA 値 4-10 ng/ml の範囲内に悪性腫瘍患者 (Gleason Score 4+4 以下) の 30%、前立腺肥大症などの良性疾患患者の 70% が混在してしまう。従ってグレーゾーン患者のがん確定診断は生検に依存しており患者への過度な身体的、精神的負担を強いているという問題がある。これを克服し PSA 値を補完する簡便で低侵襲ながん診断法の確立が患者の負担軽減や医療費の削減に大きく貢献すると考えた。現在グレーゾーン患者の追加検査として F/T PSA 比 (フリーの PSA と蛋白質複合体を形成した PSA を含むトータル PSA との比) を指標とした血液検査が実施されているが、グレーゾーンの患者以外には識別の有意性が認められないことや排尿障害のない患者に限られるなどの課題がある。このような理由から血清や尿を試料としたプロテオミクスによる方法など診断マーカーに関する研究が行われているがいまだ解決されていない。

タンパク質はさまざまな翻訳後修飾を受けており、ヒトの蛋白質の約 50% はそのひとつである糖鎖修飾を受けた糖蛋白質である。蛋白質あるいは遺伝子が変化するには相当の時間を必要とするのに対し翻訳後修飾の変化は炎症などの微小な環境の変化に素早く対応することができる。したがってがん化のような細胞の変化が分泌蛋白質の糖鎖構造に変化を及ぼすことは極めて当然のことと考えられ、従来からさまざまな糖鎖がガンマーカーとして利用されている。例えば CA19-9 や SLX、CA125 などのがんで増加する糖鎖を検出する代表的なガンマーカーである。

申請者はこれまで、シアル酸認識レクチン SNA-1 の血清ハプトグロビンへの結合量が前立腺がん患者と健常者間、さらに前立腺がん患者と前立腺肥大症などの良性疾患患者間で有意な差異を持つことを発見し、血清ハプトグロビン定量と SNA-1 レクチン結合量測定を連続的に行う SPR (表面プラズモン共鳴) バイオセンサー多段階解析法を開発した (Kazuno ら, Anal. Biochem. 419:241-249(2011))。これらの研究成果から、がん患者の血清糖蛋白質の糖鎖構造変化の比較定量は PSA の問題点を克服しうるバイオマーカーであり、その簡便な検出法を開発する本研究は新規がん診断法として重要な意義があると考えた。

### 2. 研究の目的

PSA 値の問題点であるグレーゾーンを補完し不要な生検を最小限にするため、ごく微量の 1 試料から複数項目を同時に測定可能なマルチプレックスビーズ結合抗体 - レクチン検出法を開発し、迅速かつ高精度な実用レベルの診断システムの確立により総合的にがん確定診断ができる高精度の診断法の実用化を目的とする。そのために必要な研究として、(1) 前立腺がんに対する特異性の高い糖蛋白質を血清中から同定し、同時測定しうる複数の候補を選択する。その糖鎖構造を認識する特異的レクチンを探索する。(2) (1) で決定した糖タンパク質-レクチン結合をマーカーとして 1 サンプルから複数項目を同時に測定し総合的に判断する高精度のがん診断法を確立する。さらに本法の実用化に向けハイスループット化、測定時間の短縮、簡便化などを検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 血清検体

本研究では、順天堂大学の内規に従い医学部及び病院倫理委員会の審査の結果、承認を得た前立腺疾患患者および健常者血清を用いた。(医院倫第 20-37-2 号、受付番号 299)

#### (2) 前立腺がん患者血清の網羅的レクチンアレイ解析による糖鎖プロファイリング

これまで申請者らは血清に含まれる糖蛋白質のうち炎症などで増加する急性期タンパク質 APP (acute phase protein) に糖鎖構造変化を検出しやすいことを発見した。そこで前立腺がん患者および健常者血清を用いて網羅的にレクチンとの結合性を測定できるレクチンアレイ分析を行って悪性腫瘍患者血清に結合特異性の高いレクチンの選定を行った (株式会社グライコテクノ)。

#### (3) 前立腺がんに対する特異性の高い糖蛋白質の同定

(2) の結果、O 型糖鎖認識レクチン AOL, ACA, MPA, Jacalin, AAL の結合に有意差が見いだされた。そこで血清中から前立腺がんに対して特異的に増加するキャリア糖蛋白質を同定するため、これらのレクチンを結合したビーズを用いて患者および健常者血清から糖タンパク質をアフィニティー精製し、さらに質量分析による iTRAQ ラベル定量プロテオミクス解析を行った。

#### (4) 培養細胞を用いた糖タンパク質の確認

テストステロン感受性前立腺がん培養細胞 LN-Cap を 5 nM R1881 を含む RPMI1640/2% FCS で培養した。細胞を回収し、0.1M リン酸ナトリウム (pH 7.5) - 0.15M NaCl に懸濁した後、超音波破碎して得られるホモジェネートを 10,000Xg, 5 分遠心した上清 (抽出液) を実験に用いた。

#### (5) マルチプレックスビーズ結合抗体 - レクチン検出法の開発

蛍光ビーズ結合抗体 - レクチン検出法の概略を示す。固有の蛍光を持つビーズ上に抗体が結合しており、血清中のターゲット糖蛋白質を捕捉する。続いてターゲット糖タンパク質の糖鎖を認識するビオチン化レクチン、さらにストレプトアビジン フィコエリスリン (SA-PE) を逐次

反応させフローサイトメトリーの手法で SA-PE の蛍光を検出、定量する。タンパク質はビーズ固有の蛍光によって識別可能であり複数ターゲットの同時検出が可能である。分析装置は Luminex200 (Millipore)を使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 前立腺がん患者血清のレクチンアレイによる O 型糖鎖プロファイリングと標的 O 型糖鎖タンパク同定

本研究では多項目同時測定が可能なマルチプレックスビーズ結合抗体 - レクチン検出法の確立を目指し、初年度において悪性腫瘍患者と健常者を識別できるレクチンを選定した。驚くべきことに、有意差のあったレクチンの多くは O 型糖鎖認識レクチンであるという新たな知見が得られた。そこで ACA、MPA、Jacalin レクチンを選択し、これらのレクチンを結合したビーズによるアフィニティークロマトグラフィーを用いて患者および健常者血清から糖タンパク質を精製し、iTRAQ 定量プロテオミクス分析を行った。その結果特異的糖鎖構造変化を提示するキャリア糖タンパク質として clusterin、apolipoprotein-A4 などを同定した。この結果をさらに確認するため血清のウエスタンブロッティングを行ったところ、タンパク質の量そのものに健常者、良性患者、悪性腫瘍患者間の差異は認められなかったが、O 型糖鎖認識レクチン結合ビーズを用いたアフィニティー精製後のサンプルをウエスタンブロッティングした場合は健常者に比べ疾患患者で増加する傾向が検出され iTRAQ 分析の結果と一致した。

clusterin は前立腺細胞で生成・分泌されることが知られている。そこで培養前立腺がん細胞においても血清と同様の結果が得られるか確認を行った。前立腺がん培養細胞 LN-Cap の細胞抽出液および培養上清から O 型糖鎖認識レクチン ACA、MPA、Jacalin 結合ビーズを用いて O 型糖鎖タンパクをアフィニティー精製し、ウエスタンブロットを行った。その結果、がん患者血清と同様、clusterin に O 型糖鎖の存在が確認され、がんによる糖鎖変化が培養細胞でも確認できた。患者血清中の O-glycosyl 化された clusterin は前立腺組織に由来し疾患の状態を反映している可能性が強く示唆された。

##### (2) clusterin を標的とする蛍光ビーズ結合抗体 - レクチン検出法

患者および健常者血清から抗 clusterin 抗体結合蛍光ビーズを用いて clusterin を捕捉し、次にこれをビオチン化 MPA レクチン結合蛍光ビーズと反応させる結合抗体 - レクチン検出法を構築した。レクチン結合量から O-glycan を持つ clusterin を定量することができた。MPA レクチン結合量の ROC 分析では特にグレーゾーンと言われる PSA 値 10ng/ml 以下の患者において PSA 値より優れた結果が得られた。がん患者、良性疾患患者、健常者間の clusterin 量およびレクチン結合量を PSA 値、血清タンパク質濃度とともに主成分解析を行った結果有意にがん患者を識別できることを確認し、PSA 値による診断の問題点を克服し clusterin のレクチン結合量を指標とした前立腺がん識別の可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kazuno S, Furukawa J, Shinohara Y, Murayama K, Fujime M, Ueno T, Fujimura T. Glycosylation status of serum immunoglobulin G in patients with prostate diseases. Cancer Med. 2016 Jun;5(6):1137-46. doi: 10.1002/cam4.662. Epub 2016 Feb 16. 査読有

##### 〔学会発表〕(計 2 件)

數野 彩子、レクチンを活用した前立腺がん特異的糖鎖構造変化およびキャリア糖タンパク質の同定、日本生化学会大会、2016 年

數野 彩子、前立腺がん特異的糖鎖構造変化を呈するキャリア糖タンパク質解析、日本生化学会大会、2017 年

##### 〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：上野 隆

ローマ字氏名：(UENO, takashi)

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：10053373

研究分担者氏名：藤村 務

ローマ字氏名：(FUJIMURA, tsutomu)

所属研究機関名：東北医科薬科大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：70245778

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。