

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16505

研究課題名(和文) IgGFc N型糖鎖を使用した乳癌予測モデルの開発

研究課題名(英文) Development of breast cancer prediction model using IgGFc N-glycosylation

研究代表者

川口 展子 (Kawaguchi, Nobuko)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：60771540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌は早期発見により手術での高い治癒率が期待できる。しかしながら現状では、病期が0、1期で診断される症例は半数程度で、簡便で感度の高い診断手法の開発が必要とされている。本研究ではパイロットスタディにて開発した血清中のIgG糖鎖を用いた乳癌診断予測モデルを検証することを目的とした。まず、IgG糖鎖が安定していることは将来臨床応用を目指す上で必須であることから、安定性を確認した。次に、検証用コホートで、IgG糖鎖の測定を行った。現在よりよいモデルとするため、これらのデータを元に予測モデルを改良中であり、IgG糖鎖を用いた予測モデルは簡便で感度のよい診断方法になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

簡便で感度のよい診断方法は早期診断に有用であり、乳癌では早期発見により手術での高い治癒率が期待でき、患者の負担が大きい抗がん剤治療をせずに済む可能性も高くなる。IgG糖鎖を用いた予測モデルの研究は簡便で感度のよい診断方法開発の第一歩であると考えられる。また学術的には本研究での結果はIgG糖鎖が乳癌の病態に關与している可能性を示しており、その機序を解明することで、IgGN型糖鎖に關与する免疫反応を治療標的やバイオマーカーとするような新規分野を開拓できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Early detection of breast cancer can result in lower recurrence after surgery. However, today, just half of the breast cancer cases are diagnosed with stage 0 and stage I, therefore development of an easy and highly sensitive diagnostic method is required for early detection. The purpose of this study was to verify a breast cancer prediction model using serum IgG glycosylation developed in a pilot study. First, stability of the IgG sugar chains was confirmed because stability of the target to detect is essential for future clinical application. Next, IgG sugar chains were measured in the verification cohort. At present the prediction model is being improved based on these data, and it is considered that the prediction model using IgG glycosylation will be a promising candidate as an easy and sensitive diagnostic method.

研究分野：乳癌

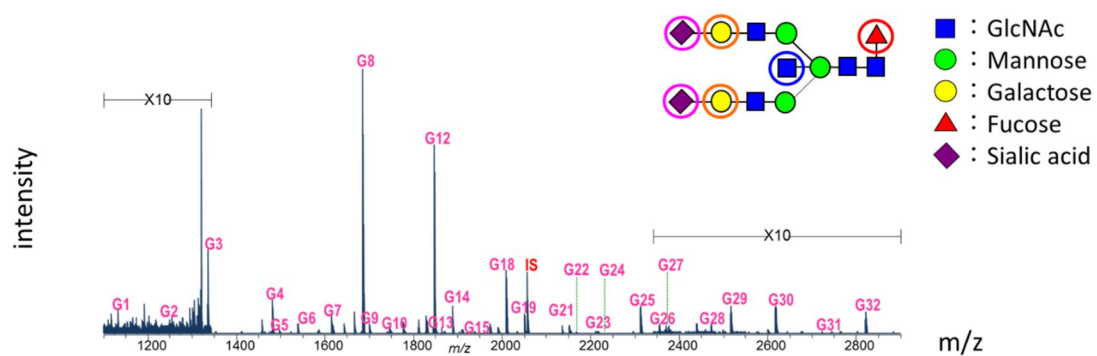
キーワード：乳癌 IgG糖鎖 診断予測モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌の発生頻度は世界的に高くなっており、日本人女性における増加も著しい。乳癌は早期発見により手術での高い治癒率を期待でき、患者の負担が大きい抗癌剤治療をせずに済む可能性も高くなる。しかしながら、視触診とマンモグラフィーがスクリーニング検査となっている現状では、病期が0、I期で診断される症例は約42,000人と半数程度である。(2014年次乳癌登録集計、日本乳癌学会)マンモグラフィーのような痛みや被爆がなく、簡便で感度の高い診断手法が開発されれば、検診受診率の向上が見込まれ、より早期での乳癌診断が可能になると期待されている。

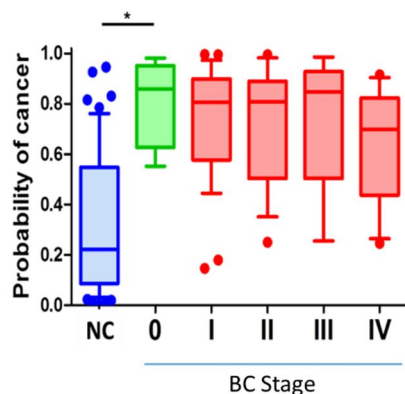
我々は免疫系、特に血中免疫グロブリンG(IgG)のFc領域のN型糖鎖(IgG糖鎖)に注目し、乳癌患者と非癌コントロールにおける血中IgG糖鎖の分析を行ってきた。IgG糖鎖修飾が疾患により変化したり、抗体の機能に影響したりすることは知られているものの、癌患者における血中IgG Fc N型糖鎖修飾の詳細、その機序、また臨床生物学的意義については不明な点が多いのがこれまでの現状だった。近年の質量分析装置の技術革新により、高感度で多検体のプロファイリングが可能となり、IgG糖鎖の研究を進められる条件が整ってきているといえる。今回の研究での乳癌患者のIgG糖鎖プロファイルの1例を示す。(図1)



(図1) 乳癌患者のIgG糖鎖プロファイルの1例

右上丸印の糖の有無で構造亜型が生じ、今回は32種類の糖鎖(G1-32)が検出できている。

我々のパイロットスタディにおいては、乳癌患者群55例とコントロール群51例のプロファイルと比較し、7糖鎖を用いた予測モデル(多重ロジスティック回帰)を用いることで、早期乳癌からコントロールと乳癌患者を判別でき(AUC=0.87)、IgGの糖鎖が有望なバイオマーカー候補であることを報告してきた。(図2)特に非浸潤性乳管癌においても予測できる可能性が示唆されている。



(* $p < 0.05$, Dunnett's multiple comparison test)

(図2) IgG糖鎖を用いた予測モデルの予測値の病期別分布

非浸潤性乳管癌でも予測可能であった。(NC: コントロール、BC Stage: 乳癌病期0-IV)

IgG糖鎖を用いた予測モデルの実用化を検討するため、パイロットスタディのコホートにおいてマンモグラフィーとIgG糖鎖の予測モデルの感度特異度を比較したところ、同程度であった。

2. 研究の目的

本研究ではパイロットスタディにて開発した血清中の IgG 糖鎖を用いた乳癌診断予測モデルを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) IgG 糖鎖の安定性の確認

血清・血漿での違い、回収時の放置時間及び温度での変化、凍結融解の繰り返しによる変化、血清の 4 保存による変化について検討した。血清または血漿からプロテイン G を用いて IgG を単離、SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) を行って IgG の重鎖を切り出した。PNGase F (Peptide-N-Glycosidase F) を用いて N 型糖鎖を切断、精製し 3AQ (3-Aminoquinoline) 化したのちマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析装置 (MALDI-MS; Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry) で測定した。各糖鎖の強度の合計で各糖鎖の割合を計算し、解析に使用した。

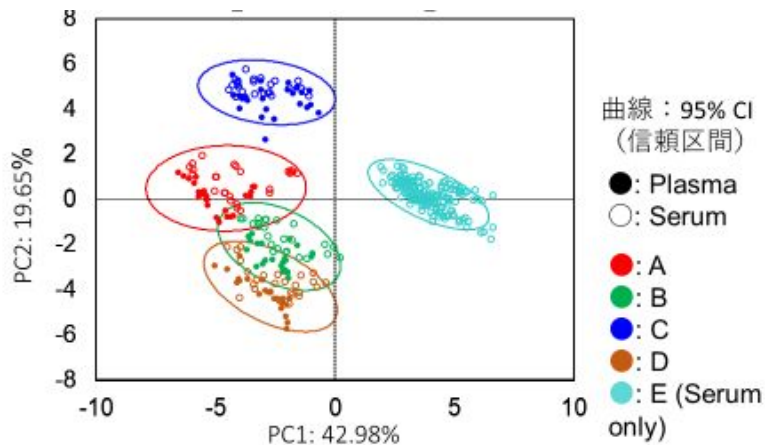
(2) 検証用コホートでの有用性の検証

バイオバンクシステムを利用し、乳癌患者と非癌コントロールで年齢調整を行った、検証用のコホート (ケースコントロール) を作成して IgG 糖鎖の測定を行った。乳癌患者や非癌コントロールと非浸潤癌症例の比較、他癌種との比較も行うため、IgG 糖鎖の測定を行った。(測定方法は (1) 同様) 測定結果は臨床情報と統合し、解析を行った。

4. 研究成果

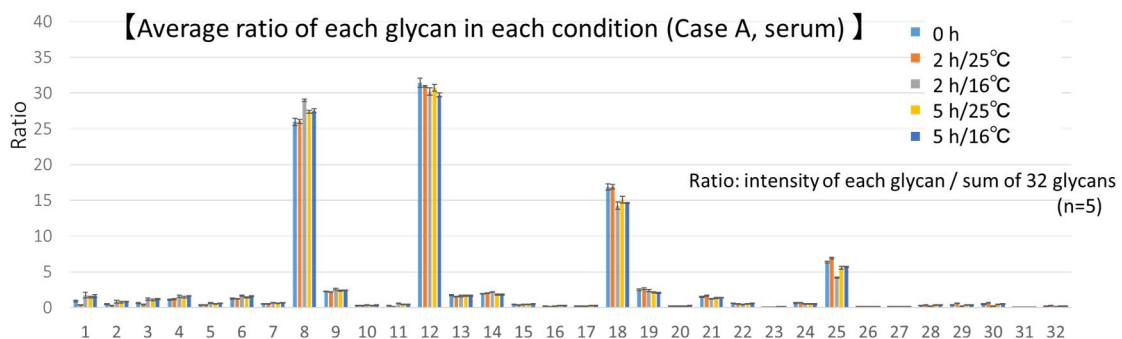
(1) IgG 糖鎖の安定性の確認

血清・血漿での 32 種類の各糖鎖の割合は同等であった。凍結融解の繰り返し等においても概ね各糖鎖の割合は安定していた。IgG 糖鎖は安定性が高く、臨床応用に適していると考えられた。



(図3) 主成分分析

症例 A-E において糖鎖のパターンは個体差を反映し、検体作成条件での違いは少ない。症例 A における糖鎖の条件による差異を下記に示す。有意な差はない。



(図4)

(2) 検証用コホートでの有用性の検証

測定症例の背景を示す。

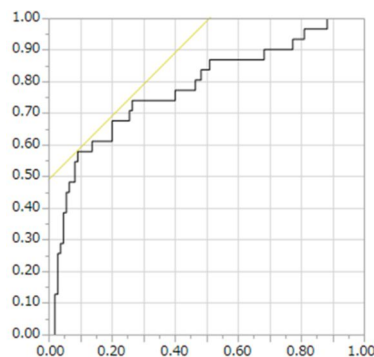
		1 st cohort		2 nd cohort		
		BC	NC	BC	NC	DCIS
Sex	Female	55	51	112	109	31
Age	Less than 50	13	14	66	69	16
	50 and over	42	37	46	40	15

(表1)

その他、胃癌症例、肺癌症例等、IgGN型糖鎖の変化を伴うといわれる疾患症例の血清を約10例ずつ測定した。

パイロットスタディと今回コホートを比較すると、乳癌群と非乳癌コントロール群で共通で差のみられる糖鎖を認めた。しかし、パイロットスタディと今回のコホートでプロフィリングのパターンが異なる可能性があったため、現在解析方法を検討中である。

また、DCISについては健常者群とDCIS群を予測するモデルを作成したところ、AUC 0.78 ($P < 0.001$, 95% confidence interval (CI), 0.34 - 0.97)となり、血清を用いてDCISをスクリーニングできる可能性が示唆された。



(図5) ROC 曲線

(3) 今後の展望

現在よりよいモデルとするため、これらのデータを元に予測モデルを改良中である。IgG糖鎖を用いた予測モデルの研究は簡便で感度のよい診断方法開発の第一歩であり、また乳癌以外の疾患や非浸潤癌のプロファイルを見ることで予測モデルの可能性を検討できると考えている。

また、同時に免疫機序の解明のため、in vitroの研究に加え、乳癌組織を用いた検討を進める予定であり、IgGN型糖鎖に關与する免疫反応を治療標的やバイオマーカーとするような新規分野を開拓していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川口展子
2. 発表標題 MALDI-MSによる血清IgGN型糖鎖修飾プロファイリングを用いた乳がんの診断予測
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawaguchi-Sakita N, Nishikaze T, Sekiya S, Sugimoto M, Kojima K, Kawashima M, Tokiwa M, Suzuki E, Toi M.
2. 発表標題 Stability of serum IgG Fc N-glycosylation profiling, a promising biomarker for breast cancer diagnosis
3. 学会等名 GBCC2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川口展子、川島 雅央、常盤麻里子、戸井 雅和
2. 発表標題 乳癌診断予測に有望である血清中IgGFcN型糖鎖の安定性について
3. 学会等名 乳癌学会2017
4. 発表年 2017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
研究協力者	関谷 禎規 (Sekiya Sadanori)	島津製作所・質量分析研究所・課長 (94303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	杉本 昌弘 (Sugimoto Masahiro)	東京医科大学・低侵襲医療開発総合センター・教授 (32645)	
研究協力者	戸井 雅和 (Toi Masakazu)	京都大学・医学部乳腺外科・教授	
研究協力者	片岡 裕貴 (Kataoka Yuki)	兵庫県立尼崎総合医療センター・臨床研究推進ユニット・ユニット長	