

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16298

研究課題名(和文)膵臓癌特異的レクチンを用いたサンドイッチアッセイによる早期診断法の開発

研究課題名(英文)The detection of early stage pancreatic cancer with sandwich ELISA using tumor specific lectins

研究代表者

下村 治(Osamu, Shimomura)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：60808070

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究は膵臓癌を早期に発見するため、細胞膜の糖鎖をターゲットにした新規診断法の開発が目的である。我々が特定した膵臓細胞に反応するrBC2LCNレクチンを用いたサンドイッチELISAにて、膵臓癌患者血清が健常者血清より高いシグナルを検出できることを証明した。更に特異性を上げる為、患者血清よりrBC2LCNレクチン陽性糖タンパク質を抽出し、質量分析にて浮上した候補タンパクの中から、患者血清中に特異的な糖タンパクAの同定に成功した。rBC2LCNレクチンとタンパクAに対する抗体によるサンドイッチアッセイ系では、既知のCA19-9より高い検出感度を確認し、更なる大規模試験に向け準備中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓がんは年間35000人が診断され、5年生存率が9%と最も予後不良の悪性腫瘍である。早期に診断され、外科的に切除された場合は、5年生存は44%で改善されることが分かっており、早期診断法の開発は急務であった。本研究では、我々が同定した膵臓に反応するレクチン(糖結合タンパク)を用いて、膵臓癌患者血液中に分泌された癌細胞由来の糖タンパク質を同定し、糖タンパク質をターゲットにした新規診断法の開発である。今回、新たに患者血清中に分泌される糖結合タンパクAを同定し、従来のCA19-9より高い検出力であることを確認した。

研究成果の概要(英文):This study is aim to discover novel detection system to diagnosis early stage pancreatic cancer targeting cell surface glycan. Using rBC2LCN lectin which is we have already identified, the sandwich ELISA revealed higher signals in pancreatic cancer patients than in health controls. For more specificity, we extracted and identified glycoprotein A from patient serum using lectin immunoprecipitation and mass spectrometry. For more accurate diagnosis, we applied antibody to glycoprotein A and rBC2LCN as sandwich ELISA system, and this system revealed higher sensitivity and specificity than known CA19-9 biomarker for pancreatic cancer. Now we try to develop new diagnostic system to detect glycoprotein A in pancreatic patient serum using sandwich ELISA utilized antibody-lectin.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：膵臓がん 早期診断 糖鎖 レクチン 糖タンパク

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は、5年生存率9%と最も予後不良な悪性腫瘍であるが、外科切除により44%まで改善することが報告されており、膵癌の予後改善には早期に発見し切除することが非常に重要である。しかし、現在実臨床で用いられるCA19-9などの血清の腫瘍マーカーは疾患特異性が低く、スクリーニングには不適であり、早期膵癌を見つけるには造影CTなどの画像的手法に依らざるを得ず、早期発見が可能な血中のマーカーの同定が切望されていた。本研究は、我々がこれまでに同定してきた膵癌細胞表面の糖鎖マーカーをターゲットとした、早期膵癌を検出する新たな診断法を開発することを目的とした。

### 2. 研究の目的

難治がんの代表である膵臓癌を早期診断する為に、血液中に遊離した糖鎖をレクチン(糖結合タンパク)で検出する新規診断技術を確立する。既存の膵癌マーカーの多くは血清中の糖タンパク質を抗体で検出しているが、特異性も十分ではなく、有効な早期診断に繋がっていない。癌細胞の最外層は糖鎖で覆われているため(=glycocalyx)、早期膵癌段階から血中に遊離する癌由来の糖鎖を検出する事は有効な新規診断に繋がると考えた。我々は膵癌に特異的に表出しているフコース化糖鎖(H-Type 1/3/4)を発見し、それを認識するレクチン(rBC2LCN)を使って標的とする新規レクチン治療を開発した(Shimomura O et al., Molecular Cancer Therapeutics 2018)。これまでにPilot的に、このrBC2LCNレクチンを使ったサンドイッチアッセイ系でマウス膵癌モデルの血清はもとより、臨床膵癌患者血清の糖鎖も高感度に検出する事に成功している。本研究では、マウス膵癌モデル、臨床ヒトサンプルでの知見を蓄積し、膵臓癌を早期に発見する特異性の高い診断法の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 複数の膵癌細胞株、臨床膵癌検体を用いた網羅的糖鎖発現解析、レクチン同定

我々はこれまでに複数の膵癌細胞株を高密度レクチンマイクロアレイによる網羅的糖鎖解析を行い膵癌細胞に反応するrBC2LCNレクチンを同定してきた。レクチンによる糖鎖をターゲットにした診断法の解析の為、これまでに同定してきた細胞膜上の候補となるレクチンを用いて臨床膵癌検体を網羅的に染色し、新たな候補レクチンを炙り出すことを目的とした。

(2) rBC2LCNレクチンを用いたSandwich ELISA

rBC2LCNレクチンはこれまでの検証で全ての膵癌細胞で発現が確認されており、血清中に遊離した糖鎖や糖タンパク質を、Sandwich ELISA系で検出する

(3) 上記2の現象をマウスモデルの腫瘍で確認

上記(1, 2)結果を、膵癌マウスモデルでの検証を行う予定であったが、(4)のヒト患者血清中の糖たんぱく質の解析で、新規糖タンパクXが同定されたため、糖タンパクXの解析に移行した。

(4) 患者血清中の膵癌細胞由来糖タンパクの同定と組織染色による確認

膵癌患者血清中に遊離するrBC2LCN陽性糖たんぱく質を、免疫沈降法により抽出し、LC/MS法で解析する。同定された糖たんぱく質が、実際に血清中で同定されるかをレクチンプロット、WB法で確認し、膵癌組織染色を用いて発現を確認する。同定された糖タンパクに対する抗体、レクチンを用いたSandwich ELISA系を構築し、有効性を検証する。

### 4. 研究成果

(1) 膵癌組織検体を用いた網羅的組織レクチン染色により、WFAレクチン(24検体中22検体で陽性)、CNLレクチン(24検体中15検体で陽性)、BPLレクチン(24検体中22検体で陽性)が同定された。これらはそれぞれ認識する糖鎖が異なるが、レクチンでの血清中糖たんぱく質の同定に使用できるかを検証した。その結果、我々がこれまで同定してきたBC2LCNレクチンを2重に使用した検出法が最も感度が高いことが分かった。

(2) rBC2LCNレクチンを2重で用いたSandwich ELISA系で、実際に膵癌患者(n=10)と健常者血清(n=10)を用いて検証したところ、患者血清で高いシグナルを検出した(図1)。また患者血清は、術前、術後第1、7、30病日で採血した検体を用いたところ、一部の症例では術後速やかに低下し、再発時に再上昇することが確認された。しかし、本検出法で得られた結果は既知の腫瘍マーカーであるCA19-9とほぼ同等の検出力であり、rBC2LCNで糖鎖および糖タンパクの検出を行う腫瘍では有意な改善が見込まれないと判断した。

(3) 上記rBC2LCNレクチンによるサンドイッチアッセイ系で有用性が示された場合、マウスモデルを用いた腫瘍増大と共に経時的な採血を行い確認する予定であったが、患者血清より候補

糖タンパクの検出実験(4)を優先した。

(4) 膵癌患者血清中の糖タンパクの中から、rBC2LCN レクチンを用いた免疫沈降法により rBC2LCN 陽性の糖タンパク質の検出に成功した。銀染色法で同定された質量の分子を含む Gel から、タンパクを抽出し、質量分析(LCMS法)にて約40種類の候補タンパク質を同定した。更に、健常者血清と患者血清から、患者血清で陽性となる3つの候補タンパクを絞り込み、それぞれの抗体を用いたWB法により、患者血清で陽性となり健常者血清では発現が見られない糖タンパクAを同定した(図2)。患者血清を用いてPilot的に、rBC2LCNと糖タンパクAに対する抗体でSandwich ELISA系を構築し検出したところ、患者血清で陽性となることを確認した。倫理審査委員会で承認を得た上で、患者血清PC(n=88)、健常者HC(n=99)、膵炎患者CP(n=9)、大腸癌患者CC(n=25)を用いて検証した。その結果、膵癌患者で有意に高いシグナルを検出した(図3)。また早期膵癌(ステージ ~ A)においては、ROC解析にて既知のCA19-9より高い検出率であることが示された(AUC:0.899 vs 0.754 p=0.023)(図4)。レクチンと抗体を用いた患者血清中の糖タンパクAの検出は、これまでのCA19-9のように単に糖鎖を検出する手法と異なり、糖鎖とタンパクを同時に検出する手法であり、特異性の向上が図られ、さらに簡便な手法で検出可能であり、今後さらに症例を蓄積して検証する予定である。

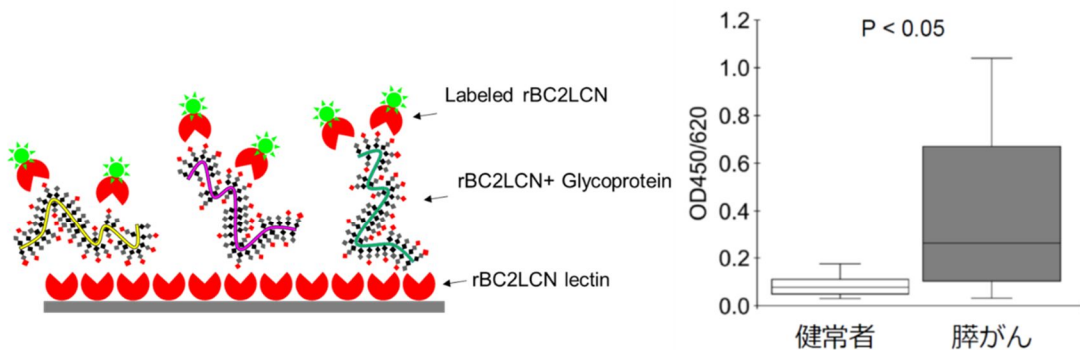


図1：BC2レクチンによるサンドイッチアッセイ系：膵癌患者血清で健常者より高いシグナルを検出することに成功した

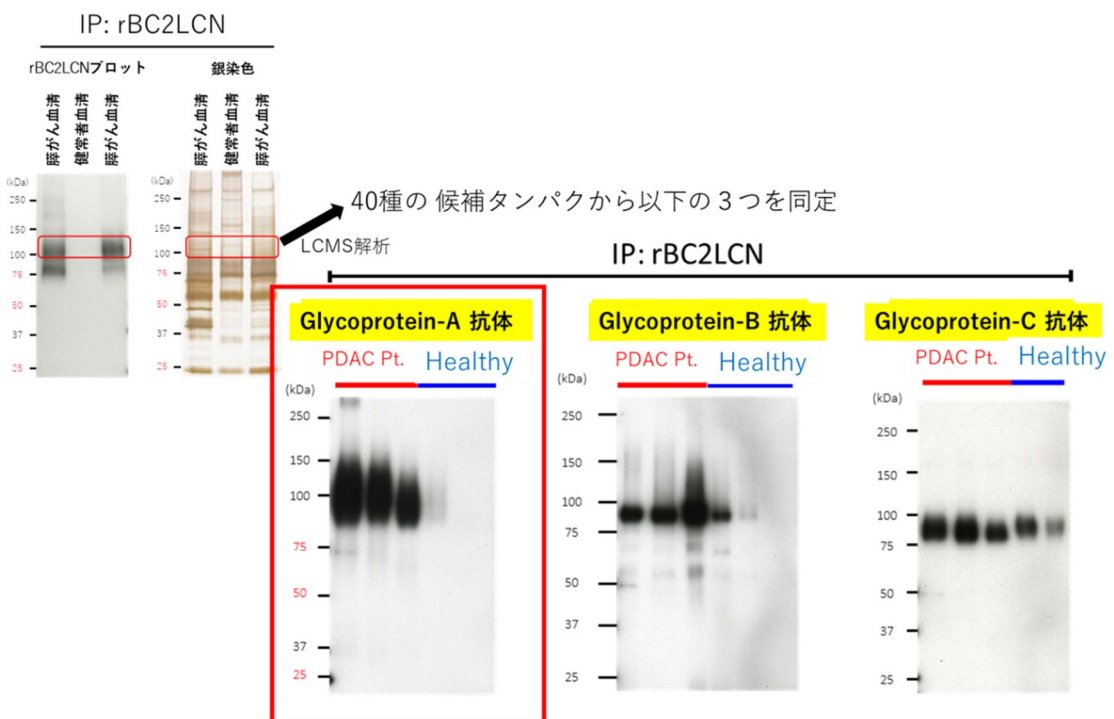


図2：BC2レクチン陽性タンパクの分析で、40種の候補糖タンパクからIP/WBで3つの中から最も患者特異的なGlycoproteinAを同定

PDAC (n=88)

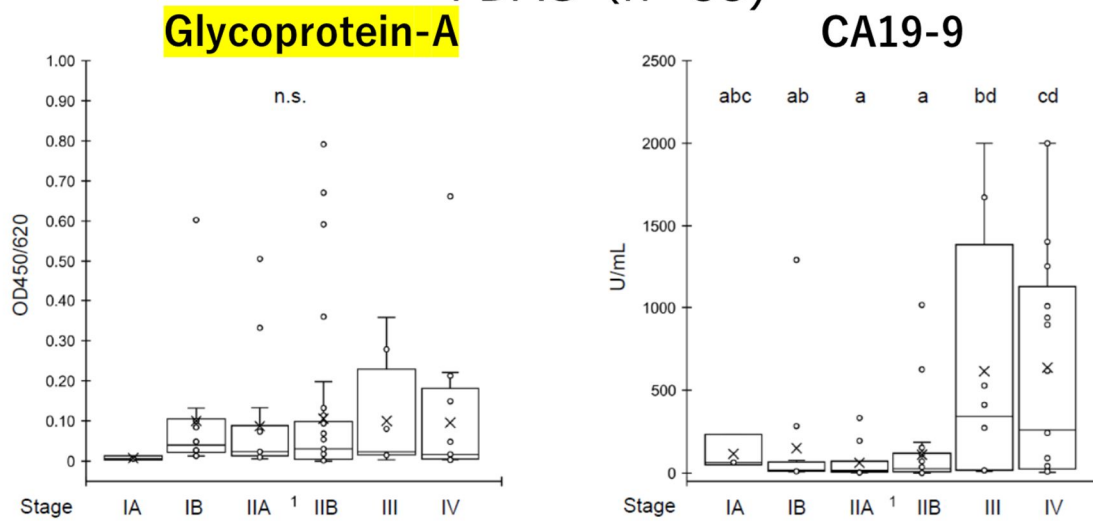


図3：ステージⅠA～ⅡAの早期膵癌患者血清中で、GlycoproteinAの検出が高いことが示された。

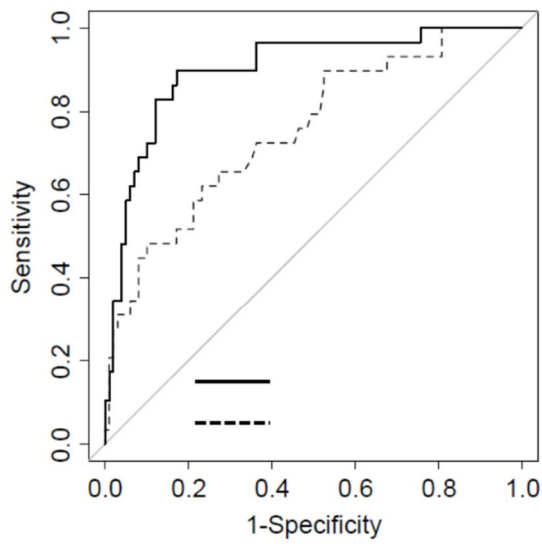


図4：ROC解析でステージⅠA～ⅡAの早期膵癌患者血清中でAUCが優位に高く、早期膵癌の検出力が従来のCA19-9より優れている可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Osamu Shimomura
2. 発表標題 Brand new biomarker for early pancreatic cancer the rBC2LCN lectin Glycoprotein X sandwich assay surpass CA19-9 detection value.
3. 学会等名 日本肝胆膵外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下村 治
2. 発表標題 研究学園都市で行う膵癌研究 ~外科医の基礎研究継承、現状と課題について
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 BC2LCNを用いたサンドイッチアッセイによるがんの検査方法	発明者 産総研、筑波大学	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-187197	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------