

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16681

研究課題名（和文）糖鎖関連バイオマーカーによる去勢抵抗性獲得予測および治療効果予測法の開発

研究課題名（英文）Development of glycomarker for prediction of castration prostate cancer

研究代表者

石橋 祐介（Ishibashi, Yusuke）

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80792316

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：ホルモン感受性前立腺癌（HSPC）の治療においてアンドロゲン遮断療法（ADT）が有効であるが、ADT抵抗性を示し、去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）へと移行する患者の予後は不良である。HSPCの治療効果やCRPCを予測し、早期に適切な治療介入を行うことは重要であるが、去勢抵抗性獲得を予測し、治療方針決定に有用な情報を与える予測マーカーは存在しない。本研究では、イムノグロブリンN-glycan signatureと機械学習モデルにより、HSPCおよびCRPCを鑑別する診断モデルを構築した。構築した診断モデルは、AUC0.88以上でCRPCを診断し、将来的にCRPCの予測に有用であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PSAによる前立腺癌のスクリーニングにより、早期の前立腺癌が発見され、治療の対象になっている現状では、前立腺癌をコントロールする上でHSPCの治療効果やCRPCの予測に本手法を導入し、早期に適切な治療介入を行うことは患者のQOL向上および医療費軽減につながり、これらは、今後、個別化医療が進むにつれ、より一層重要な検査となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Androgen deprivation therapy (ADT) is effective in the treatment of hormone-sensitive prostate cancer (HSPC), but the prognosis for patients who develop resistance to ADT and progress to castration-resistant prostate cancer (CRPC) is poor. However, there are no predictive markers that can predict the acquisition of castration resistance and provide useful information for treatment decisions. In this study, we constructed a diagnostic model to differentiate HSPC and CRPC using an immunoglobulin N-glycan signature and a machine learning model. The constructed diagnostic model diagnoses CRPC with an AUC of 0.88 or higher and is expected to be useful in predicting CRPC in the future.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：イムノグロブリン 前立腺癌 N型糖鎖 去勢抵抗性

1. 研究開始当初の背景

ホルモン感受性前立腺癌 (Hormone sensitive prostate cancer, HSPC) に対するアンドロゲン遮断療法 (Androgen deprivation therapy; ADT) は、非常に有効であるが、ADT 施行中の患者の約 20% は、5 年以内に ADT 抵抗性を示し、去勢抵抗性前立腺癌 (Castration resistant prostate cancer; CRPC) へと移行する。HSPC に対する治療はここ数年の間に、複数の薬剤が承認され、治療選択肢が増加した。これに伴い、早期に適切な治療方針を決定するために有用な予測マーカーが重要であるが、去勢抵抗性獲得を予測するバイオマーカーは存在しない。近年、患者の全身状況の「今」を反映し、癌の分子プロファイル全体のモニタリングが可能となる Liquid biopsy の汎用化により cfDNA や CTC を用いた AR を標的にした HSPC に対する治療効果予測などの試みも行われている。このことから Liquid biopsy や非侵襲的な血清検査による前立腺癌の去勢抵抗性予測や治療効果予測マーカーの実用化は過剰治療の是正と患者の QOL 向上および医療費軽減につながり、その開発は急務である。

2. 研究の目的

前立腺癌の去勢抵抗性獲得過程における AR シグナリングの変化と癌の浸潤転移に関わる糖鎖変化と関連について解明することは、臨床的にも大きな意義がある。最近、申請者が中心となって進めてきた CRPC 予測血清糖鎖マーカーの検索 (Ishibashi et al. *Prostate*(15):1521-1529. (2014)) に関する研究をさらに発展させ、CRPC 患者では、血清の高分岐 (3、4 分岐) 型糖鎖が増加するのに伴って、低分岐糖鎖 (2 分岐、bisecting GlcNAc 型) が著しく減少することが明らかとなり、その糖鎖構造を持つ血清糖タンパク質としてイムノグロブリンを同定した。本研究では、HSPC 患者の血清 N 型糖鎖の網羅的解析から同定された CRPC 予測糖鎖マーカーをより簡便な血清検査あるいは、Liquid biopsy による定量法に関する開発応用について検討すること、また、低分岐糖鎖 (2 分岐、bisecting GlcNAc 型) 修飾血清イムノグロブリン (Ig) の定量する方法が、HSPC に対する治療効果や去勢抵抗性の獲得に有用であるか否かを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) レクチンアレイによる低分岐糖鎖修飾 Ig の定量検出法の確立と Liquid biopsy による低分岐糖鎖修飾関連糖転移酵素の発現量をモニタリング

HSPC 患者あるいは、健常人の血清より、レクチンアフィニティーカラムを用いて低分岐糖鎖修飾 Ig を含む分画を精製し、ELISA 法にてイムノグロブリン濃度を測定し、既知濃度の低分岐糖鎖修飾 Ig 標準液を調製する。

で調製した低分岐糖鎖修飾 Ig 溶液を種々の濃度で添加し、レクチンアレイチップ上で反応させ、エパネッセント蛍光スキャナ (BioREXSCAN200、レグザム社) で蛍光強度を測定し、検量線を作成し、目的とする低分岐糖鎖修飾 Ig が定量可能か否かを検証する。

HSPC および CRPC 患者から cfDNA を分離し、低分岐糖鎖合成に関連する糖転移酵素のコピー数をモニタリングし、HSPC 患者および CRPC 患者の各測定値のベースラインと去勢抵抗性獲得および治療効果との関連を検討する。

(2) Ig N 型糖鎖プロファイル (N-glycan signature) 解析と機械学習による HSPC, CRPC 診断モデル構築

HSPC および CRPC 患者、腎細胞癌 (RCC) 患者、膀胱癌 (BCa) 患者、上部尿路上皮癌 (UTUC) 患者、精巣腫瘍 (GCT) 患者、前立腺肥大症 (BPH) 患者、尿路感染症 (UTI) 患者、尿路感染症に伴う敗血症患者 (US)、健常者 (HV) から血清を分離し、キャピラリー電気泳動型迅速 N 型糖鎖解析装置による、血清中の N-glycan signature を定量する、得られた各疾患 N-glycan signature から機械学習により、HSPC

このイムノグロブリン糖鎖プロファイルから、Tensor Flow Deep learning アルゴリズムによる機械学習を用いて、HSPC および CRPC を予測する診断モデルを構築した (Figure 2)。

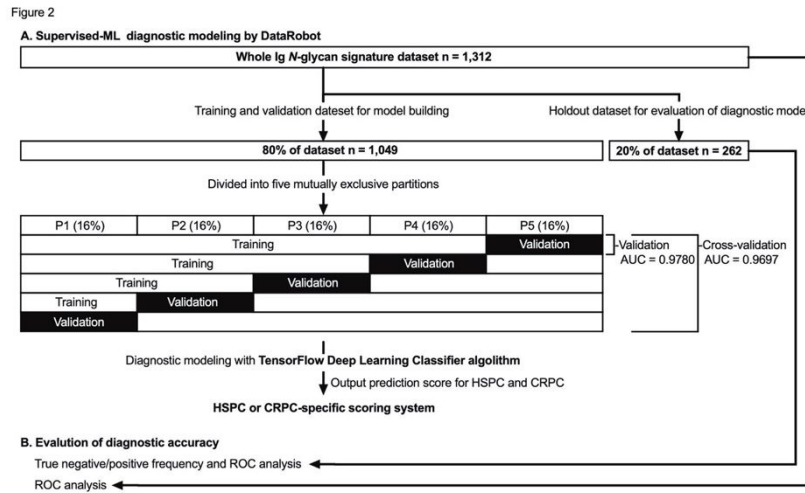


Figure 2. 教師あり ML 診断のモデリングと HSPC, CRPC 特異的スコアの評価。
 A. DataRobot による機械学習-教師あり診断モデリング。データセットの 80% (n = 1,049) を 5 つの相互に排他的なパーティションに分割し、そのうち 4 つをトレーニングに、最後の 1 つを検証に使用し、TensorFlow Deep Learning Classifier アルゴリズムで泌尿器疾患特異的スコアのモデリングに使用した。B. ホールドアウトデータセット (全データの 20%、n = 262) を用いた真陰性 / 陽性頻度および受信者動作特性曲線 (ROC) 分析による泌尿器科疾患特異的スコアの検証、全データセット (n = 1,312) を用いた泌尿器科疾患特異的スコアの ROC 分析。

Figure 3 にホールドアウトデータセットにおける HSPC スコアおよび CRPC スコアの各疾患に対する真陽性/陰性率および偽陽性/陰性率を示す。HSPC スコアは、77.1%の頻度で、HSPC を正しく診断し、CRPC スコアは、66.7%の確率で CRPC を正しく診断する結果であった。CRPC スコアは、27.8%の確率で HSPC と偽判定した。

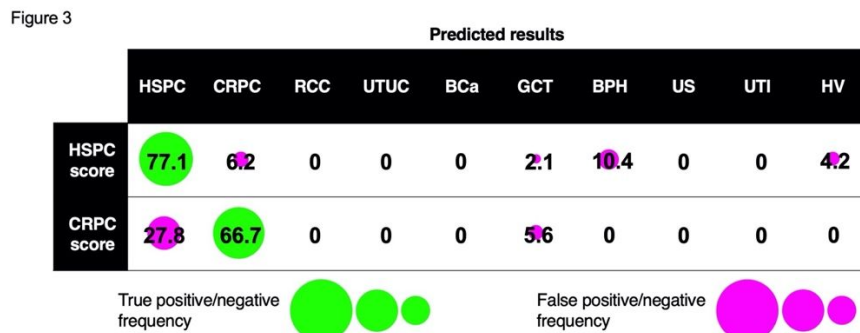


Figure 3. ホールドアウトデータセットで評価した HSPC スコアおよび CRPC スコアの混同行列における真偽判定頻度。

左列が各疾患別スコアリングシステム、上列が予測結果を示す。各疾患別スコアリングシステムを用いて各疾患と判定された症例の真陽性 / 陰性率および偽陽性 / 陽性率を表に示す。緑色の円の大きさは、真の陽性・陰性率を表す。マゼンタの円の大きさは、偽陽性 / 偽陰性の頻度を表している。

Figure 4 は、解析した 1312 症例における HSPC スコアおよび CRPC スコアの分布および ROC 解析の結果を示している。Figure 4 の結果から、HSPC スコアは、CRPC に対して、AUC0.78 であり、他の疾患の鑑別と比較して、HSPC と CRPC の鑑別精度が低い結果となった。このことから、HSPC と CRPC では、糖鎖の特徴が他の疾患よりも類似している可能性が示唆された。一方 CRPC スコアでは、HSPC にたいして、AUC0.88 と

HSPC スコアよりも HSPC と CRPC 鑑別に対して、高い精度を示すことが示唆された。

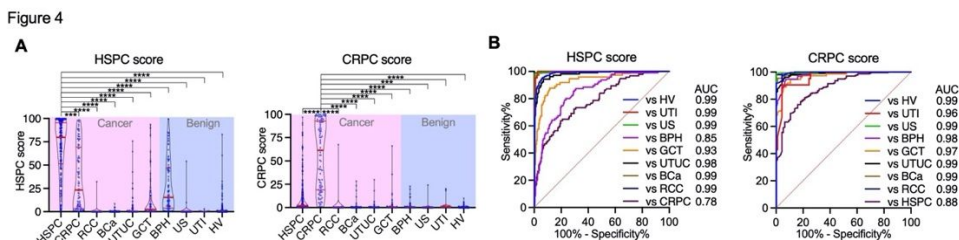


Figure 4. 全データにおける HSPC スコアおよび CRPC スコアの各疾患の検出に対する診断精度。

A. データセット全体における各スコアのバイオリンプロット。バイオリンプロットの赤線は、四分位範囲 (IQR) と中央値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns not significant. B. 各スコアの ROC 解析。

Figure 5 は、各疾患の鑑別に寄与する特異的な Ig N-glycan の相対的インパクトを示す。Figure 4 の結果から、前立腺疾患である HSPC や BPH の鑑別に寄与する N-glycan は、G4S2(2,3), G1[6], G0FB の組み合わせが重要であり、BPH の検出には A1FB, G1FB, G1[6], G0FB の組み合わせが重要であった。一方、シアリル 3 分岐、2 分岐 N-グリカン [A3(2,6), A2(2,6), A1(2,6)] 経路は CRPC の検出に大きく寄与しており、このシアリル分岐 N-グリカン経路は去勢抵抗性の検出に特異的である可能性が示唆された。

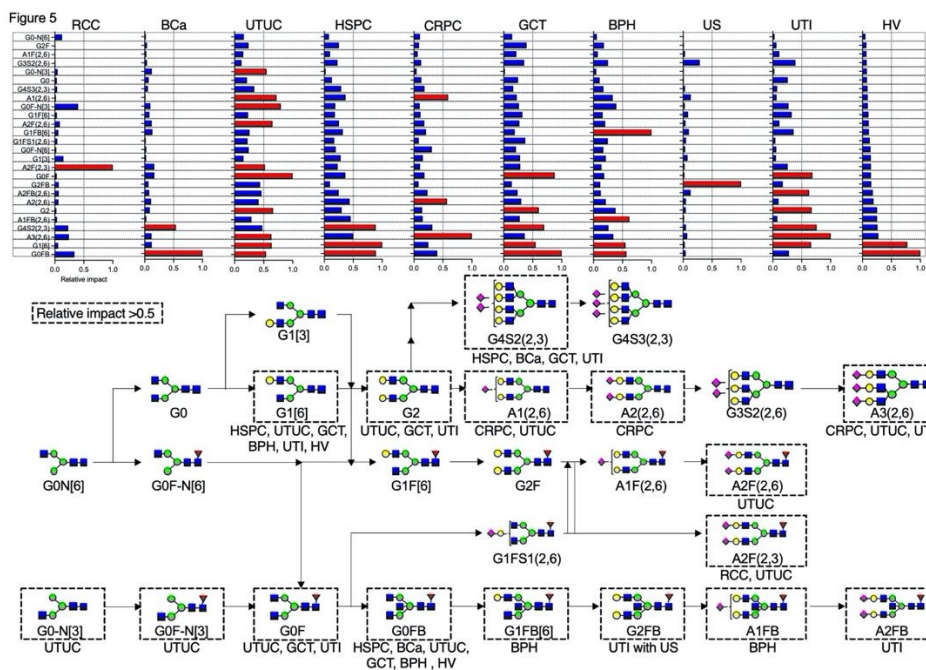


Figure.5 各疾患の検出に寄与する N-glycan の影響。

上段のグラフは、各疾患の検出に対する N-glycan 構造の影響を表している。相対的影響度が 0.5 より大きいものは赤いバーで表されている。下段の Ig N-glycan 合成経路の点線の四角は、各疾患に対する相対的影響度が 0.5 より大きい N-glycan 構造を示している。N-glycan 構造は単糖の記号で示されている。黄色の丸はガラクトース (Gal)、緑の丸はマンノース (Man)、青い四角は N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、赤い三角はフコース (Fuc)、マゼンタ色の菱形は N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) である。

以上の結果から、機械学習によって構築した HSPC スコアおよび CRPC スコアを組み合わせることで、HSPC と CRPC の予測を効果的に実施できる可能性が示唆された。今後さらなる Follow-up 解析により、各種薬剤に対する治療効果や去勢抵抗性を獲得し CRPC へと移行する過程での予測診断が可か否かが明らかになると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumoto Teppei, Hatakeyama Shingo, Yoneyama Tohru, Tobisawa Yuki, Ishibashi Yusuke, Yamamoto Hayato, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Ito Hiroyuki, Nishimura Shin-ichiro, Ohyama Chikara	4. 巻 9
2. 論文標題 Serum N-glycan profiling is a potential biomarker for castration-resistant prostate cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16761-16761
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-53384-y	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米山徹、石川友一、金子智典、彼谷高敏、飛澤悠葵、畠山真吾、田中壽一、石橋祐介、萩原和久、橋本安弘、古家琢也、伊達睦廣、須田美彦、大山力
2. 発表標題 泌尿器腫瘍に対する分子マーカーの研究の現状と将来 泌尿器腫瘍に対する糖鎖バイオマーカーの現状と将来
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会（招待講演）
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------