

機関番号： 32620

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間： 2008 ~2010

課題番号：20591867

研究課題名 (和文) 血中の糖鎖構造に基づく前立腺癌マーカーの探索と診断法の確立

研究課題名 (英文) The search of the prostate cancer marker based on blood carbohydrate chain structure and the establishment of the diagnostic method

研究代表者

藤村 務 (FUJIMURA TSUTOMU)

順天堂大学・医学(系)研究科・准教授

研究者番号：70245778

研究成果の概要 (和文)：前立腺特異抗原 (PSA) は、前立腺癌の発見と診断のために広く使われていますが、PSA を用いる前立腺癌の診断法は偽陽性が高くなります。PSA に代わる前立腺癌マーカーとして糖鎖修飾されたハプトグロビン量を比較したところ、ハプトグロビンのシアル酸化及びフコシル化が癌患者で著しく上昇していました。ハプトグロビンが血中の糖鎖構造に基づく新たな前立腺癌の腫瘍マーカーとして用いられる診断法の可能性を示した。

研究成果の概要 (英文)：Prostate-specific antigen (PSA) has been widely used for detection and diagnosis of prostate cancer. But a false-positive is high in the diagnosis of the prostate cancer when I use PSA. I compared glycosylation haptoglobin as a prostate cancer marker as alternated PSA. The sialylation and fucosylation of the haptoglobin significantly rose with prostate cancer serum. I showed the possibility of a diagnostic method used as tumor marker of the novel prostate cancer that haptoglobin was based on blood carbohydrate structure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

(1) 前立腺癌は初期症状がほとんどないため、転移を伴う進行癌の状態で見られることが多い。前立腺癌の腫瘍マーカーとして PSA が広く使われているが、PSA を用いた診断では、偽陽性が多く、良性和悪性との境界領域が広

い (グレイゾーン) 等の問題がある (Matthew B et al. *Urol Clin N Am.* 2003; 30: 677-686, Kuruma H et al. *Jpn J Cancer Chemother.* 2003; 30:11-15)。新たな腫瘍マーカーによる診断法の確立が望まれている。

(2) 私は、悪性前立腺癌患者由来の血清と良

性前立腺疾患や健常人由来の血清それぞれに含まれている血液成分の比較から、特定の構造からなる糖鎖で修飾を受けたハプトグロビンが悪性前立腺癌患者の血清で特異的に発現していることを見出した。ハプトグロビンは、肝実質細胞やリンパ節などの成熟顆粒白血球（特に好酸球）で生合成されるタンパク質の一種であり、種々の等電点を有する isotypes の存在が知られている。ハプトグロビンは、 α 鎖と β 鎖を含んでおり、 β 鎖の4つのN-グリコシル化部位 (Asn23, Asn46, Asn50及びAsn80) に種々の構造を有する糖鎖が結合した、糖タンパク質の一種である。ハプトグロビンは、溶血により生じた酸化ヘモグロビンと結合して複合体を形成することで酸化ヘモグロビンの分解処理を促し、酸化的血管障害毒性を中和したり、腎糸球体からのヘモグロビンの喪失を防止したりする機能を有することが知られている。しかし、前立腺癌とハプトグロビンの機能との関係は不明である。

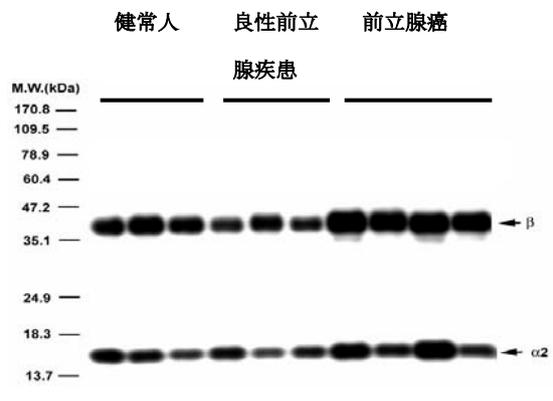
2. 研究の目的

(1) 日本における死亡原因は、昭和 56 年より癌（悪性新生物）が第 1 位であり、厚生労働省研究班の推計によれば、生涯のうちに癌に罹る可能性は男性の 2 人に 1 人、女性の 3 人に 1 人とされている。男性における前立腺癌は高齢化や食生活の欧米化等に伴い急増している癌である。前立腺癌は、高齢者に多く、進行が遅い癌であり、検診等で初期に発見できれば、治療の選択枠も多く他の癌に比べて高い生存率を示すのが特徴である。

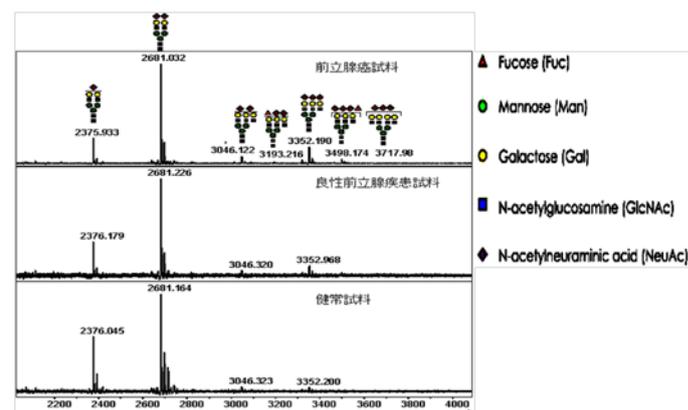
(2) 私は米国留学中に健常人、良性前立腺疾患よりも悪性前立腺癌患者血清中のハプトグロビンが有意に増加している(図 1)と共に、ハプトグロビンが糖鎖修飾（多分岐糖鎖にシアル酸とフコースが結合）を受けていることを発見した(図 2, Fujimura T et al. *Int J Cancer*. 2008)。

ハプトグロビンが新たな前立腺癌の腫瘍マーカーとして用いられる診断法を確立する。

(図 1) 前立腺癌患者、良性前立腺疾患患者及び健常人の血清に含まれるハプトグロビンに対するウェスタンブロットティングの結果



(図 2) 前立腺癌患者、良性前立腺疾患患者、健常人各由来のハプトグロビンから遊離したN-グリカンをMALDI-TOF MSで測定



3. 研究の方法

(1) 2008 年度

ハプトグロビン β 鎖に結合しているフコース (Fuc) 或いはシアル酸 (SA) の結合位置の確定

(概要) : 前立腺癌ハプトグロビン β 鎖の Asn207, Asn211 に結合している糖鎖修飾内のフコース (Fuc) 或いはシアル酸 (SA) の結合位置を確定することにより糖鎖抗原の種類を同定する。

①血清からハプトグロビンを精製し糖鎖構造の決定

すでに確立している方法で血清からハプト

グロビンを精製してくる。具体的には、健康人、良性前立疾患、前立腺癌患者血清をヘモグロビンアフィニティーカラムにかけてハプトグロビンを精製し、還元アルキル化後、ゲル濾過にてハプトグロビン β 鎖を分離した。

②フコース或いはシアル酸結合部位の決定

*完全メチル化 N-グリカンの調製

①で精製した各試料の精製ハプトグロビン β 鎖 20 μ g を用いて再度還元アルキル化 (カルボキシアミドメチル化) し、50mM Ammonium carbonate (pH 8.5) に対し 4°C、72 時間透析した。凍結乾燥後、シーケンス用のトリプシン (Promega 社) を用いて 37°C、18 時間消化した。その後 SepPak カートリッジ C18 (Waters 社) でグリコペプチド (Asn46、Asn50 を含むグリコペプチド配列) を精製し、精製したグリコペプチドを、50mM の ammonium bicarbonate (pH8.5) 中で 10 ユニットの PNGase-F (Roche Applied Science 社) を用いて、37°C で 18 時間以上処理した。再度 SepPakC18 カートリッジで N-グリカンを精製し、その後水酸化ナトリウムを用いた方法により N-グリカンの完全メチル化を実施した。

*完全メチル化 O-グリカンの調製

①で調製した精製ハプトグロビン β 鎖に 400 μ l の 1M potassium borohydride/0.1M 水酸化カリウム溶液を加え、45°C で 24 時間インキュベートし、糖鎖の還元的脱離を行った。反応を数滴の酢酸を加えて停止させ、Dowex beads minicolumn purification を用いて脱離した O-グリカンを洗浄し、次いで 10% のメタノール酢酸を用いてホウ酸を除去した。さらに、脱離した O-グリカンを Sutton-Smith ら (Cell Biology: A Laboratory Handbook. San Diego, CA: Academic Press; 2005 年) のプロトコールに従って完全メチル化を行い、完全メチル化した O-グリカンを

得た。これにより、前立腺癌ハプトグロビン β 鎖に結合している糖鎖修飾が O-グリカン或いは N-グリカンであるかを確認した。

*MALDI-QIT-TOF 解析

①、②の各操作で得た試料それぞれを 10 μ l のメタノールに溶解し、1:1 (容量比) 2,5-ジヒドロキシ安息香酸と混合後、MALDI-QIT-TOF MALDI-QIT-TOF MSⁿ マススペクトロメーターを用いた。各試料に関するハプトグロビン β 鎖に結合しているフコース或いはシアル酸の結合位置を決定し、CA19-9 (シリアル Le^a 抗原) 或いは SLX (シリアル Le^x 抗原) どちらであるかを確認した。

尚、研究に用いた血清は学内の倫理委員会の許可のもと採決した。(医院倫 20-37-2 号)

(2) 2009 年度

糖鎖修飾ハプトグロビン β 鎖の定量化

(概要): 平成 20 年度に決定した糖鎖構造をもとにハプトグロビン β 鎖の糖鎖修飾の定量をレクチンと癌糖鎖抗原抗体を組み合わせで行う。

①レクチンと癌糖鎖抗原抗体の選択

ハプトグロビン β 鎖中に同定された糖鎖構造をレクチン (PHA, LAL, LTL AAL, AOL, PHAL, MAA, SNA, SBA, WFA) あるいは癌糖鎖抗原抗体 (CA19-9, SNH3) でイムノプロットし健康人、良性前立疾患、前立腺癌患者血清と定量比較し統計学的に有意差を調べた。レクチンと癌糖鎖抗原抗体のどの様な組み合わせが良性前立疾患、悪性前立腺癌患者血清中のハプトグロビンに対する腫瘍マーカーとして有効であるか評価し、ハプトグロビンの特異的な糖鎖修飾が前立腺癌の腫瘍マーカー診断として可能かどうか検討した。

②血清前処理用ミニカラムの作製

血清中にはハプトグロビン以外の多くのタンパク質 (アルブミン、グロブリン、他) が存在する。ハプトグロビンは抗体による免疫

沈降が不十分である（ハプトグロビンの有する物理化学的性質による）為、効率良くハプトグロビンのみを精製してくる方法として、私はハプトグロビンのヘモグロビン結合性を利用して血清より特異的にハプトグロビンのみを精製してきた。少量多検体処理できるようにヘモグロビン前処理用ミニカラムを作製して、ハプトグロビン β 鎖の糖鎖修飾の定量用に用いる。最終的にはサンドイッチアッセイ (ELISA) に応用すべきヘモグロビン修飾ゲル粒子を作製する。ピアス社の **Microlink Protein Coupling Kit (Amino Link Plus Coupling Gel)**, 或いは **Polystyrene Beads, underivatized** を対象として、前処理用或いは ELISA assay 用のゲル粒子を作製し、血清からハプトグロビンを短時間で多検体精製できる系を試みる。

(3) 2010 年度

糖鎖修飾ハプトグロビン β 鎖の定量キットの試作

(概要): 糖鎖修飾ハプトグロビン β 鎖の定量キットを試作し、迅速、簡便な前立腺癌の診断法を確立する。

①糖鎖修飾ハプトグロビン β 鎖の定量キットの試作

ハプトグロビンの簡便な精製法でかつ高感度な検出方法としてのサンドイッチ ELISA 法

あらかじめ抗ハプトグロビン抗体を固定した ELISA 用プレートを作製する。その後、健常人、良性前立腺疾患或いは悪性前立腺癌患者血清を約 25 μ l プレートに添加する。HRP の結合したレクチン及びビオチンの結合したレクチンを反応させる。これにより血清中のハプトグロビンを簡便に精製すると共にハプトグロビン β 鎖に結合している糖鎖を検出、定量した。反応液を 450nm~650nm の差吸光度を用い、マイクロプレートリーダーにて測定した。ELISA 法をベースにハプトグ

ロビン量当たりのレクチン結合比を検討した。

4. 研究成果

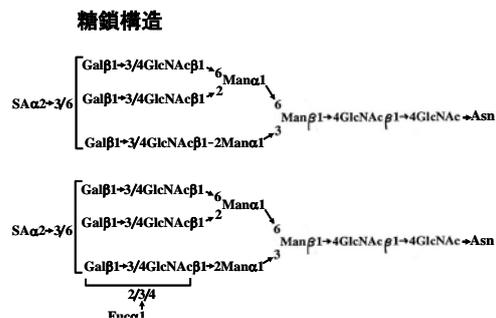
(1) 2008 年度

①血清からハプトグロビンを精製しフコース或いはシアル酸結合部位の決定

各血清から精製したハプトグロビン β 鎖をトリプシン消化後、グリコペプチド (Asn207、Asn211 を含むグリコペプチド配列) を精製した。精製したグリコペプチドの N-グリカン或いは O-グリカンの MALDI-TOF 解析から前立腺癌ハプトグロビン β 鎖に結合している糖鎖修飾 (Asn207、Asn211) は O-グリカンではなく N-グリカンであることが示唆された。その N-グリカンに結合している糖鎖の末端側にはフコース或いはシアル酸が結合していた。シアリル Le^a 或いはシアリル Le^x どちらであるか、MALDI-TOF ではっきりしなかった。レクチンと癌糖鎖抗原抗体を用いた結果シアリル Le^a の可能性であることが分かった。

(図 3)

(図 3) ハプトグロビン β 鎖 Asn207、Asn211 の



(2) 2009 年度

①レクチンと癌糖鎖抗原抗体の選択

ハプトグロビン β 鎖中に同定された糖鎖構造を基に選択したレクチンのうち多岐化 (PHA-L)、シアル酸修飾 (SNA) 及びフコシレーション (AAL) が悪性前立腺癌患者と良性前立腺疾患及び健常人血清と比較すると有意に上昇していた。(悪性前立腺癌患者 対 健

常人 PHA-L : $p < 0.002$ 、SNA : $p < 0.0001$ 、AAL : $p < 0.0001$ 、悪性前立腺癌患者 対 良性前立腺疾患 PHA-L : $p < 0.012$ 、SNA : $p < 0.002$ 、AAL : $p < 0.05$)。同様に、癌糖鎖抗原抗体のうち CA19-9 が悪性前立腺癌患者血清で有意に上昇していた。(悪性前立腺癌患者 対 健常人 CA19-9 : $p < 0.001$ 、悪性前立腺癌患者 対 良性前立腺疾患 CA19-9 : $p < 0.01$)。ハプトグロビンの糖鎖修飾が腫瘍マーカーとして有効である可能性が示された。

② 血清前処理用ミニカラムの作製

ハプトグロビン β 鎖の糖鎖修飾の定量用に用いる血清の前処理法としてヘモグロビン Beads を作製した。血清からハプトグロビンを短時間で多検体精製できたが、ヘモグロビン Beads からハプトグロビンの溶出方法を検討する必要性があった。

(3) 2010 年度

悪性前立腺癌患者と良性前立腺疾患及び健常人血清と比較すると糖鎖修飾されているハプトグロビン β 鎖中の多岐化(PHA-L)、シアル酸修飾 (SNA) 及びフコシレーション (AAL) 化が悪性前立腺癌患者で著しく有意に上昇していた。PSA 値が 4-10ng/ml のグレーゾーンに入る悪性前立腺癌患者と良性前立腺疾患患者間でも区別が可能であった。

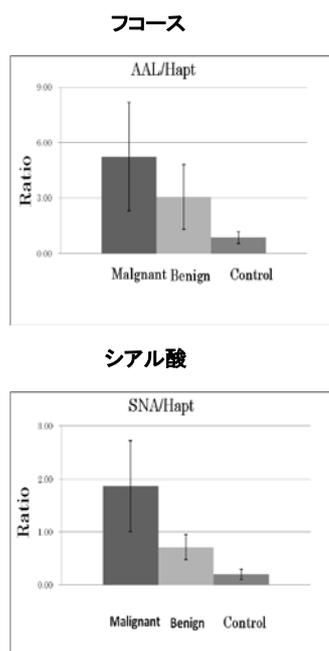
(図 4)

サンドイッチ ELISA 法によるハプトグロビンの糖鎖修飾の検出が悪性前立腺癌の早期診断法につながる可能性を示した。また、前立腺癌の血中腫瘍マーカー測定用の(糖鎖修飾ハプトグロビン β 鎖の定量) キット化の目的が立った。

[まとめ]

ハプトグロビンが血中の糖鎖構造に基づく新たな前立腺癌の腫瘍マーカーとして用いられる診断法の可能性を示した。

(図 4) ELISA 法によるハプトグロビン量当たりのレクチン結合比



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ①Horie A., Fujimura T., Nishiyama M. et al. Discovery of proteinaceous N-modification in lysine biosynthesis of *Termus thermophilus*. *Nat Chem Biol*, 査読有、5巻、2009、673-679(10人、7番目)
- ②Kawano T., Fujimura T., Taka H., Nitta K. et al. Globotriaosylceramide-expressing Burkitt's lymphoma cells are committed to early apoptotic status by rhamnose binding lectin from catfish eggs. *Biol Pharm Bull*. 査読有、32巻、2009、345-353(9人、6番目)
- ③Kato T., Takai T., Fujimura T., Ogawa H. et al. Mite serine protease activates protease-activated receptor-2 and induces cytokine release in human keratinocytes. *Allergy*, 査読有、64巻、2009、

1366-13674(10人、3番目)

④Hattori N., Fujimura T., Mochizuki H. et al. Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord、査読有、15巻、2009、35-38(7人、4番目)

⑤Saito S., Fujimura T., Arai Y. et al. Haptoglobin-beta chain defined by monoclonal antibody RM2 as a novel serum marker for prostate cancer. Int J Cancer、査読有、123巻、2008、633-640(16人、5番目)

[学会発表] (計4件)

① 藤村務、他3名血中のハプトグロビンをバイオマーカーに用いる前立腺ガンの早期診断法、BMB2010(日本分子生物・生化学会合同大会)、2010年12月9日、神戸ポートアイランド

② 数野彩子、藤村務、他2名、前立腺癌診断を目的とした血清糖蛋白の糖鎖変化を捉える SPR 多段階解決法の確立、BMB2010(日本分子生物・生化学会合同大会)、2010年12月9日、神戸ポートアイランド

③ Hiroaki K., Tsutomu F., Fumiyuki Y. 他3名、Identification of nitrotryptophan in the sequence of nitrated proteins generated by the treatment of PC12 cell lysate with peroxynitrite. The 82nd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society、2009年10月23日、神戸ポートアイランド

④ Tsutomu F. jimura、他4名、Glycosylation status of haptoglobin in sera of patients with prostate cancer versus benign prostate disease and normal subjects. Biochemistry and Molecular Biology 2008、2008年10月23日、神戸ポートアイランド

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 新規な糖鎖修飾ハプトグロビン
発明者: 五十嵐靖之、藤村務、他3名
権利者: 五十嵐靖之、藤村務、他3名
種類: 特許

番号: PCT/JP2008/00135

出願年月日: 平成20年5月29日

国内外の別: 国際

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 務 (FUJIMURA TSUTOMU)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・
准教授

研究者番号: 70245778

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

該当なし