様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月　 ３ 日現在

機関番号：３２７１３
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2024
課題番号：２１Ｋ０９４７９

研究課題名（和文）子宮頸管粘液を用いたレクチン、糖鎖による子宮体がんの新規診断検査法の開発

研究課題名（英文）Development of a Novel Diagnostic Method for Endometrial Cancer Using Lectin and Glycan Profiling of Cervical Mucus

研究代表者
戸澤　晃子（Tozawa, Akiko）

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：９０５６９８６５

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）：子宮内膜がんと対照となる正常内膜を収集、レクチン解析を行い、子宮内膜がんの診断に有用な分子の候補を見出した。実際の診断キットに用いるには複数の分子を組み合わせることで診断感度や特異度を適正化する必要があることがわかった。検出分子がタンパク質か、糖鎖かなど最適なターゲットとその組み合わせについて検討中である。診断方法として本診断キットは特許出願予定があるため具体的には記載できないが、診断精度解析のためには当初予定していた検体数では精度解析には不十分であることがわかったため、引き続き検体の追加収集を行いレクチン解析等の追加解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義
子宮内膜がんは罹患率が上昇している疾患である。子宮内膜がんは早期に発見できれば完治する可能性が高い疾患であるが、公的ながん検診の受診率は低く、子宮の奥からの細胞採取のため痛みを伴い受診者にとっては苦痛を伴う検査方法となっている。本研究は子宮の入り口付近からの粘液採取によって子宮内膜がんを診断することを目的としており、この診断方法が確立し普及することによって子宮内膜がんの早期発見に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Normal endometrial tissues, serving as controls, and endometrial cancer tissues were collected and analyzed using lectin profiling, leading to the identification of candidate molecules potentially useful for the diagnosis of endometrial cancer. It was found that, for application in an actual diagnostic kit, combining multiple molecular markers is necessary to optimize diagnostic sensitivity and specificity. Currently, we are investigating the optimal targets, whether the detected molecules are proteins, glycans, or a combination thereof. Although specific details cannot be disclosed due to a planned patent application for this diagnostic method, we have determined that the initially planned number of specimens is insufficient for reliable diagnostic accuracy analysis. Therefore, we are continuing to collect additional samples and performing further lectin-based and related analyses.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮内膜がん　子宮体がん　レクチン　糖鎖

様　式　C－１９、F－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

子宮体がんは近年増加傾向で、罹患年齢は妊孕性温存が必要な若年でも増加している。子宮体がんは早期に診断できれば根治が可能であるが、子宮体がん検診である子宮内膜細胞診は子宮の奥の細胞を採取するため疼痛を伴うためか受診率は低い。そこで本研究は従来の内膜細胞診に変わる低侵襲で高感度の検査方法の開発に着手することにした。研究代表者はこれまでに子宮頸部腺癌のホルマリン固定パラフィン包埋(Formalin fixed-paraffin embedded: FFPE)組織や子宮頸部腺癌症例の頸管粘液を用いてレクチン解析を行い、子宮頸部腺癌に有意に多く存在するレクチンを同定している。これまでの研究で得られた結果から子宮頸管粘液は子宮頸部だけでなく子宮体部（内膜）からの分泌粘液の特性を有し、子宮体がんに特異的なレクチンが存在していることを発見した。そこで頸管粘液を用いた子宮体がん検査の開発が可能と考え子宮体がんの診断の標的となるレクチンや糖タンパク質を明らかにし、新規子宮体がん検出キットを開発することとした。

２．研究の目的

本研究の目的は低侵襲な子宮体がん検診の採取方法、早期診断方法の開発、さらに治療の標的となり得る糖鎖の同定にある。従来の診断は子宮内膜の細胞診・組織診による病理検査であるが、本研究は採取が容易な頸管粘液、月経血等を用いて子宮体がんを早期に発見または治療するための標的となるレクチン・糖鎖の同定に着手した研究はない。妊孕性温存が必要な若年の子宮体がんの早期発見、子宮体がん死亡率を減少させる可能性は十分にあり臨床的に大きなメリットである。

３．研究の方法

(1). レーザーマイクロダイセクションによって採取された子宮体がん組織のレクチンマイクロアレイ解析

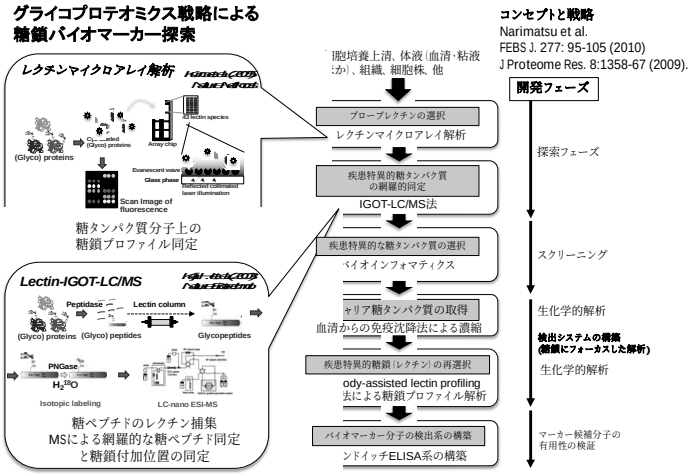
① 手術によって採取された子宮内膜がんと子宮筋腫などで摘出された子宮内膜組織のホルマリン固定パラフィン包埋(Formalin fixed-paraffin enbedded: FFPE)組織を用いて（各 10 症例)、レクチンマイクロアレイ解析を行う。

② レクチンマイクロアレイによって候補レクチンを列挙し（3～10 種程度)、レクチンで捕集したものの中から子宮内膜癌マーカーになり得る分子を探索する。(後述の新鮮組織での検討の予備実験として)

(2) 臨床検体（凍結組織、並びに頸管粘液）によるレクチンマイクロアレイ解析

前方視的に子宮内膜正常上皮と子宮内膜癌（各 10 例程度）を比較し子宮内膜癌に特徴的なレクチン候補を選出、FFPE 組織でのレクチンマイクロアレイ結果の再現性を確認する。子宮内膜がんに特徴的なレクチンにより捕集されたもののうち、量的差分が大きい分子が同定でき、既知の抗体が存在すればその抗体との組み合わせによりサンドイッチ ELISA にて、検査試薬を検討する。

(3) 子宮内膜がん凍結組織、頸管粘液を用いたマーカー分子の探索・同定



子宮内膜がん組織ならびに頸管粘液に発現がより多く見られる糖鎖と結合するレクチンプローブにより捕集された分子群について、各分子の糖鎖付加部位や糖鎖構造の特徴を同定する。糖鎖バイオマーカー分子の探索戦略は本研究の連携機関(産総研)が提案している（*FEBS J.* 2010. 277: 95-105)。本研究の大まかな解析フローを図に示す。前述のレクチンマイクロアレイ解析で選択されたプローブを用い、標的糖タンパク質を捕集し、同定する。がん性糖鎖キャリアタンパク質（内膜がんのバイオマーカー候補分子）の同定は、先行研究（*J Proteome Res.* 2014. 13:1624-1635）を参考に、FFPE 組織や子宮頸管粘液からレクチンカラムを用いて標的とする糖鎖を結合した糖ペプチドを濃縮し、それをグライコプロテオミクス解析（IGOT-LC/MS 法：*Nature Protocols* 2006. 1: 3019-3027)を用いて同定する。本研究の標的である粘液糖タンパク質はムチンなどに代表されるが、糖鎖付加が多すぎるためにグライコプロテオミクス解析では逆に解析が困難である場合も考えられる。この場合はレクチンで濃縮した試料より通常のプロテオミクス解析によって分子を同定する。

(4) マーカー候補分子の生化学解析と、診断に向けた検出系構築ならびに有用性検証
組織での糖鎖遺伝子の発現プロファイルからも糖鎖バイオマーカー候補の特徴を予想するとともに、(グライコ)プロテオミクス解析で得られたマーカー候補糖タンパク質のリストのうち、特に内膜がんの病態との関連が疑われるような糖タンパク質を中心に選択、後述の解析を行う。レクチンで分画された組織抽出物中に、候補タンパク質が存在するかどうかを Western Blot 法などで生化学的に解析し、標的糖鎖変化を有するマーカー候補分子としての性質を持つかを検討する。ここで高い特異性を示した候補タンパク質については、プローブレクチンとタンパク質に対する抗体によるサンドイッチ ELISA 検出系を構築し、患者の粘液や血清を用いて検証する。必要に応じて免疫組織化学染色により解析を行う。

４．研究成果
子宮内膜がんは罹患率が上昇している疾患である。子宮内膜がんは早期に発見できれば完治する可能性が高い疾患であるが、公的ながん検診の受診率は低く、子宮の奥からの細胞採取のため痛みを伴い受診者にとっては苦痛を伴う検査方法となっている。本研究は子宮の入り口付近からの粘液採取によって子宮内膜がんを診断することを目的としており、この診断方法が確立し普及することによって子宮内膜がんの早期発見に貢献できる。
本研究で子宮内膜がん特有のレクチン等のターゲット候補を明らかにした。現在、実装に向けての研究を継続しており、特許出願を予定しているため具体的な分子等の報告は差し控える。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計0件

〔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
研究分担者	栂谷内　晶 (Togayachi Akira) (60392635)	創価大学・糖鎖生命システム融合研究所・教授 (32690)	

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