

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22390301

研究課題名(和文) 前立腺特異抗原を凌駕する糖鎖標の前立腺癌診断ツールの開発と臨床応用

研究課題名(英文) Development of glycan-targetted assay system for diagnosis of prostate cancer

研究代表者

大山 力(Ohyama, Chikara)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80282135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌の診断に広く用いられているprostate specific antigen(PSA)テストは、疾患特異度が低いことさらに診断効率の良い腫瘍マーカーの開発が待たれている。本研究では、PSAの癌性糖鎖変異を検出するモノクローナル抗体と抗フリーPSAモノクローナル抗体を利用した新規アッセイ系を開発した。さらに、本アッセイ法が、従来のPSAテストを凌駕する特異度を有することを立証した。

研究成果の概要(英文)：To develop an assay system to measure prostate specific antigen (PSA) with cancer-associated aberrant glycosylation and to compare the diagnostic accuracy with conventional PSA test and %free PSA. We previously identified prostate cancer (PCa)-associated aberrant glycosylation on PSA, that is, 2,3-linked sialylation as an additional terminal N-glycan on free PSA (S2,3PSA). In the present study, we developed a new assay system for measurement of S2,3PSA with magnetic microbead-based immunoassay. We used the magplex beads to measure serum S2,3PSA, employing anti-human free PSA monoclonal antibody (8A6) for coating beads and anti-2,3-linked sialic acid monoclonal antibody (HYB4) for detection. Area under the curve (AUC) for detection of PCa with S2,3 PSA was 0.84 which was significantly higher than those with PSA (0.57) or %free PSA (0.61). (P<0.001) The novel assay system had significantly higher specificity than conventional PSA test.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 前立腺特異抗原 バイオマーカー 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌(PCa)は欧米人男性に発生する悪性腫瘍の中で最も頻度の高い癌である。従来日本を含むアジア人の前立腺癌罹患率は欧米に比べて低かったが、近年日本においても患者数が急増しており、数年後には日本人男性において最も頻度の高い癌になると予測されている。現在、PCaは前立腺特異抗原(PSA)によるスクリーニングによって発見されることがほとんどであるが、血清中のPSA値はPCa以外に前立腺肥大症(BPH)、前立腺炎、尿閉などの良性疾患においても異常高値を示す。そのため現在のPSAを使用したPCa検診法は、PCa特異的ではなく、感度と特異度を共に満足させるカットオフがないことが世界的な問題となっている。そのためfree/total PSA ratio、PSA doubling time、PSA density、PCA3、-2PSAなど診断効率を改善するための様々な工夫がなされてきたが、臨床で広く使用される状況には至っていない。

さて、AFPやhCG、CEAなど日常診療で広く使用されている腫瘍マーカーの多くが糖タンパク質であり、その糖鎖は各々特徴的ながん性変異を有している。PSAも糖タンパク質であり、我々は1997年からPSA糖鎖のがん性変異の研究を続けてきた。まず、BPH組織と進行PCa症例の血清からPSAを分離し、MALDI-TOF MSで糖鎖構造を解析した。BPHのPSA糖鎖は末端のシアル酸が α -2,6結合でガラクトースと結合していたが、PCaのPSAは α -2,3結合でガラクトース(Sia α -2,3Gal)と結合していた。

2. 研究の目的

Sia α -2,3Galを特異的に認識するモノクローナル抗体(HYB4)とfree-PSAを用いた新規ア

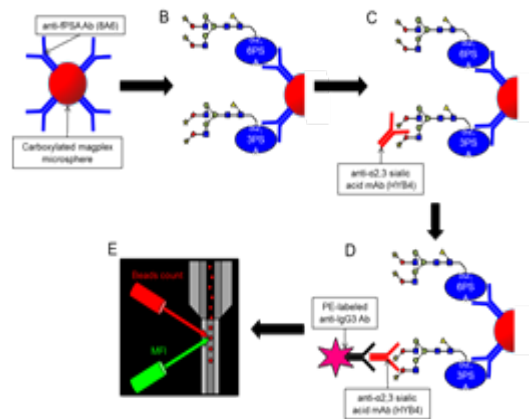
ッセイ法を開発し、その臨床応用の可能性について検討した。

3. 研究の方法

Total PSA値10ng/mL以下のBPH患者血清176例およびcT1-T2のPCa患者血清138例計314例を検体とした。血清20 μ Lを抗fPSA抗体固定化磁性ビーズと混合し、血清中のfPSAをキャプチャー後、シアル酸 α 2,3ガラクトースを認識するHYB4抗体でサンドウィッチし、がん関連free PSA (S2,3PSA)量をルミネックスシステムにより測定した。(図1)

図1

抗フリーPSAモノクローナル抗体をビーズにカップリングさせ、サンプル中のフリーPSAを吸着する(B)。さらに、HYB4抗体でサンドウィッチし(C)。前立腺癌に特異的な糖鎖変異であるS2,3PSAをルミネックスシステムで定量した。(D,E)



4. 研究成果

まず、pilot studyによってMFI cut-off valueを決定した。その結果、PCaの診断においてMFI: 1130がspecificity 72.0%、sensitivity 95%であり、同値を以下のvalidation studyにおけるMFI cut-off valueとした。314例の血清中のS2,3fPSAを測定したvalidation studyの結果、PCa群のMFIは、BPH群のMFIよりも有意に高く(図2)、PCa患者において血清中のS2,3PSA量が有意に増

加した。PCaの診断効率に関するROC曲線からS2,3PSAのAUCは0.84であり従来PSAスクリーニング法 (AUC=0.57) よりも検査効率が良好であることが示された。(図3)

PSA糖鎖の癌性変異を標的とした新規測定法は、前立腺癌の診断精度を向上させる可能性が示された。上記の結果はまだ preliminary ではあるが、従来法よりも特異度に勝つため大規模な validation study を予定している。

図2

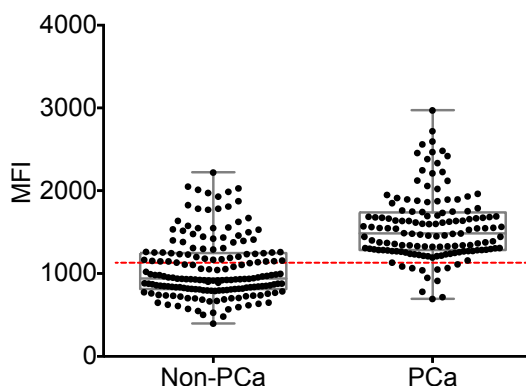
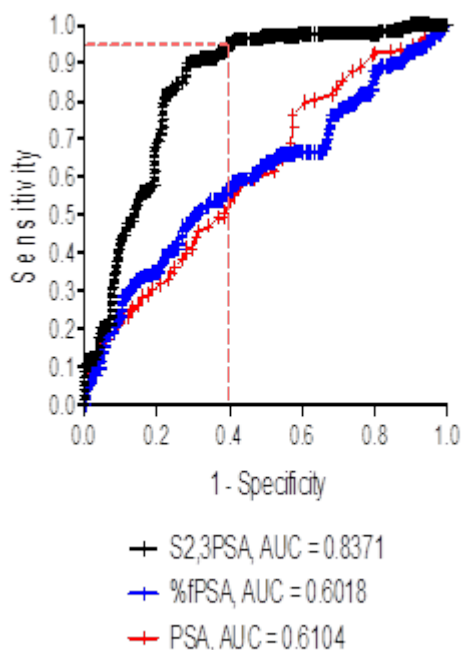


図3



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23件)

Ishibashi Y, Tobisawa Y, Hatakeyama S, Ohashi T, Narita S, Koie T, Habuchi T, Nishimura S, Ohyama C, Yoneyama T. Serum tri- and tetra-antennary N-glycan is a potential predictive biomarker for castration-resistant prostate cancer. *Prostate*. 2014Nov;74(15):1521-9.

Yoneyama T, Ohyama C, Hatakeyama S, Narita S, Habuchi T, Koie T, Mori K, Hidari KI, Yamaguchi M, Tobisawa Y.

Measurement of aberrant glycosylation of prostate specific antigen can improve specificity in early detection of prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Jun 13;448(4):390-6.

Hatakeyama S, Tobisawa Y, Yoneyama T, Habuchi T, Nishimura S, Ohyama C. Serum N-glycan alteration associated with renal cell carcinoma detected by high throughput glycan analysis. *J Urol*. 2014 Mar;191(3):805-13.

[学会発表](計48件)

Ishibashi Y, Tobisawa Y, Hatakeyama S, Ohashi T, Tanaka M, Narita S, Koie T, Habuchi T, Nishimura S, Ohyama C, Yoneyama T : Serum Tri- and Tetra-Antennary N-Glycan is a Potential Predictive Biomarker for Castration-Resistant Prostate Cancer . 第30回欧州泌尿器科学会(EAU)平成27年3月20-24日 マドリッド

Yoneyama T, Tobisawa Y, Hatakeyama S, Narita S, Habuchi T, Mori K, Koie T, Ohyama C : Measurement of Prostate Cancer-Associated Aberrant Glycosylation of Prostate Specific Antigen can improve

diagnostic accuracy. 第 109 回米国泌尿器学会議(AUA 2014)平成 26 年 5 月 16-21 日 オランダ

Yoneyama T, Hatakeyama S, Tobisawa Y, Koie T, Ohshima C, Fukuda M : Laminin binding glycan depletion on α -dystroglycan in prostate cancer cells promotes epithelial-mesenchymal transition and enhances tumor formation. 第 109 回米国泌尿器学会議(AUA 2014)平成 26 年 5 月 16-21 日 オランダ

Yoneyama T, Tobisawa Y, Hatakeyama S, Narita S, Habuchi T, Mori K, Koie T, Ohshima C : Measurement of Prostate Cancer-Associated Aberrant Glycosylation of Prostate Specific Antigen can improve diagnostic accuracy. 第 29 回欧州泌尿器科学会(EAU)平成 26 年 4 月 11-15 日 ストックホルム

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 4 件)

1. 名称 : 分析装置
発明者 : 大山 力
権利者 : 弘前大学, システムインスツルメンツ(株), 神戸大学
種類 : 外国出願 (PCT 出願)
番号 : PCT/JP2014/002630
出願年月日 : 平成 26 年 5 月 19 日
国内外の別 : 外国出願

2. 名称 : 前立腺癌と前立腺肥大症を鑑別するための方法およびキット
発明者 : 大山 力
権利者 : 弘前大学, 静岡県立大学
種類 : 外国出願 (PCT 出願)
番号 : PCT/JP2013/077495
出願年月日 : 平成 25 年 10 月 9 日
国内外の別 : 外国出願

3. 名称 : ヒトコア 2 β -1,6-*N*-アセチルグルコサミンルトランスフェラーゼ 1 を特異的に認識するモノクローナル抗体
発明者 : 大山 力
権利者 : 弘前大学

種類 : 特許
番号 : 特願 2012-232564
出願年月日 : 平成 24 年 10 月 22 日
国内外の別 : 国内特許

4. 名称 : 前立腺特異抗原の N-型糖鎖をターゲットとした前立腺がん診断法
発明者 : 大山 力
権利者 : 弘前大学, 静岡県立大学
種類 : 特許
番号 : 特願 2012-226-489
出願年月日 : 平成 24 年
国内外の別 : 国内特許

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

弘前大学大学院医学研究科泌尿器科学講座
<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~uro/>

6 . 研究組織

- (1)研究代表者
大山 力 (OHYAMA, Chikara)
弘前大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 80282135
- (2)研究分担者
神村 典孝 (KAMIMURA, Noritaka)
弘前大学・医学研究科・准教授
研究者番号 : 00281931
- (3)研究分担者
羽淵 友則 (HABUCHI, Tomonori)
秋田大学・医学系研究科・教授
研究者番号 : 00293861
- (4)研究分担者
坪井 滋 (TSUBOI, Shigeru)
弘前大学・医学研究科・研究員
研究者番号 : 20526727
- (5)研究分担者
盛 和行 (MORI, Kazuyuki)
弘前大学・医学研究科・助教
研究者番号 : 40266903
- (6)研究分担者
古家 琢也 (KOIE, Takuya)
弘前大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 60321965