

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16865

研究課題名（和文）エクソソーム中の糖蛋白質をターゲットとした初期卵巣癌マーカー診断システムの開発

研究課題名（英文）Development of a diagnostic system for early detection of ovarian cancer targeting glycoproteins in exosomes

研究代表者

林 優（Hayashi, Masaru）

東海大学・医学部・助教

研究者番号：80631837

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、血中糖蛋白質を分解して得た糖ペプチド約2000種のピーク値から癌と非癌を判定する卵巣癌検知AIを開発した（特許取得済）。本研究では、卵巣癌検知AIの特異度・感度を上げるために、エクソソーム中糖蛋白質からの糖ペプチドを用いて上記検知AIを作成することを目的としたが、血清1000μLから精製したエクソソーム中の糖蛋白質からの糖ペプチドは微量であり解析が困難であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームは細胞外小胞であり、蛋白やRNAなど、起源細胞に由来する多くの分子を含み、疾患バイオマーカーの貯蔵庫と報告されている。我々はエクソソーム中の糖蛋白質、そこから得た糖ペプチドに注目し我々の開発した卵巣癌検知AIへの応用を試みたが、残念ながらエクソソーム中の糖蛋白質からの糖ペプチドは微量であり解析が困難であった。今後、エクソソーム中の糖蛋白質を詳細に解析できる方法が開発されることを期待したい。

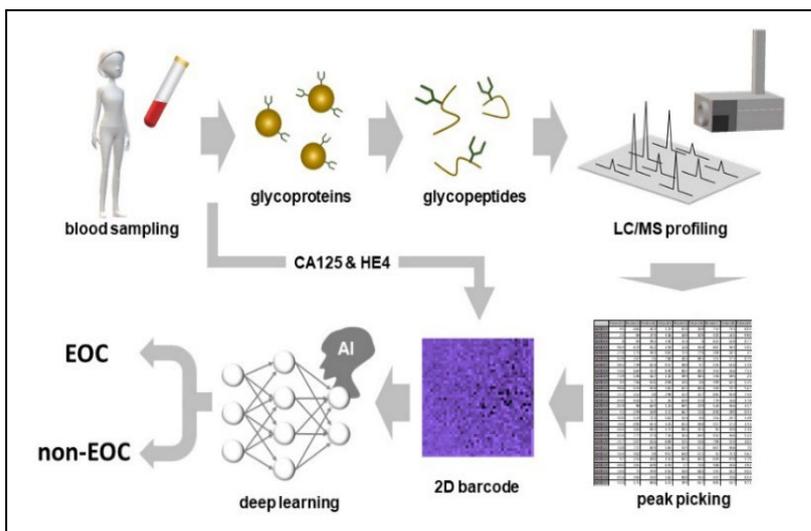
研究成果の概要（英文）：We have developed (patented) an ovarian cancer detection AI that determines cancer and non-cancer from the peak values of approximately 2000 glycopeptides obtained by degrading blood glycoproteins. In this study, we aimed to create the above detection AI with glycopeptides from glycoproteins in exosomes to increase the specificity and sensitivity of the ovarian cancer detection AI, but the glycopeptides from glycoproteins in exosomes purified from 1000 μL of serum proved to be difficult to analyze due to the small amount.

研究分野：婦人科腫瘍/卵巣癌/早期発見

キーワード：卵巣癌 子宮内膜症 エクソソーム 糖蛋白質 糖ペプチド 深層学習

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景



現在、血中糖蛋白質マーカーの測定値は、様々な固形癌で用いられているが、その診断は参考にはなるが、必ず偽陽性、偽陰性があり、陽性的中率、陰性的中率、AUCが100%になることは現在までのところ報告されていない。既存の卵巣癌マーカーとしては、CA125およびHE4が良く知られている。HE4は癌検出感度の面でやや課題があるものの、癌特異性に優れた卵巣癌マーカーである。一方、

CA125は癌検出感度の面で優れているものの、月経や良性の卵巣腫瘍である子宮内膜症でも高値化することから特異性（偽陽性）が課題となっている。このような状況から現状では無症候性の一般集団に対して上記マーカー検査での検診は推奨されておらず、卵巣癌の早期発見には精度の高い新たな癌マーカーの探索が求められている。そこで我々は、液体クロマトグラフィー/質量分析による網羅的血清糖ペプチドスペクトラ解析 (CSGSA: Comprehensive Serum Glycopeptide Spectra Analysis) (特許番号:6145650、特願:2019-108992)により得られる1例毎約2000の糖ペプチドピークに深層学習を応用して良性婦人科腫瘍と卵巣癌を選別するアルゴリズムを報告した (CSGSA-AI、上図)。

一方、エクソソームは、大部分の真核細胞において膜結合性の細胞外小胞である。エクソソームを含む細胞外小胞は起源となった細胞由来の標識分子を含んでおり、さまざまな生理学的過程に特化した機能を持つ。つまり、エクソソームは、蛋白やRNAなど、起源細胞に由来するさまざまな分子的構成要素を含んでいる。エクソソームの体液中での顕著な安定性は、疾患バイオマーカーの貯蔵庫としての有用性を高めていると報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、CSGSA-AIをエクソソーム中の糖蛋白に応用し、より感度特異度の高い卵巣癌を早期に診断するシステムの開発を目指す。

3. 研究の方法

- ・エクソソーム精製：マグネットビーズに抗エクソソーム表面抗体添付、抗体添付マグネットビーズを患者血清に投入（エクソソームの吸着）、非吸着物の洗浄、エクソソームのビーズからの分離、エクソソーム単離精製。
- ・糖ペプチド単離：エクソソームからタンパク抽出、糖ペプチドへ分解、糖ペプチドエンリッチ精製。
- ・液体クロマトグラフィー/質量分析による網羅的血清糖ペプチドスペクトラ解析

4. 研究成果

CSGSA解析の結果、エクソソームから得られた糖蛋白から糖ペプチドピークデータを得ることは困難であった。血清20 μ Lから得られる推定糖蛋白質量は約1000 μ gであることから、エクソソーム中の糖蛋白質量は血清に対し、仮に100%回収されたとしても0.34%程度であることがわかった。よって、血清1000 μ Lからの精製では検出が困難であることが判明した。つまり、血清1000 μ Lから精製したエクソソーム中の糖蛋白からの糖ペプチドは質量分析器では解析が困難であると判断された。血清量を増やすことは現実的でないことから、糖ペプチドでなくエクソソームに含まれる糖蛋白自身の検討を行うべきであると考察された。そこで、エクソソームを抽出し、DIAプロテオミクスを使って新たな卵巣癌マーカーの探索の検討を行ったが、エクソソーム抽出からプロテオミクスに至る工程が長いこと（前処理から測定まで4日程度）、その間に発生するエラー（誤差）のコントロールに限界があるであろうこと、が指摘された。マーカーを探索する上で、個々のタンパク質発現量を精度（再現性）よく測定することは重要であり、大きなばらつきはマーカー探索の成功率を著しく低下させる。また4日間のスル

ーットでは測定できる検体数に限界があると考えられた。以上の結果よりエクソソームに含まれる糖蛋白のプロテオミクスパターンを検討を行うことで、臨床的に使用可能な有益な卵巣癌早期診断法の開発は難しいと判断された。

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 池田仁恵、矢坂美和、林優、町田弘子、飯田哲士、吉田浩、平澤猛、三上幹男
2. 発表標題 Wisteria floribunda Agglutinin-Reactive Ceruloplasmin : 早期卵巣癌バイオマーカーの開発
3. 学会等名 第64回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hayashi I, Momose H, Kashiwagi H, Hayashi M, Machida H, Ikeda M, Ishimoto H, Mikami M
2. 発表標題 The utility of FS-C4BP as a prognostic biomarker for epithelial ovarian cancer.
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022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
---------	---------