

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791631

研究課題名(和文) O グリカンを標的とした泌尿器癌悪性度マーカーの開発

研究課題名(英文) Construction of biomarker in urological cancer targeting the O-glycan

研究代表者

飛澤 悠葵 (Tobisawa, Yuki)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70623768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌は近年、日本においても急速に罹患率が上昇し2015年の推計では男性の癌罹患率の1位となっており、それに伴い過剰診断・過剰治療が日本だけでなく世界的な課題となっている。本研究では糖転移酵素C2GnTの発現が摘出癌組織および針生検検体において検出された癌患者の再発率が有意に高いことが明らかとなった。さらに、低侵襲かつハイスループットなスクリーニング方法を目指し、癌患者の前立腺圧出液中のC2GnT検出を行いその発現量に応じて癌の前立腺外への浸潤度が術前に予測可能であることが示唆された。以上の結果から、今後の検討により低侵襲な診断マーカーの構築につながると予想される。

研究成果の概要(英文)：Core2 -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-1 (GCNT1) is a key enzyme that forms core 2-branched O-glycans. Paraffin-embedded PCa specimens were analyzed by immunohistochemistry for GCNT1 expression. GCNT1-negative tumors were associated with significantly better prostate-specific antigen (PSA)-free survival compared with GCNT1-positive tumors. Multivariate analysis revealed that detection of GCNT1 expression was an independent risk factor for PSA recurrence. We established new methods for GCNT1 detection from PCa specimens. Immunoblotting was used to examine post-digital rectal examination (DRE) urine from PCa patients. Over 90% of GCNT1-positive PCa patients with high concentrations of PSA showed extracapsular extension. In conclusion, GCNT1 expression closely associates with the aggressive potential of PCa. Further research aims to develop GCNT1 detection in post-DRE urine as a marker for PCa aggressiveness.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：糖転移酵素 糖鎖生物学 バイオマーカー 前立腺癌

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌検診をはじめ、癌検診の普及により癌が早期に発見される件数は急増しているが、治療法の選択基準は明確になっていない。その理由は、癌の悪性度、および治療後の再発率を現状の検診では判断できていないためである。前立腺癌を例に挙げると、これまで前立腺特異抗原 (PSA) の測定値から癌患者の絞込みが行われていたが、その精度が低く治療方針の決定には推奨できない状況となってきた。

2. 研究の目的

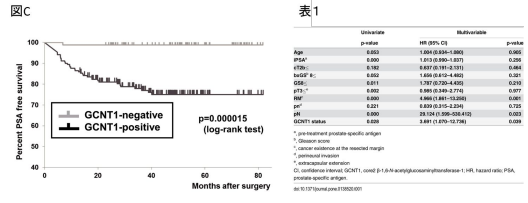
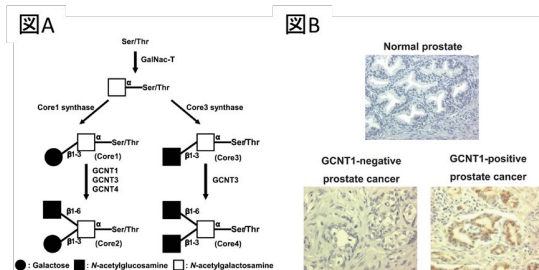
泌尿器癌、特に前立腺癌は近年急激に増加してきており、早急な手術が必要な癌であるか否かを判断することが必要となってきた。泌尿器癌においては糖転移酵素 C2GnT の発現が悪性度を反映することが明らかとなっている。本研究では、独自に作成した C2GnT モノクローナル抗体を用いた免疫染色によりこの酵素が悪性度診断のマーカーとなりうるかを検証する。さらに尿中に存在する C2GnT 生成物であるコア2糖鎖構造を有する Muc1 を特異的に検出するモノクローナル抗体の作製とそれをマーカーとして利用した新規泌尿器癌診断法の樹立を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、まず樹立した抗 C2GnT モノクローナル抗体を用いた組織染色により C2GnT の発現と泌尿器癌の悪性度が相関するかを確認した。さらに前立腺圧出液を用い、ドットプロティングシステムを利用した定量測定系により C2GnT 発現量と前立腺癌予後を比較した。測定値が前立腺癌の悪性度評価に利用可能であるかを検討し、癌の悪性度を術前に評価可能か検討した。以上の結果をふまえ、針生検などの侵襲によるリスクを伴わない安全かつ簡便な泌尿器癌悪性度診断マーカーの開発を目指す。

4. 研究成果

1). まずは前立腺癌全摘除術症例 250 例の組織切片を用い、免疫組織染色を行った結果、C2GnT 陽性率は pT2 60.1%に対し pT3, pT4 では 80.2%, 100%と有意に高率であった(図 A,B)。C2GnT 陽性群は陰性群に比べ術後 PSA 再発率が有意に高く、RM と共に独立した PSA 再発の危険因子であった (図 C および表 1)。



2). 次に、術前の因子と比較して悪性度の判定が可能かを検討するため、針生検標本 122 例の免疫組織染色を行った結果、C2GnT 陽性率は pT3 以上では 87.5%と有意に高率であった。C2GnT 陽性群は陰性群に比べ術後 PSA 再発率が有意に高く、iPSA と共に独立した PSA 再発の危険因子であった (図 D,E および表 2)。

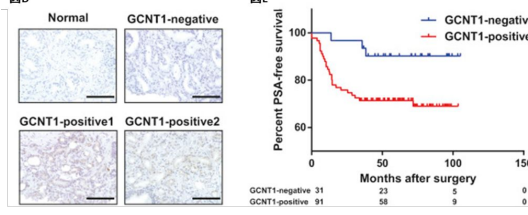
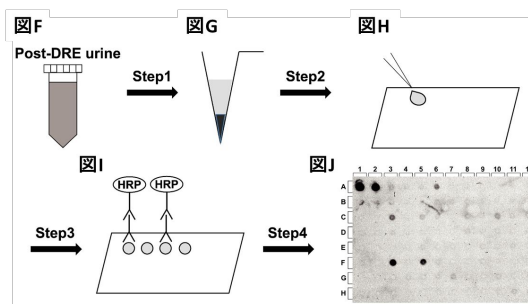


表 2 Univariate and multivariate analysis for prostate specific antigen recurrence-free survival

	Univariate	Multivariate	
	p-value	HR (95% CI)	p-value
Age	0.053	1.014 (0.947-1.085)	0.693
iPSA	0.000	1.026 (1.010-1.042)	0.001
cT2c5	0.173	0.730 (0.236-2.264)	0.586
Biopsy Gleason score 8s	0.048	1.490 (0.659-3.369)	0.339
GCNT1 status	0.024	3.806 (1.143-12.671)	0.029

iPSA: initial prostate specific antigen, GCNT1: core2 β1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-1.

3). さらに、低侵襲かつハイスルーブット化を目指す、前立腺由来タンパク質が豊富に含まれると予想される前立腺癌圧出液中の C2GnT の定量測定を行った (下図 F-J)。



前立腺全摘除術施行例の患者 35 名を対象に検討を行った。本症例は PSA 再発症例が無い場合、術後 PSA 再発の危険因子である癌の被膜外浸潤予測に有効であるか否かを検証したところ、PSA および C2GnT 量が高い症例において被膜外浸潤率が高いことが明らかとなった (表 3)。さらに、測定値を基に ROC 曲線を作製したところ PSA では AUC=0.7455、C2GnT では AUC=0.7614 であった (図 K,L,M)。これを基にカットオフ値を算出し (PSA=7.52 ng/mL、C2GnT=79.36 pg/mg)、リスク分類

を以下のように設定した。Double negative (DN)-risk (PSA < 7.52 ng/mL, GCNT1 < 79.36 pg/mg), single positive (SP)-risk (PSA > 7.52 ng/mL or GCNT1 > 79.36 pg/mg) and double positive (DP)-risk (PSA > 7.52 ng/mL and GCNT1 > 79.36 pg/mg)。このリスク分類を用いるとDPリスク症例では90%以上の確率で術前に前立腺癌の被膜外浸潤が予測できることが明らかとなった(図N)。

表3

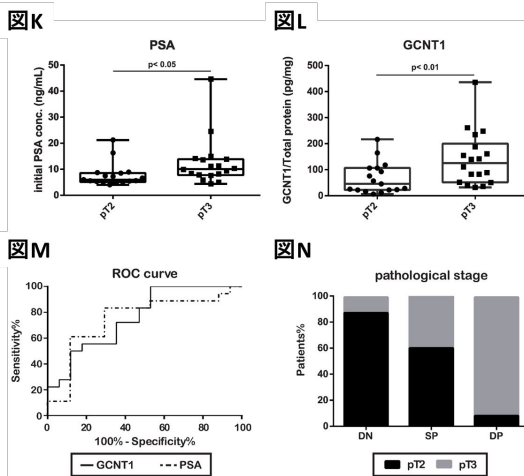
	HR (95% CI)	p-value
Age	1.003 (0.823-1.222)	0.978
IPSA ^a	1.252 (0.984-1.594)	0.068
cT2b ^c	0.718 (0.015-33.566)	0.866
bxGS ^b ≤ 8	1.569 (0.457-5.385)	0.474
GCNT1 status	1.031 (1.009-1.053)	0.006

^a: pre-treatment prostate-specific antigen

^b: Gleason score

CI, confidence interval; GCNT1, core2 β-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-1; HR, hazard ratio; PSA, prostate-specific antigen

doi:10.1371/journal.pone.0138520.t002



今後、臨床検体を用いた更なる検討が必要であるが、本研究の結果は低侵襲かつハイスループットな悪性度診断法の開発につながる事が予想される。

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2件)

1. Kojima Y, Yoneyama T, Hatakeyama S, Mikami J, Sato T, Mori K, Hashimoto Y, Koie T, Ohyama C, Fukuda M, Tobisawa Y. Detection of Core2 β-1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase in Post-Digital Rectal Examination Urine Is a Reliable Indicator for Extracapsular Extension of Prostate Cancer. PLoS One. 2015 Sep 21;10(9):e0138520. doi: 10.1371/journal.pone.0138520. (査読有)
2. Sato T, Yoneyama T, Tobisawa Y, Hatakeyama S, Yamamoto H, Kojima Y, Mikami J, Mori K, Hashimoto Y, Koie T, Ohyama C. Core 2 β-1,6-N-acetylgluco

saminyltransferase-1 expression in prostate biopsy specimen is an indicator of prostate cancer aggressiveness. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Jan 29;470(1):150-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.011. (査読有)

(学会発表) (計8件)

1. Tobisawa Y: Expression of core 2 β-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase is an independent risk factor for PSA recurrence after radical prostatectomy and closely associated with aggressive potential. Glycobiology Meeting 2012 平成 24 年 11 月 11-14 日 (サンディエゴ(アメリカ合衆国))
2. Tobisawa Y: Glycan modification of podoplanin enhances growth factor production through stabilization of platelet aggregation in bladder cancer cell. 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(スウェーデン))
3. Tobisawa Y: Immunohistochemical detection of core2 β-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase is an independent risk factor for PSA recurrence after radical prostatectomy. 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(スウェーデン))
4. Tobisawa Y: Glycan modification of surface glycoproteins on prostate cancer induces secretion of growth factors via enhanced interaction with prostate stromal cells. 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(スウェーデン))
5. Tobisawa Y: Detection of core2 β-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase in post-digital rectal examination urine is an independent predictor for extraprostatic extension of prostate cancer. 第 109 回米国泌尿器学会議(AUA 2014)平成 26 年 5 月 16-21 日(オーランド(アメリカ合衆国))
6. 飛澤悠葵: pT3 および PSA 再発を術前に予測する新規前立腺癌悪性度診断マーカーの開発. 第 102 回日本泌尿器科学会総会平成 26 年 4 月 24-26 日 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
7. 飛澤悠葵: 前立腺マッサージ尿中の core2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase の発現は pT3 予測に有用である. 第 79 回日本泌尿器科学会東部総会 平成 26 年 10 月 12-14 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
8. 飛澤悠葵: Core2 β-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase に対する新規モノクローナル抗体の樹立と本酵素による前立腺癌の悪性度増強機構の解明. 第 87 回日本生化学会大会 平成 26 年 10 月 15-18 日 グランドプリンスホテル京都(京都府・京都市)

(図書) (計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:抗コア 2 1,6-N-アセチルグルコサミニル
トランスフェラーゼIモノクローナル抗体を利用し
て癌の悪性度を診断する方法

発明者:大山 力、畠山真吾、米山 徹、飛澤悠
葵

権利者:同上

種類:特許

番号:特願 2012-232564

出願年月日:2012年10月22日

国内外の別:国内

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

飛澤 悠葵 (Tobisawa, Yuki)

弘前大学大学院医学研究科・助教

研究者番号:70623768

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: