

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430145

研究課題名(和文)糖鎖修飾を標的とした前立腺がん診断マーカーの開発

研究課題名(英文)Development of prostate cancer diagnostic marker targeting glycosylation

研究代表者

藤村 務 (FUJIMURA, Tsutomu)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70245778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺がんの診断には前立腺特異抗原(PSA値)が用いられるが、グレーゾーンといわれる検出範囲、4-10 ng/mlには良性疾患患者が7割も含まれ、不必要な針生検が行われているのが現状である。そこで、前立腺がん患者血清由来ハプトグロビン(Hpt)とIgGからがん特異的な糖鎖修飾ペプチド抗体を作製し、多項目同時測定が可能なマルチプレックスビーズ結合抗体検出法の開発を行った。前立腺がん患者、良性疾患患者、健常者間の血清HptおよびIgGの糖鎖修飾量を比較した。その結果、前立腺がん特異的に糖鎖構造が変化し、がん患者を識別できる可能性を示した。前立腺がんの針生検を必要としない確定診断法の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Prostate specific antigen (PSA) is used for diagnosis of prostate cancer, but detection range called gray zone, 4-10 ng / ml, includes benign disease patients 70%. An unnecessary biopsy is performed in patients with benign diseases at present. The cancer-specific glycosylated peptide antibodies were prepared from haptoglobin (Hpt) and IgG from prostate cancer patient serum. I have developed a multiplex bead bound antibody detection method capable of simultaneous measurement of multiple items. The glycosylation amounts of Hpt and IgG in Serum between prostate cancer patients, benign diseases patients, and healthy subjects were compared. As a result, changes in prostate cancer-specific sugar chain structure could be confirmed in cancer patients. The possibility to distinguish between cancer patient and benign disease patient or healthy individual can doing. These results demonstrated the possibility of definitive diagnosis that does not require biopsy of prostate cancer.

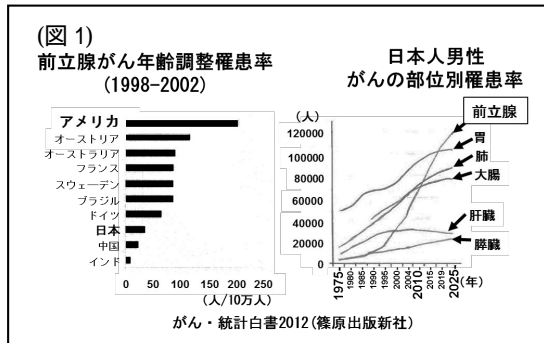
研究分野：糖鎖構造解析、診断マーカーの探索

キーワード：前立腺がん 診断マーカー 糖タンパク質 糖鎖修飾ペプチド IgGの糖鎖 anti IgG 抗体 anti Hpt 抗体 Luminex

1. 研究開始当初の背景

(1) 前立腺がんの現状

日本の前立腺がんの罹患率は急増している。以前は男性成人の悪性腫瘍では第6位程度であったが、最近の統計では、胃がん、肺がんに次いで第3位との報告がなされている。2020年以降は2位となり、近い将来1位となることが予想されている。欧米では以前から第1位であったが、日本が急激に追いついてきている。原因としては、高齢化(前立腺がんの発症年齢は50歳以降に多く60歳から増え始め70歳以上で最も多くなる。)食生活やその他の生活環境の欧米化による罹患率の急増が指摘されている。(図1)



(2) 前立腺がんマーカーとしての血中・前立腺特異抗原 (PSA) の現状

臨床現場では、前立腺がんマーカーとして組織特異性の高い血中 PSA 値が用いられる。グレーゾーンといわれる 4-10 ng/ml の範囲内では、前立腺がん患者 (グリソン・スコア 4+4) の 30%、前立腺肥大症などの良性疾患患者の 70% が混在してしまう。従ってがんの確定診断は患者への身体的な負担が大きい針生検に依存しているのが現状である。この問題を克服し PSA 値を補完する簡便で低侵襲ながん診断法の確立が患者の救済 (過剰診断) と医療費負担の軽減の両面で大きく貢献することになる。

(3) 臨床的に有用な前立腺がんマーカーの探索

実際に順天堂病院において血中 PSA 検査を実施したところグリソン・スコア 4+4 においてもグレーゾーン (4-10ng/ml) 値を有するがん患者は 25% 以上存在していた。また、良性疾患患者の 68% はグレーゾーン値を示していた。しかし、良性疾患患者の 27% は PSA 値が 10ng/ml 以上であった。PSA 値によるスクリーニング検査が不十分であると共に過剰診断による患者に対する不利益が問題視される。これまでの研究により私は、悪性前立腺がん患者由来の血清中からがん特異的な糖鎖修飾を受けたハプトグロビン (Hpt) を見出した。糖鎖構造解析により Hpt の鎖のアミノ酸残基 Asn207、211 に多岐化、シアル酸化 (NeuAc)、フコシル化などがん化による特異的な糖鎖の増加 (異常) が認められた。更に血清中の Hpt 定量とレクチン結合量測定を連続的に行う表面プラズモン共鳴 (SPR) 多段階解析法を開発した。Hpt への糖

鎖結合量として NeuAc 2-6 結合を認識するレクチン SNA-1 の量を定量化した。その結果、前立腺がん患者と健常者間、前立腺がん患者と前立腺肥大症などの良性疾患患者間で有意な差異を見出した。これらの結果から、Hpt-レクチン ELISA の研究を進め、ある程度の結果が得られた。しかし、糖鎖に対するレクチンの特異性はあるものの、目的の Hpt の糖鎖以外に結合する場合があり、更なる研究を進める必要があった。悪性前立腺がん患者血清由来 Hpt から糖鎖修飾ペプチドを精製し (Hpt の糖鎖修飾を含む鎖 203 ~ 215 残基) それを抗原に抗体を作製した (anti Hpt 糖鎖修飾ペプチド抗体: anti Hpt 抗体)。本研究課題では、糖鎖修飾を含むペプチド構造全体を認識するのが特徴的であり、既に抗体が得られ、ELISA 法の構築段階に入っている。

更に、がんマーカーとしての特異度、感度を上げるためにマーカーの探索を行った。前立腺がん患者、良性疾患患者および健常者の比較を行った結果、がんによる糖鎖構造変化は主に血清中に豊富に存在する主要糖タンパク質 (IgG, IgA, ハプトグロビン、トランスフェリン、1 アンチトリプシン) に存在することが明らかとなった。これらの結果は、がん患者の血清糖タンパク質の糖鎖構造変化が PSA 値を補完するバイオマーカーとなることを示唆する (論文作成中)。

2. 研究の目的

前立腺がんの診断には PSA 値が用いられているが、グレーゾーンといわれる検出範囲、4-10 ng/ml には良性疾患患者が 7 割も含まれ、不必要な針生検が行われているのが現状である。これまで私は前立腺がん患者血清 Hpt からがん特異的な糖鎖修飾ペプチド抗体を作製し、ELISA 法の開発を行ってきた。今回新たに、前立腺がん患者血清 IgG の糖鎖構造変化を見出した。糖鎖修飾を標的とした Hpt と IgG による多項目同時測定が可能なマルチプレックスビーズ結合抗体検出法を開発し、針生検を必要としない高感度、高精度な確定診断法を確立し臨床導入を目指す。患者への身体的負担と医療経済的負担の軽減を図る。

3. 研究の方法

(1) 悪性前立腺がん患者、良性疾患患者、健常者由来の血清中から Protein G カラムを用いて IgG を精製する。それぞれから精製した IgG を還元アルキル化後、ゲル濾過法を用いて重 (H) 鎖と軽 (L) 鎖を分離精製し、重 (H) 鎖をトリプシン消化後 HPLC で糖鎖修飾ペプチドを精製する。

(2) 精製した糖鎖修飾ペプチドを抗原にして抗体を作製する。

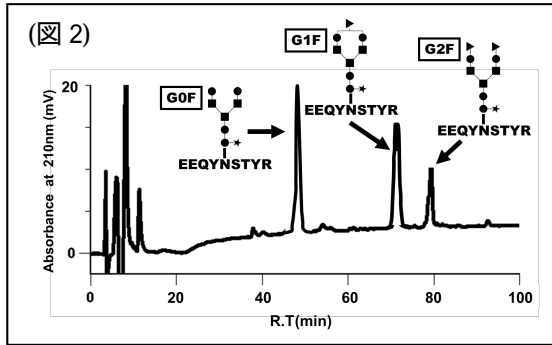
(3) がん患者、良性疾患患者、健常者の血清を用いてウエスタンブロットを行い、IgG に対する反応性からがん患者由来の糖鎖修飾ペプチド抗体 (anti IgG 抗体) の特異性の評価を行う。既に得られている anti Hpt 抗体

および悪性度（グリソン・スコア：2～10）と病期（ステージ：A～D）の相関関係も比較し診断マーカーとしての評価を行う。

(4) anti Hpt 抗体と anti IgG 抗体のマルチプレックスビーズ結合抗体を作製し多項目同時測定が可能な抗体検出法の開発を目指す。

4. 研究成果

(1) 悪性前立腺がん患者由来血清 IgG の糖鎖修飾ペプチドを精製した。HPLC のクロマトパターンを図 2 に示す。

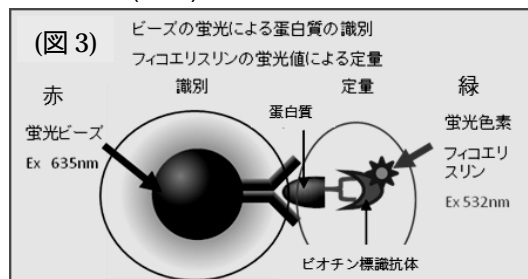


(2) 精製した IgG 由来の糖鎖修飾ペプチド G0F、G1F、G2F、を抗原にしてマウス及びウサギに免疫し抗体を作製し、抗体の特異性をウエスタンブロット法で確認した結果、特異性の高い抗体が得られた。

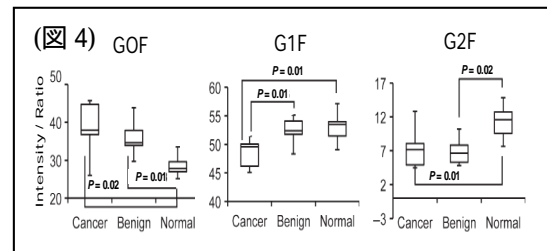
(3) スクリーニングとして前立腺がん患者、良性疾患患者、健常者の血清を用いてウエスタンブロットを行い、それぞれの血清 IgG に対する反応性の違いからがん患者由来の糖鎖修飾ペプチド G0F、G1F、G2F 抗体の特異性の評価を行った。anti Hpt 抗体と anti IgG 抗体を組み合わせることにより、健常者とグレーゾーン（4-10 ng/ml）値を示すがん患者の診断区別の可能性を示した。

(4) マルチプレックス抗体結合蛍光ビーズ検出法の確立：Luminex®200PROTEIN/多項目同時測定法

Luminex テクノロジーシステムの測定系はフローサイトメーターと同様な原理で、赤色と緑色レーザーをビーズに照射する。赤色のレーザーはタンパク質の識別、緑色のレーザーはタンパク質の 2 次抗体に照射しその蛍光標識を検出して定量を行う。この 2 色のレーザーを照射することにより、各ビーズの識別と蛍光標識の蛍光値の情報を得ることができるため、多種のビーズが混在した状態でも検出することができ、多項目の同時測定が可能となる。(図 3)



特異性が明らかとなった anti Hpt 抗体と anti IgG 抗体を蛍光ビーズに結合し、作製した抗体を用いてマルチプレックス抗体結合蛍光ビーズ検出法が構築できるか検討した。実証実験として患者血清を試料に用いビーズ結合抗体、蛍光標識ストレプトアビジンを逐次反応させ結合量を測定した。前立腺がん患者、良性疾患患者、健常者間の血清 Hpt および IgG の糖鎖修飾量を比較した。その結果、前立腺がん特異的糖鎖構造の変化が有意にがん患者と良性疾患患者および健常者を識別できる可能性を確認示した(図 4)。PSA 値を補完する簡便で低侵襲な前立腺がん診断法の可能性が示された。



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 17 件)

Kazuno S, Furukawa J, Shinohara Y, Murayama K, Fujime M, Ueno T, Fujimura T. Glycosylation status of serum immunoglobulin G in patients with prostate diseases. *Cancer Med.* 2016, 5, 1137-1146.

doi:10.1002/cam4.662. (査読有)

Takamiya S, Hashimoto M, Mita T, Fujimura T, Ueno T, Yamasaki H. Bioinformatic identification of cytochrome b5 homologues from the parasitic nematode *Ascaris suum* and the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* highlights the crucial role of *A. suum* adult-specific secretory cytochrome b5 in parasitic adaptation. *Parasitol Int.* 2016, 65, 113-120. doi:10.1016/j.parint.2015.11.004. (査読有)

Tabe Y, Hatanaka Y, Nakashiro M, Fujimura T, Konopleva M, Andreeff M, Miida T, Iwabuchi K, Sasai K. Integrative genomic and proteomic analyses identifies glycerol-3-phosphate acyltransferase as a target of low-dose ionizing radiation in EBV infected-B cells. *Int J Radiat Biol.* 2016, 92, 24-34. doi:10.3109/09553002.2015.1106021. (査読有)

Mukaihara K, Suehara Y, Kohsaka S, Akaike K, Fujimura T, Kazuno S, Okubo T, Takagi T, Yao T, Kaneko K, Saito T.

Protein Expression Profiling of Giant Cell Tumors of Bone Treated with Denosumab. *PLoS One*. 2016, 11, e0148401.doi:10.1371/journal.pone.0148401. (査読有)

Mukaihara K, Suehara Y, Kohsaka S, Fujimura T, Kobayashi E, Yao T, Ladanyi M, Kaneko K, Saito T. Expression of F-actin-capping protein subunit beta, CAPZB, is associated with cell growth and motility in epithelioid sarcoma. *BMC Cancer*. 2016, 10, 206-216.doi:10.1186/s12885-016-2235-z. (査読有)

Nishikado H, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Ogawa H, Okumura K, Takai T. Cysteine protease antigens cleave CD123, the subunit of murine IL-3 receptor, on basophils and suppress IL-3-mediated basophil expansion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015, 460, 261-266.doi:10.1016/j.bbrc.2015.03.022. (査読有)

Watanabe T, Tamura Y, Kawaguchi M, Yamamoto R, Sato F, Ikeda S, Taka H, Fujimura T, Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. Effects of sitagliptin on ectopic fat contents and glucose metabolism in type 2 diabetic patients with fatty liver: A pilot study. *J Diabetes Investig*. 2015, 6, 164-172. doi:10.1111/jdi.12262. (査読有)

Sugimoto K, Suzuki HI, Fujimura T, Kaga N, Taka H, Miyazono K, Komatsu N. A clinically attainable dose of L-asparaginase targets glutamine addiction in lymphoid cell lines. *Cancer Sci*. 2015, 106, 1534-1543. doi:10.1111/cas.12807. (査読有)

Tabé Y, Kojima K, Ishizawa J, Kazuno S, Kauffman M, Shacham S, Fujimura T, Ueno T, Miida T, Andreeff M. Ribosomal Biogenesis and Translational Flux Inhibition by the Selective Inhibitor of Nuclear Export (SINE) XP01 Antagonist KPT-185. *PLoS One*. 2015, 10, e0137210.doi:10.1371/journal.pone.0137210. (査読有)

Seko Y, Fujimura T, Yao T, Taka H, Mineki R, Okumura K, Murayama K. Secreted tyrosine sulfated-eIF5A mediates oxidative stress-induced apoptosis. *Sci Rep*. 2015, 5, 13737. doi:10.1038/srep13737. (査読有)

Harada M, Benito J, Yamamoto S, Fujimura T, Kazuno S, Kojima K, Tabé Y, Konopleva M. The novel combination of dual mTOR inhibitor AZD2014 and pan-PIM inhibitor AZD1208 inhibits growth in acute myeloid leukemia via

HSF pathway suppression. *Oncotarget*. 2015, 6, 37930-37947.doi:10.18632/oncotarget.6122. (査読有)

Kuba M, Matsuzaka T, Kaga N, Taka H, Fujimura T, Nakagawa Y, Yamada N, Shimano H. Absence of Elovl6 attenuates steatohepatitis but promotes gallstone formation in a lithogenic diet-fed Ldlr(-/-) mouse model. *Sci Rep*. 2015, 5, 17604.doi:10.1038/srep17604. (査読有)

Yoshida A, Tomita T, Fujimura T, Nishiyama C, Kuzuyama T, Nishiyama M. Structural insight into amino group-carrier protein-mediated lysine biosynthesis: crystal structure of the LysZ-LysW complex from *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem*. 2015, 90, 435-447.doi:10.1038 / srep17604. (査読有)

Yamamoto E, Uchida T, Abe H, Taka H, Fujimura T, Ueno T, Takeda S, Watada H. Increased expression of ERp57/GRP58 is protective against pancreatic beta cell death caused by autophagic failure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014, 453, 19-24.doi:10.1016/j.bbrc.2014.09.040. (査読有)

Akiyama T, Niyonsaba F, Fujimura T, Ueno T, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S. The human cathelicidin LL-37 host defense peptide upregulates tight junction-related proteins and increases human epidermal keratinocyte barrier function. *J Innate Immun*. 2014, 6, 739-753. doi:10.1159 / 000362789. (査読有)

Omote K, Gohda T, Murakoshi M, Sasaki Y, Kazuno S, Fujimura T, Tomino Y. Role of the TNF pathway in the progression of diabetic nephropathy in KK-A(y) mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014, 306, F1335-47.doi:10.1152/ajprenal.00509.2013. (査読有)

Furuya N, Ikeda S, Sato S, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, Hattori N, Ueno T. PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy*. 2014, 10, 631-641.doi:10.4161/auto.27785. (査読有)

[学会発表](計 14 件)

藤村 務、新規末梢性掻痒治療薬の代謝物への影響、第 10 回メタボロームシンポジウム、2016 年 10 月 19 日～10 月 21 日、慶応義塾大学(山形県鶴岡市)

藤村 務、GCMS による呼気分析の進歩、第

17回アロマ・サイエンス・フォーラム 2016 (招待講演)、2016年10月13日アルカディア市ヶ谷(東京都千代田区)
藤村 務、渡部 彩佳、猪股 明日香、久保田 雅史、蓬田 伸、セサミンのK562細胞に対する抗腫瘍効果の解析、第89回日本生化学会大会、2016年9月25日~9月27日、仙台国際センター(宮城県仙台市)
数野 彩子、藤村 務、レクチンを活用した前立腺がん特異的糖鎖構造変化およびキャリア糖タンパク質の同定、第89回日本生化学会大会、2016年9月25日~9月27日、仙台国際センター(宮城県仙台市)
藤村 務、Carbohydrate chain structure analysis of Acute Phase Proteins included in prostate cancer、平成28年度 化学系学協会東北大会(招待講演)、2016年9月10日~9月11日、いわき明星大学(福島県いわき市)
小松 祥子、藤村 務、LC-ESI-MS/MSによるコルチゾール生合成関連ステロイドの一斉分析、日本薬学会第136年会、2016年3月26日~3月29日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
藤村 務、GC/MSによる呼気分析、第341回ガスクロマトグラフィー研究懇談会(招待講演)、2015年12月11日、北トピア13F飛鳥ホール(東京都北区)
根本 崇宏、藤村 務、妊娠中の摂取カロリー制限母ラットからの出生仔でみられたグルココルチコイドフィード、BMB2015、2015年12月01日~12月04日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
斉藤 哲也、藤村 務、オートファジーの抑制は代謝および転写リプログラミングを引き起こす、BMB2015、2015年12月01日~12月04日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
藤村 務、ヒスタミンH4受容体を標的とした新規末梢性掻痒治療薬の機能解析、BMB2015、2015年12月01日~12月04日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
藤村 務、造血器腫瘍細胞におけるGlnの関与、第五回新アミノ酸分析研究会、2015年12月7日、東京大学(東京都文京区)
Fujimura T. Search of cancer markers in exhaled breath. Metabolomics 2014 Japan, 2014.6.23~6.26. Keio Univ. Ymagata-ken Tsuruoka-shi
藤村 務、新規末梢性掻痒治療薬の機能解析、第87回日本生化学会大会、2014年10月15日~10月18日、京都国際会議場(京都府京都市)
数野 彩子、藤村 務、蛍光ビーズ-レクチンマルチプレックス糖鎖検出法による前立腺がん診断、第87回日本生化学会大会、2014年10月15日~10月18日、京都国際会議場(京都府京都市)

〔図書〕(計 1 件)

藤村 務、村山季美枝、三恵社、寄生虫学研究:材料と方法 2014年度版、2015、179

〔その他〕

ホームページ等

http://www.tohoku-mpu.ac.jp/pharmacy/about/lp_a04/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 務 (FUJIMURA, Tsutomu)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 70245778