

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462538

研究課題名(和文)糖ペプチドをターゲットとしたCA125の弱点を補う卵巣癌新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of a novel glycoprotein serum biomarker for epithelial ovarian cancer with more superior diagnostic capability than CA125

研究代表者

三上 幹男(MIKAMI, Mikio)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：30190606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌は早期発見が困難な予後不良の疾患であり、分子標的薬などの開発応用が進んでいるものの予後改善はいまだ不十分である。卵巣癌診断に汎用されるCA125にいくつかの弱点があるがその発見以来、技術革新にもかかわらず早期診断に有効な新たな血清マーカーの発見はない。我々は、従来の単一分子への抗原抗体反応を基本としたアッセイ系での腫瘍マーカーの測定という概念を打ち破り、患者と健常人血清を用いた血清網羅的糖ペプチドプロファイル解析により、未だその感度・特異度の優るマーカーが発見されていないCA125よりも有意に早期卵巣癌(特に本邦で頻度の高いCCC)を診断する糖ペプチドマーカーを発見同定した。

研究成果の概要(英文)：No useful biomarker is currently available for early detection of epithelial ovarian cancer (EOC). More than 100,000 glycopeptides of serum glycoproteins obtained from all stage EOC patients and non-cancer control women (including endometriomas: EM) were explored for a mass spectrum approach. A2160, a fully-sialylated alpha-chain of complement 4-binding protein, (C4BP) was identified. A2160 was significantly elevated in all stages of Clear cell carcinoma (CCC) patients compared to with EMs. Diagnostic accuracy of A2160 to distinguish early stage CCC from EMs is significantly higher than that of CA-125. In addition, fully-sialylated glycans had a higher accuracy for diagnosing EOC as compared to partially-sialylated glycans of C4BP. Our study suggested that A2160 may be a useful biomarker to distinguish early-stage CCC from EM. This new biomarker can be potentially applied for the monitoring of EM patients, which could make the early diagnosis of CCC possible.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣癌 腫瘍マーカー 糖蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は早期発見が困難な予後不良の疾患であり、分子標的薬などの開発応用が進んでいるものの予後改善はいまだ不十分である。本邦での卵巣癌の問題点は、内膜症性嚢胞を発生母地とする明細胞腺癌が欧米に比較して多く若年化傾向にあり、さらに本邦の卵巣癌患者の全年齢を通じての死亡率は欧米に比べて低いが、29-50歳代の死亡率は欧米より高いことである。したがって、本邦における卵巣癌早期発見・治療のためには欧米と違った本邦独自のシナリオを考える必要がある。

卵巣癌血清マーカーCA125発見以来すでに30年が経過するがCA125を凌駕する新たな腫瘍マーカーの発見はない。血清腫瘍マーカーの開発は、現在臨床に用いられているそのほとんどは癌特異的モノクローナル抗体により検出された抗原であり以前は癌抗原と呼ばれていた。その後分子生物学的手法による遺伝子変異の解析、また質量分析器を用いた癌化に伴う蛋白質変化を対象にしたプロテオミクス解析、そして最近では血液中のmicroRNA、Exosome、Circulating Tumor DNAなどが注目されている。しかしながらいまだに検診に用いることができる血清腫瘍マーカーは発見されていない。CA125やCEAを含む血清糖タンパクマーカーについては以前に大規模なCombination Assayによる検討も行われてきたが、やはり検診に有効なシステムは見出されていない。卵巣癌の早期診断、検診を可能にする新規腫瘍マーカーの開発は急務とされている。

## 2. 研究の目的

申請者らは血清中の糖蛋白を蛋白分解酵素にて糖ペプチドに分解後LC/MS（液体クロマトグラフィー/質量分析）を用いて網羅的に分析し（血清網羅的糖ペプチドプロファイル解析）、いくつかの候補の中から内膜症性嚢胞(EM)患者で偽陽性を示さない卵巣癌に

特異的な糖ペプチドの統計学的な検索・同定を目的とした。本研究では同定マーカー糖ペプチドの構造解析を行うとともに、臨床応用を目指した測定キットの開発、さらなる特異度感度を増加させるためのCombination Assayの検討及び腫瘍マーカー糖ペプチドを同定した網羅的血清糖ペプチドプロファイル解析を用いた新たな卵巣癌診断システムの開発を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)EOC患者群134名(明細胞腺癌CCC:45名、漿液性腺癌:30名、類内膜腺癌:22名、粘液性腺癌:12名、分類不能:25名)と対照群159名(健常者:63名(月経中19名を含む)、内膜症性嚢胞EM:36名、卵巣嚢腫:23名、子宮筋腫:21名、子宮癌:16名)の計293名(2010-2014年)を対象として、初回治療開始前に血液を採取、血清蛋白を糖ペプチドに分解後濃縮し、LC/MSを用いて検討した。得られた各糖ペプチドピークデータは数値化され、独自のコンピューターシステムにより網羅的に解析(血清網羅的糖ペプチドプロファイル解析)、10万をこえる糖ペプチドの中から新規卵巣癌バイオマーカー候補を抽出した。マーカーの抽出には、t検定、Mean Fold Change (MFC)分析、ROC分析を用いた。抽出されたマーカーの有用性についてはPPV、NPV、尤度比を用いて検討した。

(2)同定された糖ペプチド(新規バイオマーカー)の構造を、LC-AMS/MS(ペプチド鎖同定)、LC-AMS(糖鎖・糖鎖結合部位同定)、LC(糖鎖構造決定)を用いて同定した。

(3)新規マーカーの局在確認のために、EOC内容液と良性卵巣腫瘍内容液中の濃度をLC/MSで測定した。

(4)予後が明らかであるEOC患者群93例を用いて、新規マーカーが独立予後因子となるか、臨床病理学的因子(年齢、進行期、組織型、分化度、手術完遂度)を含めてCox比例ハザード回帰分析を行った。

(5)新規マーカーの糖ペプチド部分とフル糖蛋白質(ALL)(EIA測定)を用いたCombination Assayの検討を行った。

(6)EM17名、およびCCC(I-II期)18名の血液の血清網羅的糖ペプチド解析(上記①))を行い、それぞれ有意( $p<0.001$ )にEMにて増加するピークとCCCにて増加するピークを用いたCombination Assayにより、CA125を凌駕するCCC(I-II期)とEMの判別システムの構築を試みた。

#### 4. 研究成果

(1)新規卵巣癌バイオマーカー候補として、Fully-Sialylated alpha-chain of Complement 4-Binding Protein (A2160)が抽出された。A2160はCA125の弱点であるEMにて、CA125に比べ明らかに低値を示した(対照群にCA125が偽陽性を示す群を含めたことからCA125の弱点をカバーしたマーカーが同定された)。

(2)構造解析の結果、A2160糖ペプチドはComplement 4-Binding Protein (C4BP)の $\alpha$ 鎖に一致、アミノ酸配列506から528の位置に存在し、この糖鎖の末端はシアル酸でフルカバーされかつフコースをもつ糖ペプチドであった。糖鎖末端をカバーするシアル酸数により感度と特異度に相違があり、末端がすべてシアル化されたものは、部分的にシアル化されたものに比較して高いAUCを示した。測定系の簡易化を目指してC4BPの部分シアル化とフルシアル化の比を測定マーカーとしても、A2160と同じ特性を示した。

(3)EMとI-II期CCCにおけるA2160値とCA125値をt検定でみると、A2160( $P=0.001$ ):CA125( $P=0.02$ )とA2160はより低い有意水準を示した。ROC解析によるA2160のcut off値は1.6U/mLで、この値を用いてI・II期CCCとEMを比較した。AUC:0.92、感度:87%、特異度:94%、陽性的中率:95%、陰性的中率:85%、正診率:90%、陽性尤度比:14.5であった。CA125のcut off値を35U/mLとし

て同様の比較をした場合、AUC:0.67、感度:71%、特異度:50%、陽性的中率:64%、陰性的中率:58%、正診率:62%、陽性尤度比:1.42であった。A2160はCA125に比較して、I・II期CCC患者とEM患者との鑑別に関してははるかに有用であった。

(4)EOCの診断精度を向上させるために、A2160とCA125のCombined Assayを行った。A2160とCA125の関係は相補的であり、A2160とCA125のcombined indexは、A2160あるいはCA125単独に比較して高いAUCを示した。そのカットオフ値を0.70U/mlとした場合の感度は81%、特異度は95%であった(EOC134名x対照群159名)。

(5)EOC内容液中のA2160は、良性卵巣腫瘍内容液中に比べてはるかに高値を示した。

(6)予後が明らかであるEOC患者群93例を用いてA2160値(中央値3.1)を3未満と3以上で患者を分類して予後について多変量解析の結果を行ったところ、A2160:3以上例ではOverall SurvivalについてHR4.598(95%CI1.453-14.548)で独立予後因子であった。分化度( $P=0.048$ )、手術完遂度( $P=0.002$ )もまた独立予後因子であった。

(7)血清ALL-C4BP値(EIA測定)はCCC I-II期と比較してEMで低値を示し( $p<0.01$ )、血清A2160(LS/MS測定)はCCC I-II期の群で高値を示した( $p=0.001$ )。CCC I-II期とEMの鑑別能をCA125、A2160、Combination of A2160 and ALL-C4BP(COMB)のPPVとNPVで比較すると、PPVは64、95、95%、NPVは58、85、92%であり、COMBはNPVを大きく改善した。

(8)検出された糖ペプチドピーク2,333を対象にEMとCCC(I-II期)を比較した結果、顕著( $p<0.001$ )な変動が認められた成分は29あり、そのうち増加したものが16、減少したものが13であった。最も顕著な増加あるいは減少を認めた糖ペプチド(U2088とU01835)を用いたCombination Assayでは、感度:83%、

特異度：76%、PPV：79%、NPV：81%となり、同時に測定したCA-125（感度：67%、特異度：47%、PPV：60%、NPV：54%）に対し大幅な改善を認めた。

#### (9) 今後の展開

分解した糖ペプチドを対象にLC/MSを行う血清網羅的糖ペプチドプロファイル解析は、従来の血清蛋白を直接用いた質量分析、つまり一般的なプロテオミクス手法では検出できない微細な変化を網羅的に検出可能であること、転移酵素産物である糖蛋白糖鎖と遺伝子産物である蛋白のいずれに変化があっても、その変化を検出しマーカーを探索できる点に特徴がある。本方法では、性格の異なる患者集団の血清を保有していれば、その集団を分別できる糖ペプチドマーカーの同定に応用が可能である。CA125やCA19-9などの抗原抗体反応を利用して同定された方法とは全く異なる新たな手法であり、我々はこの新規の方法を用いてA2160を同定した。今回の研究で同定したA2160の特徴は、糖鎖の末端がシアル酸でフルカバーされていることであり、さらにC4BPは補体経路における免疫抑制効果で自然免疫応答を回避する作用をもつ。末端がシアル酸でフルカバーされている血清糖蛋白は肝臓での分解を受けにくいことから、A2160は血中にとどまりやすく腫瘍マーカーとしての意義が深い。今回報告した血清A2160値が独立予後因子であったことと、C4BPの免疫学的機能を考慮すると、がん治療における免疫関連物質として治療標的となる可能性も示唆される。今後このA2160に着目した研究の発展が期待される。

さらにこの血清網羅的糖ペプチド解析では、研究成果⑧に示すように複数の糖ペプチドの組み合わせでの診断（Combination Assay）が質量分析による1回の測定で可能である。今後の取り組みとしては、人工知能に血清網羅的糖ペプチドプロファイル解析で得た膨大な糖ペプチドデータおよび術前

後患者の臨床病理学的因子あるいは健常人の臨床データを投入し、アウトプットを卵巣癌の有無、卵巣癌症例では臨床病理学的因子、抗がん剤副作用の予見などとして人工知能に深層学習を行わせることで、より正確な診断、より適格な治療オプションを患者に提示できるような個別化医療診断システムの開発が期待され、近未来医療は大きな変革の時代を迎えると推測される。

我々はA2160が真のEOCバイオマーカーであり、早期CCC診断に有用であることの検定作業、および血清網羅的糖ペプチド解析と人工知能を用いた個別化医療診断システムの開発に向けて、現在国内外の施設から協力を得て臨床試験の準備中である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計22件）

1. Matsuo K, Shimada M, Mikami M (他6名8番目) Comparison of adjuvant therapy for node-positive clinical stage IB-IIB cervical cancer: Systemic chemotherapy versus pelvic irradiation. International Journal of Cancer. 2017. doi. 10.1002/ijc.30793. 査読有
2. Mikami M, Nagase S, Gynecologic Oncology Committee of Japan Society of Obstetrics and Gynecology (JSOG) (他4名1番目) Opportunistic bilateral salpingectomy during benign gynecological surgery for ovarian cancer prevention: a survey of Gynecologic Oncology Committee of Japan Society of Obstetrics and Gynecology. Journal of Gynecologic Oncology. 2017. doi.org/10.3802/jgo.2017.28.e52. 査読有
3. Matsuo K, Shimada M, Mikami M. Ovarian conservation for young women with clinical stage IB-IIB cervical cancer in Japan. Journal of Gynecologic Oncology. 2017. doi.org/10.3802/jgo.2017.28.e60. 査読有
4. T Tajima, M Miyazawa, M Hayashi, M Ikeda, M Shida, T Hirasawa, M Mikami (他3名10番目) Enhanced expression of hydroxylated ceramide in

- well-differentiated endometrial adenocarcinoma. *Oncology Letters*. 13:45-50. 2017. 査読有
5. K Tanaka, M Mikami, M Iwamori (他 4 名 4 番目) Effective Selection of a Well-Differentiated Type of Human Uterine Endometrial Carcinoma Cells by Transfection of the Sulfotransferase Gene and Possible Association of Sulfoglycolipids with Well-Differentiated Phenotypes. *International Journal of Gynecological Cancer*. 27(2):267-73. 2017. 査読有
  6. Komiyama S, Katabuchi H, Mikami M (他 9 名 3 番目) Japan society of gynecologic oncology guidelines 2015 for the treatment of ovarian cancer including primary peritoneal cancer and fallopian tube cancer. *International Journal of Clinical Oncology*. 21:435-446. 2016. 査読有
  7. Ebina Y, Katabuchi H, Mikami M (他 8 名 3 番目) Japan society of gynecologic oncology guidelines 2013 for the treatment of uterine body neoplasms. *International Journal of Clinical Oncology*. 21:419-434. 2016. 査読有
  8. Matsuo K, Takazawa Y, Mikami M (他 69 名 60 番目) Significance of histologic pattern of carcinoma and sarcoma components on survival outcomes of uterine carcinosarcoma. *Annals of Oncology*. 27(7):1257-1266. 2016. 査読有
  9. Ikeda Y, Furusawa A, Mikami M (他 9 名 10 番目) Practice patterns of adjuvant therapy for intermediate/high recurrence risk cervical cancer patients in japan. *Journal of Gynecologic Oncology*. May;27(3):e29. doi:10.3802/jgo.2016.27.e29. 2016. 査読有
  10. Matsuo K, Sigita S. Mikami M (他 10 名 13 番目) Association of low-dose aspirin and survival of women with endometrial cancer. *Obstetrics & Gynecology*. 128(1): 127-37. 2016. 査読有
  11. Tanaka K, Miyazawa M, Mikami M (他 3 名 3 番目) Enhanced expression of unique gangliosides with GM2-determinant in human uterine cervical carcinoma-derived cell lines. *Glycoconjugate Journal*. doi: 10.1007/s10719-016-9668-0016. 2016. 査読有
  12. Sugiyama T, Okamoto A, Mikami M (他 21 名 8 番目) Randomized phase III trial of irinotecan plus cisplatin compared with paclitaxel plus carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian clear cell carcinoma: JGOG3017/GCIG Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 34(24):2881-2887. 2016. 査読有
  13. Matsui N, Kajiwara H, Mikami M (他 7 名 7 番目) Use of epithelial-specific antigen for cytological diagnosis of glandular lesions in the uterine cervix. *Pathology International*. 66(5):305-8. 2016. 査読有
  14. M Shida, M Miyazawa, T Hirasawa, M Ikeda, M Mikami (他 5 名 10 番目) Possible role of thymidine phosphorylase in gynecological tumors as an individualized treatment strategy. *Oncology Letters*. 12(5):3215-3223. 2016. 査読有
  15. M Mikami, M Miyazawa, M Hayashi, M Ikeda, M Shida, T Hirasawa (他 4 名 1 番目) Fully-sialylated alpha-chain of complement 4-binding protein: Diagnostic utility for ovarian clear cell carcinoma. *Gynecologic Oncology* 2015 ;139:520-8. 査読有
  16. Ebina Y, Yaegashi N, Mikami M, Aoki Y, Yoshikawa H (他 5 名 8 番目) Japan Society of Gynecologic Oncology guidelines 2011 for the treatment of uterine cervical cancer. *International Journal of Clinical Oncology*. 20:240-248. 2015. 査読有
  17. Tanaka K, Mikami M, Iwamori M (他 3 名 2 番目) Expression of sulfatide and sulfated lactosylceramide among histological types of human ovarian carcinomas. *Hum Cell*. 28(1):37-43. 2015. 査読有
  18. M Mikami, Y Aoki, M Sakamoto (他 7 名 1 番目) Surgical principles for managing stage IB2, IIA2, and IIB uterine cervical cancer (Bulky Tumors) in japan a survey of the Japanese Gynecologic Oncology Group. *International Journal of Gynecological Cancer*. 24(7):1333-1340. 2014. 査読有
  19. Y Goto, Y Kametani, M Miyazawa, M Mikami (他 6 名 10 番目) Defect of tropomyosin-related kinase B isotype expression in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Bio Science Trends*. 8(2):93-100. 2014. 査読有
  20. Ikeda M, Hayashi M, Shida M, Hirasawa T, Mikami M (他 4 名 9 番目) Predicting perioperative venous thromboembolism in Japanese gynecological patients. *PLoS One*. 9(2): e89206. 2014. 査読有
  21. Sogabe M, Nozaki H, Mikami M (他 12 名 11 番目) A novel glyco-biomarker for ovarian cancer that detects clear cell

carcinoma. Journal of Proteome Research. 13(3):1624-1635. 2014. 査読有

22. Mikami M. Role of lymphadenectomy for ovarian cancer. Journal Of Gynecologic Oncology 25(4):279-81. 2014. 査読有

〔学会発表〕 (計 7 件)

1. Mikami M. Implementation and quality assurance of training institutions for gynecologic oncologists in Japan. SG02017 Annual Meeting on Women's Cancer. 2017/3/11. アメリカ
2. K Matsuo, M Shimada, Y Aoki M Sakamoto, M Mikami, H Fujiwara, N Takeshima, T Sugiyama. Comparison of adjuvant therapy for node-positive, high-risk, early-stage cervical cancer: Systemic chemotherapy vs. pelvic irradiation. SG02017 Annual Meeting on Women's Cancer. 2017/3/11. アメリカ
3. Ikeda M, Mikami M et al. A2160 (fully-sialylated alpha-chain of complement 4-binding protein) is a novel biomarker that can detect early stage epithelial ovarian cancer, especially clear cell carcinoma. 16th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS2016). 2016/10/29. ポルトガル
4. Mikami M, Ikeda M et al. Fully sialylated alpha-chain of complement 4-binding protein: Diagnostic utility for ovarian clear cell carcinoma. SG047th Annual Meeting on Women's Cancer. 2016/3/20. アメリカ
5. Mikami M. Surgery or CCRT for stage II B cervical Cancer - Role of Radical Surgery -19th INTERNATIONAL MEETING OF THE EUROPEAN SOCIETY OF GYNAECOLOGICAL ONCOLOGY (ESGO). 2015/10/24. フランス
6. Mikami M. Surgical principles and status for managing stage IB2, II A2, and II B uterine cervical cancer (bulky tumors) in Japan. The 20th Korean Gynecologic Oncology Group Symposium. 2014/10/25. 韓国
7. Mikami M. Role of lymphadenectomy for Ovarian Cancer. The 20th Korean Gynecologic Oncology Group Symposium. 2014/10/24. 韓国

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：卵巣癌マーカー及び卵巣癌検出方法

発明者：三上幹男、田辺和弘、宮崎祐子、小島望

権利者：学校法人東海大学、三菱化学株式会社

種類：通常

番号：特願 2013-271047

出願年月日：2013年12月27日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上 幹男 (MIKAMI, Mikio)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：30190606

(2) 研究分担者

岩森 正男 (IWAMORI, Masao)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号：90110022

池田 仁恵 (IKEDA, Masae)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：20365993