

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2011～2011

課題番号：23659657

研究課題名（和文） N型糖鎖を用いた臓器特異的癌腫瘍マーカーの開発

研究課題名（英文） Search of organ specific tumor markers by N-glycan expression

研究代表者 夏越祥次（NATSUGOE SHOJI）

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：70237577

研究成果の概要（和文）：

食道癌患者 37 例と健常者 11 例対象とし、血清中の糖鎖の網羅的解析を行い、食道癌に特異的な糖鎖マーカーを検索した。得られた糖鎖の発現パターンをもとに、健常者群と食道癌患者群との間で OPLS 法による層別化が可能であった。健常者群と食道癌患者群間で、両者の層別化が可能な発現糖鎖が 6 つ抽出可能であった。その 6 糖鎖から食道癌患者を 69.7% の正診率で判別することが可能であった。これらの糖鎖は食道癌に特異的マーカーとして利用できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the serum N-glycan in 37 esophageal cancer patients and 11 healthy volunteers. N-glycan expression by using OPLS method was stratified between esophageal cancer patients and healthy volunteers on the base of glycan expression pattern, We extracted six N-glycan with statistical significance between esophageal cancer patients and healthy volunteers. According to these six markers, the accuracy rate was 69.7% to detect the esophageal cancer. These results show that six N-glycan may be a useful markers in detection of esophageal cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道癌、胃癌、大腸癌、膵臓癌、N結合型糖鎖

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに消化器癌のリンパ節微小転移の臨床的意義について検討してきた。(Cancer 83:858, 1998, Oncology 58:38, 2000; Ann Surg Oncol. 8:158, 2001; Surgery; 131:630, 2002, Am Surg 69:573, 2003, Br J Surg 90:563, 2003, World J Surg 27:455, 2003). さらに原発巣の悪性度の解析とリンパ節転移との関連に関して報告してきた(Clin Cancer Res. 10:8413, 2004, Clin Cancer Res. 11:1174, 2005, Clin Cancer Res. 12:3740, 2006, Br J Cancer. 95(5):634, 2006, Clin Cancer Res. 12:5972, 2006, Br J Surg. 94:984, 2007 など). これらの検討結果から、微小転移を来たしやすい癌の特性の一部について明らかにしてきた。胃癌、食道癌、膵臓癌で術中血中遊離癌細胞が高頻度に存在し、再発と密接な関係があることを報告してきた(Am J Surg 177:475, 1999, Ann Surg 233:189, 2001, Ann Surg Oncol 9:364, 2002, Surgery 133:162, 2003, Clin Cancer Res 10:3807, 2004 など). また外来 follow-up 中に血中に遊離癌細胞が出現する症例は予後が不良であることを見出し報告した(Clin Cancer Res 12:5972, 2006). これらは有用なマーカーであるが、腫瘍上皮を認識しており、各臓器の癌に特有ではない。したがって今後は各臓器に特有な腫瘍マーカーの開発が急務と考え、血液サンプルに含まれる糖タンパク質の糖鎖との関連の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、これまで申請者らが明らかにしてきた「消化器癌の再発や予後不良症例には、血中遊離癌細胞が関係する」という知見と、「糖鎖はがん化に伴い糖鎖構造が変化し、血漿中の糖鎖を腫瘍マーカーとして臨床応用できる」という知見から、「血中遊離癌細胞の存在と血漿中の臓器特異度が高い糖鎖マーカーの測定により、相互の関連を明らかにすることで、早期癌の発見、再発の早期予測が可能となる」という仮説をたて、これまでの申請者らの実績と手技を応用して、高い精度で本仮説を検証するものである。

現在、消化器癌において測定されている腫瘍マーカーのほとんどは糖鎖関連分子である。しかし、消化器の臓器特異的な腫瘍マーカーは存在せず、癌の存在以外の要因で上昇することがあり、また進行した悪性腫瘍の動態を把握するために使用されていることが多く、腫瘍マーカーを利用した癌の検出・診断方法として、早期診断に使用できるものは確立されていない。また、単体でのマーカーを測定しても陽性率は低い、複数のマーカーで測定を行う方が、その確診率は高くなることは多く報告されているものの、どの組み合わせがよいかについてのコンセンサスは、

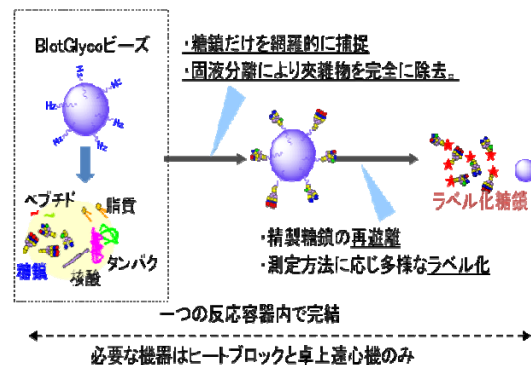
まだ得られていない。特に本研究では「N 結合型糖鎖を利用した消化器癌の新規腫瘍マーカーの開発」を中心に臨床応用可能にすることを目的とする。これが明らかとなれば、予防医学の境界領域の新たな分野が開拓され、消化器癌の早期発見と早期治療が期待できる。

3. 研究の方法

2003 年にヒトゲノムの解読が完了し、ヒトの遺伝子に関する DNA チップなど関連技術が発展した。2002 年～2007 年にはポストゲノム研究の時代に入り、遺伝子機能解析、たんぱく質の構造解析・機能解析が行われてきた。現在は次世代ポストゲノム研究の時代に入り、糖鎖、糖蛋白、糖脂質の構造・機能解析が行われている。申請者らはヒドラジド基(NHNH₂) 高密度含有ポリマー微粒子である BlotGlyco を用いて、糖鎖を効率よく捕捉回収する方法を行った(図 1)。

図 1

◇BlotGlycoによる糖鎖精製スキーム



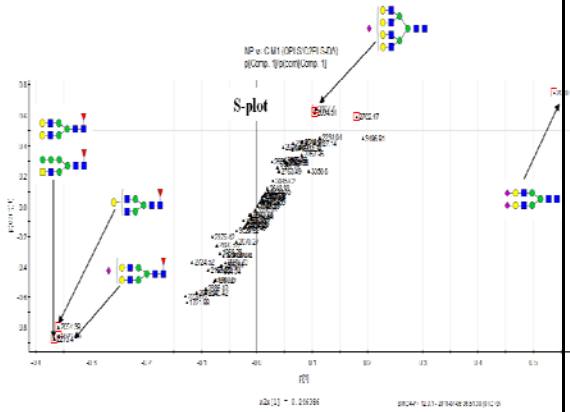
癌患者と健常者との 2 群間で解析し、有意に存在量が変化している N 型糖鎖を同定することが可能である。

今回、食道癌患者を対象とし、血清中の糖鎖の網羅的解析を行い、食道癌に特異的な糖鎖マーカーを検索した。得られた糖鎖発現プロファイル解析で、診断の可能性を検討した。2007 年から 2009 年までの同意の得られた食道癌患者 37 例と健常者の 11 例。検体の血漿から、タンパク質と修飾 N 型糖鎖を遊離、ヒドラジド基を有するビーズで遊離 N 型糖鎖を標識した後に精製分離、質量分析を行った。得られたデータを SIMCA-P+を使用し多変量解析した。

4. 研究成果

食道癌における血清中の糖鎖の網羅的解析を行い、6糖鎖をそれぞれ抽出できた(図2).

図2 (食道癌患者 vs 健常者)



得られた糖鎖の発現パターンをもとに、健常者群と食道癌患者群との間で OPLS 法による層別化が有意に可能であった。また、健常者群と食道癌患者群間で、両者の層別化が可能な発現糖鎖が6つ抽出可能であった。この6糖鎖を利用し、健常者と食道癌患者の半数症例との間で判別モデルを構築し、残り半分の食道癌患者で判別可能かを検証した(図3)。

C1~C11, NG1~NG12はモデル構築に使用された。NG13~NG23はモデルの検証に使用された。図3に示す緑色の症例(C1~C6, C8, C10, 11, NG1~NG6, NG9~12, NG15~NG18, NG20)では、食道癌の予測が可能であった。一方、赤色で示す症例(C7, C9, NG7~8, NG13~14, NG19, NG21~23)は食道癌の予測が不可能な症例であった。

Sensitivityは45.5%, Specificityは81.8%で6マーカーすべてを用いたAccuracy rateは69.7%であった。

予測が外れた症例の特徴を解析すると、深達度が粘膜下層までの食道表在癌であり、Stage I, IIの症例であった。

図3 食道癌例の判別モデル

ID	C	NE
C-1	1.04792	-0.0479221
C-2	0.891363	0.108637
C-3	1.1708	-0.170798
C-4	0.831936	0.168064
C-5	0.933749	0.0662509
C-6	0.854898	0.145102
C-7	0.581725	0.418275
C-8	1.04697	-0.0469689
C-9	0.731799	0.268201
C-10	0.78594	0.21406
C-11	0.661107	0.338893
NE-1	0.136873	0.863127
NE-2	0.0324084	0.967592
NE-3	0.0725845	0.927415
NE-4	-0.322246	1.32225
NE-5	0.0428761	0.957124
NE-6	0.226762	0.773238
NE-8	-0.0641614	1.06416
NE-9	0.0939843	0.906016
NE-10	0.297709	0.702291
NE-11	0.0623523	0.937648
NE-12	0.268911	0.731089
NE-13	0.684778	0.315222
NE-14	-0.030421	1.03042
NE-16	0.204086	0.795914
NE-17	0.0882622	0.911738
NE-18	-0.104786	1.10479
NE-19	-0.253436	1.25344
NE-20	0.0252563	0.974744
NE-21	0.22881	0.77119
NE-22	0.2808	0.7192
NE-23	0.472495	0.527505
NE-24	0.00814556	0.991854
NE-25	0.269095	0.730905
NE-26	0.140017	0.859983
NE-27	-0.0672208	1.06722
NE-28	0.0630495	0.936951
NE-29	0.788864	0.211136
NE-30	0.109752	0.890248
NE-31	0.337032	0.662968
NE-33	0.647114	0.352886
NE-34	0.392359	0.607641
NE-35	-0.00834113	1.00834
NE-36	0.075029	0.924971
NE-37	0.0733716	0.926628

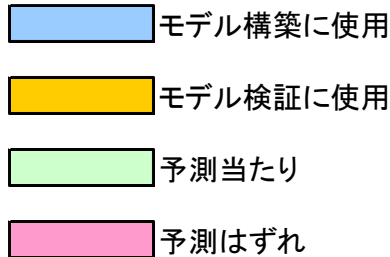


図4 マーカー候補の1例

P<0.0001

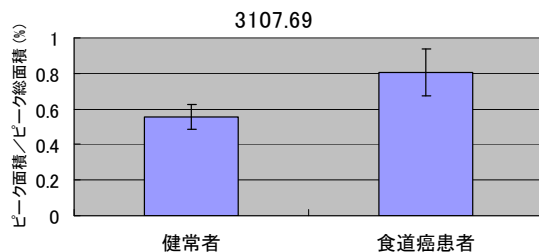


図4は食道癌のマーカー候補の一つを示す。明らかに健常者と比較して高値であった。

今回、食道癌患者における血清中の糖鎖の網羅的解析を行い、6糖鎖を抽出し、その6糖鎖から食道癌患者を判別することが可能であった。食道癌に特異的な糖鎖マーカーとして利用できると考えられた。

今後、さらに症例を集積・解析し、抽出したN型糖鎖から、臓器特異的な腫瘍マーカーとして利用できるかどうかの検討が必要である。現在、他の癌（膵臓癌、胃癌）でN型糖鎖の解析中である。

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)

[学会発表] (計4件)

- 1) 内門泰斗, 夏越祥次他：上部消化器癌患者の血清中N型糖鎖による新規腫瘍マーカーの可能性. 第66回日本消化器外科学会総会 2011年7月14日, 名古屋市
- 2) Natsugoe S, Uenosono Y, Arigami T, Setoyama T, Yanagita S, Uchikado Y, Matsumoto M, Okumura H, Sasaki K, Kita Y, Owaki T, Ishigami S. Clinical significance of isolated tumor cells in esophageal and gastric cancer. 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer Symposium 2011 September, 22, Osaka
- 3) Natsugoe S, Ishigami S, Uenosono Y, Arigami T, Hagiwara T, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Kita Y, Owaki T, Ueno S. Minimally invasive treatment for adenocarcinoma of esophago-gastric junction. International Surgical Week 2011. August 30, Yokohama
- 4) Natsugoe S, Uenosono Y, Arigami T, Yanagita S, Haraguchi N, Kita Y, Uchikado Y, Okumura H, Matsumoto M, Ishigami S. Current Status and Future Perspective of Sentinel Node Navigation Surgery for

Gastrointestinal Cancer. The International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists 2011. November 11, Tokyo

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称：消化器癌診断用マーカー、および消化器癌の検査方法

発明者：夏越祥次

権利者：鹿児島大学

種類：特願

番号：2011-222353

出願年月日：平成23年10月6日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

夏越 祥次 (NATSUGOE SHOJI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：70237577

(2) 研究分担者

上野真一 (UENO SHINICHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：40322317

迫田雅彦 (SAKODA MASAHIKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：40418851

上之園芳一 (UENOSONO YOSHIKAZU)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・特任准教授
研究者番号：60398279

内門泰斗 (UCHIKADO YASUTO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：30464465

喜多芳昭 (KITA YOSHIAKI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：30570692

橋口照人 (HASHIGUCHI TERUHIITO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：70250917