

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分
平成28年3月14日現在

網羅的糖鎖解析による新規癌マーカーの探索と診断技術の開発

Exploration of Novel Markers on Cancer and Development
of a Technology for the Diagnosis Utilized by
Comprehensive Glycomics

課題番号：25220206

西村 紳一郎 (NISHIMURA SHINICHIRO)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授



研究の概要

血中バイオマーカーは疾患の早期発見や進行度、治療効果等を簡単・迅速に判定する際に極めて重要な分子である。本研究では肝細胞癌、膵臓癌、大腸癌等の消化器癌と腎細胞癌や前立腺癌等の泌尿器癌に焦点を絞り、高感度で疾患・病態特異的なバイオマーカーを大規模網羅的糖鎖解析による全く新しいアプローチによって探索する。2011年に本研究チームが世界に先駆けて実現した全自動血清糖鎖解析システムを駆使して信頼性の高い血中糖鎖発現プロファイルデータベースの構築を目指す。蓄積された疾患ごとの糖鎖発現プロファイルデータから疾患特異度や進行度などを含めた縦断的・横断的臨床統計調査を行い、各疾患に特異的で臨床的に有望な糖鎖マーカーを抽出してその診断性等の臨床的意義の検証を進めて実用化に向けた治験研究に進展させる。

研究分野：複合領域

キーワード：診断薬探索

1. 研究開始当初の背景

血液中の糖タンパク質や糖脂質に結合した糖鎖は新たなバイオマーカーとして疾患の早期発見、薬剤の治療効果や副作用を予想する新しい診断法が実現する可能性が高いため大いに期待されてきた。しかし、患者検体を縦断的・横断的に用いた大規模糖鎖解析が依然として手つかずの状態であったため、臨床的に価値のある糖鎖構造データベースは未完成のままである。米国 National Research Council の報告 (Background Paper on Glycosciences and Glycomics in the United States, Ericka D. Martin McGowan and Katherine Bowman, National Research Council, December 2010) にあるとおり、本分野の最も深刻な問題点は専門外の研究者が導入できる糖鎖のエンリッチ技術や解析法が未だ存在しないことであった。2002年に西村が発明したグライコプロッティング法はこの難題を世界で初めて解決した。グライコプロッティング法はケトン・アルデヒド体とヒドラジド・アミノオキシ基の特異的化学反应を微粒などの固体表面で行うことで血清や細胞破碎液などの複雑な生体由来混合物からの

簡便かつ迅速な糖鎖精製を実現した革新的方法論である。「全自動糖鎖解析装置（全自動血清糖鎖プロファイル解析装置）」は研究代表者が実用化に成功した世界初の方法論であり、遺伝子研究を爆発的に進展させた PCR 法に匹敵する新技術に発展する可能性があるという評価も得られている。既に製薬企業や大学等の研究者を中心に本技術のユーザーが急増しており、抗体医薬やタンパク質製剤等のバイオ医薬品の品質管理やバイオマーカーの探索研究で広く活用されつつある。

2. 研究の目的

本研究課題では患者血清糖タンパク質糖鎖の発現プロファイルを用いた疾患早期発見・診断技術の実用化に必須の疾患糖鎖構造データベースの構築を第一の目標とする。さらに、蓄積された糖鎖発現プロファイルデータから疾患特異度や進行度などを含めた縦断的・横断的臨床統計調査を行い、各疾患に特異的で臨床的に有望な糖鎖マーカーを抽出してその診断性等の臨床的意義の検証を進めて実用化に向けた展開研究に進展させることを第2の目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題の最終目標を達成するためには医師を含む臨床研究チームとの強力な連携により厳密に管理された患者検体を用いた大規模網羅的糖鎖解析、さらに臨床情報に基づく新規バイオマーカーの探索を進めることが必要不可欠である。まず、消化器癌と泌尿器癌に焦点を絞りバイオマーカーとして有望な糖鎖構造情報を獲得するために全自動糖鎖解析装置（全自動血清糖鎖プロファイル解析装置）による大規模糖鎖解析からの疾患糖鎖データベース構築を円滑に実施できる強力な研究体制を組織化した。具体的には神山（北大医）と能祖（岡山大医）が担当する膵臓癌、膵炎、肝細胞癌、肝炎、および大腸癌等の消化器領域、大山（弘前大医）が担当する腎細胞癌、腎炎、前立腺癌等の泌尿器領域に焦点を絞り、健常者の糖鎖プロファイルとの比較に基づいて有意な変動の認められた疾患糖鎖情報を収集する。蓄積された疾患ごとの糖鎖発現プロファイルデータから疾患特異度や進行度などを含めた縦断的・横断的臨床統計調査を行い、各疾患に特異的で臨床的に有望な糖鎖マーカーを抽出する。これらの上質な患者検体を用いた網羅的糖鎖解析によりヒトの血清糖タンパク質の全糖鎖構造プロファイルを収録した世界初の疾患関連ヒト血清糖鎖データベースの構築を実現して新たな診断技術の開発に展開する。

4. これまでの成果

患者検体の大規模糖鎖解析・質量分析データの自動アノテーション法や PCA (principal component analysis)、BPA (biosynthetic pathway analysis) 等の大規模統計解析による健常者の糖鎖プロファイルとの比較に基づいて有意な変動の認められた疾患糖鎖情報の収集を進めた。蓄積された疾患ごとの糖鎖発現プロファイルデータから疾患特異度や進行度、薬剤に対する治療効果、予後などを含めた臨床統計調査を行い、各疾患に特異的で臨床的に有望な糖鎖マーカーを抽出することに成功した。得られた糖鎖マーカー候補の診断指標としての有効性を、各研究分担者が現在現場で使用している体外診断法と比較検討・評価した。本研究課題に直接関係する臨床グライコミクス研究成果についてはこれまでの3年間(2013~2015年度)で査読付き学術論文を20篇発表した(研究成果全体として36篇の学術論文を発表)。

北海道大学拠点では1999年から2011年までの間に北海道大学病院において根治的な肝切除を受けた肝細胞癌患者について、血清糖タンパク質糖鎖の大規模網羅的定量解析を行った。その結果、今回発見した肝細胞癌患者に特異的な糖鎖は門脈浸潤、肝静脈浸潤などの悪性度ならびに予後・再発予測に関連していることが単変量解析、多変量解析から判明し、これらは従来からの腫瘍マーカーであるAFP、PIVKA-IIを凌駕するバイオマーカー

ーとしての性能を示すことが証明された。

弘前大学拠点では腎細胞癌患者血清に特異的な2種類の糖鎖が生命予後の責任因子として検出された。Reverse Glycoblotting法によりこれら糖鎖はIgA1、IgG4の糖鎖変異であることが明らかとなった。一方、進行性前立腺癌においても、3本鎖、4本鎖の糖鎖発現が去勢抵抗性獲得過程におけるバイオマーカーとして有用であった。また、前立腺特異抗原(PSA)の糖鎖の癌性変異を利用した新規アッセイ法を開発し、従来のPSAによる前立腺癌診断能力を遥かに凌駕することが明らかとなった。

岡山大学拠点では膵臓癌・肝臓癌・膵管内乳頭状粘液産生性腫瘍・食道癌・大腸癌などの消化器癌患者血清中の糖鎖発現を網羅的に解析し、多くの癌患者血清で特異的に上昇している新たな糖鎖マーカーを発見した。また、分子標的薬であるソラフェニブ投与前の血清を、多数例で網羅的に解析し予後を反映する特異的糖鎖マーカーを明らかにした。癌の発生母地となる潰瘍性大腸炎患者や、癌との鑑別が問題となる自己免疫性膵炎では病勢や悪性化に伴う糖鎖変異があること、更に膵臓癌の治療薬であるゲムシタビン投与症例の予後が、糖鎖発現パターンの変化から推測できることを発見した。

5. 今後の計画

癌特異的糖鎖結合タンパク質および糖ペプチドエピトープが次々と同定されている。これらの疾患特異的エピトープに対する自己抗体の検出系の確立、およびこれらに対する新規抗体の作製とハイスループットな診断技術の開発を目指して臨床応用に向けた研究を推進している。本研究課題は癌マーカーの探索による診断技術開発に留まらず、様々な疾患と生体内の糖鎖構造変化の関係、特に免疫バランスや恒常性維持、疾患発症のメカニズムと翻訳後修飾の意義を追求する基礎研究領域への貢献も大きい。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. Miyahara K., *et al.* Prognostic Value of Altered N-Glycosylation of Circulating Glycoproteins in Patients With Unresectable Pancreatic Cancer Treated With Gemcitabine. *Pancreas* 2015, **44**, 551-556

2. Hatakeyama, S. *et al.* Serum N-glycan alteration associated with renal cell carcinoma detected by high-throughput glycan analysis. *J. Urology* 2014, **191**, 805-813. (平成26年度日本泌尿器科学会賞を受賞)

3. Miyahara K. *et al.* Serum glycan as a prognostic marker in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib. *Hepatology* 2014, **59**, 355-356.

ホームページ等 なし