

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09132

研究課題名(和文) 高リスク前立腺癌におけるフコシル化タンパクの解析及び革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of fucosylated protein of high risk prostate cancer and the development of novel therapy

研究代表者

藤田 和利 (Fujita, Kazutoshi)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：50636181

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)：フコシル化は癌および炎症における重要な糖鎖修飾の一つであり、Core型、Lewis型、H型の3種類存在する。マイクロキャピラリー電気泳動免疫蛍光測定装置を用いて血中のcore型フコシル化PSAを測定するため測定キットの開発を行った。Core型フコシル化PSAは前立腺生検陰性患者と比べ前立腺癌患者で有意に上昇していた。またGleason scoreとも関連を認め、Gleason score 7以上の前立腺癌ではGleason score 6及び生検陰性群と比べても有意に上昇していた。またS2,3PSAと同時測定することにより高リスク前立腺癌診断の精度が更に上がった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Core型フコシル化PSAが高リスク前立腺癌患者の血中で上昇しており、治療を行う必要のある前立腺癌患者を採血により診断できることが可能となった。また認可されたS2,3PSAと同時測定することによりその精度が更に上がることを明らかにした。測定方法は実臨床で使用されているユータスマイクロキャピラリー電気泳動免疫蛍光測定装置を用いており、実臨床で実施が可能で、短時間での測定が可能である。今後臨床性能試験を行い臨床応用を目指す。

研究成果の概要(英文)：Fucosylation is one of the important glycosylation modifications in cancer and inflammation, and there are three types of fucosylation: Core, Lewis, and H-type. We developed a kit to measure core-type fucosylated PSA in blood using a microcapillary electrophoresis immunofluorescence assay, and found that core-type fucosylated PSA was significantly elevated in prostate cancer patients compared to prostate biopsy-negative patients. Core-type fucosylated PSA was also significantly elevated in prostate cancer patients with a Gleason score of 7 or higher, compared with Gleason score 6 and biopsy negative patients. Simultaneous measurement of S2,3 PSA with core-type fucosylated PSA further improved the accuracy of diagnosis of high-risk prostate cancer.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 糖鎖 PSA

1. 研究開始当初の背景

新規治療法が開発されているにもかかわらず、年間1万人以上の日本人が前立腺癌により死亡する。このため新規の治療法及び高リスク前立腺癌の新規バイオマーカーの開発が必要である。フコシル化は癌および炎症における重要な糖鎖修飾の一つであり、Core型、Lewis型、H型の3種類存在する(図1)。これまでに我々は質量分析により前立腺癌では他の癌種と異なりCore型フコシル化が主たるフコシル化であり(Takahashi S,.. Fujita K, et al. Glycoconj J, 2016)(図2)、高Gleason scoreの前立腺癌ではフコシル化が亢進し、フコシル化分泌タンパクが上昇していることを明らかにしてきた(Fujita K, et al Prostate 2015)。糖鎖タンパクのCore型フコシル化によりタンパクの分泌、機能などが変化することが知られている。前立腺癌細胞株でもCore型フコシル化転移酵素(FUT8)を強制発現すると浸潤能が亢進するが、Core型フコシル化がどのようなタンパクの糖鎖に生じて癌の悪性を来すか不明である。

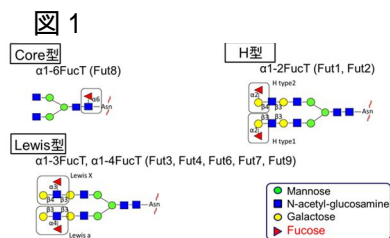


図1

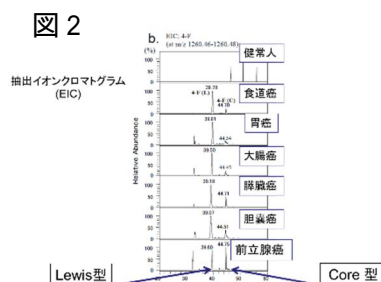


図2

2. 研究の目的

前立腺癌のCore型フコシル化による悪性のメカニズムを解明することにより、新規の治療法およびバイオマーカーの開発につなげる。

3. 研究の方法

(1) 糖鎖タンパクの機能解析、糖鎖抗体の作成

糖鎖タンパクを、前立腺癌細胞株、前立腺癌発症モデルマウス(PTEN ノックアウトマウス)FUT8 ノックアウトマウスを用いて分子生物学的、免疫組織学的に解析を行い、前立腺癌のメカニズムの解明を行う。また候補タンパクに対してはCore型フコシル化および糖鎖付着部位のアミノ酸配列を認識する糖鎖抗体の作成を行う。

(2) 糖鎖抗体を用いた治療法および新規治療バイオマーカーの開発

高リスク前立腺癌で上昇しているフコシル化糖タンパクを特異的に阻害できる糖鎖抗体を臨床応用するため、前立腺癌細胞株および前立腺癌マウスモデルに投与して効果を前立腺癌に対する効果を評価する。また微量なフコシル化タンパクを測定するために、候補タンパクに対する抗体と糖鎖抗体のSandwich ELISA法の開発を行う。糖鎖抗体が作成できない場合にはレクチンを用いたレクチン抗体ELISA法を開発する。開発したELISA法を用いて多症例の臨床検体(血液、尿)を用いて測定を行う。

4. 研究成果

高リスク前立腺(Gleason score 7以上)で高値をしめす血中フコシル化ハプトグロビンをこれまでレクチンのALLを用いてELISA法で測定していた。レクチンは結合力が低く、ELISAの測定条件が厳密である必要があるため、それにかわるフコシル化ハプトグロビンを認識するモノ

クローナル抗体を作成する手法を開発した(論文10)。この手法を用いて core 型フコシル化ハプトグロピンを認識するモノクローナル抗体 10-7G を作成し、この抗体の E p i t o p e や他疾患での評価をおこなった(論文8,9)。この抗体が認識する core 型フコシル化ハプトグロピンが産生される細胞を癌組織を用いて検討したところ癌微小環境に浸潤する免疫細胞が 10-7G を用いた免疫組織化学染色により染色され、免疫細胞が産生源であることが明らかになった。免疫細胞ではマクロファージにおける CD14 依存性 の Toll-like receptor 4 と Toll-like receptor 2 シグナル経路に core 型フコシル化が必要であることが明らかになった(論文11)。

前立腺癌患者の検討で、ホルモン感受性転移性前立腺癌および去勢抵抗性前立腺癌において Gleason score pattern 5 が予後不良因子であることを臨床データの解析により明らかになり(論文5,6)、高リスク前立腺癌の早期診断のマーカーの開発が重要である。そこでマイクロキャピラリー電気泳動免疫蛍光測定装置を用いて血中の core 型フコシル化 PSA を測定するため測定キットの開発を行い、前立腺癌特異的なバイオマーカーとしての有用性を検討した。ミュータスマイクロキャピラリー電気泳動免疫蛍光測定装置を用い、core 型フコシル化を特異的に認識するレクチン PhoSL と抗 free PSA 抗体により core 型フコシル化 PSA を測定するシステムを確立した。PhoSL と抗 freePSA 抗体と結合した core 型フコシル化 free PSA をキャピラリー電気泳動により抗 free PSA 抗体とのみ結合した free PSA から分離し、ピーク面積から core 型フコシル化 freePSA の比率を測定した。結果、ミュータスプラットフォームにより 1 検体約 9 分の短時間で 0.01ng/ml の core 型フコシル化 freePSA の検出が可能であった。前立腺生検を施行した PSA20ng/ml 以下の 89 名の男性で測定したところ core 型フコシル化 PSA は前立腺生検陰性患者と比べ前立腺癌患者で有意に上昇していた($P = 0.048$)。また Gleason score と関連を認め、GS 7 以上の前立腺癌では GS6 及び生検陰性群と比べても有意に上昇していた($P = 0.031$) (論文2)。2,3 シアリル化 PSA は既に報告されている前立腺癌の糖鎖マーカーであるが、コア型フコシル化 PSA と同時に測定することにより診断能が改善するか検討した。S2,3PSA と FucPSA の間に有意な相関を認めなかったが、S2,3PSA と FucPSA は共に、生検陰性もしくは GS6 の群と比較し GS7 以上の前立腺癌で有意に上昇していた。S23PSA と FucPSA から得られた S2,3PSA-FucPSA index (SF index)の GS7 以上の前立腺癌診断の AUC は 0.842 と PSA (AUC0.632)、S2,3PSA (AUC0.711)、FucPSA (AUC0.738)よりも良好な結果であった。Decision curve 解析でも PSA と比較し、SF index は良好な結果であった。検証群では、SF index の AUC は 0.769 と GS7 以上の前立腺癌の診断に有用であった(論文3)。測定方法の改善を行い、臨床応用を目指す。

発表論文

1. **Fujita K, Nonomura N.** Urinary biomarkers of prostate cancer. *Int J Urol.* 2018 Sep;25(9):770-779. doi: 10.1111/iju.13734. Epub 2018 Aug 21. PMID: 30129068.
2. **Fujita K, Hatano K, Tomiyama E, Hayashi Y, Matsushita M, Tsuchiya M, Yoshikawa T, Date M, Miyoshi E, Nonomura N.** Serum core-type fucosylated prostate-specific antigen index for the detection of high-risk prostate cancer. *Int J Cancer.* 2021 Jun 15;148(12):3111-3118. doi: 10.1002/ijc.33517. Epub 2021 Feb 26. PMID: 33594666.
3. Hatano K, Yoneyama T, Hatakeyama S, Tomiyama E, Tsuchiya M, Nishimoto M, Yoshimura K, **Miyoshi E**, Uemura H, Ohyama C, **Nonomura N, Fujita K.** Simultaneous analysis of serum α 2,3-linked sialylation and core-type fucosylation of prostate-specific antigen for the detection of high-grade prostate cancer. *Br J Cancer.* 2022 Mar;126(5):764-770. doi: 10.1038/s41416-021-01637-x. Epub 2021 Nov 20. PMID: 34802050; PMCID: PMC8888746.
4. **Fujita K, Hatano K, Hashimoto M, Tomiyama E, Miyoshi E, Nonomura N, Uemura**

- H. Fucosylation in Urological Cancers. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 11;22(24):13333. doi: 10.3390/ijms222413333. PMID: 34948129; PMCID: PMC8708646.
5. Nishimoto M, Fujita K, Yamamoto Y, Hashimoto M, Adomi S, Banno E, Saito Y, Shimizu N, Mori Y, Minami T, Nozawa M, Nose K, Hirayama A, Yoshimura K, Uemura H. Prognostic factors in Japanese men with high-Gleason metastatic castration-resistant prostate cancer. *Transl Cancer Res.* 2022 Aug;11(8):2681-2687. doi: 10.21037/tcr-22-375. PMID: 36093511; PMCID: PMC9459578.
 6. Ueda T, Fujita K, Nishimoto M, Shiraishi T, Miyashita M, Kayukawa N, Nakamura Y, Sako S, Ogura R, Fujihara A, Minami T, Hongo F, Okihara K, Yoshimura K, Uemura H, Ukimura O. Predictive factors for the efficacy of abiraterone acetate therapy in high-risk metastatic hormone-sensitive prostate cancer patients. *World J Urol.* 2022 Dec;40(12):2939-2946. doi: 10.1007/s00345-022-04200-2. Epub 2022 Nov 4. PMID: 36331614.
 7. Ito N, Yamada M, Morishita K, Nojima S, Motooka K, Sakata N, Asuka T, Otsu R, Takamatsu S, Kamada Y, Mori S, Akita H, Eguchi H, Morii E, Miyoshi E. Identification of fucosylated haptoglobin-producing cells in pancreatic cancer tissue and its molecular mechanism. *Glycoconj J.* 2021 Feb;38(1):45-54. doi: 10.1007/s10719-020-09970-8. Epub 2021 Feb 1. PMID: 33523362.
 8. Motooka K, Morishita K, Ito N, Shinzaki S, Tashiro T, Nojima S, Shimizu K, Date M, Sakata N, Yamada M, Takamatsu S, Kamada Y, Iijima H, Mizushima T, Morii E, Takehara T, Miyoshi E. Detection of fucosylated haptoglobin using the 10-7G antibody as a biomarker for evaluating endoscopic remission in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2021 Jan 14;27(2):162-175. doi: 10.3748/wjg.v27.i2.162. PMID: 33510557; PMCID: PMC7807302.
 9. Morishita K, Maki Y, Takamatsu S, Ito N, Koda S, Motooka K, Kamada Y, Kajihara Y, Miyoshi E. Identification of the epitope of 10-7G glycan antibody to recognize cancer-associated haptoglobin. *Anal Biochem.* 2020 Mar 15;593:113588. doi: 10.1016/j.ab.2020.113588. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31981485.
 10. Egashira Y, Suganuma M, Kataoka Y, Higa Y, Ide N, Morishita K, Kamada Y, Gu J, Fukagawa K, Miyoshi E. Establishment and characterization of a fucosylated α -fetoprotein-specific monoclonal antibody: a potential application for clinical research. *Sci Rep.* 2019 Aug 26;9(1):12359. doi: 10.1038/s41598-019-48821-x. PMID: 31451706; PMCID: PMC6710264.
 11. Nakayama K, Wakamatsu K, Fujii H, Shinzaki S, Takamatsu S, Kitazume S, Kamada Y, Takehara T, Taniguchi N, Miyoshi E. Core fucose is essential glycosylation for CD14-dependent Toll-like receptor 4 and Toll-like receptor 2 signalling in macrophages. *J Biochem.* 2019 Mar 1;165(3):227-237. doi: 10.1093/jb/mvy098. PMID: 30445455.

知的財産：特願 2020-201372

出願日：令和2年12月3日

発明の名称：前立腺癌の診断を補助する方法 発明者：野々村祝夫、三善英知、藤田和利ら

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hatano Koji, Yoneyama Tohru, Hatakeyama Shingo, Tomiyama Eisuke, Tsuchiya Mutsumi, Nishimoto Mitsuhiisa, Yoshimura Kazuhiro, Miyoshi Eiji, Uemura Hirotsugu, Ohyama Chikara, Nonomura Norio, Fujita Kazutoshi	4. 巻 126
2. 論文標題 Simultaneous analysis of serum 2,3-linked sialylation and core-type fucosylation of prostate-specific antigen for the detection of high-grade prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 764 ~ 770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-021-01637-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujita Kazutoshi, Hatano Koji, Hashimoto Mamoru, Tomiyama Eisuke, Miyoshi Eiji, Nonomura Norio, Uemura Hirotsugu	4. 巻 22
2. 論文標題 Fucosylation in Urological Cancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13333 ~ 13333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222413333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujita Kazutoshi, Hatano Koji, Tomiyama Eisuke, Hayashi Yujiro, Matsushita Makoto, Tsuchiya Mutsumi, Yoshikawa Tomoyasu, Date Mutsuhiro, Miyoshi Eiji, Nonomura Norio	4. 巻 148
2. 論文標題 Serum core type fucosylated prostate specific antigen index for the detection of high risk prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 3111 ~ 3118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33517	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Motooka Kei, Morishita Koichi, Ito Nami, Shinzaki Shinichiro, Tashiro Taku, Nojima Satoshi, Shimizu Kayoko, Date Mutsuhiro, Sakata Natsumi, Yamada Momoko, Takamatsu Shinji, Kamada Yoshihiro, Iijima Hideki, Mizushima Tsunekazu, Morii Eiichi, Takehara Tetsuo, Miyoshi Eiji	4. 巻 27
2. 論文標題 Detection of fucosylated haptoglobin using the 10-7G antibody as a biomarker for evaluating endoscopic remission in ulcerative colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 162 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v27.i2.162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Kazutoshi, Hatano Koji, Tomiyama Eisuke, Hayashi Yujiro, Matsushita Makoto, Tsuchiya Mutsumi, Yoshikawa Tomoyasu, Date Mutsuhiro, Miyoshi Eiji, Nonomura Norio	4. 巻 148
2. 論文標題 Serum core type fucosylated prostate specific antigen index for the detection of high risk prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 3111 ~ 3118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33517	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamada Yoshihiro, Yamamoto Akiko, Fujiyoshi Anna, Koseki Masahiro, Morishita Koichi, Asuka Tatsuya, Takamatsu Shinji, Sakata Yasushi, Takehara Tetsuo, Taniguchi Naoyuki, Miyoshi Eiji	4. 巻 527
2. 論文標題 Loss of core fucosylation reduces low-density lipoprotein receptor expression in hepatocytes by inducing PCSK9 production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 682 ~ 688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morishita Koichi, Maki Yuta, Takamatsu Shinji, Ito Nami, Koda Sayaka, Motooka Kei, Kamada Yoshihiro, Kajihara Yasuhiro, Miyoshi Eiji	4. 巻 593
2. 論文標題 Identification of the epitope of 10-7G glycan antibody to recognize cancer-associated haptoglobin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 113588 ~ 113588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2020.113588	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Egashira Yuriko, Suganuma Masatoshi, Kataoka Yukiko, Higa Yukiko, Ide Nobuyuki, Morishita Koichi, Kamada Yoshihiro, Gu Jianguo, Fukagawa Koji, Miyoshi Eiji	4. 巻 9
2. 論文標題 Establishment and characterization of a fucosylated -fetoprotein-specific monoclonal antibody: a potential application for clinical research	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12359-12370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48821-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujita Kazutoshi、Nonomura Norio	4. 巻 25
2. 論文標題 Urinary biomarkers of prostate cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 770 ~ 779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.13734	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 波多野 浩士, 米山 徹, 畠山 真吾, 藤田 和利, 三善 英知, 吉村 一宏, 植村 天受, 大山 力, 野々村 祝夫
2. 発表標題 Simultaneous analysis of serum a 2,3-linked sialylation and core-type fucosylation of PSA for the detection of clinically significant prostate cancer
3. 学会等名 日本泌尿器科学会総会 109回
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 S2,3PSAとFucPSA同時測定による高Gleason score前立腺癌診断
2. 発表標題 藤田 和利
3. 学会等名 日本泌尿器腫瘍学会第7回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田 和利, 林 裕次郎, 吉川 友康, 山下 謙一郎, 富山 栄輔, 松下 慎, 中野 剛佑, 加藤 大悟, 波多野 浩士, 河嶋 厚成, 氏家 剛, 植村 元秀, 吉村 一宏, 植村 天受, 三善 英知, 野々村 祝夫
2. 発表標題 自動化マイクロキャピラリー電気泳動法による高Gleason前立腺癌診断法のための血中Core型フコシル化PSA測定法の開発
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田和利、吉川友康、山下謙一郎 富山栄輔、松下慎、林裕次郎、 加藤大悟、波多野浩士、河嶋厚成、氏家剛、植村元秀、三善英知、野々村祝夫
2. 発表標題 マイクロキャピラリー電気泳動免疫蛍光測定装置によるcore型フコシル化PSA測定法の開発
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田和利
2. 発表標題 前立腺癌におけるフコシル化とバイオマーカーへの応用
3. 学会等名 第39回日本分子腫瘍マーカー研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 血中フコシル化PSAによるハイリスク前立腺癌診断バイオマーカーの開発	発明者 藤田和利、三善英知、野々村祝夫、吉川友康、伊達睦廣	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-201372	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>悪性度の高い前立腺がんを診断する新たな高感度測定法を確立 https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2021/20210219_2 悪性度の高い前立腺がんを診断する新たな高感度測定法を確立 https://newscast.jp/news/0271941</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	三善 英知 (Miyoshi Eiji) (20322183)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	
研究 分 担 者	野々村 祝夫 (Nonomura Norio) (30263263)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関