

総 説

PSA 値を補完する前立腺がんマーカーの探索

藤村 務

Search for Prostate Cancer Markers Complementing PSA Levels

Tsutomu FUJIMURA

(Received November 20, 2016)

1. はじめに

現在の日本は、寿命の延びと出生率の低下により少子高齢化が急速に進んでおり、社会への影響として年金、医療、介護などの社会保障費の負担が増大する。特に、国民医療費は年々増加し、現在、約 30 兆円の規模となっている。このうち高齢者に係る老人医療費は約 10 兆円であり、医療費全体の 1/3 を占めており、年々その割合が上昇している。また、国民医療費の伸びは、国民所得の伸びを上回る伸びを示しており、特に老人医療費の伸びは著しいものとなっている。高齢化の進展により死亡者数も増大し、病気原因の死亡率は、1 位がん、2 位心臓病、3 位脳卒中である。国立がんセンターは、2016 年がんと診断された人は初めて 100 万人を超えたと発表している。更なる国民医療

費の増大が予想される。がんには多くの種類があり、中には腫瘍（がん）マーカーと呼ばれる、そのがんの特徴的な物質を産生するものがある。そのような物質のうち、体液中（主として血液中）で測定可能なものが、いわゆる「腫瘍マーカー」として臨床検査の場で使われている。現在、数多くの腫瘍マーカーが臨床の場で使われ、確立された腫瘍マーカーの一部を Fig. 1 と Table 1 に示した。多くの腫瘍マーカーは糖鎖修飾を受けているものである。

前立腺がんは男性の臓器である前立腺に発生するがんで、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

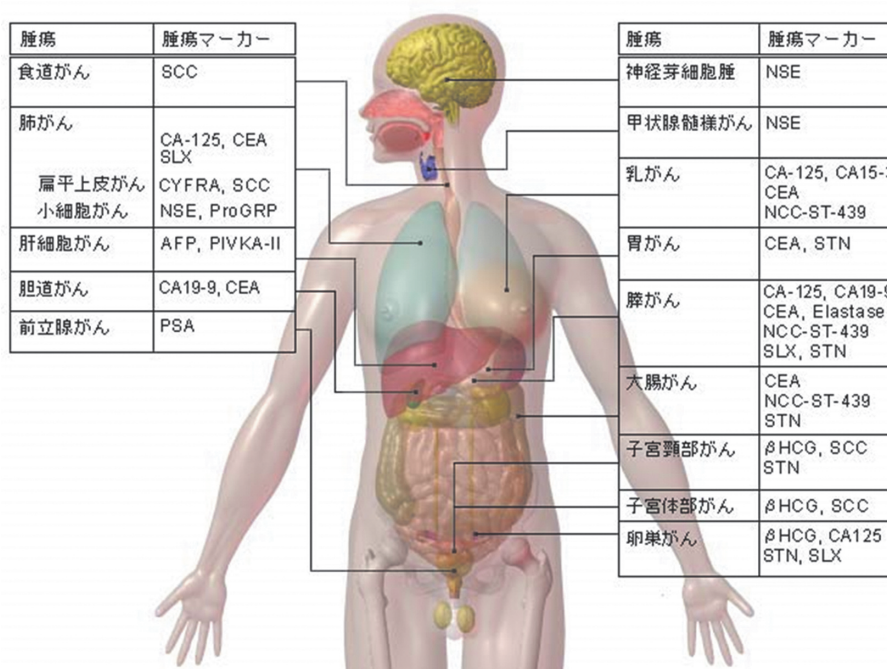
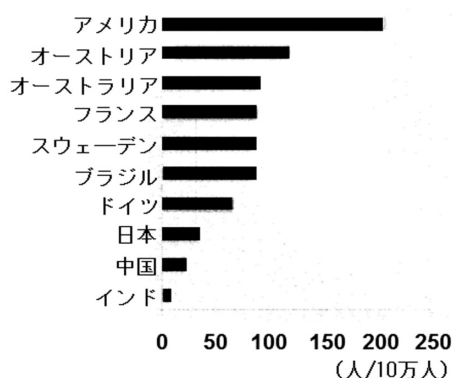


Fig. 1. Biomarkers in tumor diagnostics. Center for Cancer Control and Information Services, National Cancer Center, Japan.

Table 1. Biomarkers in tumor diagnostics. Center for Cancer Control and Information Services, National Cancer Center, Japan.

省略名	マーカー名	備 考
AFP	α -フェトプロテイン	胎児性タンパク. 原発性肝細胞がんの特異性が高い.
CA125	糖鎖抗原 125	糖鎖抗原. 卵巣がんにも有用.
CA19-9	糖鎖抗原 19-9	糖鎖抗原. シアリルルイス A 糖鎖. 消化器官がんにも有用.
CEA	がん胎児性抗原	胎児性タンパク. 消化器官がんにも有用.
CYFRA	サイトケラチン 19 フラグメント	扁平上皮肺がんにも有用.
エラスターゼ 1	エラスターゼ 1	膵がんに限らず膵疾患にも有用.
NCC-ST-439	NCC-ST-439	糖鎖抗原.
NSE	神経特異エラノーズ	同位酵素. 神経組織に特異性が高い.
PIVKA2	PIVKA2	肝細胞がんにも有用.
ProGRP	ガストリン放出ペプチド前駆体	小細胞肺がんにも特異性が高い.
PSA	前立腺特異抗原	糖鎖抗原. 前立腺がんにも有用.
SCC	扁平上皮がん関連抗原	各種臓器の扁平上皮がんでも有用.
SLX	シアリル Lex-i 抗原	糖鎖抗原.
STN	シアリル Tn 抗原	糖鎖抗原. 卵巣がんでも有用.
β HCG	ヒト絨毛性ゴナドトロピン β 分画コア	糖タンパク.

前立腺がん年齢調整罹患率 (1998-2002)



日本人男性 がんの部位別罹患率

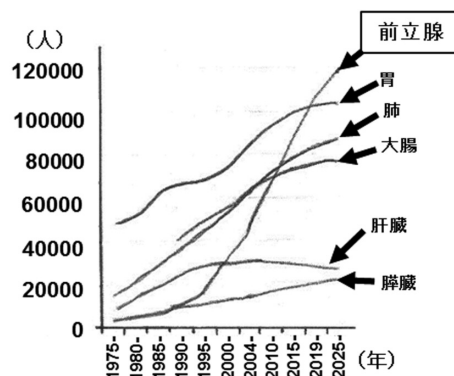


Fig. 2. Cancer Registry and Statistics. Center for Cancer Control and Information Services, National Cancer Center, Japan.

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 (Fig. 2). 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。

2. 前立腺がんマーカーとしての血中 PSA 値の現状

臨床現場では、前立腺がん (prostate cancer: PCa) マーカーとして組織特異性の高い血中の前立腺特異抗原 (prostatic specific antigen: PSA) 値が用いられている。1979年 Wang ら¹⁾ が精漿から

PSA 値の精製に成功し、前立腺から分泌される分子量約 34,000 の糖タンパク質で、セリンプロテアーゼ (セリン・タンパク質分解酵素) に分類される。PSA 値は本来、前立腺から精漿中に分泌され精子が体外に放出されるときに精漿中のゼリー化成分であるタンパク質を分解して精子の運動性を高める役割を果たす。そのため、PSA 値は前立腺疾患 (がん患者) 由来の物質ではなく、前立腺自体から分泌されるので、健常者でも多少血中に存在する (前立腺から血中にほんのわずかな漏れ出ている。健常者の PSA 値値は 4 ng/mL 以下)。^{2,3)} 前立腺に炎症がある場合 (良性前立腺疾患・benign prostatic hyperplasia: BPH) は、前立腺か

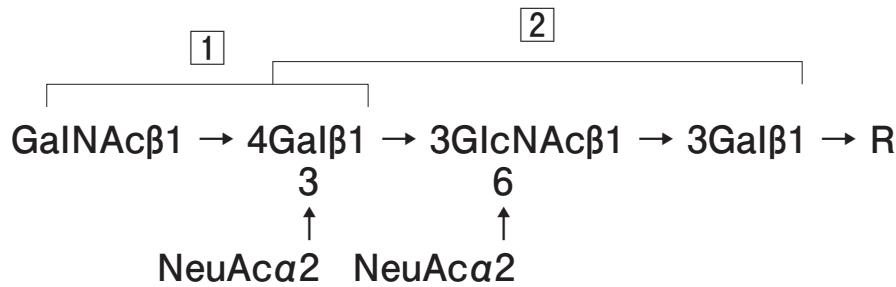


Fig. 3. Structure of RM2 antigen. 1: ganglio-series structure. 2: disialyl lacto-series type 1 structure. (Saito S. *et al. Int J Cancer*, **115**, 105–113, 2005)

ら血中に漏れ出ているため PSA 値はがんでなくても高値となる。1991 年に Stenman ら⁴⁾は前立腺から血中に漏れ出た PSA 値の存在形態は、①単独で遊離している遊離型 PSA 値（フリー PSA 値）② α 1-アンチキモトリプシン（ACT）と結合し複合体を形成する結合型 PSA 値（PSA 値-ACT）であると報告した。その後、Christensson と Lilja ら⁵⁻⁷⁾は血中の PSA 値が 4~10 ng/mL のグレーゾーンといわれる良性前立腺疾患と前立腺がん患者が混在する場合において、フリー PSA 値=f とフリー PSA 値+PSA-ACT 値=トータル PSA 値（T）の比をとれば、良性前立腺疾患と前立腺がん患者を区別可能であると報告したが、臨床診断の要求を満たすには至っていない。現状では、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：針生検による組織学的診断、1+1~5+5 までであり数値が大きいほど悪性度が高い）が 30%，良性前立腺疾患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を見つけないことが患者の救済（過剰な検査による診断）および医療費負担の軽減の両面で貢献することになる。

3. 前立腺がんマーカーの探索

前立腺がんのマーカー研究について、共同研究者の Saito と Hakomori ら⁸⁻¹¹⁾は次のように報告している。RM2 とはモノクローナル抗体の名称であり、RM2 (β 1,4-GalNAc-disialyl Lc4, Fig. 3) 抗原はモノクローナル抗体 RM2 が認識する糖鎖抗原のことである。RM2 抗原の出発点は腎がんにおける糖脂質研究であり、腎がん転移巣においてシアル酸を 2

つ有するジシアロガングリオシド分画の増加がみられた。¹²⁾ この分画から同定されたガングリオシドは DSGb5 (disialosyl globopentaosylceramide) であり、DSGb5 を目的としてモノクローナル抗体を作成し RM2 と名付けた。⁸⁾ しかし、その後の研究過程で、モノクローナル抗体 RM2 は実は DSGb5 を認識するのではなく、DSGb5 と同じジシアロガングリオシド分画に移動し、精製したと考えていた DSGb5 に混入していた糖鎖を認識することが判明した。長年の後、RM2 の認識抗原は、最新の NMR 技術により新規の糖鎖である RM2 抗原であることが判明した。⁹⁾ この予期しなかった RM2 抗原は、ラクトシリーズ I 型糖鎖とガングリオシリーズ糖鎖のきわめてユニークなハイブリッド構造をしているのが特徴である (Fig. 3)。ラクトシリーズ I 型糖鎖は上皮、腺に広く分布しており、ガングリオシリーズ糖鎖は神経外胚葉由来の細胞に豊富に存在する特徴がある。¹³⁾ 他方、前立腺がんは腺上皮由来のがんであり、PSA 値や PAP (prostatic acid phosphatase) 分泌などの上皮由来の性格を有していながら、臨床的に neuroendocrine differentiation が観察されることが特徴である。¹⁴⁾ 以上から、このハイブリッド構造と前立腺がんとの関連が想定されたため、RM2 抗原の発現を、前立腺全摘術を施行した前立腺がん 75 例において調べた。その結果、RM2 抗原は良性腺管では発現しないか発現レベルが弱いこと、HGPIN (high-grade prostatic intraepithelial neoplasia) では同一症例で比較した場合、RM2 抗原発現レベルはがん部に比して弱いこと、前立腺がんの悪性度 (Gleason pattern) を反映して発現が高くなること、特に Gleason pattern 3 と 4 ではその発現レベルに明らかな違いがあることが判明した (Fig. 4)。さらに、RM2 抗原の高発現群では、低発現群に比して 5 年

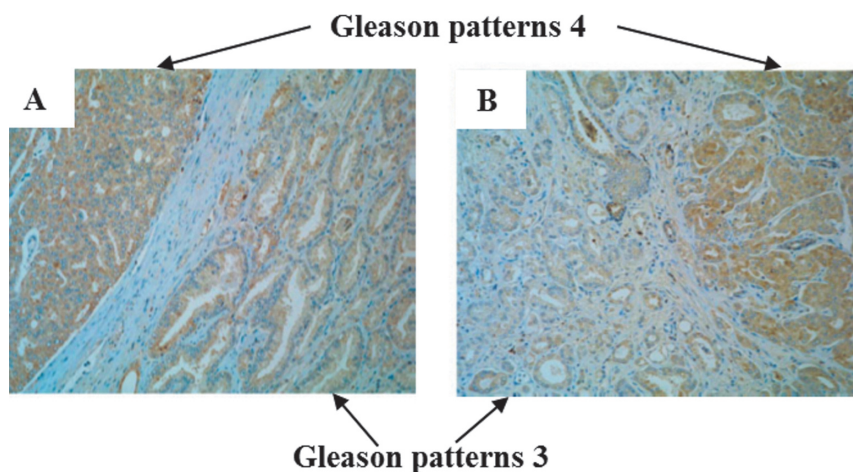


Fig. 4. Contrast of immunoreactivity of RM2 antigen between Gleason patterns 3 and 4. In most cases, immunoreactivity of RM2 antigen was higher in Gleason pattern 4 than in Gleason pattern 3, as shown here. Strong to moderate immunoreactivity was observed in Gleason pattern 4, while negative to weak immunoreactivity was observed in Gleason pattern 3. Magnification 100x. (Saito S. *et al. Int J Cancer*, **115**, 105–113, 2005)

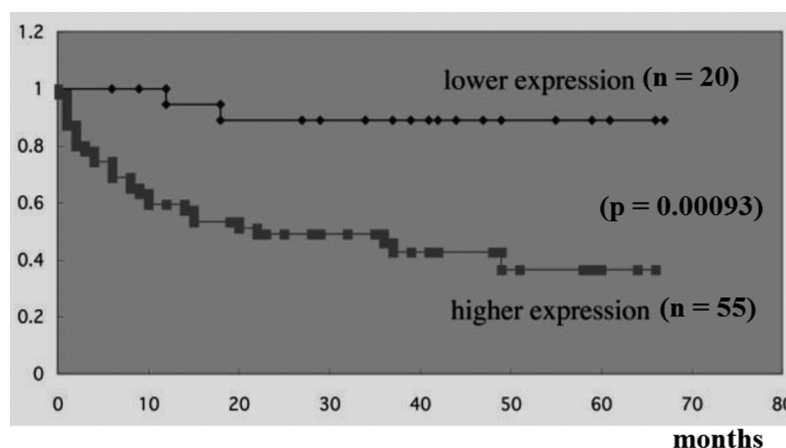


Fig. 5. PSA failure-free survival in 75 patients who underwent radical prostatectomy; 5-year PSA failure-free survival was 88.9% in the lower expression group and 36.6% in the higher expression group. The difference was statistically significant by the log-rank test ($p = 0.00093$). (Saito S. *et al. Int J Cancer*, **115**, 105–113, 2005)

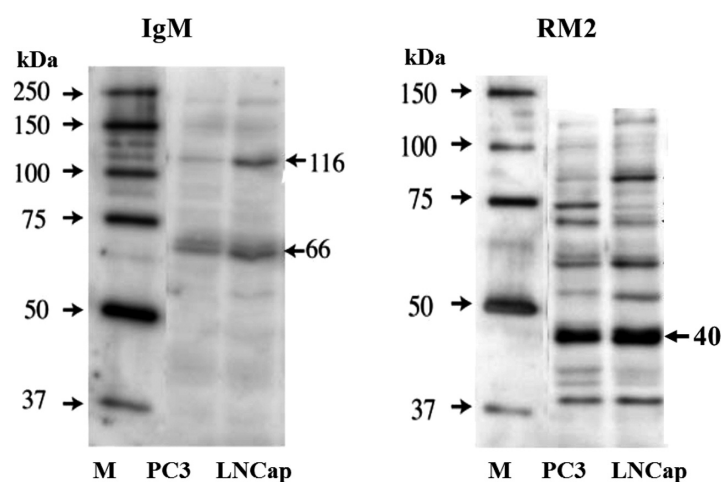


Fig. 6. Western blot analysis of prostate cancer cell lines by RM2. A total of 10 mg of cancer cells was applied in each lane. Left panel: immunostaining by mouse IgM. Right panel: immunostaining by RM2. PC3: prostate cancer cell lines. LNCap: prostate cancer cell lines. M: size marker. RM2 detected a 40 kDa glycoprotein as the major band in LNCap and PC3. (Saito S. *et al. Int J Cancer*, **115**, 105–113, 2005)

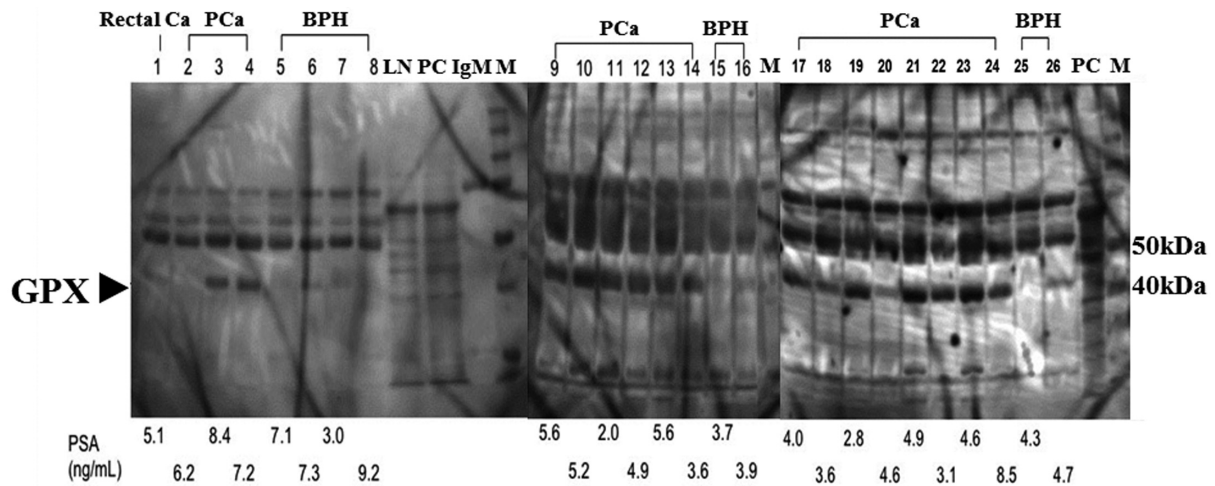


Fig. 7. Examples of serum Western blotting by mAb RM2. Rectal Ca: rectal cancer. PCa: prostate cancer. BPH: benign prostatic hyperplasia. LN: prostate cancer cell lines. PC: prostate cancer cell lines. IgM: immunoglobulin M. GPX: increased level of RM2 reactivity to glycoprotein X. M: size marker. PSA level for each case was indicated at bottom. (Saito S. *et al. Int J Cancer*, **123**, 633–640, 2008)

PSA 値無再発生存率が有意に低かった (Fig. 5).¹⁰⁾ RM2 抗原 carrier protein を調べるため、前立腺がん細胞株のウェスタンブロッティングを施行したところ、PC3 と LNCap 両者に共通の糖タンパクの発現、PC3 に特徴的な糖タンパクの増加、LNCap に特徴的な糖タンパクの増加がそれぞれ観察された (Fig. 6). PC3 はアンドロゲン非依存性であり、LNCap はアンドロゲン依存性なのでこれらの RM2 抗 carrier protein の発現の違いは、アンドロゲン依存性・非依存性にそれぞれ関連している可能性が考えられた。¹⁰⁾

次に RM2 反応分子が、血清マーカーになりうるか否かを検討した。組織免疫染色で、前立腺がん組織の間質にも RM2 反応があるということは、がん細胞から間質に RM2 反応分子が放出されて血液中に検出される可能性がある。また、RM2 によりがんは染色されるが、BPH は染色されないため、血液中に検出されるとすれば、がんと良性疾患を判別できる可能性がある。

4. 前立腺がんおよび良性前立腺疾患の血清に対する RM2 反応^{15,16)}

血清に対してモノクローナル抗体 RM2 によりウェスタンブロッティングを施行した。対象症例は、前立腺生検によりがん (n=62) か良性疾患 (n=43) かの診断がなされた PSA 値 <10 ng/mL の男性である。2つのグループ間で年齢と PSA 値に有意差はなかった。IgM を陰性コントロールとして

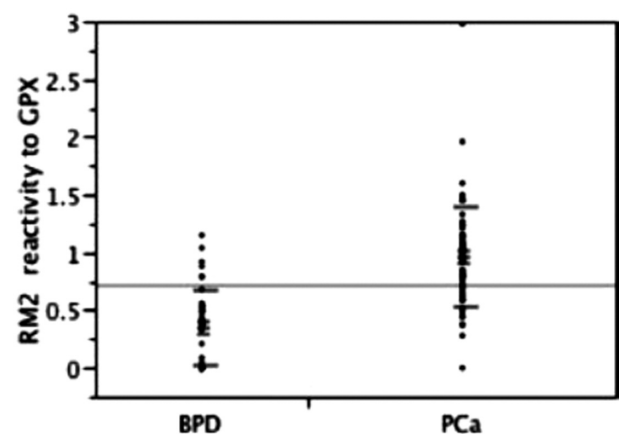


Fig. 8. Comparison of RM2 reactivity to GPX between BPD and PCa. Large bars: standard deviation, Small bars: standard error of the mean. (Saito S. *et al. Int J Cancer*, **123**, 633–640, 2008)

用いた場合、血清タンパク質上に反応は認められなかった。前立腺がんと良性前立腺疾患との違いは、約 40 kDa の糖タンパク質 (glycoprotein X: GPX と仮称) 上の RM2 反応の違いとして観察された (Fig. 7). Scion image により計算した GPX に対する RM2 反応は、前立腺がんにおける GPX に対する RM2 反応レベル (0.96 ± 0.43) は、良性前立腺疾患における反応レベル (0.35 ± 0.32) よりも有意に高かった ($p < 0.0001$) (Fig. 8). がんと良性とで明らかな反応レベルの差が観察された。

受信者動作特性 (receiver operating characteristic: ROC) 分析を施行したところ、GPX に対する RM2

反応のROC 曲線下面積 (area under the ROC curve: AUC) は0.8874 と高かった. GPX に対する RM2 反応のカットオフレベルを0.59にセットすると, 前立腺がん検出における GPX に対する RM2 反応は, 感度 87%, 特異度 84%であった (Fig. 9).

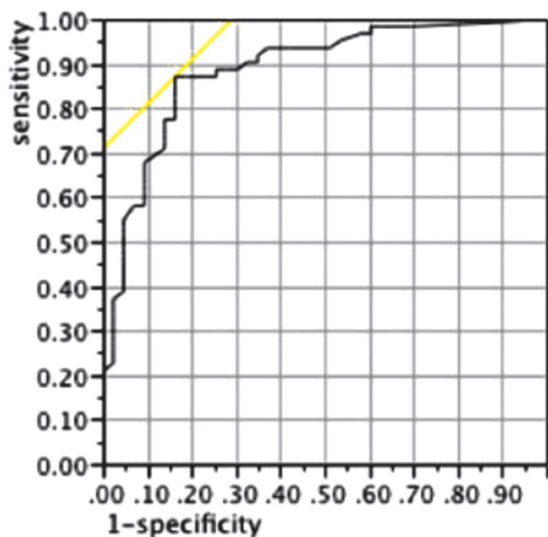


Fig. 9. ROC curve of RM2 reactivity to GPX. The area under the ROC curve was 0.89. The difference between sensitivity and 1-specificity was highest at sensitivity of 87%. (Saito S. *et al. Int J Cancer*, **123**, 633–640, 2008)

5. RM2 抗体が認識するタンパク質の同定 (GPX の同定)^{15,16)}

我々は, Saito と Hakomori らの結果を踏まえて, 約 40 kDa の GPX をプロテオミクス解析の手法を用いてタンパク質同定を行った.

5-1. アジレントカラムによる血清の前処理と二次元電気泳動

タンパク質中に含まれるバイオマーカーの探索を行う際に, 血清中/血漿中に大量に存在するタンパク質が邪魔になり, 低濃度タンパク質の同定が困難になる. アジレントのマルチプルアフィニティ除去システム (Multiple Affinity Removal System: MARS) は, 血清中/血漿中に大量に存在するタンパク質を除去し, 低濃度タンパク質中に含まれるバイオマーカーの同定とキャラクタライゼーションを可能にする. MARS は大量に存在するタンパク質 (アルブミン, 免疫グロブリンの IgG および IgA, トランスフェリン, ハプトグロビン, アンチトリプシン) の 98–99% を吸着する. 残り数% の微量タンパク質は非吸着のため, 素通り画分に溶出される. 研究当初は, 微量タンパク質に GPX が存在していると予想したが, RM2 抗

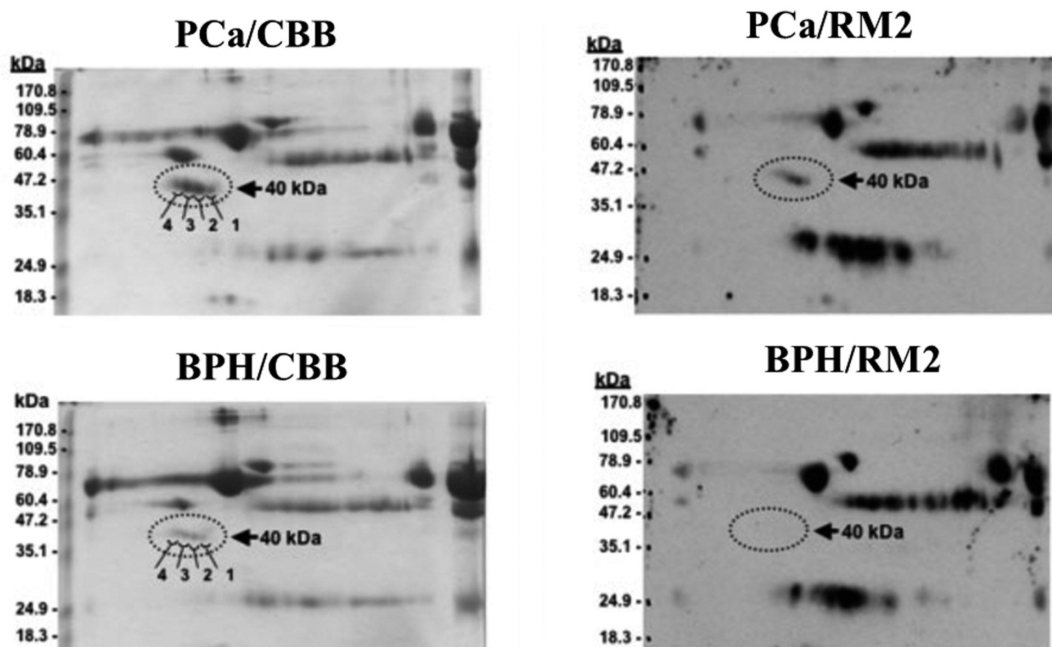


Fig. 10. Identification of GPX as haptoglobin-b chain. PCa/CBB and BPH/CBB: Protein components separated by 2D SDS-PAGE. Staining by Coomassie Brilliant Blue (CBB). Agilent column-adsorbed fractions from PCa (prostate cancer) serum and from BPH (benign prostatic hyperplasia) serum were analyzed by 2D SDS-PAGE. Upper: The pattern from serum of PCa. Lower: The pattern from serum of BPH. Horizontal direction: isoelectric focusing (IEF). Vertical direction: SDS-PAGE. Area circled by dotted line on both left and right: GPX. Note that PCa has higher CBB staining than BPH. For each sample, GPX is separated into four contiguous spots with different IEF, termed 1, 2, 3 and 4 as indicated. PCa/RM2 and BPH/RM2: Protein components separated by 2D SDS-PAGE. Staining by mAb RM2. Note that RM2-stained bands are clearly seen for sample PCa/RM2 but not for BPH/RM2. (Saito S. *et al. Int J Cancer*, **123**, 633–640, 2008)

体と反応するタンパク質を同定することはできなかった。そこで、大量に存在するタンパク質画分から RM2 抗体と反応するタンパク質の同定を二次元電気泳動 (2D SDS-PAGE: Fig. 10) →インゲル消化→質量分析 (LC/MS: Fig. 11 と LC/MS/MS: Fig. 12) →分析結果を TurboSEQUEST によるサーチエンジンを用いて、NCBI のヒト配列データベースから GPX の同定を行った。

二次元電気泳動において、がん患者血清 (PCa/CBB, Fig. 10) と良性前立腺疾患々者血清 (BPH/CBB, Fig. 10) との間で、近接する 4 スポット (スポット 1, 2, 3, 4 と名付ける) からな

る一つの分画に明らかな違いが認められた。良性前立腺疾患々者血清と前立腺がん患者血清との間の違いは、二次元電気泳動を RM2 によるウェスタンブロットングを施行するとさらに著明になった。すなわち、RM2 によりプロットされたスポットは、前立腺がん患者血清検体 PCa/RM2 に対して強いが、良性前立腺疾患々者血清検体 BPH/RM2 に対しては陰性であった。

5-2. LC/MS と LC/MS/MS による GPX の同定^{15,16)}

Fig. 10 の検体 PCa/CBB より近接する 4 スポットを切り出し、トリプシンによるインゲル消化を

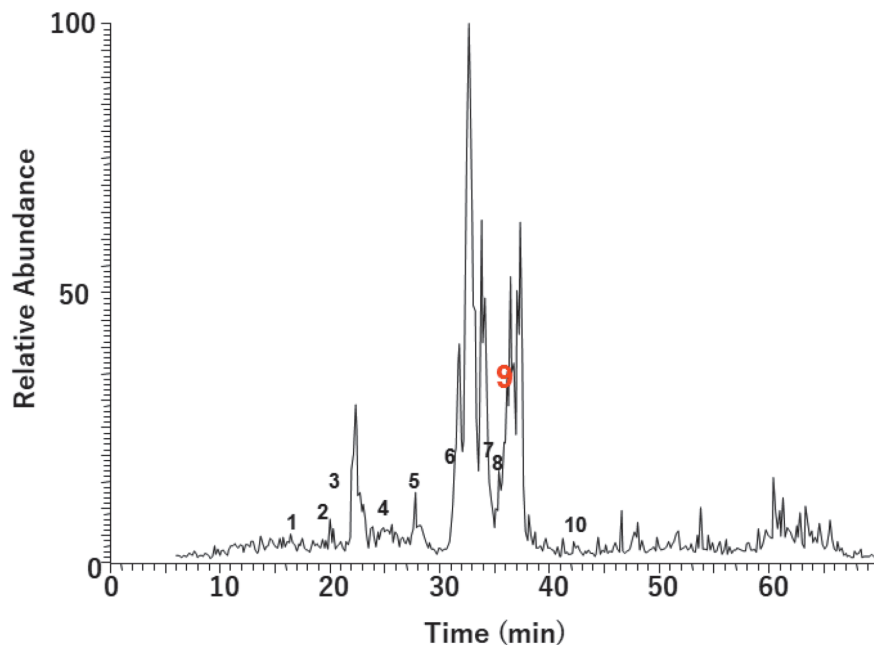


Fig. 11. LC/MS chromatogram of spot 2 on the 2D SDS-PAGE in PCa/CBB after in gel trypsin digestion and extraction of the tryptic peptides. Abscissa: LC retention time. Ordinate: MS1 of total ion chromatogram. (Saito S. *et al. Int J Cancer*, **123**, 633–640, 2008)

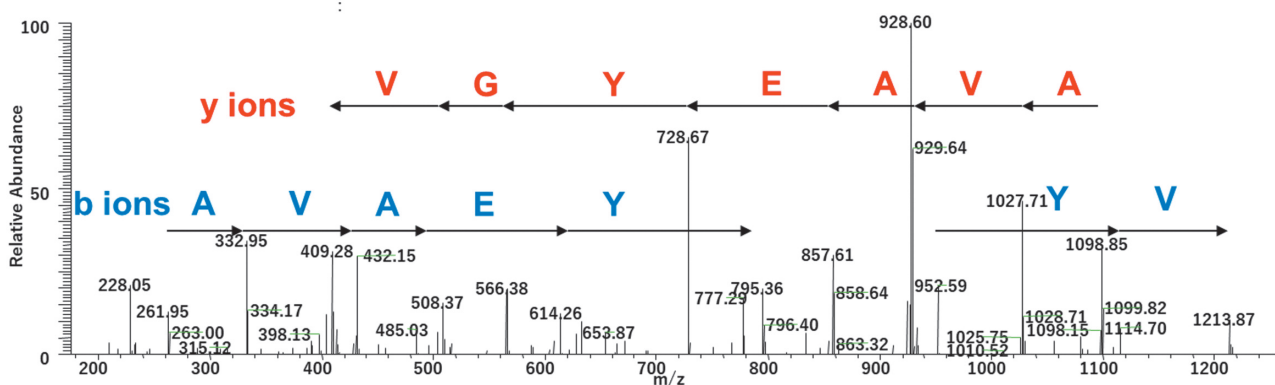


Fig. 12. MS/MS spectrum of a doubly charged precursor ion ($[M+2H]^{2+}$ ion) at m/z 680 identifying SC(PAM) AVAEYGVYVK peptide with annotated amino acid sequence. The amino acid sequences correspond to the residues 380-391 of the haptoglobin precursor. (Saito S. *et al. Int J Cancer*, **123**, 633–640, 2008)

行った後、タンパク質同定のために LC-MS/MS 分析を行った。Fig. 11 に GPX のスポット 2 をトリプシン消化したペプチドの LC/MS クロマトグラムを示した。TurboSEQUENT によるデータ探索の結果、GPX がハプトグロビン β 鎖であることが同定でき、9 つのトリプシン消化ペプチド (Table 2)

Table 2. Detection of peptide sequences in haptoglobin by LC/MS/MS. (Saito S. *et al. Int J Cancer*, **123**, 633–640, 2008)

Peak No	Sequence
1	(R)ILGGHLDK
2	(K)GSFPWQAK
3	(K)DIAPTLTLVVGK
4	(K)DIAPTLTLVVGKK
5	(K)QLVEIEK
6	(R)VGIVSGWGR
7	(K)YVMLPVADQDQC*IR
8	(K)SPVGVQPILNEHTFC*AGMSK
9	(K)SC* AVAEGVYVK (380-391)
10	(K)VTSIQDWVQK

が検出できた。ハプトグロビン (PubMed Entry P00738, gi: 123508) はシグナルペプチド (1–18 残基), α 鎖 (19–160 残基), β 鎖 (162–406 残基) からなり、検出された全てのトリプシン消化ペプチドは β 鎖由来であった。ハプトグロビン β 鎖の分子量は約 40 kDa であり RM2 抗体と反応するタンパク質の分子量と一致していた。また、スポット 2 のハプトグロビン β 鎖のペプチドカバー率は 38.8% であった。他のスポットも同様であり、GPX がハプトグロビン β 鎖であることが分かった。Fig. 12 に m/z : 680 における二価イオン $[M+2H]^{2+}$ の MS/MS スペクトラムを示した。MS/MS スペクトラムは、SC(PAM)AVAEGVYVK (配列番号 9) であることを示しており、アミノ酸配列は、ハプトグロビン β 鎖の 380–391 残基に相当した。

6. ハプトグロビンの糖鎖構造解析¹⁶⁾

前立腺がん患者由来血清と良性前立腺疾患や健康人由来血清からヘモグロビンをカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによりハプトグロビンを精製した。それぞれから精製したハプト

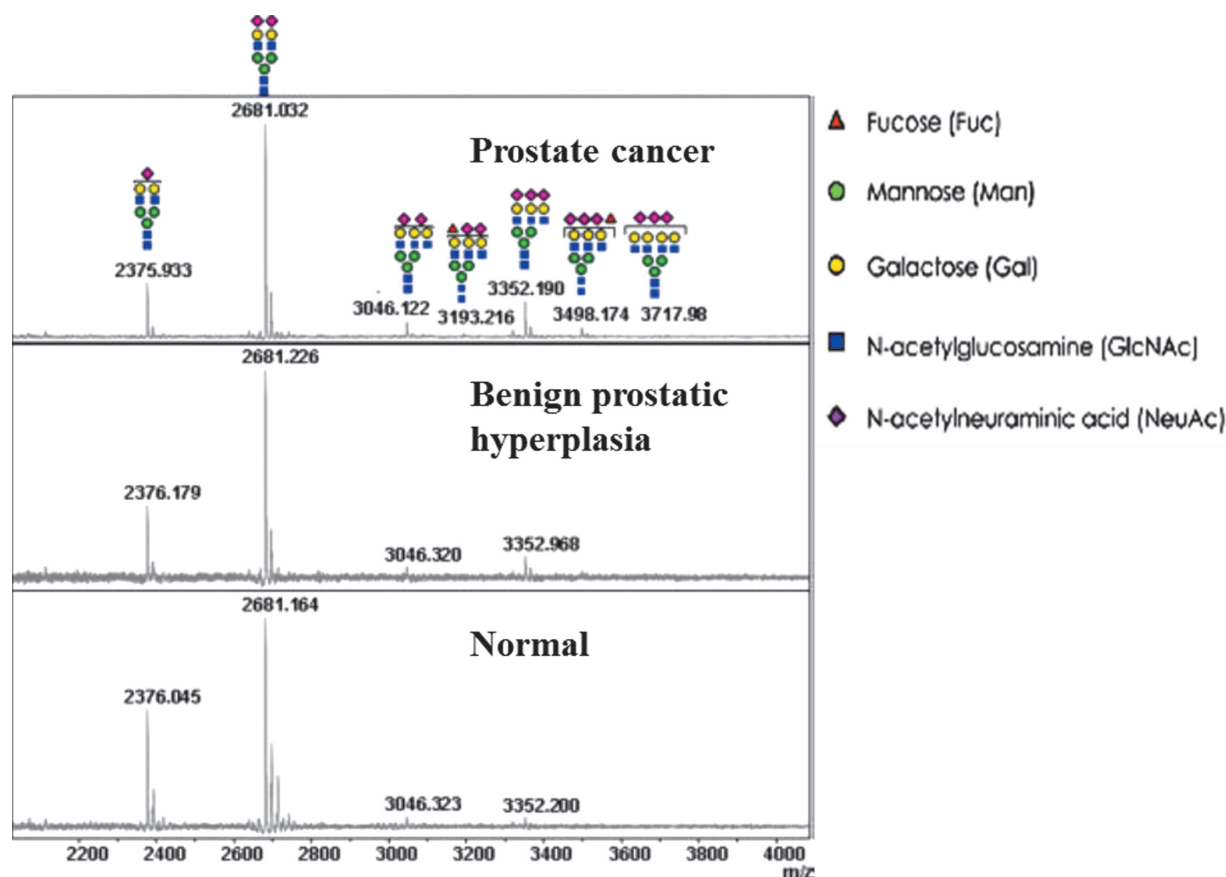


Fig. 13. MALDI-TOF spectra showing differences in N-linked glycans of haptoglobin β -chain from sera of prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, and normal subjects. Glycans were released by PNGase-F, methylated at the carboxyl group of sialic acid(s), and derivatized with aOR. Keys are given in the box and correspond to Consortium for Functional Glycomics symbols (<http://www.functionalglycomics.org/fg/>). (Fujimura T. *et al. Int J Cancer*, **122**, 39–49, 2008)

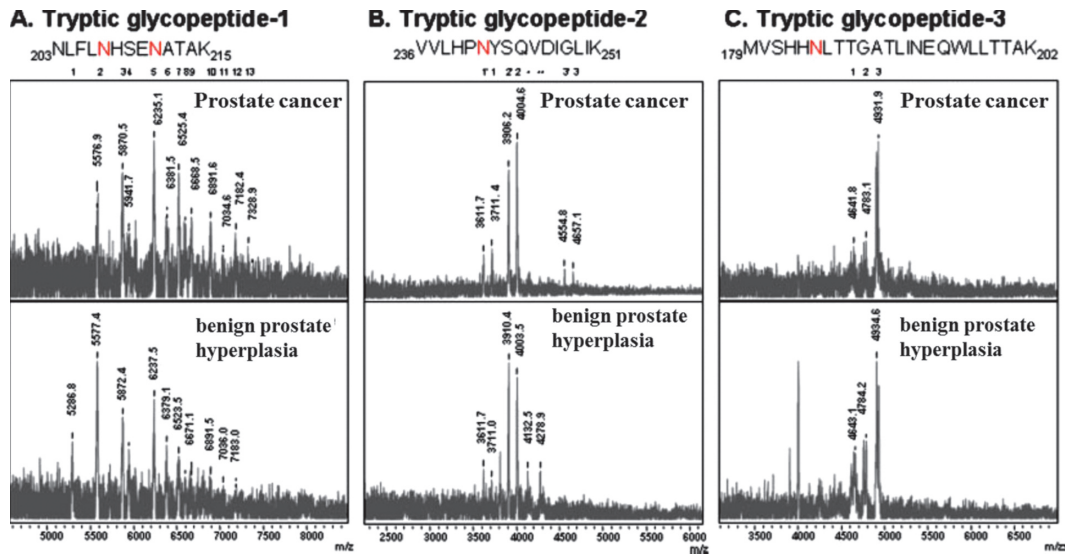


Fig. 14. Variation in N-linked glycan structures in tryptic glycopeptides from haptoglobin β -chain. MALDI-TOF spectra of “tryptic glycopeptide-1” (including N-linked glycans present at N207 and N211), “tryptic glycopeptide-2” (including N-linked glycans present at N241), and “tryptic glycopeptide-3” (including N-linked glycans present at N184) are shown in a, b and c, respectively. Upper panels: haptoglobin β -chain of sera from prostate cancer patients. Lower panels: haptoglobin β -chain of sera from benign prostate disease. (Fujimura T. *et al. Int J Cancer*, **122**, 39–49, 2008)

Table 3. Putative glycan structures from haptoglobin β -chain, m/z values, and relative abundance. (Fujimura T. *et al. Int J Cancer*, **122**, 39–49, 2008)

Peak No	m/z	Glycan structure		Relative abundance		
				Prostate cancer	Benign prostate	Normal subject
A: NLFLNHSENAK(203-215)¹						
1	5286.8 ± 9.0	[NeuAc1Hex2HexNAc2+Man3GlcNAc2]		ND	9.6	17.8
2	5576.9 ± 15.0	+ [NeuAc1Hex2HexNAc2+Man3GlcNAc2]		10.5	22.3	31.1
3	5870.5 ± 17.0	[NeuAc2Hex2HexNAc2+Man3GlcNAc2]		12.8	14.3	12.5
4	5941.7 ± 18.0	+ [NeuAc2Hex2HexNAc2+Man3GlcNAc2]		4.3	7.3	11.0
5	6235.1 ± 18.0	[NeuAc1Hex2HexNAc2+Man3GlcNAc2]		17.0	17.0	9.2
		+ [NeuAc3Hex3HexNAc3+Man3GlcNAc2]				
		[NeuAc2Hex2HexNAc2+Man3GlcNAc2]				
6	6381.5 ± 18.0	+ [NeuAc3Hex3HexNAc3+Man3GlcNAc2]		6.7	8.2	5.8
7	6525.4 ± 18.0	[NeuAc2Hex2HexNAc2+Man3GlcNAc2]		14.7	6.4	6.0
8	6597.3 ± 17.0	+ [NeuAc3Hex3HexNAc3+Man3GlcNAc2]		4.4	3.3	6.6
9	6668.2 ± 18.0	[NeuAc2Hex3HexNAc3+Man3GlcNAc2]		7.3	4.1	ND
		+ [NeuAc2Hex3HexNAc3+Man3GlcNAc2 + Fuc]				
10	6891.6 ± 18.0	[NeuAc2Hex3HexNAc3+Man3GlcNAc2]		7.3	3.4	ND
		+ [NeuAc3Hex3HexNAc3+Man3GlcNAc2]				
11	7034.6 ± 17.0	[NeuAc2Hex3HexNAc3+Man3GlcNAc2]		4.5	4.1	ND
		+ [NeuAc3Hex3HexNAc3+Man3GlcNAc2 + Fuc]				
12	7182.4 ± 20.0	[NeuAc3Hex3HexNAc3+Man3GlcNAc2]		6.3	ND	ND
		+ [NeuAc3Hex3HexNAc3+Man3GlcNAc2]				
13	7328.9 ± 20.0	[NeuAc3Hex3HexNAc3+Man3GlcNAc2]		4.2	ND	ND
		+ [NeuAc3Hex3HexNAc3+Man3GlcNAc2 + Fuc]				
				100.0	100.0	100.0
B: VVLHPNYSQVDIGLIK (236-251)²						
1'	3611.7 ± 9.0	[NeuAc1Hex2HexNAc2+Man3GlcNAc2]		8.8	11.2	ND
1	3711.4 ± 9.0	- 98 (N-terminal Val residue?)		10.6	8.0	ND
2'	3906.2 ± 9.0	[NeuAc2Hex2HexNAc2+Man3GlcNAc2]		28.4	25.9	ND
		- 98 (N-terminal Val residue?)				
2	4004.6 ± 9.0	[NeuAc2Hex2HexNAc2+Man3GlcNAc2]		35.5	30.0	ND
2*	4132.5 ± 15.0	[NeuAc2Hex2HexNAc2+Man3GlcNAc2] +128		4.5	11.6	ND
2**	4278.9 ± 15.0	[NeuAc2Hex2HexNAc2+Man3GlcNAc2]		2.1	8.6	ND
		+128 + 146 (Fuc?)				
3'	4554.8 ± 18.0	[NeuAc3Hex3HexNAc3+Man3GlcNAc2]		5.5	4.7	ND
		- 102 (N-terminal Val residue?)				
3	4657.1 ± 18.0	[NeuAc3Hex3HexNAc3+Man3GlcNAc2]		4.6	ND	ND
				100.0	100.0	
C: MVSHHNLTTGATLINEQWLLTTAK(179-202)³						
1	4641.8 ± 9.0	[NeuAc1Hex2HexNAc2+Man3GlcNAc2]		14.2	16.5	ND
2	4783.1 ± 15.0	[NeuAc1Hex2HexNAc2+Man3GlcNAc2 + Fuc]		21.1	27.5	ND
3	4931.9 ± 17.0	[NeuAc2Hex2HexNAc2+Man3GlcNAc2]		64.7	56.0	ND
				100	100	

ND: not determined, due to limited sample availability.

¹N-207 & 211, MW1458.735; ²N-241, MW1795.0112; ³N-184, MW2679.3923.

グロビンから PNGase-FN を使用して N 結合型糖鎖をハプトグロビンから切り出し、切り出した糖鎖を MALDI-TOF 質量分析計を用いて測定した。前立腺がん患者由来の血清と良性前立腺疾患や健康人由来の血清ハプトグロビンのに含まれている糖鎖構造を比較した結果を Fig. 13 に示した。良性前立腺疾患や健康人と比較して、前立腺がん患者由来のハプトグロビンは多くの構造からなる糖鎖修飾を受けていた。すなわち、がん化したことによりハプトグロビンの糖鎖修飾の割合が著しく上昇していた。

ハプトグロビンは、 α 鎖と β 鎖を含んでおり、 β 鎖の 4 つの N-グリコシル化部位 (Asn184, Asn207, Asn211 および Asn241) に種々の構造を有する糖鎖が結合した、糖タンパク質である。これまでの研究結果に基づいて血清ハプトグロビン β 鎖の糖鎖の状況を調べた。その結果、ハプトグロビン β 鎖は 4 つの N 結合型糖鎖を有しているこ

と、前立腺がんと良性前立腺疾患との間でハプトグロビン β 鎖の糖鎖に違いがあることが分かった。がん化したことによりハプトグロビン β 鎖の糖鎖修飾がフコシル化、シアル酸化および多岐化を著しく受けていた (Fig. 14, Table 3)。特に、前立腺がん患者で糖鎖修飾が顕著であった、Asn207 と Asn211 の質量分析の結果を Fig. 15 に示した。

7. 炎症性サイトカインの関与¹⁷⁻²⁰⁾

組織の損傷があるとマクロファージを中心に白血球の浸潤がおり、サイトカインが産生される。^{17,18)} 今日では炎症性浸出液のみでなく、腫瘍細胞にも白血球をひき寄せるサイトカインやケモカインがあることがわかってきた。^{19,20)} がん組織には好中球、マクロファージ、単球、樹状細胞などが存在し、これらの細胞から活性酸素、タンパク分解酵素、細胞膜貫通因子などのサイトカイン (interleukin-7 (IL-7), interleukin-8 (IL-8), etc.),

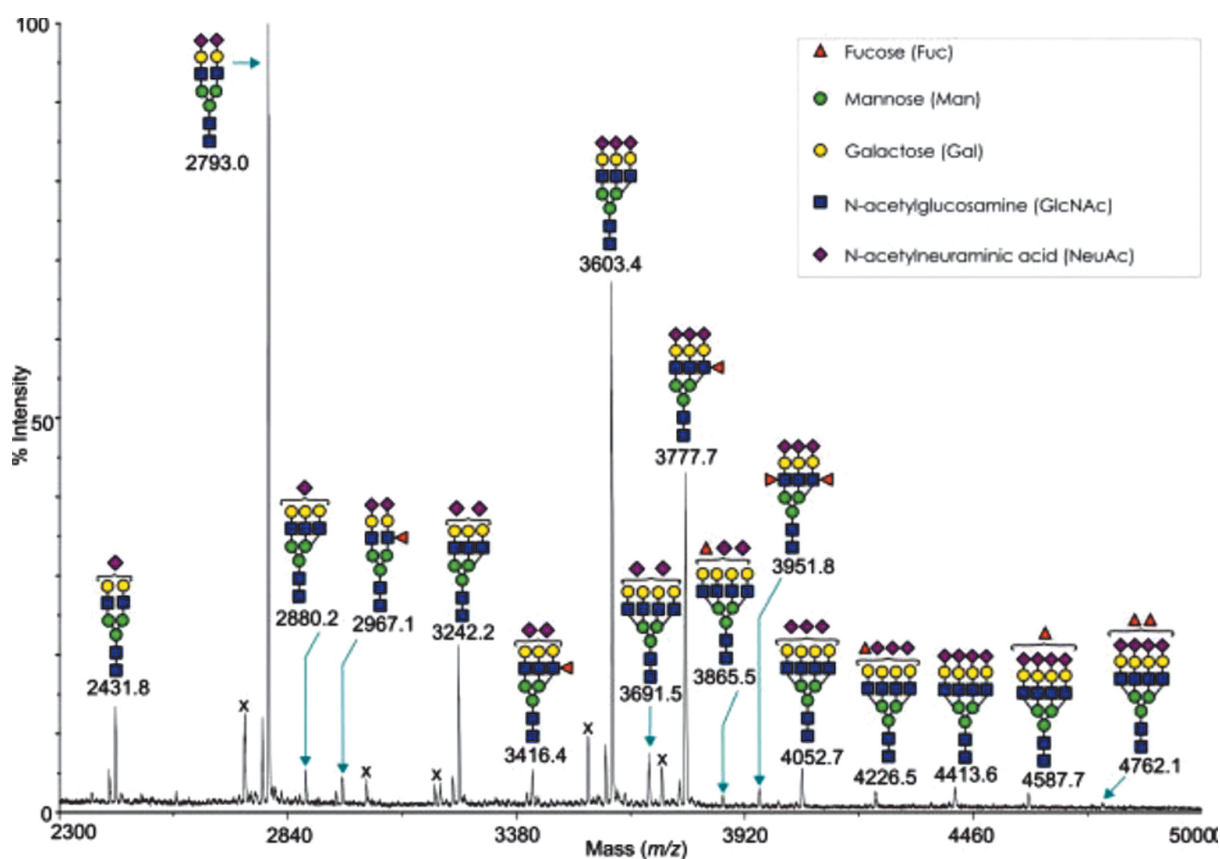


Fig. 15. MALDI-TOF spectra of prostate cancer haptoglobin N-glycans. Glycans were released by PNGase-F, permethylated, and subjected to Sep-Pak cleanup. Data from one of the fractions collected upon Sep-Pak cleanup are shown. Cartoon assignments are based on the precise fit between composition calculations and the m/z ($z=1$) ratio of the molecular ions detected. These cartoons represent the most likely structures taking into account the biosynthetic pathways and, when available, MALDI TOF/TOF MS/MS data. Each of the major peaks presents a minor peak distant by 14 mass units that corresponds to an under-methylated species. Ions labeled with a cross correspond to permethylation artifacts. (Fujimura T. *et al. Int J Cancer*, **122**, 39–49, 2008)

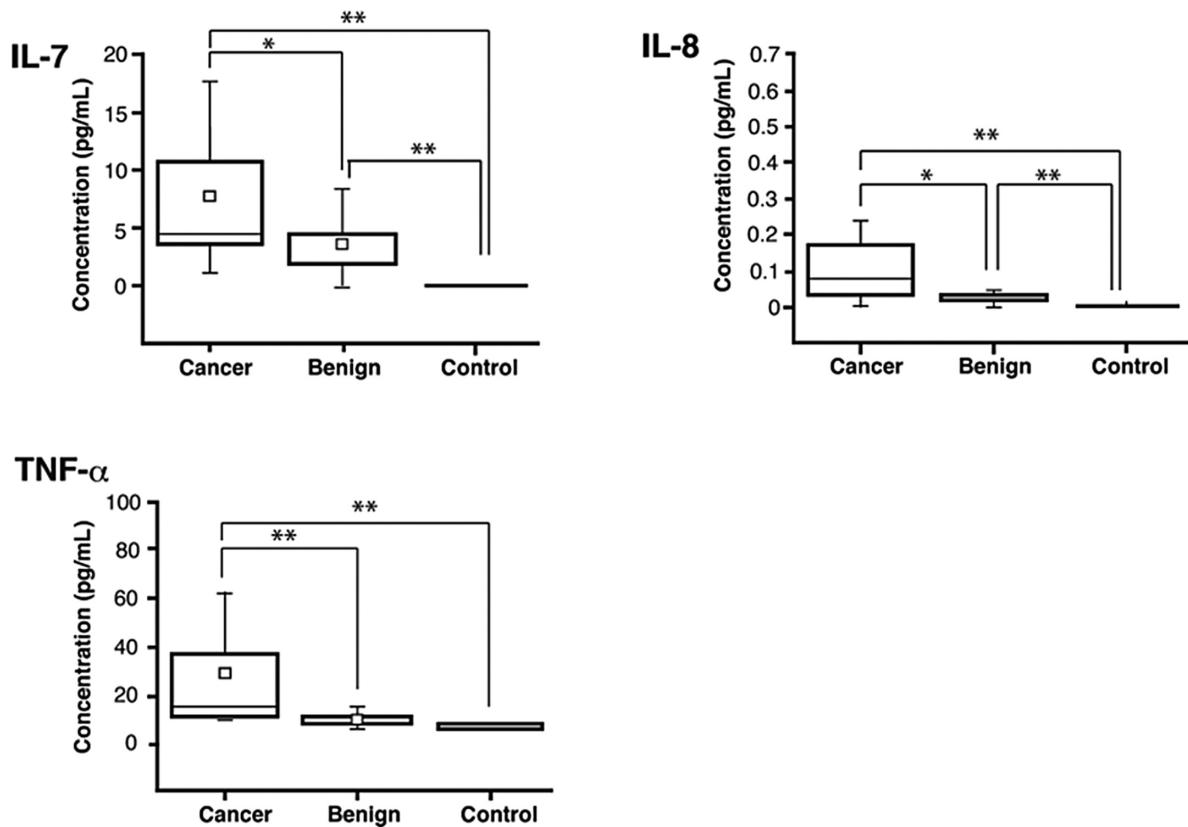


Fig. 16. Box graphs of (interleukin, IL) IL-7, IL-8, and tumor necrosis factor (TNF)- α concentrations in serum samples determined by Luminex 200 multiplex beads assay. The small open square represents an average. The horizontal line in the box represents the median value (Cancer: $n=17$, Benign: $n=17$, Normal: $n=5$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (Kazuno S. *et al. Cancer Med.*, 5, 137–1146, 2016)

tumornecrosis factor- α (TNF- α) や Interferons (IFNs) などを放出している。^{21,22)} 研究が進むにつれて炎症性細胞から放出される各種のサイトカイン、ケモカインなどががん細胞にも存在し、細胞増殖をめぐる複雑に絡み合ってきた。²³⁻²⁵⁾ そこで、前立腺がんにおける炎症性サイトカインの関与を検討した (Fig. 16)。マルチプレックスアッセイキットを用いて、ヒト・サイトカイン/ケモカイン 41 種類を同時に測定した。

良性前立腺疾患や健常人と比較して、前立腺がん患者血清由来の IL-7, IL-8, および TNF- α が優位に上昇していた。前立腺がんにおいても炎症性サイトカインの上昇が関与していることが示された。

8. まとめと考察

モノクローナル抗体 RM2 は、そもそもジシアロガングリオシドに対して確立され、糖鎖抗原 (β 1,4-GalNAc-disialyl Lc4) を認識することが判明した。本研究において、我々は RM2 が、ハプトグロビン β 鎖にも反応することを見いだした。さら

に、RM2 は前立腺がん患者血清由来のハプトグロビン β 鎖により選択的に反応した。ハプトグロビン β 鎖の量的な変化に加えて質的な変化が前立腺がんと良性前立腺疾患との間における RM2 反応の有意な違いの根拠であることが示唆された。本研究では、血清ハプトグロビン β 鎖の糖鎖の状況を調べた。その結果、ハプトグロビン β 鎖は 4 つの N 結合型糖鎖の他、わずかながら O 結合型糖鎖を有していること、前立腺がんと良性前立腺疾患との間でハプトグロビン β 鎖の糖鎖に違いがあることを見いだした。しかしながら、RM2 により認識される糖鎖抗原 (RM2 抗原: β 1,4-GalNAc-disialyl Lc4) は、ハプトグロビン β 鎖の N 結合型糖鎖上には検出されなかった。前立腺がんにおけるハプトグロビン β 鎖の糖鎖修飾の著しい上昇のメカニズムとして以下のようなことが考えられる (Fig. 17)。²⁶⁾ 身体的ダメージ (がんなど) を受けた場合、炎症の急性期に血中に増加するタンパク質として、acute phase protein (APP: 急性期タンパク質) があり、ヒトでは、CRP (C-reactive protein), SAA

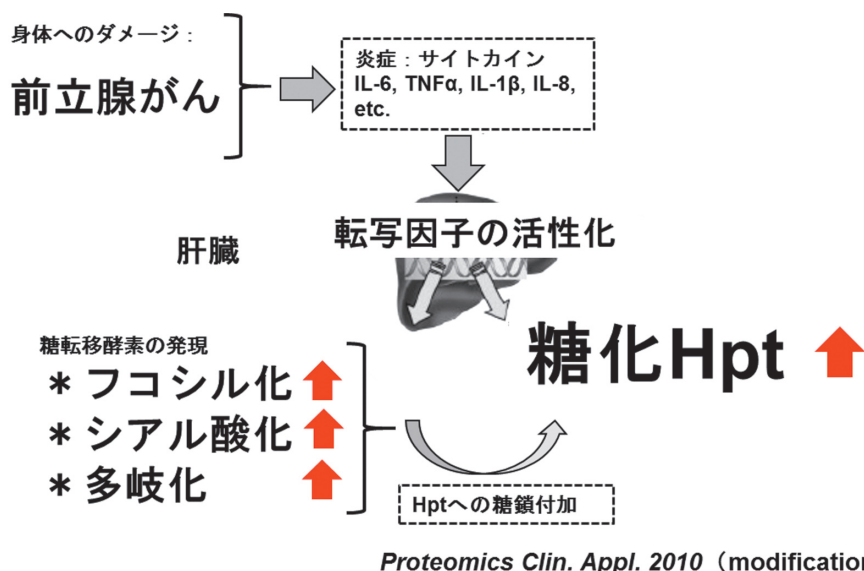


Fig. 17. Haptoglobin (Hpt) changes in inflammation and malignant diseases. The serum levels of Hpt are modified as a response to several body disturbances that initiate the acute-phase response. The released inflammatory cytokines also modify the glycosylation machinery of hepatocytes and several glycosyltransferases may alter their expression levels, which lead to changes in Hpt glycosylation. Encircled Hpt can modify their glycosylation in inflammation and malignant diseases. Tumour-associated glycan changes were fucosylation, sialylation, bi-antennary and tri-antennary. (Peracaula R. et al. *Proteomics Clin Appl.*, 4, 426–431, 2010)

(serum amyloid A) が最も鋭敏に反応し、12 時間以内に血中に増加する。次いで、フィブリノーゲン、ハプトグロビン、 α 1-アンチトリプシン、 α 1-アンチキモトリプシン、ASP (acid soluble glycoprotein) などが上昇し、やや遅れてセルプラスミン、補体 C3 が上昇してくる。組織の損傷があるとマクロファージを中心に白血球の浸潤が起こり、サイトカインと総称される活性タンパク質が産生される。これらサイトカインや腫瘍壊死因子 (TNF) は T-cell の活性化、発熱などの生物学的活性を有し、肝臓を刺激して APP を誘導する。APP は、臨床的に最も利用され、炎症、悪性腫瘍などの組織損傷をきたす疾患の有無、疾患の重症度、治療効果、予後の判定などに用いられる。前立腺がんにおいて RM2 抗体が強く反応したハプトグロビン β 鎖は、がんにより産生された炎症性サイトカインが肝臓を刺激して (転写因子の活性化) ハプトグロビンの産生が誘導され、それに伴う糖転移酵素の発現によりハプトグロビン β 鎖の糖鎖修飾の増加によるものであると考えられる。それを指示する結果として、質量分析の解析によりハプトグロビン β 鎖のフコシル化、シアル酸化および多岐化が確認された (Fig. 13, 14, 15, Table 3)。本研究で用いた患者血清は、PSA 値 < 10 ng/mL の男性である。ハプトグロビン β 鎖の糖鎖

修飾の増減を調べることはグレーゾーンといわれる 4–10 ng/mL の前立腺がん患者と良性前立腺疾患を区別できる可能性を示す。すなわち、前立腺がんの血清腫瘍マーカーとしてハプトグロビン β 鎖の糖鎖修飾の増減を指標にすることは、現在用いられている PSA 値を補完する腫瘍マーカーとして期待される。

ハプトグロビンの糖鎖修飾における腫瘍マーカーの可能性は、他のがんでも報告されており、ハプトグロビンの糖鎖修飾をターゲットとする腫瘍マーカーとしての広がり可能性を示している。²⁷⁻³⁴⁾

謝辞 本総説は 2016 年 10 月 29 日に開催された東北医科薬科大学生涯教育講演会における講演内容の一部をまとめたものである。

REFERENCES

- 1) Wang MC., Valenzuela LA., Murphy GP., Chu TM., *Invest Urol.*, **17**(2), 159–163 (1996).
- 2) Kuriyama M., Wang MC., Papsidero LD., Killian CS., Shimano T., Valenzuela L., Nishiura T., Murphy GP., Chu TM., *Cancer Res.*, **40**(12), 4658–4662 (1980).
- 3) Catalona WJ., Smith DS., Ratliff TL., Dodds KM., Coplen DE., Yuan JJ., *N Engl J Med.*, **324**(17),

- 1156–1161 (1991).
- 4) Stenman UH., Leinonen J., Alfthan H., Rannikko S., Tuhkanen K., Alfthan O., *Cancer Res.*, **51**(1), 222–226 (1991).
- 5) Christensson A., Björk T., Nilsson O., Dahlén U., Matikainen MT., Cockett AT., Abrahamsson PA., Lilja H., *J Urol.*, **150**(1), 100–105 (1993).
- 6) Christensson A., Lilja H., *Eur J Biochem.*, **220**(1), 45–53 (1994).
- 7) Pettersson K., Piironen T., Seppälä M., Liukkonen L., Christensson A., Matikainen MT., Suonpää M., Lövgren T., Lilja H., *Clin Chem.*, **41**(10), 1480–1488 (1995).
- 8) Saito S., Levery SB., Salyan ME., Goldberg RI., Hakomori S., *J Biol Chem.*, **269**(8), 5644–5652 (1994).
- 9) Ito A., Levery SB., Saito S., Satoh M., Hakomori S., *J Biol Chem.*, **276**(20), 16695–16703 (2001).
- 10) Saito S., Egawa S., Endoh M., Ueno S., Ito A., Numahata K., Satoh M., Kuwao S., Baba S., Hakomori S., Arai Y., *Int J Cancer*, **115**(1), 105–113 (2005).
- 11) 斎藤誠一, 額川 晋, 伊藤明宏, 荒井陽一, 臨床泌尿器科, **59**(13), 977–989 (2005).
- 12) Saito S., Orikasa S., Ohyama C., *Int J Cancer*, **49**, 329–334 (1991).
- 13) Hakomori S., *Curr Opin Immunol*, **3**, 646–653 (1991).
- 14) diSant'Agnese PA., *Cancer*, **70**, 254–268 (1992).
- 15) Saito S., Murayama Y., Pan Y., Taima T., Fujimura T., Murayama K., Sadilek M., Egawa S., Ueno S., Ito A., Ishidoya S., Nakagawa H., Kato M., Satoh M., Endoh M., Arai Y., *Int J Cancer*, **123**, 633–640 (2008).
- 16) Fujimura T., Shinohara Y., Tissot B., Pang P., Kurogochi M., Saito S., Arai Y., Sadilek M., Murayama K., Dell A., Nishimura S., Hakomori S., *Int. J. Cancer*, **122**, 39–49 (2008).
- 17) Kazuno S., Furukawa J., Shinohara Y., Murayama K., Fujime M., Takashi U., Fujimura T., *Cancer Med.*, **5**(6), 1137–1146 (2016).
- 18) Balkwill F., Mantovani A., *Lancet*, **357**, 539–545 (2001).
- 19) Dvorak, H. F., *N. Engl. J. Med.*, **315**, 1650–1659 (1986).
- 20) de Visser KE., Eichten A., Coussens LM., *Nat Rev Cancer*, **6**(1), 24–37 (2006).
- 21) Alberto M., Cancer-related inflammation, *Nature*, **454**, 436–444 (2008).
- 22) Lisa C., Zena W., Inflammation and cancer, *Nature*, **420**, 860–873 (2002).
- 23) Seth RN., *Yale journal of biology and medicine*, **79**, 123–130 (2006).
- 24) Kuper H., Adami HO., Trichopoulos D., *J Intern. Med.*, **248**, 171–183 (2000).
- 25) Wahl L., Kleinman HK., *J Natl Cancer Inst.*, **90**(21), 1583–1584 (1998).
- 26) Peracaula R., Sarrats A., Rudd PM., *Proteomics Clin Appl.*, **4**(4), 426–431 (2010).
- 27) Ang I. L., Poon T. C., Lai P. B., Chan A. T., Ngai S. M., Hui A. Y., Johnson P. J., Sung J. J., *J Proteome Res.*, **5**(10), 2691–2700 (2006).
- 28) Matsumoto H., Shinzaki S., Narisada M., Kawamoto S., Kuwamoto K., Moriwaki K., Kanke F., Satomura S., Kumada T., Miyoshi E., *Clin Chem Lab Med.*, **48**, 505–512 (2010).
- 29) Miyoshi E., Moriwaki K., Nakagawa T., *J Biochem.*, **143**(6), 725–729 (2008).
- 30) Nakano M., Nakagawa T., Ito T., Kitada T., Hijioka T., Kasahara A., Tajiri M., Wada Y., Taniguchi N., Miyoshi E., *Int J Cancer.*, **122**(10), 2301–2309 (2008).
- 31) Narisada M., Kawamoto S., Kuwamoto K., Moriwaki K., Nakagawa T., Matsumoto H., Asahi M., Koyama N., Miyoshi E., *Biochem Biophys Res Commun.*, **377**(3), 792–796 (2008).
- 32) Okuyama N., Ide Y., Nakano M., Nakagawa T., Yamanaka K., Moriwaki K., Murata K., Ohigashi H., Yokoyama S., Eguchi H., Ishikawa O., Ito T., *Int J Cancer.*, **118**(11), 2803–2808 (2006).
- 33) Ueda K., Katagiri T., Shimada T., Irie S., Sato T. A., Nakamura Y., Daigo Y., *J Proteome Res.*, **6**(9), 3475–3483 (2007).
- 34) Zhao J., Patwa T. H., Qiu W., Shedden K., Hinderer R., Misek D. E., Anderson M. A., Simeone D. M., Lubman D. M., *J Proteome Res.*, **6**(5), 1864–1874 (2007).