

表面プラズモン共鳴励起増強蛍光分光 (SPFS) を用いた 卵巣癌糖鎖マーカの開発

Development of Novel Glycoprotein Biomarker for Ovarian Cancer Diagnosis with
Surface Plasmon field-enhanced Fluorescence Spectroscopy (SPFS)

乾 智 恵* 金子 智 典* 彼 谷 高 敏*
Chie INUI Tomonori KANEKO Takatoshi KAYA

要旨

医療財政破綻に対する社会的懸念がある中、医療費増加の歯止めの見通しは未だない。癌罹患者および癌医療費は年々増加傾向であり、奏効率の改善と癌医療費削減は国家的課題である。

卵巣癌は他癌と同様に、早期発見が非常に重要である。現在最も汎用的に利用されている経膈超音波検査は、低侵襲性の優れた検査方法であるものの、一般的な画像検査による診察では良性の卵巣腫瘍との区別が難しいため、病理検査により診断が確定されている。このため、簡便で低侵襲、かつ高い正診率を有する検査方法の確立は非常に重要な課題となっている。

この様な課題に対して、特定遺伝子変異を検出することで、効率的に罹リスクを把握することが可能となってきたおり、大きな期待が持たれている。その一方で、高罹患リスクに対するきめ細やかなモニタリングの重要性がより一層高まっており、低侵襲な癌マーカー血液検査の癌特異性向上にも大きな期待が寄せられている。

近年の分子生物学の進展により、ある種の細胞では癌化に伴い、糖鎖構造が変化することが知られており、癌を特定するマーカーの一つとして期待されている。

本稿では、卵巣癌で発現上昇が確認されているヒト精巣上体タンパク4 (Human Epididymis protein 4, HE4) に注目し、癌化に伴うHE4糖鎖構造変化を解析することで、卵巣癌糖鎖バイオマーカーを開発した。また、従来技術では感度面で定量が困難なHE4糖鎖構造変化に対し、高感度SPFS技術を用いることでHE4糖鎖SPFS測定系を開発した。少数の臨床検体を対象とした試験結果から高い正診率を有する新たな癌マーカー血液検査としての可能性が示唆されたので併せて報告する。

Abstract

There is a social apprehension in national healthcare finance, but there is no prospect to stop increase in medical expenses. Cancer patients and cancer medical treatment expenses are increasing yearly, and improvement of efficiency and reduction in cancer medical expenditure are national issues.

Ovarian cancer, like other cancers, needs to be diagnosed in the early stage. However, the transvaginal ultrasonography is the currently most commonly used examination but has an issue that it is difficult to distinguish cancer from a benign ovarian tumor, and the diagnosis is confirmed by a pathological examination. Therefore, a simple, minimally invasive, highly accurate examination method is required to be established. To address such an issue, it is highly expected to grasp the patient's risk by detecting specific gene mutations. On the other hand, the patient diagnosed to have a high risk needs to be monitored carefully, and improvement of specificity of minimally invasive blood tests for cancer markers are strongly expected.

Carbohydrate chains have two main function both participating in cell recognition and adhesion. And carbohydrate chain is well known to change from normal cells to cancer cells and expected to utilize as the novel biomarker. In this paper, we focus on HE4 (Human Epididymis protein 4), whose upregulation is confirmed in ovarian cancer, and have developed a glycoprotein biomarker for ovarian cancer by analyzing a change in the structure of the carbohydrate chain of HE4 with cancerization. In addition, we have developed an HE4 carbohydrate chain SPFS measurement system using a high sensitivity SPFS technology for detecting a change in an HE4 carbohydrate chain structure, whose change is difficult to highly sensitively quantify with a conventional technique. From a test result of a small number of clinical specimens, there was suggested a possibility as a new cancer biomarker in the blood test.

* 開発統括本部 バイオ要素技術開発室

1 背景

卵巣とは、子宮の両側に1つずつある親指大の臓器であり、女性ホルモンの分泌、受精に必要な卵子の成熟、排卵といった機能を担っている。卵巣癌はこの卵巣にできる悪性腫瘍のことであり、卵巣癌の原因は遺伝的要因や環境要因など複数あると考えられている。2012年の卵巣癌診断者数は世界で239,000人、死亡者数は152,000人に上り、卵巣癌は死亡率の高い癌である。最新の2035年予測では、卵巣癌診断者数は55%増加、死亡者数は67%増加すると推定されており、奏効率の改善と癌医療費の抑制は大きな課題となっている¹⁾。卵巣癌に限らず癌の罹患に伴う、受療負担や早期死亡による労働損失、および医療費高騰による経済的負担の増加は、近年社会課題となっており、卵巣癌も例外とはなっていない。本邦における、卵巣癌を含む婦人科系疾患を抱える女性の経済的損失は、年間6.37兆円と試算されており、本邦経済に与える影響も少なくない²⁾。

卵巣は骨盤の奥深くに存在し、卵巣癌罹患時の初期症状が乏しいことから、自覚症状が認識できた時点では、進行癌となっているケースが少なくない。ステージIII、IVのような進行癌では、初回治療の奏功例においても2年以内に55%、5年以内に70%以上の症例が再発となることが報告されている。5年生存率はステージI、IIの90%、60%に対して、ステージIIIで30%、ステージIVでは12%と極めて低いため、早期発見が重要である。また近年では、妊孕性の温存や治療による早期閉経に伴うホルモン分泌異常、継続的な更年期障害症状といったQOLの低下も若年層、働く女性にとって大変重要な課題であり、有効な検診技術の開発が求められている。

卵巣癌の検診には、内視鏡検査や直接細胞診の適応が困難なことから、CT・経膈超音波法・MRI等の画像検査や癌マーカー検査が一般的な検査方法として検討されている。画像検査は非侵襲的で優れた方法ではあるものの、必ずしも簡便ではなく、卵巣腫瘍の良性と悪性の鑑別が難しいことから、追加の病理検査や不要な外科手術が実施される可能性があり、受診者に過剰な不利益が生じるケースがある。また、既存の卵巣癌マーカーとしては、ヒト精巣上体タンパク4 (Human Epididymis protein 4, HE4: 25 kDa) およびCA125が良く知られている。HE4は癌検出感度の面でやや課題があるものの、癌特異性に優れた卵巣癌マーカーである。一方、CA125は癌検出感度の面で優れているものの、月経や良性の卵巣腫瘍である子宮内膜症でも高値化することから特異性（偽陽性）が課題となっている。最近では、これら2つの癌マーカーを組み合わせた新たな指標として卵巣悪性腫瘍推定値 (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm: ROMA) が開発され、卵巣癌診断の有用な指標としてFDA承認された。しかし、ROMAを用いた検査においても、閉経前の女性に対しては癌検出感度が低下する傾向が確認されている³⁾。このような状況から現状では無症候性の一般集

団に対して上記検査は推奨されておらず、有効な卵巣癌の早期発見には検診への応用が可能となる精度の高い新たな癌マーカーの探索が求められている。

一方、卵巣癌においては家族歴やBRCA1/2などの遺伝子変異と、高い癌罹患リスクの相関性が認められており、遺伝子検査により罹患リスクの把握が可能となる。本邦の卵巣癌におけるBRCA1/2遺伝子変異の保有率は14.7%であり、遺伝子変異を有する人は比較的若年で卵巣癌を含む様々な癌を発症する傾向にある。このような遺伝子変異キャリアに対して、きめ細やかな定期的な癌検診を行うことは、効率的な早期癌の検出につながると期待されており、卵巣癌全体の奏効率改善やQOL向上に繋がるものと考えられている。

コニカミノルタでは2019年度より個別化医療を志向した遺伝子診断サービスの提供を開始している。遺伝子診断により癌の罹患リスクを把握することで、受診者一人一人にあった検診項目や検診間隔などを提案するオーダーメイド検診の実現を目指している。本稿では、リスク評価の後に行うべき精度の高い癌マーカーの探索に関する取り組みを紹介する。

糖鎖は、核酸、タンパク質に次ぐ第三の生命鎖とも呼ばれており、タンパク質や脂質に結合して存在し、生体内でとても重要な役割を担っている。細胞の発現する糖鎖は発生、分化の過程で顕著に変化することが知られており、性質の異なる細胞ではそれぞれ特徴的な糖鎖構造を発現する。癌においても同様で、正常細胞から癌細胞になると、細胞表面の糖鎖の構造が大きく変化し、癌特異的な糖鎖の発現が増加することが報告されている。そのため、糖鎖は癌を特定するとともに悪性度を反映するバイオマーカーとしても有力な分子と考えられている。

本稿では、卵巣癌腫瘍マーカーとして知られるHE4とその分子内に存在する糖鎖の構造に注目することで、卵巣細胞の癌化とHE4糖鎖変化について明らかにした。また、従来技術では測定感度面で定量が困難なHE4糖鎖構造変化に対し、高感度SPFS技術を用いることで簡便にHE4糖鎖の定量が可能な測定系を開発した。極少数の臨床検体を対象とした試験において、既存腫瘍マーカーに対して高い正診率を有することが確認され、新たな癌マーカー血液検査としての可能性が示唆されたので併せて報告する。

2 研究結果と成果

2.1 HE4糖鎖バイオマーカーの開発

HE4は1本のN型糖鎖を有することが知られている⁴⁾。しかし、卵巣癌細胞および非卵巣癌組織から分泌されるHE4上の糖鎖構造の差異や糖鎖バイオマーカーとしての有効性に関する報告例は皆無であり、科学的に未解明であった。そこで我々は、卵巣癌細胞株(OVSAHO)から分泌されるHE4と、健常者血清中(Normal Human Serum, NHS)に見られるHE4分子上の糖鎖構造解析を実施し

た。本邦における卵巣癌の組織型別発生頻度は、漿液性腺癌36%、粘液性腺癌11%、類内膜性腺癌17%、明細胞性腺癌24%である⁵⁾。本検討では、罹患者数が比較的多いことに加え、BRCA1/2遺伝子変異キャリアにおいて漿液性卵巣癌に多く罹患することが知られていることから⁶⁾、漿液性卵巣癌細胞株を対象にHE4分子上の糖鎖構造をレクチンアフィニティークロマトグラフィー法により解析した。レクチンは糖と特異的に結合するタンパク質の総称であり、糖鎖解析のツールとして利用されている⁷⁾。

Fig. 1 に、漿液性卵巣癌細胞株 (OVSAHO) と健常者血清を対象としたHE4分子上の糖鎖構造の含有比率の解析結果を示す。

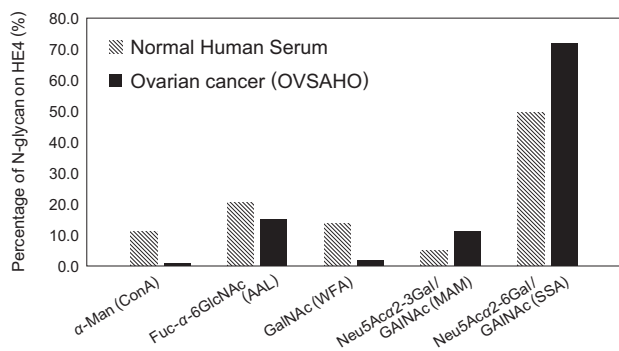


Fig. 1 Proportion of HE4 carbohydrate chain structure contained in each of NHS (Normal Human Serum) and ovarian cancer cell culture supernatant.

Each parenthesized word indicates lectin used for each lectin column. The content ratios of SA2,3-HE4, and SA2,6-HE4 are increased in ovarian cancer cell strain.

解析結果の比較から、Neu5Acα2-3Gal/GalNAc-HE4 (SA2,3-HE4) および、Neu5Acα2-6Gal/GalNAc-HE4 (SA2,6-HE4) 等のシアル酸修飾糖鎖の含有比率が漿液性卵巣癌細胞株由来のHE4糖鎖構造として大きく増加していることが明らかとなった。また、高マンノース型を有するHE4 (α-Man-HE4) やβ-N-アセチルガラクトサミン残基を有するHE4 (GalNAc-HE4) の含有率は、低下傾向が認められ、非卵巣癌組織と卵巣癌細胞 (悪性) から分泌されるHE4分子上の糖鎖構造の比率が大きく異なることが明らかとなった。そこで本稿では、上記解析で見出された糖鎖構造の内、特に、SA2,3-HE4構造に着目し、SPFS測定系開発を実施した。

2.2 表面プラズモン共鳴励起増強蛍光分光 (SPFS)

SPFSは、表面プラズモン共鳴現象を用いた高感度蛍光検出技術であり、血液検査システムの基盤技術として製品開発中である。SPFSシステムは、デスクトップサイズの小型測定装置とディスプレイな試薬カートリッジから構成されている (Fig. 2)。我々は、これまで本システムを用いて、様々なタンパク質およびタンパク質上の糖鎖検出を実現しており、超高感度心筋トロポニンI測定や迅速高感度PSAテスト、PSA糖鎖 (PSA-Gi) 定量への応用を報告している^{8) 9) 10) 11)}。

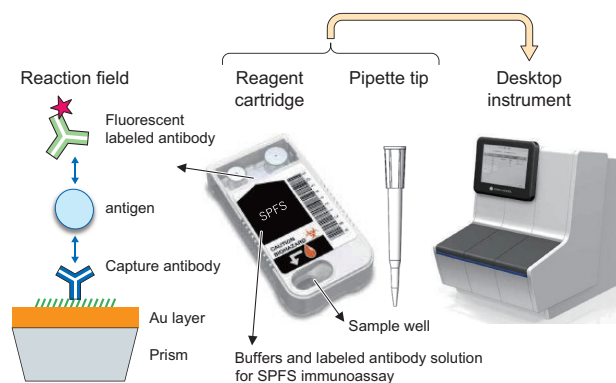


Fig. 2 Compact desktop SPFS measurement device including contamination-free pipet-disposable tip and reagent.

2.3 SA2,3-HE4の測定法と定量検出性能

SA2,3-HE4のSPFS測定は、抗HE4抗体と、SA2,3糖鎖構造に特異的に結合するMAM (Maackia amurensis) レクチンによる、レクチンサンドイッチ系を採用した (Fig. 3 (a))。まず、一連の検討で使用した標準抗原として漿液性卵巣癌細胞株の培養上清から抽出精製したSA2,3-HE4を準備し、基本分析性能を評価した。Fig. 3 (b) に、SA2,3-HE4のSPFS測定における検量線を示す。検量線から見積もられた検出下限値は0.2pM (4.0pg/ml) であった。本稿2.1で示したレクチンカラムの結果からNHSにおけるSA2,3-HE4の濃度は1.2pM (HE4濃度25pM, そのうち4.9%がSA2,3糖鎖HE4) であり、今回構築したSA2,3-HE4のSPFS測定系は、SA2,3-HE4濃度が低いと推定される健常者検体の測定においても、十分な検出感度があることが確認された。加えて、血清検体に対して添加回収、希釈直線性の試験を行い、血清マトリックス中においても正確な測定結果が得られることも確認した (data not shown)。

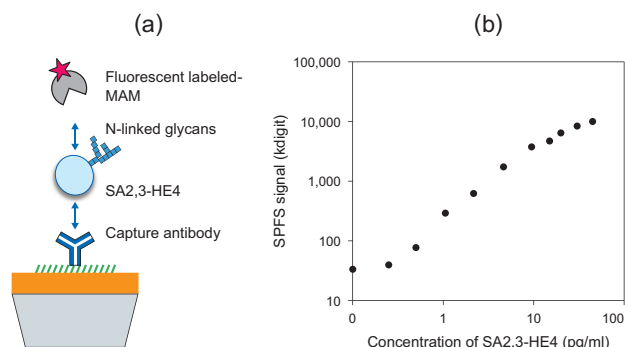


Fig. 3 (a) Lectin immunoassay system.

For SPFS measurement of SA2,3-HE4 was used a lectin sandwich assay using anti-HE4 antibodies and MAM (Maackia amurensis) which binds specifically to SA2,3 carbohydrate chain structure.

(b) Calibration curve of SA2,3-HE4 measured using a standard antigen. After measuring a blank sample twice, the lower detection limit was calculated using the formula: Lower detection limit = 3.3 (standard deviation of measurement values of blank sample)/(inclination of calibration curve near lower detection limit).

The lower detection limit was estimated to be 0.2 pM (4.0 pg/ml).

2.4 卵巣癌鑑別性能評価

妊孕性温存やBRCA1/2遺伝子変異キャリアに対する検診への高い要求度を想定し、本検討においては50歳以下の検体クライテリアを設定し、本稿2.3で構築した測定法にてSPFS自動免疫測定装置を用い血中のSA2,3-HE4の濃度測定を行った。Table 1に今回評価対象とした37例の検体内訳を示す。Fig. 4には、全検体を対象としたSA2,3-HE4の測定結果を示す。

Table 1 The number of specimens of histological type used for the evaluation. Each parenthesized value represents the number of stage I or II patient specimens.

Normal	Benign	Serous	Clear	Mucinous	Endometrioid
8	8	8 (3)	2 (1)	6 (3)	5 (3)

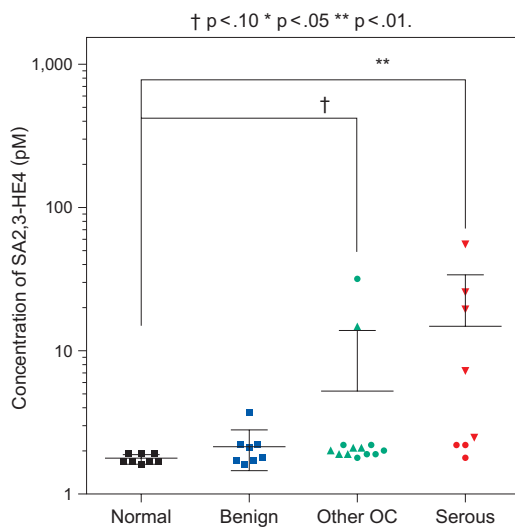


Fig. 4 SA2,3-HE4 concentration in specimens of NHS, benign tumors, serous ovarian cancer, and other histological types of ovarian cancer. Round shape shows SA2,3-HE4 concentration in specimens of stage I or stage II of ovarian cancer.

SA2,3-HE4 values were clearly higher in serous ovarian cancer than NHS. Other types of ovarian cancer (other OC) include ovarian cancer specimens of clear-cell type, mucinous type, and endometrioid type.

今回コントロール対象とした健常者検体のSA2,3-HE4濃度は1.6～1.9pMと極低濃度であり、良性検体においても1.6～3.7pMと健常者検体とほぼ同程度 ($p=0.974$)の低値であることが確認された。

一方、漿液性卵巣癌検体においては、1.8～55.9pMと健常者検体と比較して有意 ($p=0.001$) に高値傾向を示した。また漿液性以外組織型の卵巣癌検体においても、1.8～31.5pMと健常者と優位な差 ($p=0.054$) を示したことから、SA2,3-HE4が漿液性以外の組織型においても分泌されている、もしくはヘテロな癌組織を反映した結果と考えられ、卵巣癌バイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。漿液性卵巣癌のステージIおよびIIの検体においては、健常者と比較するとやや高濃度を示しているが、低濃度を示す結果となった点については、今後検体数を増やし解析を進めたい。

次に、Table 2に既存卵巣癌マーカー HE4やROMAとSA2,3-HE4の診断性能を比較した統計解析結果を示す。非癌検体（健常者検体と良性の卵巣腫瘍検体）と各卵巣癌検体群との診断性能評価を実施した。

統計解析にはMann-Whitney U法 (Graph pad prism ver. 6.07) を用い、Receiver Operator Characteristic (ROC) 曲線下面積 (Area Under the Curve, AUC) を求めた。

Table 2 AUC (Area Under the Curve), which is a value representing diagnostic performance of biomarker. AUC was analyzed using Mann-Whitney-U test. SA2,3-HE4 shows a higher AUC value than total HE4 and ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm).

	Total HE4	ROMA	SA2,3-HE4
(A) Ovarian cancer	0.731	0.741	0.819
(B) Serous	0.820	0.832	0.902
(C) Other tissue type ovarian cancer	0.676	0.685	0.767
(D) Stage I, II ovarian cancer	0.606	0.613	0.763

健常者および良性腫瘍検体に対する卵巣癌検体 (A) の鑑別性能 AUC (p value) は、HE4, ROMA および SA2,3-HE4においてそれぞれ、0.731 (0.017), 0.741 (0.012), 0.819 (0.001) であり、SA2,3-HE4が既存マーカーと比較して卵巣癌鑑別能の点で優れていることが示唆された。特に、本稿2.1で糖鎖構造の解析を行った細胞と同様の組織型である漿液性卵巣癌検体 (B) においては、SA2,3-HE4はAUC 0.902 ($p=0.001$) と HE4 0.820 (0.01), ROMA 0.832 (0.007) と比較しても高い鑑別性能を示すバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。一方、漿液性以外の組織型 (明細胞性, 類内膜性, 粘液性) 卵巣癌検体群 (C) においては、AUC 0.767 ($p=0.012$) であり、既存マーカー HE4 (AUC=0.676, $p=0.113$), ROMA (AUC=0.685, $P=0.09$) と比較すると鑑別性能は向上しているが、漿液性卵巣癌におけるAUC 0.902と比較すると鑑別性能に劣る結果となった。

これはSA2,3-HE4が、漿液性卵巣癌細胞株由来のHE4糖鎖解析より見出されたことが影響している可能性がある。またこの結果は、細胞の特徴 (分化度, 組織型) を反映するといわれている糖鎖変化を、本稿で実施した糖鎖バイオマーカー探索ステップにより評価し、他の組織型や他癌を対象とした糖鎖バイオマーカー開発が可能であることを示唆していると考えられる。

また、卵巣癌罹患初期であり比較的自覚症状が乏しいとされるステージI, IIの卵巣癌 (D) に対する鑑別性能向を比較した結果、SA2,3-HE4, HE4, ROMAのAUC (P値) はそれぞれ、0.763 (0.024), 0.606 (0.384), 0.613 (0.351) であり、SA2,3-HE4が優れた鑑別性能を示した。ステージIおよびIIの卵巣癌 (D) と、非癌検体 (健常者と良性腫瘍検体) のSA2,3-HE4測定値分布をFig. 5に示す。ステージIおよびIIの卵巣癌患者の測定値分布は、健常者とは優位差 ($p=0.023$) が認められているが、

良性腫瘍の分布とは、一部重なりが認められている。良性卵巣腫瘍罹患者のうち特にチョコレート嚢胞罹患者については、卵巣癌の罹患リスクが高くなることが知られている。SA2,3-HE4 高値の良性腫瘍検体に対しては、病理組織等との比較で予後の詳細な解析を行うことで、SA2,3-HE4のマーカーとしての特徴を見極めていきたい。

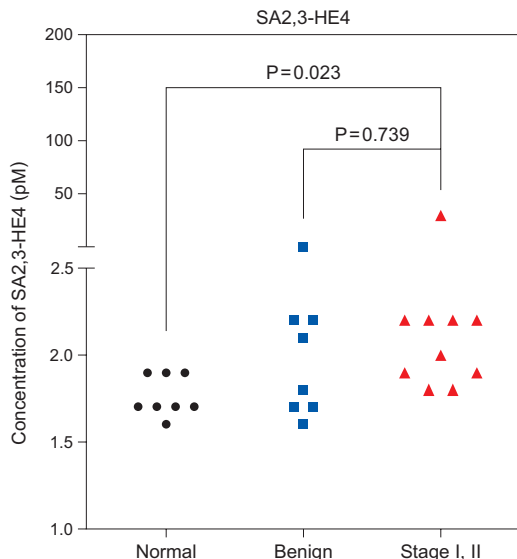


Fig. 5 SA2,3-HE4 concentration of NHS, benign tumors, and stage I, II ovarian cancer patients.

Dunn's test was used for the analysis. The distribution of measurement values of stage I, II ovarian cancer patients is significantly different ($p = 0.023$) from that of healthy people, but it partially overlaps the distribution of benign tumors.

3 まとめ

卵巣癌の早期診断に向けた、簡便、低侵襲的、かつ高い正診率を有する血液検査方法として、糖鎖変化を対象としたバイオマーカー候補としてSA2,3-HE4を同定し、SPFS測定法を構築し検体評価を実施した。特に50歳以下の検体において、今回検討したSA2,3-HE4糖鎖バイオマーカーは、少数例の評価であるが既存マーカーよりも高い診断性能を有する可能性が確認できた。特に本稿において診断性能の向上に向けてバイオマーカーの開発に取り組んだ、漿液性の卵巣癌患者に対しては、秀でた鑑別能力を有していた。早期卵巣癌患者に対しても癌検出感度の向上が示されたことは、卵巣癌早期発見に寄与できる可能性を示唆している。今後は、症例数を増やし、SA2,3-HE4糖鎖バイオマーカーの特徴および診断性能を評価していく必要がある。特に、SA2,3-HE4は漿液性卵巣癌において高い診断性能を有する可能性があり、漿液性卵巣癌罹患リスクが高いBRCA1/2遺伝子変異キャリアに対するSA2,3-HE4の診断性能は今後確認すべき点である。今後評価検体を増やし、SA2,3-HE4のバイオマーカーとしての有効性が確認できれば、卵巣癌の早期診断ツールとなり、奏効率改善にも寄与できる可能性があると考えられる (Fig. 6)。

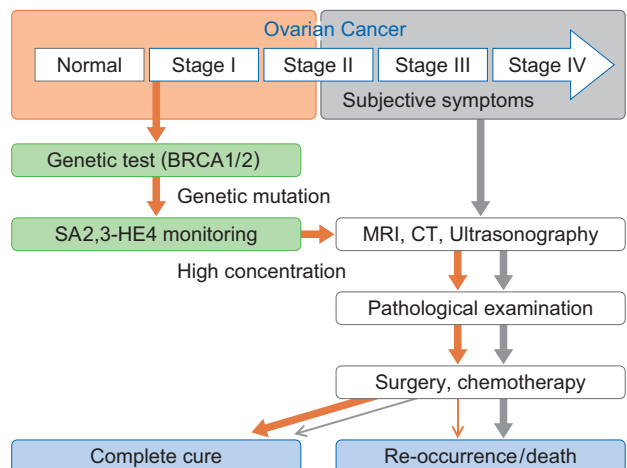


Fig. 6 Current ovarian cancer diagnostic procedure and ovarian cancer diagnostic procedure expected in the future.

In the expected procedure, a full recovery rate is expected to be higher than in the current procedure.

一方、漿液性以外の組織型（明細胞性、粘液性、類内膜性）における鑑別性能向上は今後の課題として残る。本稿で報告したバイオマーカー開発プロセスは、上記組織型や他癌においても、適応可能と考えている。また、遺伝子変異や、画像との組み合わせによる診断も上記課題の解決方法の一つと考えられるため、これらを組み合わせた診断システムについて今後も検討を進めたい。

●参考文献

- 1) world ovarian cancer coalition atlas 2018
- 2) 平成24～25年度厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）分担研究報告書がんの罹患による労働損失の推計
- 3) Molina R et al. Tumour Biol. 32, 1087-95 (2011)
- 4) Drapkin R et al. Cancer Res. 65 (6), 2162-9 (2005)
- 5) 日本産科婦人科学会婦人科腫瘍委員会報告. 2012年患者年報. 日産婦誌 66, 1024-1038 (2014)
- 6) Hirasawa A et al. Oncotarget, 8 (68), 112258-112267 (2017)
- 7) Hitoi A et al. Gann. 75: 301-304 (1984)
- 8) 彼谷高敏, 松尾正貴, 石田賢治, 須田美彦, “表面プラズモン共鳴励起増強蛍光分光 (SPFS) を用いた高感度免疫測定システムの開発”, Konica Minolta Tech. Rep., Vol. 9, 95-98 (2012)
- 9) 寺田孝太郎, 大谷真紀子, 村山貴紀, 井出陽一, “表面プラズモン励起増強蛍光分光 (SPFS) を用いたバイオマーカー測定技術の救急医療への応用”, Konica Minolta Tech. Rep., Vol. 15, 8-11 (2018)
- 10) 金子智典, 彼谷高敏, 小島駿, 中村幸登, 須田美彦, “表面プラズモン励起増強蛍光分光 (SPFS) を用いた糖鎖マーカー定量による前立腺癌診断法の開発”, Konica Minolta Tech. Rep., Vol. 13, 73-78 (2016)
- 11) 村山貴紀, 岡田純, 彼谷高敏, 佐藤威文, “表面プラズモン共鳴励起増強蛍光分光 (SPFS) を用いた高感度PSA検査POCTシステムの開発” Konica Minolta Tech. Rep., Vol. 16, 104-108 (2019)