

奨励金No.1459

## 糖タンパク質を標的とした膵がん早期診断技術の開発

舘野 浩章

国立研究開発法人産業技術総合研究所 研究グループ長

### Development of early diagnosis technology of pancreatic cancer targeting glycoproteins

Hiroaki Tateno,

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Group Leader



膵癌の5年生存率は未だ10%未満であり、治療することが極めて難しい。膵癌を根治する唯一の方法は、膵癌を早期発見し、外科的切除することである。しかし早期膵癌を高感度に検出できる診断薬は存在しない。我々はグライコム解析の結果、膵癌から血液中に分泌される新たな膵癌関連糖鎖マーカーとしてrBC2LCN陽性SERPINA3 (BC2-S3)を発見した。BC2-S3は健常者や良性疾患患者と比べ膵癌患者で有意に高い値を示した。さらに既存の診断薬であるCA19-9と比べて切除可能な早期膵癌に高い診断能を示すことがわかり、実用化に向けて研究開発を進めてきた。

The five-year survival rate for pancreatic cancer is still less than 10%, making it extremely difficult to treat. The only way to cure pancreatic cancer is early detection and surgical resection. However, there is no diagnostic agent that can detect early-stage pancreatic cancer with high sensitivity. We discovered rBC2LCN-positive SERPINA3 (BC2-S3) as a novel pancreatic cancer-associated glycan marker secreted into the blood from pancreatic cancer by glycomic analysis. Furthermore, BC2-S3 showed higher diagnostic performance in resectable early-stage pancreatic cancer than CA19-9, an existing diagnostic agent, and we have been conducting research and development for practical use.

#### 1. 膵癌の医療課題

癌の治療が格段に進んだ現代では、癌全体として治る確率（5年生存率）は約60%に達している。しかし膵管上皮に発生する膵癌は例外で、未だ治る確率が10%未満の難治癌の代表である。膵癌の国内患者数は4.2万人、世界では約40-50万人である。膵癌を根治できる唯一の方法は早期膵癌を発見し、外科的切除することである。しかし早期（ステージI-II）に発見できるのは膵癌患者全体の約5-10%程度に過ぎない。早期膵癌は腫瘍が小さいために画像診断で検出することが難しい。さらにはCA19-9などの既存の診断薬も早期膵癌の検出率は50%以下と低い。外科的切除と補助療法に

より膵癌の5年生存率は44%にまで向上できることが報告されている。そのため切除可能な状態で発見することが膵癌根治の最大の課題となっている。

#### 2. 新たな膵癌関連糖鎖マーカー・BC2-S3の同定

正常組織に近い形態をもつ高分化型膵癌に発現する癌関連糖鎖マーカーは、早期膵癌のマーカーとして利用できるのではないかと仮説を立てた。そこでまずレクチンマイクロアレイを用いて各種膵がん細胞株の糖鎖プロファイル解析を行った。その結果、高分化型膵癌細胞株に高い反応性を示

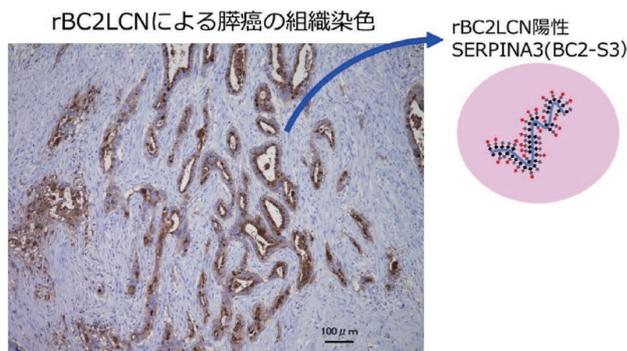


図1 BC2-S3は膵癌から血液中に分泌

すものの、低分化型膵癌細胞株や正常膵管細胞株には反応しないレクチン rBC2LCN を発見した (Shimomura et al. Mol Cancer Ther 2018, PCT/JP2016/079577)。rBC2LCN は 69 例の膵癌患者全例に強い反応性を示した (図 1)。rBC2LCN は H タイプ 3 (Fucα1-2Galβ1-3GalNAc) に極めて特異的に反応するレクチンである。実際に質量分析と液体クロマトグラフィーを用いて膵癌患者由来ゼノフラフト腫瘍の定量的糖鎖構造解析を行うと、H タイプ 3 (Fucα1-2Galβ1-3GalNAc) が確かに膵癌腫瘍で検出されることがわかった (Hasehira et al. BBRC 2021)。そのため H タイプ 3 は新たな膵癌関連糖鎖であると結論付けた。

rBC2LCN が反応性を示す H タイプ 3 陽性糖タンパク質が膵癌から血中に分泌されているのではないかと考え、rBC2LCN を捕捉と検出の両方に用いるレクチン-レクチンサンドイッチアッセイで健常者と膵癌患者血清の解析を行った。その結果、健常者と比べて膵癌患者血清に有意に高値を示した。そのため膵癌患者血清では H タイプ 3 陽性糖タンパク質が増加していることがわかった。次に LC-MS/MS 解析により rBC2LCN の糖タンパク質リガンドを一斉解析すると、そのうちの 1 種が SERPINA3 と呼ばれるセリンプロテアーゼ阻害剤であることがわかった。SERPINA3 は主に肝臓で発現していることから、免疫沈降とウエスタンブロット解析において、健常者でも膵癌患者でも同定度血清中に検出された。一方、rBC2LCN 陽性

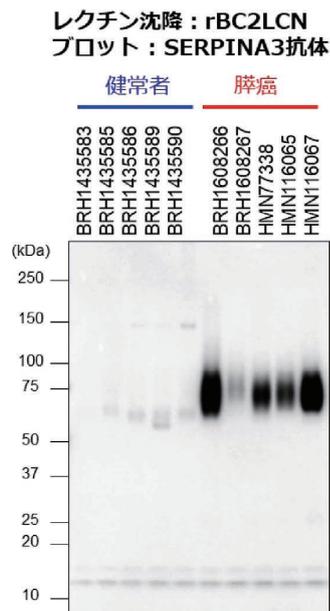


図2 BC2-S3は膵癌で特異的に検出

SERPINA3 (BC2-S3) は健常者では検出されず、膵癌患者血清でのみ検出された (図 2)。さらに BC2-S3 は正常膵癌では発現していないものの、膵癌で発現していることがわかった。そのため BC2-S3 は膵癌で発現し、血液中に分泌されていると考えられた。

### 3. BC2-S3 の診断能

BC2-S3 を測定するために rBC2LCN と SERPINA3 抗体を用いたレクチン ELISA を構築し、健常者、膵癌、その他癌 (胆管癌、大腸癌、食道癌、肝癌)、その他良性疾患 (胆嚢炎、慢性膵炎、他の膵疾患) を解析した (図 3)。BC2-S3 は健常者と比べて膵癌で有意に高値を示すことがわかった。BC2-S3 は良性疾患では低値を示した一方で、肝癌や胆管癌でも増加した。また BC2-S3 は術後に有意に低下したことから、腫瘍依存的であることを確認できた。CA19-9 は後期 (ステージ III/IV) に血中量が顕著に高くなる一方で、BC2-S3 値はステージが進むにつれて徐々に血中量が増加する傾向があることがわかった。

BC2-S3 の膵癌全体に対する判別能 (AUC: 0.822) は CA19-9 (AUC: 0.790) と同等であった。重要

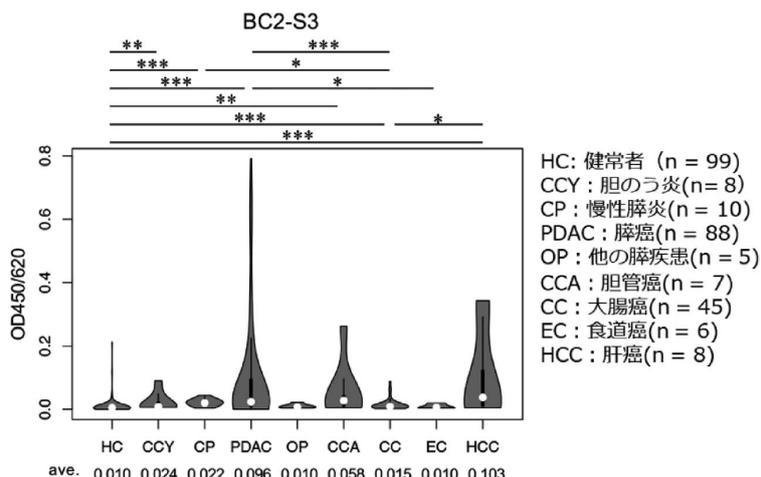
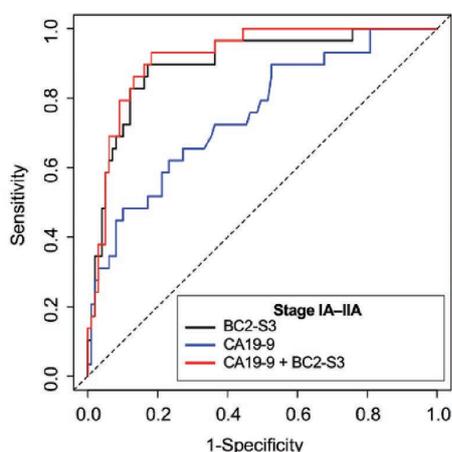


図3 BC2-S3は健常者と比べて膵癌で高い値を示す



Stage IA-IIA			
	AUC (95% CI)	P (vs. CA19-9)	P (vs. combination)
BC2-S3	0.899 (0.833-0.965)	<b>0.023*</b>	0.283
CA19-9	0.754 (0.651-0.857)	-	<b>0.002**</b>
CA19-9 + BC2-S3	0.920 (0.869-0.970)	-	-

CA19-9 (initial model) vs. CA19-9 + BC2-S3 (combination model)	
NRI (95% CI):	0.913 (0.538-1.289); P < <b>0.001***</b>
IDI (95% CI):	0.194 (0.089-0.299); P < <b>0.001***</b>

図4 BC2-S3の早期膵癌 (IA-IIA) の診断能

なことに、早期膵癌 (ステージ IA-IIA) においては BC2-S3 の判別能 (AUC: 0.899) は CA19-9 (AUC: 0.754) より顕著に高い判別能を示した (図4)。一方、後期膵癌 (ステージ IIB-IV) においては BC2-S3 の判別能 (AUC: 0.784) は CA19-9 (AUC: 0.807) と同等であった。さらに BC2-S3 の早期膵癌の検出率 (89.7%) は CA19-9 の検出率 (62.1%) を圧倒的に凌駕していた (図5)。そのため BC2-S3 は早期膵癌を検出できる新たな糖鎖マーカーとして期待される。

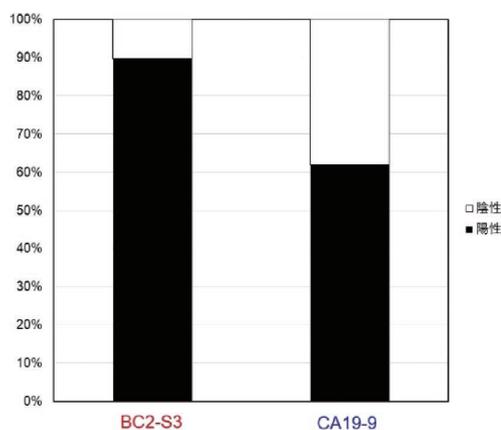


図5 BC2-S3の早期膵癌 (IA-IIA) の検出率

#### 4. BC2-S3のキット化と品質規格設定

キットの安定供給体制を構築するために、SERPINA3に対するマウスモノクローナル抗体を3種作製し、レクチンELISAを構築した。そして、年齢をマッチさせた健常者 (n=39) と膵癌患者血清 (n=36) を用いてこれら3種のモノクローナル抗体の膵癌 (I-IV) に対する識別能をROC曲線下面積 (AUC) で比較した。その結果、1種のモノクローナル抗体が最も高い膵癌識別能 (AUC: 0.8711) を示し、ポリクローナル抗体 (AUC: 0.8761) と同等であった。そして、CA19-9 (AUC: 0.7742) と比べて高い膵癌識別能を示した。最終的にレクチンELISAに用いるSERPINA3モノクローナル抗体の作製と安定供給体制の構築を完了

した。BC2-S3を産生する膵癌細胞株の培養上清から抗SERPINA3モノクローナル抗体アフィニティカラムにより精製することで、ELISAの標準物質の作製を完了した。SERPINA3糖タンパク質の発現プラスミドを膵癌細胞株にトランスフェクトし、組換えBC2-S3を一過性発現させ、得られた培養上清から組換えBC2-S3を精製し、値付けを行った。rBC2LCNレクチンの固相化法、SERPINA3抗体を用いた検出法（POD標識、ビオチン-アビジン、ABC法）の検討を行った。さらにブロッッキング剤や非特異反応防止剤の検討を行い、バックグラウンドやバラツキの低減を検討し、最適化を完了した。最終的にBC2-S3測定キットを完成させ、計215例の患者検体を用いて予備試験を行った。早期膵癌（IA-IIA）と異常がない患者の識別能を解析した結果、CA19-9のAUCが0.6952であるのに対し、BC2-S3のAUCが0.8116であることがわかり、切除可能早期膵癌（IA-IIA）に対して高い識別能を示すことがわかった。

さらに、標準物質の値付け、キャリブレーター、試薬性能（感度、正確性、同時再現性、測定範囲）、分析における妨害物質、妨害薬剤、カットオフ値の参考値、測定試料の性質、採取法を設定した。以上から、BC2-S3測定キット（モノクローナル抗体使用）の仕様・規格の設定を完了した。

## 5. 薬事相談

PMDAと計4回の相談を行い、臨床的意義、及び臨床性能試験プロトコルの合意に至った。

## 6. 発表（研究成果の発表）

（論文発表）

rBC2LCN-reactive SERPINA3 is a glycobiomarker candidate for pancreatic ductal adenocarcinoma. Mawaribuchi S, Shimomura O, Oda T, Hiemori K, Shimizu K, Yamase K, Date M, Tateno H. *Glycobiology*. 2023 Feb 2;cwad009. doi: 10.1093/glycob/cwad009.

（依頼講演）

早期膵癌の診断を実現する新規糖タンパク質マーカーの開発

第41回日本糖質学会

2022/9/30