

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10607

研究課題名(和文)膀胱癌における血清蛋白質の網羅的解析と診断スクリーニング法の確立

研究課題名(英文) Analysis of newly detected serum protein and trial of establishment of diagnostic tool in patients with bladder cancer

研究代表者

松本 和将 (MATSUMOTO, KAZUMASA)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：70306603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌に関わる新規蛋白質の組織および血清における発現と、臨床病理学的因子との比較、予後との相関関係、統計解析を用いた早期診断および予後予見因子としての有用性を検討した。臨床的に有用な蛋白質を認め、成果の一部を特許申請した。今後、獲得された膀胱癌特異的と判断された蛋白質、抗体について総合的な有用性を検討するため、各々の因子間での相関関係を検討し適正化を進め、臨床への実用化を目指す予定である。

研究成果の概要(英文)：We investigated an association of clinicopathological factors with newly detected proteins which we found using proteomics analyses in patients with bladder cancer. For example, serum PPP1CA was higher in patients with bladder cancer than in healthy controls. In addition, high levels of serum PPP1CA was associated with muscle-invasive cancer, high grade, the status of lymphovascular invasion and poor prognosis. Using cisplatin resisted bladder cancer cell line, we identified 25 obviously different spots for naive bladder cancer cell line. Seven spots had increased expression and 18 spots had decreased expression in cisplatin-resisted cell compared to those in naive cell. We will plan to examine whether the rest of bladder specific and cisplatin-resisted proteins detected in this project would be matched in real world clinical scenario.

研究分野：泌尿器科学、腫瘍学

キーワード：膀胱癌 尿路上皮癌 蛋白質 抗体 腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

泌尿器科領域において膀胱癌、腎盂・尿管癌の罹患率、死亡率は増加の一途を辿っている。一般的に、治療として手術、化学療法、放射線療法があげられる。しかし、治療に対する奏効率は芳しいものではない。また、腎盂尿管癌に至っては、疫学研究すら進んでいないのが現状である。この一因として無症候性血尿が出現し初めて診断されること、特異的腫瘍マーカーが存在せず、検出および経過観察においても画像診断のみで行われているためと考えられる。また、治療ガイドラインも画像診断による術前病期および術後の病理病期で規定されているのみである。腫瘍特異的マーカーを同定することは膀胱癌、腎盂・尿管癌のみならず、様々な癌種においても次世代に向けた医療躍進の重要な課題となっている。今後、膀胱癌、腎盂・尿管癌に対する根治性を高め予後を改善するには、新たなマーカーを用いた新しい診断基準に基づく検討が重要と考える。今までに膀胱癌特異的蛋白として nestin、plakin family、S100A2、A4、A8、A9 を、血清蛋白として S100A6、自己抗体として MMP2、calreticulin を同定し、膀胱癌の臨床病理学的所見や予後との相関関係を見出した。

2. 研究の目的

膀胱癌細胞株や膀胱癌組織を免疫源に、ランダム免疫法を用いて膀胱癌に特異と考えられる抗体を獲得してきた。今回の研究では、今までに得られた抗体を用いて多数例の患者血清・尿との反応性、膀胱癌組織との反応性を検討する。また、早期血清診断に有用な自己抗体を同定する目的で、二次元電気泳動法で得られた自己抗体が認識する合成蛋白質を用いた一次および二次スクリーニングを行う。組織アレイを作製抗体、自己抗体の認識する腫瘍関連抗原に対する精製抗体を用いて、免疫組織化学的に検討する。さらに検出された蛋白および抗体の発現と臨床的背景・化学療法の奏効率・放射線の感受性との相関、および予後を含めた検討を行い、治療アルゴリズムを検討する。

3. 研究の方法

- (1) 膀胱癌特異的抗体と患者血清との反応性に関しては、Dot Blot Chip System で解析する。新たに得られた抗体に対して、一次スクリーニングを行う。膀胱癌患者血清とは反応するが、健常人血清とは反応しない抗体が認められるため、全ての抗体に関してこの一次スクリーニングを行う。その結果、健常人血清、非腫瘍性疾患患者血清と比較して、腫瘍特異的マーカーとして同定されたものについて、さらに多数例を用いて二次スクリーニングを行う。統計学的に有意であり、ROC curve から AUC 値が 0.7 以上である

マーカーに関しては、さらに多数例の膀胱癌患者血清を用いて検討する。

- (2) 膀胱癌組織との反応性は、ホルマリン固定した膀胱癌細胞株を用いて染色し、特徴のある染色性を示した抗体は、膀胱癌組織マイクロアレイを用いて染色する。その後、症例の臨床病理学的検討、予後との相関関係、単変量、多変量解析を行い、早期診断および予後予見因子としての有用性を検討する。
- (3) 検出抗体に関して、単独で特定の膀胱癌の早期診断・予後予見因子として使用できるのか、複数のマーカーを組み合わせることで診断できるか否かを、健常者や良性疾患症例の検体結果も用いて、バイオインフォマティクスの手法を用いて検討する。

4. 研究成果

- (1) 膀胱癌（尿路上皮癌）の腫瘍マーカーの探索を遂行した。我々はこれまでに、膀胱癌特異的単クローン性抗体を 600 個、膀胱癌患者血清中の自己抗体が認識する腫瘍関連蛋白質 163 個を同定した。一次スクリーニングを行うことで膀胱癌特異的抗体を 204 個、自己抗体を 138 個獲得した。
- (2) Uroplakin III は既存の尿路上皮特異的発現蛋白質である。免疫染色を用いた検討は多く施行されているが、血清中の uroplakin III 発現の検討は世界的にも行われておらず、dot plot analysis を用いて発現と臨床的意義を検討した。血清 uroplakin III は健常者と比較し、膀胱癌症例で有意に上昇していた。また、筋層浸潤癌、高異形度、リンパ脈管浸潤症例で発現が上昇していた。さらに、血清 uroplakin III が高値の症例は癌特異的死亡率が高かった。（参照発表論文）
- (3) 進行性膀胱癌への治療では、集学的治療の一法としてシスプラチンを使用した全身化学療法が用いられる。しかし、繰り返し使用しているうちに耐性を示し、効果が減弱することは臨床的に経験される。市販の膀胱癌細胞株を用いて、シスプラチンと共培養し、シスプラチン耐性株を作成した。二次元電気泳動を用いて、親株とシスプラチン耐性株の発現蛋白質を比較検討した。シスプラチン耐性株で、7 の増加スポット、18 の減少スポットを同定した。特に、HNRNPA3、PCK2、PPL、PGK1、TKT、SERPINB2、GOT2、EIF3A は今までに報告のないシスプラチン耐性関連新規蛋白質と考えられた。（参照発表論文）
- (4) 高異形度の筋層非浸潤性膀胱癌症例の血清を用いて、自己抗体の検出を行った。その 1 抗体として、PPP1CA が検出された。血清 PPP1CA は、健常者と比較して膀胱癌症例で有意に高値を示した。また、

進行癌、高異形度、リンパ脈管浸潤、予後不良症例で、血清中 PPPICA は有意に高値を示した。さらに、膀胱全摘除術標本を用いての発現を検討したところ、進行癌、高異形度、リンパ脈管浸潤を認める症例と相関関係を示した。膀胱癌症例での自己抗体発現の検討は、世界に先駆けた検討と考えられた。(参照発表論文)

- (5) 先進治療として、久留米大学主導のもとペプチドワクチン療法の多施設共同研究に参画した。去勢抵抗性前立腺癌に対して、20種のペプチドを含有したワクチン(KRM-20)を使用し、Phase Iを施行した。重篤な有害事象も認めず、PSAの有効な低下例が認められた。また、シスプラチン耐性進行性膀胱癌に対して、Phase II ペプチドワクチン療法を施行した。緩和治療法群と比較し、有意な予後の改善を認め、重篤な有害事象も認めなかった。いずれも新規治療として世界初の試みと考えられた。今後、本研究で検出された膀胱癌特異的蛋白質を用いた検討も視野に入れていきたい。(参照発表論文)
- (6) 本研究で得られた成果の一部を、膀胱癌関連蛋白質として特許申請を行った参照産業財産権。残り多くの膀胱癌に関連する蛋白質、抗がん剤感受性に関する蛋白質を同定しているため、今後さらに検討、適正化を進め、特許取得、臨床への実用化を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計26件)

Minami S, Matsumoto K, Nagashio R, Hagiuda D, Fukuda E, Goshima N, Hattori M, Tsuchiya B, Hachimura K, Jiang SX, Saegusa M, Iwamura M, Sato Y. Analysis of autoantibodies related to tumor progression in sera from patients with T1G3 bladder cancer. *Anticancer Res.* 査読有. 37(12): 6705-6714, 2017.

<http://ar.iiarjournals.org/content/37/12/6705.full.pdf+html>

Noguchi M, Matsumoto K, Uemura H, Arai G, Eto M, Naito S, Ohyama C, Nasu Y, Tanaka M, Moriya F, Suekane S, Matsuda S, Komatsu N, Sasada T, Yamada A, Kakuma T, Itoh K. An open-label, randomized phase II trial of personalized peptide vaccination in patients with bladder cancer that progressed after platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 22(1): 54-60, 2016. 査読有. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1265.

Taoka Y, Matsumoto K, Ohashi K,

Minamida S, Hagiwara M, Nagi S, Saito T, Kodera Y, Iwamura M. Protein expression related to cisplatin resistance in bladder cancer cell lines detected by two-dimensional electrophoresis. *Biomed Res.* 36(4): 253-261, 2015. 査読有. doi: 10.2220/biomedres.36.253.

Tsumura H, Matsumoto K, Ikeda M, Yanagita K, Hirano S, Hagiwara M, Nagashio R, Fujita T, Sato Y, Iwamura M. High expression level of preoperative serum uroplakin III is associated with biologically aggressive bladder cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 16(4), 1539-1543, 2015. 査読有

http://www.apocpcontrol.org/page/apjcp_issues_view.php?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:25743828&key=2015.16.4.1539.

Noguchi M, Arai G, Matsumoto K, Naito S, Moriya F, Suekane S, Komatsu N, Matsueda S, Sasada T, Yamada A, Itoh K. Phase I trial of a cancer vaccine consisting of 20 mixed peptides in patients with castrate-resistant prostate cancer: dose-related immune boosting and suppression. *Cancer Immunol Immunother.* 64(4), 2015, 493-505. 査読有. doi: 10.1007/s00262-015-1660-1.

[学会発表](計135件)

萩原正博 他. 膀胱全摘除術標本における CD155 発現の臨床的意義の検討. 第 8 2 回日本泌尿器科学会東部総会. 2017.

川村瑞穂 他. 膀胱癌症例における尿中 14-3-3 protein beta/alpha 蛋白発現の検討. 第 1 0 5 回日本泌尿器科学会総会. 2017.

Hirano S et al. Anti-PPPICA autoantibody detected by proteomics analyses is associated with biological aggressiveness and poor prognosis in patients with bladder cancer. 111st Annual Meeting American Urological Association, 2016.

小林健太郎 他. 膀胱癌における PPPICA 抗体発現と臨床病理学的因子の検討. 第 1 0 4 回日本泌尿器科学会総会. 2016.

萩原正博 他. 膀胱癌細胞株を用いたシスプラチン耐性に関わる蛋白質の検出. 第 1 0 4 回日本泌尿器科学会総会. 2016.

Mochizuki K et al. Detection of tumor-associated antigens in culture supernatants using autoantibodies in sera from patients with bladder cancer. 30th Annual European Association of Urology Congress, 2015.

Matsumoto K et al. Loss of periplakin expression is associated with pathological stage and cancer-specific survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. 30th Annual European Association of Urology Congress, 2015.

平野修平 他. 膀胱癌病理検体における periplakin 発現に関する検討. 第 103 回日本泌尿器科学会総会. 2015.
望月康平 他. 自己抗体解析を利用した膀胱癌患者における血清中腫瘍関連抗原の探索. 第 103 回日本泌尿器科学会総会. 2015.
立花貴史 他. 血清 periplakin の膀胱癌症例での動態に関する検討. 第 103 回日本泌尿器科学会総会. 2015.
松本和将. 尿路上皮がんにおける腫瘍マーカーの探索. 第 12 回北里疾患プロテオーム研究会・第 65 回日本電気泳動学会シンポジウム. 2015.
望月康平 他. 血清 periplakin を用いた膀胱癌における腫瘍マーカーの検討. 第 74 回日本癌学会学術総会. 2015.

〔図書〕(計 4 件)

Matsumoto K, Ikeda M, Hirayama T, Ishii D, Iwamura M. Chemoradiotherapy. Concurrent uses, efficacy and impact on prognosis. Nova Science Publishers, Inc, 35-51 (56), 2017.
Matsumoto K, Nishi M, Tsumura H, Tabata K, Fujita T, Iwamura M. Role of Biomarkers in Medicine. In Tech, 33-45 (249), 2016.
Hirayama T, Matsumoto K, Nishi M, Fujita T, Iwamura M. Hematuria: Etiology, Management and Long-Term Prognosis. Nova Science Publishers, Inc, 77-84 (204), 2015.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 5 件)

名称：膀胱癌の診断
発明者：松本和将、大草 洋、馬場志郎、小寺義男、前田忠計
権利者：学校法人北里研究所
種類：特許
番号：特願 2015-020750
出願年月日：平成 27 年 2 月 20 日
国内外の別：国内

名称：膀胱癌マーカー及びその使用
発明者：松本和将、小寺義男、岩村正嗣
権利者：学校法人北里研究所
種類：特許
番号：特願 2015-094158
出願年月日：平成 27 年 5 月 1 日
国内外の別：国内

名称：尿路上皮癌診断薬及びその使用
発明者：佐藤雄一、田中 圭、松本和将、岩村正嗣、鉢村和男、長塩 亮
権利者：学校法人北里研究所
種類：特許

番号：特願 2016-038271
出願年月日：平成 28 年 2 月 29 日
国内外の別：国内

名称：膀胱癌マーカー及びその使用
発明者：小寺義男、松本和将、岩村正嗣
権利者：学校法人北里研究所
種類：特許
番号：特願 2016-107206
出願年月日：平成 28 年 5 月 30 日
国内外の別：国内

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 和将 (MATSUMOTO, Kazumasa)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：70306603

(2)研究分担者

佐藤 雄一 (SATO, Yuichi)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号：30178793

岩村 正嗣 (IWAMURA, Masatsugu)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：20176564