

令和 2 年 4 月 28 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09027

研究課題名(和文)膜型プロテアーゼの基質分解産物に着目したがん特異的に発現するバイオマーカーの解析

研究課題名(英文)Analysis of cleavage fragments produced by proteolysis on cancer cell membrane

研究代表者

越川 直彦 (KOSHIKAWA, NAHIKO)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・臨床研究所・部長

研究者番号：70334282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膵がんの早期診断法は確立されていない。本研究では、膵がんの悪性化に重要なMT1-MMPとその基質のプロセッシングに着目し、MR1-MMP基質のプロセッシング断片を指標とした新たな膵がん診断法の開発を行った。今回の検討において、2種類のMT1-MMP基質であるシグナル膜蛋白質断片に対するELISA定量測定系を作製した。活性型HB-EGF断片に対する検出感度は十分ではなく、さらなる改良を必要とした。また、MT1-MMP基質として見出したEphA2断片は健常人と比較して早期ステージを含む膵がん血清で有意に高値を示した。以上、EphA2断片が早期膵がん診断の新たな指標になりうる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は早期診断、早期治療以外に完治を見込めない難治癌である。しかし、現状では早期膵癌を見出すバイオマーカーはない。今回着目したMT1-MMP、EphA2は共に早期の膵癌で高発現していることが報告されていることから、それら相互作用としての蛋白分解で生じる基質断片は早期の膵癌の存在を示す重要なバイオマーカーになる可能性をもつ。今後、多検体血清を用いた臨床研究により、これら分解断片の早期膵癌のバイオマーカーとしての有用性を明らかとすることが必要となる。

研究成果の概要(英文)：An early detection method for pancreatic cancer has not been established so far. In this study, we focused on the proteolytic fragment of substrates of membrane-type-1 matrix metalloprotease (MT1-MMP), which is important for the malignant progression of pancreatic. In this study, we made monoclonal antibodies to the proteolytic fragments of MT1-MMP substrates, heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF and EphA2, and established quantitative ELISA assays for the fragments. As the results, the detection sensitivity of the HB-EGF fragment was not sufficient and required further improvement. In contrast, the serum levels of EphA2 fragment in the patient with pancreatic cancer including an early stage was a significantly higher than that of healthy donors. These results suggest that the EphA2 fragment could be a new biomarker for early pancreatic cancer diagnosis.

研究分野：腫瘍診断学

キーワード：膵癌 プロセッシング MT1-MMP HB-EGF EphA2

1. 研究開始当初の背景

膵がん等の難治がんはこれまでに有効な治療法や分子標的薬がないことから、その5年生存率は未だに5~10%と極めて低い。そのため、早期発見、外科的治療が最善の治療となっている。しかし、膵がんを特異的に診断可能な血液腫瘍マーカーはなく、CA19-9等の既存の腫瘍マーカーとCT等の画像診断に頼らざるを得ない。多くの患者は何らかの症状が出てから受診するため、診断確定した患者の約4割が遠隔転移をもつ末期がん患者である。そのため、難治がんの治療成績の向上は、検診、人間ドック等で早期がんの状態で見つけることが必須となる。

そのため、難治がんをいち早く診断できるバイオマーカーがゲノム、蛋白質、糖鎖、代謝産物を標的とした大規模オミックス研究が探索されているが、これまでに十分な成果が得られていない。これらオミックス解析はがん患者と健常人でのバイオマーカーの候補分子の発現量に対するS/N比を元に選抜するため、健常人でも若干の発現が見られる。この特異性の甘さが診断精度の検証において感度や特異度を低下させている原因となっている。そのため、がんで特異的に発現しているバイオマーカーを見出すことは喫緊の課題である。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに一貫して、がん悪性化形質の獲得における細胞外マトロプロテアーゼの役割について研究を精力的に進め、悪性化形質の動力源となる膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1(MT1-MMP)の研究分野を進めている。先行研究において、細胞膜上で特異的に発現しているMT1-MMPがその基質となる膜蛋白質を限定分解(プロセッシング)することで、膜蛋白質の機能制御に寄与する新たな分子機序を見出している。例として、MT1-MMPはがん化の促進に働くヘパリン結合性EGF様増殖因子(HB-EGF)や腫瘍抑制に作用するチロシンキナーゼ受容体(EphA2)をプロセッシングすることで、HB-EGFを活性化やEphA2の腫瘍抑制作用を不活化することで、がん悪性化進展の亢進に寄与している(Cancer Sci 2009, Cancer Res 2010, 2015 Cancer Sci 2011)。さらに、MT1-MMPによるこれら膜蛋白質基質のプロセッシング産物である基質断片ががん細胞でのみ特異的に産生されていること、また、予備的な結果であるが、それら断片ががん患者血清に存在することを見出している(Cancer Sci, 2011, Cancer Res, 2015)。

以上より、これまでにMT1-MMP基質のプロセッシング断片に着目した系統的な研究はないことから、膵がん細胞が産生するMT1-MMPプロセッシングが産生する基質断片のdegradome解析は、膵がんの高い特異性をもつバイオマーカーを見出す可能性がある。また、先行研究で見出した2種のシグナル膜蛋白質の断片は複数のがん種で発現特異性を確認しており、アドバンテージを持って研究を進めることができる。以上より、本研究は、がんへの高い特異性をもつバイオマーカーを同定し、膵がん等の難治がんを克服するための早期血清診断法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(課題1)難治癌診断のバイオマーカーとしてのMT1-MMP基質断片の網羅的な探索、同定、測定法の開発、平成29~令和元年度

これまでにMT1-MMPによる基質のプロセッシングを検討し、MT1-MMPがHB-EGFやEphA2のプロセッシングを介してがん悪性化進展を促進すること、また、これらプロセッシング断片ががん診断のバイオマーカーになる予備的知見を見出している。本研究では難治がんの膵がんを早期血清診断するための新たなバイオマーカーを検索する目的で、培養膵がん細胞に発現するMT1-MMP基質のプロセッシング断片を検索した。

(課題2)先行シーズHB-EGF断片、EphA2断片の定量測定法の確立、平成29~令和元年度

血液中のHB-EGF、EphA2のプロセッシング断片を高感度に検出する抗体とELISA測定法を確立し、今後の臨床応用に必要な技術基盤の構築を行った。まず、ヒト抗体ライブラリーを用いたファージディスプレイ法を用いて単離した活性型HB-EGF断片を認識するモノクロー抗体の性状を検討した。次に、活性型HB-EGF断片抗体を用いて、ELISAを用いた測定系を作製した。同時に、MT1-MMP基質として見出したEphA2がプロセッシングを受け遊離するN末端断片の特異抗体を樹立し、EphA2遊離断片に対する定量ELISA測定系を作製した。

(課題3) 難治がんの血液診断のバイオマーカーとしての評価、平成30～令和元年度

課題2で作製した EphA2 遊離断片に対する定量 ELISA 測定系を用いて、がん患者血清に含まれる当該断片の検出を試みた。まず、がん種の異なる患者血清(購入血清)を用いて、血清中に含まれる基質のプロセシング断片を定量し、診断の対象となるがん種を検索した。

4. 研究成果

(結果1)

Panc1 細胞は MT1-MMP を高発現するヒト・膵がん細胞である。そこで、Panc1 に発現する MT1-MMP をノックダウンするために、対照の LacZ と MT1-MMP の shRNA を導入したノックダウン細胞を作製した。次に、これら細胞の培養上清を採取し、MT1-MMP によるプロセシングを受ける膜蛋白質の遊離断片の検索を行った。方法として、LacZ、MT1-MMP ノックダウンした Panc1 細胞を無血清で 48 時間培養し、培養上清に含まれる蛋白質の泳動パターンを SDS-PAGE で比較した。しかし、両細胞の培養上清中の蛋白質の泳動バンドの分子量に異同は見られなかった。そのため、50 倍に培養上清を濃縮し、染色の感度を銀染色で向上させたが、培養上清に異なる蛋白質の泳動バンドの分子量の異同は検出できなかった。さらに、膜蛋白質をビオチンで標識後、アビジンビーズで膜蛋白質のみを単離して、両細胞の膜蛋白質のプロセシング状態をウエスタンブロットで比較したが、MT1-MMP によるプロセシングを受けた膜蛋白質を見出すことが出来なかった。最後に、MT1-MMP 過剰発現した細胞の培養上清を同様に検討したが、MT1-MMP 発現に依存した基質のプロセシング断片は見出すことは出来なかった。以上より、MT1-MMP 過剰発現細胞を用いても本手法による遊離断片の解析は困難であると判断し、膵がん細胞の MT1-MMP 基質断片の探索を完了した。

(結果2)

これまでに、ヒトファージ抗体ライブラリーを用いた解析から、MT1-MMP によるプロセシングを受けて活性化増殖因子に変換されたヘパリン EGF 様増殖因子断片 (HB-EGF-N2、-N3、以下、N2、N3 断片) のモノクローナル抗体を作製した。今回、リコンビナント野生型 HB-EGF (HB-EGF-N1、以下 N1) とその断片である N2、N3 を用いて、樹立したモノクローナル抗体の性状を解析した。ダイレクト ELISA による検討から、GFC265 抗体は N3 断片に反応することを見出した。そこで、GFC265 抗体を用いたサンドイッチ ELISA を検討したが、N3 断片の検出感度は 10ng/mL 以上であった。しかし、ウエスタンブロットを用いた先行研究から、がん患者血清の N3 断片が pg/mL 程度あることを見出している。そこで、GFC265 抗体によるサンドイッチ ELISA の検出感度を向上させるため、蛍光発色法を用いた検出感度の向上を検討したが、バックグラウンドも高くなり、検出に必要な S/N 比を得ることができていない。現在まで、この問題の解決策を見出すことが出来ていない。

次に EphA2 の MT1-MMP によるプロセシング断片に対する特異抗体を作製し、それらの性状解析から 3 種のモノクローナル抗体 (46A1、62A1、76A1) を樹立した。このうち、免疫沈降-ウエスタンブロット解析により、76A1 抗体は、野生型 EphA2 に反応せずに MT1-MMP のプロセシングによる生じる N 末端遊離断片に反応する抗体であった (図 1A、B)。そこで、62A1、76A1 抗体による EphA2 断片に対するサンドイッチ ELISA を作製した。健康人血清に組替え EphA2 断片をスパイクした標準蛋白質を用いたサンドイッチ ELISA は 10pg/mL 以上の EphA2 断片を検出することができた (図 2)。

(結果3)

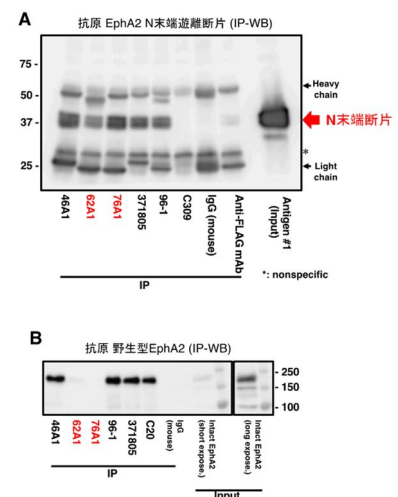


図1 EphA2遊離断片に対する特異抗体の免疫沈降-ウエスタンブロットによる性状解析

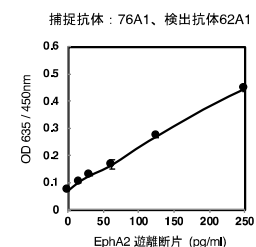


図2. EphA2遊離断片に対するサンドイッチELISAの標準曲線

課題2の検討において、血清等の臨床試料の解析に十分な感度が得られると判断した EphA2 断片のサンドイッチ ELISA(62A1:検出抗体、76A1:捕捉抗体)を用いて、種々の購入がん血清中の EphA2 断片の定量を行った。今回用いたがんは膵がん(9例)、胃がん(17例)、食道がん(9例)、頭頸部がん(9例)および健常人血清(50例)を用いた。

まず、健常人血清の EphA2 断片を定量し、その平均値 + 2SD (350pg/mL) をカットオフ値に設定した。膵がん(8/9例)、胃がん(10/17例)は、カットオフを超える値を示した(図3)。さらに、膵がんの8例の中には早期のステージ II が2例含まれていた。このことから、本測定法が膵がんの早期診断に応用できる可能性を見出した。また、EphA2 は細胞外小胞として細胞外に放出されることが報告されている。野生型 EphA2 と EphA2 断片の両者を認識する 46A1 を捕捉抗体にしたサンドイッチ ELISA を用いて健常人血清を検討したところ、76A1 を捕捉抗体とした場合と異なり、多くの健常人血清で高値を示した。このことは、健常人血清中の細胞外小胞として野生型 EphA2 が存在することを示唆している。そのため、EphA2 断片を特異的に認識する 76A1 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 測定法は、難治がんの膵がんを早期に見出す新たな手法になりうると考えられる。

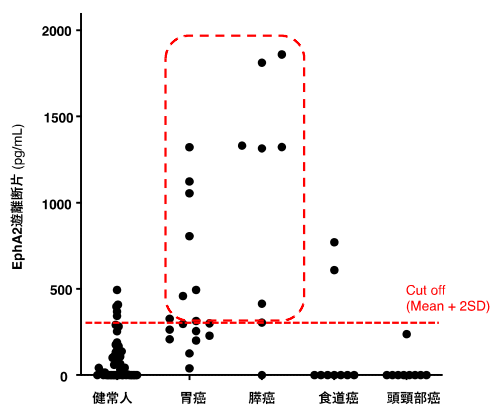


図3 種々の癌患者血清のEphA2遊離断片の定量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kikuchi Keiji, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Seiki Motoharu, Koshikawa Naohiko	4. 巻 1731
2. 論文標題 Identification of Proteolytic Cleavage Sites of EphA2 by Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase on the Surface of Cancer Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 29 ~ 37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-7595-2_3	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 TAKAHASHI YOKO, HAMASAKI MAKOTO, AOKI MIKIKO, KOGA KAORI, KOSHIKAWA NAOHICO, MIYAMOTO SHINGO, NABESHIMA KAZUKI	4. 巻 38
2. 論文標題 Activated EphA2 Processing by MT1-MMP Is Involved in Malignant Transformation of Ovarian Tumours In Vivo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4257 ~ 4266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.21873/anticancerres.12722	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 Yasuda Hiroshi, Nakagawa Masatoshi, Kiyokawa Hirofumi, Yoshida Eisaku, Yoshimura Toru, Koshikawa Naohiko, Itoh Fumio, Seiki Motoharu	4. 巻 20
2. 論文標題 Unique Biological Activity and Potential Role of Monomeric Laminin-2 as a Novel Biomarker for Hepatocellular Carcinoma: A Review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 226 ~ 226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20010226	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 -
1. 著者名 Suzuki Takashi, Minerva Dhisa, Nishiyama Koichi, Koshikawa Naohiko, Chaplain Mark Andrew Joseph	4. 巻 109
2. 論文標題 Study on the tumor-induced angiogenesis using mathematical models	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 15 ~ 23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13395	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 -

1. 著者名 Kikuchi Keiji, Kozuka-Hata Hiroko, Oyama Masaaki, Seiki Motoharu, Koshikawa Naohiko	4. 巻 1731
2. 論文標題 Identification of Proteolytic Cleavage Sites of EphA2 by Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase on the Surface of Cancer Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 29 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7595-2_3	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 Koshikawa Naohiko, Minegishi Tomoko, Kiyokawa Hirofumi, Seiki Motoharu	4. 巻 8
2. 論文標題 Specific detection of soluble EphA2 fragments in blood as a new biomarker for pancreatic cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Death Dis	6. 最初と最後の頁 e3134 ~ e3134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/cddis.2017.545	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 -

1. 著者名 Nakagawa Masatoshi, Karashima Takashi, Kamada Masayuki, Yoshida Eisaku, Yoshimura Toru, Nojima Masanori, Inoue Keiji, Shuin Taro, Seiki Motoharu, Koshikawa Naohiko	4. 巻 5
2. 論文標題 Development of a fully automated chemiluminescence immunoassay for urine monomeric laminin-2 as a promising diagnostic tool of non-muscle invasive bladder cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomark Res.	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40364-017-0109-4	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 -

1. 著者名 Suzuki Takashi, Minerva Dhisa, Nishiyama Koichi, Koshikawa Naohiko, Chaplain Mark Andrew Joseph	4. 巻 109
2. 論文標題 Study on the tumor-induced angiogenesis using mathematical models	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 15 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13395	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 -

1. 著者名 Kiyokawa Hirofumi, Yasuda Hiroshi, Oikawa Ritsuko, Okuse Chiaki, Matsumoto Nobuyuki, Ikeda Hiroki, Watanabe Tsunamasa, Yamamoto Hiroyuki, Itoh Fumio, Otsubo Takehito, Yoshimura Toru, Yoshida Eisaku, Nakagawa Masatoshi, Koshikawa Naohiko, Seiki Motoharu	4. 巻 108
2. 論文標題 Serum monomeric laminin- 2 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 1432 ~ 1439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13261	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9件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Koshikawa, N.
2. 発表標題 Monomeric laminin- 2 is a promising biomarker for cancer diagnosis
3. 学会等名 Special Lecture at National Institute of Gastroenterology, S. De Bellis” Research Hospital at Bari (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koshikawa, N.
2. 発表標題 Mathematical modeling for EphA2 and EGF-receptor and their downstream signal pathways involved in malignant progression of hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 4th Core to Core Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 越川直彦
2. 発表標題 MT1-MMPによるEphA2の限定分解 (プロセッシング) を介したがん悪性化進展制御の分子機序の解明
3. 学会等名 第50回 日本結合組織学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 越川直彦
2. 発表標題 悪性がんのバイオマーカーとしてのラミニン 2単鎖
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会学術集会（横浜）会長講演（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 越川直彦、星野大輔、清木元治
2. 発表標題 がん抑制因子から促進因子に変換するEphA2プロセシングの解明
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koshikawa N
2. 発表標題 EphA2 proteolysis converts it from tumor suppressor to oncoprotein
3. 学会等名 Vanderbilt University Quantitative system biology center (QSBC) meeting（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 星野大輔、清木元治、越川直彦
2. 発表標題 エクソソームは細胞膜突起構造を増強し、浸潤活性を惹起する
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 越川直彦、清木元治
2. 発表標題 EphA2プロテオリスによるがん悪性化シグナル制御の解明
3. 学会等名 第21回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 越川直彦
2. 発表標題 新たな肝細胞がんの早期診断法の開発
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 EphA2 N末端フラグメント抗体	発明者 特願2018-534429	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-534429	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 EphA2 N末端フラグメント抗体	発明者 越川直彦、清木元治	権利者 東京大学、神奈川県立病院機構
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP201729596	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

神奈川県立がんセンター臨床研究所 http://kcch.kanagawa-pho.jp/kccri/

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
--	---------------------------	-----------------------	----