

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：16401
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K11144
 研究課題名(和文) 尿路上皮癌増殖因子ラミニン 2測定による腎盂尿管癌の高感度腫瘍マーカー開発と応用
 研究課題名(英文) Development of laminin-gamma2 monomer as a potent biomarker for upper urinary tract cancer
 研究代表者
 執印 太郎 (SHUIN, Taro)
 高知大学・医学部附属病院・特任教授
 研究者番号：70128601
 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)：腎盂尿管癌は、有効な疾患特異的腫瘍マーカーが無いため、診断が困難である。我々は、ラミニン 2単鎖の高感度CLIA測定系を開発し、膀胱癌患者の尿検体において、診断マーカーとなりうることを証明した。同様に、腎盂尿管癌患者の尿中においてもラミニン 2単鎖が高発現することが確認できれば、これまでの逆行性尿路造影や尿管鏡など侵襲的な検査に頼らずに診断できる。本研究では、基礎研究として腎盂尿管癌マウスモデルの製作ができた。一方で、臨床研究として、『上部尿路上皮癌に対するラミニン 2単鎖のバイオマーカーとしての有用性に関する臨床研究』を開始したが、保存方法などの点で課題があり、検体の採取解析に至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 尿路上皮癌を対象とした有効な腫瘍マーカーは存在しない。我々は、ラミニン 2単鎖の高感度CLIA測定系を開発し、膀胱癌患者の尿検体において特異度の高いマーカーとなりうることを証明した。同様に、腎盂尿管癌患者の尿中においてもラミニン 2単鎖が高発現することが確認できれば、これまでの逆行性尿路造影や尿管鏡など侵襲的な検査に頼らずに確定診断できることは、学術的ならびに社会的に意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Renal pelvic and ureter cancer is difficult to diagnose because there is not effective disease-specific tumor marker. We have developed a highly sensitive CLIA assay system for laminin 2 single chain and demonstrated that it can be a diagnostic marker in urine samples from bladder cancer patients. Similarly, if it can be confirmed that laminin 2 single chain is highly expressed in the urine of patients with renal pelvic and ureteral cancer, diagnosis can be made without relying on invasive examinations such as retrograde urography and ureteroscopy. In this study, we made a mouse model of renal pelvic and ureteral cancer as a basic research. On the other hand, as a clinical study, we started "a clinical study on the usefulness of laminin 2 single chain as a biomarker for upper urothelial cancer". However, clinical study could not be commenced because of problems in terms of sample strage.

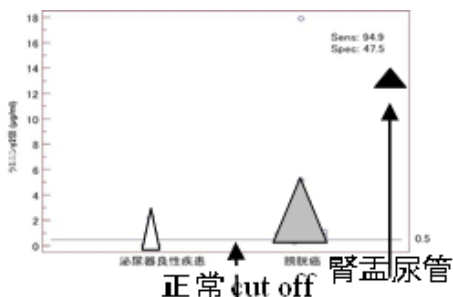
研究分野：泌尿器科

キーワード：尿中腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

腎盂尿管癌は日本人の高齢化により膀胱癌と同様にその患者数は増加している。しかし症状に乏しく特異的な腫瘍マーカーが無いため早期発見は困難である。確定診断は腎盂尿の細胞診、画像診断と生検である。これらの検査は確定診断のための検査であり、早期発見にはより簡便でかつ精度の高い腫瘍マーカー開発が強く望まれるが、患者数も年間 7-8 千人と少ないためその試みは無い。

最近、我々は移行上皮癌からラミニン-5 の一部で腫瘍増殖蛋白であるラミニン γ 2 鎖が尿中、血中に分泌されることを発見し特異抗体を用いた高感度 ELISA 測定系を開発した(Koshikawa N, Shuin T et al. Urinary laminin- γ 2 is a novel biomarker of non-muscle invasive urothelial carcinoma. Cancer Science 2015)。ラミニン γ 2 鎖は上皮成長因子 (EGF) 様の活性を持っており、特定の癌で Matrix-Metalloprotease の作用により細胞基底膜成分のラミニン-5 から産生され、癌細胞の増殖浸潤に関わる。我々は膀胱癌において尿細胞診や BK、NMT などのマーカーよりも感度が高いマーカーとしてラミニン γ 2 鎖蛋白測定法を実用化段階まで開発している。本測定法により膀胱癌に比べてヒト腎盂尿管癌ではラミニン γ 2 鎖値は異常高値を示した。



2. 研究の目的

今回の研究目的は、尿中の測定で異常高値を示すラミニン γ 2 鎖を腎盂尿管癌の腫瘍マーカーとしてとらえて、一般尿、腎盂尿管のカテーテル尿と血清中で screening 用、及び診断の腫瘍マーカーとしてその特性を検討して腎盂尿管癌の新規の腫瘍マーカーとして開発、確立することである。さらに我々が確立した「ヌードマウスによる腎盂腫瘍作成モデル」を用いて抗ラミニン γ 2 鎖抗体による腎盂腫瘍の治療の開発の研究を行う。

3. 研究の方法

(1) マウス移植モデルの製作

胸腺無形性ヌードマウスを用いた腎盂癌モデルの確認を行った。Yamashita らの文献をもとに、一部手技の変更を加え、経尿道的同所移植モデルを製作した (Yamashita M et al., Cancer Gene Ther. 2002 Aug;9(8):687-91.)。尿路上皮癌細胞株のなかで、比較的ラミニン γ 2 単鎖を高発現している KU-7 ならびに KMBC-2 を中心に腫瘍の生着率を検討した。KU-7 は比較的効率に腫瘍生着を認めたが、KMBC-2 においては低率かつ不安定であった。また、生着率の確認においては、病理組織学的な検討に加え、ルシフェラーゼ遺伝子導入を行い、IVIS imaging system を用いた蛍光発光の観察を体外診断にて行った。

(2) 腎盂尿管癌患者の尿検体を用いたラミニン γ 2 単鎖の測定

『上部尿路上皮癌に対するラミニン γ 2 単鎖のバイオマーカーとしての有用性に関する臨床研究』として当学倫理委員会の承認を得た。以下に計画の詳細を記す。

登録番号 ERB-106278

研究期間 2018 年 10 月 15 日～2023 年 7 月 31 日

目標症例数 150 件

本研究では、これまでに膀胱癌患者を対象に開発した全自動化学発光測定装置を用いたラミニン γ 2 単鎖の測定系を用いて、上部尿路上皮癌患者の尿中ラミニン γ 2 単鎖の測定を行う。比較対照として、膀胱癌患者、泌尿器良性疾病患者の尿中ラミニン γ 2 単鎖の濃度を測定する。これらの結果より、上部尿路上皮癌患者において、尿中ラミニン γ 2 単鎖の測定がバイオマーカーとなるかの臨床評価を行う。

被験薬

ラミニン γ 2 単鎖測定試薬

測定方法

本試薬による測定は、ARCHITECT®アナライザーを用いて実施される。測定試料をサンプルカップに分注後、測定機器にセットしスタートすることで、前述の原理により測定され、終了後は測

定結果が出力される。

(1) 尿検体を用いて、全自動化学発光測定装置によるラミニン γ 2 単鎖の測定を行う。また、ラミニン γ 2 単鎖の定量のためのスタンダード物質は、ラミニン γ 2 単鎖発現ベクターを安定発現させたトランスフェクタント細胞の無血清培養上清に産生したリコンビナント蛋白質を用いる。なお、尿中ラミニン γ 2 単鎖における初回測定は、通常希釈をせずに行う。

(2) 測定は1検体について3回の測定を行い、各測定間の一致率をそれぞれ求める。測定結果は3回の測定の平均値を採用する。なお、1測定でも結果が乖離した検体については再検査を行う。

対象患者

20歳から90歳までの者のうち、それぞれの群で以下の条件を満たすものを対象とする。上部尿路上皮癌(50例)、膀胱癌(50例)、泌尿器科良性疾患(50例)と診断された患者および健康人ボランティア(50例)を対象とする。

研究参加者に説明し同意を得る方法

倫理審査委員会で承認された同意説明文書を患者に渡し、文書および口頭による十分な説明を行い、患者(又は代諾者)の自由意思により同意を文書で得る。

検査項目

尿中ラミニン γ 2 単鎖(神奈川県立がんセンターに委託する)、尿クレアチニン(株式会社SRLに委託)、尿細胞診(株式会社SRLに委託)、検尿沈渣(各施設の院内検査)。

尿検体の種類と採取方法

尿検体の種類として、自然尿、膀胱カテーテル尿、分腎尿を用いる。同一患者において異なる採取法の検体を複数対象とする場合がある。いずれも本研究のために別途検体採取をすることはなく、日常臨床で採取した検体残を使用する。健康人においては自然尿を提供していただく。

臨床情報

- (1) 臨床診断: TNM分類
- (2) 治療方法: 手術療法、化学療法、放射線療法、腎盂尿管内注入療法、そのほかの治療
- (3) 病理組織学的所見
- (4) 術前後補助療法の有無と内容
- (5) 再発の有無とそれに対する治療方法

研究の作業手順

- (1) 採取した尿は遠心分離後(>400g、5分)、上清(1mL)はポリプロピレン製凍結用チューブ(SS1 1.5mL スクリューキャップ、2231-S0)に保存して-4℃で保存する(4本)。
- (2) 検尿沈渣は日常診療として各施設の院内検査を行う。
- (3) 尿細胞診(20倍濃縮尿5mL)はSRLに委託する。
- (4) 採尿用チューブは50mLの遠心チューブ(IWAKI 遠沈管:2343-050)とする。

評価項目

本研究の役割は、上部尿路上皮癌と膀胱癌、泌尿器科良性疾患における尿中ラミニン γ 2 単鎖濃度を測定し比較を行うことで、ラミニン γ 2 単鎖値が上部尿路上皮癌患者におけるバイオマーカーとして有用であることを証明する。

主要評価項目 (Primary endpoint)

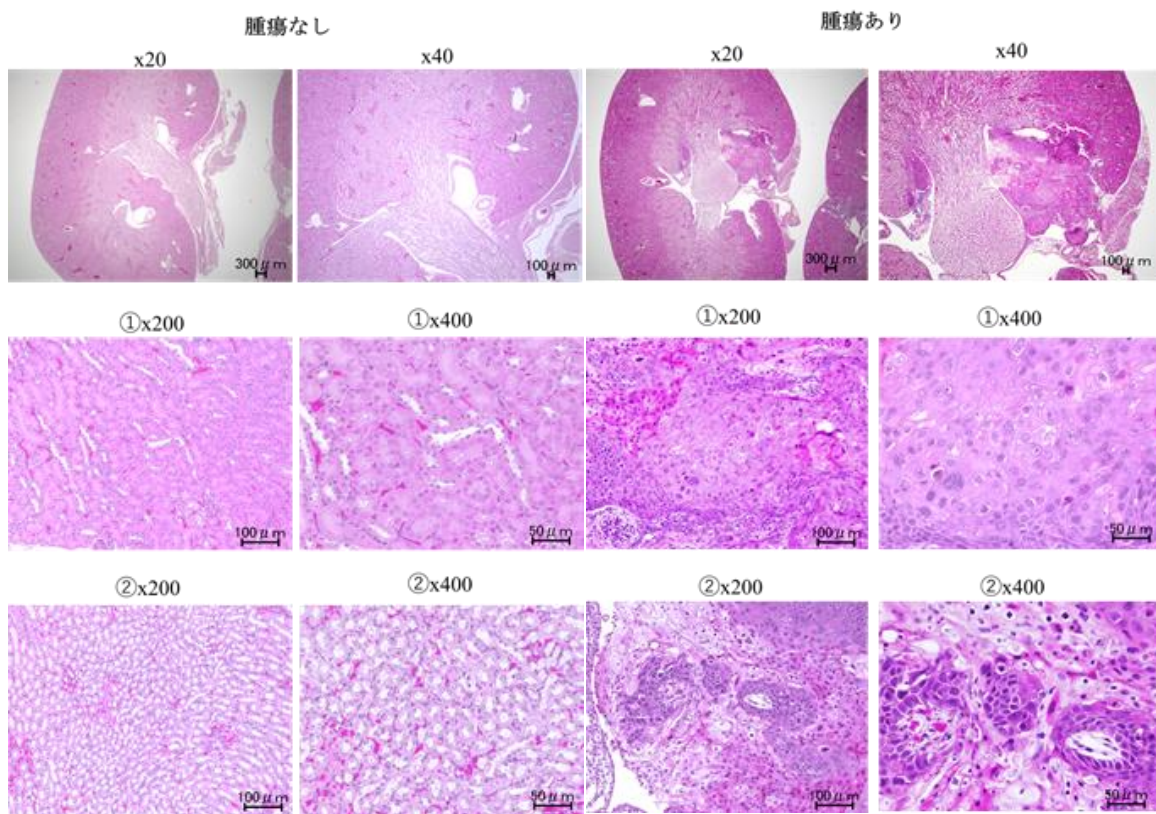
尿中ラミニン γ 2 単鎖の平均値、標準偏差、ROCを用いたc統計量(AUC)等。

副次的評価項目 (Secondary endpoint)

尿中ラミニン γ 2 単鎖値および細胞診を用いた感度(sensitivity)、特異度(specificity)、陽性的中率(Positive Predict Value)、陰性的中率(Negative Predict Value)、平均値、標準偏差、Youden indexを用いたカットオフ値、あるいは臨床的条件下における至適カットオフ値。

4. 研究成果

(1) 経尿道的同所移植モデルの製作を行った。ヒト尿路上皮癌細胞株のなかで、ラミニン γ 2 単鎖を高発現しているKU-7およびKMBC-2を中心に腫瘍の生着率を検討した。KU-7は高率に腫瘍生着を認めたが、KU-7とHeLa細胞(子宮頸癌細胞)にクロスコンタミネーションが存在するとの報告があり(J Urol. 2013 Oct;190(4):1404-9.)、KU-7の使用を中止した。KMBC-2においては低率かつ不安定であったが、手技の向上により、約60%の腎盂生着率を得られるようになった。



(2) 臨床研究として、『上部尿路上皮癌に対するラミニン γ 2 単鎖のバイオマーカーとしての有用性に関する臨床研究』を開始したが、保存方法などの点で課題があり、検体の採取解析に至っていない。

(まとめ) 胸腺無形性ヌードマウスを用いて、経尿道的な尿路上皮癌細胞の移植により、腎盂尿管癌マウスモデルを製作できた。一方で、患者検体を用いた、臨床研究の開始は次年度以降となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辛島 尚, 執印太郎, その他
2. 発表標題 Monomeric laminin-gamma2, a novel diagnostic marker of bladder cancer (ワークショップ)
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	辛島 尚 (KARASHIMA Takashi) (60304672)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授 (16401)	
研究協力者	越川 直彦 (KOSHIKAWA Naohiko)		
研究協力者	岸田 健 (KISHIDA Takeshi)		