

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19390158
 研究課題名（和文） トップダウン・スクリーニング法による膀胱癌診断用プローブの獲得と診断法の開発
 研究課題名（英文） Development of serum tumor markers by using antibodies generated by Top-Down screening strategy.
 研究代表者
 前田 忠計（MAEDA TADAKAZU）
 北里大学・理学部・教授
 研究者番号：90265728

研究成果の概要：ヒト腫瘍部位の組織もしくは樹立癌細胞株から取得したタンパク質混合物をそのままマウスに免疫し、取り出した脾細胞に対して常法に従い細胞融合し、限界希釈法を経てモノクローナル抗体を獲得する（ランダム免疫法）。我々の最終目的は低侵襲性で患者への負担の少ない体液（血液、尿）を対象とした癌診断法の確立である。本研究ではランダム免疫法で獲得した抗体について、免疫プロットならびに組織染色によって、有用抗体を評価した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学

1. 研究開始当初の背景

我々は 2000 年より本格的な疾患プロテオーム解析を開始し、組織ならびに体液（血清、尿）中に様々な疾患の診断マーカー候補タンパク質（ペプチドを含む）を見つけ、一部は診断応用に向けて研究を進めている。しかし、現状のプロテオーム解析では疾病特異的な翻訳後修飾や微量タンパク質等の検出は難しい。さらに、多くのマーカー候補タンパク質を見つけても、実際に診断に使えるタンパク質を絞り込んで抗体を作製し、臨床検査レベルの簡便で信頼性の高い診断システムを構築するまでには非常に長い時間と労力を要する。

以上の背景より、我々はこうした基礎研究からスタートしてプロダクトを得る従来の研究方法（Bottom-Up 的なアプローチ）を継続しつつ、基礎研究とプロダクト創出との距離を縮めるための新たな **Top-Down 的なアプローチ** をもう一つの柱として開始した。

1984 年、廣橋説雄（国立がんセンター研究所）らは St-4 胃癌細胞株を免疫源としてモノクローナル抗体を作成する手法を開発した（*Gann*, **75**, 485-488; 1984）。このランダム免疫法は癌関連の未知抗原や翻訳後修飾を受けた未知抗原にたいする抗体を獲得する手法として一時注目されたが、当時は質量分析法が未発達で抗原が同定できなかったた

めに、この方法が抗体獲得法として広まることはなかった。現在では様々なプロテオミクス手法を使い抗原を同定できるので、ランダム免疫法の有用性が発揮できる時代になった。

膀胱癌は泌尿器科領域で第2位の罹患率、死亡率の癌である。診断方法として主に尿細胞診、侵襲性のある膀胱鏡検査が行われているが、表在性癌や低悪性度癌での有効性は未だ低い。また、表在性癌は高率に再発をきたし、治療後も定期的な膀胱鏡検査を含む経過観察が必要となる。尿中腫瘍マーカーとしてBTAやNMP22はあるが、未だ尿細胞診の診断率を超える有効性は認められていない。さらに、浸潤性癌への膀胱全摘除術後や化学療法後の経過観察に使えるのは画像診断のみであり、現時点でモニターリングに活用できる腫瘍マーカーは存在せず、膀胱癌に対する有効な新規腫瘍マーカーの開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究ではランダム免疫法を用い、膀胱癌、肺癌由来抗原に対して多くのモノクローン抗体を効率的に作製し、その中から癌組織での発現および癌患者血清における有無によって有用抗体候補を絞り込む。候補抗体が認識する抗原については、質量分析計による同定を行う。提案の目的はランダム免疫法・抗体選別・抗原同定の各ステップを巧妙に組み合わせることにより、癌断用抗体を迅速かつ体系的に獲得する。

3. 研究の方法

ヒト腫瘍部位の組織もしくは樹立癌細胞株から取得したタンパク質混合物をそのままマウスに免疫し、取り出した脾細胞に対して常法に従い細胞融合し、限界希釈法によりモノクローン性抗体を獲得する方法(ランダム免疫法)を基本的に用いる。免疫源としてAMeX固定法を行った細胞株を用い、スクリーニングにも免疫源と同じAMeX固定した細胞株を免疫染色する方法で抗体の作製を行う。その理由は抗体獲得の効率がAMeX固定細胞を免疫源とした場合が一番高いからである。

先行して進めている肺の大細胞性神経内分泌癌細胞株であるLCN1細胞をソニケーションしてマウスに免疫し、スクリーニングに同じ細胞のAMeX固定細胞を免疫染色する方法で抗体を作製した場合、コロニーの形成されたwellの約25%で免疫染色可能な抗体が獲得出来るが、同じ細胞を予めAMeX固定した後免疫源として用い、同じ細胞を免疫染色する方法で抗体を作製した場合、コロニーの形成されたwellの約63%で免疫染色可能な抗体が獲得出来ることを見出した。また、

肺小細胞癌細胞株N231を用いた検討でも、生細胞をソニケーション後、免疫源に用いた場合は、LCN1細胞と同様に、免疫染色可能な抗体は約25%であり、効率的に免疫染色可能な抗体を獲得するためには、AMeX固定細胞で免疫を行う方が効率がよい。よって、今回膀胱癌ではT-24細胞のAMeX固定細胞を免疫源に、AMeX固定細胞を免疫染色する方法で抗体の作製を行った。

4. 研究成果

免疫プロットによる評価

肺癌、膀胱癌、胃癌について、ランダム免疫法によって獲得し、評価を行った抗体の個数を表1に示す。

Invitrogenから市販されているE-PAGEシステムを用いて作製済みの抗体1,522個について検討を行った。用いた細胞は、抗肺癌抗体1,172個に関しては4種類の組織型の細胞株(扁平上皮癌由来細胞株RERF LC-AI、小細胞癌由来細胞株N231、大細胞性神経内分泌癌由来細胞株LCN1、腺癌由来細胞株A549)を使い、抗膀胱癌抗体350個に関しては4種類のgradeの異なる移行上皮癌細胞株(RT4 grade I, 5637 grade II, T24 grade III, TCCSUP grade III)を使った。上記のE-PAGEシステムでは、これらの細胞のライセートを各々10 μ gずつ電気泳動を1時間行い、その後、7分間プロットングを行った。このシステムを使用することにより、1回の泳動で8種類の抗体を免疫プロット法で検討することが可能となった。

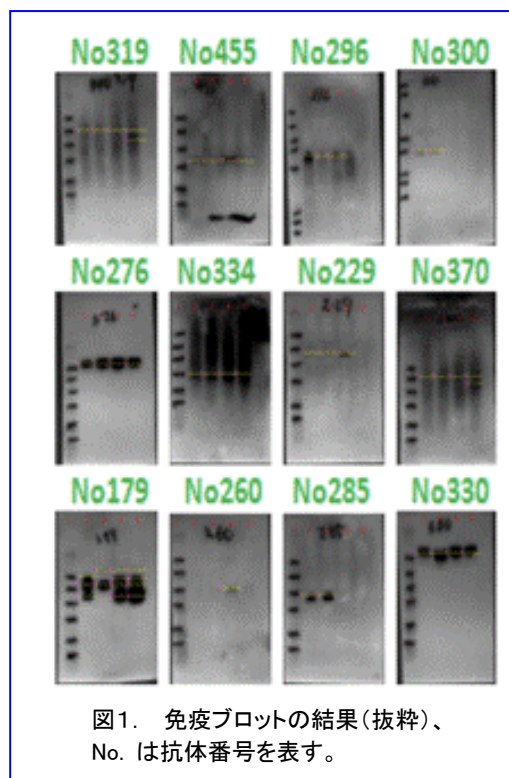


図1. 免疫プロットの結果(抜粋)、No. は抗体番号を表す。

図1, 2に獲得した抗体を用いた免疫プロットの結果の一部を示す。膀胱癌ならびに肺癌において獲得できた抗体について、全てこのように免疫プロットによる評価を行った。ランダム免疫法を適用した癌種それぞれにおいて、複数の細胞株を免疫プロットの各レーンで分析した。その結果、各細胞株中の抗原の存在量、分子量の違いが観測された(図2)。最終的に、膀胱癌に対する抗体312個において、その中の81抗体が膀胱癌の4つの細胞株と免疫プロット法で様々な程度にバンドが認められた。

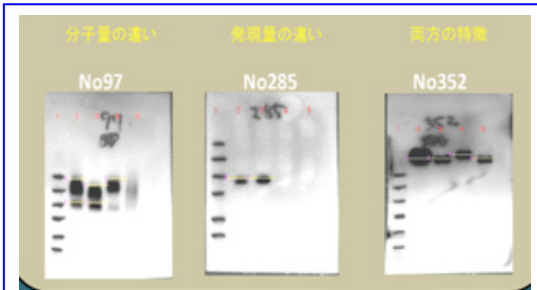


図2. 獲得した抗体による免疫プロットの結果。No. は抗体番号を表す。各レーンは分析している細胞株が異なる。

Grade I、IIのRT-4、5637に比してGrade IIIのTCCSUP、T-24で発現部位が変化しているものが多かった。この中で、1195抗体と1211抗体についてその免疫プロット法の結果を図3に、細胞の染色性を図4に示す。免疫プロット法では1195抗体はRT-4と5637細胞で50kDa付近にブロードに明らかなバンドが認められたが、gradeの高いT-24細胞ではごく弱いバンドが、TCC-SUP細胞ではバンドは認められなかった。1211抗体はT-24細胞で45kDa付近にバンドが認められ、RT-4細胞では100kDa付近に2本のバンドが認められた。その他の細胞では明らかなバンドは認められなかった。

組織染色による評価

免疫プロット陽性の抗体について、膀胱癌細胞株(RT4 grade I, 5637 grade II, T24 grade III, TCCSUP grade III)のホルマリン固定・パラフィン包埋細胞標本を免疫染色し

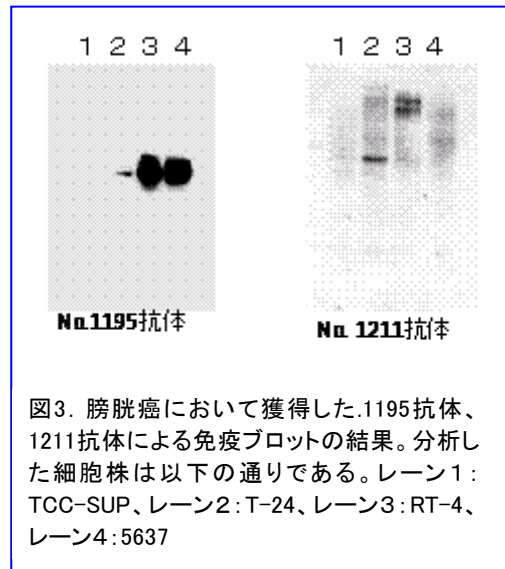


図3. 膀胱癌において獲得した1195抗体、1211抗体による免疫プロットの結果。分析した細胞株は以下の通りである。レーン1: TCC-SUP、レーン2: T-24、レーン3: RT-4、レーン4: 5637

た。その結果、4種類の細胞株を用いた免疫染色でどれかの細胞が陽性となったのは57個(63.0%)であった。この数字は免疫プロットで評価した膀胱癌抗体312個の18.3%に相当する。それぞれの抗体は細胞株により陽性率は異なっていた。抗体では細胞質に染色されるものが一番多かった。

免疫染色の結果では、1195抗体はRT-4や5637細胞では細胞質に強い染色性を示したが、TCC-SUPやT-24細胞では細胞質に弱い染色性しか認められなかった。染色結果は免疫プロット法の結果と一致していた。1211抗体は図4に示すように、RT-4細胞では細胞質に比較的強い染色性が認められたが、RT-4細胞では細胞質に顆粒状に染色される細胞が散在性に認められ、その他の細胞では細胞質にごく弱い染色性が観察された。5637細胞やTCC-SUP細胞では散在性にごく弱い染色性しか得られなかった。

膀胱癌組織を用いた検討(図5)では、1195抗体は膀胱上皮細胞の細胞質に弱い染色性が認められるが、腫瘍細胞では症例により様々な程度で細胞質に強い発現が認められる。また、腫瘍細胞では染色される部位とされない部位が混在している症例も散見される。膀胱癌組織での発現程度と患者の臨床病理学的検討は現在行っている段階である。

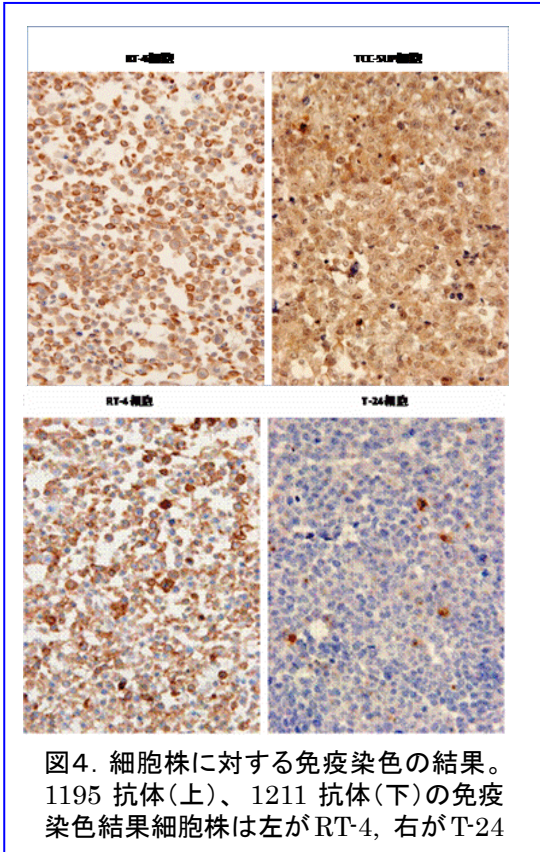


図4. 細胞株に対する免疫染色の結果。
1195 抗体(上)、1211 抗体(下)の免疫
染色結果細胞株は左が RT-4、右が T-24

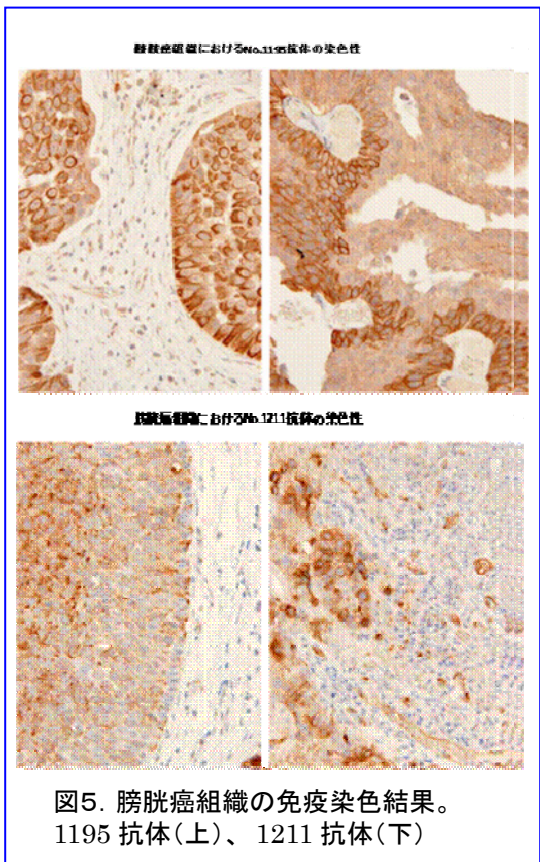


図5. 膀胱癌組織の免疫染色結果。
1195 抗体(上)、1211 抗体(下)

膀胱癌患者検体の収集状況

膀胱癌に関しては、膀胱癌組織の新鮮凍結

組織が 20 例、予後や臨床情報が明らかな膀胱癌のホルマリン固定・パラフィン包埋組織が 90 例、同一膀胱癌患者の手術前と手術後血清各 50 例、同患者の手術前と手術後の尿各 50 例ずつを収集した。

今後の展開

今後は免疫プロット陽性の 1195 抗体、1211 抗体以外の抗体についても免疫染色、膀胱癌組織により、評価を進める。さらに、血清、尿における反応性を確認し、作製した抗体の臨床応用の可能性を検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 21 件)

- ① Sogawa K., Kodera Y., Nomura F. (他 3 名), A Search for Novel Markers of Alcohol Abuse Using Magnetic beads and MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometry, *Proteomics-Clinical applications* (査読有), in press
- ② Hattori N, Kodera Y., Sogawa K, Satoh M, Hirasawa H. (他 8 名). YKL-40 identified by proteomic analysis as a biomarker of sepsis. *Shock* (査読有), in press
- ③ Matsui T., Maeda M., and Kodera Y., (他 9 名) The RNA recognition mechanism of human immunodeficiency virus (HIV) type 2 NcP8 is different from that of HIV-1 NcP7, *Biochemistry* (査読有), in press
- ④ Kawashima, Y., Fukuno T., Satoh M., Takahashi H., Matsui T., Maeda T., and Kodera Y., A simple and highly reproducible method for discovering potential disease markers in low abundance serum proteins *J. Electrophoresis* (査読有), **57**, 13-18, 2009
- ⑤ Amoh Y, Sato Y., Katsuoka K(他 3 名), Hoffman RM. Human and mouse hair follicles contain both multipotent and monopotent stem cells. *Cell Cycle* (査読有), **8**, 1-2, 2009
- ⑥ Kanoh M, Amoh Y, Sato Y., Katsuoka K. Expression of the hair stem cell-specific Marker nestin in epithelial and follicular tumors. *Eur J Dermatol* (査読有), **18**(5), 518-523, 2008
- ⑦ Nagashio R, Sato Y., Jiang Shi-Xu Ryuge S, Kodera Y., Maeda T, Nakajima T. Detection of tumor-specific autoantibodies in sera of patients with lung cancer. *Lung Cancer* (査読有), **62**, 364-373, 2008
- ⑧ Suzuki S, Sato Y., Tsukui T(他 5 名). MAGE-A protein and MAGE-A10 gene expression in liver metastasis in patients with stomach cancer. *Br J Cancer* (査読有), **99**, 350-356, 2008
- ⑨ Matsumoto K., Soh S, Satoh T, Iwamura M,

Ishikawa Y, Ishii T, Baba S. A lymphatic vessel network in normal urothelium of the urinary bladder. *Urology* (査読有), **72**, 706-710, 2008

⑩ Matsumoto K, Matsushita K, Baba S (他 5 名). Recent advances in molecular markers for bladder cancer. *Res Adv in Urol* (査読有), **1**, 1-17, 2008

⑪ 2. Matsumoto K, Baba S (他 5 名). Loss expression of uroplakin III is associated with clinicopathological features of aggressive bladder cancer. *Urology* (査読有), **72**, 444-449, 2008

⑫ Sawada A., Kodera Y, and Maeda T. (他 4 名), Protein Carbonyl Detection by Two-Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis, *J. Electrophoresis*, (査読有) **52**, 1-17, 2008

⑬ Okusa H., Kodera Y, Oh-ishi M., Minamida M., Tsuchida M., Kavoussi N., Matsumoto K, Sato T., Iwamura M, Maeda T, and Baba S, Searching for new biomarkers of bladder cancer based on proteomic analysis. *J. Electrophoresis* (査読有), **52**, 19-24, 2008

⑭ Seimiya M., Kodera Y, Maeda T, Nomura F. (他 11 名), Identification of novel immunohistochemical tumor markers for primary hepatocellular carcinoma; clathrin heavy chain and formiminotransferase cyclodeaminase. *Hepatology* (査読有), **48**, 519-530, 2008

⑮ Nagashio R, Sato Y, Jiang SX, Ryuge S, Kodera Y, Maeda T, Nakajima T, Detection of tumor-specific autoantibodies in sera of patients with lung cancer. *Lung Cancer*. (査読有), **62**, 364-73, 2008

⑯ Oh-Ishi M, Kodera Y, Furudate S, Maeda T. Disease proteomics of endocrine disorders revealed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics Clin Appl* (査読有), **2**: 327-337, 2008.

⑰ Matsumoto K, Baba S. (他 6 名)、Expression of S100A2 and S100A4 predicts disease progression and patient survival in bladder cancer. *Urology* (査読有), **70**, 602-607, 2007

⑱ Matsumoto K, Irie A, Satoh T, Okazaki M, Iwamura M, Baba S. Gemcitabine and paclitaxel chemotherapy as a second-line treatment for advanced transitional cell carcinoma. *Int J Urol* (査読有), **14**, 1000-1004, 2007

⑲ Matsui T., Kodera Y, Maeda T. (他 6 名), Structural role of the secondary active domain of HIV-2 NCp8 in multi-functionality. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有), **678**, 373-678. 2007.

⑳ Matsui T, Kodera Y, and Maeda T. (他 6 名), RNA Recognition Mechanism of the Minimal Active Domain of the Human Immunodeficiency Virus Type-2 Nucleocapsid Protein. *J Biochem.* (査読有), **141**, 269-277. 2007

㉑ Wu D, Kodera Y, Maeda T, Nomura F. (他 7 名), Detection of biomarkers for alcoholism by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Alcohol Clin Exp Res.* (査読有), **31**, S67-71, 2007

[学会発表] (計 15 件) 主要な物を記載

① (招待) 小寺義男, 「質量分析計を用いた診断を目指して」 第 1 回次世代医療システム産業化フォーラム 2008、2009. 02. 19、大阪商工会議所

② (シンポジウム) 小寺義男, 「血清中のペプチドを対象とした診断法の確立を目指して」 日本分析化学会 第 217 回液体クロマトグラフィー研究懇談会、2008. 11. 21、東京理科大学

③ (招待) 前田忠計 特別講演：北里大学での疾患プロテオミクスの歩み、これまでとこれから Clinical Proteomics in Chiba 2008 (第 5 回千葉疾患プロテオミクス研究会) (千葉) 2008. 11. 16

④ (シンポジウム) 小寺義男, 川島祐介, 福富俊之, 高橋広樹, 相野谷学, 丸橋正弘, 松井崇, 平賀啓介, 曾川一幸, 朝長毅, 野村文夫, 前田忠計 独自のペプチド分析法による大腸癌マーカーペプチドの探索と評価, 日本ヒトプロテオーム機構 (JHUP) 第 6 回大会 (大阪府茨木市) 2008. 7. 30

⑤ (シンポジウム) 大石正道, 小寺義男, 前田忠計 量子ドット技術を用いた複数のタンパク質翻訳後修飾の同時検出, 日本ヒトプロテオーム機構 (JHUP) 第 6 回大会 (大阪府茨木市) 2008. 7. 29

⑥ Kodera Y, Maeda T. (他 9 名), Development of the basic strategy for the comparative analysis of serum proteomes and its application in the discovery of hepatic injury biomarkers, 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (MPSA2008), Sapporo, 2008. 7. 26-29

⑦ (招待) 小寺義男, 「独自の基盤技術の確立と臨床応用可能なプロダクトの創出を目指して」 第 35 回 BMS コンファランス、2008. 7. 6 ~ 7. 9、裏磐梯ロイヤルホテル

⑧ (シンポジウム) 小寺義男, 体液を対象とした診断システムの開発 第 58 回日本電気泳動学会シンポジウム (東京都港区) 2008. 6. 13

⑨ (シンポジウム) 前田忠計, 有用プロダクト創出を目指した疾患プロテオーム解析 第 58 回日本電気泳動学会シンポジウム「基礎研究から様々な応用研究へ飛躍する最先端プロテオミクス」 (東京都港区) 2008. 6. 13

⑩ Kodera, Y., Maeda, T. (他 6 名), Development of novel serum peptidomic strategy and its application in the discovery of colon cancer tumor marker peptides, PepTalk2008, San-Diego, 2008.1.6-9

⑪ Kawashima, Y., Kodera, Y., Maeda, T. (他 8 名), Use of gel-based low molecular weight proteomic approach to discover potential biomarkers in serum, PepTalk2008, San-Diego, 2008.1.6-9

⑫ Fukuno, T., Kodera, Y., Maeda, T., (他 9 名) Development of the basic strategy for the comparative analysis of serum proteomes to discover potential biomarkers, PepTalk2008, San-Diego, 2008.1.6-9

⑬ Okusa H, Kodera Y, Kondo R, Matsumoto K, Iwamura M, Oh-Ishi M, Baba S, Maeda T Urinary proteomics of high-molecular-mass proteins by 2-DE with agarose gels in the first dimension (Agarose 2-DE) and LC-MS/MS Human Kidney & Urine Proteome Project HUP0 6th Annual World Congress (Seoul, Korea : 韓国, ソウル) 2007.10.6

⑭ Oh-Ishi M, Kodera Y, Baba S, Maeda T (他 4 名) High molecular mass proteomics of human renal cell carcinoma by 2-DE using agarose gels for IEF (Agarose 2-DE) and HPLC/MS/MS HUP0 6th Annual World Congress 第 6 回国際ヒトプロテオーム機構年会 (Seoul, Korea : 韓国, ソウル) 2007.10.9

⑮ (招待) 小寺義男、「尿を対象としたプロテオミクスの最前線」日本臨床検査自動化学会第 39 回大会、2007.9.26~28、横浜

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

①名称：大腸癌マーカーペプチド、及び大腸癌の診断

発明者：小寺義男、川島祐介、前田忠計、朝長毅、野村文夫

権利者：学校法人北里研究所

種類：国際出願

番号：PCT/JP2008/002217

出願年月日：2008年8月15日

国内外の別：国外

②名称：体液試料における、低分子量タンパク質及びペプチドの濃縮方法

発明者：小寺義男、川島裕介、前田忠計

権利者：学校法人北里研究所

種類：国際出願

番号：PCT/JP2008/002168

出願年月日：2008年8月8日

国内外の別：国外

③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：特許願

番号：特願 2008-066122

出願年月日：2008年3月14日

国内外の別：国内

④名称：大腸癌マーカーペプチド、及び大腸癌の診断

発明者：小寺義男、川島祐介、前田忠計、朝長毅、野村文夫

権利者：学校法人北里学園、国立大学法人千葉大学

種類：特許願

番号：特願 2007-213211

出願年月日：2007年8月18日

国内外の別：国内

⑤名称：体液試料における、低分子量タンパク質及びペプチドの濃縮方法

発明者：小寺義男、川島裕介、前田忠計

権利者：学校法人北里学園

種類：特許願

番号：特願 2007-206602

出願年月日：2007年8月8日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 忠計 (MAEDA TADAKAZU)

北里大学・理学部・教授

研究者番号：90265728

(2) 研究分担者

佐藤 雄一 (SATO YUICHI)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：30178793

馬場 志郎 (BABA SHIRO)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：00051889

松本 和将 (MATSUMOTO KAZUMASA)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：70306603

小寺 義男 (KODERA YOSHIO)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号：60265733

(3) 連携研究者

野崎 直仁 (NOZAKI NAOHITO)

神奈川歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70222198