

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07197

研究課題名（和文）がん関連抗原CSPG4特異的自己抗体を指標とした早期診断・予後予測システムの構築

研究課題名（英文）Construction of early diagnosis and prognosis prediction system by monitoring of cancer-related antigen CSPG4 specific autoantibodies.

研究代表者

伊藤 邦彦（ITO, Kunihiko）

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：90221770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、抗CSPG4自己抗体の新規腫瘍マーカーとしての有用性を評価することを目的とした。まず、CSPG4の主要な免疫応答部位が細胞外ドメイン1(D1)であることを明らかにした。次に、抗CSPG4自己抗体を検出するための免疫測定系(ELISA)を構築した。ELISAを補完するため、CSPG4強制発現細胞を用いた蛍光抗体法(IIF)も確立した。ELISA及びIIFを用いて、各種がん患者血清を測定した結果、乳がん及び子宮頸がんにおいて高い陽性率(60-80%)で抗CSPG4自己抗体が検出された。以上の結果より、抗CSPG4自己抗体は乳がん及び子宮頸がんのバイオマーカーとなりうる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、抗CSPG4自己抗体が、乳がんと子宮頸がんにおいて、高い確率で検出されることを見出した。これまでに筆者らは乳がん組織でCSPG4の発現が亢進していることを確認している。がん組織におけるCSPG4発現の亢進と自己抗体形成の亢進が相関していることを明らかにした学術的意義は大きいと考えられる。今後は、乳がんと子宮頸がんに絞って、がんの早期発見やがん化学療法への奏効予測における抗CSPG4自己抗体モニタリングの有用性について検討を行い、これまでの腫瘍マーカーに対して抗CSPG4自己抗体の優位性が証明できれば、新規バイオマーカーの創出という点において社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to evaluate the utility of anti-CSPG4 autoantibodies as a novel tumor marker. First, authors identified the extracellular domain 1 (D1) as the major immunoreactive site of CSPG4. Next, authors established an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system to detect anti-CSPG4 autoantibodies against D1, and an indirect fluorescence (IIF) assay using CSPG4-expressed BALB3T3 cells to compensate to the accuracy of ELISA system. Authors measured the levels of anti-CSPG4 autoantibody in sera of various cancer patients by established ELISA and IIF systems. As a result, a high positive rate (60-80%) of anti-CSPG4 autoantibodies was detected in breast and cervical cancer patients. These results indicate that anti-CSPG4 autoantibody may be a potential biomarker for breast and cervical cancer.

研究分野：医療薬学（がん診断・治療）

キーワード：CSPG4 がん関連抗原 自己抗体 がん診断・予後モニタリング 乳がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在臨床で広く測定されている腫瘍マーカーとして、CEA、AFP、CA19-9などが挙げられるが、これらは、X線CTやMRIなどの画像診断を補完する情報に止まっている。最近では血中マイクロRNAや循環腫瘍DNAなどの腫瘍マーカーへの応用に関する研究が精力的に行われているが、測定に時間と費用がかかるという欠点がある。迅速、簡便、安価かつ鋭敏にがんを検出できるマーカー候補が見つければ、がんの早期発見や早期治療に大きく貢献するものと期待される。

(2) 筆者は、これまでにB細胞リンパ腫患者骨髄細胞から構築した抗体遺伝子ライブラリーより、ファージディスプレイ法により細胞外マトリクスコンドロイチン硫酸プロテオグリカン4(CSPG4)に対するリコンビナントFab(rFab)AHSAを得ることに成功した¹⁾。平成28年度から3年間にわたり科学研究費補助金(基盤研究(C))の助成を受け、AHSA完全IgG発現系の構築とエフェクター機能の解析を行うとともに、がん組織(メラノーマ、膵がん、トリプルネガティブ乳がん、悪性中皮腫)マイクロアレイを用いてCSPG4の発現について検討した。その結果、4種のがんすべてにおいて高頻度でCSPG4の発現が確認された一方で、正常組織では、ほとんど発現が認められなかったという結果を得た。

(3) ところで、CSPG4は多くのがんで発現することが報告されており²⁾、その発現増強は免疫応答の標的になりやすいものと考えられる。これまで、がん患者血中には、p53、Ras、c-mycなどに対する自己抗体が検出されること並びにがんの早期検出への応用の可能性について報告されている³⁾。

(4) AHSAはがん患者から単離されたCSPG4モノクローナル自己抗体であり、また、同一患者の血清でCSPG4陽性細胞が強染されたという事実は、B細胞リンパ腫での抗CSPG4自己抗体の生成と増加を示唆するものと考えられる。それゆえにCSPG4自己抗体は、新規な腫瘍マーカー候補となりうるものと考えられるが、CSPG4自己抗体の検出とその臨床応用に関する報告は国内外で皆無である。

2. 研究の目的

(1) 本研究においては、CSPG4自己抗体の新規腫瘍マーカーとしての有用性を評価することを目的とする。がん患者に見出されるがん関連自己抗体のうち、申請者が蓄積したこれまでの研究成果に基づき、がん関連抗原CSPG4に着目し、抗CSPG4自己抗体のがん早期診断や予後予測における有用性を評価しようとするものである。

(2) 本研究により、抗CSPG4自己抗体モニタリングの有用性が確認できれば、がんの早期診断や予後予測における新機軸となるものと期待される。また、間接的にはあるがCSPG4の治療標的としての有効性も証明できることから、臨床的意義の深い研究といえる。

3. 研究の方法

(1) CSPG4 コアタンパク質の主要な免疫応答部位の同定

標的細胞として CSPG4 を強発現する MDA-MB-435S (メラノーマ) を用い、AHSA 及び各種のウサギ抗 CSPG4 ポリクローナル抗体との反応性を間接蛍光抗体法 (IIF) で測定した。また、MDA-MB-435S 免疫マウス脾細胞からの抗 CSPG4 モノクローナル rFab の単離には、抗体ファージディスプレイ法を用いた。

(2) 抗 CSPG4 自己抗体測定系 (サンドイッチ ELISA) の構築

ハーフウェルサイズ 96 ウェルプレートを用い、キャプチャー抗体として CSPG4 ドメイン 3 を認識するウサギ抗 CSPG4 ポリクローナル抗体、サンドイッチ抗原として MDA-MB-435S 細胞から抽出して部分精製した CSPG4、モデル自己抗体として AHSA rFab を用いて、サンドイッチ ELISA の至適化を行った。

(3) 各種がん患者血清中の抗 CSPG4 自己抗体の測定

抗 CSPG4 自己抗体測定系 (サンドイッチ ELISA) 及び CSPG4 強制発現細胞を標的とした IIF により、がん患者血清中の抗 CSPG4 自己抗体を測定した。

4. 研究成果

(1) CSPG4 コアタンパク質の免疫応答部位の同定

抗 CSPG4 自己抗体検出系に用いる CSPG4 コアタンパク質の抗原部位を決定する目的で、異なるエピトープを認識する 3 種類の抗体 (ヒト型 rFab AHSA、抗 MCSP 抗体: Bethyl Lab、抗 CSPG4 抗体: Sigma-Aldrich) の CSPG4 陽性 MDA-MB-435S (435S) に対する反応性を間接蛍光抗体法により検討した。その結果、435S 生細胞は、AHSA と強く反応し、抗 MCSP 抗体と弱く反応したが、抗 CSPG4 抗体とは全く反応しなかった。一方、4% フォルマリン固定細胞は、いずれの抗体とも強く反応した。CSPG4 の細胞外ドメインは、3 つの部分から構成されており、AHSA はドメイン 1 の N 末端側、抗 MCSP 抗体はドメイン 1 の C 末端側、抗 CSPG4 抗体はドメイン 3 を認識する。生細胞では、抗体がドメイン 1 のみにアクセスできた一方で、固定細胞では、ドメイン 3 にもアクセスできたことから、生細胞の CSPG4 ドメイン 1 以外は、抗体がアクセスしにくい構造となっていることが示唆された。これらの結果よりドメイン 1 (aa1-640) 部分が最も抗原性の高い部位であると考えられた。

この仮説を裏付ける目的で、435S 生細胞を免疫したマウスの脾細胞より抗体遺伝子ライブラリーを構築し、得られた CSPG4 反応性 rFab クローンのエピトープ解析を行った結果、全ての陽性クローンがドメイン 1 に存在する配列を認識していることが明らかとなった。以上の結果より、ドメイン 1 部分が CSPG4 の抗原性を担っていることが明らかとなった。

(2) 抗 CSPG4 自己抗体測定系 (サンドイッチ ELISA) の構築

抗 CSPG4 自己抗体測定系の構築について検討した。ヒト CSPG4 強制発現 293T 細胞より細胞膜画分を抽出し、これを抗原ソースとする予定であったが、細胞膜画分中に含まれる CSPG4 をサンドイッチ ELISA で定量した結果、予想を下回る収量しか得ることができなかった。293T 細胞における発現が十分ではなかったことが理由として考えられた。そこで、CSPG4 を高発現する 435S 細胞から CSPG4 の抽出について検討した。その結果、測定系の構築のために必要十分量の CSPG4

を得ることができた。

測定系の構築については、CSPG4 の細胞外ドメイン 3 を認識する抗 CSPG4 ポリクローナル抗体をキャプチャー抗体とし、モデル自己抗体として我々が単離したヒト型リコンビナント Fab AHSA を用いたサンドイッチ ELISA について検討した。本測定系では、キャプチャー抗体濃度 10ug/ml、抗原濃度 30 ug/ml の至適条件下で AHSA は 1000ng/ml から 10ng/ml の範囲で検出可能であった。自己抗体の検出限界は 5 ng/ml であった。測定系の日内および日間変動の変動係数は 10%未満と良好であった。

サンドイッチ ELISA による測定系で得られた結果を評価する上で、偽陽性を排除する必要があると考えられる。そこで、サンドイッチ ELISA で CSPG4 と反応することが確認できた検体について、間接蛍光抗体法(IIF)により確認するための系を構築した。ヒト血清とは交差反応性が極めて低いマウス由来細胞株として BALB/3T3 cloneA31 を選択し、CSPG4 強制発現系を構築した。AHSA をモデル自己抗体として用いた時、強制発現細胞とのみ強く反応することを確認した。

(3) 各種がん患者血清中の抗 CSPG4 自己抗体の測定

がん患者血清中の抗 CSPG4 自己抗体レベルを、確立したサンドイッチ ELISA 法で測定するとともに、CSPG4 強制発現細胞を用いた間接蛍光抗体法により確認した。がん患者及び非がん疾患患者血清試料は、東大医科研バイオバンクより有償分与された。がん種として、肺がん、胃がん、大腸・直腸がん、肝がん、膵がん、乳がん、子宮頸がん、卵巣がん、造血器腫瘍の 9 種類、非がん疾患は関節リウマチを選択した。本研究では、抗 CSPG4 自己抗体が上昇するがん種を見いだすことを目的としたので、ステージ IV 以上あるいは手術不能の末期がん患者血清 10 例ずつを測定した。また、静岡県立大学研究倫理審査委員会及び東大医科研バイオバンク倫理審査委員会の承認を得た上で実施した。その結果、乳がん 80%、子宮頸がん 60%と高い陽性率であった。その他のがん腫では卵巣がん 40%、肺がん、大腸・直腸がん、膵がん、造血器腫瘍 30%、肝がん 20%、胃がん 0%であった。関節リウマチ患者では 0%であった。筆者らは、CSPG4 を指標とした免疫組織化学においても、これまでに乳がん組織で高い陽性率を示すことを明らかにしており、今回の結果と考え合わせると、組織中 CSPG4 の発現が高いがん種では、抗 CSPG4 自己抗体が高値になることが示唆された。本研究の最終目標は、抗 CSPG4 自己抗体のがん早期診断・予後予測への応用である。今回の検討により、対象とするがん種を乳がん及び子宮頸がんと絞り込むことができた。今後も引き続き本研究を遂行し、CSPG4 自己抗体が、乳がん及び子宮頸がんの早期発見や化学療法の治療効果判定における有用性について検討を行っていきたいと考えている。

引用文献

- (1) J.Biochem, 163,61,2018
- (2) Theranostics,5,530,2015
- (3) Trends Cancer,3,198,2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤邦彦、嶋美月、藪内雅人、佐藤豪彦
2. 発表標題 がん関連抗原CSPG4の免疫応答部位の解析を目的としたモノクローナル抗体の作製
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嶋美月、伊藤邦彦
2. 発表標題 がん関連抗原CSPG4の細胞外ドメインに対する免疫応答の解析
3. 学会等名 第67回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤邦彦、嶋美月
2. 発表標題 腫瘍細胞におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン4の発現様式
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤邦彦、嶋美月、鈴木詩絵里、志田幸平
2. 発表標題 細胞外マトリクスCSPG4のがん細胞における発現様式の検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤邦彦、平井啓太、吉村久志、石渡俊行
2. 発表標題 CSPG4はトリプルネガティブ乳がんを含めた乳がんの免疫組織化学的検出における有望なマーカーである
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019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	井上 和幸 (INOUE Kazuyuki) (90514589)	静岡県立大学・薬学部・准教授 (23803)	
研究分担者	辻 大樹 (TSUJI Daiki) (90565615)	静岡県立大学・薬学部・講師 (23803)	
研究分担者	平井 啓太 (HIRAI Keita) (30740203)	静岡県立大学・薬学部・講師 (23803)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------