

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09692

研究課題名(和文) 尿中PKC を標的とした新規尿路上皮がん診断システムの開発

研究課題名(英文) Development of a novel diagnostic method for urothelial carcinoma targeting urinary activated protein kinase C-alpha

研究代表者

猪口 淳一 (Inokuchi, Junichi)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：10403924

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)：尿路上皮癌に対する尿中バイオマーカーは、その感度の低さからあまり利用されていないのが現状であるが、今回尿中の活性化型プロテインキナーゼC (PKC) が尿路上皮癌に対し高い感度、特異度を示し、特に従来の検査法では感度が低かった低異型度腫瘍においても高い感度を示し、尿路上皮癌に対する新規尿中バイオマーカーとしての有用性が明らかとなった。さらに、より安価で簡便な検査法として、抗リン酸化ペプチド抗体を利用した電子バイオセンサを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路上皮癌を早期かつ非侵襲的に発見するために、これまで様々な尿中バイオマーカーが開発されてきたが、検査特異度が高い尿細胞診以外はあまり利用されていないのが現状である。特に低異型度癌ではその感度が低く問題となっている。尿中活性化型プロテインキナーゼC (PKC) は高い感度、特異度で尿路上皮癌を検出できることが示され、特に低異型度癌でも高感度であり、今後の実臨床への導入・普及が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Urinary activated protein kinase C (PKC) showed high sensitivity and specificity for detecting urothelial carcinoma (UC), even in low grade UC which had been shown low sensitivity to date. This result indicates the usefulness of activated PKC as a novel urinary biomarker for urothelial carcinoma. Furthermore, we developed an electronic biosensor device using an anti-phosphopeptide antibody as a cheaper and simpler examination.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿路上皮癌 膀胱癌 腎盂尿管癌 尿中バイオマーカー スクリーニング PKC リキッドバイオシ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

尿路上皮癌は尿路上皮から発生する悪性腫瘍であり、全尿路上皮癌のうち約 95%は膀胱癌が占める。我が国における膀胱癌罹患数は約 2 万人 (2014 年)、年間死亡数は約 8,400 人 (2016 年) を数えておりさらに増加傾向にある (国立がん研究センターがん情報サービスより)。尿路上皮癌の臨床的特徴の一つは空間的、時間的多発性であり、診断時に多発する場合や、内視鏡的な腫瘍切除後に膀胱内再発をきたす頻度が高いことが知られている。そのため頻回な検査が術後のモニタリングとして行われるが、現時点では肉体的・精神的な苦痛を伴う膀胱鏡検査や感度が低い尿細胞診などに頼っており、より簡便で感度が高いスクリーニング・モニタリング法の開発は喫緊の課題である。

尿路上皮癌の尿を用いた補助診断法としては、検出特異度が 95%以上と高い尿細胞診が最も汎用されているが、感度は 40~60%と相対的に低い。特に、低異型度の筋層非浸潤性膀胱癌の検出は困難であり診断上大きな問題である。また尿細胞診は診断者間における判定結果の不一致も現実的課題である。一方で、いくつかの分子が膀胱癌に対するバイオマーカーとして開発されている。中でも Nuclear matrix protein 22 (NMP22)、Bladder tumor antigen test (BTA test)、サイトケラチン 8・18 等は保険適用となっているが、いずれも感度は高いものの偽陽性が多いことが問題となっており、残念ながら実臨床ではあまり使われていないのが現状である。よって、尿路上皮癌の補助診断法として感度、特異度の高い非侵襲的なバイオマーカーの開発は極めて重要である。

## 2. 研究の目的

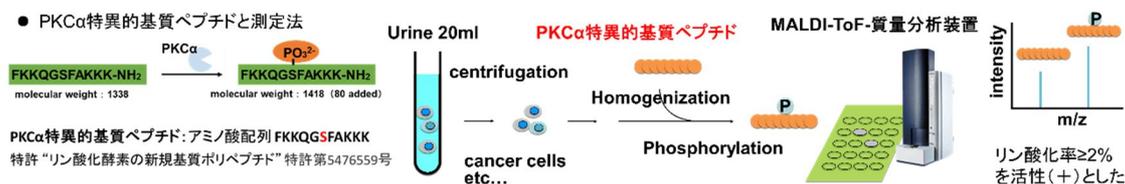
本研究では、尿路上皮癌のバイオマーカーとしてプロテインキナーゼ C- $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) に注目した。PKC は細胞内情報伝達を司る代表的なリン酸化酵素で細胞増殖の中心的役割を担っており、そのサブタイプの一つである PKC $\alpha$  は、特に癌化の初期から活性化され増殖・転移と深く関わっている(1)(2)。これまで PKC は細胞内酵素で血中や尿中には存在しないと考えられていたが、我々は癌の発生と進展にともなって体液中に活性型 PKC $\alpha$  が増加することをモデル動物により明らかにしてきた。またその際に、PKC $\alpha$  特異的に反応する基質ペプチド (アミノ酸配列: FKKQGSFAK $\alpha$ KK) の開発に世界で初めて成功している (特許登録番号: 5476559) (3)。このペプチドは癌細胞に対する反応性 (リン酸化反応) は非常に高い一方で、正常細胞にはほとんど反応しないことを確認しており、PKC $\alpha$  の活性を定量的に評価することで感度、特異度の高い検査法の確立が期待できる。

実際に我々は、この基質ペプチドを用いてヒトの尿路上皮癌株をマウスに移植した xenograft model において尿検体から活性型 PKC $\alpha$  が検出されることを確認した(4)。また、ごく少数の尿路上皮癌患者において尿中活性型 PKC $\alpha$  を予備的に調査し、感度よく膀胱癌を検出できることを確認している。そこで、本研究では新規尿路上皮癌バイオマーカーとして尿中活性型 PKC $\alpha$  の有用性を評価し、さらに将来の臨床導入を目的としたより安価で簡便な検査システムを開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 尿中活性型 PKC $\alpha$ の尿路上皮癌バイオマーカーとしての有用性及び特異性の評価

これまでの我々が行った小規模研究では、PKC $\alpha$  の活性が尿路上皮癌患者の尿で検出されることを確認してきたが、今後対照群も含めて症例数を増やしバイオマーカーとしての有用性を評価する。また、PKC $\alpha$  は多くの癌種においてその初期段階で活性化し、その後、進展・転移段階においても高発現していることが知られており、他の泌尿器癌においても腫瘍組織中では PKC $\alpha$  の高発現が確認できる。そこで、他の泌尿器癌における尿検体中の活性型 PKC $\alpha$  を MALDI-TOF 質量分析により測定し、尿中活性型 PKC $\alpha$  の尿路上皮癌に対する特異性を評価する。



### (2) 尿中活性型 PKC $\alpha$ 測定における簡便・安価な検査法の開発

これまでの小規模臨床研究により、尿路上皮癌患者において尿中活性型 PKC $\alpha$  が高い感度を示す可能性が示されたが、これらは MALDI-TOF 質量分析装置を用いた解析であり非常に高価であり汎用性に欠ける。そのため、臨床に導入可能な安価で簡便な検査システムを開発する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 尿中活性型 PKC の尿路上皮癌バイオマーカーとしての有用性

###### 尿中活性型 PKC による尿路上皮癌の検出

九州大学病院にて尿路上皮癌(UC)と診断された患者 141 名から早朝尿を採取し遠心分離した。沈殿物を回収し、超音波照射後、基質と反応した後、質量分析した。その結果、UC の検出感度は 85.8%と高く、High grade、Low grade それぞれの感度が 87.5%、82.1%と、特に従来の検査法にて感度が低かった Low grade においても高い感度を示した。

	陽性/検体数	感度	がん種	陽性/検体数	感度
尿路上皮がん	121/141	85.8	膀胱がん	92/106	86.8
			腎盂がん	19/22	86.4
			尿管がん	10/13	76.9
			Grade	陽性/検体数	感度
			Low	23/28	82.1
			High	91/104	87.5

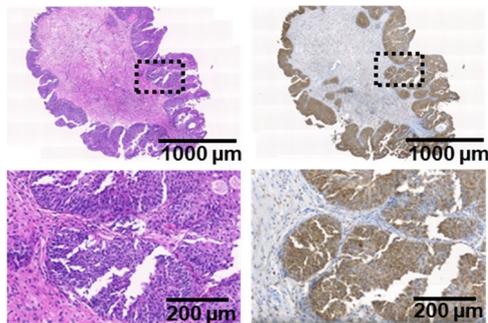


図) 低異型度癌の免疫組織染色  
尿細胞診、NMP-22、BTA、CK8/18 すべて陰性、  
かつ活性型 PKC 陽性例

HE 染色

活性型 PKC

###### 他の泌尿器癌における尿中活性型 PKC

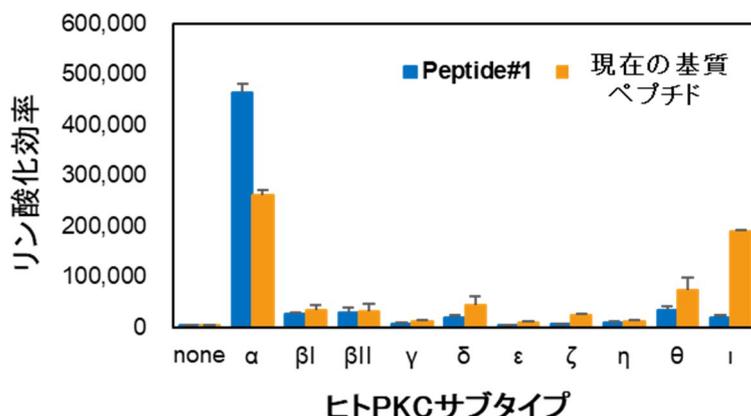
UC 症例において尿中活性型 PKC は高い感度を示したが、他の泌尿器癌を含む非 UC 患者では、活性化された PKC はほとんど検出されず、非 UC 患者群の特異度は 88.4%、尿中の活性型 PKC による診断精度は陽性的中率 91.7%、陰性的中率 80.8%、正診率 86.9%であった。以上より尿路上皮癌のバイオマーカーとしての特異性・有用性が示唆され、この知見を基に国内、国際特許申請を行った。

	陰性/検体数	特異度	疾患名	陰性/検体数	特異度
健常	20/21	95.2			
泌尿器系疾患	64/74	86.5	前立腺がん	23/26	88.5
			腎がん	21/23	91.3
			良性尿路上皮腫瘍	9/12	75.0
			副腎腫瘍	11/13	84.6
合計	84/95	88.4			

##### (2) 尿中活性型 PKC 測定における簡便・安価な検査法の開発

質量分析法による測定はコストがかかるため、より安価な検出法として抗リン酸化ペプチド抗体を作成し抗体反応を利用した検出方法開発を実施した。抗体は安定した検査精度を確立するため数種モノクローナル抗体を設計し、その中で高い親和性と特異性を有する抗体作成に成功した。また、その抗リン酸化ペプチド抗体を用いた検出システムとして、電子バイオセンサを用いた検査システムを開発し、これまでに質量分析による基質ペプチドのリン酸化率閾値を同センサでも定量可能であることを確認した。今後、臨床検体を用いた実証実験、製品化へ向けた治験を計画していく予定である。

一方で、これまでの評価において数は少ないものの一部に偽陽性を認めている。そこで、現在入手可能な各 PKC サブタイプに対する抗体を用いて、臨床検体のウエスタンブロットを行ったところ、炎症性疾患などにおいて他の PKC サブタイプの発現、活性化を認めた。基質ペプチドとこれら他の PKC サブタイプとの反応性を確認したところ、従来の基質ペプチドは PKC 以外にも複数のサブタイプと程度の差はあるものの反応を示した。よって、基質ペプチドと他の PKC サブタイプの副反応により PKC の検出性能が低下している可能性が考えられた。そこで、新たに複数の基質ペプチドを設計し、活性型 PKC との反応性を確認した。その結果、一つのペプチドにおいて従来の基質ペプチドと比較して PKC に対する高い反応性を示しながら他のサブタイプでは相対的に反応性が低く抑えられた新型基質ペプチドを作成することに成功した。今後、この新型基質ペプチドの性能評価を継続し、本ペプチドに対する抗リン酸化ペプチド抗体を作成し、更なる検査性能向上を検討する予定である。



<引用文献>

1. Isakov N. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Semin Cancer Biol.* 2018;48:36-52.
2. Kawano T, Inokuchi J, Eto M, Murata M, Kang JH. Activators and Inhibitors of Protein Kinase C (PKC): Their Applications in Clinical Trials. *Pharmaceutics.* 2021;13(11).
3. Kang JH, Asami Y, Murata M, Kitazaki H, Sadanaga N, Tokunaga E, et al. Gold nanoparticle-based colorimetric assay for cancer diagnosis. *Biosens Bioelectron.* 2010;25(8):1869-74.
4. Kawano T, Tachibana Y, Inokuchi J, Kang JH, Murata M, Eto M. Identification of Activated Protein Kinase Calpha (PKCalpha) in the Urine of Orthotopic Bladder Cancer Xenograft Model as a Potential Biomarker for the Diagnosis of Bladder Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10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 2件）

1. 著者名 Kawano Takahito, Inokuchi Junichi, Eto Masatoshi, Murata Masaharu, Kang Jeong-Hun	4. 巻 13
2. 論文標題 Activators and Inhibitors of Protein Kinase C (PKC): Their Applications in Clinical Trials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1748 ~ 1748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13111748	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 Kawano Takahito, Tachibana Yoko, Inokuchi Junichi, Kang Jeong-Hun, Murata Masaharu, Eto Masatoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Identification of Activated Protein Kinase C (PKC) in the Urine of Orthotopic Bladder Cancer Xenograft Model as a Potential Biomarker for the Diagnosis of Bladder Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9276 ~ 9276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22179276	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 Kato Minoru, Kobayashi Takashi, Matsui Yoshiyuki, Ito Katsuhiro, Hikami Kensuke, Yamada Takeshi, Ogawa Kosuke, Nakamura Kenji, Sassa Naoto, Yokomizo Akira, Abe Takashige, Tsuchihashi Kazunari, Tatarano Shuichi, Inokuchi Junichi, et. al., Japan Urological Oncology Group	4. 巻 28
2. 論文標題 Impact of the objective response to and number of cycles of platinum based first line chemotherapy for metastatic urothelial carcinoma on overall survival of patients treated with pembrolizumab	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 1261 ~ 1267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14686	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 Nagakawa Shohei, Shiota Masaki, Fujimoto Naohiro, Yamamoto Yoshiaki, Blas Leandro, Tsukahara Shigehiro, Matsumoto Takashi, Kashiwagi Eiji, Takeuchi Ario, Inokuchi Junichi, Uchiumi Takeshi, Matsuyama Hideyasu, Eto Masatoshi	4. 巻 39
2. 論文標題 The impact of single-nucleotide polymorphisms on intravesical recurrence after bacillus Calmette-Guerin therapy for non-muscle invasive bladder cancer in a genome-wide association study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations	6. 最初と最後の頁 733.e17 ~ 733.e24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.urolonc.2021.05.034	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 Ito K, Kobayashi T, Kojima T, Hikami K, Yamada T, Ogawa K, Nakamura K, Sassa N, Yokomizo A, Abe T, Tsuchihashi K, Tatarano S, Inokuchi J, et. al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Pembrolizumab for treating advanced urothelial carcinoma in patients with impaired performance status: Analysis of a Japanese nationwide cohort	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 3188 ~ 3196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3863	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 Mutaguchi Jun, Morooka Ken`ichi, Kobayashi Satoshi, Umehara Aiko, Miyauchi Shoko, Kinoshita Fumio, Inokuchi Junichi, Oda Yoshinao, Kurazume Ryo, Eto Masatoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Artificial intelligence for segmentation of bladder tumor cystoscopic images performed by U-Net with dilated convolution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Endourology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/end.2021.0483	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 Hatakeyama Shingo, Narita Shintaro, Okita Kazutaka, Narita Takuma, Iwamura Hiromichi, Fujita Naoki, Inokuchi Junichi, Matsui Yoshiyuki, Kitamura Hiroshi, Ohyama Chikara	4. 巻 52
2. 論文標題 Management of bladder cancer in older patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 203 ~ 213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyab187	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 Nishimura N, Miyake M, Iida K, Miyamoto T, Tomida R, Numakura K, Inokuchi J, Yoneyama T, Matsumura Y, Yajima S, Masuda H, Terada N, Taoka R, Kobayashi T, Kojima T, Matsui Y, Nishiyama N, Kitamura H, Nishiyama H, Fujimoto K	4. 巻 29
2. 論文標題 Prognostication in Japanese patients with bacillus Calmette Guerin unresponsive non muscle invasive bladder cancer undergoing early radical cystectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 242 ~ 249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14759	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 猪口淳一	4. 巻 34
2. 論文標題 膀胱癌薬物療法の新展開	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 泌尿器外科	6. 最初と最後の頁 1238-1244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 猪口淳一	4. 巻 15
2. 論文標題 リキッドバイオプシーを用いた尿路上皮がんの診断	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 泌尿器科	6. 最初と最後の頁 47 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 猪口淳一
2. 発表標題 泌尿器がん:薬物療法update
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪口淳一
2. 発表標題 腎尿管全摘除術における課題と今後の展望
3. 学会等名 第35回日本泌尿器内視鏡学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪口淳一
2. 発表標題 尿路上皮癌に対する新規尿中腫瘍マーカー
3. 学会等名 第30回日本腎泌尿器疾患予防医学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Inokuchi Junichi
2. 発表標題 Current evidence of systemic treatments for untreated metastatic urothelial carcinoma.
3. 学会等名 The East Asia Urological Oncology Society 2021 Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪口淳一、河野喬仁、村田正治、姜 貞勲、木下史生、松元 崇、李 賢、門司恵介、柏木英志、武内在雄、塩田真己、江藤正俊
2. 発表標題 尿路上皮癌に対する新規尿中バイオマーカーとしての活性型プロテインキナーゼC の有用性
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪口淳一、河野喬仁、村田正治、姜 貞勲、橘洋子、門司恵介、柏木英志、武内在雄、塩田真己、江藤正俊
2. 発表標題 尿路上皮癌に対する新規尿中バイオマーカーの同定
3. 学会等名 第58回 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 猪口淳一
2. 発表標題 尿路上皮癌に対する新規尿中腫瘍マーカー
3. 学会等名 日本泌尿器腫瘍学会 第6回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 がんを診断するための方法、がん診断用組成物、がん診断用キット、がんの状態を評価する方法、並びにがん予防薬及び/又は治療薬をスクリーニングする方法	発明者 村田正治、河野喬仁、江藤正俊、猪口淳一、姜貞勲	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-220139	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 がんを診断するための方法、がん診断用組成物、がん診断用キット、がんの状態を評価する方法、並びにがん予防薬及び/又は治療薬をスクリーニングする方法	発明者 村田正治、河野喬仁、江藤正俊、猪口淳一、姜貞勲	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/045257	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	村田 正治  (Murata Masaharu)  (30304744)	九州大学・先端医療イノベーションセンター・特任教授    (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	姜 貞勲  (Kang Jeong-Hun)  (50423512)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長   (84404)	
研究分担者	今田 憲二郎  (Imada Keijiro)  (80735001)	九州大学・医学研究院・助教   (17102)	
研究分担者	河野 喬仁  (Kawano Takahito)  (90526831)	九州大学・先端医療イノベーションセンター・特任助教   (17102)	

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