

平成 23 年 4 月 4 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591955

研究課題名（和文）血清中ヘパラーゼ測定法の確立と抗ヘパラーゼ薬による癌転移抑制療法の開発

研究課題名（英文）Establishment of serum Heparanase concentration measurement method and its application to gynecologic cancer treatment

研究代表者

青木 陽一 (AOKI YOICHI)

国立大学法人琉球大学・医学研究科・教授

研究者番号：40231774

研究成果の概要（和文）：血清中 Heparanase 値測定法の確立のため、ELISA 反応確認試験として、抗 HPR1 抗体と合成ペプチド、ビオチン標識ペプチドを用いた ELISA を構築し、抗ウサギ抗体を固相したマイクロプレートを用い、抗体と各ペプチドの反応が確認できた。HPR1 ペプチドとして 10～1,000nmol/l の範囲で濃度に依存する検量線を得ることができた。HPR1 ELISA キットを用いて血清サンプルの測定を行った結果、良好な添加回収率、希釈直線性が得られた。本キットを用いて血清中の HPR1 を定量することが可能であると判断された。さらに ELISA 性能評価試験では、HPR1 ペプチドに対する抗体と合成ペプチドを用いた ELISA を検討した結果、良好な反応性を確認できた。HPR1 ペプチド濃度として 1～100nmol/l の範囲で定量が可能であった。血漿を用いた ELISA も良好な反応を示し、血液サンプル測定への可能性が示され、HPR1 タンパクあるいは実際のサンプルを用いた検討を行うことで有用性の検証を行うことが可能となった。HPR1 ELISA キットを試作し血清サンプルの測定を行った結果、検量線の範囲に入る良好な結果が得られ、臨床応用が可能と判断された。

研究成果の概要（英文）：To establish a measurement method of serum heparanase titer, we constructed ELISA system using antiHPR1 antibody, synthesized peptide for heparanase, and biotin-labeled peptide. The ELISA for heparanase measurement worked well in the reaction of the antibody and the synthesized peptide between concentrations of 10 to 1,000 nmol/l of HPR1 peptide. The ELISA also worked well in the measurement of serum heparanase between concentrations of 1 to 100nmol/l of HPR1 peptide. We tried to measure the 22 serum samples from patients with cervical cancer, endometrial cancer and ovarian cancer, and were able to get appropriate titers of heparanase concentration in each sample. These data indicate that our ELISA system for the measurement of serum heparanase titer is applicable for a clinical setting.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：ヘパラーゼ、抗ヘパラーゼ抗体、血清ヘパラーゼ値、  
婦人科癌、転移抑制療法

#### 1. 研究開始当初の背景

ヘパラーゼは細胞表面、細胞外マトリックスにおいて重要な構造の一つである Heparan sulfate proteoglycan の分解酵素である。細胞株において転移能とヘパラーゼ活性との相関が報告され、臨床検体の癌細胞においても高いヘパラーゼ活性の発現およびヘパラーゼが腫瘍血管の新生を促進していることが報告された。ヘパラーゼはますます腫瘍細胞の転移・血管新生、さらに転移抑制療法との関連において注目されている。

#### 2. 研究の目的

ヘパラーゼは分泌蛋白であるため、担癌患者の血清中に検出される。そこで婦人科癌におけるヘパラーゼの発現を免疫染色で確認し、癌患者血清中のヘパラーゼ濃度を測定し、これが臨床病理学的特徴、転移、予後と関連しているかを確認することは非常に意義あることと考える。

#### 3. 研究の方法

婦人科癌臨床材料における血管新生とヘパラーゼ発現の免疫組織学的検討に関して、免疫染色法によりヘパラーゼの局在、染色強度と臨床病理学的因子、とくにリンパ節転移、遠隔転移との関係を中心に比較検討する。血清中ヘパラーゼ濃度測定法の確立に関しては、ELISA を用いたヘパラーゼ濃度測定法を確立する。担癌患者血清中ヘパラーゼ測定に関しては、本学臨床研究倫理委員会の承認を得、患者から同意取得後、採血し血清中ヘパラーゼ濃度を測定した。

#### 4. 研究成果

##### 1. ELISA 反応確認試験

1 目的：抗 Heparanase 抗体 (Anti HPR1) と合成ペプチドとの組み合わせで競合法 ELISA 反応を確認する。

2 試薬：Peptide Ab (7.11mg/mL)：Anti HPR1, Peptide (NGSQKGEDFIQLH)：HPR1, Biotin Peptide(Bio-NGSQKGEDFIQLH):Bio-HPR1, Avidin HRP (Amersham)：Av-HRP, Anti Rabbit Immunoglobulin Goat antibody：Anti Rabbit Ig, Microplate (NUNC)

3 方法 抗体固相マイクロプレートに PBST で適当に希釈した HPR1 20  $\mu$ L、Bio-HPR1 50  $\mu$ L、Anti HPR1 50  $\mu$ L を順次分注し、マ

イクロプレートリーダーで主波長 450nm、副波長 630nm における吸光度を測定した。

4 結論：HPR 1 ペプチドとして 10 ~ 1,000nmol/l の範囲で濃度に依存する検量線を得ることができた。

#### II. 反応条件検討試験

1 目的：反応に及ぼす各種条件を検討し、より高感度な測定条件を設定する。

2 試験内容：HPR 1, Bio-HPR 1, Anti HPR 1 反応時間、Avidin HRP 反応時間、HRP 酵素反応時間、Bio- HPR 濃度、Anti HPR 濃度、Avidin HRP 濃度、血漿による影響の確認を行った。

##### 3 試験結果：

1) HPR 1, Bio-HPR 1, Anti HPR 1 反応時間による影響  
振とう条件

【方法】HPR 1, Bio-HPR 1, Anti HPR 1 反応時間を振とう下で 0.5, 1, 2 時間とした場合の影響を比較検討した。

【結論】反応時間 1 時間が適当と判断した。  
静置条件

【方法】HPR 1, Bio-HPR 1, Anti HPR 1 反応時間を静置下で 1, 2, 3 時間とした場合の影響を比較検討した。

【結論】静置反応時間として 3 時間が適当と判断した。

##### 2) Avidin HRP 反応時間による影響

【方法】Av-HRP 反応時間を静置で 1, 2, 時間とした場合の影響を比較検討した。

【結論】1~3 時間で十分な吸光度が得られ、HPR1 濃度に依存する良好な検量線が得られた。反応時間として 1 時間が適当と判断した。

##### 3) HRP 酵素反応時間による影響

【方法】HRP 反応時間を 10, 20, 30 分間とした場合の影響を比較検討した。

【結論】HRP 反応時間による影響を検討した結果、反応時間は 20 分間が適当と判断した。

##### 4) Bio- HPR 濃度による影響

【方法】Bio-HPR1 濃度を 1, 2.5, 10ng/ml とした場合の影響を比較検討した。

【結論】Bio-HPR1 濃度として 2.5ng/ml が適当と判断した。

5) Anti HPR 濃度による影響

【方法】Anti HPR1 濃度を 100, 500, 2500ng/ml とした場合の影響を比較検討。

【結論】Anti HPR1 濃度として 500ng/ml が適当と判断した。

6) Avidin HRP 濃度による影響【方法】Avidin HRP 濃度を 5000, 10000, 20000 倍希釈した場合の影響を比較検討。【結論】Avidin HRP 濃度として 10,000 倍希釈が適当と判断した。

7) 血漿による影響【方法】HPR1 ペプチド標準品を希釈する溶液として PBST と血漿を用い比較検討した。【結論】血液サンプル測定の可能性を検討する上で、HPR1 ペプチドを血漿に添加し測定を行った結果、PBST に添加した場合と同程度の反応が確認された。

III. 血清サンプル反応性評価検討試験

1 目的：Anti HPR1 抗体と合成ペプチドとの組み合わせで得られた競合法 ELISA 反応を用いて血清中 HPR1 の測定を評価検討する。

2 ELISA キット：抗体固相マイクロプレート (Anti Rabbit IgG 固相) 抗 HPR1 抗体、標準 HPR1、Biotin HPR1、Avidin HRP

3 試験内容：添加回収試験、希釈試験、添加希釈試験

4 試験サンプル：以下の 5 検体についてサンプルとして測定：No. 9003, 9005, 9019, No. A, B

5 結果

1) 添加回収試験【方法】5 検体に各々 3, 10, 30nmol/L 相当の HPR1 peptide を加えて測定を行った。【結果】回収率まとめ

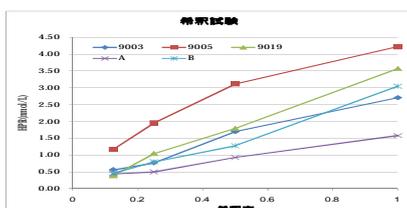
添加濃度	9003	9005	9019	A	B
3	89.3%	117.2%	102.7%	86.3%	112.0%
10	98.1%	125.5%	107.4%	93.9%	112.6%
30	97.1%	125.0%	109.0%	93.5%	110.3%
平均回収率	94.8%	122.5%	106.3%	91.2%	111.6%

【結論】本 ELISA において血清中の HPR1 が定量的に測定できることが確認された。

2) 希釈試験

【方法】5 検体を各々、PBS で 2 倍づつ段階的(x2, 4, 8)に希釈し測定を行った。

【結果】

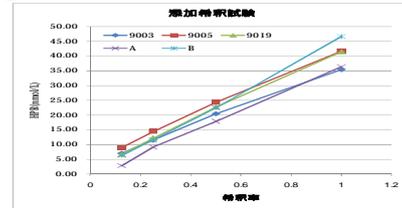


【結論】異なる 5 検体を PBS で 2 倍希釈を行った結果、いずれも希釈に伴い濃度の低下が確認され原点に収束する希釈直線性を示した。

3) 添加希釈試験

【方法】希釈試験 5 検体に一定量の HPR1 を添加後に、各々、PBS で 2 倍づつ段階的(x2, 4, 8)に希釈し測定を行った。

【結果】



【結論】異なる 5 検体に一定量の HPR1 を添加後に PBS で 2 倍希釈を行った結果、いずれも希釈に伴い濃度の低下が確認され原点に収束する希釈直線性を示した。

6 結論

1) HPR1 ELISA キットを用いて良好な添加回収率、希釈直線性が得られた。

2) 本キットを用いて血清中の HPR1 を定量することが可能であると判断された。

IV. ELISA 性能評価試験

1 目的：HPR1 ELISA キットを用いて性能 (同時再現性、特異性) を評価検討する。

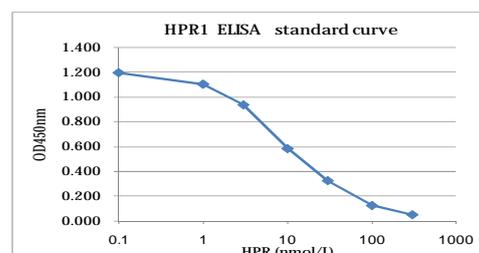
2 試験試薬：抗体固相マイクロプレート (Anti Rabbit IgG 固相) 抗 HPR1 抗体、標準 HPR1、Biotin HPR1、Avidin HRP

3 試験内容：異なる 3 濃度のサンプルを用いて 5 重測定の再現性と特異性を検討する。

4 試験サンプル：HPR1 として 3, 10, 100nmol/L のサンプルの測定。

5 試験結果

1) 標準液吸光度



2) サンプル測定結果

	A	B	C
1	3.29	11.82	95.63
2	3.08	9.32	96.66
3	3.79	12.79	91.69
4	3.66	11.91	93.62
5	4.34	10.27	108.11
AVG	3.63	11.22	97.14
S.D.	0.49	1.40	6.42
C.V.%	13.41%	12.45%	6.61%

3) 結論：異なる3, 10, 30nmol/Lの濃度において同時再現性として6.61~13.41%と良好な再現性を示した。

6 結論

- 1) HPR1 ペプチドに対する抗体と合成ペプチドを用いた ELISA を検討した結果、良好な反応性を確認できた。
- 2) HPR1 ペプチド濃度として1~100nmol/l の範囲で定量が可能であった。
- 3) 血漿を用いた ELISA も良好な反応を示し、血液サンプル測定への可能性が示された。
- 4) HPR1 タンパクあるいは実際のサンプルを用いた検討を行うことで有用性の検証を行うことが可能となった。

V. ELISA キット試作、サンプル測定 1

目的：抗 HPR1 抗体と合成ペプチドとの組み合わせで得られた競合法 ELISA 反応を用いて測定キットを試作し血清中 HPR1 を測定する。

2 ELISA キット試作

3 試験内容：サンプル測定（22 検体）

4 試験サンプル：婦人科癌患者の血清 22 検体についてサンプルとして測定する。

5 結果

サンプル測定

【方法】22 検体の 2 重測定を行い、検量線を用いて濃度(nmol/L)を算出した。

【結果】

Sample	OD450		HPR 1 (nmol/L)		AVG
	1	2	1	2	
1	1.146	1.152	1.63	1.57	1.60
2	1.161	1.158	1.49	1.52	1.51
3	1.144	1.114	1.65	1.97	1.81
4	1.101	1.078	2.12	2.40	2.26
5	1.150	1.156	1.59	1.54	1.57
6	1.163	1.174	1.47	1.37	1.42
7	1.079	1.064	2.39	2.58	2.49
8	1.107	1.093	2.05	2.22	2.14
9	1.163	1.146	1.47	1.63	1.55
10	1.053	1.042	2.72	2.87	2.80
11	1.118	1.155	1.93	1.55	1.74
12	1.139	1.101	1.71	2.12	1.92
13	1.126	1.133	1.84	1.77	1.81
14	1.142	1.165	1.67	1.45	1.56
15	1.096	1.039	2.18	2.92	2.55
16	1.036	1.069	2.96	2.51	2.74
17	0.936	0.988	4.62	3.69	4.16
18	1.145	1.188	1.64	1.24	1.44
19	1.151	1.174	1.58	1.37	1.48
20	1.151	1.070	1.58	2.50	2.04
21	1.120	1.076	1.91	2.42	2.17
22	1.158	1.063	1.52	2.59	2.06

【結論】異なる 22 検体の測定を行った結果、いずれも検量線の範囲に入る濃度が得られた。6 結論 HPR1 ELISA キットを試作し血清サンプルの測定を行った結果、検量線の範囲に入る良好な結果が得られた。

5 . 主な発表論文等（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- 1) Ferdousi J, Nagai Y, Asato T, Hirakawa M, Inamine M, Kudaka W, Kariya K, Aoki Y. (2010) Impact of human papillomavirus genotype on response to treatment and survival in patients receiving radiotherapy for squamous cell carcinoma of the cervix. *Exp Ther Med* 1:525-530. (査読有)
- 2) Nakayama K, Ishikawa M, Nagai Y, Yaegashi N, Aoki Y, Miyazaki K. (2010) Prolonged long-term survival of low grade endometrial stromal sarcoma (LGESS) patients with lung metastasis following treatment with medroxyprogesterone acetate (MPA) . *Int J Clin Oncol* 15: 179-183. (査読有)
- 3) Nakayama K, Nagai Y, Ishikawa M, Aoki Y, Miyazaki K. (2010) Concomitant postoperative radiation and chemotherapy following surgery was associated with improved overall survival in patients with FIGO stage III and IV endometrial cancer. *Int J Clin Oncol* 15: 440-6. (査読有)
- 4) Sunagawa N, Inamine M, Norioka T, Chiba I, Morita N, Aoki Y, Suzui M, Yoshimi N. (2009) Inhibitory effect of rice bran-derived crude glycosphingolipid on colon preneoplastic biomarker lesions induced by azoxymethane in male F344 rats. *Mol Med Rep* 2:45-50. (査読有)
- 5) Hirakawa M, Nagai Y, Inamine M, Kamiyama K, Toita T, Ogawa K, Murayama S, Aoki Y. (2008) Predictive factors of distant recurrence in locally advanced squamous cell carcinoma of the cervix treated with concurrent chemoradiotherapy. *Gynecol Oncol* 108:126-129. (査読有)
- 6) Nashiro T, Yagi C, Hirakawa M, Inamine M, Nagai Y, Sakumoto K, Tamaki W, Ogawa K, Toita T, Aoki Y. (2008) Concurrent chemoradiation for locally advanced squamous cell carcinoma of the vagina: Case series and literature review. *Int J Clin Oncol* 13:335-339. (査読有)
- 7) Ogawa K, Yoshii Y, Aoki Y, Nagai Y, Tsuchida Y, Toita T, Kakinohana Y, Tamaki W, Iraha S, Adachi G, Hirakawa M, Kamiyama K, Inamine M, Hyodo A, Murayama S. (2008)

- Treatment and prognosis of brain metastases from gynecological cancers. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 48:57-63. (査読有)
- 8) Kudaka W, Oda T, Jinno Y, Yoshimi N, Aoki Y. (2008) Cellular localization of placenta-specific human endogenous retroviruses (HERVs) transcript and their possible implication in pregnancy-induced hypertension. *Placenta* 29:282-9. (査読有)
  - 9) Inamine M, Nagai Y, Hirakawa M, Mekaru K, Yagi C, Masamoto H, Aoki Y. (2008) Heparanase expression in endometrial cancer: Analysis of immunohistochemistry. *J Obstet Gynaecol* 28: 634-637. (査読有)
  - 10) Nishino K, Sekine M, Kodama S, Sudo N, Aoki Y, Seki N, Tanaka K. (2008) Cigarette smoking and polymorphism of glutathione S-transferase M1 associated with risk for uterine cervical cancer. *J Obstet Gynecol Res* 34:994-1001. (査読有)
  - 11) Hirakawa M, Nagai Y, Yagi C, Nashiro T, Inamine M, Aoki Y. (2008) Neoadjuvant chemotherapy followed by extended-field concurrent chemoradiotherapy in squamous cell carcinoma of the cervix with positive para-aortic lymph node: Two cases report. *Eur J Gynaecol Oncol* 29:171-173. (査読有)
  - 12) Hirakawa M, Nagai Y, Yagi C, Nashiro T, Inamine M, Aoki Y. (2008) Recurrent juvenile granulosa cell tumor of the ovary managed by palliative radiotherapy. *Int J Gynecol cancer* 18:913-915. (査読有)
- [学会発表](計 11 件)
- 1) Asato K., Nagai Y, Oyakawa M, Nitta H, Okubo E, Hirakawa M, Kudaka W, Inamine M, Toita T, Aoki Y. Risk factors for tumor recurrence in patients with stage III-IVA squamous cell carcinoma of the cervix treated with concurrent chemoradiotherapy. International Gynecological Cancer Society biennial meeting. Prague 2010, 10.23-26.
  - 2) Nagai Y, Asato K, Hirakawa M, Inamine M, Kudaka W, Toita T, Aoki Y. Locally advanced adenocarcinoma of the cervix treated with concurrent concurrent chemoradiotherapy using paclitaxel and cisplatin. International Gynecological Cancer Society biennial meeting. Prague 2010, 10.23-26.
  - 3) Kudaka W, Hirakawa M, Nagai Y, Toita T, Inamine M, Ogawa K, Aoki Y. High-risk group for loco-regional recurrence in patients with stage IB-II squamous cell carcinoma of the cervix treated with concurrent chemoradiotherapy. International Gynecological Cancer Society biennial meeting. Prague 2010, 10.23-26.
  - 4) Yoneyama K, Konishi H, Yahata T, Fujita K, Doi D, Honma S, Kodama S, Katoh H, Nakayama H, Kurose K, Aoki Y, Asakura H, Tanaka K, Takeshita T, Gynecologic Cancer Network. Long term follow-up of advanced ovarian cancer patients treated with biweekly paclitaxel/carboplatin (TC) combination chemotherapy. International Gynecological Cancer Society biennial meeting. Prague 2010, 10.23-26.
  - 5) Takano T, Otsuki T, Yaegashi N, Tase T, Nakahara K, Yokoyama Y, Aoki D, Nakayama H, Takehara H, Katabuchi H, Yamada H, Kikkawa F, Fujimoto T, Emoto M, Kamoi S, Arakawa A, Morimura Y, Hiura M, Aoki Y, Fujimoto H, Sato S, Kotera K, Japan Uterine Sarcoma Study Group. Adjuvant paclitaxel and carboplatin in patients with complementaly or optimally resected carcinosarcomas (mixed mesodermal tumors) of the uterus. International Gynecological Cancer Society biennial meeting. Prague 2010, 10.23-26.
  - 6) Ferdousi J, Nagai Y, Asato T, Hirakawa M, Inamine M, Kudaka W, Kariya K, Aoki Y. Impact of human papillomavirus genotype on response to treatment and survival in patients receiving radiotherapy for squamous cell carcinoma of the cervix. The 62<sup>nd</sup> Annual Congress of Japan Society of Obstetrics and Gynecology Tokyo 2010.4.23-25.
  - 7) Kudaka W, Hirakawa M, Inamine M, Nagai Y, Aoki Y. Impressive 3 cases we enrolled in phase III study of S-1+cisplatin combination chemotherapy acompared with single agent cisplatin in stage IVB, recurrent, or persistent carcinoma of the cervix. The 8<sup>th</sup> Japan-Korea Gynecologic Cancer Joint Meeting, Tokyo 2009.11.21
  - 8) Aoki Y, Inamine M, Hirakawa M, Kudaka W, Nagai Y. Heparanase expression and angiogenesis in endometrial cancer: Analyses of RT-PCR and immunohistochemistry. ASCO, Orland, FL. 2009.5.29-6.2.
  - 9) Inamine M, Nagai Y, Hirakawa M, Kudaka W, Aoki Y. A preliminary study of concurrent radiotherapy using paclitaxel and CDDP for locally advanced adenocarcinoma of the uterine cervix. 12<sup>th</sup> Biennial meeting International Gynecologic Cancer Society Bangkok, Thailand October 25-28, 2008.
  - 10) Nagai Y, Wakayama A, Inamine M, Hirakawa M, Tamaki W, Ogawa K, Toita T, Murayama S, Aoki Y. Two cases of high risk gestational trophoblastic neoplasia with brain metastases successfully treated with

whole brain irradiation and high-dose MTX  
EMA/CO. 12<sup>th</sup> Biennial meeting  
International Gynecologic Cancer Society  
Bangkok, Thailand October 25-28, 2008.

- 11) Toita T, Nagai Y, Tamaki W, Ariga T,  
Kasuya G, Ogawa K, Kakinohana Y,  
Hirakawa M, Inamine M, Yagi C, Aoki Y,  
Murayama S. Concurrent  
chemoradiotherapy using high-dose rate  
intracavitary brachytherapy for  
locoregionally advanced uterine cervical  
cancer. 12<sup>th</sup> Biennial meeting International  
Gynecologic Cancer Society Bangkok,  
Thailand October 25-28, 2008.

〔図書〕(計5件)

- 1) 青木陽一 患者さんご家族のための子  
宮頸がん・子宮体がん・卵巣がん治療ガ  
イドラインの解説 日本婦人科腫瘍学会  
(編), 69-71, 金原出版 東京 2010.
- 2) Aoki Y, Inamine M, Hirakawa M, Kudaka W,  
Nagai Y, Masamoto H, Watanabe M.  
Heparanase expression and angiogenesis in  
endometrial cancer: Analyses of RT-PCR and  
immunohistochemistry. *Current Research in  
Cancer. Research Media, Kerala, India, pp  
13-27, 2009.*
- 3) Aoki Y, Hirakawa M, Inamine M, Kudaka W,  
Nagai Y. Concurrent chemoradiotherapy:  
Predictor of distant recurrence in squamous  
cell carcinoma of the cervix, and Recent  
aspect in carcinoma of the vagina. *Reaearch  
Advances in Obstetrics and Gynaecology,  
GLOBAL RESEARCH NETWORK, Kerala,  
India, pp 1-17, 2009.*
- 4) Aoki Y, Tanaka K. Ovarian Cancer: New  
Research (Horizons in Cancer Research,  
Volume 19); Chapter IV Docetaxel in  
Combination with Carboplatin as first-line  
chemotherapy for Patients with Epithelial  
Ovarian Cancer. Ed: Bardos, A. P. *Nova  
Science Publishers, Hauppauge, NY. USA,  
pp 103-116, 2009.*
- 5) 青木陽一 今日の治療指針 私はこう治療  
している 21.産婦人科疾患 絨毛性  
疾患 山口徹、北原光夫、福井次矢(編),  
942-943, 医学書院 東京 2009.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.ryukyu-obgyn.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 陽一 (AOKI YOICHI)  
国立大学法人琉球大学・医学研究科・教授  
研究者番号：40231774

(2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

(3) 連携研究者

稲嶺 盛彦 (INAMINE MORIHIKO)  
国立大学法人琉球大学・医学研究科・助教  
研究者番号：90437989