

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月22日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390183

研究課題名（和文） 抗 IAP 抗体スクリーニングアレイを用いた癌診断法の実用化

研究課題名（英文） Development of auto-IAP-antibody screening array for diagnosing cancer patients.

研究代表者

渡邊 直樹 (WATANABE NAOKI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：10158644

研究成果の概要（和文）：

分子生物学の進歩に伴い、癌で発現が亢進あるいは低下し、浸潤・転移能の増強や治療抵抗性と密接に関与する分子群が、報告されるようになった。今回我々は、抗 Survivin, 抗 Livin および抗 XIAP 自己抗体に着目し、自動分析機器に搭載可能な検出系を開発した。本検出系を用い、大腸癌や前癌病変である大腸ポリープにおける陽性率を、既存の腫瘍マーカーと比較検討した。いまだ途中経過であるが、大腸癌における抗 Livin 自己抗体の陽性率は 2.4% と低かった。また、比較対照とした既存の腫瘍マーカーである CEA, CA19-9 や抗 p53 自己抗体のそれは、それぞれ 39.8%, 21.6%, 25.0% であった。一方、抗 Survivin と抗 XIAP 自己抗体に関しては、それぞれ 37.5%, 36.3% と高く、CEA など他の腫瘍マーカーと比べ、早期癌のみならず大腸ポリープの検出能が有意に優れていた。

研究成果の概要（英文）：

The inhibitor of-apoptosis (IAP) family proteins are shown to be advantageous to cancer in many circumstances, including carcinogenesis, promotion, and therapy resistance. In this study, we focused on expression of anti-survivin, anti-livin and anti-XIAP antibodies as tumor markers in patients with colorectal polyp and cancer, and developed the screening array that can be automated. We compared positivity of anti-survivin, anti-livin, and anti-XIAP antibodies with existing tumor markers, including carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9), and anti-p53 antibody. So far, positivity of anti-livin antibody in patients with colorectal cancer was low at 2.4%; positivity of CEA, CA19-9, and anti-p53 antibody were 39.8%, 21.6%, and 25.0%, respectively. Positivity of anti-survivin and anti-XIAP antibodies was higher than other tumor markers at 37.5% and 36.3%, respectively. Furthermore, expression of anti-survivin and anti-XIAP antibodies was found not only in patients with early stage colorectal cancer but also in patients with colorectal polyps.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

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：腫瘍検査学

### 1. 研究開始当初の背景

分子生物学の進歩に伴い、癌で発現が亢進あるいは低下し、浸潤・転移能の増強や治療抵抗性と密接に関与する分子群が、報告されるようになった。IAP (inhibitor of apoptosis) ファミリーもその一つで、アポトーシスの実行分子である Caspase の活性阻害を介して、抗アポトーシス作用を発揮する。IAP ファミリーには、NAIP, XIAP, cIAP1, cIAP2, Survivin, Livin や TsIAP などがあり、いずれも構造的には Caspase との結合に必要な BIR (baculoviral IAP repeat) 領域を 1~3 個持っている。

これまで我々は、大腸癌や乳癌組織および造血器悪性腫瘍細胞において Survivin が、肺癌組織では Livin が、それぞれ高発現することを報告してきた。いずれも、正常細胞ではほとんど発現がみられないため、癌診断や治療の標的分子として注目されている。

一方、癌抗原に対しては細胞性免疫のみならず、液性免疫反応すなわち自己抗体が誘導される。自己抗体には、固有の癌に特異なものと、各種癌に共通するものの 2 種類がある。後者として、変異型癌抑制遺伝子産物 (変異型 p53 など)、癌化によりその発現量が増加する分子 (HER-2/neu など) や臓器特異抗原であるが各種癌に発現する分子 (MAGE など) に対する抗体が、知られている。

### 2. 研究の目的

今回我々は、自動分析機器に搭載可能な Survivin, Livin や XIAP など複数の IAP ファミリー分子に対する自己抗体検出系を開発し、これらを組み合わせた新たな癌の血清学的診断法の実用化を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象

札幌医科大学附属病院および協力病院で、あらかじめ同意が得られた大腸癌 (88 例) や切除術を施行した大腸ポリープ (82 例) 患者と、健常者 (39 例) の血清を用いた。

#### (2) ELISA

精製リコンビナント蛋白を 96 ウェルプレート (Coster) に  $100\mu\text{l}$  添加し、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩固相化した。抗原を除去後、0.05% Tween20 入り phosphate-buffered saline (PBS-T) で 2 回洗浄した。次に、1% ブロックエース液 (大日本住友製薬) で、常温、2 時間ブロッキングを行い、さらに PBS-T で 4 回洗浄した。0.25% ブ

ロックエース液 (blocking buffer) で 1,000 倍に希釈した健常者あるいは患者の血清を  $100\mu\text{l}$  ずつウェルに加え、室温で 1 時間、抗原と反応させた。PBS-T で 4 回洗浄後、blocking buffer で 6,000 倍に希釈した HRP 結合 rabbit anti-human IgG (DAKO)  $100\mu\text{l}$  を添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS-T で 4 回洗浄後、TMB Blue 基質 (DAKO)  $100\mu\text{l}$  を加え、室温で 30 分間発色を行った。1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液  $100\mu\text{l}$  で反応を停止後、主波長 450、副波長 620nm で吸光度を測定した。

### 4. 研究成果

(1) ELISA で抗原に用いる自家製リコンビナント Survivin および Livin 蛋白の特異性  
抗ヒト Survivin あるいは抗ヒト Livin 市販抗体の 1 万倍希釈液を、それぞれの市販リコンビナント蛋白 (最終濃度  $30\mu\text{g/ml}$ ,  $5\mu\text{g/ml}$ ) で吸収後、自家製リコンビナント蛋白を固相化抗原として ELISA を行った。その結果、吸収処理後には吸光度がほぼ完全に消失していた (図 1)。すなわち、自家製リコンビナント蛋白の特異性に問題はなかった。なお、市販抗体を自家製リコンビナント蛋白で吸収し、市販リコンビナント蛋白を固相化抗原として行った逆の解析でも、同様の結果が得られた。XIAP については、市販リコンビナント蛋白の入手が困難で、今回は検討できなかった。

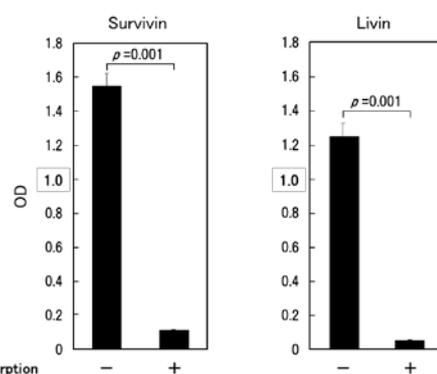


図 1 自家製リコンビナント蛋白の特異性

#### (2) 検出系の自動分析機器への搭載条件の設定と検量線

「全自動マイクロプレート EIA 分析装置 EVOLIS」への搭載条件を検討し、最終的に blocking buffer の除去操作以降を自動化し

た。なお、抗原固相化と非固相化(ブランク)ウェルに試料を添加し吸光度を測定後、両者の差を用いて検量線から値を求めた。検量線用の市販抗体希釈液は、機器の測定可能域内で直線性が保たれる条件下とし、ブランクを含め5段階の濃度を設定した(図2, 3, 4)。

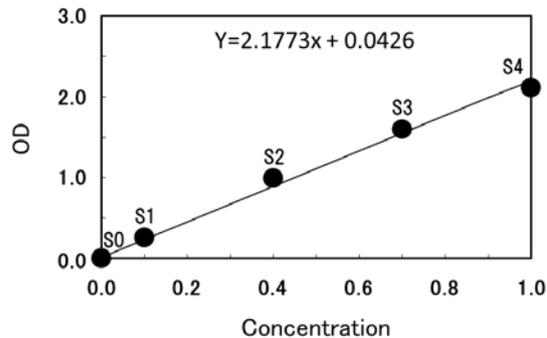


図2 抗 Survivin 自己抗体の検量線

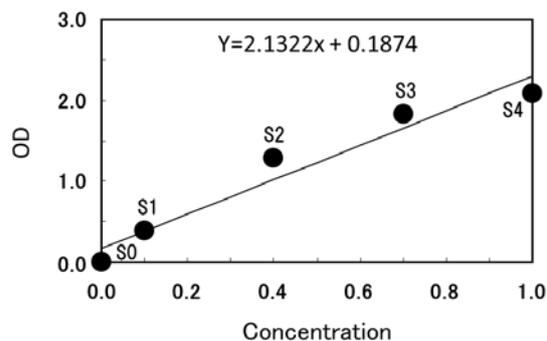


図3 抗 Livin 自己抗体の検量線

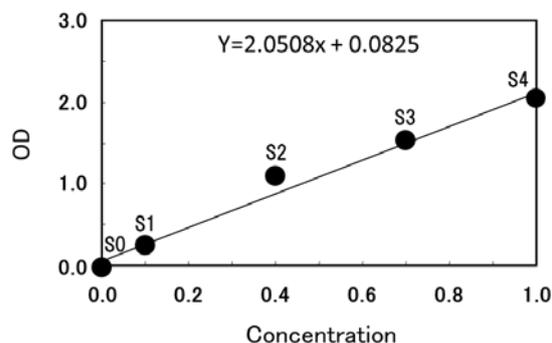


図4 抗 XIAP 自己抗体の検量線

(3)大腸癌患者における抗 Survivin, 抗 Livin および抗 XIAP 自己抗体の陽性率  
健常者 39 例の血清を用いて ELISA を行い、その平均値+2SD をカットオフ値(図中点線)とした。抗 Survivin 自己抗体は 0.10, 抗

Livin 自己抗体は 0.97, 抗 XIAP 自己抗体のそれは 0.08 であった。そこで、本検出系を用い、大腸癌患者 88 例における抗 IAP 自己抗体の陽性率を調べた(図 5, 6, 7)。その結果、抗 Survivin と抗 XIAP 自己抗体がそれぞれ 37.5%, 36.3% と高く、抗 Livin 自己抗体は 2.4% と前二者に比べ著しく低値であった。また、比較対照とした既存の腫瘍マーカーについては、CEA が 39.8% と陽性率が最も高く、抗 p53 自己抗体 (25.0%), CA19-9 (21.6%) の順であった(表 1)。次に、各腫瘍マーカーの病期別陽性率を比較検討した(表 2)。CEA は最も高頻度で大腸癌を検出したが、ステージ 0 および I 期の 13 例に陽性者はいなかった。一方、抗 Survivin 自己抗体は 46.2% (6/13), 抗 XIAP 自己抗体のそれは 38.5% (5/13) と、早期から検出されていた。また、既存の腫瘍マーカーである抗 p53 自己抗体に関しては、全体の陽性率が前述したごとく 25.0% と劣っているのみならず、ステージ 0 および I 期のそれも 23.1% (3/13) と、抗 Survivin および抗 XIAP 自己抗体よりも低かった。

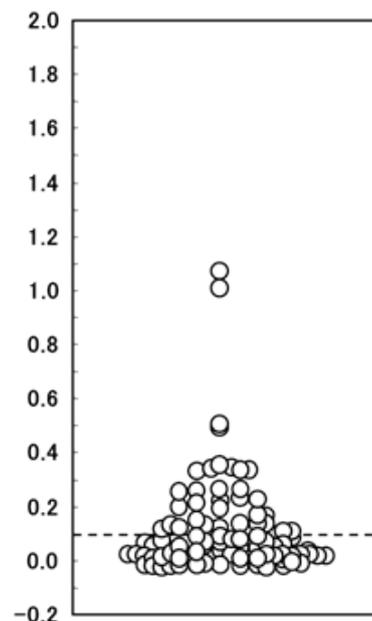


図5 大腸癌患者における抗ヒト Survivin 自己抗体の測定値

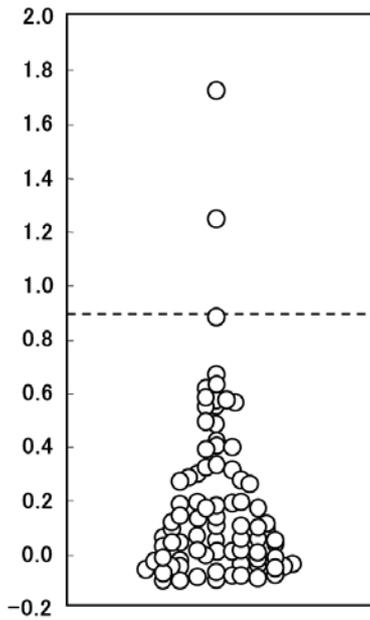


図6 大腸癌患者における抗ヒトLivin自己抗体の測定値

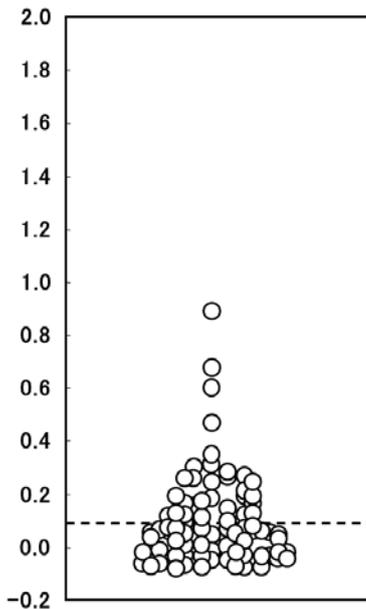


図7 大腸癌患者における抗ヒトXIAP自己抗体の測定値

表1 各項目の陽性率

	抗Survivin 自己抗体	抗Livin 自己抗体	抗XIAP 自己抗体	CEA	CA19-9	抗p53 自己抗体
大腸癌 (n=88)	37.5%	2.4%	36.3%	39.8%	21.6%	25.0%
大腸ポリープ (n=82)	24.4%	0.0%	13.4%	4.9%	2.4%	1.2%

表2 大腸癌患者における各項目の病期別陽性率

Stage	抗Survivin 自己抗体	抗Livin 自己抗体	抗XIAP 自己抗体	CEA	CA19-9	抗p53 自己抗体
0 (n=3)	100.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%
I (n=10)	30.0%	0.0%	20.0%	0.0%	0.0%	30.0%
II (n=20)	30.0%	5.0%	25.0%	25.0%	10.0%	31.6%
III (n=25)	44.0%	0.0%	36.0%	28.0%	8.0%	32.0%
IV (n=30)	33.3%	3.4%	46.7%	80.0%	48.3%	17.2%

(4)大腸ポリープ患者における抗Survivin, 抗Livinおよび抗XIAP自己抗体の陽性率  
大腸ポリープ患者82例を対象とし, 同様に解析を行った(表1)。その結果, 既存の腫瘍マーカーであるCEA, CA19-9および抗p53自己抗体に関しては, それぞれ4.9%, 2.4%, 1.2%と陽性率は低かった。また, 興味深いことに, 抗Survivinおよび抗XIAP自己抗体は, それぞれ24.4%, 13.4%と, 他の4者に比べ有意に高い陽性率を示した。この結果は, SurvivinやXIAPの誘導が, 前癌病変である大腸ポリープの段階から起こることを意味している。すなわち, 本法を用い前癌病変の大腸ポリープも含めた大腸癌の血清学的診断法が, 開発できる可能性がある。現在, さらに症例数を増やし, 各種臨床背景との関係や最善の組み合わせ法などに関し, 解析を進めている。

### 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 10件)

- 1 Kobayashi D, Kuribayashi K, Watanabe N. SALL4 is essential for cancer cell proliferation and is overexpressed at early clinical stages in breast cancer. Int J Oncol, 査読有, 2011, 38: 933-939.
- 2 Kobayashi D, Kuribayashi K, Tanaka M, Watanabe N. Overexpression of SALL4 in lung cancer and its importance in cell proliferation. Oncol Rep, 査読有, 2011, 26: 965-970.
- 3 Onoda C, Kuribayashi K, Nirasawa S, Tsuji N, Tanaka M, Kobayashi D, Watanabe N.  
(-)-Epigallocatechin-3-gallate

- induces apoptosis in gastric cancer cell lines by down-regulating survivin expression. *Int J Oncol*, 査読有, 2011, 38: 1403-1408.
- 4 Tanabe H, Kuribayashi K, Tsuji N, Tanaka M, Kobayashi D, Watanabe N. Sesamin induces autophagy in colon cancer cells by reducing tyrosine phosphorylation of EphA1 and EphB2. *Int J Oncol*, 査読有, 2011, 39: 33-40.
- 5 Koshida S, Asanuma K, Kuribayashi K, Goto M, Tsuji N, Kobayashi D, Tanaka M, Watanabe N. Prevalence of human anti-mouse antibodies (HAMAs) in routine examinationns. *Clin Chim Acta*, 査読有, 2010, 411: 391-394.
- 6 Goto M, Kuribayashi K, Umemori Y, Ohe Y, Asanuma K, Tanaka M, Kobayashi D, Watanabe N. High prevalence of human anti-mouse antibodies in the serum of colorectal cancer patients. *Anticancer Res*, 査読有, 2010, 30: 4353-4356.
- 7 Umemori Y, Ohe Y, Kuribayashi K, Tsuji N, Nishidate T, Kameshima H, Hirata K, Watanabe N. Evaluating the utility of N<sup>1</sup>, N<sup>12</sup>-diacetylspermine and N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-diacetylspermidine in urine as tumor markers for breast and colorectal cancers. *Clin Chim Acta*, 査読有, 2010, 411: 1894-1899.
- 8 Furuya M, Tsuji N, Kobayashi D, Watanabe N. Interaction between survivin and aurora-B kinase plays an important role in surviving-mediated up-regulation of human telomerase reverse transcriptase expression. *Int J Oncol*, 査読有, 2009, 34: 1061-1068.
- 9 Moriai R, Tsuji N, Moriai M, Kobayashi D, Watanabe N. Survivin plays as a resistant factor against tamoxifen-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 査読有, 2009, 117: 261-271.
- 10 Moriai M, Tsuji N, Kobayashi D, Kuribayashi K, Watanabe N. Down-regulation of hTERT expression plays an important role in 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub>-iuduced apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol*, 査読有, 2009, 34: 1363-1372.
- [学会発表] (計 8 件)
- 1 栗林景晶, 小林大介, 渡邊直樹. ゴマリグナン由来 Sesamin による癌細胞増殖抑制機序の解析. 第 24 回バイオセラピー学会学術集会総会, 2011 年 12 月 1 日, 和歌山.
- 2 小林大介, 近藤 崇, 栗林景晶, 田中真樹, 渡邊直樹. 白血病細胞におけるチロシンキナーゼ STYK1 遺伝子の発現増強とその臨床的意義. 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会, 2011 年 11 月 20 日, 岡山.
- 3 Kuribayashi K, Goto M, Endoh A, Moriai R, Tanabe H, Kondoh T, Tanaka M, Kobayashi D, Watanabe N. Identification of novel SEREX antigens in aplastic anemia. 第 7 3 回日本血液学会学術集会, 2011 年 10 月 14 日, 名古屋.
- 4 渡邊直樹. シンポジウム「予防医学と臨床検査-分担-がん検診における腫瘍マーカーの位置づけ」. 第 50 回日本臨床化学会年次学術集会, 2010 年 9 月 24 日, 甲府.
- 5 後藤真希, 栗林景晶, 浅沼康一, 越田早織, 辻 直樹, 田中真樹, 小林大介, 渡邊直樹. 大腸癌患者におけるヒト抗マウス抗体 (HAMA) の出現頻度と認識部位の解析. 第 50 回日本臨床化学会年次学術集会, 2010 年 9 月 25 日, 甲府.
- 6 Kuribayashi K, Krigsfeld G, Wang W, Mayes p.A., Dicker D. T., Wu G. S., Watanabe N, El-Deiry W. S.. TNFSF10 (TRAIL), a p53 target gene that mediates p53-dependent cell death. 第 6 8 回日本癌学会学術総会, 2009 年

10月1日, 横浜.

- 7 栗林景晶, 渡邊直樹. 抗癌剤は p53 による TRAIL の誘導を惹起し, 癌細胞をアポトーシスに導く. 第 56 回日本臨床検査医学会学術集会, 2009 年 8 月 28 日, 札幌.
- 8 浅沼康一, 越田早織, 辻 直樹, 栗林景晶, 田中真樹, 小林大介, 渡邊直樹. 異好抗体検出用 ELISA システムによるヒト抗マウス抗体 (HAMA) 出現頻度の解析. 第 56 回日本臨床検査医学会学術集会, 2009 年 8 月 28 日, 札幌.

[図書] (計 1 件)

1. 渡邊直樹, 小林大介. 総合医学社, パーフェクトガイド検査値事典, 2011, 460-471.

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 直樹 (WATANABE NAOKI)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10158644

(2) 研究分担者

小林 大介 (KOBAYASHI DAISUKE)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 50295359

栗林 景晶 (KURIBAYASHI KAGEAKI)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 50381257

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: