

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 6 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590636

研究課題名（和文） 新規癌細胞分泌タンパク質による早期大腸癌血清診断法の確立

研究課題名（英文） Multi-marker serum test for early colorectal cancer.

研究代表者

菊池 正二郎 (KIKUCHI SHOJIRO)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：70381960

研究成果の概要（和文）：

血清中 Dermokine（以下 DK）認識 ELISA 測定系を確立して、市販抗体との組み合わせで蛍光標識による高感度 DK 測定 ELISA を確立した。大腸癌患者血清 130 症例における血清中 Dermokine を測定したところ、早期がんにおける陽性率は CEA/p53 自己抗体/CA19-9 に比べて高く、重複も少ない結果であった。結果としては早期癌の 60.7% が診断可能であった。DK 測定系が大腸癌診断に有用であると判断するためには、大腸癌以外の癌種における測定を行う必要がある。そのために胃癌・膵癌・肝臓癌などの患者血清（800 症例）を測定した。結果としては、胃癌・肝臓癌では DK の陽性例は大腸癌よりは少なかった。しかし、膵癌と膵管内嚢胞性腫瘍である IPMN では高頻度に血清 DK 高値であり、大腸がんと同様に既存血清マーカー（CA19-9）との併用で進行膵がんや IPMN 関連膵腫瘍に関して高い陽性率が得られた。

研究成果の概要（英文）：

We established an experimental enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect Dermokine the serum of colorectal cancer patients. DK test improved the positive detection rate for early-stage tumors. The sensitivity was 60.7% to detect T1 colorectal cancer using multi-marker test (DK and CEA/CA19-9/p53, n=130). DK test was useful to detect pancreatic cancer including IPMN and invasive ductal carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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

Dermokineは、本研究の研究分担者である松井らによって 2004 年に同定された重層上皮特異的新規分泌蛋白質である。(Matsui *et al.*, Genomics 2004)マウスの発現解析によ Dermokineは、マウスの正常重層扁平上皮組織(皮膚、食道等)に高発現しており、その分化とともに発現が上昇する事も明らかになった。その後様々な isoform と alternative splicing form も報告されているが、分子機能は依然として未知であった。一方、多くのヒト大腸癌の発生初期段階においては、単層上皮である正常大腸が上皮過形成と呼ばれる上皮多層化状態を経て、腺腫を形成してやがて癌化する。大腸癌発生初期における多層化現象が、重層上皮組織形成の分子機構と類似している点は興味深い。すなわち、上皮重層化に伴い特異的に発現する分子の機能解析を通して、重層上皮組織の形成・維持機構と腺上皮癌化の分子機構の一端が明らかになると思われる。我々は東京医科歯科大学難治疾患研究所・松井 毅/(株)エーザイ/(株)カン研究所らと共同研究を行い、独自に作製した抗Dermokine- β \square γ 抗体を用いて大腸癌組織の免疫組織学的解析を行った。その結果、Dermokineが正常大腸腺上皮に比べて、大腸癌組織でより多く発現していることを明らかにしたが、前癌病変である大腸腺腫においても発現していることを発見した。そこで、大腸癌患者血清中では Dermokineが検出できるのではないか?という仮説のもとに、血清中の分泌型Dermokineを検出するELISA系を構築した。京都府立医科大学消化器外科で手術を行った 130 名の大腸癌患者血清中Dermokineを測定したところ、腫瘍マーカーとしてのDermokine陽性率が大腸癌の代表的な腫瘍マーカーであるCEA等よ

りも早期大腸癌において有意に高いことを発見した。

2. 研究の目的

新規早期大腸癌血清診断法の確立を目標とする。大腸癌は早期診断により治癒が見込めるが、簡便で低侵襲・低費用かつ下剤等の前処置不要な血液検査による検診法開発は、がん患者の多い超高齢化社会において必須である。最近、我々が開発中の新規腫瘍マーカー(Dermokine検査)は少なくとも早期大腸癌診断に対して特に有用である事が明らかになりつつある。そこで、本方法を確立し、早期癌のどの段階から検出されるかを明らかにする事により、特に僻地の高齢者や多忙な労働者に対するがん検診の普及や啓発・医療費抑制と治療成績の改善が期待できる。

3. 研究の方法

大腸癌 130 症例とその他の疾患 800 症例における血清中 Dermokine 値と既存の腫瘍マーカーとの比較検討を行った。主たる目的は臨床検査としての有用性の検証であるが、実用化に向けた測定系の安定性確保も目的としている。具体的には以下の項目を実施した。

- (1) Dermokine アイソフォーム特異的抗体の作製と精製
- (2) 大腸癌における Dermokine アイソフォームの発現パターン解析
- (3) 高感度 ELISA の開発と安定性試験
- (4) 手術後フォローアップ症例やその他の疾患における血清中 Dermokine の測定
- (5) 大腸がん以外の消化器がん患者血清中 Dermokine 測定と病理組織解析

4. 研究成果

- (1) 血清中 Dermokine 認識 ELISA 測定系の確立:ウサギ抗ヒト Dermokine ポリクローナル抗体を作製して、市販抗体との組み合わせで蛍光標識による高感度 Dermokine 測定 ELISA

を確立した。(2) 大腸癌患者血清中 Dermokine 測定:大腸癌患者血清 130 症例における血清中 Dermokine を測定したところ、早期がんにおける陽性率は CEA/p53 自己抗体/CA19-9 に比べて高く、重複も少ない結果であった。結果としては早期癌の 60.7%が診断可能であった。(3) 大腸癌以外の癌患者血清中 Dermokine 測定:Dermokine 測定系が大腸癌診断に有用であると判断するためには、大腸癌以外の癌種(胃癌・膵癌・肝臓癌など)の患者血清 800 症例を測定した。結果としては、胃がん・肝臓癌では Dermokine の陽性例は大腸癌よりは少なかった。しかし、膵癌と膵管内嚢胞性腫瘍である IPMN では陽性率が高く、既存腫瘍マーカーとの重複も少なかった。したがって大腸がんと同様に既存血清マーカー(CA19-9)との併用で進行膵がんや IPMN 関連膵腫瘍に関して高い陽性率が得られた。

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 1 件)

- ① Dermokine as a novel biomarker for early-stage colorectal cancer. Tagi T, Matsui T, Kikuchi S, Hoshi S, Ochiai T, Kokuba Y, Kinoshita-Ida Y, Kisumi-Hayashi F, Morimoto K, Imai T, Imoto I, Inazawa J, Otsuji E. J Gastroenterol. 2010 Dec;45(12):1201-11. Epub 2010 Jul 21.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 菊池正二郎、松井毅、竹村雅至、小石健二、堀高明、松本友寛、海辺展明、山下英孝、花山寛之、渡邊健次、落合登志哉、安川覚、松原長秀、富田尚裕、笹子三津留。「IPMN組織と患者血清中にお

けるDermokineの発現解析」第 111 回日本外科学会定期学術集会サージカルフォーラム. 2011. 5. 28 (東日本大震災のために紙上開催)

- ② 菊池正二郎、松井毅、海辺展明、山下英孝、松本友寛、小石健二、藤原由規、松原長秀、富田尚裕、笹子三津留。「家族性大腸腺腫症における多段階発がんと扁平上皮関連分子群の発現解析」第 65 回日本消化器外科学会総会口演. 2010. 7. 14 山口
- ③ 菊池正二郎、松井毅、落合登志哉、熊野達也、八木信明、大辻英吾、吉川敏一、笹子三津留。「血清中Dermokineを用いた早期胃癌大腸癌診断法と臨床病理学的解析」第 110 回 日本外科学会定期学術集会サージカルフォーラム. 2010. 4. 10 名古屋
- ④ 菊池正二郎、海辺展明、藤原由規、小石健二、松本友寛、山下英孝、熊野達也、落合登志哉、八木信明、大辻英吾、笹子三津留「血清マルチマーカーによる早期胃癌血清診断法の有用性」第 82 回 日本胃癌学会総会口演. 2010. 3. 4 新潟
- ⑤ 菊池正二郎、松井毅、星佐知、熊野達也、渡邊健次、落合登志哉、今井俊夫、大辻英吾「血清中Dermokineを用いた早期胃癌大腸癌診断法と臨床病理学的解析」第 68 回 日本癌学会総会口演. 2009. 10. 2 横浜
- ⑥ 菊池正二郎、松井毅、星佐知、落合登志哉、中西正芳、阪倉長平、國場幸均、園山輝久、谷口弘毅、大辻英吾。「血清中Dermokineによる大腸癌血清診断法の有用性の検討」第 64 回日本消化器外科学会総会ワークショップ. 2009. 7. 16 大阪
- ⑦ 田儀知之、菊池正二郎、落合登志哉、渡

邊健次、熊野達也、松井 毅、星佐知、
生駒久視、窪田健、中西正芳、市川大輔、
岡本和真、藤原斉、阪倉長平、國場幸均、
園山輝久、谷口弘毅、大辻英吾. 「血清
中Dermokineによる胃癌大腸癌血清診断
と臨床組織病理学的解析」第109回日本
外科学会定期学術集会サージカルフォー
ラム. 2009. 4. 3 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 正二郎 (KIKUCHI SHOJIRO)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：70381960

(2) 研究分担者

松井 毅 (MATSUI TAKESHI)
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・
助教
研究者番号：10452442

落合 登志哉 (OCHIAI TOSHIYA)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：30311913

大辻 英吾 (OTSUJI EIGO)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：20244600

(3) 連携研究者

なし