

## 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 4月 1日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590981

研究課題名（和文）泳動パターン解析による糖蛋白腫瘍マーカーの簡便な鑑別診断法の確立

研究課題名（英文） Establishment of a simple differentiation diagnostic method of glucoprotein tumor markers by the pattern analysis in Western blotting

研究代表者

佐藤 浩昭 (SATO HIROAKI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：00261800

研究成果の概要（和文）：

糖鎖抗原腫瘍マーカーの構造は、原発部位が異なる癌腫間で一致しているかどうかは、明らかではない。複数の癌腫症例の血清を用い、作成した抗体を用いてウェスタンブロットを実施した。肺腺癌では 150kD 以上の分子量部位に複数のバンドがみられ、他の癌腫、コントロールでは当該部位より小さな分子量のバンドがみられ、泳動パターンが異なることが確認された。CA19-9 においても膵臓癌、大腸癌症例での泳動パターンが確認された。糖蛋白腫瘍マーカー血中高値例の原発部位推定の鑑別に有用な鑑別診断法の確立への道筋が立てられた。

研究成果の概要（英文）：

It is not clear whether structures of glucoprotein tumor markers such carcinoembryonic antigen (CEA) and CA19-9 differ or not in various cancers. Western blot analysis of the expression patterns in various cancers was performed using original antibody against CEA which we made. The expression pattern of them was ladder bands pattern. In serum from lung, bands larger than 150kD were observed, but they were not in serum form other cancer patients and normal control ( $p=0.0352$ ). Expression patterns were evaluated in such analysis using antibody against CA19-9 in sera from pancreas and colon cancers. A clue of simple differentiation diagnostic method of glucoprotein tumor markers by the pattern analysis in Western blotting was established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：癌、肺癌、腫瘍マーカー、診断法、泳動パターン

## 1. 研究の背景

腫瘍マーカーの多くは、臓器特異的でないものが多く、そのため原発部位の鑑別のため、複数の侵襲的検査を必要とする例が少なくない。さらにびまん性細気管支炎などの慢性呼吸器疾患では、複数の腫瘍マーカーの偽陽性率が高いことも知られている。腫瘍マーカーの多くは糖蛋白抗原であり、ELISA 法などによる測定「値」が臨床の場に提供されるが、この結果は糖鎖の一部を構成する抗原の多寡のみを反映した情報である。糖鎖構造は、良悪性間で、また原発部位が異なる癌腫間で一致しているかどうかは、明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、糖蛋白腫瘍マーカーの中で最も汎用されている CEA および CA19-9 に着目し、これらの血清での泳動パターン解析を可能とする最適な泳動検査法を確立し、癌腫の原発部位診断に有用な簡易な診断法を開発することであった。

## 3. 研究の方法

### (1)市販の抗 CEA 抗体を用いた検討

抗 CEA 抗体は、免疫染色用の抗体が複数市販されているが、ウェスタンブロット用に供することが可能な抗体は市販されていない。市販されている複数の抗 CEA 抗体を入手し、泳動に供することが可能かどうかを検討する。

### (2)抗 CEA ポリクローナル抗体の作製および泳動での反応性の確認

市販の抗 CEA 抗体は免疫染色ようであり、泳動に供することが不可能であった際に、新たに CEA 抗原を購入し、マウスに抗原を接種し、泳動に供することが可能なポリクローナル抗体を作成する。抗体作成法は通常の抗体作成法を用いる。

### (3)癌細胞の培養

筑波大学で作成したヒト癌細胞株の中で培養上清中に CEA 産生が確認されているヒト乳癌細胞株 (MMK-96) を培養し、そのセルペレットを作成し、泳動を実施する。この陽性コントロールのほか、細胞培養上清中に CEA 産生がみられない陰性コントロールとしてヒト肺癌細胞株 (TKB-30) のセルペレットも用意し、陰性コントロールとして泳動実験に供した。

### (4)CEA に関するウェスタンブロット

ゲル濃度の設定、泳動電圧の設定、転写電流、時間などの条件設定を行い、最適な泳動条件決めを実施する。

### (5)癌症例血清 CEA に関するウェスタンブロット

予め説明と同意を得た後に採取、遠心、凍結保存した肺癌をはじめとした複数の癌腫症例およびコントロール症例の血清等臨床検体を泳動に供し、最適な泳動条件設定をおこなう。

### (6) 癌症例血清 CA19-9 に関するウェスタンブロット

上記 1)-5) の結果を踏まえ、CA19-9 についても CEA 同様臨床検体を用いた泳動パターン解析実験を実施する。CA19-9 については市販の抗体が泳動実験に供することができる可能性があり、その際には市販の抗体を用いて泳動実験を実施する。

## 4. 研究成果

- (1) 市販の抗 CEA 抗体を用いた検討
- (2) 抗 CEA ポリクローナル抗体の作製および泳動での反応性の確認
- (3) 癌細胞の培養
- (4) CEA に関するウェスタンブロット

泳動用の CEA 抗体は存在せず、市販の CEA 抗体はいずれも免疫染色用抗体である。

3 種の市販の CEA 抗体を購入し、泳動実験を実施したが、泳動に耐える抗体ではなく、この時点で市販の抗体では泳動はおこなえないと判断した。

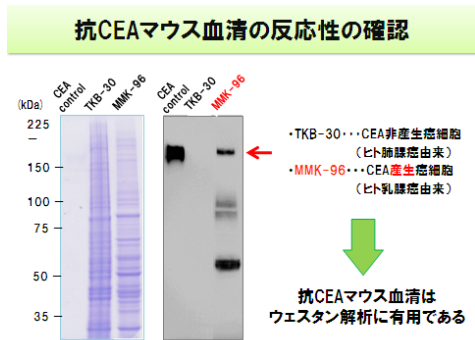
その結果を受け、ヒト CEA 抗原を購入し、マウスによるポリクローナル抗体作成をおこなった。抗体の作成法は上記の通り、通常の抗体作成法を用いた。すなわち、マウスに CEA 抗原を接種し、マウス血清中の抗体価を確認するというポリクローナル抗体作成法である。その結果以下のような抗 CEA ポリクローナル抗体が作成された (図 1 参照)。

CEA を培養上清中に産生するヒト乳癌細胞株 MMK-96 および CEA 非産生ヒト癌培養細胞株 TKB=30 を用い、作成した抗体を用い泳動を実施した。検体はセルペレットであるが、その結果 CEA 産生株 MMK-96 で CEA に特異的なバンドが 175kD の部位に確認された (図 1 参照)。

ネガティブコントロールの TKB-30 のセルペレットでは、いずれの部位にも反応するバンドは確認されず、陰性コントロールの確認も実施した。

以上の結果については、以下の図 1 を参照。

図 1



(5) 癌症例血清 CEA に関するウェスタンブロット

泳動条件についても通常の 12.5% のゲルではなく、7.5% とかなり薄いゲルを用いるなどの条件決めをおこない安定した泳動が可能となる設定を確立した。

また CEA 抗原との反応では、175 kD 程度の部位に単一のバンドが確認されていたが、細胞上清中に CEA を発現しているヒト乳癌細胞株では 100kD、50kD、25kD 部位にバンドが確認されており、これらは CEA とクロスリアクトする糖蛋白ないし CEA を構成する糖蛋白の一部をみている可能性が示唆された。

以上のような条件決めのために、30 症例の血清を用いて、CEA の泳動パターンを調べる実験に着手した。対象とした症例の内訳は以下の通りである。肺癌 12 例（肺腺癌 11 例、小細胞肺癌 1 例）、大腸癌 9 例、膵臓癌 3 例、胃癌 2 例、胚細胞腫 1 例、コントロール 2 例、良性呼吸器疾患 1 例。当初 CEA 値が 50ng/ml 以上でないと泳動パターンは確認できないものと想定したが、ELISA における測定値の高低の如何に依らず泳動パターンを確認できることが明らかとなった。従って、CEA が正常範囲内の症例の検体においても泳動パターンの実験に検体を供することが可能であることが確認された。

図 2

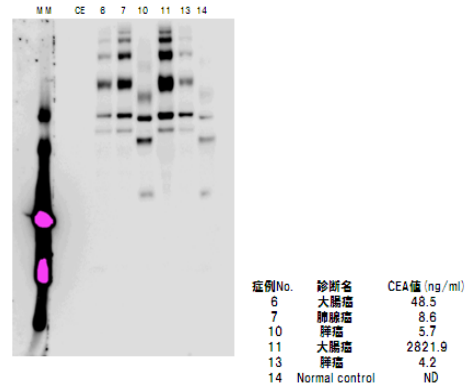
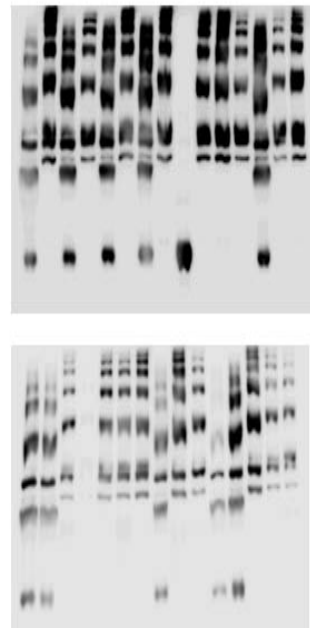


図 3, 4

実際に実施した泳動パターン結果を図 3, 4 に示す。これらの泳動パターンは、CEA 抗原で発現が確認された 175kD のみではなく、それよりも大きな、あるいは小さな分子量の部位にも梯子状にバンドが確認されていた。従って、上記のようにヒト乳癌細胞株の泳動結果で推測したように、確認されたバンドは CEA とクロスリアクトする糖蛋白ないし CEA を構成する糖蛋白の一部をみている可能性が示唆された。この結果については発現タンパク自体の解析を今後要すると考えられた。

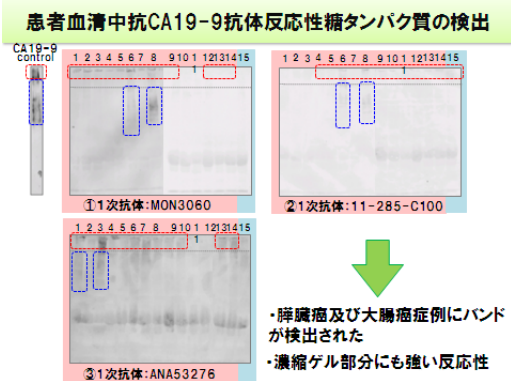


その結果、いずれの癌腫でも梯子状のバンドの発現であったが、肺癌では150kD以上の分子量部位に複数のバンドがみられ、消化器癌を中心とした肺癌以外の癌腫およびコントロール、良性肺疾患では当該部位より小さな分子量のバンドがみられ、泳動パターンが異なることが確認された。肺癌12例とそれ以外の癌腫およびコントロールの計18例の150kD以上の分子量部位のバンドの有無を比較すると統計学的有意差が確認された(p=0.0352、chi-square test)(図2,3,4)。

今回の泳動結果の解析では200kD以上の大きな分子量のバンドに着目したが、梯子状の泳動パターンに癌腫間に違いがあるかどうか、良悪性間(特に肺癌と間質性肺炎等の良性のびまん性肺疾患間)で違いがあるかどうかは、さらに泳動実験を繰り返し、その結果を解析することが求められる。また泳動の条件決めが決定し再現性を持った検査法が確立したと判断され、より多数の症例の臨床検体を用いた泳動パターンの解析を継続実施中である。

#### (6) CA19-9の泳動結果

CA19-9については、市販の抗体で膵臓癌、大腸癌症例での泳動パターンが確認された(図3)。びまん性汎細気管支炎などの慢性呼吸器疾患での発現は今後の課題である。



泳動用の抗体作成、適切な泳動く条件の確立により糖蛋白腫瘍マーカー血中高値例の原発部位推定や偽陽性の鑑別に有用な鑑別診断法の確立への道筋が立てられた。共同研究推進目的に茨城大学農学部上妻准教授に研究に参画いただき、現在も追加研究を実施している。成果を研究期間内に、十分な形で誌上発表できていないが成果をまとめしかるべき英文

誌上での発表を実施する。

#### 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)

[学会発表](計 1件)

1. 佐藤浩昭、他. 泳動パターン解析による糖蛋白腫瘍マーカーの簡便な鑑別診断法の確立. 第52回日本肺癌学会総会  
平成23年11月3日大阪

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐藤 浩昭 (SATO HIROAKI)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号:00261800

##### (2) 研究分担者

大塚 盛男 (OHTSUKA MORIO)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号:00143173

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: