

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16日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591717

研究課題名（和文） 多種抗原を同時標的とする食道癌血清抗体バイオマーカーの研究

研究課題名（英文） Application of Serum Antibodies against Multiple Tumor Antigen to Diagnose Esophageal Squamous Cell Carcinoma

研究代表者

島田 英昭 (SHIMADA HIDEAKI)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：20292691

研究成果の概要（和文）：

血管新生因子であるVEGFに対する血清抗体検出方法を確立して、食道癌患者における陽性率を検討することを目的とした。VEGF抗体陽性率は、健常者群の平均値+3SDをカットオフ値とすると6.6%(6/91)であり、健常者対照群における陽性率は1.4%(1/74)であった。臨床病理学的因子ならびにp53抗体との相関関係は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

Purpose of this study was (i) establish ELISA system to detect serum anti-VEGF antibodies, and (ii) evaluate positive rate of serum anti-VEGF antibodies in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Using a cut-off value of mean +3SD of serum anti-VEGF antibody level of healthy controls, positive rate of patients with esophageal squamous cell carcinoma was 6.6%(6/91). No clinicopathological factors were associated with presence of anti-VEGF antibodies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：SEREX, VEGF, p53, ELISA, 食道癌, 血清抗体, 腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

食道癌早期診断では簡便性の面からは血液検査法が望ましいが、既存の血液腫瘍マーカーでは癌細胞から分泌される微量タンパクを検出するため早期癌診断は理論的に難しい。一方、進行食道癌においては、化学療法・放射線治療の治療感受性や治療効果を簡便に評価できる手法は確立されておらず、進行癌の生物学的悪性度を評価できる血液バイオマーカーの開発が期待されており、分子生物学的特徴を反

映する血液バイオマーカーの必要性が高い。

我々が開発した血清 p53IgG 抗体検出による診断法(*Cancer 2003*)は、微量の癌抗原に対する抗原抗体反応を利用して、微小な癌細胞を検出することが可能である。さらに p53 分子の異常と相関するため分子生物学的特徴を反映するバイオマーカーでもある(*Surgery 2003*)。stage I 食道癌に対する陽性率は約 20%であり(*Cancer 2000*)、既存の腫瘍マーカーの陽性率に比較して有用性が高い（平成 20 年 11 月 1 日よ

り食道癌の腫瘍マーカーとして保険収載)。

Serological identification of antigens by recombinant cDNA expression libraries(SEREX)法を用いて種々の癌抗原遺伝子が同定されているが、食道癌抗原に関しての報告は少ない。我々はSEREX法を用いて、血清抗体を誘導する新規の癌特異的抗原遺伝子(*Int J Cancer 2004, Cancer Sci. 2006*)を同定してきた(*Int J Oncology 2005, Int J Oncology 2007*)。PUBMED 検索上、食道癌のSEREX抗原遺伝子に関して12件の論文報告があるが、このうち6件が我々の研究グループからの報告であり、この領域の研究で世界をリードしている。食道癌では血管新生因子が悪性度や予後と強く関連しているが、中でもVascular Endothelial Growth Factor(VEGF)の発現ならびに血清中 VEGF 値は、治療効果や予後と関連している。我々は、食道癌患者血清中の VEGF タンパク濃度の高い症例は、予後不良であり(*Cancer 2001*)、放射線治療抵抗性であることを報告してきた(*Br J Cancer 2002*)。しかし、VEGF タンパク濃度は、炎症反応でも容易に変化するため、安定性やモニタリング性能に課題が多い。最近、VEGF は、p53分子と同様に、血清中の VEGF タンパク濃度に相関して血清抗 VEGF 抗体が誘導されることが明らかとなった(*BBA 2006*)。もしも、p53 抗体と同様に安定した定量化が可能なIgG抗体による検出が可能であれば、臨床上的有用性が高い。

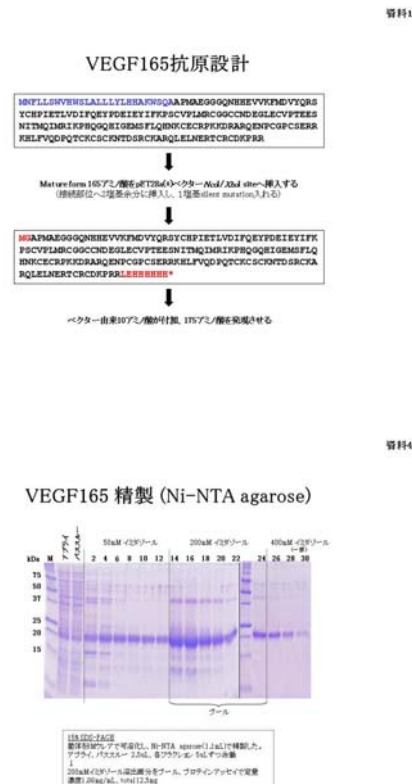
2. 研究の目的

本研究期間において、p53 抗原ならびに VEGF 抗原を同時に用いた血液検査方法の有用性について以下の課題について明らかにする。最も陽性率が高い抗 VEGF 抗体 ELISA キットを作成するために、WEB サイトにて、HLA class I に認識されるエピトープを選別する。選別したエピトープに対応するペプチド断片を精製して、ELISA キットの結合標的とする。Class I 結合エピトープは、最低 3 箇所同定されており、この部分を含むペプチド断片を複数精製する。試作した ELISA キットにて、治療開始前の食道癌患者の血清中の抗 VEGF 抗体をスクリーニングする。これらの食道癌患者において病期別の血清抗体の陽性率を明らかにする。抗原ペプチドとしてどのペプチドが最も陽性率が高いかを検討する。最も陽性率の高いペプチドを標的とした ELISA キットを使用して、陽性症例の臨床病理学的特徴を検討する。陽性例と陰性例の予後を比較する。また、放射線化学療法施行症例においては、治療効果との相関関係について検討する。抗 VEGF 抗体を用いて、手術標本あるいは生検組織の免疫染色を行う。免疫染色レベルと血清 VEGF 抗体価レベルとの相関関係を検討する。同じウェル内に p53 タンパクならびに VEGF ペプチドを同時に固相化して、上記の食道癌患者において病期別の血清抗体の陽性率を明らかにする。

3. 研究の方法

VEGF cDNA の塩基配列をアミノ酸配列に変換し、MHCpred ウェブサイト (<http://www.jenner.ac.uk/MHCpred/>)を用いてクラスII 抗原部位を検索し、その領域を含むペプチドを人工合成した(図1)。

(図1)

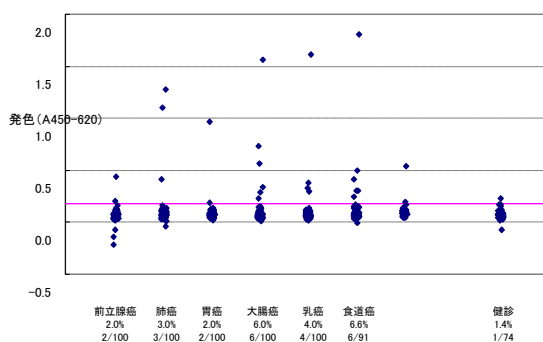


アミノ末端にビオチンを付加しておき、予めアビジンを固相化したプレートを用いて合成ペプチドを特異的に結合させ、洗浄後に血清抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG 抗体を用いて血清抗体レベルを測定した。健常者血清抗体価の平均値+3SD をカットオフ値として、陽性とした。VEGFペプチドを精製して血清VEGF抗体検索のためのELISAキットを作成した。食道癌患者91例の血清をスクリーニングに用いた。また、癌検診において固形癌を有していないと診断された50歳以上の74名を健常者対照群とした。VEGFならびにp53の両者を併用した場合の抗体価とそれぞれの標的抗原に対する単独抗原に対する抗体価との相関関係を検討した。

4. 研究成果

健常者対照群の平均値+3SD=0.182 を基準値として基準値を超える場合を陽性と定義した。健常者ならびに各種固形癌腫瘍における陽性率を(図2)に示す。

(図 2)



VEGF 抗体陽性率は 91 例中 6 例(6.6%)であり、p53 抗体陽性率は 91 例中 17 例(18.7%)であった。両者とも陽性症例は 1 例のみであったため、両者を併用した場合の陽性率は 91 例中 22 例(24.2%)であった。VEGF 単独での陽性率が当初の予想より低かったため、p53 抗体との併用によっても十分な陽性率を得ることができなかった。今後、さらに 3 種類以上の抗原との組み合わせによる併用によって、臨床上有用な検査法を開発する予定である。

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 7 件)

- ① Tonoike Y, Matsushita K, Tomonaga T, Katada K, Tanaka N, Shimada H, Nakatani Y, Okamoto Y, Nomura F. Adhesion molecule periplakin is involved in cellular movement and attachment in pharyngeal squamous cancer cells. BMC cell biology, 査読有, 12(1):41, 2011.
DOI: 10.1186/1471-2121-12-41
- ② Kagaya A, Shimada H, Shiratori T, Kuboshima M, Nakashima-Fujita K, Yasuraoka M, Nishimori T, Kurei S, Hachiya T, Murakami A, Tamura Y, Nomura F, Ochiai T, Matsubara H, Takiguchi M, Hiwasa T. Identification of a novel SEREX antigen family, ECSA, in esophageal squamous cell carcinoma. Proteome Science, 査読有, 9:31, 2011. DOI: 10.1002/jso.22127
- ③ Shimada H, Takiguchi N, Kainuma O, Soda H, Ikeda A, Cho A, Miyazaki A, Gunji H, Yamamoto H, Nagata M. High preoperative neutrophil-lymphocyte ratio predicts poor survival in patients with gastric cancer. Gastric Cancer, 査読有, 13(3):170-176, 2010. DOI: 10.1007/s10120-010-0554-3

- ④ Oshima Y, Yajima S, Yamazaki K, Matsushita K, Tagawa M, Shimada H. Angiogenesis-related factors are molecular targets for diagnosis and treatment patients with esophageal carcinoma. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 査読有, 16(6):389-393, 2010.

http://www.atcs.jp/pdf/2010_16_6/389.pdf

- ⑤ 島田英昭, 山崎有浩, 谷島聡, 大嶋陽幸, 小池淳一. 腫瘍マーカー 血清p53 抗体-診断モニタリング-. 日本臨床, 査読有, 68(Suppl7):829-832, 2010.

http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z_mokuji/ketueki7-4.html

- ⑥ Shimada H, Shiratori T, Takeda A, Matsushita K, Okazumi S, Akutsu Y, Matsubara H, Nomura F, Ochiai T. Perioperative Changes of Serum p53 Antibody Titer is a Predictor for Survival in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. World J Surg, 査読有, 33, 272-277, 2009.

DOI: 10.1007/s00268-008-9821-4

- ⑦ Shimada H, Kagaya A, Shiratori T, Nomura F, Takiguchi M, Matsubara H, Hiwasa T. Detection of anti-CUEC-23 antibodies in serum of patients with esophageal squamous cell carcinoma: a possible new serum marker for esophageal cancer. J Gastroenterol, 査読有, 44, 691-696, 2009.

DOI: 10.1007/s00535-009-0060-8

[学会発表] (計 7 件)

- ① 島田英昭. 癌診療におけるp53抗体マーカーの有用性~PUBMED文献から~. 第73回日本臨床外科学会総会, 2011年11月17日, 東京.
- ② Shimada H. Clinical utility of serum p53 antibody for patients with esophageal carcinoma. 21st World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists (IASGO2011), 2011/11/12, Keio Plaza Hotel, Tokyo
- ③ 島田英昭. 食道癌診療におけるp53抗体マーカーの使い方入門編~PUBMED文献から. 第65回日本食道学会学術集会, 2011年09月26日, 仙台.
- ④ Shimada H. Serum SEREX antibodies as new biomarkers for gastric cancer. 9th International Gastric Cancer Congress, 2011年04月21日, Seoul, Korea.
- ⑤ Shimada H, Yamazaki K, Yajima S, Oshima Y, Nanami T, Tamura A, Tsuchiya M, Maeda T, Suzuki T, Ootsuka Y, Kaneko H. Serum SEREX antibodies as new biomarkers for stage I/II gastric cancer. The 7th International Symposium on Can

cer Research and Therapy, 2010年11月27日, Tokyo.

- ⑥ **Shimada H.**, Yajima S, Yamazaki K, Oshima Y, Kaneko H. Serum IgG antibodies as new tumor markers for esophageal carcinoma. 12th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, 2010年9月5日, Kagoshima.
- ⑦ **島田英昭.** Clinical Significance of Serum p53 Antibodies in 1541 patients at Chiba Cancer Center from One-year Experience. 第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月2日, 横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 英昭 (SHIMADA HIDEAKI)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：20292691

(2) 分担研究者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし