

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25年5月1日現在

機関番号：32661
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591416
 研究課題名（和文） c-mycを標的腫瘍抗原とした固形癌診断血清抗体診断法の研究
 研究課題名（英文） Application of Serum Antibodies against c-myc to Malignant Solid Tumors
 研究代表者
 山崎 有浩 (YAMAZAKI KUNIHIRO)
 東邦大学・医学部・客員講師
 研究者番号：00307761

研究成果の概要（和文）：多種類の固形癌において増殖促進因子として機能している c-myc を標的抗原とした血清抗体検出方法を確立して、固形癌患者における陽性率を検討することを目的とした。精製した c-myc ペプチドを標的とした ELISA キットを作成し、健常者群の平均値 +3SD をカットオフ値として血清抗体陽性率を解析した。健常者対照群における陽性率は 2.5%(2/73)であった。比較的早期の固形癌における陽性率を検討する目的で、stage I あるいは stage II の各種固形癌をそれぞれ 100 症例について解析した。各種固形癌における c-myc 抗体陽性率は、前立腺癌=8%、肺癌=9%、胃癌=14%、大腸癌=6%、乳癌=13%、食道癌=12%、肝細胞癌=10%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。今後複数の抗体マーカーを併用する診断方法の開発に取り組みたい。

研究成果の概要（英文）：Purpose of this study was (i) establish ELISA system to detect serum anti-c-myc antibodies, and (ii) evaluate positive rate of serum anti-c-myc antibodies in patients with malignant solid tumors. Using a cut-off value of mean +3SD of serum anti-c-myc antibody level of healthy controls, positive rate of patients were evaluated. Various kind of serum samples from stage I or stage II cancer patients were analyzed for serum c-myc antibodies. The positive rates were prostate cancer=8%, lung cancer=9%, gastric cancer=14%, colon cancer=6%, breast cancer=13%, esophageal cancer=12%, liver cancer=10%, respectively. No clinicopathological factors were associated with presence of anti-c-myc antibodies. Plural serum antibodies can increase sensitivity to detect cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：SEREX・serum antibody・c-myc・malignant tumor

1. 研究開始当初の背景

各種固形癌の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。固形癌のスクリーニング検査として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 (CEA, CA19-9 など) では癌細胞の分泌タンパクを検出するため早期癌診断は理論的に難しい。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ため stage I 症例においても 10-20% 程度の陽性率である。さらに、我々は **Serological identification of antigens by recombinant cDNA expression libraries (SEREX) 法** を用いて種々の新規癌抗原遺伝子が同定してきた (*Int J Cancer 2004, Cancer Sci. 2006, Int J Oncology 2005, 2007, 2009, J Gastroenterology 2009, BMC Cancer 2009*)。この研究過程で、c-myc タンパクが腫瘍抗原のひとつであることが明らかとなったが、癌患者における血清中の抗 c-myc 抗体の存在を検討した報告はない。c-myc 遺伝子は、種々の固形癌で、発現異常が報告されており、生存率や転移形成との関連性も指摘されており、p53 抗体と同様に、広く固形癌スクリーニングに応用できる可能性がある。腫瘍抗原に対する血清 IgG 抗体検出は、比較的早期の固形癌を診断する有用な手法である。しかし、p53 抗体単独での血清検査では、陽性率ならびに生物学的悪性度評価が不十分であり、複数の有用な血清抗体を解析する必要がある。そこで、広く固形癌一般において、分子生物学的特徴を反映している c-myc タンパクに着目してその抗体を測定できる簡便な検査法が有用であろうと判断した。従来のタンパク検出型 ELISA キットと異なり、標的抗原が複数であっても IgG 抗体量を測定するステップが共通であるため、いずれかの抗体が陽性であれば容易に検出できる併用検査が可能であると推測した。c-myc 異常発現は、p53 分子との発現相関が少ないことから、p53 抗体との併用によって p53 抗体単独よりも高い陽性率が期待できる。c-myc は p53 と同様に生物学的悪性度を反映する分子であることから、両者を併用することで、治療感受性予測、治療後の予後や転移率などをより正確に推測することが可能となると考えられる。

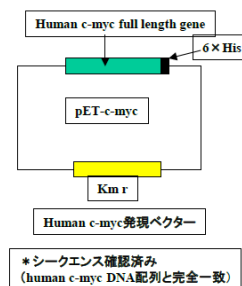
2. 研究の目的

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

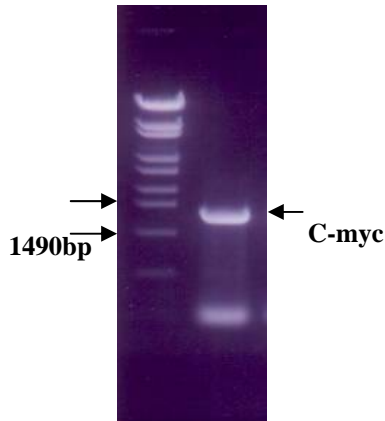
有用性について以下の課題について明らかとする。最も陽性率が高い抗 VEGF 抗体 ELISA キットを作成するために、WEB サイトにて、HLA class I に認識されるエピトープを選別する。選別したエピトープに対応するペプチド断片を精製して、ELISA キットの結合標的とする。Class I 結合エピトープは、最低 3 箇所同定されており、この部分を含むペプチド断片を複数精製する。試作した ELISA キットにて、治療開始前の食道癌患者の血清中の抗 VEGF 抗体をスクリーニングする。これらの食道癌患者において病期別の血清抗体の陽性率を明らかとする。抗原ペプチドとしてどのペプチドが最も陽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とする。

3. 研究の方法

c-myc 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。ヒトリンパ球から調整した cDNA を鋳型にして、RT-PCR 増幅して human c-myc 遺伝子全長を修得した。この PCR 断片を pET28a(+) ベクターのマルチクローニングサイト中の NcoI と XhoI 部位に挿入したものを発現ベクターとした。この発現ベクターを pET-c-myc と呼んでいる。このベクターでは、C 末端に 6×His が Tag として付加されて発現される。



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

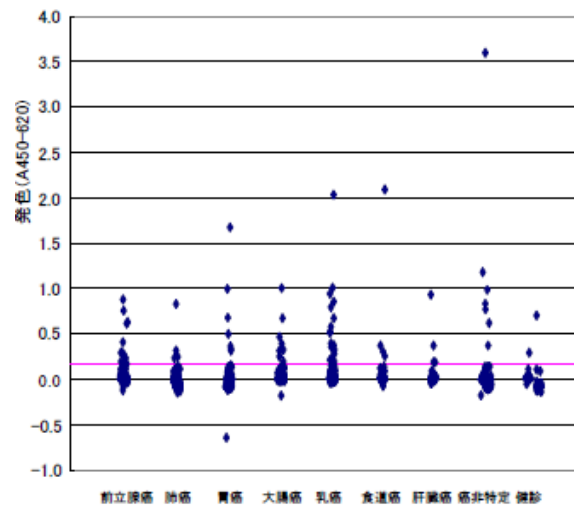
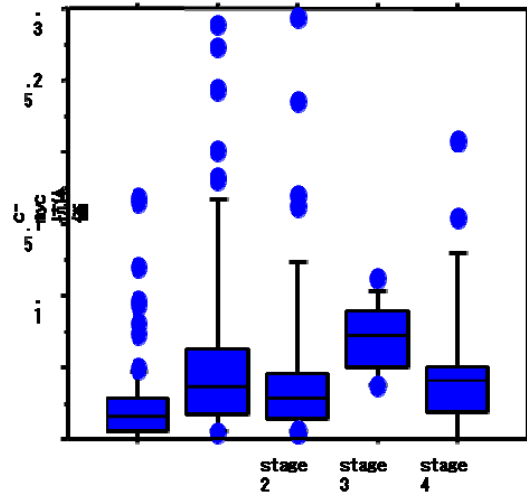


成ペプチドを特異的に結合させ、洗浄後に血清抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体を用いて血清抗体レベルを測定した。健常者 73 名の血清抗体価の平均値 +3SD をカットオフ値として陽性率を算出した。c-myc ならびに p53 の両者を併用した場合の抗体価とそれぞれの標的抗原に対する単独抗原に対する抗体価との相関関係を検討した。

解析対象は、stage I あるいは II の固形癌患者購入血清である。癌種は、前立腺癌、肺癌、比較的早期の固形癌における陽性率を検討する目的で、stage I あるいは stage II の各種固形癌をそれぞれ 100 症例について解析した。

4. 研究成果

健常者対照群の平均値 +3SD=0.124 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抗体価を示す。c-myc 抗体陽性率は解析対象全体で 700 例中 72 例 (10.2%)であった。胃癌症例における stage 別の陽性率を示す。胃癌症例では、p53 抗体を同時解析しているが、両者で相関関係を認めなかった。各種固形癌における c-myc 抗体陽性率は、前立腺癌=8%、肺癌=9%、胃癌=14%、大腸癌=6%、乳癌=13%、食道癌=12%、肝細胞癌=10%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。今後複数の抗体マーカーを併用する診断方法の開発に取り組みたい。



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 6 件)

1. Kajiwara T, Matsushita K, Itoga S, Tamura M, Tanaka N, Tomonaga T, Matsubara H, Shimada H, Habara Y, Matsuo M, Nomura F : SAP155-mediated c-myc suppressor FBP-interacting repressor splicing variants are activated in colon cancer tissues. Cancer Sci 査読有 104(2): 149-156. 2013.2
DOI : 10.1111/cas.12058
2. Shimada H, Yajima S, Oshima Y, Hiwasa T, Tagawa M, Matsushita K, Nomura F : Impact of serum biomarkers on esophageal squamous

- cell carcinoma. Esophagus 査読有 9(3): 131-140. 2012.9
DOI : 10.1007/s10388-012-0332-x
3. Matsushita K, Kajiwara T, Tamura M, Satoh M, Tanaka N, Tomonaga T, Matsubara H, Shimada H, Yoshimoto R, Ito A, Kubo S, Natsume T, Levens D, Yoshida M, Nomura F : SAP155-mediated splicing of FUSE-binding protein-interacting repressor (FIR) serves as a molecular switch for c-myc gene expression. Molecular cancer research : MCR 査読有 10(6): 787-799. 2012.6
DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0462
 4. Li Q, Kawamura K, Yamanaka M, Okamoto S, Yang S, Yamauchi S, Fukamachi T, Kobayashi H, Tada Y, Takiguchi Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M : Upregulated p53 expression activates apoptotic pathways in wild-type p53-bearing mesothelioma and enhances cytotoxicity of cisplatin and pemetrexed. Cancer Gene Ther 査読有 19(3): 218-228. 2012.3
DOI : 10.1038/cgt.2011.86.
 5. 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 biol 査読有 12(1): 41. 2011.9
DOI : 10.1186/1471-2121-12-41
 6. Kitamura A, Matsushita K, Takiguchi Y, Shimada H, Tada Y, Yamanaka M, Hiroshima K, Tagawa M, Tomonaga T, Matsubara H, Inoue M, Hasegawa M, Sato Y, Levens D, Tatsumi K, Nomura F : Synergistic effect of non-transmissible Sendai virus vector encoding the c-myc suppressor FUSE-binding protein-interacting repressor plus cisplatin in the treatment of malignant pleural mesothelioma. Cancer Sci 査読有 102(7): 1366-1373. 2011.7
DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.01931.x.
- 2012/11/09
2. 島田英昭, 谷島 聡, 小池淳一, 田川雅敏, 竹田明彦, 松下一之, 日和佐隆樹, 野村文夫 : SEREX抗原を標的とした胃癌の血清腫瘍マーカー. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋 2011/10/05
 3. 谷島 聡, 島田英昭, 山崎有浩, 大嶋陽幸, 鈴木 隆, 名波竜規, 石井 淳, 大塚由一郎, 鷺澤尚宏, 金子弘真 : 消化器癌症例における血清SEREX抗体の検出～新しいバイオマーカー検査法開発を目指して～. 第 66 回日本消化器外科学会総会、名古屋 2011/07/14
 4. Shimada H, Yamazaki K, Yajima S, Oshima Y, Nanami T, Tamura A, Kaneko H : Serum SEREX antibodies as new biomarkers for gastric cancer. 9th International Gastric Cancer Congress Seoul, Korea 2011/04/21
6. 研究組織
- (1)研究代表者
山崎 有浩 (YAMAZAKI KUNIHIRO)
東邦大学・医学部・客員講師
研究者番号 : 00307761
 - (2)研究分担者
島田 英昭 (SHIMADA HIDEAKI)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号 : 20292691
 - (3)連携研究者
該当なし

[学会発表] (計 4 件)

1. 島田英昭 : 食道扁平上皮癌の血液バイオマーカーの開発. 第 64 回日本気管食道科学会総会ならびに学術講演会、東京