

## 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 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591762

研究課題名（和文）

尿中のラミニン関連分子は膀胱がんの診断・治療の指標となりうるか？

研究課題名（英文）

Laminin-like molecule is a potent therapeutic and diagnostic target for bladder cancer.

研究代表者

越川 直彦（KOSHIKAWA NAOHIKO）

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：70334282

研究成果の概要（和文）：

我々は早期がんを含む膀胱がん患者尿にモノマー $\gamma$ 2鎖が高濃度に存在することをウエスタンブロット、モノマー $\gamma$ 2鎖に対する特異的なモノクローナルを用いたサンドイッチELISAで初めて見出した。さらに、尿中のモノマー $\gamma$ 2鎖が浸潤性膀胱がんのみならず、早期の表在性膀胱がんの患者尿においても検出されることを見出した。さらに、膀胱がん患者尿を用いた解析から、モノマー $\gamma$ 2鎖がBTA、NMP-22など既存の腫瘍マーカーに比べ高感度に膀胱がんを診断することが可能となった。以上は、モノマー $\gamma$ 2鎖が膀胱がんの新しい腫瘍マーカーとなりうる可能性を強く示唆している。

研究成果の概要（英文）：

In this study we demonstrated for the first time that monomeric laminin gamma2 chain was detected in urines obtained from the patients with early stage of bladder carcinomas by a sandwich ELISA assay using a specific antibody to human monomeric laminin gamma2 chain (To be submitted). Furthermore urinary monomeric laminin gamma2 was expressed not only in invasive but also in surface carcinomas. The diagnostic value of monomeric laminin gamma2 was higher than that of other marker proteins (MTA, NMP-22) of bladder carcinoma urine. These results strongly suggest that urinary monomeric laminin gamma2 has the possibility to be a potent novel tumor marker for bladder carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012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：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍マーカー、膀胱がん、ラミニン、診断

1. 研究開始当初の背景

| 膀胱がんに対しての簡便、高感度なスクリー

ニング法は確立されていない。尿細胞診はT2以上の進行がんに対して有効な診断法であるが、早期の上皮内がんや上部尿路に発生した膀胱がんは尿中に剥離する腫瘍細胞の絶対数が少ないために陽性率は3割程度である。また、尿細胞診は専門医の経験によるところが大きい。このような問題から、確定診断を行うためには膀胱鏡検査や画像診断などの高度な2次検査に頼らざるを得ない。しかし、医療過疎地域ではこのような専門性を必要とする診断は困難であり、診断の機会を逸した末期の膀胱がん患者がしばしば見られる。これら問題点を解決するためには、簡便、高感度に膀胱がんをスクリーニング可能な検査法の確立が急務の課題となる。そこで本研究では、これまでの予備的な検討から見出された膀胱がん患者の尿中に高濃度に産生されるラミニン $\gamma$ 2単鎖( $\gamma$ 2単鎖)に注目し、尿中の $\gamma$ 2単鎖が膀胱がんの診断に応用できる可能性を検証する。

## 2. 研究の目的

これまでに、悪性がんが発現しているラミニン関連分子であるラミニン $\gamma$ 2単鎖( $\gamma$ 2単鎖)が種々のタイプの膀胱がんの患者尿で高頻度に検出されることを見出した(未発表)。このことは $\gamma$ 2単鎖が尿細胞診に代わる有効な膀胱がんの診断マーカーとなる可能性を示唆している。本研究では、1)尿中の $\gamma$ 2単鎖が膀胱がんの診断指標となる可能性を多検体の膀胱がん患者尿で検証する、2) $\gamma$ 2単鎖の特異的な糖鎖構造を同定し、それを指標とした高感度の検出法を作製する。

## 3. 研究の方法

ラミニン $\gamma$ 2単鎖を膀胱がんの早期診断のマーカー分子として臨床応用への試み

① これまでに早期がんを含む膀胱がん患者尿中に $\gamma$ 2単鎖が検出できることをウエスタンブロットで確認したので、その一般性について検討する。その準備として、ELISAによる定量的な検出系を構築して、試料の前処理法や検出感度を上げるための条件検討を行う。

② 膀胱がん患者を含む泌尿器疾患の患者から得られた尿サンプル(300検体)を研究期間内に採取する(尿の採取は高知大学病院泌尿器科の外来にて実施し、現状で100検体の採取が完了している)。そして、A)で作製したELISA用いて、300検体の患者尿中の $\gamma$ 2単鎖を定量化する。この際、膀胱がん患者以外の尿を陰性対照とする。ELISAの結果の再現性を確認するため、一部の尿検体は非還元条

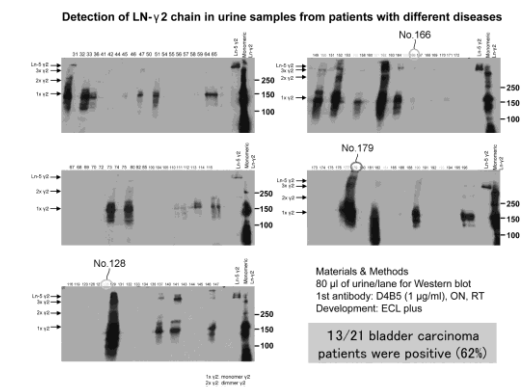
件のウエスタンブロットを行う。本結果は臨床病理学的なデータとの相関性を解析し、尿由来の $\gamma$ 2単鎖が膀胱がんの診断や治療のモニターのための腫瘍マーカーとしての役割を担うか否かを検証する。

③ 尿中で $\gamma$ 2が検出できる膀胱がんの組織におけるラミニン $5\gamma$ 2鎖の発現と $\gamma$ 2単鎖発現がどのような関係にあるのかを検証する。まず、尿中の $\gamma$ 2単鎖が陽性になった膀胱がん患者で、生検あるいは手術により得られた原発巣のがん部、非がん部組織を用いて、原発巣や尿路組織でのラミニン $\gamma$ 2単鎖、ラミニン $5\gamma$ 2鎖とその構成鎖であるラミニン $\alpha$ 3、 $\beta$ 3鎖の発現局在を免疫組織化学的手法で検証する。この検証から、尿中の $\gamma$ 2単鎖が原発巣由来であることを、また、ラミニン $5\gamma$ 2鎖が炎症で誘発される尿路組織の崩壊に起因する可能性を検証する。この際、コラーゲンIV型についても検証することで基底膜の崩壊の指標とする。

## 4. 研究成果

(1)がん患者の尿中におけるラミニン $\gamma$ 2単鎖の発現(ウエスタンブロットによる分析)

結果を下図に示す。



種々の患者尿中にD4B5抗体で認識されるスメアなバンドが分子量150kDa、100kDa、80kDa付近に検出された。分子量150kDaはインタクトなラミニン $\gamma$ 2単鎖、100および80kDaはMMPsやBMP-1などのメタロプロテアーゼによるプロセッシングを受けたラミニン $\gamma$ 2単鎖の断片と予想される。また、検出バンドがスメアである理由は、ラミニン $\gamma$ 2鎖に翻訳後修飾で糖鎖が付加されることが上げられる。一方、非還元条件下のラミニン5は $\alpha$ 3、 $\beta$ 3鎖とジスルフィド結合により会合しているために、分子量はラミニン単鎖より大きな450kDa付近にインタクト、プロセッシング断

片として検出されたが、ラミニン  $\gamma$  2 単鎖に比較するとわずかな量であった。膀胱がんについては、21例中13例においてラミニン  $\gamma$  2 単鎖が陽性であった。

### (2) 尿中と組織中のラミニン $\gamma$ 2 単鎖の検出の相関

(1)の結果に基づき、ウエスタンブロッティングによる尿中のラミニン  $\gamma$  2 単鎖の検出結果と、免疫組織化学による腫瘍組織中のラミニン  $\gamma$  2 単鎖の検出結果の相関を以下の表に示す。

サンプル ID	尿		組織	病理組織		
	WB ( $\gamma$ 2単鎖)	WB (Ln $\gamma$ 2単鎖)	IH	核異型度 1<=<3(大)	上皮内癌・表在性癌・浸潤癌	
150	3	1	+	膀胱小細胞癌	なし	浸潤癌
162	4	2	+	尿路上皮癌	3	表在性癌
166	1	0	+	尿路上皮癌	3	浸潤癌
177	2	0	+	尿路上皮癌	3	表在性癌
179	4	2	++	尿路上皮癌	3	浸潤癌
190	2	2	+	尿路上皮癌	3	表在性癌
128	0	0	+	尿路上皮癌	2	表在性癌
155	0	0	±(数が少ない)	尿路上皮癌	3	上皮内癌
161	0	0	±(数が少ない)	尿路上皮癌	3	表在性癌
165	0	0	±	尿路上皮癌	2	表在性癌
184	0	0	±(薄い)	尿路上皮癌	2	表在性癌
193	0	0	-	尿路上皮癌	3	浸潤癌

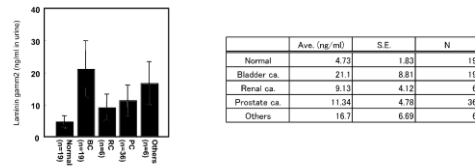
免疫組織化学で+又は++と判定されたものはほとんど、尿サンプルのウエスタンブロッティングによってもラミニン  $\gamma$  2 単鎖の発現を検出できることを確認した。尿細胞診では検出困難な表在性膀胱癌においても、4例中4例で、尿サンプルにおけるラミニン  $\gamma$  2 単鎖の発現が確認された。一方、免疫組織化学で±と判定されたもの(染色された細胞数が少なかったもの、又は染色が薄かったもの)は尿サンプルのウエスタンブロッティングではラミニン  $\gamma$  2 単鎖の発現を確認できなかった。これらについては、尿サンプルにおけるラミニン  $\gamma$  2 単鎖の検出感度を改善することにより、尿サンプルを用いた診断が実現されるものと考えられる。

### (3) 尿中のラミニン $\gamma$ 2 単鎖検出の感度及び特異度

上記の結果から、膀胱癌(19名)と健常者(19名)のサンプルについて、尿中のラミニン  $\gamma$  2 単鎖のELISAによる測定値の平均値は、それぞれ21.14 ng/ml、4.73 ng/mlで、t検定で有意差が認められた(P<0.05)。現在の最小測定値は0.5 ng/mlであるので、これをカットオフ値として感度と特異度を求めた。結果を下図に示す。感度は89.5%、特異度は57.9%と求められ、尿中のラミニン  $\gamma$  2 単鎖が、従来膀胱癌診断に用いられているマーカーよりも高感度なマーカーであることが確認され

た。さらに、尿中のラミニン  $\gamma$  2 単鎖の感度は、より高感度にすることが可能であり、膀胱癌スクリーニング検査として有用なものとなり得る。

Quantitative detection of LN- $\gamma$ 2 in urine samples

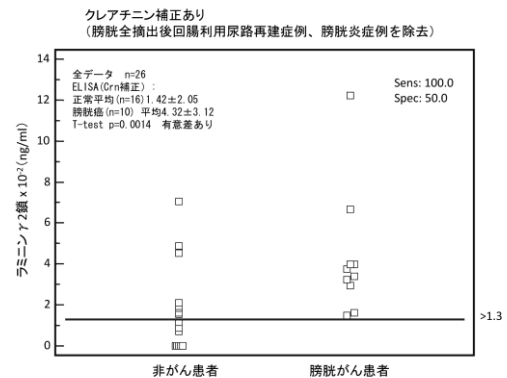


### (4) 尿中のラミニン $\gamma$ 2 単鎖のELISAによる定量(クレアチニン補正あり)

尿検体数を増やして、尿中のラミニン  $\gamma$  2 単鎖の定量をさらに行った。

患者から採取した尿は、室温3000gの遠心処理を行い、細胞及びその破片を除去した後、-80℃に急速に冷凍して保存した。

非がん患者尿(104例)および膀胱がん患者尿(32例、回腸利用尿路再建症例、膀胱炎症例は含まず)のラミニン  $\gamma$  2 鎖をELISAで測定した(下図)。



26検体のうち、非がん患者尿中(n=16)のラミニン  $\gamma$  2 鎖の平均値は1.42 ± 2.05 ng/ml、膀胱がん患者尿中(n=10)では4.32 ± 3.12 ng/mlであった。T-testにおいてはp=0.0014となり、有意差が得られた(下図)。

この結果について統計的に処理を行ったところ、カットオフ値は1.3 ng/ml、感度及び特異性は、それぞれ100%、50.0%と飛躍的に向上した(図10)。感度が100%になったのは解析数が少ないためと思われる。カットオフ値を1.3 ng/mlに設定しているが、これを下げることで、特異性はさらに向上すると考えられる。以上から、クレアチニンによる補正を行うことで、より正確な定量解析ができると考えられた。

### 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 17 件)

1. Shuo T, Koshikawa N, Hoshino D, Minegishi T, Ao-Kondo H, Oyama M, Sekiya S, Iwamoto S, Tanaka K, Seiki M. Detection of the heterogeneous O-glycosylation profile of MT1-MMP expressed in cancer cells by a simple MALDI-MS method. *PLoS One*. 2012;7(8):e43751. doi: 10.1371/journal.pone.0043751.
2. Saitou T, Itano K, Hoshino D, Koshikawa N, Seiki M, Ichikawa K, Suzuki T. Control and inhibition analysis of complex formation processes. *Theor Biol Med Model*. 2012 Aug 3;9:33. doi: 10.1186/1742-4682-9-33.
3. Nishida C, Kusubata K, Tashiro Y, Gritli I, Sato A, Ohki-Koizumi M, Morita Y, Nagano M, Sakamoto T, Koshikawa N, Kuchimaru T, Kizaka-Kondoh S, Seiki M, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K. MT1-MMP plays a critical role in hematopoiesis by regulating HIF-mediated chemokine/cytokine gene transcription within niche cells. *Blood*. 2012 Jun 7;119(23):5405-16. doi: 10.1182/blood-2011-11-390849.
4. Hoshino D, Koshikawa N, Suzuki T, Quaranta V, Weaver AM, Seiki M, Ichikawa K. Establishment and validation of computational model for MT1-MMP dependent ECM degradation and intervention strategies. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(4):e1002479. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002479.
5. Nagano M, Hoshino D, Koshikawa N, Akizawa T, Seiki M. Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:310616. doi: 10.1155/2012/310616.
6. Saitou T, Rouzaimaiti M, Koshikawa N, Seiki M, Ichikawa K, Suzuki T. Mathematical modeling of invadopodia formation. *J Theor Biol*. 2012 Apr 7;298:138-46. doi: 10.1016/j.jtbi.2011.12.018.
7. Uematsu T, Konishi C, Hoshino D, Han X, Tomari T, Egawa N, Takada Y, Isobe T, Seiki M, Koshikawa N. Identification of proteins that associate with integrin  $\alpha 2$  by proteomic analysis in human fibrosarcoma HT-1080 cells. *J Cell Physiol*. 2012 Aug;227(8):3072-9. doi: 10.1002/jcp.23054.
8. Hamasaki H, Koga K, Aoki M, Hamasaki M, Koshikawa N, Seiki M, Iwasaki H, Nakayama J, Nabeshima K. Expression of laminin 5- $\gamma 2$  chain in cutaneous squamous cell carcinoma and its role in tumour invasion. *Br J Cancer*. 2011 Sep 6;105(6):824-32. doi: 10.1038/bjc.2011.283.
9. Nagano M, Hoshino D, Koshiba S, Shuo T, Koshikawa N, Tomizawa T, Hayashi F, Tochio N, Harada T, Akizawa T, Watanabe S, Handa N, Shirouzu M, Kigawa T, Yokoyama S, Seiki M. ZF21 protein, a regulator of the disassembly of focal adhesions and cancer metastasis, contains a novel noncanonical pleckstrin homology domain. *J Biol Chem*. 2011 Sep 9;286(36):31598-609. doi:10.1074/jbc.M110.199430.
10. Srichai MB, Colleta H, Gewin L, Matrisian L, Abel TW, Koshikawa N, Seiki M, Pozzi A, Harris RC, Zent R. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) modulates water homeostasis in mice. *PLoS One*. 2011 Feb 11;6(2):e17099. doi: 10.1371/journal.pone.0017099.
11. Onozuka I, Kakinuma S, Kamiya A, Miyoshi M, Sakamoto N, Kiyohashi K, Watanabe T, Funaoka Y, Ueyama M, Nakagawa M, Koshikawa N, Seiki M, Nakauchi H, Watanabe M. Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrix metalloproteinase-2 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Mar 4;406(1):134-40. doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.012.
12. Hoshino D, Koshikawa N, Seiki M. A p27(kip1)-binding protein, p27RF-Rho, promotes cancer metastasis via activation of RhoA and RhoC. *J Biol Chem*. 2011 Jan 28;286(4):3139-48. doi: 10.1074/jbc.M110.159715.

13. 13: Koshikawa N, Mizushima H, Minegishi T, Eguchi F, Yotsumoto F, Nabeshima K, Miyamoto S, Mekada E, Seiki M. Proteolytic activation of heparin-binding EGF-like growth factor by membrane-type matrix metalloproteinase-1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Sci.* 2011 Jan;102(1):111-6. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01748.x.
14. 14: Nagano M, Hoshino D, Sakamoto T, Akizawa T, Koshikawa N, Seiki M. ZF21 is a new regulator of focal adhesion disassembly and a potential member of the spreading initiation center. *Cell Adh Migr.* 2011 Jan-Feb;5(1):23-8.
15. 15: Riggins KS, Mernaugh G, Su Y, Quaranta V, Koshikawa N, Seiki M, Pozzi A, Zent R. MT1-MMP-mediated basement membrane remodeling modulates renal development. *Exp Cell Res.* 2010 Oct 15;316(17):2993-3005. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.08.003.
16. Koshikawa N, Mizushima H, Minegishi T, Iwamoto R, Mekada E, Seiki M. Membrane type 1-matrix metalloproteinase cleaves off the NH2-terminal portion of heparin-binding epidermal growth factor and converts it into a heparin-independent growth factor. *Cancer Res.* 2010 Jul 15;70(14):6093-103. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0346.
17. Nagano M, Hoshino D, Sakamoto T, Kawasaki N, Koshikawa N, Seiki M. ZF21 protein regulates cell adhesion and motility. *J Biol Chem.* 2010 Jul 2;285(27):21013-22. doi: 10.1074/jbc.M110.106443.

[学会発表] (計7件)

1. Koshikawa, N. et al.: Membrane type-1 matrix metalloproteinase is a potent regulator of cancer malignant progression through the heparin-binding EGF-like growth factor activation. H25. 1. 24, San Diego, USA
2. 鎌田雅行、越川直彦他:尿中腫瘍分泌蛋白 X 検出による尿路上皮癌診断の可能性、日本癌治療学会、H24. 10. 25、横浜
3. Koshikawa, N. et al.: Proteolytic activation of HB-EGF by MT1-MMP in

- ovarian carcinoma cells. 第70回日本癌学会総会、H23. 10. 7、名古屋
4. 越川直彦他:がん細胞膜上の微小環境、第20回日本がん転移学会学術総会、H23. 6、浜松
5. Koshikawa, N. et al.: MT1-MMP is a potent regulator of malignant progression in tumor microenvironment. 国際研究集会「がん細胞の数理科学」H23. 6、広島
6. Koshikawa, N. et al.: MT1-MMP is a potent regulator of malignant progression in tumor microenvironment. 米国マトリックス生物学会 10周年記念総会、H22. 10. Charleston, USA
7. 越川直彦他:がん微小環境での悪性化制御因子としてのMT1-MMPの役割、第69回日本癌学会総会、H22. 9. 大阪

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 泌尿器科がんの検査方法および検査用キット

発明者: 越川直彦、清木元治、鎌田雅行、執印太郎、

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2011-050444

出願年月日: 2011年3月8日

国内外の別: 日本

○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

<http://www.motoharu-seiki.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越川直彦 (KOSHIKAWA NAOHIKO)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号: 70334282

(2) 連携研究者

執印太郎 (SHUIN TARO)  
高知大学・医学部・教授  
研究者番号：70128601

(3) 連携研究者  
周尾卓也 (SHUO TAKUYA)  
東京大学・医科学研究所・特任研究員  
研究者番号：90399006