

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592341

研究課題名(和文)尿路上皮癌の新規尿中マーカー 80KDa糖蛋白の臨床的意義と生物学的役割

研究課題名(英文)A novel urinary marker for detection of urothelial carcinoma The clinical significance and the biological role of 80KDa glycoprotein

研究代表者

木村 太一(Kimura, Taichi)

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60596360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの実験で我々が尿路上皮癌患者尿で同定した尿中80KDa糖蛋白の抗体を使用し100症例の膀胱癌患者尿でウエスタンブロットを行うと、この糖蛋白への陽性反応は病理学的悪性度と比例して、統計学的に有意に強かった。

複数の膀胱癌細胞株(=A)と正常尿路上皮細胞株(=B)を用いてRNAを抽出しPCRを施行すると、この80KDa糖蛋白の発現をAで確認できたが、Bでは発現が非常に弱いか、発現を認めなかった。そこでAに対し脱メチル化および脱アセチル化処理後PCRを施行すると、全ての株で80KDa糖蛋白は再発現した。一方、免疫組織学的染色では尿路上皮癌と正常尿路上皮を統計学的有意に鑑別できなかった。

研究成果の概要(英文)：Western blot analysis was performed using urine of the patients with bladder cancer (about 100 cases) by using the antibody reacts to the 80KDa glycoprotein (we detected previously). The result was revealed that these expression levels of 80KDa glycoprotein were higher in the advanced pathological grade cases statistically significance.

The real-time PCR revealed that mRNA level of 80KDa glycoprotein was higher in the order of normal urothelial cell line, low-grade urothelial cancer cell line and high-grade urothelial cancer cell lines. Treatment with histone deacetylase inhibitor and DNA methylation inhibitor restored LTF expression in urothelial cancer cell lines. Immunoreactivity of the 80KDa glycoprotein was undistinguished between cancer cells and normal urothelial cells in radical cystectomy specimens.

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：腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

我々は、癌の糖鎖研究の過程で、糖鎖 GalNacDSLc4を認識するモノクローナル抗体 RM2が前立腺癌由来の糖蛋白である haptoglobin-beta鎖に選択的に反応すること、RM2が認識するhaptoglobin-beta鎖は前立腺癌の新たな組織ならびに血清マーカーであることを報告した(Saito S, et al: Int J Cancer 2008)。

近年、haptoglobin構成分子(alpha鎖やbeta鎖)は、汎腫瘍マーカーとしての可能性を有しているといわれている。これらの報告は、ある特定の糖鎖がある種の癌に存在する糖蛋白に発現すれば、そのような特定の糖鎖を探索することで新しい腫瘍マーカーを見つけられる可能性を示唆する。

現在の膀胱癌の診療では、尿細胞診が95%という高い特異度を持つものの、感度が40%以下と低いことが難点である。つまり尿細胞診の感度が非常に低いため、癌の診断が遅れる可能性や侵襲的な検査である膀胱鏡を診断のために施行しなくてはならないといった問題があることから、膀胱癌における新しい尿中マーカーが早急に必要な状況である。さらに、肉眼的血尿を主訴に来院される症例の約30%が、診断の時点ですでに5年生存率が50%しかない筋層浸潤性膀胱癌の状態である。そこで我々は、膀胱癌患者尿中で、特定の糖鎖を認識するモノクローナル抗体を利用して、特定の糖鎖を発現する糖蛋白(マーカー)を探索しようとした。目的とするのは、筋層浸潤性膀胱癌へ進行する前に、悪性度の高い尿路上皮癌を検出できるような尿中マーカーである。

まず約50症例の尿路上皮癌患者の尿20 μ lを用いて、モノクローナル抗体RM2による尿中糖蛋白の検出をウエスタンブロッティング法で行ったところ、75~80kDaの尿中糖蛋白が検出された。さらにRM2抗体への反応は、腫瘍の悪性度が高い症例ほど強い反応を認めた。このRM2抗体へ反応する尿中糖蛋白の解析を行い、数種類の糖蛋白が新しい尿中マーカーになりうる可能性があることが判明した。次に、判明した数種類の糖蛋白に対応する抗体と膀胱癌患者尿を用いて、再度ウエスタンブロッティング法で反応を確認すると、ある1つの抗体が悪性度の高い膀胱癌患者ほど尿中80kDa糖蛋白が増加することが確認できた。

2. 研究の目的

最終目的は、尿中80kDa糖蛋白が、特に悪性度の高い膀胱癌を、無症候性血尿で発見されるより前に、より早期癌の状態で見出せる能力を有するか否かを調べることであり、その過程で治療へつながるなんらかの遺伝

子の発現が関与しているのかも調査する。

3. 研究の方法

(1)72症例の膀胱癌患者の尿を用いて、尿中80kDa糖蛋白の抗体への反応をウエスタンブロッティング法で調べる。

(2)上記(1)で得られた反応レベルと臨床病理学的パラメーターとの相関を解析し、悪性度との関連があるか否かを調査する。

健常人13症例、泌尿器科を受診した良性疾患82症例の尿を用いて尿中80kDa糖蛋白の抗体への反応を調査し、膀胱癌との鑑別マーカーとしての可能性を有するかを調査する。

(3)この尿中80kDa糖蛋白の膀胱癌における遺伝子レベルでの発現について調査し、尿中マーカーとともに治療へつなげられるかの検討も行う。

(4)この尿中75~80kDa糖蛋白の、膀胱癌組織内での存在の有無、正常尿路上皮組織との鑑別が可能かどうか、膀胱癌細胞内の増殖・浸潤等の悪性形質における役割を解析する。

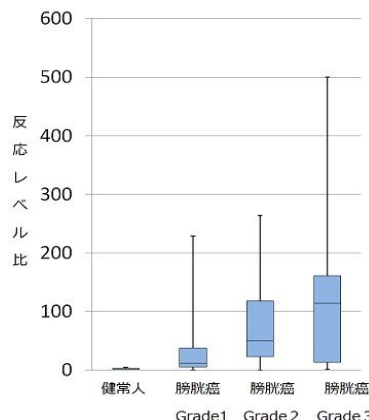
(5)実用的な尿中マーカーとして、スポット尿による簡易アッセイ系のプロトタイプ(試験紙法など)の作成を試み、感度、特異度を調査する。最終的には、特に悪性度の高い癌を筋層浸潤する以前の段階で検出できるかどうか、尿細胞診と比較して癌細胞の検出率に優れるか否かを調査する。

4. 研究成果

<3-(1)および3-(2)に対する結果>

尿中80kDa糖蛋白の抗体を使用し72症例の膀胱癌患者尿および健常人尿でウエスタンブロットを行うと、健常人と比較して悪性度の高い膀胱癌患者尿ほどこの糖蛋白の陽性反応が強くなることが分かった。(図1)

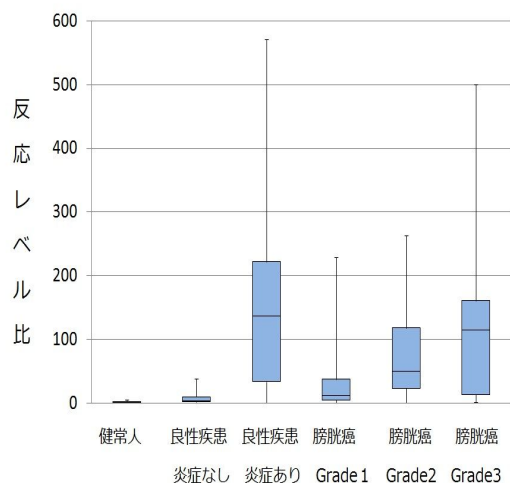
<図1> 健常人と膀胱癌の各悪性度(Grade)における尿中80kDa糖蛋白の反応レベル



さらに、当科を受診した良性疾患症例82例のうち、尿中白血球が10個/Hpf以上と炎症を認めた症例（図2では「炎症あり」と表記。40症例）と尿中白血球10個/Hpf未満の炎症の無い良性疾患（図2では（炎症なし）」と表記。42症例）についても、尿を用いて同様に尿中80KDa糖蛋白への抗体に対する反応を確認したところ、炎症のない良性疾患は健常人とほぼ同様に抗体反応は非常に弱かったが、炎症を有する症例は強い陽性反応を示した。（図2）

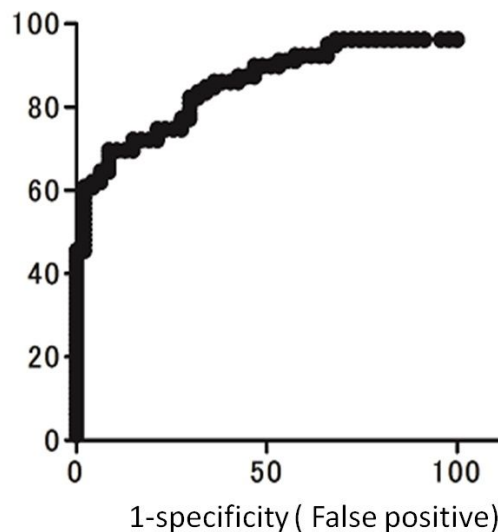
< 図2 >

健常人と良性疾患（炎症なし、炎症あり）と膀胱癌の各悪性度(Grade)における尿中80KDa糖蛋白の反応レベル



以上の結果から、尿中80KDa糖蛋白への抗体が、膀胱癌と健常人および良性疾患（炎症なし）を鑑別するマーカーとして利用価値があるのか、ROC曲線で解析してみた。（図3）すると、膀胱癌と健常人・良性疾患（炎症なし）との鑑別のためのカットオフ値を13に設定すると、感度72.2%、特異度91.5%であった。ただし、良性疾患のうち炎症のある症例との鑑別には適さない結果であった。

< 図3 > 膀胱癌と健常人および良性疾患（炎症なし）の尿中80KDa糖蛋白への抗体反応を比較したROC曲線



< 3-(3)に対する結果 >

リアルタイム PCR を用いて、膀胱癌細胞株（KK47、YTS-1、5637、T24）と正常尿路上皮細胞株（SV-HUC-1MC-SV-HUC）における80KDa糖蛋白の mRNA の発現を確認した。すると、正常尿路上皮細胞株が最も発現が強く、ついで低悪性度膀胱癌細胞株（KK47）と続き、最も発現が弱いのが高悪性度膀胱癌細胞株（YTS-1、5637、T24）であった。（図4）

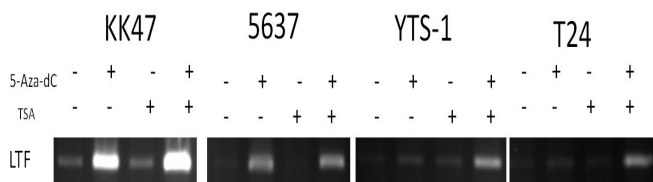
< 図4 > 膀胱癌細胞株と正常尿路上皮細胞株における80KDa糖蛋白の mRNA 発現



上記のように、膀胱癌患者の尿中80KDa糖蛋白が悪性度の高いほど強く発現しているにも関わらず、膀胱癌細胞株の mRNA レベルで

はこの80KDa糖蛋白の発現が非常に弱かったため、膀胱癌細胞株を脱メチル化処理（5-Aza-dC 使用）および脱アセチル化処理（TSA 使用）したところ、膀胱癌細胞株のmRNA が再発現した。（図5）何故そのようになったのか、現在検討中である

<図5> 膀胱癌細胞株を脱メチル化および脱アセチル化処理（TSA 使用）



<3-(4)に対する結果>

(4)- 免疫組織学的染色では、尿中80KDa糖蛋白に対する抗体は、尿路上皮癌と正常尿路上皮組織を、統計学的有意には鑑別できなかった。

(4)- 現在、尿中80KDa糖蛋白の膀胱癌組織内における浸潤や増殖に関与するかどうかについて検証するべく、実験系を立ち上げている最中である。

<3-(5)に対する結果>

尿中80KDa糖蛋白への抗体が実用的な尿中マーカーとして応用できないかどうか、またスポット尿による簡易アッセイ系のプロトタイプ（試験紙法など）の作成ができないか、現在検討段階である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 太一(Kimura Taichi)

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60596360

(2)研究分担者

松村 英理(Matsumura Eiri)

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30457676

斎藤 誠一(Saito Seiichi)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・

教授

研究者番号：80235043

町田 典子(Machida Noriko)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・

助教

研究者番号：70448588

(3)連携研究者：なし