

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430140

研究課題名(和文)膀胱がんにおける尿中腫瘍マーカーの探索

研究課題名(英文) Search for new urothelial cancer biomarkers

研究代表者

高 ひかり (TAKA, HIKARI)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60338374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：バイオマーカーの探索において、患者への負担が少ないという利点から血清又は尿が試料として多く用いられる。膀胱がんの最も効果的なバイオマーカーとしてNMP22があるが、偽陽性の割合が高い。そこで、膀胱がんの早期発見のためにがん患者からの尿を使用し、NMP22を補完する新しい診断バイオマーカーの探索を行った。その結果、がん患者の尿中にSNAレクチンと強く反応する75kDa(糖タンパク質X)と50kDa(糖タンパク質Y)のタンパク質が同定できた。さらに、SNAレクチンとの反応の強さは腫瘍の悪性度と相関があり、糖タンパク質XおよびYの糖鎖がNMP22を補完する新規バイオマーカーとしての可能性を見つけた。

研究成果の概要(英文)：Biomarkers from sample of serum or urine have the advantage of being less of a burden to the patients. Currently the most effective biomarker for bladder cancer is NMP22. However, NMP22 has the problem of presenting a very high rate of false positive. In this study, we examined for a new diagnostic biomarker to complement NMP22 using urine from bladder cancer patients in order to attempt early detection of bladder cancer. Protein bands detected at 75kDa (glycoprotein X) and 50kDa (glycoprotein Y) reacted strongly to SNA lectin in the urine of patients with bladder cancer. The stronger reactivity was correlated with an increase in malignancy. The sugar chains of glycoprotein X and Y are suggested the possibility as a novel biomarker which complement NMP22. Analysis of sugar chains of glycoprotein X and Y in urine will be useful tool for early diagnosis of bladder cancer.

研究分野：質量分析によるタンパク質翻訳後修飾解析

キーワード：尿中腫瘍マーカー 糖タンパク質 ウエスタンブロット ELISA 膀胱がん 糖タンパク質抗体

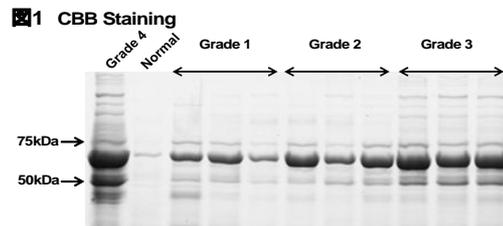
1. 研究開始当初の背景

尿は腎臓で産生され尿路（腎盂、尿管、膀胱、尿道）を通過して体外に排出される。この尿路上皮が癌化したものが尿路上皮がんであり、腎盂癌、尿管癌、膀胱癌、尿道癌が含まれる。尿路上皮がんの中で膀胱がんは最も死亡率が高く、7割以上を占める。罹患（りかん）数でも膀胱がんが最も多く、尿路がん全体の約半数を占める。年齢別にみた膀胱がんの罹患率は、男女とも60歳以降で増加し、40歳未満の若年では低い。また、男性のほうが女性より膀胱がん罹患率が高く、女性の約4倍である。罹患率の国際比較では、膀胱がんは欧米白人で高く（アメリカでは男性の全がん患者の25%が泌尿器系のがんを占めている）日本人を含む東アジア系民族では低い傾向がある。しかしながら、日本でも近年、食生活や生活様式が欧米化したためか、最近泌尿器系のがんでは前立腺がんに次いで膀胱がんが増加している。膀胱がんは、その発症頻度が比較的低いこと（日本では男性：悪性腫瘍の第11位・女性：悪性腫瘍の第14位）、前立腺がんにおけるPSAのような有効なスクリーニングマーカーがないことなどから、現在のところ一般人口を対象とした検診スクリーニングは施行されていない。また、原因の明らかな膀胱がんは少なく、ほとんどの膀胱がんは自然発生であり、その機序についてはまだ十分には分かっていない。膀胱がんの予後は依然として悪く、再発率の高いがんである。（上皮内膀胱がん5～15% / 2年以内、表在性膀胱がん50～70% / 2年以内、10～20%は浸潤がんに移行してしまう。）そこで、早期発見・早期診断が強く望まれるが、前立腺がんで用いられるPSAのような臨床的に有用なマーカーが見出されていない。現在、膀胱がんマーカーとして最も有効性が高いといわれている尿中NMP22（核マトリックスプロテイン）は細胞核内に存在し、尿路上皮がんにおいては正常細胞に比べ約2.5倍存在すると言われており、細胞死に伴い直接尿に放出されるため尿路上皮がん患者の尿中で増加する事から尿路上皮がんのスクリーニング検査に有用とされている。しかし、尿路感染症で偽陽性率が高く、がんにおいて特異性の高いバイオマーカーではない。そこで今後、尿路上皮がんに対する特異的かつ、その生物学的活性を反映し得るマーカーの開発が必須であり、より有効な治療薬やより良い治療方法を行うためのバイオマーカーの発見の必要性が指摘されている。近年、臨床プロテオミクスの領域において、様々な疾患バイオマーカーの探索に多くの研究が集中している。その際、用いる試料としては患者への負担が少なく採取が簡便な血清あるいは尿が用いられており、老化に伴い好発する尿路上

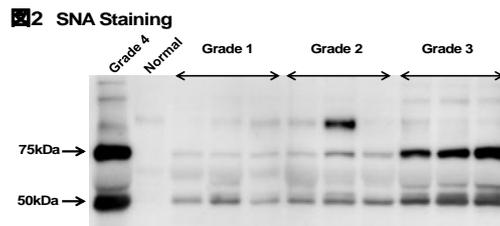
皮がん患者尿を用いて臨床的に有用なバイオマーカーの探索を行い、尿路上皮がんの早期発見・早期診断を目指す。見つけた新たな尿中腫瘍マーカーが、尿中NMP22 或いはBTA test（尿中の膀胱腫瘍関連抗原の定性的検出を意図する in-vitro のイムノアッセイ）を補完し、膀胱がんに対し、感度と特異性があり、早期発見・早期診断が可能であるか検討する。

2. 研究の目的

泌尿器系がんのなかでも膀胱がんは、前立腺がんにおけるPSAのような有効なスクリーニングマーカーがないことなどから、現在のところ一般人口を対象とした検診スクリーニングは施行されていない。しかし、膀胱がんの予後は依然として悪く（再発率の高いがんである）早期発見・早期診断が強く望まれる。そこで、我々は膀胱がんの早期発見につながる患者への負担が少ない尿中腫瘍マーカーの探索を行った。その結果、尿中に腫瘍マーカー候補と成り得る2つの有力な糖タンパク質を見つけた。（図1、2）



*膀胱がん患者尿: Grade1～4 最終病理組織診断済み、Normal: 健常者尿



*75kDa や 50kDa タンパク質は悪性度(Grade)が進行するほど SNA レクチン染色が著しく増加

そこで、これらの糖タンパク質の性質を詳細に調べると共に同定した糖タンパク質から糖鎖修飾ペプチドを切りだし、糖鎖修飾ペプチドを抗原としたがん特異的な抗体を製作する。また、糖鎖修飾抗体の特異性を検討し、尿中の糖タンパク質が尿路上皮がん患者のバイオマーカーとなるか実用性を検討する。さらに、糖鎖修飾抗体を用い、酵素結合抗体法(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay: ELISA)のキット化を目標にする。患者への負担が少ない試料(尿)を使用し、膀

膀胱がんに対し感度や特異性が高く、NMP22 あるいは BTA test を補完し、早期発見・早期診断につながる新規尿中腫瘍マーカーとしての可能性・有効性を評価する。

3. 研究の方法

膀胱がん患者(Grade 3 以上)由来の尿から糖タンパク質 X(75kDa)及び Y(50kDa)を免疫沈降及びゲル濾過法を用いて精製する。精製した糖タンパク質をトリプシン消化後、HPLCで糖鎖修飾ペプチドを分離精製する。精製した糖鎖修飾ペプチドを抗原にしてウサギ及びマウスに免疫を行いモノクローあるいはポリクローナル抗体を作製し、抗体の特異性の評価を行う。一次スクリーニングとして膀胱がん患者(Grade 1,2,3,4)、健常者由来の尿を用いてウエスタンブロットを行う。尿中糖タンパク質 X 及び Y に対する反応性の違いからがん患者由来の糖鎖修飾ペプチド抗体の特異性の評価を行う。さらに、Grade (悪性度)との相関関係も評価する。ELISA 法の開発を目指し、健常者と比較してがん患者に対する特異性と感度の評価を行う。

4. 研究成果

(1) 平成25年度

糖鎖修飾ペプチドの精製：膀胱がん患者(Grade 3 以上)及び健常人由来の尿から糖タンパク質 X 及び Y を免疫沈降及びゲル濾過法を用いて精製した。単離した糖たんぱく質 X 及び Y をトリプシン消化後、Sepharose CL4B を用いる和田らの方法に従って糖鎖修飾ペプチド(Glycopeptide)を分離精製した。糖鎖修飾ペプチドを抗原にしてウサギ及びマウスに免疫を行い抗体を作製した。

抗体の評価：スクリーニングとして膀胱がん患者(Grade 1,2,3,4)、健常者由来の尿を用いてウエスタンブロットを行い、尿中糖タンパク質 X 及び Y に対する反応性の違いからがん患者由来の糖鎖修飾ペプチド抗体の特異性の評価を行った。

糖タンパク質 X 及び Y の糖鎖構造解析：精製した糖タンパク質の一部を用いて糖鎖構造解析を行った。N 結合型糖鎖の構造解析は西村らの BlotGlyco 法を、O 結合型糖鎖の構造解析は篠原らの方法を用いた。その結果、健常人と比較して膀胱がん患者由来の糖たんぱく質 X 及び Y ではシアル酸を有する NeuAc 2-6/ 3Gal/ GalNAc 及びフコシル化の糖鎖構造が上昇していた。今回の実験では、O 結合型糖鎖は検出限界以下であった。抗原である糖鎖修飾ペプチドの必要量を得るのに予定よりも時間を要したが、質量分析(MALDI TOF MS)により、がんでは上昇する糖たんぱく質 X 及び Y の糖鎖構造を解析することが出来た。

(2) 平成26年度

膀胱がん患者(Grade 3 以上)及び健常人由

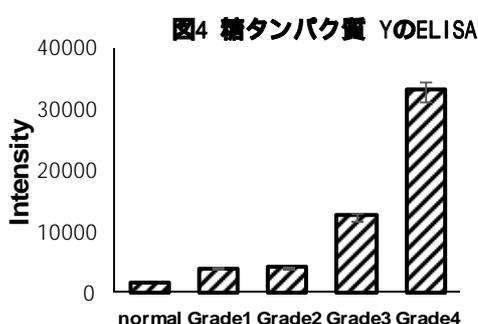
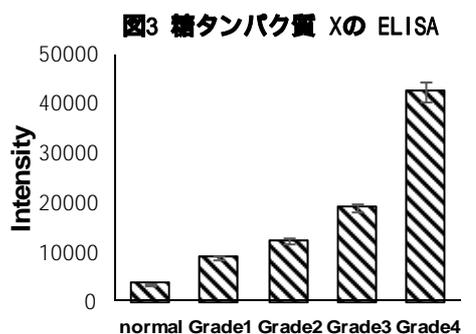
来の尿から糖タンパク質 X 及び Y を免疫沈降及びゲル濾過法を用いて精製し、目的の抗原糖鎖修飾ペプチドを精製できた。

ウサギで作成した 75kDa の糖タンパク質 X 由来の抗体をウエスタンブロット法で確認した。膀胱がん患者の悪性度の Grade が進行する程に、抗体で染色される割合が増加した。また、健常人と優位に区別することが可能であり、尿 10ul 中の糖鎖タンパク質 X を検出できることから、十分な感度が得られていた。50kDa の糖タンパク質 Y 由来の抗体は Grade 1 と 2 の間であまり差がなく、Grade 3 まで進まないという差が見られなかったが、作製した抗体の精製度を上げる(純度を良くすることにより十分解決可能と考えた。マウスで作製した 75kDa の糖タンパク質 X 由来の抗体をウエスタンブロット法で確認したところ、特異性はウサギ抗体より高い傾向を示したが感度において不十分であった。ELISA 法を構築する上で、ウサギあるいはマウスで作製した抗体のどちらがより有効で実用的であるか、検討を重ねているところである。また、実用的な ELISA 法にする為に測定可能なプロトコルや反応条件の最適化も検討している。今回作製した抗体は、一般的なペプチドあるいはタンパク質に対する抗体と違い、糖鎖修飾を含むペプチド構造全体を認識するのが特徴的であり、がん特異的な糖鎖修飾ペプチド配列を認識している。

(3) 平成27年度

糖鎖修飾ペプチド抗体の特異性の評価：膀胱がん患者尿から見つけた糖タンパク質 X 及び Y のタンパク質に対する抗体(市販品)とウサギから作製した糖鎖修飾ペプチド抗体を用いた多項目同時測定系の構築を図った。サンドイッチ ELISA 法により健常者とがん患者由来の尿を比較し、特異性と感度の評価を行った。一次抗体にタンパク質に対する市販品の抗体 X 及び Y を用い尿中のタンパク質 X 及び Y をキャプチャーした。その後、二次抗体としてビオチン標識糖鎖修飾ペプチド(糖鎖修飾ペプチド X 及び糖鎖修飾ペプチド Y)抗体を結合させストレプトアビジン-フィコエリスリン(PE)で蛍光ラベルした。この方法により、尿中の糖タンパク質 X 及び Y の糖鎖修飾(糖鎖修飾ペプチド)量を同時に測定することが可能となり、従来の ELISA 法に比べ試料量や測定時間を短縮することができた。膀胱がん患者の悪性度の Grade が進行する程に蛍光強度が増加した。特に、75kDa の糖タンパク質 X で顕著であり、膀胱がん患者由来の尿と健常人由来の尿を優位に区別することが可能であった。一方、50kDa の糖タンパク質 Y では Grade 1 と 2 の間であまり差がなく、Grade 3 まで進まないという顕著な差が見られなかった。用いた試料量は尿 10~100ul 中の糖鎖タンパク質 X 及び Y を検出可能であることから、十分な感度が得られた。糖タンパク質 X 及び Y の糖鎖を同時に測定することにより膀胱がん患者由来の尿と健常人由来の

尿を優位に区別することが可能であり、今回作製した ELISA 法 (図 3 , 4) は膀胱がん患者尿を用いて NMP22 を補完できる診断法の可能性を示した。



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 10 件)

Kuba M, Matsuzaka T, Matsumori R, Saito R, Kaga N, Taka H, Ikehata K, Okada N, Kikuchi T, Ohno H, Han SI, Takeuchi Y, Kobayashi K, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Sone H, Yahagi N, Arakawa Y, Fujimura T, Nakagawa Y, Yamada N, Shimano H., Absence of Elovl6 attenuates steatohepatitis but promotes gallstone formation in a lithogenic diet-fed Ldlr(-/-) mouse model., *Sci Rep.*, 査読有, vol.5, 2015, pp17604, doi: 10.1038/srep17604.

Seko Y, Fujimura T, Yao T, Taka H, Mineki R, Okumura K, Murayama K., Secreted tyrosine sulfated-eIF5A mediates oxidative stress-induced apoptosis, *Sci Rep.*, 査読有, vol.5, 2015, pp13737, doi: 10.1038/srep13737.

Sugimoto K, Suzuki HI, Fujimura T, Ono A, Kaga N, Isobe Y, Sasaki M, Taka H, Miyazono K, Komatsu N, A clinically attainable dose of L-asparaginase targets glutamine addiction in lymphoid cell lines., *Cancer Sci.*, 査読有, vol.106, 2015, pp1534-1543, doi: 10.1111/cas.12807

Yamamoto E, Uchida T, Abe H, Taka H, Fujimura T, Komiya K, Hara A, Ogihara T, Fujitani Y, Ueno T, Watada H, Increased

expression of ERp57/GRP58 is protective against pancreatic beta cell death caused by autophagic failure., *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, vol.453, 2014, pp19-24, doi:10.1016/j.bbrc.2014.09.040.

Ouchi T, Tomita T, Horie A, Yoshida A, Takahashi K, Nishida H, Lassak K, Taka H, Mineki R, Fujimura T, Kosono S, Nishiyama C, Masui R, Kuramitsu S, Albers SV, Kuzuyama T, Nishiyama M., Lysine and arginine biosyntheses mediated by a common carrier protein in *Sulfolobus*., *Nat Chem Biol.*, 査読有, vol.9, 2013, pp2013-2019, doi: 10.1038/nchembio.1200.

[学会発表] (計 5 件)

根本崇弘、藤村務、加賀直子、高ひかり、上野隆、柿沼吉彦、妊娠中の摂取カロリー制限母ラットからの出生子でみられたグルココルチコイドフィードバックの異常と次世代仔への影響、BMB2015、2015年12月1日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

加賀直子、高ひかり、根本崇宏、上野隆、胎生期低栄養が引き起こす血中代謝物の変動解析、第9回メタボロームシンポジウム2015、2015年10月1日、三島市民文化会館 / 三島商工会議所 (静岡県・三島市)

Fujimura T, Matsumori S, Kaga K, Taka H, Kajiyama Y, Ueno T, Search of cancer markers in exhaled breath., *Metabolomics* 2014, 2014年6月24日、鶴岡第一ホテル / MARICA (山形県・鶴岡市)

藤村務、加賀直子、高ひかり、松森聖、梶山美明、上野隆、呼気中がんマーカー探索、がん代謝研究会、2013年10月31日、メタボロームキャンパスレクチャーホール (山形県・鶴岡市)

Hikari Taka, Tsutomu Fujimura, Jun-ichi Furukawa, Yasuro Shinohara, Saiko Kazuno, Reiko Mineki, Kimie Murayama, Takashi Ueno, Search for new urothelial cancer biomarkers, HUP02013, 2013年9月15日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

[図書] (計 1 件)

編集：富野康日己 (分担：高ひかり、藤村務)、中外医学社出版、腎臓病実験法ハンドブック、蛋白質関連実験操作法、2013、204-212

[その他]

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/seitai_bunshi/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高ひかり (TAKA, Hikari)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：60338374

(2) 研究分担者

藤村務 (FUJIMURA, Tsutomu)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70245778

(3)連携研究者

斎藤 誠一 (SAITO, Seiichi)

琉球大学・医学部・教授

研究者番号：80235043