

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460675

研究課題名(和文)新規腫瘍マーカー：クラスリン重鎖の、食道および頭頸部がん診断への応用

研究課題名(英文)Clathrin Heavy chain is a potential biomarker for histological diagnosis of various cancer

研究代表者

清宮 正徳 (SEIMIYA, Masanori)

千葉大学・医学部附属病院・副臨床検査技師長

研究者番号：20554265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の飲食物作用に関与するクラスリン重鎖(CHC)の染色は、肝細胞や食道の病理診断における腫瘍の良・悪性の鑑別に有用であることが判明している。我々は咽頭、喉頭、舌、歯肉の各悪性腫瘍症例についてCHC染色を行った結果、非癌部に比べて癌部で極端に強く発現しており、したがってCHC染色は、正確な病理組織診断に貢献できる可能性が示唆された。

また、癌患者の血清中の抗CHC抗体量を測定するために、CHCの2次構造の予測から親水領域や極性を割り出し、自己抗体生成における抗原部分を推定して12種のペプチドを合成した。今後ELISA法を開発して腫瘍マーカーとしての性能を評価する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Clathrin Heavy Chain (CHC) is an endocytosis related protein. We previously reported the immunohistochemical staining of CHC as a histological diagnostic marker of liver cancer or esophageal cancer. In this study, the usefulness for the histopathological diagnosis of pharynx carcinoma, larynx carcinoma, tongue carcinoma, and gingiva carcinoma were investigated. CHC was significantly more strongly expressed in the cytoplasm of malignant lesions, than in that of normal tissue or benign lesions. Therefore, the immunohistochemical staining of CHC is a potential biomarker for histological diagnosis of these cancer. Moreover, we synthesized the 12 peptide for serum anti-CHC antibody level. It will be necessary to develop the ELISA method and to evaluate performance for diagnosis of various cancer.

研究分野：臨床検査学

キーワード：臨床検査 病理診断 クラスリン重鎖 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

がんの早期発見は患者の予後や治療成績の向上に重要である。しかし現在使用されている腫瘍マーカーのみによる早期診断は多くのがんで困難であり、有用な腫瘍マーカーの開発が望まれている。一方病理学的診断においても、細胞の異型度や良悪性を客観的に評価し定量化できる分子マーカーはほとんどない。従って細胞の異型度や悪性を蛋白質等の発現強度で評価することができれば、病理組織診断の正確性に寄与することが期待できる。

このような新たながん関連蛋白質の発見を目指し、我々は原発性肝細胞がん(HCC)を対象に、HCCおよび肝臓の非がん部組織に含まれる蛋白質の網羅的な解析(プロテオーム解析)を行った。その結果、クラスリン重鎖(Clatrin heavy chain、以下CHC)が非がん部に比べがん部で発現が極端に強くなることが確認された。さらに、そしてHCCの組織を対象にCHCの免疫組織化学染色を行った結果、癌部の細胞質が非癌部の細胞質と比較して明らかに強く染色され、従ってCHCの免疫組織化学染色は、従来より鑑別が困難であったHCC、特に早期肝細胞がんの病理組織診断(癌部・非癌部の判別)に有用であった。

CHCは細胞膜および細胞内小器官における被覆小胞の表面のバスケット構造を構成する分子量190kDaの線維状蛋白質であり、細胞のエンドサイトーシス(高分子物質等の取り込み)に関与している。また近年、CHCは細胞膜に発現する種々の抗原蛋白質の細胞内への取り込みに関わり宿主の免疫応答に関与していること、約5%が核内に存在し姉妹染色体均等分配に必須な紡錘体微小管の安定性に関与すること、そして核内でがん抑制蛋白質であるp53と結合しp53の転写活性を増強することが報告される等、発がんや癌の進展にとって興味深い知見が得られている。さらにCHCは全身のほとんどの細胞の発育に必須の蛋白質である。従ってHCCのみならず、他のがんにおいても強く発現している可能性がある。すなわち、CHCの免疫組織化学染色はHCC以外の他のがんの病理組織診断においても有用である可能性がある。そこで、HCC以外のがん組織中のCHCの発現を免疫組織化学染色によって検討した。その結果、食道の進行癌および粘膜内癌においても増大していることが判明した。さらに、当院において切除された頭頸部進行癌数例についても実施した結果、CHCは非癌部に比べて癌部で明らかに強く発現していた。従ってCHCの免疫組織化学染色は頭頸部および食道等の上部消化管における上皮内腫瘍病変の良・悪性の鑑別に有用である可能性が示唆された。

一方で、CHCが癌部で強く発現していることはCHCあるいはその分解産物や抗CHC抗体が血液や尿等の体液中に流出している

可能性を示唆する。我々のこれまでの研究では、血清中のCHCの存在量のがんと関連が認められなかったが、抗CHC抗体の存在量は、HCC患者で多く存在する傾向が認められた。従って血清中抗CHC抗体は新たな腫瘍マーカーとなりうる可能性がある。

2. 研究の目的

上部消化管の各種腫瘍症例の病理組織についてCHCの組織染色を行い、組織診断マーカーとしての有用性を評価し、正確な病理診断に寄与することを目的とする。そして多くの癌の早期診断および分子標的治療へ寄与することを最終的な目的とする。

3. 研究の方法

(1)これまでの我々の研究により、食道がんをはじめとする上部消化管悪性腫瘍においてCHCが強く発現している可能性が示唆されたことから、当院において採取された咽頭がん、喉頭がん、舌がん、歯肉がんの各種腫瘍症例のパラフィン包埋標本について、抗CHC抗体を用いて染色する。得られた染色標本におけるCHCの発現強度を陰性から強陽性の4段階に分類し、病理組織診断結果との比較を行う。そして生検組織においてCHCが強く発現している症例を悪性と判断したときの的中率を求め、病理組織診断マーカーとしての可能性を評価する。さらに、市販のTissue micro arrayを購入して多数の症例におけるCHCの染色性を同様に評価する。

(2)抗CHC抗体の血清中抗体価の腫瘍マーカーとしての評価を行うために、安定して抗CHC抗体量を測定できる方法を作成する必要があることから、ELISA法を構築した上で、各種腫瘍症例の血清中抗CHC抗体濃度の評価を行う。具体的には、ELISAプレートにCHC抗原を固相化する。このCHC抗原は入手可能なCHCの全長蛋白質またはCHCの断片について検討する。これらに10~100倍程度に希釈した患者あるいは比較用健常ボランティアの血清を加えて反応させる。検出試薬としてペルオキシダーゼまたはアルカリフォスファターゼを標識した抗ヒトグロブリンを反応させ、ELISAプレートリーダーで吸光度を測定して抗CHC抗体量を測定する。以上の手法において、検出に最適な抗原や検出酵素試薬の選択、検体の希釈条件、反応時間などを検討する。

4. 研究成果

(1)各種組織における染色性の評価
全身の細胞のエンドサイトーシスの主役を務める蛋白質であるClatrin heavy chain(以下CHC)は、これまでの我々の研究で、多くの種類の癌の組織中で強く発現しており、特に原発性肝細胞癌(HCC)や食道上皮内腫瘍において、病理組織診断における腫瘍の良・悪性の鑑別に有用であることが判明し

ている。そして、他の上部消化管腫瘍の病理組織診断においても組織診断マーカーとして有用である可能性がある。

我々は、上部消化管の悪性腫瘍の切除標本について、CHC および既存の組織診断マーカーである p53 蛋白および Ki67 蛋白の免疫組織化学染色を行った。各マーカーの染色性について陰性、疑陽性、陽性、強陽性の4段階で評価し、陽性以上の染色性が認められた割合を算出した。その結果、CHC は喉頭癌(図2)、舌癌(図3)、咽頭癌(図4)、歯肉癌で非癌部に比べて明らかに強く発現(茶色に染色)しており、各腫瘍における陽性率は、それぞれ 83, 60, 89, 71%であった。そして、この陽性率は p53 や Ki67 よりも高い成績であった(表1)。

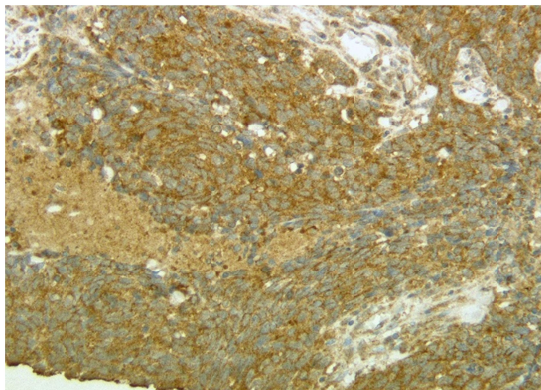


図2 喉頭癌組織のCHC染色像

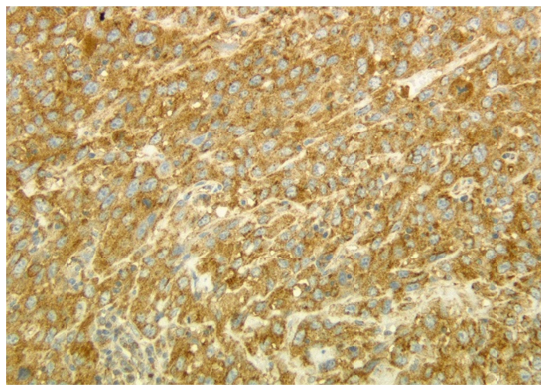


図3 舌癌組織のCHC染色像

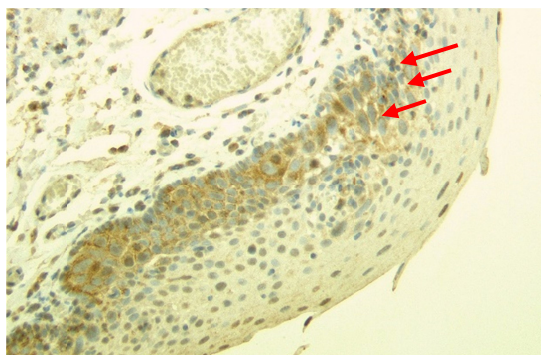


図4 咽頭癌組織のCHC染色像
赤矢印は癌部(左側)と非癌部(右側)の境界を示す

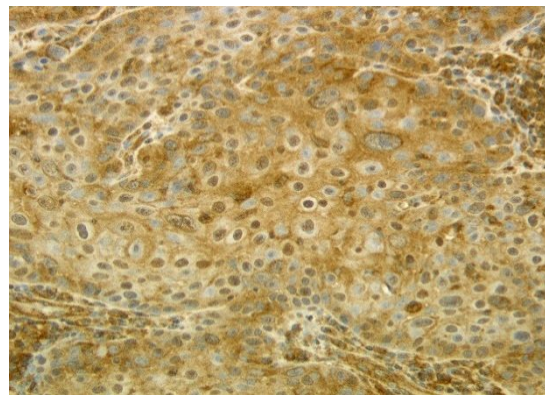


図5 歯肉癌組織のCHC染色像

表1 各種組織診断マーカーの陽性率(%)

	喉頭癌	舌癌	咽頭癌	歯肉癌
症例数	12	15	9	14
CHC	83	60	89	71
p53	33	60	44	31
Ki67	75	73	78	31

さらに、tissue micro array を購入して多数症例で検討した結果、CHC の陽性を悪性と診断した時の感度・特異度は咽頭癌で 75%・77%、舌癌で 93%・63%、口腔癌で 61%・52%であり、CHC の強陽性を悪性とした時の感度・特異度は、それぞれ 44%・100%、56%・94%、30%・90%と特異度が上昇した(表2)。したがってCHC染色は、ヘマトキシリン-エオジン(HE)染色での病理組織診断が困難な症例における、正確な病理診断に貢献できる可能性が示唆された。今後、生検組織などの微小な組織について検討を行うことで、CHC の組織診断マーカーとしての有用性を更に評価していく必要があると考えられた。

表2 CHC の正診率(%)

		咽頭癌	舌癌	口腔癌
症例数		61	75	160
陽性以上	感度	75	93	61
	特異度	77	63	52
強陽性以上	感度	44	56	30
	特異度	100	94	90

(2) 抗CHC抗体のELISA法の確立
血清中の抗CHC抗体量は、HCC患者で明らかなる高値傾向を示し、あらたな腫瘍マーカーとなる可能性が示唆されていた。しかしELISA構築のためのCHC蛋白が供給停止となったため、新たな抗原を用いたELISA法を開発する必要性が生じた。CHCは分子量190kDaと長大で全蛋白を合成するのは不可能である。そこで、CHCの2次構造の予測、親水領域の同定による表面露出の推定、極性などから、生体内での自己抗体生成における抗原推定部分を想定し、このような推定部分12箇所について、15-17Daのペプチドを合成した。

各合成ペプチドの配列を表3に示す。今後は本ペプチドを混合した場合のELISA法を開発し、腫瘍マーカー検査法としての性能を評価する必要がある。

表3 Clathrin heavy chain 1 (Gene: CLTC; Homo sapience)の合成ペプチド

No.	配列部分	アミノ酸
1	1661-1675	APPYGPQPGFGYSM
2	1652-1667	QAPFGYGTAPPYGPQ
3	1644-1660	GPSVAVPPQAPFGYGT
4	1633-1648	VYGPQLMLTAGPSVA
5	1621-1637	KEEEQATETQPIVYGPQ
6	949-965	RRKDPELWGSVLLESNP
7	885-901	DSNNNPERFLRENPPYD
8	739-755	GQIKEVERICRESNCYD
9	569-585	ALKNNRPSEGPLQTRLL
10	395-411	PDTIRRFQSVPAQPGQT
11	233-249	VGTPPTGNQPFPKKAVD
12	54-70	DMNDPSNPIRRPISADS

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)

Suzuki Y, Matsushita K, Seimiya M, Yoshida T, Sawabe Y, Ogawa M, Nomura F: stimulated glomerular filtration rate by serum creatinine or standardized cystatin C in Japanese patients with Graves' disease. Data Brief. 査読有, 24;5:1092-5, 2015

Suzuki Y, Matsushita K, Seimiya M, Yoshida T, Sawabe Y, Ogawa M, Nomura F: Paradoxical effects of thyroid function on glomerular filtration rate estimated from serum creatinine or standardized cystatin C in patients with Japanese Graves' disease. Clin Chim Acta. 査読有, 7;451:316-22, 2015

Seimiya M, Suzuki Y, Yoshida T, Sawabe Y, Matsushita K, Nomura F: The abnormal reaction data-detecting function of the automated biochemical analyzer was useful to prevent erroneous total-bilirubin measurement and to identify monoclonal proteins. Clin Chim Acta. 査読有, 20;441:44-6, 2014

Seimiya M, Ohno S, Asano H, Fujiwara K, Yoshida T, Sawabe Y, Sogawa K, Ogawa M, Matsushita K, Yokosuka O, Nomura F: Change in albumin measurement method affects diagnosis of nephrotic syndrome Clinical Laboratory. 査読有, 60(10):1663-7, 2014

Yamada M, Seimiya M, Satoh M, Itoga S, Sogawa K, Takizawa H, Yokosuka O, Nomura F: Determination of Serum Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT) by the Nephelometric N Latex CDT Assay in Japanese Habitual Drinkers and Patients with Non-Alcoholic Liver Diseases Alcoholism & Drug Dependence, J Alcoholism Drug Depend. 査読有, 1:138, 2013

Rahmutulla B, Matsushita K, Satoh M, Seimiya M, Tsuchida S, Kubo S, Shimada H, Ohtsuka M, Miyazaki M, Nomura F: Alternative splicing of FBP-interacting repressor coordinates c-Myc, P27Kip1/cyclinE and Ku86/XRCC5 expression as a molecular sensor for bleomycin-induced DNA damage pathway Oncotarget. 査読有, 15;5(9):2404-17, 2013

Tokita K, Seimiya M, Matsushita K, Tomonaga T, Onodera K, Ohki S, Tanizawa T, Uesato M, Shimada H, Matsubara H, Nakatani Y, Fumio Nomura: Clathrin heavy chain is a useful immunohistochemical marker for esophageal squamous intraepithelial neoplasia Esophagus 査読有, 10:193-198, 2013

Mochizuki A, Kodera Y, Saito T, Satoh M, Sogawa K, Nishimura M, Seimiya M, Kubota M, Nomura F: Preanalytical evaluation of serum 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 measurements using LC-MS/MS. Clinica Chimica Acta. 査読有, 420:114-20, 2013

Seimiya M, Ohno S, Yamamoto H, Fujiwara K, Yoshida T, Sawabe Y, Sogawa K, Matsushita K, Yokosuka O, Nomura F: Child-pugh score is altered by the albumin measurement method. Hepatology. 査読有, 57:2093-4, 2013

Yamada M, Satoh Seimiya M, Sogawa K, Itoga S, Tomonaga T, Nomura F: Combined Proteomic Analysis of Liver Tissue and Serum in Chronically Alcohol-Fed Rats. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 査読有, 37: E79-87, 2013

[学会発表](計4件)

Masanori Seimiya, Yoshitake Suzuki, Toshihiko Yoshida, Yuji Sawabe, Kazuyuki Matsushita, Fumio Nomura. Usefulness of abnormal reaction detection system of automated biochemical analyzer. 21st IFCC - EFLM European Congress of

Clinical Chemistry and Laboratory
Medicine.
21-25 June 2015, Paris (France)

Masanori Seimiya, Yoshitake Suzuki,
Toshihiko Yoshida, Yuji Sawabe, Kazuyuki
Matsushita, Fumio Nomura.

The abnormal reaction data-detecting
function of the automated biochemical
analyzer was useful to prevent erroneous
total-bilirubin measurement and to
identify monoclonal proteins.
22th International Congress of Clinical
Chemistry and Laboratory Medicine.
22-27 June 2014, Istanbul (Turco)

Masanori Seimiya, Yuji Sawabe,
Toshihiko Yoshida, Fumio Nomura.

Change in albumin measurement method
affects diagnosis of nephrotic syndrome
13th Asia-Pacific Federation for Clinical
Biochemistry and Laboratory Medicine.
27-30 October 2013, Bali (Indonesia)

クラスリン重鎖の免疫組織化学染色は食
道粘膜内腫瘍の病理組織診断に有用である
清宮正徳, 時田和也, 松下一之, 朝長毅,
谷澤徹, 上里昌也, 島田英明, 松原久裕,
中谷行雄, 野村文夫
第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会誌
2013 年 10 月 2 日 パシフィコ横浜 (神奈川県
横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

Masanori Seimiya: Disorders of Albumin
Metabolism in Liver Diseases, Serum
albumin - measurement methods and
analytical challenges. (UNI-MED Verlag
AG) Page 20-22 (2014.04)

〔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

清宮 正徳 (SEIMIYA Masanori)
千葉大学・医学部附属病院・副臨床検査技師
長
研究者番号 : 20554265

(2) 研究分担者

野村 文夫 (NOMURA Fumio)
千葉大学・医学部附属病院・特任教授
研究者番号 : 80164739

松下 一之 (MATSUSHITA Kazuyuki)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号 : 90344994