

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830100

研究課題名(和文) 癌胎児性抗原CEAの腫瘍マーカーとしての新たな展開

研究課題名(英文) The new aspects of carcinoembryonic antigen as the tumor marker

研究代表者

中尾 香菜子 (Nakao, Kanako)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：30583059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な腫瘍マーカーの1つ、癌胎児性抗原CEAにおける新規アイソフォームに着目し、野生型、2種類のアイソフォームを差別化する検出系を構築することを目的として研究を行った。2種類の新規CEAアイソフォームを特異的に認識する抗体を作製し、樹立したCEA野生型とアイソフォームを単独に発現する安定発現株およびCEAを発現・分泌する培養癌細胞を用いて、抗体の検証を行った。また、CEAアイソフォームの発現分泌様式が他と異なった膵臓がん由来培養細胞を用いて、検出系のさらなる検証を行った。

研究成果の概要(英文)：Carcinoembryonic antigen (CEA) is an oncofetal cell surface glycoprotein overexpressed in human gastrointestinal tumors. Because of its high expression in tumors and secretion to serum, CEA has been widely used as a serum tumor marker. However, the secretion of CEA in cancer tissues is not well defined. We previously identified two novel CEA protein isoforms in gastrointestinal cancer cell lines. CEA isoforms were also secreted to culture medium. Although CEA isoforms always co-existed with the wild type of CEA, the secretion patterns of these isoforms were different from the expression patterns. In this study, we established the stable cell lines expressing each CEAs and examined the isoforms-specific antibodies. Furthermore, we also determined the expression/secretion manner of the CEAs in pancreatic cancer cell lines.

研究分野：分子生物学

キーワード：CEA 腫瘍マーカー アイソフォーム スプライスバリエント 膵臓がん

1. 研究開始当初の背景

1965年 CEA が P.Gold らによって同定されて、約 50 年。当初、大腸がん特異的に発現するたんぱく質として同定された CEA だったが、その後胃がん、膵臓がんなどの消化器系の癌全般や肺がん、乳がんなど広範囲な癌患者でその血中濃度の上昇が報告されている。現在では代表的な腫瘍マーカーの 1 つとして臨床の現場で広く用いられているが、早期癌での検出が難しく、またその臓器特異性が非常に低いことから、癌のスクリーニングや術後の経過観察、再発予防として用いられているというのが現状である。臨床の現場で多用に用いられている CEA であるが、一方で、IgG ファミリーに属する CEA は多数の糖鎖を有する膜たんぱく質であり、接着分子としての機能も有している。しかしながら、その分子型や局在、機能といった分子生物学的側面からの研究は、腫瘍マーカーとしての歴史の割に乏しいというのが現状である。

CEA は CEA 関連細胞接着分子群 (CEACAM family) を構成している分子の 1 つである。この family 内の分子は、配列の相同性が高く、また構造も似通っていることから、その交差反応性が重要視されている。実際 CEACAM family の中でも特に CEA との配列の相同性が高い CEACAM1、CEACAM6 に関して、癌細胞における発現や血中、体液中への分泌が報告されている。それら CEACAM family の分子は、細胞接着分子としての機能に関する報告もなされており、いずれも癌細胞の増殖や浸潤、転移に関与していることが示唆されている。特に CEACAM1 については、splice variant に由来する isoform が多数存在しており、それらの発現バランスが癌の悪性度に影響することも報告されている (*Int J Cancer*. 129(6): 1351-61 2011, *BMJ Open*. 1(1): e000179 2011)。

2. 研究の目的

我々はこれまで、CEACAM family 内の分子の配列や構造の相同性が高いことに着目し、CEA 関連分子群の臓器特異性について検証を行ってきた。一連の研究の中で、これまで癌との関連性がほとんど知られていなかった CEACAM4 の甲状腺髄様がんにおける特異的発現を見出し(雑誌論文)、さらには CEA の新規 splice variant および isoform を同定、消化器癌由来培養細胞株におけるそれらの発現、分泌を明らかにした(Hatakeyama, K., Wakabayashi-Nakao, K *et al.* *BMC Res Notes* 6, p381, 2013)。これら新規 CEA isoform は、細胞種によらず、野生型 CEA と共発現、共分泌されているが、野生型 CEA に対する相対的な発現量、分泌量が、膵臓がん由来細胞株において高い傾向にあることが確認されている。

そこで本研究では、新規 CEA isoform に着目し、これまでの検出系で CEA を測定するだ

けでは識別の難しかった癌の症例や臓器の特定を可能にするため、野生型 CEA と CEA isoform を差別化する検出系を構築することを目的とし、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 野生型 CEA および CEA アイソフォーム安定発現株の構築

CEA を発現・分泌する培養がん細胞は、そのほとんどが CEA の野生型と 2 種類のアイソフォームすべてを発現する。そこで、培養がん細胞に発現する CEAs を鋳型として、CEA 野生型およびアイソフォームのクローニングを行い、ヒト細胞発現ベクターに挿入した。

CEA を遺伝子導入する培養細胞として、内因性 CEA を発現しないヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞を用いた。作製した発現ベクターを用いて、CEA の野生型および 2 種類のアイソフォームをそれぞれ発現する安定発現株を作製した。

(2) CEA アイソフォーム特異的抗体の作製および検出系の構築

市販の CEA 抗体は、そのほとんどが野生型だけでなく、アイソフォームも認識する。そこで、CEA の野生型と 2 種類のアイソフォームそれぞれに特異的な抗体の作製を行うため、抗原ペプチドの合成を行った。2 種類の CEA アイソフォームのアミノ酸配列は、野生型 CEA と共通する部分がほとんどであるが、一部異なる部分も存在する。アイソフォーム 5D は、N ドメインの C 末側から A2 ドメインの N 末にかけて、アイソフォーム 3D は、A1 ドメインの C 末側から B3 ドメインの N 末にかけての一部に特異的な配列を有する(図 1)。

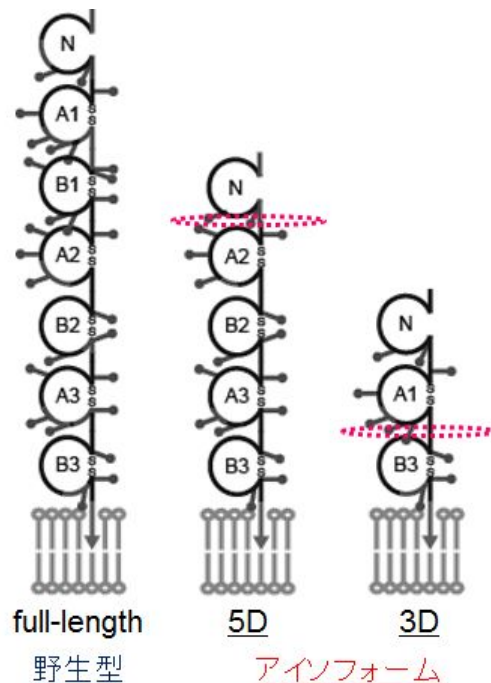


図 1: CEA 野生型および 2 種類のアイソフォームたんぱく質の模式図

そこで、その野生型と異なる領域にエpitepopeをデザインし、アイソフォームを特異的に認識する抗体作成のための抗原ペプチドを合成した。合成した抗原ペプチドを用いて、2種類のCEAアイソフォーム特異的な抗体の作製を外注した。

4. 研究成果

(1) CEA 安定発現株の樹立

作製した HEK293-CEA 安定発現株 (野生型および2種類のアイソフォームをそれぞれ単独で発現) における CEA の発現確認を、市販抗体を用いたイムノブロット法により行った。CEA は多数の糖鎖修飾を受けるため、理論上の分子量より高分子量側にシフトした位置にバンドが検出される。そこで、N 結合型糖鎖修飾を切断する酵素 (PNGase F) 処理を行った後、イムノブロット法により発現確認を行った。その結果、それぞれの安定発現株からは、理論上の分子量の位置付近に CEA 野生型およびアイソフォームと考えられるバンドが検出された (図 2)。用いた市販抗体は、これまでの研究により、CEA 野生型だけでなくアイソフォームも認識することが確認されているため、これらのバンドは導入した CEA 由来のバンドであると考えられる。さらに、LC-MS/MS 解析を行ったところ、これらのバンドから CEA 由来のペプチド断片が検出された。

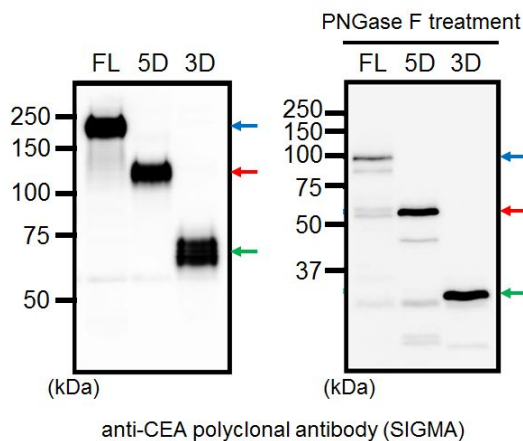


図 2: CEA 野生型およびアイソフォーム安定発現株における発現確認

(2) CEA isoform 5D 認識抗体の検証

2種類のアイソフォームにそれぞれ特異的な抗体の反応性を、作製した CEA 野生型およびアイソフォーム安定発現株を用いて、イムノブロット法により検証を行った。作製した 5D 認識抗体は、いずれも 5D を認識したが、CEA 野生型、アイソフォーム 3D にも若干交差反応性を示した。しかしながら、市販抗体と比較し、より 5D を強く認識することが分かった (図 3A)。これらの 5D 認識抗体は、樹立した HEK293-CEA (isoform 5D) 安定発現細胞だ

けでなく、内因性の CEA を発現する膵臓がん由来培養がん細胞の CEA アイソフォーム 5D も認識することも確認された (図 3B)。

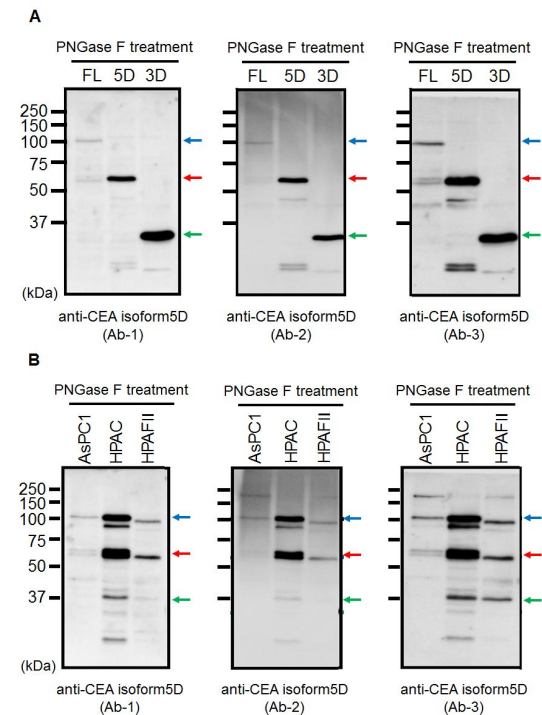


図 3: 作製した anti-CEA isoform 5D 抗体の特異性の検証

一方で、作製した 5D 認識抗体の一部は、培養上清中に分泌されている CEA アイソフォーム 5D も認識することがわかった。以上のことから、この新規 CEA-isoform 5D 抗体は、ELISA 系の構築に使える可能性が示唆された。

(3) CEA isoform 3D 認識抗体の検証

CEA アイソフォーム 3D 抗体に関して、アイソフォーム 5D 同様検証を行った。3D 抗体も複数作製したが、いずれの抗体も CEA アイソフォーム 3D を認識できず、さらには野生型、アイソフォーム 5D を認識することもできなかった。アイソフォーム 3D は、野生型、5D と比較して特異的な配列を持っていない。そのため、抗体作成に用いる抗原ペプチドは、ドメイン欠損領域近傍にデザインした。しかしながら配列としては野生型、5D と区別化することはできず、さらにその領域には糖鎖修飾部位も含まれている。以上のことから、CEA アイソフォーム 3D 抗体は特異性の高いものができなかったと考えられた。

(4) 膵臓がん由来培養細胞株における検証

これまでの研究結果から、CEA アイソフォームが、膵臓がん由来培養細胞株において特に多く検出されることに着目し、CEA の腫瘍マーカーとしての有用性向上の検証を膵臓がん焦点を当てて研究を行った。膵臓がん由来培養細胞株においては、CEA 野生型・ア

イソフォームだけでなく CEA と相同性の高い関連細胞接着分子群(CEACAMs)が発現、分泌しており、そのパターンが他の臓器癌由来細胞株とは異なることが明らかとなった。さらには、膵臓がんの危険性が増すといわれている慢性膵炎や糖尿病などの疾患に關与する遺伝子異常のキャリアをもつ膜タンパク質との關連性も示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Hatakeyama, K., Yamakawa, Y., Fukuda, Y., Ohshima, K., Wakabayashi-Nakao, K., Sakura, N., Tanizawa, Y., Kinugasa, Y., Yamaguchi, K., Terashima, M., and Mochizuki, T. A novel splice variant of XIAP-associated factor 1 (XAF1) is expressed in peripheral blood containing gastric cancer-derived circulating tumor cells. *Gastric Cancer* 査読有, 18, (2015), pp.751-761.

DOI: 10.1007/s10120-014-0426-3

Wakabayashi-Nakao, K., Hatakeyama, K., Ohshima, K., Yamaguchi, K., and Mochizuki, T. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 4 (CEACAM4) is specifically expressed in medullary thyroid carcinoma cells. *Biomed Res*, 査読有, 35, (2014), pp.237-242.

<http://doi.org/10.2220/biomedres.35.237>

Ohshima, K., Kanto, K., Hatakeyama, K., Ide, T., Wakabayashi-Nakao, K., Watanabe, Y., Sakura, N., Terashima, M., Yamaguchi, K., and Mochizuki, T. Exosome-mediated extracellular release of polyadenylate-binding protein 1 in human metastatic duodenal cancer cells. *Proteomics*, 査読有, 14, (2014), pp.2297-2306.

DOI: 10.1002/pmic.201300477

[学会発表](計4件)

Kanako Nakao et al, Characterization of CFTR mutations found in Japanese cystic fibrosis patients., 第94回日本生理学会大会、2017年3月30日、アクトシティ浜松(静岡県浜松市)

Kanako Nakao et al, Characterization of G970-T1122del CFTR mutation found in Japanese CF patients., The joint Conference of the 47th annual meeting of the Japan Pancreas Society, the 20th meeting of the International Association of Pancreatology and the 6th meeting of the Asian Oceanic Pancreatic Association, August 5, 2016,

Sendai International Center (宮城県仙台市).

佐竹一紘、中尾香菜子 他、分子間ジスルフィド結合の形成と N 結合型糖鎖付加が起こらないヒト ABCG2 タンパク質は細胞に薬剤耐性を付与することができる。第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
中尾香菜子 他、新規 CEA アイソフォームたんぱく質の生物学的意義の検証。第73回日本癌学会学術総会、2014年9月26日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中尾 香菜子 (NAKAO, Kanako)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：30583059