

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390174
 研究課題名(和文) 高感度抗 IAP 抗体スクリーニングアレイの開発と癌診断への応用
 研究課題名(英文) Development of auto-IAP-antibody screening array for diagnosing cancer patients
 研究代表者
 渡邊 直樹(WATANABE NAOKI)
 札幌医科大学 医学部 教授
 研究者番号：10158644

研究成果の概要：分子生物学の進歩に伴い、癌で発現が亢進あるいは低下し、浸潤・転移能の増強や治療抵抗性の発現と密接に関与する分子群が、報告されるようになった。今回我々は、抗 Survivin, Livin および XIAP 自己抗体に注目し、各種消化器癌、肺癌や乳癌患者の血清診断を試みた。癌患者 29 例中 14 例(48%)で、いずれかの自己抗体が検出された。なかでも、抗 Survivin 自己抗体の陽性率が最も高く、45% (13/29) であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2007 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の進歩に伴い、癌で発現が亢進あるいは低下し、浸潤・転移能の増強や治療抵抗性と密接に関与する分子群が、報告されるようになった。IAP (inhibitor of apoptosis) ファミリーもその一つで、アポトーシスの実行分子である Caspase の活性阻害を介して、抗アポトーシス作用を発揮する。IAP ファミリーには、NAIP, XIAP, cIAP1, cIAP2, Survivin, Livin や TsIAP などがあり、いずれも構造的には Caspase との結合に必要な BIR

(baculoviral IAP repeat)領域を 1～3 個持っている。

これまで我々は、大腸癌や乳癌組織および造血器悪性腫瘍細胞において Survivin が、肺癌組織では Livin が、それぞれ高発現することを報告してきた。いずれも、正常細胞ではほとんど発現がみられないため、癌診断や治療の標的分子として注目されている。

一方、癌抗原に対しては細胞性免疫のみならず、液性免疫反応すなわち自己抗体が誘導される。自己抗体には、固有の癌に特異なもの

と、各種癌に共通するものの2種類がある。後者として、変異型癌抑制遺伝子産物(変異型 p53 など)、癌化によりその発現量が増加する分子(HER-2/neu など)や臓器特異抗原であるが各種癌に発現する分子(MAGE など)に対する抗体が、知られている。

2. 研究の目的

今回我々は, Survivin および Livin のみならず, XIAP に対する自己抗体検出系を開発し, 3 者の併用により癌診断の感度上昇を試みた。

3. 研究の方法

(1) 対象

札幌医科大学附属病院の外来および入院患者(大腸癌 9 例, 胃癌 3 例, 膵癌 1 例, 乳癌 6 例, 肺癌 10 例)と, 健常者(33 例)の血清を用いた。

(2) Survivin, Livin および XIAP 蛋白の合成と精製

ヒト大腸癌細胞(SW480)から ISOGEN (ニッポンジーン) を用い tRNA を抽出し, GeneAmp RNA PCR Kit (Applied Biosystems) で cDNA を作製した。次に, Survivin (Primer: 5'-cac cat ggg tgc ccc gac gtt g-3' と 5'-tca atc cat ggc agc cag ctg ct-3'), Livin (Primer: 5'-cac cat ggg acc taa aga cag tg-3' と 5'-cta gga cag gaa ggt gcg ac-3') および XIAP (Primer: 5'-cac cat gac ttt taa cag ttt tga-3' と 5'-tta aga cat aaa aat ttt ttg ctt gaa-3') を使用し, 94℃, 5 分の denature 後, 94℃ 30 秒, 65℃ 30 秒, 68℃, 1 分を 35 サイクル, 68℃, 7 分の最終伸長反応を行い, 遺伝子の全長を増幅した。PCR 産物を精製後, 蛋白発現用ベクター(pET151/D-TOPO)にライゲーションした。作製したコンストラクトは大腸菌(BL21 Star-DE3)に形質転換し, IPTG で蛋白の誘導を行った。大腸菌の溶解には, B-PER II Bacterial Protein Extraction Reagent (PIERCE) を使用した。蛋白の精製には, His-tag 蛋白精製用カラム(His Trap FF crude Kit: GE ヘルスケア)を用いた。精製蛋白の純度は, SDS-PAGE 後, Coomassie Brilliant Blue R250 で染色し確認した。これらの蛋白の特異性は, 抗 Survivin 抗体(R&D Systems), 抗 Livin 抗体(Abcam)および抗 XIAP 抗体(R&D Systems)を用いた Western blot 法で調べた。

(3) ELISA

精製リコンビナント蛋白を 96 ウェルプレート(Corning)に 100 μl 添加し, 4℃で一晩固相化した。抗原を除去後, 0.05% Tween20 入り phosphate-buffered saline(PBS-T)で 5 回洗浄した。次に, 0.25% ブロックエース液(大日本住友製薬)で, 4℃, 一晩ブロッキングを行い, さらに PBS-T で 5 回洗浄した。Blocking

buffer で 200 倍に希釈した健常者あるいは癌患者の血清を 100 μl ずつウェルに加え, 室温で 1 時間, 抗原と反応させた。PBS-T で 5 回洗浄後, blocking buffer で 2,500 倍に希釈した HRP 結合 rabbit anti-human IgG (DAKO) 100 μl を添加し, 室温で 1 時間反応させた。PBS-T で 5 回洗浄後, TMB Blue 基質(DAKO)100 μl を加え, 室温で 10 分間発色を行った。0.25 mol/L H₂SO₄ 溶液で反応を停止後, 492nm で吸光度を 2 重測定した。

(4) 腫瘍マーカーの測定

大腸癌(9 例), 胃癌(3 例), 膵癌(1 例)および肺癌(10 例)症例に関しては CEA と CA19-9, 乳癌(6 例)は CEA と CA15-3 の濃度を, それぞれ測定した。腫瘍マーカーのカットオフ値は, CEA で 6.0 ng/ml, CA19-9 で 38 U/ml, CA15-3 では 31 U/ml である。

4. 研究成果

(1) Survivin, Livin および XIAP 蛋白の合成と精製

Survivin, Livin および XIAP 蛋白をカラム精製後, 目的とする単一の band を得た(図 1A)。精製蛋白の特異性は, Western blot 法で確認した(図 1B)。

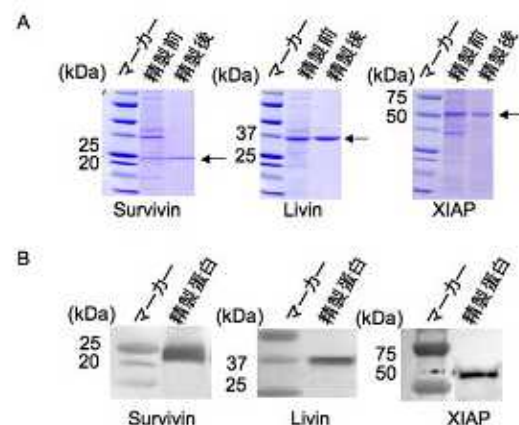


図 1 リコンビナント蛋白の精製および確認

(A) SDS-PAGE 後の CBB 染色

(B) ウェスタンブロッティング

(2) ELISA 条件の設定

ELISA を行うにあたり, 最初に固相化する Survivin, Livin および XIAP の抗原量を検討した。96 ウェルプレートに, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1 μg/ml の濃度に調整したリコンビナント蛋白を 100 μl ずつ添加し, 4℃で一晩固相化した。これら抗原濃度の異なる ELISA プレートをを用い, 健常者および癌患者各 5 名の血清で測定を行った(図 2)。その結果, Survivin, Livin および XIAP のいずれも, 0.1 μg/ml の抗原量で両者の比が最も高値を示した。この

ため、本アッセイ系で用いる固相化抗原濃度は0.1 μ g/mlとした。

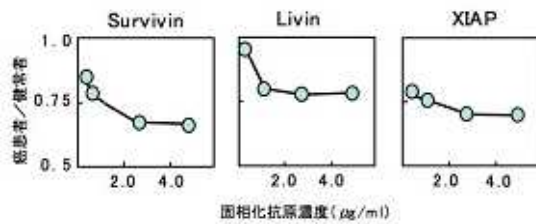


図2 固相化抗原濃度
癌患者の平均値健常者のそれで割った値

(3) 癌患者における抗 Survivin, 抗 Livin, 抗 XIAP 自己抗体の陽性率
健常者 33 名の血清を用いて ELISA を行い, その平均値 + 2SD をカットオフ値とした。その結果, 抗 Survivin 自己抗体は 0.434, 抗 Livin 自己抗体は 0.325, 抗 XIAP 自己抗体は 0.366 であった。
次に, 本アッセイ系を用い癌患者血清中の自己抗体を測定した。大腸癌患者 9 例中, 4 例 (44%) で抗 Survivin および抗 Livin 自己抗体が, 2 例 (22%) で抗 XIAP 自己抗体が, それぞれ陽性であった (表 1)。

表 1 大腸癌患者における各種自己抗体と腫瘍マーカーの陽性パターン

Patient NO.	Sex	Age	Clinical stage	Survivin	Livin	XIAP	CEA	CA19-9
1	M	81	I	-	-	-	-	-
2	F	54	I	+	+	-	+	-
3	F	73	III	+	+	-	-	-
4	F	51	III	-	-	-	-	-
5	M	66	IV	-	-	-	+	+
6	F	84	III	+	+	+	-	-
7	M	77	III	+	+	+	-	-
8	F	72	I	-	-	-	-	-
9	M	82	IV	-	-	-	+	+

胃癌患者 3 例中 1 例 (33%) で, 全ての自己抗体が陽性となった (表 2)。

表 2 胃癌患者における各種自己抗体と腫瘍マーカーの陽性パターン

Patient NO.	Sex	Age	Clinical stage	Survivin	Livin	XIAP	CEA	CA19-9
1	F	49	I	+	+	+	-	-
2	M	72	II	-	-	-	+	-
3	M	74	II	-	-	-	+	-

本検討で行った唯一の膵癌患者では, 3 種類全ての自己抗体が陽性であった (表 3)。

表 3 膵癌患者における各種自己抗体と腫瘍マーカーの陽性パターン

Patient NO.	Sex	Age	Clinical stage	Survivin	Livin	XIAP	CEA	CA19-9
1	M	81	II	+	+	+	-	+

乳癌患者 6 例では, 1 例 (16%) が抗 Survivin 自己抗体, 2 例 (33%) が抗 Livin 自己抗体陽性で, 抗 XIAP 自己抗体陽性の患者はいなかった (表 4)。

表 4 乳癌患者における各種自己抗体と腫瘍マーカーの陽性パターン

Patient NO.	Sex	Age	Clinical stage	Survivin	Livin	XIAP	CEA	CA15-3
1	F	53	II	-	-	-	-	-
2	F	83	III	+	+	-	-	+
3	F	60	IV	-	+	-	-	+
4	F	46	I	-	-	-	-	-
5	M	62	III	-	-	-	-	-
6	F	58	I	-	-	-	-	-

肺癌患者 10 例中 6 例 (60%) で抗 Survivin 自己抗体, 4 例 (40%) で抗 Livin 自己抗体, 3 例 (30%) で XIAP 自己抗体が, それぞれ陽性であった (表 5)。

表 5 肺癌患者における各種自己抗体と腫瘍マーカーの陽性パターン

Patient NO.	Sex	Age	Clinical stage	Survivin	Livin	XIAP	CEA	CA19-9
1	M	51	I	-	-	-	-	-
2	F	70	I	-	-	-	-	-
3	M	62	I	-	-	-	-	-
4	M	75	II	+	+	+	-	-
5	M	51	III	+	+	+	-	+
6	F	74	I	+	-	-	-	-
7	M	77	I	+	+	+	-	-
8	M	75	I	+	-	-	-	-
9	M	68	I	+	+	-	+	-
10	M	62	I	-	-	-	-	-

すなわち, 癌患者 29 例の血清を用い, Survivin, Livin および XIAP に対する自己抗体の有無を調べたところ, 14 例 (48%) でいずれかの自己抗体が検出された。Survivin, Livin および XIAP の中でも抗 Survivin 自己抗体の陽性率が最も高く, 45% (13/29) であった。この陽性率は, 我々も含めこれまでの報告結果と, ほぼ同等であった。また, 抗 Survivin 抗体陰性患者については, 乳癌患者 1 例で抗 Livin 抗体の陽性例を認めた以外, 抗 Livin および抗 XIAP 自己抗体が陽性となった症例はなかった。すなわち, 抗 Survivin 自己抗体の測定に, 抗 Livin あるいは抗 XIAP 自己抗体の測定を併用しても, 癌の検出率を高める効果は少ないと考えられた。
原発臓器別に陽性率を比較してみると, 膵癌 (100%; 1/1), 肺癌 (60%; 6/10), 大腸癌 (44%; 4/9), 乳癌 (33%; 2/6), 胃癌 (33%; 1/3) の順に陽性率が高かった。この結果は, 乳癌患者で抗 Survivin 自己抗体の陽性率が低く

(6%), 消化器癌で高い(40%)というこれまでの結果とよく一致していた。興味深いことに、大腸癌患者では、各種自己抗体が陰性の患者中、2例でCEAが陽性であった。また、胃癌患者でも、各種自己抗体が陰性の患者2例がともにCEA陽性であった。そこで、CEAと各種自己抗体を組み合わせて患者の陽性率を求めたところ、大腸癌で67%(6/9)、胃癌で100%(3/3)に高まった。以上の成績から、機序の異なる腫瘍マーカー、すなわち腫瘍抗原に対する自己抗体と、腫瘍由来蛋白の測定を組み合わせることで、癌の検出率を高めることが可能と考えられた。現在、さらに症例を増やし検討を続けている。

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 8件)

Moriai M, Tsuiji N, Kobayashi D, Kuribayashi K, Watanabe N. Down-regulation of hTERT expression plays an important role in 15-deoxy-^{12,14}-prostaglandin J₂-induced apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol*, 査読有, 2009, 34:1363-1372.

Furuya M, Tsuiji N, Kobayashi D, Watanabe N. Interaction between survivin and aurora-B kinase plays an important role in survivin-mediated up-regulation of human telomerase reverse transcriptase expression. *Int J Oncol*, 査読有, 2009, 34:1061-1068.

Moriai R, Tsuiji N, Moriai M, Kobayashi D, Watanabe N. Survivin plays as a resistant factor against tamoxifen-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research Treat*, 査読有, Epub ahead of print, 2008.

Kobayashi D, Koshida S, Moriai R, Tsuiji N, Watanabe N. Olfactomedin 4 promotes S-phase transition in proliferation of pancreatic cancer cells. *Cancer Sci*, 査読有, 2007, 98: 334-340.

Koshida S, Kobayashi D, Moriai R, Tsuiji N, Watanabe N. Specific overexpression of OLFM4GW112/hGC-1 mRNA in colon, breast, and lung cancer tissues detected using quantitative analysis. *Cancer Sci*, 査読有, 2007, 98: 315-320.

Kaneko R, Tsuiji N, Asanuma K, Tanabe H, Kobayashi D, Watanabe N. Survivin down-regulation plays a crucial role

in 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor-induced apoptosis in cancer. *J Biol Chem*, 査読有, 2007, 282: 19273-19281.

Kamagata C, Tsuiji N, Moriai M, Kobayashi D, Watanabe N. 15-Deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J(2) inhibits G(2) M phase progression in human breast cancer cells via the down-regulation of cyclin B1 and survivin expression. *Breast Cancer Res Treat*, 査読有, 2007, 102: 263-273.

Kondo K, Tsuiji N, Asanuma K, Kobayashi D, Watanabe N. Inhibition of estrogen receptor-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription via the suppression of mitogen-activated protein kinase signaling plays an important role in 15-deoxy-^{12,14}-prostaglandin J₂-induced apoptosis in cancer cells. *Exp Cell Res*, 査読有, 2007, 313: 3486-3496.

[学会発表](計 10件)

小林大介, 盛合亮介, 辻直樹, 渡邊直樹. 乳癌および肺癌診断におけるチロシンキナーゼS T Y K 1解析の意義. 第48回日本臨床化学会年次学術集会, 2008, 浜松.

葦澤慎也, 小林大介, 辻直樹, 渡邊直樹. E S細胞複製分子Nano gを用いた早期肺癌診断法の開発. 第48回日本臨床化学会年次学術集会, 2008, 浜松.

佐伯理知, 小林大介, 辻直樹, 渡邊直樹. 乳癌組織におけるBmi-1遺伝子の発現量解析. 第48回日本臨床化学会年次学術集会, 2008, 浜松.

辻直樹, 小林大介, 渡邊直樹. 15d-PFJ2はhTERTの発現抑制を介して癌細胞にアポトーシスを誘導する. 第20回日本バイオセラピー学会学術集会総会, 2007, 札幌.

辻直樹, 小林大介, 渡邊直樹. HMG-CoA reductase阻害剤によるSurvivinを標的とした新たな癌治療法. 第19回日本バイオセラピー学会学術集会総会, 2006, 福岡.

小林大介, 辻直樹, 渡邊直樹. 新規チロシンキナーゼNOKは乳癌の早期診断に有用である. 第65回日本癌学会学術集会, 2006, 横浜.

辻直樹, 小林大介, 渡邊直樹. 抗アポトーシス分子SurvivinはhTERTの発現増強を介して癌細胞を不死化する. 第65回

日本癌学会学術集会，2006，横浜。
浅沼康一，辻 直樹，盛合美加子，渡邊直樹。15-deoxy-^{12,14}-prostaglandin J₂はERのリン酸化阻害を介してhTERTの発現を抑制する。第46回日本臨床化学年会，2006，東京。

辻 直樹，金子礼子，浅沼康一，渡邊直樹。HMG-CoA reductase 阻害剤による癌細胞増殖抑制機序 -FFP と GGGP が Survivin の発現に及ぼす影響。第46回日本臨床化学年会，2006，東京。

小林大介，辻 直樹，渡邊直樹。抗アポトーシス分子 OLFM4 は膀胱癌細胞で抗発現し増殖を促進する。第37回日本膀胱学会大会，2006，横浜。

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 直樹 (WATANABE NAOKI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：10158644

(2)研究分担者

辻 直樹 (TSUJI NAOKI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：00347171

小林 大介 (KOBAYASHI DAISUKE)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：50295359

(3)連携研究者