

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：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14401

研究課題名(和文)大腸がん特異抗体を用いた高感度便タンパク検出法の開発

研究課題名(英文) Development of a highly sensitive fecal protein detection method using colorectal cancer specific antibody

研究代表者

古賀 宣勝 (Koga, Yoshikatsu)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・室長

研究者番号：70536086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では大腸がん特異的抗体付加磁性ビーズによる高感度タンパク検出法(CLEIA法)の確立と大腸がん診断法への応用を目的とした。大腸がん特異的分子に対する複数クローンを取得し、抗エクソソーム抗体と大腸がん特異抗体を用いたサンドイッチELISAにより、目的とする分子がエクソソーム上に存在することを明らかにした。便タンパク検査へ向けた前段階として、末梢血中腫瘍由来エクソソームによる大腸がん診断法の検討を行い、大腸がん患者の陽性率は64.7%であった。今後は検査方法の最適化および自動化を行い、最終目標である便検体への応用を目指している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish highly sensitive protein detection method using magnetic beads conjugated with colorectal cancer-specific antibody (CLEIA method) and apply the method to colorectal cancer (CRC) screening. Multiple clones against CRC specific molecule were obtained and it was revealed that the target molecule exist on exosomes by sandwich ELISA using anti-exosome antibody and CRC specific antibody. As a preliminary step towards fecal protein tests, a CRC diagnosis method using serum exosomes derived from tumors was examined, and the positive rate of CLEIA for CRC patients was 64.7%. In the future, we will optimize the automated CLEIA method and apply the method to the fecal samples.

研究分野：腫瘍診断学

キーワード：腫瘍マーカー バイオマーカー 発現解析 タンパク診断

1. 研究開始当初の背景

大腸粘膜から発生した大腸がんは早期段階から常に便と接している。そのため便には剥離したがん細胞やがん組織から分泌されるようなタンパク、DNA、RNAなど多くの情報が含まれており、自然排泄便を対象にした新しい大腸がん診断法の開発研究は昔から多くの研究者によって報告されてきた。2014年に1万人規模の便DNA検査と便潜血検査の比較研究が報告され、便DNA検査の感度は92%と便潜血検査の74%よりも優れていると報告された(引用文献)。しかし、特異度は87%と便潜血検査の95%よりも劣っており、偽陽性健常者が3倍以上増えた。また、1検査数万円のコストがかかるため、そのままがん検診に利用するのは困難である。研究代表者らも、これまでに新しい大腸がんスクリーニング法の実現を目指して、自然排泄便から大腸がん細胞を分離、検出する検査手法の研究開発を進め、大腸がん細胞に高発現しているCOX2やmiR-106aなど有望な遺伝子・miRNAを報告してきた(引用文献)。最近は大腸がん検診と同一検体からmiRNAを検出する方法を世界で初めて報告し(引用文献)、研究を継続しているが、便miRNA検査はRNAの抽出など余計なコストがかかり、大腸がん検診への応用には費用対効果を十分検討することが求められる。そこで本研究では便潜血検査と同じ便タンパク検査に着目した。

以前より大腸がん診断のための便タンパク検査はいくつか報告されているが、残念ながらこれらのタンパク検査は便潜血検査の精度に及ばず、現在までに臨床応用されていない。便DNA検査や便RNA検査に比べて便タンパク検査の報告が少ない理由は、(a)がん細胞と正常細胞を明確に区別するがん特異分子の同定、(b)高性能な抗体作製、(c)膜タンパクを効率よく抽出するタンパク抽出法の確立、(d)抗体を用いた高感度タンパク検出法の確立、など多くの越えるべきハードルと手間がかかるため、網羅的に解析が可能で、シークエンスやPCRといった解析方法が確立されたDNAやRNAなど核酸診断が主流となっているからである。

研究代表者らは便タンパク検査の確立のため、大腸がん特異分子の同定を行った。通常、大腸がん特異分子の同定には、大腸がん組織と正常大腸組織の比較を行う。しかし、この方法ではがん組織と正常組織で共通の間質系の細胞(血管や線維芽細胞など)が問題となる。そこで大腸内視鏡検査の洗浄液から回収した正常大腸上皮細胞と大腸がん細胞株を比較する斬新なアイデアによって複数の候補分子が大腸がん細胞に特異的に高発現していることを明らかにした(引用文献)。いずれも複数回膜貫通型の細胞膜タンパクであり抗体の取得は困難であるが、精度の高い市販抗体は存在しないためそれぞれに対する抗体作製を挑戦的に行っている。タンパク検出系に関して、微量のタンパクを検

出するため通常のサンドイッチELISA法(検出下限が数ng/mL)を越える高感度タンパク検出法を検討している。以前から研究代表者らが開発してきた抗体付加磁性ビーズと化学発光システムを組み合わせたCLEIA法による高感度タンパク検出法は、予備検討にて通常のELISA法の100倍以上の検出感度(検出下限が数pg/mL)であり、微量なタンパクの検出に有用である(引用文献)。

2. 研究の目的

日本における大腸がんは未だに増加中の悪性腫瘍であり、罹患者数や死亡者数を減少させることが喫緊の課題である。死亡率を低下させるためにはがん検診と早期発見・治療が最も重要であり、日本における大腸がん検診は便潜血検査免疫法が行われている。欧米諸国と比較して明らかに低い日本の大腸がん検診受診率を50%以上に引き上げるという「がん対策推進基本計画」により、最新の調査での大腸がん検診受診率は男性41.4%および女性34.5%(平成25年度国民生活基礎調査)と一定の成果が得られ始めている。しかし便潜血検査は便中の微量なヘモグロビンを診断するものであり大腸がんを特異的には診断しておらず、最終診断には消化器内視鏡医による大腸内視鏡検査と病理医による組織検査という精密検査が必須である。精密検査が求められる便潜血検査陽性者は便潜血検査受診者のうち7%程度であるが、精密検査受診者のうち大腸がんと診断される陽性的中率はわずか2~4%程度と低い。つまり大腸に異常のない健常者における便潜血検査の陽性症例(偽陽性健常者症例)の存在と、不必要な精密検査が行われることによる精神的・肉体的な負担増、自己判断によって精密検査を受診しない被験者の存在などが問題となっている。また、がん検診受診率の引き上げにより精密検査対象者が増える一方で、消化器内視鏡医・病理医の数は簡単には増加できないため医師の負担が増すことになる。そこで、大腸がんの特異的な陽性的中率の高い新たな大腸がん検診法の実現は臨床的に大きな意義を持つ。

そこで本研究では、研究代表者らがすでに見出した大腸がんの特異的な複数回膜貫通型タンパクに対する抗体を作製し、微量のタンパクでも検出できる高感度タンパク検出系の確立を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では便潜血検査と同様に便タンパクを対象に、高感度タンパク検出法である抗体付加磁性ビーズを用いたCLEIA法による新しい大腸がん診断法の実現を行うが、本研究期間では(1)大腸がん特異的な分子に対する高性能な抗体の取得、(2)(1)で取得した抗体を用いた高感度便タンパク検出法の確立の2つの項目に着目した研究を行った。

(1)大腸がん特異的な分子に対する高性能

な抗体の取得に関して、対象となる分子は大腸がん特異的複数回膜貫通型の膜タンパクである。マウスやラットに抗原を免疫して通常通り抗体を取得するが、免疫に用いる抗原には技術と工夫が必要であった。大腸菌を用いてリコンビナントタンパクを作製する場合、今回のような複数回膜貫通型タンパク全長の取得は困難であるため、細胞膜外に存在するペプチド断片や強制発現させた細胞そのものを抗原として利用した。免疫した動物の脾細胞とミエローマ細胞を癒合したハイブリドーマ細胞を作製後、限界希釈法にてハイブリドーマ細胞のクローン化を行った。ハイブリドーマ細胞から生成される抗体の性能は、ELISA や flow cytometry によって解析し、大腸がん細胞を特異的に認識することを確認した。

(2)抗体を用いた高感度タンパク検出法の確立と、臨床検体による評価を行った。CLEIA法によるタンパク検出法には、磁性ビーズに結合させタンパクを捕捉する抗体と発光基質を結合した検出抗体が必要である。捕捉用および検出用に優れた抗体の組合せをサンドイッチ ELISA 法などで検討した。候補となった抗体は、磁性ビーズに結合させたり（捕捉用抗体）、発光基質を結合したり（検出用抗体）し、実際に CLEIA 法を行い定量性に優れた抗体の組合せを決定した。最後に、便タンパク検査と便潜血検査の比較を大腸がん患者および健常者の便検体を用いて行う予定であったが、本研究期間内に標的分子が細胞膜だけでなく培養上清でも検出されることが解り、特にエクソソーム上の標的分子を検出するために、血清検体を用いた高感度検出系の確立を行った。

4. 研究成果

(1)大腸がん特異的な分子に対する高性能な抗体の取得

取得が困難な複数回膜貫通型の大腸がん特異的分子に対する高性能な抗体の取得を試み、ラットを用いて作製したクローン 1361 およびクローン 669 を取得した。標的分子を強制発現させた細胞株 (OE 株) や逆に shRNA

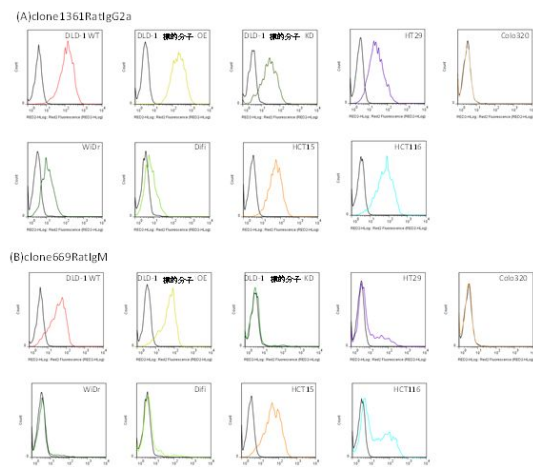


図1 取得抗体の評価 (Flow cytometry法)

によって抑制させた細胞株 (KD 株) を含む複数の大腸がん細胞株に対する反応性を flow cytometry 法にて確認した (図1)。大腸がん特異的分子の発現は細胞株によって様々だが、DLD-1 の野生株 (WT 株) と比べて OE 株での高発現および KD 株での低発現が観察された。同様に WT 株、OE 株、KD 株の培養上清に対する反応性を ELISA で確認した (図2)。特にクローン 669 を用いた検討にて

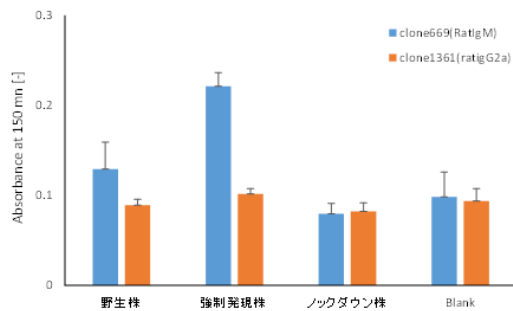


図2 取得抗体の評価 (ELISA法)

WT 株の培養上清と比べて OE 株の培養上清では吸光度の値が上昇し、逆に KD 株の培養上清では低下したことより目的の分子に対する特異的抗体が取得されたことが示された。

(2)エクソソーム上の大腸がん特異的分子

抗体の性能評価の過程で、標的分子が培養上清を用いても検出可能であったことから、標的とする大腸がん特異的分子は細胞外に放出され対外診断に応用可能であることを見出した。OE 株の培養上清から超速心法によりエクソソームを単離し、金コロイド標識抗体 (大腸がん特異的抗体および CD9 抗体、CD63 抗体) を用いると、エクソソーム上には、エクソソームマーカーである CD9 や CD63 だけでなく大腸がん特異的分子も存在しており、エクソソームを対象とした大腸がん特異的分子の検出が可能であることが示された。

(3)高感度タンパク検出法の確立

エクソソームマーカーと大腸がん特異的抗体の組合せをサンドイッチ ELISA 法で評価した。クローン 669 と CD9 抗体を使用する組合せが最も高感度であり、同組合せを CLEIA 法に適用した。検出下限を検討するため、段階的に希釈した培養上清を用いて、大腸がん特異的エクソソームをサンドイッチ ELISA 法と CLEIA 法で解析すると、サンドイッチ ELISA 法と比べて CLEIA 法は約 10 倍の感度を有しており、高感度タンパク検出法が確立された。

(4)臨床検体による評価

エクソソームは血液や唾液、尿、便などに安定的に存在しているが、特に血中エクソソームによるがん診断の報告が多い。本研究では挑戦的な便中タンパク (エクソソーム) 検査へ向けた前段階として、末梢血中腫瘍由来エクソソームによる大腸がん診断法の検討を試みた。予備検討にて健常者と大腸がん患

者間に明らかな差が見られたことから大腸がん患者では末梢血中に大腸がん特異的分子を有する腫瘍由来のエクソソームが循環していることが示唆されたため、症例数を追加して大腸がん患者 68 例および健常者 50 例の血清検体の評価を行った。健常者血清の平均値の 3 倍をカットオフとすると特異度は 96%となった。その際の感度は 64.7%であり、CEA の 23.5%よりも優れていた。リンパ節転移を伴わないステージ 1、2 の大腸がんにおいても 50%以上の感度を示していた。今後は検査方法の最適化および自動化を行い、最終目標である便検体への応用を目指している。

< 引用文献 >

Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, Ahlquist DA and Berger BM. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med.* 2014; 370(14):1287-1297.

Koga Y, Yasunaga M, Moriya Y, Akasu T, Fujita S, Yamamoto S, Kozu T, Baba H and Matsumura Y. Detection of colorectal cancer cells from feces using quantitative real-time RT-PCR for colorectal cancer diagnosis. *Cancer Sci.* 2008; 99(10):1977-1983.

Koga Y, Yamazaki N, Yamamoto Y, Yamamoto S, Saito N, Kakugawa Y, Otake Y, Matsumoto M and Matsumura Y. Fecal miR-106a is a useful marker for colorectal cancer patients with false-negative results in immunochemical fecal occult blood test. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013; 22(10):1844-1852.

Yasunaga M and Matsumura Y. Role of SLC6A6 in promoting the survival and multidrug resistance of colorectal cancer. *Scientific reports.* 2014; 4:4852.

Fujiwara Y, Koga Y, Hasegawa K, Fujii H, Yamaguchi T, Tsumura R, Yasunaga M and Matsumura Y. A new chemiluminescent enzyme immunoassay for plasma tissue factor detection. *Biosens J.* 2014; 3(1).

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計2件)

古賀宣勝、ユニークな消化器癌研究 - 便の分子診断から抗体デリバリーまで -、第 75 回日本癌学会学術総会(招待講演)、2016 年 10 月 6 日、パシフィコ横浜(横浜市)

米山諒 他、抗体付加磁性ビーズを用いた大腸がん新規マーカーを標的とする検出系の開発、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 7 日、パシフィコ横浜(横浜市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古賀 宣勝 (KOGA, Yoshikatsu)
国立がん研究センター・先端医療開発センター・室長
研究者番号：70536086

(2)研究協力者

西條 信史 (SAIJO, Shinji)

藤原 悠起 (FUJIWARA, Yuki)
(平成 27 年度まで)

米山 諒 (YONEYAMA, Ryo)