

令和元年6月14日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15690

研究課題名(和文)尿中免疫複合体の網羅的な解析結果に基づく尿路癌の新たな尿路再発予測モデルの構築

研究課題名(英文)A novel predictive model of urinary tract recurrence in urothelial cancer by comprehensive analyses of urine immunocomplex

研究代表者

宮田 康好(MIYATA, Yasuyoshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：60380888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：尿路癌は再発しやすい特徴があるため、膀胱鏡検査が必要になりますが、痛みや感染症などの問題があります。そこで、私達が開発したイムノコンプレキソーム解析法を用いて、膀胱癌の病態や進行に関する因子を尿の中から同定を試みた結果、セルロプラスミンが膀胱癌の病態や予後と関連することを見出しました。その成果を基に再発を予測するモデルの構築に向けて最終の解析中です。

また、その研究過程で同定されたその他の様々な因子についても尿路癌における病的意義を明らかにしました。また、BCGを用いた膀胱内注入療法において、その治療効果と関連する因子の解析を進め、いくつかの因子を同定しており、さらに研究を進めています。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、免疫に関係する複合体を検出し、その病態や予後と関連する因子を同定するイムノコンプレキソーム解析法を用いました。この方法で血液を解析することで、肺癌において今まで知られていなかった癌関連因子を同定した実績がありますが、尿を用いた初めての解析になります。また、今回の研究の過程において得られた成果の一部は、その解析法のさらなる精度向上や移植患者への応用などにも役立ちました。そして、セルロプラスミンという、今まで注目されていなかった因子の膀胱癌における臨床病理学的意義を確認したことに加え、その他の様々な癌関連因子の尿路癌における病的役割を明らかにできるなど、幅広い研究成果に繋がりました。

研究成果の概要(英文)：Urothelial cancer has characteristics of high frequency of recurrence. Therefore, cystoscopic examination is necessary; however, it has disadvantage on complication including pain and infection. In this study, we tried to identify the bladder cancer-related factors by used immunocomplexome method in urine samples. As results, we found that ceruloplasmin is associated with malignant behaviors and outcome in patients with bladder cancer. In addition, we detected several cancer-related factors during the examination, and clarified pathological significance of 4N1K-peptide, heme oxygenase-1, human antigen-R, class III beta-tubulin, and feline sarcoma oncogene protein in urothelial cancers. On the other hand, we analyze and detect the some prognostic factors of BCG intravesical therapy, and further studies are on going at the present.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：セルロプラスミン 免疫複合体 尿路癌 4N1K-peptide Thrombospondins 尿中ペプチド 膀胱内注入療法 尿路再発

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 非筋層浸潤膀胱癌の標準的治療は経尿道的腫瘍切除術であり、病期によって根治的切除が期待できる。一方、根治的切除ができて高頻度に尿路再発し、その一部は筋層浸潤し生命予後に影響する。そこで、定期的な膀胱鏡検査が行われるが、痛みを伴う侵襲的検査であり、上皮内癌や上部尿路再発など診断が困難な病変があることなど、問題点も少なくない。

(2) 膀胱鏡検査の補助的診断法として、尿細胞診や尿中マーカーの測定、欧米では fluoresce in situ hybridization (FISH) による検査も行われる(研究開始時は本邦未承認であった)が、感度や特異度の点で限界もあり、尿路再発を診断する新たなツールの必要性は高い。

(3) 尿路再発予防や上皮内癌に対して膀胱内注入療法が行われることがあり、その抗腫瘍効果から Bacillus Calmette-Guerin (BCG) が最も有用とされている。しかし、BCG の膀胱内注入には疼痛や頻尿、萎縮膀胱などの問題があるため、再発予防を含めた抗腫瘍効果や、有害事象の予測因子を同定する研究が広く行われているが、未だに見つかっていない。

(4) 我々の研究グループは、血液や髄液から免疫複合体を検出・解析することで病態に関連する因子を同定する『イムノコンプレキソーム(IC)解析法』を独自に開発し特許を取得していた。その後、尿中からも安定的、かつ、特異的に免疫複合体を検出できる方法を開発した。

(5) 尿路癌には新たな免疫療法が有効であり、尿路癌における免疫機能の重要性が知られている。そこで、免疫応答を利用し病的因子を網羅的に解析できる IC 解析法を用いることで、新たな尿路再発や膀胱内 BCG 注入療法の効果および有害事象予測モデルの構築が可能と考えた。

2. 研究の目的

(1) IC 解析法を用い尿路癌患者の尿中に存在する免疫複合体を捕捉・分析し、尿路癌に特異性の高い新たな病態関連因子を見いだす。

(2) (1) で得られた IC 解析法の結果と、手術で採取した尿路癌組織を用いた解析結果を網羅的に解析し、尿路癌組織での免疫反応やその病理学的意義について新たな知見を見いだす。

(3) (1)、(2) の結果をもとに、BCG を用いた膀胱内療法を受けた患者において同様の解析を行い、その再発予防効果と関連する因子や有害事象の予測因子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 尿路癌患者の自然尿を用いて IC 解析法を行い、病態に関連する免疫複合体を捕捉し、さらに、液体クロマトグラフィー質量分析法とデータベースへの照合を行うことで、数万のペプチドから尿路癌に有意な関連因子を同定する。

(2) 尿路感染症と健常者(尿路癌を含め尿路系の疾患がなく、検尿所見も正常)の尿において IC 解析法を行い、(1) の結果と比較検討することで尿路癌に特異的な因子を同定する。

(3) (2) の結果をもとに、臨床病理学的特徴や再発の有無などの臨床データとの関連を解析することで、尿路癌の病態関連因子と再発予測因子を同定する。

(4) (2) の結果について、尿路癌組織における発現を評価し、その病理所見や癌細胞の増殖との関連を検討することによって、より詳細で網羅的な臨床病理学的役割を解明する。

(5) 再発予防や上皮内癌の治療として BCG 膀胱内注入療法を行った患者の尿を用いて IC 解析法を用い、同療法の再発予防・抗腫瘍効果、有害事象の予測モデルを構築する。

4. 研究成果

(1) IC 解析法による尿中から膀胱癌に特徴的な因子の同定

101 名の膀胱癌患者(男性; 83 名、女性 18 名)の尿を用いて IC 解析を行ったところ、749 種類のペプチドが免疫複合体を形成している因子として同定された。そこで、対照群として、膀胱炎患者 52 名、健常人 42 名の尿について IC 解析を行ったところ、十数種類のペプチドにおいて膀胱癌と膀胱炎および健常者で検出率が異なることがわかった。その中で、最も検出率の差が大きかったものが「セルロプラスミン」であり、健常者で 45 名中 3 名(6.7%)、膀胱炎患者で 52 名中 9 名(17.3%)であったのに対して、膀胱癌患者で 101 名中 42 名(41.6%)に「セルロプラスミン」の免疫複合体を検出した。その他、ある種の捕体やグロブリン関連ペプチド

などが膀胱癌に特徴的であったが、以前より我々の研究室が注目している「トロンボスポンジン」の免疫複合体が膀胱癌患者の尿ではほとんど検出されないことなどもわかった。

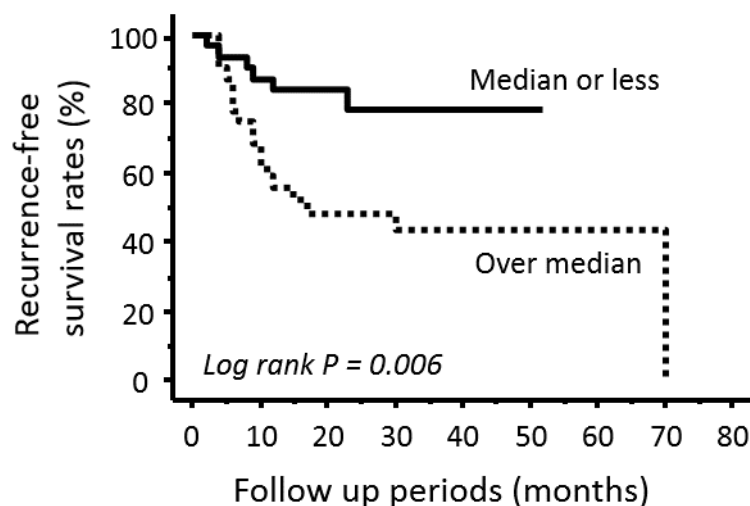
(2) 尿中セルロプラスミン濃度の臨床病理学的意義

研究の方法に述べた通り、IC解析法は尿中で補足した免疫複合体を、液体クロマトグラフィー質量分析法を用いて解析する「定性的試験」であり「定量的試験」ではない。つまり、(1)の結果は、診断という意味では意義深い結果と言えるが、それらの結果が、真の病理学的役割を反映しているかは不明である。そこで、次に、90名の膀胱癌患者(pTa = 36名、pT1 = 30名、pT2以上の筋層浸潤癌 = 23名)と66名の健常者の尿に含まれるセルロプラスミン量をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した。なお、90名の膀胱癌の中に14名のconcomitant carcinoma in situ (CIS)を認めた。

その結果、膀胱癌患者の尿中のセルロプラスミン濃度の中央値 / 範囲は、605.0 / 214.6 – 1480.8 ng/ml と健常者の154.4 / 71.9 – 294.1 ng/ml に比べて有意に ($P < 0.001$) 高値であった。一方、pTa と pT1 の筋層非浸潤癌と pT2 以上の筋層浸潤癌の間に有意な差を認めず(それぞれ、538.5 / 192.0 – 1835.6 ng/ml と 813.3 / 259.0 – 1328.82 ng/ml ; $P = 0.999$)、転移の有無とも関連していなかった ($P = 0.747$)。また、尿中セルロプラスミン濃度は、grade との間に有意な正の関連を認めた ($P = 0.021$) もの、これも筋層非浸潤癌では有意 ($P = 0.001$) であったのに対して、筋層浸潤癌では有意な関連を認めなかった ($P = 0.097$)。以上の結果から、尿中セルロプラスミンは、筋層浸潤癌や転移性癌よりも筋層非浸潤癌において病理学的、臨床的に有意な役割を果たす可能性が示唆された。

(3) 筋層非浸潤癌におけるセルロプラスミンの病理学的役割

まず pTa と pT1 においてその尿中濃度を比較したところ、pT1 では 1146.9 / 300.7 – 2480.4 ng/ml、pTa では 327.3 / 157.8 – 1006.2 ng/ml と、有意に ($P = 0.008$) pT1 の患者の尿中でセルロプラスミンは高値であった。さらに、concomitant CIS を認める膀胱癌の方が、それを認めない患者よりも有意に高値であることも示された ($P = 0.022$)。また、根治的切除後の尿路再発について、尿中セルロプラスミン濃度との関連を解析したところ、下図に示したとおり、その中央値より高い患者 (Over median) における再発率は、中央値以下 (Median or less) の患者に比較して有意に高いことが示された ($P = 0.006$)。



さらに、grade や pT stage を含む多変量解析において、尿中セルロプラスミンが中央値より高いことが有意な独立した予後予測因子であった (hazard ratio = 2.81, $P = 0.043$)。

(4) イムノコンプレキソーム解析法の応用とさらなる改良への貢献

以前より、IC解析法により膠原病や自己免疫疾患など様々な免疫が病態と深く関与する疾患で、新たな病態関連因子や予後関連因子を同定してきた。一方、本研究を開始した時点で、癌患者における検討はなく、本研究を補足する形で様々な診療科とも協力しながら解析を行った。

その過程において、肺癌患者で80%以上の血液中に gelsolin と inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chains が免疫複合体を形成して存在することや VENTX および VCIP135 の phosphoproteins が特異的に存在することを見出した。その臨床病理学的意義の解明は今後の課題ではあるが、従来には全く知られていなかった知見であり、今後の展開が期待される。

一方、前述の通り、IC解析法では、血液、髄液、そして、本研究で用いた尿などの液状の検体から免疫複合体を補足し解析する。そして、その免疫複合体の検出には Protein-A と Protein-G をコートした異なる2種類の磁気ビーズを組み合わせることで特異性を高めてきた。また、免疫複合体を処理して liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) で解析するが、

その処理にはトリプシンを用いていた。一方、今回の尿検体の解析において、尿路感染や血尿が強い患者尿で解析結果に不安定さが見られることに気付いた。そこで、以前より開発中であった、前述の2種類のビーズに加えて Proceptor™-sepharose ビーズを加えた3種類のビーズを用い、トリプシン処理以外にパパイン処理を行い、より精度の高い nano-LC-MS/MS を用いることで、結果の安定化が可能となった。この解析は、本研究のために行ったわけではないが、その感度、特異度、そして、より網羅的な解析が可能であることの検証に役立った。

(5) セルロプラスミン以外に検出された膀胱癌病態関連分子の臨床病理学的意義の解明

(4) に示したように、膀胱癌以外での IC 解析法の応用や新たな測定法の開発、さらには、我々の研究グループが腎臓移植にも携わっている関係から、IC 解析法を用いた生体肝移植の急性拒絶反応関与因子の同定などを共同で行った。そして、それらの過程で、我々が以前より癌関連分子として注目してきた因子が、これらの病態とも関連することが明らかとなった(例えば、生体肝移植の急性拒絶反応に関連する因子として同定された4つに、thrombospondin (TSP)-1 が含まれていた。そこで、以前より蓄積していら臨床病理学的所見や実験結果のデータを活用、あるいは、一部は追加実験を行うことで、本研究を基に以下に示す新たな知見を得た。

TSP-1 および TSP-2 とそのフラグメント 4N1K-peptide の膀胱癌での臨床病理学的意義。

膀胱癌組織における TSP-1 関連分子の発現を評価し、臨床病理学的特徴や癌細胞の増殖 (proliferation index, PI) 、アポトーシス (apoptotic index, AI) 、血管新生 (microvessel density, MVD) として、癌細胞浸潤に関連する angiogenesis and matrix metalloproteinase (MMP)-9 との関連を解析した。その結果、TSP-2 と 4N1K-peptide の発現は pT stage, 転移、そして、grade と負の有意な関連を認めたとに対し、TSP-1 は有意な関連を認めなかった。さらに、TSP-2 の発現は PI と MMP-9 と、4N1K-peptide は AI, MVD, MMP-9 と負の関連を認め、4N1K-peptide は新たな転移の予測因子であることが多変量解析にて示された (hazard ratio = 3.90, P = 0.002)。

さらに、TSP のファミリーである TSP-3 ~ TSP-5 の発現についても膀胱癌組織で検討し、TSP-5 が有意にその病態や悪性度と関連することを見出した。

Heme oxygenase (HO) -1, Human antigen-R (HuR) , Class III beta-tubulin (TUBB3) , そして、feline sarcoma oncogene protein (FES) の膀胱癌における臨床病理学的意義

膀胱癌で特異的に発現する割合はセルロプラスミンより低いものの、これらの免疫複合体を癌患者の尿で高率に検出されたため、さらなる研究を進めたところ、以下の新たな知見を得た。

- ・筋層非浸潤性膀胱癌において、HO-1 は、high-grade および pT1 腫瘍で高発現しており、PI, lymph vessel density, そして、cyclooxygenase (COX) -2 の発現と有意に関連していた。また、生存曲線を用いた解析で、転移の出現や生命予後とも有意に関連していた。
- ・細胞質に高発現した HuR は、シスプラチン抵抗性膀胱癌患者の2次療法として行われたゲムシタピンを含む化学療法の効果を予測する因子であった。また、尿路癌患者における緑茶摂取量を調査し、その尿路再発への影響を検討したところ、非喫煙者において緑茶摂取量が多い患者で尿路再発頻度は低く、その機序に HuR が関与していた。
- ・FES は高悪性度の尿路癌においてのみ、癌細胞の増殖や pT stage, そして、予後と有意に関連しており、その傾向は T24, RT4, 5637 細胞株を用いた in vitro 研究でも確認された。
- ・TUBB3 はシスプラチン抵抗性の尿路癌患者に対するパクリタキセルをベースとした2次化学療法の生命予後延長を含む抗腫瘍効果と関連していた。

(6) BCG 膀胱内注入療法と関連する因子の同定

現在、BCG 膀胱内注入療法を受けた患者の尿での解析を行っているが、BCG 注入療法中の尿では、結核菌の存在が解析の支障になることがわかった。そこで、BCG 注入療法後1ヶ月後の尿で解析を行っている。現在、最近の解析法を用いているため、その標準化を待ち結果解析の予定である。ただし、BCG 治療前とは異なるプロファイルであることがわかっている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Nakamura Y, Miyata Y, Takehara K, Asai A, Mitsunari K, Araki K, Matsuo T, Ohba K, Sakai H. The Pathological Significance and Prognostic Roles of Thrombospondin-1, and -2, and 4N1K-peptide in Bladder Cancer. *Anticancer Res.* 査読有り, 2019; 39(5): 2317-2324. doi: 10.21873/anticancer.13348.

Yasuda T, Miyata Y, Nakamura Y, Sagara Y, Matsuo T, Ohba K, Sakai H. High Consumption of Green Tea Suppresses Urinary Tract Recurrence of Urothelial Cancer via Down-regulation of Human Antigen-R Expression in Never Smokers. *In Vivo.* 査読有り, 2018; 32(4): 721-729. doi: 10.21873/invivo.11300.

Miyata Y, Matsuo T, Nakamura Y, Yasuda T, Ohba K, Takehara K, Sakai H. Expression of Class III Beta-tubulin Predicts Prognosis in Patients with Cisplatin-resistant Bladder Cancer Receiving Paclitaxel-based Second-line Chemotherapy. *Anticancer Res.* 査読有り, 2018; 38(3): 1629-1635.

Aibara N, Ohyama K, Hidaka M, Kishikawa N, Miyata Y, Takatsuki M, Eguchi S, Kuroda N. Immune complexome analysis of antigens in circulating immune complexes from patients with acute cellular rejection after living donor liver transplantation. *Transpl Immunol*. 査読有り, 2018; 48: 60-64. doi: 10.1016/j.trim.2018.02.011.

Asai A, Miyata Y, Takehara K, Kanda S, Watanabe SI, Greer PA, Sakai H. Pathological significance and prognostic significance of FES expression in bladder cancer vary according to tumor grade. *J Cancer Res Clin Oncol*. 査読有り, 2018; 144(1): 21-31. doi: 10.1007/s00432-017-2524-1.

Aibara N, Kamohara C, Chauhan AK, Kishikawa N, Miyata Y, Nakashima M, Kuroda N, Ohyama K. Selective, sensitive and comprehensive detection of immune complex antigens by immune complexome analysis with papain-digestion and elution. *J Immunol Methods*. 査読有り, 2018; 461: 85-90. doi: 10.1016/j.jim.2018.06.021.

Miyata Y, Mitsunari K, Akihiro A, Watanabe SI, Matsuo T, Ohba K, Sakai H. Human antigen R as a predictive marker for response to gemcitabine-based chemotherapy in advanced cisplatin-resistant urothelial cancer. *Oncol Lett*. 査読有り, 2017; 13(2): 811-818. doi: 10.3892/ol.2016.5484.

Matsuo T, Miyata Y, Mitsunari K, Yasuda T, Ohba K, Sakai H. Pathological significance and prognostic implications of heme oxygenase 1 expression in non-muscle-invasive bladder cancer: Correlation with cell proliferation, angiogenesis, lymphangiogenesis and expression of VEGFs and COX-2. *Oncol Lett*. 査読有り, 2017; 13(1): 275-280. doi: 10.3892/ol.2016.5416.

Ohyama K, Yoshimi H, Aibara N, Nakamura Y, Miyata Y, Sakai H, Fujita F, Imaizumi Y, Chauhan AK, Kishikawa N, Kuroda N. Immune complexome analysis reveals the specific and frequent presence of immune complex antigens in lung cancer patients: A pilot study. *Int J Cancer*. 査読有り, 2017; 140(2): 370-380. doi: 10.1002/ijc.30455.

〔学会発表〕(計 7 件)

宮田康好、浅井昭宏、安田拓司、中村裕一郎、相良祐次、松尾朋博、大庭康司郎、酒井英樹 . トロンボスポンジン由来の4N1K-peptide膀胱内注入療法は膀胱癌進展を抑制し予後を改善する . 第 56 回 日本癌治療学会学術集会 2018 年

Tsutomu Yuno, Yasuyoshi Miyata, Yuichiro Nakamura, Kyohei Araki, Yuji Sagara, Tomohiro Matsuo, Kojiro Ohba, Hideki Sakai. 4N1K-PEPTIDE DERIVED FROM THROMBOSPONDIN-2 IS ASSOCIATED WITH MALIGNANT AGGRESSIVENESS AND PROGNOSIS IN BLADDER CANCER. 2018 Annual meeting of American Urological Association. 2018 年

Yasuyoshi Miyata, Akihiro Asai, Takuji Yasuda, Yuichiro Nakamura, Yuji Sagara, Tomohiro Matsuo, Kojiro Ohba, Hideki Sakai. 4N1K-peptide derived from thrombospondin-1 acts as tumour suppressor in bladder cancer in vivo and in vitro: Potential therapeutic agents for intravesical therapy. 2018 Annual meeting of European Association of Urology. 2018 年

Kyohei Araki, Yasuyoshi Miyata, Yoichiro Nakamura, Takuji Yasuda, Yuji Sagara, Tomohiro Matsuo, Kojiro Ohba, Hideki Sakai. Pathological significance of thrombospondin 3 to 5 in patients with bladder cancer. 2018 Annual meeting of European Association of Urology. 2018 年

Tomohiro Matsuo, Yasuyoshi Miyata, Yuichiro Nakamura, Takuji Yasuda, Kojiro Ohba, Hideki Sakai. Expression of class III beta-tubulin predicts prognosis in cisplatin-resistant bladder cancer patients receiving paclitaxel-based second-line chemotherapy. 2017. Annual meeting of American Urological Association. 2017 年

宮田康好、松尾朋博、大庭康司郎、酒井英樹 . 高頻度の緑茶摂取は非喫煙患者において human antigen-R の発現を抑制することで尿路再発を抑制する。 第 105 回 日本泌尿器科学会総会 2017 年

宮田康好、浅井昭宏、松尾朋博、大庭康司郎、酒井英樹 . 緑茶摂取量が尿路癌の予後に与える影響 . 喫煙状況および癌細胞 HuR との関連に注目して。 第 54 回 日本癌治療学会学術集会 2016 年

(1)研究分担者

研究分担者氏名：計屋 知彰

ローマ字氏名：(HAKARIYA, Tomoaki)

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科(医学系)

職名：助教

研究者番号(8桁)：00716574

研究分担者氏名：大山 要

ローマ字氏名：(OHYAMA, Kaname)

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科(薬学系)

職名：准教授

研究者番号(8桁)：50437860

(2)研究協力者

研究協力者氏名：酒井 英樹

ローマ字氏名：(SAKAI, Hideki)

研究協力者氏名：大庭 康司郎

ローマ字氏名：(OHBA, Kojiro)

研究協力者氏名：松尾 朋博

ローマ字氏名：(MATSUO, Tomohiro)

研究協力者氏名：中村 裕一郎

ローマ字氏名：(NAKAMURA, Yuichiro)

研究協力者氏名：浅井 昭宏

ローマ字氏名：(ASAI, Akihiro)

研究協力者氏名：安田 拓司

ローマ字氏名：(YASUDA, Takuji)

研究協力者氏名：相原 希美

ローマ字氏名：(AIBARA, Nozomi)

研究協力者氏名：荒木 杏平

ローマ字氏名：(ARAKI, Kyohei)

研究協力者氏名：光成 健輔

ローマ字氏名：(MITSUNARI, Kensuke)

研究協力者氏名：竹原 浩介

ローマ字氏名：(TAKEHARA, Kosuke)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。