

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09197

研究課題名（和文）膀胱癌の新たな診断法と治療の開発に向けたセルロプラスミンの病理学的意義の解明

研究課題名（英文）Investigation on pathological significance of ceruloplasmin for development of new diagnostic methods and treatment strategies in bladder cancer

研究代表者

相良 祐次（SAGARA, Yuji）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員

研究者番号：80816702

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：膀胱癌患者の尿に含まれるセルロプラスミンを含む免疫複合体は、その発がんや病態と有意に関連することが示された。また、尿中のセルロプラスミン濃度は、筋層非浸潤性膀胱癌患者の病期や予後と関連することがわかった。さらに、膀胱癌の組織を用いた検討において、セルロプラスミンの膀胱癌細胞における発現は、癌細胞の浸潤や進展、そして、転機と関連することもわかった。このように、セルロプラスミンは膀胱癌の病態と密接に関連すると共に、そのバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱癌の病態に関して不明な点も多く、再発率が高く予後不良である点からも、その解明は重要な意義を持つ。今回の研究では、尿中の免疫複合体を検出という新たな方法において、セルロプラスミンを含む免疫複合体が膀胱癌の病態に重要な役割を果たすという新たな知見を見出した。また、その結果を基に、比較的容易に施行可能なELISAおよび免疫染色法を用いて尿中濃度や組織発現を解析し、セルロプラスミンが臨床的にも有用性の高いバイオマーカーであることを見出したことは、新規性、汎用性の面からも意義深い。

研究成果の概要（英文）：Immunocomplex including ceruloplasmin in urine sample was significantly associated with carcinogenesis and pathological status in patients with bladder cancer. In addition, urine level of ceruloplasmin was associated with stage and prognosis in patients with non-muscle invasive bladder cancer. On the other hand, ceruloplasmin expression in cancer cells predicted cancer cell invasion, progression and outcomes. Thus, ceruloplasmin plays important roles for pathological feature of bladder cancer, and it is speculated to be the useful biomarker in these patients.

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 尿中濃度 病理学的特徴 予後 癌組織 膀胱癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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) (1) 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 解析を行い、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。

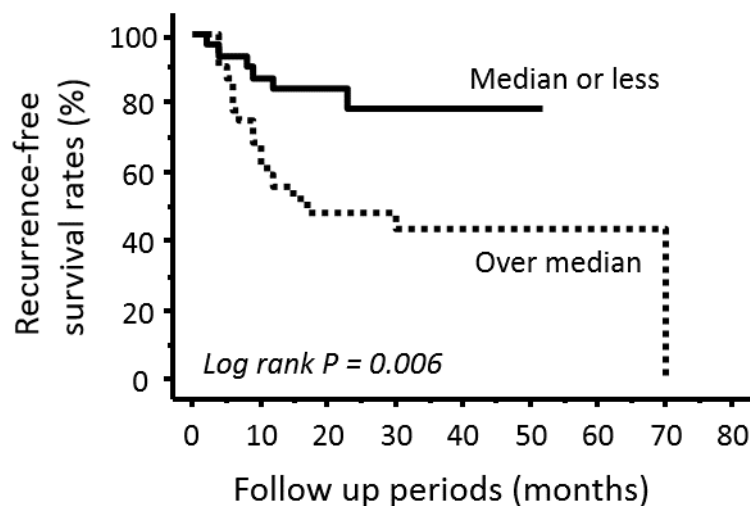
(2) 尿中セルロプラスミン濃度の臨床病理学的意義

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-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つた、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、本研究のために行つたわけではないが、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つた。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る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) そして、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) および、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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aibara N, Miyata Y, Araki K, Sagara Y, Mitsunari K, Matsuo T, Ohba K, Mochizuki Y, Sakai H, Ohyama K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection of Novel Urine Markers Using Immune Complexome Analysis in Bladder Cancer Patients: A Preliminary Study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 NAKAMURA YUICHIRO, MIYATA YASUYOSHI, TAKEHARA KOSUKE, ASAI AKIHIRO, MITSUNARI KENSUKE, ARAKI KYOHEI, MATSUO TOMOHIRO, OHBA KOJIRO, SAKAI HIDEKI	4. 巻 39
2. 論文標題 The Pathological Significance and Prognostic Roles of Thrombospondin-1, and -2, and 4N1K-peptide in Bladder Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2317 ~ 2324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 YASUDA TAKUJI, MIYATA YASUYOSHI, NAKAMURA YUICHIRO, SAGARA YUJI, MATSUO TOMOHIRO, OHBA KOJIRO, SAKAI HIDEKI	4. 巻 32
2. 論文標題 High Consumption of Green Tea Suppresses Urinary Tract Recurrence of Urothelial Cancer via Down-regulation of Human Antigen-R Expression in Never Smokers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 721 ~ 729
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.11300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyata Y, Matsuo T, Nakamura Y, Yasuda T, Ohba K, Takehara K, Sakai H.	4. 巻 38
2. 論文標題 Expression of Class III Beta-tubulin Predicts Prognosis in Patients with Cisplatin-resistant Bladder Cancer Receiving Paclitaxel-based Second-line Chemotherapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1629 ~ 1635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12394	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Aibara Nozomi, Ohyama Kaname, Hidaka Masaaki, Kishikawa Naoya, Miyata Yasuyoshi, Takatsuki Mitsuhiisa, Eguchi Susumu, Kuroda Naotaka	4. 巻 48
2. 論文標題 Immune complexome analysis of antigens in circulating immune complexes from patients with acute cellular rejection after living donor liver transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplant Immunology	6. 最初と最後の頁 60～64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.trim.2018.02.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aibara Nozomi, Kamohara Chihiro, Chauhan Anil K., Kishikawa Naoya, Miyata Yasuyoshi, Nakashima Mikiro, Kuroda Naotaka, Ohyama Kaname	4. 巻 461
2. 論文標題 Selective, sensitive and comprehensive detection of immune complex antigens by immune complexome analysis with papain-digestion and elution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Immunological Methods	6. 最初と最後の頁 85～90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jim.2018.06.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 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。
2. 発表標題 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。
3. 学会等名 第56回 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮田 康好 (MIYATA Yasuyoshi) (60380888)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授 (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松尾 朋博 (MATSUO Tomohiro) (60622024)	長崎大学・病院（医学系）・助教 (17301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	酒井 英樹 (SAKAI Hideki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関