

平成 21 年 4 月 13 日現在

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2007～2008

課題番号：19591530

研究課題名（和文） 新規食道癌抗原 CUEC-10 の食道癌における診断・治療への応用研究

研究課題名（英文） Application of Novel Tumor Antigen, CUEC-10, to Diagnosis and Treatment for Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma

研究代表者

島田 英昭 (SHIMADA HIDEAKI)

千葉県がんセンター(研究所)・医療局消化器外科・主任医長

研究者番号:20292691

研究成果の概要：

【背景と目的】SEREX法は癌細胞由来の cDNA 発現ライブラリーの中から患者血清中の IgG 抗体が認識する抗原遺伝子を同定する方法であり、癌抗原のスクリーニング法として優れた方法である。SEREX (serological identification of antigens by recombinant cDNA expression cloning) 法により食道癌関連抗原CUEC-10の同定・機能解析を行い、腫瘍マーカーとしての意義を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】食道癌細胞株 T.Tn より cDNA ライブラリーを作製し、食道扁平上皮癌患者血清を用いてSEREX法によるスクリーニングを施行した。SEREX 法を用い食道扁平上皮癌患者血清をスクリーニングし、新規の癌抗原としてCUEC-23を同定した。HCS cDNA を GST-融合タンパク質発現ベクター pGEX に組換え、合成された融合タンパク質を精製して ELISA 法により血清抗体のレベルを測定した。

【結果と考察】CUEC-10 に対する抗体価は健常者血清に比べ、患者血清において有意に高いことが判明した。食道扁平上皮癌患者における血清 CUEC-10 抗体陽性率は Western blot 解析で 26%(14/54) であり、既存の腫瘍マーカーと併用することで、陽性率が高くなることが明らかとなった (CEA との併用で 44%, SCC-Ag との併用で 41%, CYFRA21-1 との併用で 52%)。また、健常者群の平均値+3SD をカットオフ値とすると ELISA 解析では 17%(43/91)であり、健常者対照群における陽性率は 2.2%(1/45)であった。臨床病理学的因子との相関関係は、認められなかった。

【結語】血清 CUEC-10 抗体は、新規の腫瘍マーカーとして有用であり、既存の腫瘍マーカーと併用することで、50%前後の陽性率となることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1800000	540000	2340000
平成 20 年度	1700000	510000	2210000
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：外科学、消化器外科

科研費の分科・細目：食道・胃・大腸

キーワード：食道癌、腫瘍マーカー、SEREX、腫瘍抗原

1. 研究開始当初の背景

食道癌はリンパ節転移陰性の表在癌であれば、内視鏡下切開剥離法によって治療可能であるが、進行癌ではリンパ節郭清を伴う開胸開腹手術が必要となる。診断時点の病期によって治療の侵襲が大きく異なる癌腫であり、早期癌発見による利益が最も大きな固形癌といえる。食道癌の早期診断については、簡便性の面からは、血液検査法が期待されるが、既存の血液腫瘍マーカーでは、癌細胞から分泌される微量の血中タンパクを検出するため、早期癌・表在癌の診断は理論的に難しい。

一方、我々が(株)医学生物学研究所と共同開発中の血清 p53IgG 抗体検出による診断方法 (*Cancer 2003*)は、癌細胞の抗原に反応する自己抗体を検出する手法であり、微量の癌抗原に対する抗原抗体反応を利用して、微小な癌細胞を検出することが可能である。現在、開発中の p53IgG 抗体検出 ELISA キットの stage I 食道癌に対する診断能力は約 20%であり (*Cancer 2000*)、既存の腫瘍マーカーの陽性率に比較して有用性が高い。しかし、1種類の抗体による診断能力では不十分であり、より陽性率の高い血清抗体を同定して臨床応用することが必要である。我々の研究組織で、1999 年より食道癌患者血清中の IgG 抗体のスクリーニングを行っており、p53 抗体を凌駕する陽性率を有する血清抗体の探索を行ってきた (*Int J Oncology 2005*)。

これらの癌抗原遺伝子をクローニングする手法として SEREX(Serological identification of antigens by recombinant cDNA expression libraries)法を用いて、現在までに 40 種類の新規癌特異的抗原遺伝子 (*Int J Cancer 2004*)を含めて 400 種類以上の癌抗原遺伝子のクローニングに成功し、有用な遺伝子については 9 件の診断方法についての発明を国内ならびに国際特許出願している(業績欄参照)。別途に研究を進めた血清 p53 抗体の診断能力から推測して、抗体反応は表在癌の段階から認められるため早期食道癌の発見に有用であることが期待される。

2. 研究の目的

本研究期間において、CU-EC-10 抗原を用いた血液検査方法の有用性を以下の課題について明らかにする。

最も陽性率が高い ELISA キットを作成するために、WEB サイトにて、HLA class II に認識されるエピトープを選別する。選別したエピトープに対応するペプチド断片を精製して、ELISA キットの結合標的とする。Class II 結合エピトープは、最低 3 箇所同定されており、この部分を含むペプチド断片を複数精製する。

試作した ELISA キットにて、血清中の抗 CU-EC-10 抗体をスクリーニングする。対象は、1999-2005 年までに当科に入院加療した食道癌患者の治療前の血清約 300 検体である。これらの食道癌患者において病期別の血清抗体の陽性率を明らかにする。抗原ペプチドとしてどのペプチドが最も陽性率が高いかを検討する。

最も陽性率の高いペプチドを標的とした ELISA キットを使用して、陽性症例の臨床病理学的特徴を検討する。陽性例と陰性例の予後を比較する。また、放射線化学療法施行症例においては、治療効果との相関関係について検討する。

3. 研究の方法

- ① 単離された cDNA の塩基配列をアミノ酸配列に変換し、MHCpred ウェブサイト (<http://www.jenner.ac.uk/MHCpred/>) を用いてクラスII 抗原部位を検索し、その領域を含むペプチドを人工合成する。アミノ末端にビオチンを付加しておき、予めアビジンを固相化したプレートを用いて合成ペプチドを特異的に結合させ、洗浄後に血清抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG 抗体を用いて血清抗体レベルを測定する(ELISA)。健常者血清に比べ患者血清の抗体レベルが有意に高いペプチドを選択する。
- ② 健常者血清における ELISA 測定レベルの平均値+3SD をカットオフ値として、陽性と診断される患者血清が 25% を上回った場合に、診断用キットとして有用であると判断する。バキュロウイルスを用いた CU-EC-10 タンパク精製と血清 CU-EC-10 抗体検出のための ELISA キットを作成する。作成した ELISA キットの性能試験を実施し、健常者の基準抗体価を設定する。
- ③ 有用抗原遺伝子としてクローニングした抗原を標的として、種々の臨床病理学的特徴を有した食道癌症例について、血清CU-EC-10抗体の存在の有無をウエスタンブロット法ならびに試作する ELISAキットにて検討する。
- ④ すでに保存している食道癌症例の治療経過が判明している血液サンプルを用いることで、深達度、リンパ節転移、遠隔臓器転移との相関関係を検討する。また、放射線・化学療法施行症例においては、治療感受性との相関関係を検討する。再発症例においては、再発時期、予後との相関関係を検討する。いずれの臨床病理学的検討においても血清CU-EC-10抗体が独立した危険因子あるいは予後因子であるか否かについて検討する。

4. 研究成果

CU-EC-10 に対する抗体価は健常者血清に比べ、患者血清において有意に高いことが判明した。食道扁平上皮癌患者における血清 CU-EC-10 抗体陽性率は Western blot 解析で 26%(14/54) であり、既存の腫瘍マーカーと併用することで、陽性率が高くなることが明らかとなった(CEA との併用で 44%、SCC-Ag との併用で 41%、CYFRA21-1 との併用で 52%)。

また、健常者群の平均値+3SD をカットオフ値とする ELISA 解析では 17%(43/91)であり、健常者対照群における陽性率は 2.2%(1/45)であった。

臨床病理学的因子との相関関係は、認められなかった。

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 7 件)

1. Shimada H, Kagaya A, Shiratori T, Nomura F, Ochiai T, Matsubara H, Takiguchi M, Hiwasa T. Detection of Anti-CUEC-23 Antibodies in Serum of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma-Possible New Serum Marker for Esophageal Cancer- J Gastroenterology 2009 (In press)
 2. Hiwasa T, Shimada H, Kuboshima M, Shiratori T, Kagaya A, Nabeya Y, Sugano S, Ochiai T, Matsubara H, Takiguchi M. Decrease in chemosensitivity against anticancer drugs by an esophageal squamous cell carcinoma SEREX antigen, AISEC. Int J Oncol. 2009 Mar;34(3):641-8.
 3. Shimada H, Shiratori T, Takeda A, Matsushita K, Okazumi S, Akutsu Y, Matsubara H, Nomura F, Ochiai T. Perioperative changes of serum p53 antibody titer is a predictor for survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. World J Surg. 2009 Feb;33(2):272-7.
 4. Arai M, Imazeki F, Sakai Y, Mikata R, Tada M, Seki N, Shimada H, Ochiai T, Yokosuka O. Analysis of the methylation status of genes up-regulated by the demethylating agent, 5-aza-2'-deoxycytidine, in esophageal squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 2008 Aug;20(2):405-12.
 5. Yamazawa K, Shimada H, Hirai M, Hirashiki K, Ochiai T, Ishikura H, Shozu M, Isaka K. Serum p53 antibody as a diagnostic marker of high-risk endometrial cancer. Am J Obstet Gynecol. 2007 Nov;197(5):505.e1-7.
 6. Shiratori T, Shimada H, Kagaya A, Kuboshima M, Nabeya Y, Machida T, Goto K, Takiguchi M, Ochiai T, Hiwasa T. Sensitization against anticancer drugs by transfection with UBE2I variant gene into ras-NIH3H3 mouse fibroblasts. Anticancer Res. 2007 Sep-Oct;27(5A):3227-33.
 7. Nimura Y, Kawata T, Uzawa K, Okamura J, Liu C, Saito M, Shimada H, Seki N, Nakagawara A, Ito H, Ochiai T, Tanzawa H. Silencing Ku80 using small interfering RNA enhanced radiation sensitivity in vitro and in vivo. Int J Oncol. 2007 Jun;30(6):1477-84.
 8. Shimada H, Kuboshima M, Shiratori T, Nabeya Y, Takeuchi A, Takagi H, Nomura F, Takiguchi M, Ochiai T, Hiwasa T. Serum anti-myomegalin antibodies in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Int J Oncol. 2007 Jan;30(1):97-103.
- 〔学会発表〕（計 21 件）
- 2007 年
1. 間宮俊太、松下一之、島田英昭、西森孝典、朝長毅、野村文夫、落合武徳。プロテオミクスを用いた食道扁平上皮癌におけるDoxetaxel耐性関連タンパクの解明と臨床応用。デジタルポスターセッション 4 月 11 日大阪 第 107 回日本外科学会定期学術集会日外会誌 108 (2); 414.
 2. 加賀谷暁子、島田英昭、久保嶋麻里、日和佐隆樹、瀧口正樹、落合武徳。SEREX法により同定された新規食道癌抗原遺伝子の機能解析。デジタルポスターセッション 4 月 12 日大阪第 107 回日本外科学会定期学術集会日外会誌 108 (2); 590.
 3. 加賀谷暁子、島田英昭、日和佐隆樹、瀧口正樹、落合武徳。食道扁平上皮癌における新規SEREX抗原の同定と血清抗体の解析。一般演題 6 月 22 日横浜 第 61 回 日本食道学会学術集会 プログラム・抄録集; 150
 4. 加賀谷暁子、島田英昭、日和佐隆樹、瀧口正樹、

- 落合武徳. 食道癌SEREX抗原サイクリンL2 の同定と機能解析. 一般演題(ポスター)7月19日東京第62回日本消化器外科学会定期学術集会 日消外会誌 40(7); 552(1340)
5. 太田拓実、島田英昭、白鳥 享、清水孝徳、鍋谷圭宏、岡住慎一、松原久裕、首藤潔彦、阿久津泰典、落合武徳. 血清p53抗体モニタリングによる食道癌手術後の微小残存腫瘍の診断と予後への影響. 一般演題(ポスター)7月20日東京第62回日本消化器外科学会定期学術集会 日消外会誌 40(7); 650(1438)
 6. 島田英昭、加賀谷暁子、白鳥享、瀧口正樹、野村文夫、落合武徳、日和佐隆樹. 食道扁平上皮癌SEREX抗原CU-EC-10 に対する血清抗体の臨床病理学的意義. 口演 10月5日横浜第66回日本癌学会学術総会 抄録集 186
 7. 西森孝典、朝長 毅、松下一之、松原久裕、佐藤 守、小寺義男、大石正道、前田忠計、島田英昭、野村文夫. プロテオミクス解析によって食道癌で発現低下が示された細胞間接着蛋白質 Periplakinの腫瘍マーカーとしての有用性. ポスター10月3日 横浜 第66回日本癌学会学術総会 抄録集 171
 8. 間宮俊太、松下一之、朝長毅、島田英昭、落合武徳、野村文夫. Proteomic Analysis of Docetaxel-resistant Mechanism in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. ポスター横浜 第66回日本癌学会学術総会 抄録集 167
 9. 加賀谷暁子、島田英昭、日和佐隆樹、瀧口正樹、落合武徳. Identification and functional analysis of esophageal squamous cell carcinoma SEREX antigen, cyclin L2. ポスター10月5日横浜第66回日本癌学会学術総会 抄録集 96.
 10. 島田英昭、白鳥享、鍋谷圭宏、岡住慎一、松原久裕、阿久津泰典、首藤潔彦、林秀樹、竹田明彦、落合武徳. 食道癌治療後の血清p53抗体モニタリングによる再発・予後診断. ワークショップ 10月26日京都第45回日本癌治療学会総会日本癌治療学会誌 42(2); 327.
 11. 島田英昭、落合武徳. 新規食道癌腫瘍マーカー「血清p53 抗体」の臨床応用. パネルディスカッション11月2日群馬第59回日本気管食道科学会 日気食会報 59(2); 181.
- ## 2008年
12. 島田英昭. 新規腫瘍マーカー「血清p53 抗体」の開発と保険適応. ランチョンセミナー-55月15日 長崎第108回日本外科学会定期学術集会 日外会誌 109(2) 日程号; 76.
 13. 白鳥享、島田英昭、鍋谷圭宏、阿久津泰典、松原久裕、瀧口正樹、日和佐隆樹. SEREX法により同定された新規食道癌特異抗原makorin 1 の解析. 一般演題・口演5月16日長崎 第108回日本外科学会定期学術集会日外会誌 109(2); 265.
 14. 西森孝典、朝長毅、松下一之、佐藤守、小寺義男、宮澤幸正、坂田治人、阿久津泰典、村上健太郎、碓井彰大、加野将之、大石正道、前田忠計、野村文夫、岡住慎一、島田英昭、松原久裕. プロテオミクス解析によって食道扁平上皮癌組織での発現低下が示された細胞間接着蛋白質 periplakinの解析. 一般演題・デジタルポスター5月16日長崎 第108回日本外科学会定期学術集会日外会誌 109(2); 509
 15. 島田英昭、日和佐隆樹、久保嶋麻里、藤田和恵、白鳥享、鍋谷圭宏、松原久裕、岡住慎一、永田松夫、落合武徳. Development of Serum Biomarker for Esophageal Carcinoma. 教育セミナー ISDE2010 6月21日東京第62回日本食道学会学術集会Program&Abstracts 63
 16. 島田英昭、佐久間貞敏、武富正廣、竹嶋俊介、井上益男、新谷晃司、山本宏、永田松夫. 食道癌症例における抗Midkineモノクローナル抗体を用いた血清Midkine値測定法の開発. 一般演題 口演 6月21日東京 第62回日本食道学会学術集会 Program&Abstracts 138

17. 加賀谷暁子、島田英昭、松原久裕、日和佐隆樹.
新規SEREX抗原ECSAを標的とした食道癌腫瘍
マーカーの開発. 一般演題・口演 7月16日札幌
第63回日本消化器外科学会総会 日消外
会誌 41(7); 448(1170)
18. 島田英昭、落合武徳、竹田明彦、岡住慎一、松
原久裕、山本 宏、永田松夫、竜 崇正. 「血清
p53 抗体」の開発・保険適応の経験からみた診
断薬におけるTRの将来展望. ワークショップ 7
月18日札幌 第63回日本消化器外科学会
総会 日消外会誌 41(7); 359(1081)
19. Shimada H, Okazumi S, Matsubara H, Nabeya Y,
Shiratori T, Akutsu Y, Ochiai T. Clinical impact
of perioperative changes of serum p53 antibody
titer in patients with esophageal carcinoma. ポス
ター9月12日ブダペスト 11thWorld Congress of
the International Society for diseases of the
Esophagus Program&Abstracts 127
20. Shimada H, Hiwasa T. Serological identification
of antigens by recombinant cDNA expression
cloning (SEREX) using antibodies from patients
with esophageal squamous cell carcinoma. ポス
ター9月12日ブダペスト 11thWorld Congress of
the International Society for diseases of the
Esophagus Program&Abstracts 129
21. Shimada H, Shiratori T, Takeda A, Matsushita K,
Matsubara H and Nomura F. Dose perioperative
changes of serum p53 antibody titer predict
survival in patients with esophageal carcinoma?
ワークショップ 10月29日名古屋第67回日本癌
学会学術総会 Proceedings294

2009年

22. 島田英昭. 血清 IgG 抗体を分子標的として癌バ
イオマーカーの開発. 第27回日本耳鼻咽喉科
免疫アレルギー学会 教育研修会 教育講演 2
月12日千葉市(三井ガーデンホテル)第27回日
本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 教育研修

会 プログラム・抄録集 36

[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] 該当せず

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田英昭 (SHIMADA HIDEAKI)

千葉県がんセンター・医療局・消化器外科・
主任医長

研究者番号：20292691

(2) 研究分担者

日和佐隆樹 (HIWASA TAKAKI)

千葉大学大学院医学研究院・
遺伝子生化学・准教授

研究者番号：30260251

白鳥享 (SHIRATORI TOORU)

千葉大学大学院医学研究院・
先端応用外科学・講師

研究者番号：80361434

(3) 連携研究者

なし