

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07738

研究課題名(和文)尿中抗体を利用した膀胱がん早期診断マーカーの獲得と診断キット開発に向けた検討

研究課題名(英文)Acquisition of early diagnostic markers for bladder cancer using urinary antibodies and examination for development of diagnostic kits

研究代表者

長塩 亮(Nagashio, Ryo)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：40618568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：早期の膀胱がんを検出可能なマーカーの獲得を目指し、膀胱がん患者の尿中の抗体を用いたプロテオーム解析を行った。尿中の抗体を一次抗体に用いた二次元免疫ブロット法を行った結果、膀胱がん細胞由来の様々なタンパク質を認識する抗体が多数含まれていることを明らかにした。これらの抗体の中には、7割以上の患者で共通に認められる抗体も含まれており、膀胱がんの新たなマーカーとしての有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では無侵襲性である尿に着目し、膀胱がん細胞由来のタンパク質を抗原とする尿中抗体を検出した。検出された抗体の抗原を同定し、膀胱がんの診断マーカーとして実用化することで、検診などに使用可能な膀胱がん診断用簡易検査キットの開発が可能となる。その結果、自覚症状のない状態での発見が困難な膀胱がん患者の早期診断が可能となり、患者のQOL向上や医療費の削減などにつながるため社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Aiming to obtain markers that can detect early-stage bladder cancer, we performed proteomic analysis using antibodies in the urine of bladder cancer patients. As a result of two-dimensional immunoblotting using the antibody in urine as the primary antibody, it was clarified that many antibodies recognizing various proteins derived from bladder cancer cells were contained. Among these antibodies, there are also antibodies commonly found in more than 70% of patients, suggesting their usefulness as a new marker for bladder cancer.

研究分野：抗体基盤の疾患プロテオミクス

キーワード：膀胱がん 診断マーカー 尿中抗体 二次元電気泳動法

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

代表的な泌尿器系腫瘍である前立腺がんは PSA が診断マーカーとして用いられており早期診断が可能となった。膀胱がんは前立腺がんの次に罹患数の多い泌尿器系腫瘍であるが特異的な診断マーカーや簡便な診断法がない。膀胱がんは進行が比較的遅く、不顕性であるため、血尿などの症状が出現したところには既に進行した状態、あるいは転移した状態の場合がある。膀胱がんの診断は膀胱鏡検査と尿細胞診が必須の検査法であるが、膀胱鏡検査は患者の肉体的・精神的苦痛や費用負担が大きく、尿細胞診は高い技術を持った細胞検査士や病理医であっても、特異度は 90 ~ 100% と高いものの、感度は 40 ~ 60% と低い。膀胱がんの腫瘍マーカーとして bladder tumor antigen や nuclear matrix protein 22 が開発され、尿中腫瘍マーカーとして保険収載されたが、良性疾患由来の血尿でも反応性を示すなど特異性が低く、あまり有効なマーカーではない (Toma *et al. World J Urol* 2004, 22:145-9)。実用性の高い診断マーカーがない現状では、膀胱鏡検査が必要と思われる自覚症状のない膀胱がん患者を選択することが出来ず、早期がんを見逃す原因にもなっている。そのため、不顕性に進行する膀胱がんを早期に発見するための実用性の高い診断マーカーの獲得が膀胱がんにおいては喫緊の課題となっている。

我々は今までがんの早期診断マーカー獲得を目的として、肺がんや膀胱がんを中心に抗体を基盤としたプロテオーム解析を継続的に行ってきた。その研究の中で、がん患者血清中の自己抗体にはがん特異的に反応するものも多数含まれていた。これらの自己抗体は、抗原タンパク質が血中で検出可能になる前の極微量な段階で既に免疫学的に増幅されており、自己抗体を利用する方法は PCR 法に匹敵するほどの感度があるとの報告がある (Hanash S. *Nature Tech* 2003, 21: 37-8)。さらに、自己抗体はがん発生の初期から免疫学的に増幅されており、検出が容易である点もマーカー候補として大変魅力的である。そこで、膀胱がん組織に直接晒されており、無侵襲性である尿検体に着目し、尿中に含まれる抗体を同定することで、膀胱がんの早期診断に有用なマーカーの獲得が期待できると考え、本研究を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では検診などで膀胱がんを早期に検出可能な診断キットの開発を目的として、侵襲性のない検体である尿に着目し、尿中に存在する抗体群を解析することで、膀胱がん診断に有用なマーカー候補となる分子を獲得することを目標とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 膀胱がん患者尿中抗体の検出及び抗原の同定

膀胱がん患者尿を一次抗体に用いた二次元免疫プロット法により、膀胱がん細胞株由来のタンパク質に反応性を示す抗体が認識する抗原タンパク質を同定した。組織学的グレードの異なる 4 種の膀胱がん細胞株よりタンパク質を抽出し、それぞれを等量混合したタンパク質サンプルを二次元電気泳動法にて展開し、ゲルを 2 枚セットで作製した。1 枚はゲル中のタンパク質を PVDF 膜に転写し、免疫プロット用にした。もう 1 枚のゲルは CBB 染色を行った。免疫プロット法には 16 例の膀胱がん患者 (男性 13 名、女性 3 名、平均 74.8 歳) の尿を使用し、1 例ずつ反応させた。これらの尿中の抗体は Protein A カラムを用いて精製し、回収した後、一次抗体として二次元に展開したタンパク質を転写した PVDF 膜と反応させることで尿中抗体が認識する抗原タンパク質スポットを検出した。反応性が確認されたスポットは対応する同じタンパク質スポットを CBB 染色したゲルから切り出した後、トリプシンを用いたゲル内消化によりペプチド断片を回収後、質量分析装置を用いて抗原タンパク質を同定した。

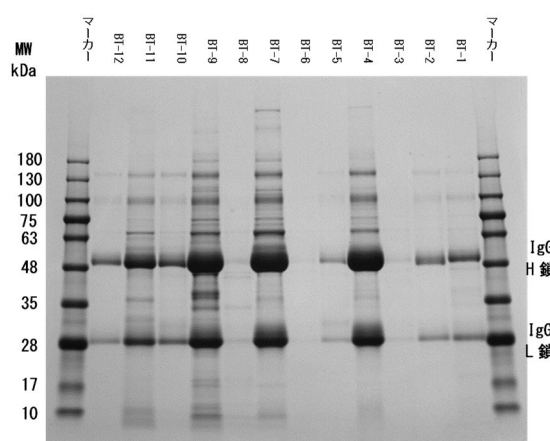


図 1. 膀胱がん患者尿中の抗体量の確認

BT-1~12 は膀胱がん患者の通し番号を表す。各レーン当たり 10 $\mu$ L 相当の尿を泳動した。患者によって尿に含まれる抗体量は様々であった。

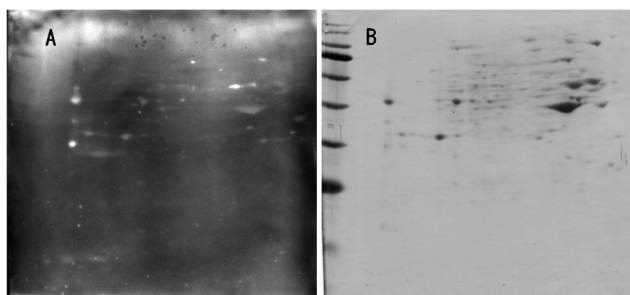


図 2. 膀胱がん患者尿中抗体を 1 次抗体に用いた二次元免疫プロット法

A: 膀胱がん患者尿中抗体を用いた二次元免疫プロット法における化学発光像

B: 化学発光後の PVDF 膜を CBB 染色した像

(2) 同定された尿中抗体の診断マーカーとしての評価

(1) で同定された候補となる抗原タンパク質のうち、多くの症例で共通の反応性を認められたものに着目し、抗原タンパク質を合成、あるいは購入し、多数の膀胱がん患者尿を一次抗体として用いたエバネッセント (EN) 法により、膀胱がんの診断マーカーとしての有用性を評価した。候補となる抗原タンパク質を合成し、それらに対する各尿中抗体量を測定するための EN 法を構築した。その後、膀胱がん患者尿と健常者尿、さらに非腫瘍性尿路系疾患患者尿 (尿路結石や膀胱炎など) を用いて、尿中抗体の反応特異性を評価することで膀胱がん診断マーカーとしての有用性を確認した。

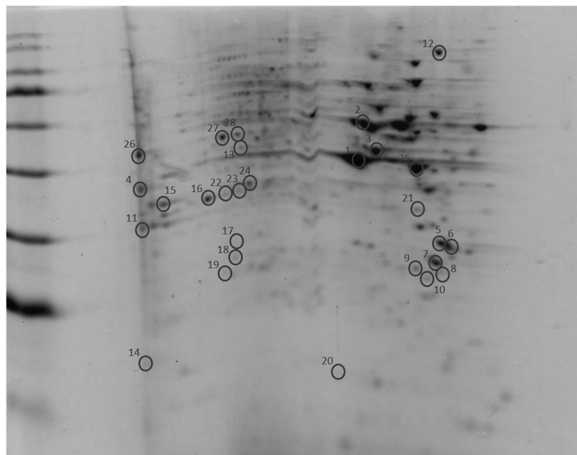


図3. 膀胱がん細胞株の二次元電気泳動像  
○は膀胱がん患者尿中抗体が認識した抗原タンパク質のスポットを示す。

#### 4. 研究成果

(1) 膀胱がん患者尿中抗体の精製方法の検討

膀胱がん患者尿を遠心し、0.2µm のフィルターで濾過後、限外濾過フィルターにより、抗体の濃縮及びリン酸緩衝液への置換を行った。その後、Protein A カラムを用いて抗体を精製した。図1に膀胱がん患者尿検体 10µL 相当から回収した抗体の電気泳動像を示す。膀胱がん患者尿中には患者によって様々な量の抗体が存在しており、以降の検討に十分な量が確保できることを確認した。

(2) 二次元免疫プロット法を用いた膀胱がん患者尿中抗体が認識する抗原タンパク質の検出

(1) で回収・精製した尿中抗体と膀胱がん細胞株由来のタンパク質との反応性を二次元免疫プロット法にて確認した。膀胱がん患者尿中には膀胱がん細胞株由来の腫瘍関連タンパク質に反応性を示す抗体が多数含まれていることが分かった (図2)。尿中抗体と反応した抗原タンパク質スポットの位置を CBB 染色したゲル上に番号で示した (図3)。また、抗原スポットとの反応性を示した膀胱がん患者検体との関係性を表1に示した。スポット No. 1, 14, 25, 26, 27 については検討に用いた膀胱がん患者の7割以上が反応性を示しており、膀胱がんの診断マーカーとして有望である可能性が示唆された。

(3) 尿中抗体が認識する抗原タンパク質の同定

膀胱がん患者尿中の自己抗体が認識する抗原タンパク質を同定するため、CBB 染色したゲルより、対応するスポットを切り出し、トリプシンを用いたゲル内消化後、質量分析装置を

表1. 膀胱がん患者尿中抗体と抗原タンパク質との反応性について  
膀胱がん患者 No.

Spot No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1																												
2																												
3																												
4																												
5																												
6																												
7																												
8																												
9																												
10																												
11																												
12																												
13																												
14																												
15																												
16																												
17																												
18																												
19																												
20																												
21																												
22																												
23																												
24																												
25																												
26																												
27																												
28																												

\* 灰色は尿中抗体が認識したタンパク質スポットを示す

表2. 膀胱がん患者尿中抗体が認識する抗原タンパク質の一覧

Accession	Gene symbol	Protein name	スポット No.
P60709	ACTB	Actin Beta	17,23,24,25
P68032	ACTC1	Actin Alpha Cardiac Muscle 1	17,23,24
P08670	VIM	Vimentin	18
P969P6	SCARF2	Scavenger Receptor Class F Member 2	13
Q96DT7	ZBTB10	Zinc Finger And BTB Domain Containing 10	26
Q6GV28	TMEM225	Transmembrane Protein 225	26
Q13114	TRAF3	TNF Receptor Associated Factor 3	1
Q8HC05	PREB	Prolactin Regulatory Element Binding	19
P40939	HADHA	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	17
P69905	HBA1	Hemoglobin Subunit Alpha 1	10
Q9Y6Z4	KIF25-AS1	KIF25 Antisense RNA 1	1
Q8NC01	CLEC1A	C-Type Lectin Domain Family 1 Member A	19
Q99871	HAUS7	HAUS Augmin Like Complex Subunit 7	23
Q8N8E2	ZNF513	Zinc Finger Protein 513	1
P05166	PCCB	Propionyl-CoA Carboxylase Subunit Beta	1
P47897	QARS	Glutamyl-tRNA Synthetase 1	19
Q6LMP2	DHRS11	Dehydrogenase/Reductase 11	19
Q6ZSS3	ZNF621	Zinc Finger Protein 621	10
P05129	PRKCG	Protein Kinase C Gamma	10
Q5TCY1	TUBK1	Tau Tubulin Kinase 1	1
Q9Y5V6	ST14	Suppression Of Tumorigenicity 14	19
Q75420	G1GYF1	GRB10 Interacting GYF Protein 1	26
Q51J48	CRB2	Crumbs Cell Polarity Complex Component 2	25
P42025	ACTR1B	Actin Related Protein 1B	17
Q04695	KRT17	Keratin 17	26
Q9H6S3	EPS8L2	EPS8 Like 2	20
P10911	MCF2	MCF.2 Cell Line Derived Transforming Sequence	5
Q16478	GR1K5	Glutamate Ionotropic Receptor Kainate Type Subunit 5	21
Q92614	MYO18A	Myosin XVIII A	24
Q69Y00	SPECC1L	Cytospin-A	15
A6H8Y1	BDP1	Transcription factor TFIIIB component B'' homolog	25
Q15042	U2SURP	U2 SnRNP Associated SURP Domain Containing	5
Q9Y6X9	MORC2	MORC Family CW-Type Zinc Finger 2	6
Q8N666	ADAMTSL1	ADAMTS Like 1	8
P62987	ADAMTSL3	ADAMTS Like 3	19
P30414	NKTR	Natural Killer Cell Triggering Receptor	25
Q96SN6	CDK5RAP2	CDK5 Regulatory Subunit Associated Protein 2	10
Q8TEM1	NUP210	Nucleoporin 210	6
P21359	NF1	Neurofibromin 1	18
MOR2J8	DCC1	Doublecortin Domain Containing 1	26

用いて、タンパク質の同定を行った。切り出したスポット No. と同定されたタンパク質の一覧を表 2 に示す。同定された分子の中には膀胱がんとの関連性が報告されている KRT17、TMEM225、HAUS7、NKTR などのタンパク質が同定されていた。これらの中で膀胱がん患者尿中抗体と高い反応性を示した（陽性率：75%）KRT17 に着目し、以降の検討を進めた。

#### （4）膀胱がん患者尿中抗体の測定法の構築

合成した KRT17 タンパク質、並びに購入した KRT17 タンパク質を抗原として用いた EN 法による膀胱がん患者尿中抗 KRT17 抗体の測定系の構築を試みた。EN 法に使用する KRT17 タンパク質濃度など、測定条件を検討した（図 4）。市販抗体での測定条件を決定した後、膀胱がん患者 48 例と非腫瘍性疾患患者尿として尿路結石患者 12 例を用いて EN 法にて尿中抗体量を測定した結果を図 5 に示す。膀胱がん患者と尿路結石患者との間に有意な差は認めなかった。反応性に差が認められなかった理由として、検討に用いた KRT17 タンパク質は合成タンパク質であり、生体内で起こる翻訳後修飾を受けていないことが原因であると推測される。以前、血中の抗 Gal-3 抗体（自己抗体）を測定する際、合成タンパク質と培養細胞から抽出した Gal-3 タンパク質を比較したところ、合成タンパク質には反応せず、培養細胞から抽出したタンパク質にのみ反応した経験がある（Yanagita *et al. Asian Pac J Cancer Prev* 2015,16:7959-65）。これらの自己抗体は Gal-3 に起こる何らかの翻訳後修飾を認識している可能性があり、修飾の無い合成 Gal-3 には反応しなかったことが考えられる。今回の尿中抗 KRT17 抗体も同様の現象が起きていることが推察され、今後、培養細胞から KRT17 タンパク質を抽出し、それを抗原として再度 EN 法による測定を行う必要がある。

本研究では膀胱がん患者尿中に膀胱がん細胞由来のタンパク質を認識する抗体が多数含まれていることを明らかにした。これらの尿中抗体が認識する抗原を同定した報告はあまりなく、新たな知見となる。また、同定されたタンパク質を認識する抗体の中には 7 割以上の患者で共通に認められる抗体も含まれていた。今後はこれらの抗体と抗原について詳細に解析することで、膀胱がん患者の新たな診断マーカーとしての実用化に向けた検討を継続して進めていく予定である。

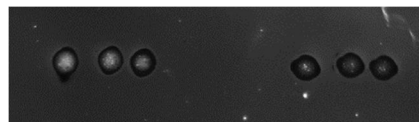


図 4. EN 法を用いた抗 KRT17 抗体測定  
左側：KRT17 含有スポット  
右側：KRT17 を非含有スポット

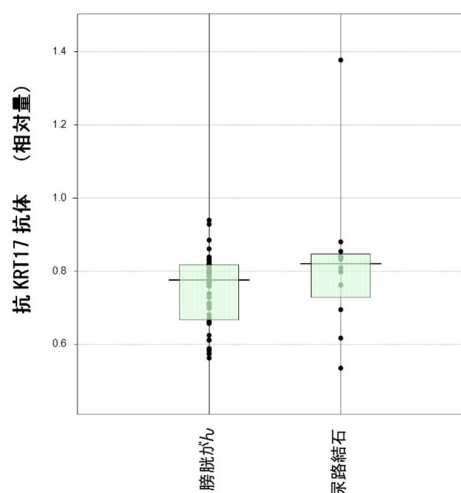


図 5. EN 法を用いた尿中 KRT17 抗体量の測定  
膀胱がん患者：48 例、尿路結石患者：12 例

## 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 6件）

1. 著者名 Hirano Shuhei, Matsumoto Kazumasa, Tanaka Kei, Amano Noriyuki, Koguchi Dai, Ikeda Masaomi, Shimizu Yuriko, Tsuchiya Benio, Nagashio Ryo, Sato Yuichi, Iwamura Masatsugu	4. 巻 14
2. 論文標題 DJ-1 Expression Might Serve as a Biologic Marker in Patients with Bladder Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2535 ~ 2535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14102535	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 Kuchitsu Y, Nagashio R, Igawa S, Kusahara S, Tsuchiya B, Ichinoe M, Satoh Y, Naoki K, Murakumo Y, Saegusa M, Sato Y.	4. 巻 41
2. 論文標題 TRAP1 is a predictive biomarker of platinum-based adjuvant chemotherapy benefits in patients with resected lung adenocarcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomed Res	6. 最初と最後の頁 53-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.41.53.	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 Nagashio Ryo	4. 巻 63
2. 論文標題 Acquisition of tumor marker candidate proteins using two-dimensional gel electrophoresis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Electrophoresis Letters	6. 最初と最後の頁 7 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2198/electroph.63.7	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長塩亮、朽津有紀、今井基貴、西原奈菜枝、田村慶介、松本和将
2. 発表標題 尿中抗体を利用した膀胱がん関連タンパク質の同定
3. 学会等名 第73回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朽津有紀、長塩亮、井川聡、土屋紅緒、佐藤雄一
2. 発表標題 肺腺癌におけるTRAP1の術後補助化学療法の治療効果予測マーカーとしての有用性評価
3. 学会等名 JPrOS/JES2019合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長塩亮
2. 発表標題 二次元電気泳動法を利用した腫瘍マーカーの獲得について
3. 学会等名 JPrOS/JES2019合同大会
4. 発表年 2019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	朽津 有紀  (Kuchitsu Yuki)  (70878272)	北里大学・医療衛生学部・助教    (32607)	

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
---------	---------