

機関番号：32607  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008 ～ 2010  
 課題番号：20591865  
 研究課題名(和文) プロテオーム解析により発見された膀胱癌新規腫瘍マーカーの臨床的有用性の検討  
 研究課題名(英文) Proteomic study of novel biomarkers for bladder cancer

研究代表者  
 馬場 志郎 (BABA SHIRO)  
 北里大学・医学部・教授  
 研究者番号：00051889

## 研究成果の概要(和文)：

現在膀胱癌の診断法における尿細胞診は進行性癌や低分化癌に対する検出率は良好であるが、表在性癌や高分化癌での有効性は満足のものではない。また診断や予後の判定可能な腫瘍マーカーがないため、治療効果判定、再発の予測が困難である。今回、我々が検討した SMC3 尿細胞診は従来の尿細胞診を超える有効性をもつ可能性があり、血清から同定されたペプチドは早期診断や治療効果判定を行える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Seven new biomarkers specific for bladder cancer were found, and the sensitivity was tested by immunohistochemistry. The diagnostic accuracy of conventional urine cytology can be increased by adding immunostaining of ant-SMC3.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：膀胱癌、プロテオミクス、腫瘍マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

膀胱癌の診断、治療効果判定に有用なマーカーは未だ発見されていない。従来の方法で解析不可能な血清中の微量なタンパク質、ペプチドに新たな可能性があると考えられた。血清中の組織由来の情報を含む数 mg/mL 以下の疾患関連ペプチドを探索するためには、濃度に応じた前処理法と精度の高い比較分析法が必要不可欠である。研究分担者の所属する研究室で新たな血清前処理法である Serum Fraction method (SF 法) とペプチド抽出法 (K 法) が開発され、上記の要求を満たすことが可能となった。また高分子プロテオ

ーム解析により、膀胱癌組織で発現が増加するタンパク質 7 種類が我々の研究で同定された。これにより組織と血清の 2 方向から膀胱癌新規腫瘍マーカータンパクを探索する基盤が整った。

## 2. 研究の目的

(1) 研究課題申請時、Agarose 2-dimensional electrophoresis (2-DE) の技術を基盤とした高分子プロテオミクスにより我々は膀胱癌新規腫瘍マーカー候補タンパク質を 10 種類同定し、更に膀胱癌組織と膀胱正常粘膜との発現量の差を Western blot 法による確認実験を行い 7 種類のタンパク質：Neuroblast

differentiation-associated protein (AHNAK)、Plectin1、Epiplakin、Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10 (EIF3)、Vigilin、Structural maintenance of chromosomes protein 3 (SMC3)、Ras GTPase-activating-like protein (IQGAP1)、について免疫化学染色によるさらなる検証を行うとともに、臨床適用の第一歩として尿細胞診に応用し、その有用性の有無を確認することを本研究の第一目的とする。

(2) 血清中の組織由来の情報を含む数 mg/mL 以下の疾患関連ペプチドを探索するためには、濃度に応じた前処理法と精度の高い比較分析法が必要不可欠である。特にペプチドにおいてはアルブミンなどのキャリアプロテインに結合した成分を効率よく抽出し、比較分析することが重要である。我々は 2007 年に上記の要求を満たすペプチド抽出法 (K 法) の開発に成功した。本研究はこの K 法を基盤とした高精度比較分析法により膀胱癌診断マーカー候補ペプチドを探索することを目的とし行った。

(3) SF 法とアガロース二次元電気泳動法 (2-DE) を組み合わせた分析法を用いて、膀胱癌の抗癌剤治療の効果判定に有効な血清中予後診断マーカーの探索を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 尿路上皮がん腫瘍マーカーの検索

##### ①膀胱癌患者尿中での存在量の確認

膀胱癌患者尿 (尿細胞診 Class V) 10 例と健常者尿 10 例での尿中タンパク存在量を比較した。尿は各 2m l ずつ使用した。尿の脱塩処理には、PD-10 カラム (GE Healthcare: Little Chalfont, UK) を使用し、限外濾過フィルター (Vivaspin 2: Vivascience, Hanover, Germany) を用いて濃縮したのち、尿 200  $\mu$  l 相当を用いて Western blot 法で比較検討を行った。

##### ②組織アレイを用いて免疫組織化学染色

Western blot 法により癌組織で有意に発現量の増加が確認された 7 種のタンパク質はヒト膀胱正常組織、同病変部組織アレイ (Folio Biosciences, Columbus, OH, USA) を用いて免疫組織化学染色による検討を行った。抗体が市販されていない Epiplakin、EIF-3、Vigilin については、理論的なアミノ酸配列をもとに作成した合成ペプチドからマウスポリクローン性抗体を作成した。

##### ③SMC3 の尿細胞診への応用

(A) SMC3 については免疫組織化学染色による初回検討においては癌と正常組織において発現に差は認められなかったが、免疫染色可能な別の抗 SMC3 抗体 (Abcam, Cambridge UK, : 1000) を用いて再検討を施行した。その結果、膀胱正常組織と比較し、膀胱癌組織に

おいては、有意に核が濃染し、また癌組織では一部細胞質にも SMC3 で染色される部位を認めた。臨床的応用の第一歩として尿細胞診に用いて、従来の Papanicolaou 染色尿細胞診と比較しその有用性について検討した。膀胱鏡検査によって、臨床的に膀胱癌 (Urothelial carcinoma) と診断され、その後、経尿道的膀胱腫瘍切除術を施行し病理学的に膀胱癌と確定診断された 50 例を対象とした。尿は膀胱鏡施行時に採取された洗浄尿を 2 本に分け染色し、尿細胞診は、class IV, V を陽性と判定し、SMC 尿細胞診は核の濃染を認めるものを陽性と判定した。さらに腫瘍の異型度、深達度による診断率についても検討した。

(B) (A) の結果より、少なくとも SMC3 尿細胞診は従来の尿細胞診と併用することで診断率の向上を期待できるものであった。そこで症例数を増やし、その有用性について更なる検討を予定した。最終的には 1000 症例での検討とするが、パイロットスタディとして 99 症例による検討を行った。対象は 2009 年 1 月から 2009 年 11 月までに膀胱鏡を施行した 99 例 (術前症例が 18 例、経尿道的膀胱腫瘍切除術後の経過観察症例が 71 例) で膀胱鏡施行時の洗浄細胞診にて比較検討した。膀胱鏡施行時に尿を 2 本採取し、Papanicolaou と SMC3 染色を施行した。SMC3 細胞診は、核の濃染しているものを positive と判定し、papanicolaou 染色による従来の尿細胞診は Class IV, V を positive と判定した。

##### (C)膀胱癌マーカー候補ペプチドの探索

膀胱癌マーカー候補ペプチドの探索には膀胱癌患者 20 名を 4 つのグループに分けて、5 名分の血清を混合したプール血清を手術前 4 試料、手術後 4 試料の計 8 試料を詳細に比較分析した。

#### (2) 抗癌剤治療の効果判定に有効な血清中予後診断マーカーの探索

膀胱癌化学療法 (メトトレキサート、ビンブラスチン、アドリアマイシン、シスプラチン併用療法) を施行した患者血清を使用した。同一患者の Partial Response (PR) が得られている時期に採取した血清 (A-1, B-1) と Progressive Disease (PD) と判定された時期に採取された血清 (A-2, B-2) を 2 例比較検討した。サンプルと採取、保存法については以下に記す。

##### ①ヒト血清サンプル

北里大学病院泌尿器科にて採取された血液を 2 時間室温で静置し、1000  $\times$  g で 20 分間、室温にて遠心後、上清 (血清) を回収し、使用するまで -80  $^{\circ}$  C で保存した。本研究で使用した患者 2 名 (患者 A、患者 B) の北里大学病院泌尿器科にてインフォーム

ドコンセントの元に採取されたものである。  
②比較解析とタンパク質同定のための一連の 2-DE 分析

SF 法を血清の前処理法としては用い、微量成分を高感度で比較分析し、抗癌剤治療関連タンパク質を同定する手順としては以下に記載する。

(A)患者 A, B の各 2 血清 (計 4 血清) の SF1, SF2, SF3 各 40・L 相当量を 2-DE 分離し、そのゲルを銀染色にて比較分析し、抗癌剤治療ともなつて患者 A, B で共通に変化するスポットを分析した (図 4)。

(B)患者 A の抗癌剤治療前・後の血清の SF1, SF2, SF3 各 120・L 相当量を 2-DE 分離し、SYPRO Ruby 染色した。そのゲル中のタンパク質を青色イルミネーターで検出し、①で探索した抗癌剤治療関連タンパク質のスポットを切り出し、ゲル内消化を施行した。

(C)消化ペプチドを質量分析計 LC-MS (LCQ-DECA, サーマファイッシャーサイエンティフィック社) にて分析し、各ペプチドの分子量とアミノ酸配列情報を MS/MS スペクトルにて取得した。その後、この情報をタンパク質同定用ソフトウェア MASCOT にてデータベースと照合し、タンパク質の同定を行った。データベースは Swiss Prot を使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 尿路上皮がん腫瘍マーカーの検索

① 7 種類のタンパク質のうち SMC3 のみが尿中で検出され、その存在量が増加している可能性が認められた。(図 1)

② Western blot 法で 7 種類のタンパク質が癌組織で有意にその発現量が増加が認められたが、免疫組織化学染色法において癌部で有意に発現が増加していたのはわずかに AHNAK の 1 種類だけであった。AHNAK は癌で有意に発現が増強し、その局在は細胞膜と細胞質でその発現が認められた。(図 2A, B) Plectin-1 の発現は、正常組織で主に細胞膜に認められるが、癌組織では細胞膜だけでなく細胞質にも発現が認められるようになるか、全く発現が認められなくなることが確認された。(図 2C) そして plectin-1 の発現の変化は癌の grade に相関し、grade 1 の 40%、grade 2 の 10%では、細胞質が均一に染色されるが、grade 3 では全く発現が認められなかった。

2つの確認実験の間に差が認められた原因は 2つ考えられる。第一に候補として検討したタンパク質は主に上皮組織に発現が認められるものであり、膀胱癌組織と正常組織では上皮組織の存在量に大きな差があった可能性があり、Western blot 法におけるタンパク質の発現量の差を正確に反映していなかった可能性が考えられた。第二に、実験当初、

免疫染色が可能な市販の抗体が存在しなかったことが理由としてあげられる。今回使用した多くの抗体は業者に委託して作成したものであり信憑性については疑問の残るところであった。しかし、現在では SMC3、AHNAK の免疫組織化学染色可能な抗体が各社より販売され始めており、また免疫組織化学染色可能な抗 Epiplakin 抗体を世界で唯一所有している大分大学皮膚科より分配して頂き、これら 3 種のタンパク質について膀胱癌、膀胱全摘症 100 例の組織アレイで再検討を開始している。SMC3 についてはヒト膀胱正常組織、同病変部組織アレイ (Folio Biosciences, Columbus, OH, USA) による再検討を施行し、膀胱正常組織と比較し、膀胱癌組織においては、有意に核が濃染し、また癌組織では一部細胞質にも SMC3 で染色される部位を認めた。(図 2 D)

③ (A)膀胱癌 50 例における尿細胞診、SMC3 尿細胞診の陽性率については表 1 に示す。Class II, III においても SMC3 尿細胞診では 50%以上診断可能であったが、Class IV, V において SMC 尿細胞診は 46.2%と陽性率は低下した。また尿細胞診、SMC3 尿細胞診のどちらか一方が陽性であったものは、全症例の 80.0%を占めた。次に表 2 に癌の Grade と T-stage 別の陽性率を示す。今回の検討では、癌の Grade、T-stage による尿細胞診、SMC3 尿細胞診の陽性率に有意差は認められなかった。以上より SMC3 尿細胞診単独では、従来の尿細胞診の診断率を越えることは出来ない。しかし尿細胞診 Class II, III 症例においても 50%以上診断可能であること、尿細胞診と SMC3 尿細胞診を併用することで 80%診断可能であることより、SMC3 尿細胞診の臨床的有用性が期待できる。今後、膀胱癌術後フォローアップ症例 1000 例における検討を予定する。

(B) 従来の尿細胞診で Class IV, V を示す 16 例において、膀胱鏡上明らかな腫瘍が認められた 12 症例では SMC3 細胞診陽性は 7 例、膀胱鏡上明らかな腫瘍が認められなかった 4 症例中 SMC3 陽性は 2 例であった。尿細胞診 Class II を示す 56 例において膀胱鏡上明らかな腫瘍が認められた 13 症例中、SMC3 陽性は 8 例認められた。膀胱鏡上明らかな腫瘍が認められなかった 43 例のうち SMC3 陽性は 6 例認められた。この 43 例のうち 6 ヶ月以内に明らかな腫瘍の再発や尿細胞診 class V を確認した症例は 6 例あり、そのうち初回の検査段階で SMC3 染色陽性は 3 例に認められた。尿細胞診 Class III を示す 27 例において、膀胱鏡上明らかな腫瘍性病変が認められたのは 6 例でそのうち SMC3 染色陽性は 3 例であった。また膀胱鏡上明らかな腫瘍性病変が認められなかった 21 例のうち SMC 染色陽性は 11 例であった。通常の尿細胞診で癌と診断でき

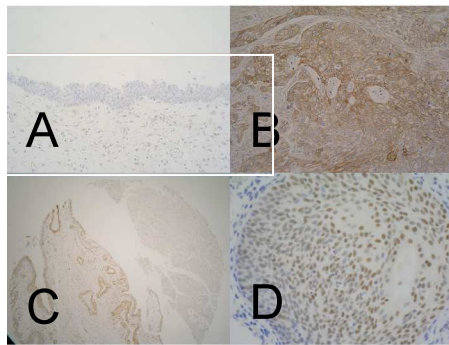
ないClass II、III症例においても、SMC3 染色では癌と診断できる可能性が本研究により示唆された。SMC3 染色陽性症例は再発をする傾向が認められるが、本研究はすべて膀胱癌術後フォロー症例のため、検査した時点でのSMC3 染色陽性症例が擬陽性であるかどうか判定することはできない。このため健常者のみならず、膀胱炎や結石などの炎症性疾患、癌以外の血尿を呈する疾患においても検討をすすめ判定基準を作成する必要があると考えられた。今後 1000 症例において検討し、SMC3 尿細胞診の感度・特異度を検討する予定であるが、現在までの成果を考慮する限り従来の尿細胞診を超える感度が得られる可能性が高く、膀胱癌診断としての有用性が期待できる。

図1 尿中 SMC3 の存在量比較 尿 200  $\mu$ L 相当



① 膀胱癌 尿細胞診 Class V ② 膀胱癌 尿細胞診 Class II ③ 健常者

図2 免疫組織化学染色



A: 膀胱正常粘膜 (AHNAK) B: 膀胱癌 (AHNAK)  
C: 右 膀胱正常粘膜 左 膀胱癌 (plectin-1) D: SMC3

表1 膀胱癌 50 症例 尿細胞診との比較

尿細胞診	Pts.	SMC3 Positive	SMC3 Positive %
Class II	16	9	56.3
Class III	8	4	50
Class IV, V	26	12	46.2
Total	50	25	50

表2 膀胱癌 50 症例 各陽性率と Grade, T stage

	Pts.	No. Pos (%)	
		尿細胞診	SMC3 尿細胞診
Total	50	26 (52%)	26 (52%)
Grade G1	8	2 (25%)	4 (50%)
G2	38	20 (52.6%)	20 (52.6%)
G3	4	4 (100%)	2 (50%)
T stage Tis	1	0 (0%)	1 (100%)
Ta	19	9 (47.4%)	8 (42.1%)
T1	24	12 (50%)	14 (58.3%)
$\geq$ T2	6	5 (83.3%)	3 (50%)

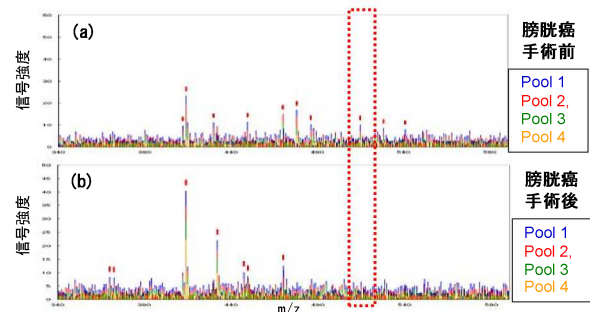
(2) 手術に伴って減少するペプチド3種類、増加するペプチド2種類の探索に成功した。膀胱癌診断マーカー候補ペプチドの分析結果の一部をそれぞれ図3に示す。今後このペプチドを同定し、多検体での検証を行う予定である。

図3. 膀胱癌診断マーカー候補ペプチドの観測例

膀胱癌患者20名の手術前、手術後血清を4グループに分けて作製した混合血清、手術前4試料 ((a):pool1~pool4)、手術後4試料 ((b):pool1~pool4) 中のペプチド成分をK法で抽出し、LC-MS分析したMSスペクトルの一部。横軸はm/z、縦軸は信号強度を示している。赤色の点線四角で示した部分に膀胱癌手術前に特異的なペプチドが観測されている。

(3) 2-DEにて比較解析を行った結果、患者A、Bで共通に変動したスポットの中から、13スポットと、さらに銀染色では増減は確認できなかったが、SYPRO Ruby染色で増減の確認できた2スポットの計15スポットについてタンパク質同定を施行し14スポットの同定に成功した(表3)。

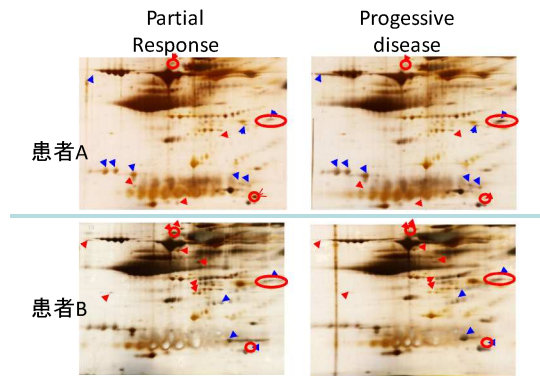
この同定できた中でC-reactive proteinとProtein Xに注目した。C-reactive proteinは体内の炎症に反応して増加するタンパク



質である。膀胱癌の放射線化学療法において、このタンパク質の血中濃度が5年生存率に相関するという報告があり、今回の結果では、SF1とSF2の両者において有意に減少を認めた。次にProtein Xは、SF1で増加、SF2で減少という結果が得られた。このようにSF1、SF2と分かれて抽出されたことより、翻訳後修飾等で2種類の状態で存在してい

ることが考えられる。Protein X と膀胱癌との関連性について現時点ではほとんど報告が無い。以上の結果より、C-reactive protein と Protein X については、膀胱癌の診断マーカーならびに抗癌剤の効果をモニターするマーカーとなりうる可能性があり、今後は多検体における検証を予定し、その有用性について検討する。

図 4 SF



患者 A, B を別々に評価して、PR 期と比較し PD 期に採取された血清で増加したスポットを赤矢印 (⇒) で、減少したスポットを青矢印 (⇐) で示す。その中で患者 A, B で共通して変動しているスポットを赤丸 (○) で囲んで示している。

表 3

Spot No.	同定タンパク名
1	Protein X (*このタンパク質は特許性があるため名前を伏せています)
2	Fibrinogen beta chain
3	C-reactive protein
4	Protein X
5	Apolipoprotein A-IV
6	Apolipoprotein A-IV
7	Apolipoprotein A-IV
8	C-reactive protein, Apolipoprotein A-I
9	Complement factor H
10	Ig gamma-1 chain C region
11	Prothrombin
12	Keratin, type II cytoskeletal 1
13	Haptoglobin
14	Complement factor B, Ig alpha-1 chain C region
15	同定不可

### 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 9 件)

- ① Minami S, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Kawashima Y, Yoshio K, Ishii J, Matsumoto K, Nagashio R, Okayasu I. Proteomic study of

sera from patients with bladder cancer - Usefulness of S100A8 and S100A9 proteins, Cancer Genomics Proteomics, 査読有、7 巻、2010、181-189

- ② 小寺義男, 大草 洋, 尿のプロテオーム解析法開発から診断マーカー獲得に向けて、日本腎臓学会誌、査読有、52 巻、2010、480-484

- ③ Novara G, Matsumoto K, Kassouf W, Walton TJ, Fritsche HM, Bastian PJ, Martínez-Salamanca JI, Seitz C, Lemberger RJ, Burger M, El-Hakim A, Baba S, Martignoni G, Gupta A, Karakiewicz PI, Ficarra V, Shariat SF., Prognostic Role of Lymphovascular Invasion in Patients with Urothelial Carcinoma of the Upper Urinary Tract: An International Validation Study, EUROPEAN UROLOGY, 査読有、57 巻、2010、1064-1071

- ④ Kazumasa Matsumoto, Shiro Baba, Loss expression of uroplakin III is associated with clinicopathologic features of aggressive bladder cancer, UROLOGY, 査読有、72 巻、2009、444-449

- ⑤ Li L, Tabata K, Thompson TC, Caveolin-1 promotes autoregulatory, Akt-mediated induction of cancer-promoting growth factors in prostate cancer cells, Mol Cancer Res, 査読有、7 巻、2009、1781-1791

- ⑥ Matsumoto K, Irie A, Satoh T, Iwamura M, Baba S, Current gene therapy for bladder cancer. New Gene Therapy and Cancer Research Inc, 査読有、2008、183-204

- ⑦ Matsumoto K, Satoh T, Irie A, Ishii J, Kuwao S, Iwamura M, Baba S, Loss expression of uroplakin III is associated with clinicopathologic features of aggressive bladder cancer, UROLOGY, 査読有、72 巻、2008、440-449

- ⑧ Oh-Ishi M, Kodera Y, Furudate S, Maeda T, Disease proteomics of endocrine disorders revealed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, Proteomics Clin Appl, 査読有、2 巻、2008、327-337

- ⑨ Okusa H, Kodera Y, Oh-Ishi M, Minamida S, Tsuchida M, Kavoussi N, Matsumoto K, Sato T, Iwamura M, Maeda T, Baba S, Searching for new biomarkers of bladder cancer based on proteomic analysis, Journal of electrophoresis, 査読有、52 巻 2008、19-24

[学会発表] (計6件)

- ① 大草 洋、藤城貴教、杉田 敦、前山良太、後藤弘江、佐藤瑞穂、高野靖悟：当院における経尿道的膀胱腫瘍切除術クリニカルパスの有用性の検討。第11回日本クリニカルパス学会，2010.12.3、松山
- ② 大草 洋、松本和将、服部 学、小寺義男、佐藤江梨奈、南田 諭、佐藤威文、前田忠計、馬場志郎：Structural maintenance of Chromosomes 3の膀胱癌新規腫瘍マーカーとしての有用性の検討。第75回日本泌尿器科学会東部総会，2010.9.16、宇都宮
- ③ 松本和将、PROTEOMIC RESEARCH FOR DIAGNOSTIC MARKERS: INCREASED EXPRESSION OF S100A8/9 IS ASSOCIATED WITH DISEASE PROGRESSION AND CANCER-SPECIFIC SURVIVAL IN BLADDER CANCER、Annual Meeting American Urological Association、2010.5.30、San Francisco, USA
- ④ 大草 洋、松本和将、服部 学、小寺義男、南田 諭、大橋和也、川島 佑介、佐藤絵梨奈、藤田哲夫、岩村正嗣、大石正道、前田忠計、馬場志郎：Structural maintenance of Chromosomes 3の膀胱癌腫瘍マーカーとしての有用性の検討。第98回日本泌尿器科学会総会，2010.4.30、盛岡
- ⑤ 馬場志郎、前立腺がん治療とLUTS、第74回日本泌尿器科学会東部総会、2009.10.29、長野県松本文化会館(長野)
- ⑥ 馬場志郎、岩村正嗣、DPCからみた代表的な入院泌尿器科手術の医療経済解析、第22回日本Endourology・ESWL学会総会、2008.11.11、大阪

[図書] (計2件)

- ① 馬場志郎、医学書院、今日の治療指針2010年版、2010、917-918
- ② 松本和将、岩村正嗣、馬場志郎、株式会社メジカルビュー社、腎細胞癌および上部尿路癌の手術 新 Urologic Surgery シリーズ3、2009、167-173

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称：体液試料における、低分子量タンパク質及びペプチドの濃縮方法  
発明者：小寺義男，前田忠計，川島祐介  
権利者：学校法人北里研究所  
種類：特許  
番号：特許第4571228号

取得年月日：平成22年8月20日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 志郎 (BABA SHIRO)  
北里大学・医学部・教授  
研究者番号：00051889

(2) 研究分担者

津村 秀康 (TUMURA HIDEYASU)  
北里大学・医学部・助教  
研究者番号：20348569  
松本 和将 (MATSUMOTO KAZUMASA)  
北里大学・医学部・講師  
研究者番号：70306603  
田畑 健一 (TABATA KENICHI)  
北里大学・医学部・助教  
研究者番号：20327414  
小寺義男 (KODERA YOSHIO)  
北里大学・理学部・准教授  
研究者番号：60265733  
前田 忠計 (MAEDA TADAKAZU)  
北里大学・理学部・教授  
研究者番号：90265728  
大草 洋 (OKUSA HIROSHI)  
北里大学・医学部・助教  
研究者番号：70337963