

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 17 日現在

機関番号： 18001  
 研究種目： 基盤研究（C）  
 研究期間： 2009～2011  
 課題番号： 21592051  
 研究課題名（和文）尿路上皮癌患者尿のモノクローナル抗体 RM2 へ反応する糖蛋白の解析と臨床意義  
 研究課題名（英文）The analysis of glycoprotein react to the monoclonal antibody RM2 in urine of urothelial carcinoma cases.  
 研究代表者  
 松村 英理（MATSUMURA EIRI）  
 琉球大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号： 30457676

## 研究成果の概要（和文）

我々は、モノクローナル抗体RM2と膀胱癌患者の尿を用いて、より悪性度の高い膀胱癌を検出できる新規尿中マーカーの探索を目指した。ウエスタンブロッティング法により、75～80kDaの尿中糖蛋白が膀胱癌患者尿から検出され、悪性度が高い症例ほど反応が強い傾向を認めた。この尿中糖蛋白の解析を行い、ある尿中80kDa糖蛋白が悪性度に比例して増加することが確認できた。しかし、リアルタイムPCRを用いて、膀胱癌細胞株および正常膀胱尿路上皮細胞株におけるこの糖蛋白のmRNAの発現の強さをみると、正常膀胱尿路上皮細胞株＞低悪性度膀胱癌細胞株＞高悪性度膀胱癌細胞株の順であった。この結果は、尿中における悪性度を反映した発現結果と矛盾してみえるため、何故そのようになったのか、現在検討中である。

## 研究成果の概要（英文）

We tried to find a new urinary marker that can detect a high grade urothelial cancer before progression to muscle invasion bladder cancer, using a monoclonal Ab RM2 defining a specific glycan. Western blot analysis was performed using urine of the patients with bladder cancer, mAb RM2 reacted to 80kDa~75kDa glycoproteins in the urine. Tumor grade and pathological stage was more advanced in the group with the higher level of RM2 expression. Proteomics analysis was conducted on the glycoproteins mAb RM2 reacted, and several glycoproteins were found as candidates for a new urinary marker. Out of the candidate glycoproteins, staining intensity of 80kDa by a certain antibody correlated with the grade of bladder cancer. However, the real-time PCR revealed that mRNA level of 80kDa glycoprotein was higher in the order of normal urothelial cell line, low-grade urothelial cancer cell line and high-grade urothelial cancer cell line. The results of PCR seem to be inconsistent with those of the urinary levels of this glycoprotein reflecting the nuclear grade of urothelial carcinoma. Now we are undertaking why these contradictory results occur.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、癌の糖鎖研究の過程で、糖鎖 **GalNacDSLc4** を認識するモノクローナル抗体 **RM2** が、前立腺癌由来の糖蛋白である **haptoglobin-beta** 鎖に選択的に反応すること、**RM2** が認識する **haptoglobin-beta** 鎖は前立腺癌の新たな組織ならびに血清マーカーであることを報告した (Saito S, et al: *Int J Cancer* 115: 105, 2005; *Int J Cancer* 123: 633, 2008)。近年、種々の癌 (乳癌、卵巣癌、膵癌、肝癌、大腸癌、腎癌、小細胞肺癌など) で、**haptoglobin-alpha** 鎖や **beta** 鎖が量的に上昇していることが、市販の抗体 (癌由来の **haptoglobin** に対する選択性がない) を用いて報告されていることから、**haptoglobin** 構成分子 (**alpha** 鎖や **beta** 鎖) は、汎腫瘍マーカーとしての可能性を有しているといわれている。これらの報告は、ある特定の糖鎖がある種の癌に存在する糖蛋白に発現すれば、そのような特定の糖鎖を探索することで新しい腫瘍マーカーを見つげられる可能性を示唆する。

一方、現在の膀胱癌の診療では、尿細胞診が **95%** という高い特異度を持つものの、感度が **40%** 以下と低いことが難点である。つまり尿細胞診の感度が非常に低いため、癌の診断が遅れる可能性や侵襲的な検査である膀胱鏡を診断のために施行しなくてはならないといった問題があることから、膀胱癌における新しい尿中マーカーが早急に必要な状況である。さらに、肉眼的血尿を主訴に来院される症例の約 **30%** が、診断の時点ですでに **5年** 生存率が **50%** しかない、筋層浸潤性膀胱癌の状態である。そこで我々は、膀胱癌患者尿中で、特定の糖鎖を認識するモノクローナル抗体 **RM2** を利用して、特定の糖鎖を発現する糖蛋白 (マーカー) の探索を試みた。目的とするのは、筋層浸潤性膀胱癌へ進行する前に、悪性度の高い尿路上皮癌を検出できるような新規尿中マーカーの発見である。

## 2. 研究の目的

目的は、モノクローナル抗体 **RM2** が反応する糖蛋白が、特に悪性度の高い膀胱癌を、無症候性血

尿で発見されるより前に、より早期癌の状態で見出す能力を有するか否かを調べ、最終的には新しい膀胱癌の尿中マーカーとなり得るかを検討することである。

## 3. 研究の方法

1) 約 **50** 症例の膀胱癌患者を対象として、**RM2** 抗体と膀胱癌患者の尿中 **75~80kDa** 糖蛋白への反応をウエスタンブロッティング法で調べる。

2) 上記 1) で得られた反応レベルと臨床病理学的パラメーターとの相関を解析し、悪性度との関連があるか否かを調査する。

3) **RM2** 抗体と反応する尿中 **75~80kDa** 糖蛋白の分析を行い蛋白の同定を行う。

4) この尿中 **75~80kDa** 糖蛋白の、膀胱癌組織内での存在の有無、膀胱癌細胞内の増殖・浸潤等の悪性形質における役割を解析する。

5) 実用的な尿中マーカーとして、スポット尿による簡易アッセイ系のプロトタイプ (試験紙法など) の作成を試み、感度、特異度を調査する。最終的には、特に悪性度の高い癌を筋層浸潤する以前の段階で検出できるか否か、尿細胞診と比較して癌細胞の検出率に優れるか否かを調査する。

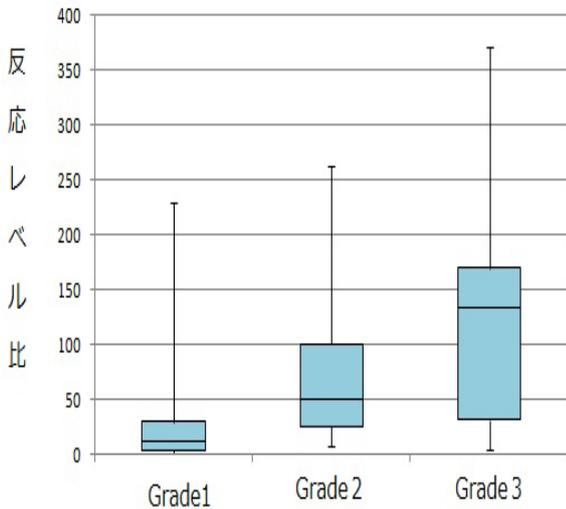
## 4. 研究成果

1) 約 **50** 例の膀胱癌患者を対象として、モノクローナル抗体 **RM2** による尿中糖蛋白の検出をウエスタンブロッティング法で行ったところ、悪性度の高い膀胱癌患者では、**75~80kDa** 前後の糖蛋白の検出が認められ、その反応の強さは悪性度が高いほど強い傾向があると判明した。

2)、3) 上記 1) で特に反応が強いサンプルを用いて尿中 **75~80kDa** 糖蛋白を質量分析し、数種類の糖蛋白へ絞りこんだ。この数種類の糖蛋白に対する抗体と膀胱癌患者尿でウエスタンブロッティングを施行した。すると 1 つの抗体において、悪性度の高い膀胱癌患者ほど、尿中の **80kDa** 糖蛋白が増加することが、ウエスタンブロッティング法で確認された。この抗体を使用し、72 症例の膀胱癌患者尿とウエスタンブロッティングによる反応レベルを比較した。すると癌の悪性度が

高いほど反応レベルが高くなる傾向が確認できた。  
(図1)

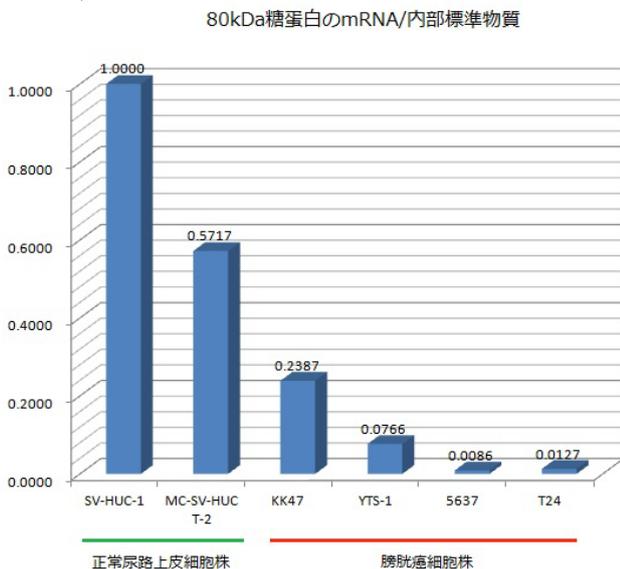
<図1> 膀胱癌の各悪性度(Grade)における  
尿中80kDa糖蛋白の反応レベル



4) 尿中80kDa糖蛋白に対する抗体と膀胱癌組織を用いて、免疫組織化学染色を行ったところ、膀胱癌組織内でも反応を認めた。

一方、リアルタイムPCRを用いて、膀胱癌細胞株(KK47, YTS-1, 5637, T24)と正常尿路上皮細胞株(SV-HUC-1MC-SV-HUC)における80kDa糖蛋白のmRNAの発現を確認した。すると、正常尿路上皮細胞株が最も発現が強く、ついで低悪性度膀胱癌細胞株(KK47)と続き、最も発現が弱いのが高悪性度膀胱癌細胞株(YTS-1, 5637, T24)であった。(図2)

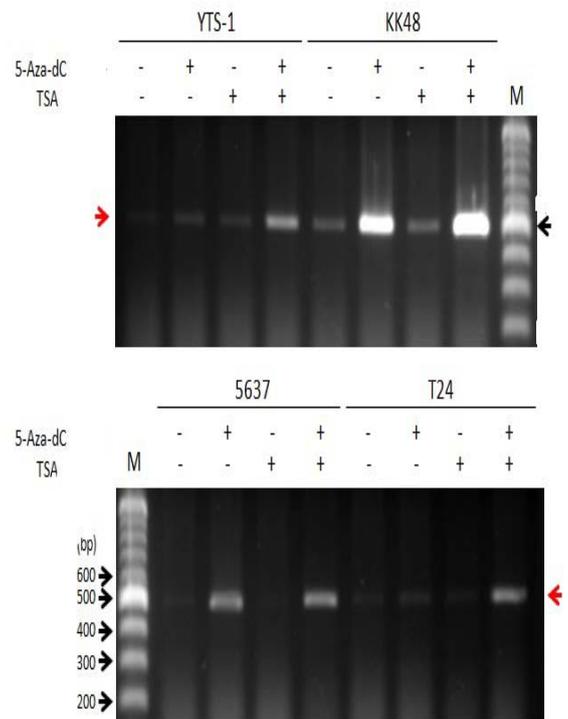
<図2> 各細胞株における80kDa糖蛋白のmRNA発現



この結果は、尿中における悪性度を反映した発現結果と矛盾してみえるため、何故そのようになったのか、現在検討中である。

その検討の一環として、膀胱癌細胞株(YTS-1, 5637, T24, KK47)にDNAメチル化阻害薬(5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dc), TSA)を加えて、細胞株を培養し、mRNAを抽出、cDNAを作成した後、80kDa糖蛋白の発現を確認したところ、4種類の膀胱癌細胞株すべてにおいて、80kDa糖蛋白の発現が回復した。(図3)

<図3> 各膀胱癌細胞株とDNAメチル化阻害薬の有無による80kDa糖蛋白発現の違い (M= marker)



この結果は、膀胱癌細胞株における80kDa糖蛋白の発現が、DNAのメチル化で阻害されていたことを示唆しており、膀胱癌細胞株において80kDa糖蛋白が、癌の発現を抑制する方向で作用している可能性がある。今後、膀胱癌組織を用いて、さらなる検討を予定している。

5) 実用的な尿中マーカーとして、スポット尿による簡易アッセイ系のプロトタイプ(試験紙法など)

の作成は現在検討段階である。

(3)連携研究者：なし

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

①松村英理 2009年5月30日「尿路上皮癌に関する新規臨床研究について」日本泌尿器科学会沖縄地方会 沖縄 沖縄ロイヤルオリオン

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松村 英理 (MATSUMURA EIRI)  
琉球大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：30457676

### (2)研究分担者

斎藤 誠一 (Saito Seiichi)  
琉球大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：80235043

大城 吉則 (Oshiro Yoshinori)  
琉球大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：10233107

町田 典子 (Machida Noriko)  
琉球大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：70448588