

## 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 25 年 05 月 13 日現在

機関番号：12501  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590518  
 研究課題名 新規腫瘍マーカー：クラスリン重鎖の、各種がん組織診断および血清診断への応用  
 研究課題名 Evaluation of Clathrin Heavy Chain (new tumor marker) for diagnosis in various cancer  
 研究代表者 清宮 正徳 (SEIMIYA MASANORI)  
 (千葉大学・医学部附属病院・主任臨床検査技師)  
 研究者番号：20554265

## 研究成果の概要（和文）

:各種がん組織についてクラスリン重鎖(CHC)の免疫組織化学染色を行ってCHCの蛋白量を確認した結果、多くのがん種においてCHC蛋白量が増加していることが確認された。そして診断が難しい食道上皮内腫瘍組織において、非がん部に比べてがん部でCHCが明瞭に濃染された。したがってCHCの免疫組織化学染色は食道上皮内腫瘍の病理組織診断に有用であることが示唆された。さらに、原発性肝細胞がん患者血清において抗CHC抗体が多く存在することが確認され、新たな腫瘍マーカーとしての可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）

: We investigated the usefulness of immunohistochemical staining of CHC for the histological diagnosis of various cancer tissues. Since an apparent difference was noted in CHC expression between cancerous and non-cancerous regions of esophageal cancer, we investigated the usefulness for the histopathological diagnosis of esophageal cancer. As a result, we found that CHC was significantly more strongly expressed in the cytoplasm of malignant lesions, than in that of normal tissue or benign lesions. Moreover, we thought the serum autoantibodies of CHC will be detectable in HCC patients. Serum levels of anti-CHC antibodies were significantly elevated in HCC patients compared to those in liver cirrhosis patients.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012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：病態検査学

キーワード：悪性腫瘍、病理組織診断、クラスリン重鎖、免疫組織化学染色

## 1. 研究開始当初の背景

がんの早期発見は患者の予後や治療成績の向上に重要である。しかし現在使用されている腫瘍マーカーのみによる早期診断は多くのがんで困難であり、有用な腫瘍マーカーの開発が望まれている。一方病理学的診断においても、細胞の異型度や良悪性を客観的に評価し定量化できる分子マーカーはほとんどない。したがって細胞の異型度を蛋白等の発現程度で評価することができれば、病理組織診断の正確性に寄与することが期待できる。このような新たな腫瘍マーカーの発見を目指し、我々は原発性肝細胞がん(HCC)の組織中に含まれる蛋白の網羅的な解析(プロテオーム解析)を行った。そしてがん組織と非がん組織間において発現量に差のある蛋白質を83種類同定した。これらの蛋白の機能やがん関連報告の有無について文献調査を行い、がんの発がんや進展にとって興味深い蛋白について更なる検討を行った結果、クラスリン重鎖(CHC)が非がん部に比べがん部で発現が極端に強くなることが確認された。さらにHCCおよび早期肝細胞がんの組織を対象にCHCの免疫組織化学染色を行った結果、がん部の細胞質が非がん部の細胞質に比較して明らかに強く染色された。したがってCHCは従来より鑑別が困難であったHCC、特に早期肝細胞がんの病理組織診断(がん部・非がん部の判別)に有用であった。

CHCは細胞のエンドサイトーシス(高分子物質等の取り込み)に関与しているとともに、細胞膜に発現する種々の抗原蛋白質の細胞内への取り込みに関わり宿主の免疫応答に関与していること、約5%が核内に存在し姉妹染色体均等分配に必須な紡錘体微小管の安定性に関与すること、そして核内でがん抑制蛋白質であるp53と結合し、p53の転写活性を増強することが報告される等、発がんやがんの進展にとって興味深い知見が得られている。さらにCHCは全身のほとんどの細胞の発育に必須の蛋白である。したがってHCCのみならず、他の組織のがんにおいて強く発現している可能性がある。すなわち、CHCの免疫組織化学染色はHCC以外の他のがんの病理組織診断においても有用である可能性がある。

そこで、予備実験としてHCC以外のがん組織中のCHCの発現を免疫組織化学染色によって検討した。その結果、肺がん、食道がん、口腔がんについては、非がん部に対しがん部で強く染色され、病理組織診断に有用である可能性が示唆された。さらに、HCC組織標本のCHCの染色強度はHCCの分化度との相関性が認められた。

その一方で、CHCががん部で非常に強く発現していることはCHCあるいはその分解産物

や抗CHC抗体が血液や尿等の体液中に流出している可能性を示唆しており、このCHCの分解産物や反応物を体液中に検出することができれば、新たな腫瘍マーカーとなりうる可能性がある。さらにCHCはHCCの早期の段階(早期肝細胞がん)から発現が高くなったことから、早期がん診断への応用も期待できる。

## 2. 研究の目的

HCCを始めとする多種類のがんにおける、CHCの病理組織診断マーカーとしての有用性を評価すること、そして体液(血清、尿、穿刺液)中のCHCまたは抗CHC抗体の簡便かつ安価な検出法を確立し、腫瘍マーカーとしての有用性を評価することを目的とする。さらにHCCを始めとする他臓器のがんの早期診断および分子標的治療へ寄与することを最終的な目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) CHCの病理組織診断マーカーとしての確立および評価

多くのがん種についてCHCの免疫組織化学染色を行い、病理組織診断に有用である可能性がある組織の検索を行う。組織は、肺がん、食道がん、舌がんに加え、胃がん、大腸がん、直腸がん、膀胱がん、尿管がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、皮膚がん、甲状腺がん等について行う。各疾患のがん部・非がん部のパラフィン包埋標本について、抗CHC抗体およびEnvision+免疫組織化学染色システムを用いてCHCを染色する。得られた染色標本の病理組織診断マーカーとしての可能性を、複数の病理医とともに評価する。

がん部および非がん部間に明瞭な染色性の違いが認められた組織については、多数症例について更なる検討を加える。また入手可能な組織マイクロアレイを試料とした検討も行い、最終的に100症例以上について評価する。その際、当該組織の早期がんや炎症など、がんとの鑑別診断が困難な症例についても積極的に検討し、病理組織診断マーカーとしての性能および有用性を評価する。

### (2) CHCの体液腫瘍マーカーとしての確立および評価

CHCの抗原認識部位の異なる抗体を入手し、HCC患者の血清または尿を試料として、ウエスタンブロット法および酵素免疫学的測定法(ELISA)による検出を試みる。ウエスタンブロットにより血清や尿から直接CHCに相当するバンドが検出できない場合は、HPLC法によって試料中のアルブミンやグロブリン等のメジャー蛋白質を除き、CHC等のメジャー蛋白以外の蛋白を濃縮後、検出する。同様

に複数の抗体を組み合わせた簡易 ELISA 法により、CHC の検出を行う。両法において発現の定量が可能となるような抗体濃度や試料の前処理等の諸条件について検討し、体液中 CHC の検出・定量法を確立する。また同様の ELISA 法を応用して体液中に存在する抗 CHC 抗体の検出を行う。

#### 4. 研究成果

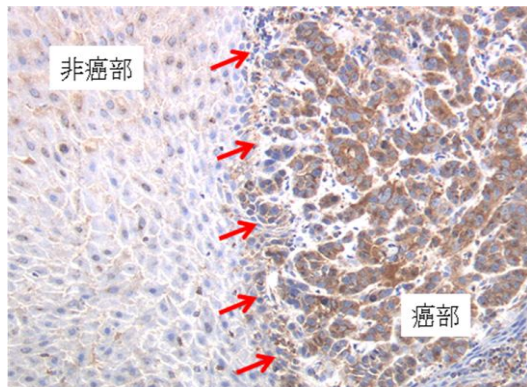
##### (1) CHC の病理組織診断マーカーとしての確立および評価

###### ①組織マイクロアレイを用いた各種がん組織における CHC の染色性

：多くのがん細胞の細胞質において CHC の強い発現が認められた。中でも、頭頸部がん、食道がん、肺がん、乳がん、膀胱がん、卵巣がん、甲状腺がんなどで、がん部と非がん部の間に明瞭な染色性の違いが認められた。

###### ②当院において切除された進行がん切除標本における CHC の染色性

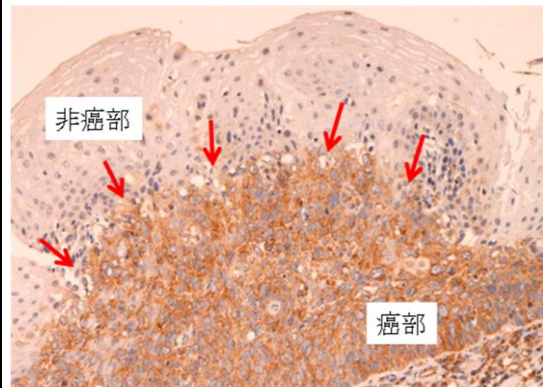
：多くのがん腫のうち、特に食道がん、肺がん、舌がん、前立腺がんなどの進行がん組織において、非がん部に比べがん部で CHC 蛋白量が顕著に多いことが確認され、がん部と非がん部の境界部分は明瞭な色の差となって現れた（下写真は舌がんの例、赤矢印はがん部と非がん部の境目を示す）。



###### ③食道粘膜内腫瘍における CHC の蛋白量

：多数症例での CHC 蛋白量の傾向を確認するため、Tissue Array を用いて検討した。その結果、食道がん 319 症例中 175 症例 (54.9%) において、CHC が強く染色された。次に、当院において内視鏡により切除された食道の上皮内腫瘍における CHC の染色性を確認した。その結果、食道の炎症および良性腫瘍組織の染色性に比べ、食道の早期がんに対応する高異型度上皮内腫瘍および上皮内悪性腫瘍において、CHC が強く発現していることが確認され、そしてがん部と非がん部の間に明瞭な染色性の違いが認められた（赤矢

印はがん部と非がん部の境目を示す）。

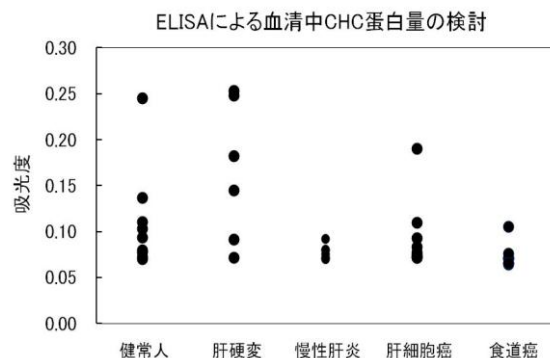


④食道粘膜内腫瘍における CHC 免疫組織染色の有用性と既存腫瘍マーカーとの比較：現在食道上皮内腫瘍における診断の困難な症例については p53 蛋白や ki67 蛋白の免疫組織化学染色が実施されることがある。これらの蛋白と CHC を比較した結果、CHC の感度・特異度 75%・95% に対し p53 は 43%・98%、そして Ki67 は 68%・100% であり、CHC は既存のマーカーと同等以上の成績であった。さらにこれらのマーカーを組み合わせると、感度・特異度 90%・95% となり、これらの蛋白の染色が食道上皮内腫瘍の病理組織診断に有用であることが示唆された。

##### (2) CHC の体液腫瘍マーカーとしての確立および評価

###### ①血清中 CHC 蛋白量の検出

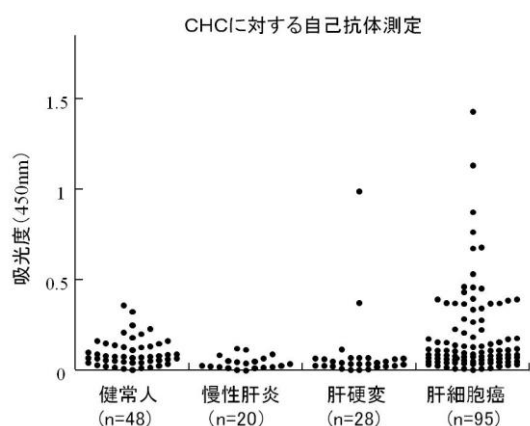
酵素免疫学的定量法 (ELISA) を開発して血清中 CHC 蛋白量を測定した。健常人および、肝硬変、慢性肝炎、肝細胞がん、食道がんの各患者血清それぞれ 5-10 症例について検討したが、健常人と各疾患群の間に有意な差は認められなかった。



###### ②血清中抗 CHC 抗体の検出

同様に ELISA を開発して血清中抗 CHC 抗体量を測定した。その結果、健常人および慢性肝炎、肝硬変患者に対し、肝細胞がん患者血清において有意に高い傾向が認められた。したがって抗 CHC 抗体は原発性肝細胞がん診断

のための新たな腫瘍マーカーとして有用である可能性が示唆された。



以上の成果より、CHCの免疫組織化学染色および血中の抗CHC抗体の測定は新たな腫瘍マーカーとして使用できる可能性があるとともに、がんの早期発見・治療に貢献できる可能性が示唆された。さらに、今後CHCがなぜ多くのがんで強く発現しているのかを調査することで、がんの進展やメカニズムの解明につながる可能性があると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

① Seimiya M, Ohno S, Yamamoto H, Fujiwara K, Yoshida T, Sawabe Y, Sogawa K, Matsushita K, Yokosuka O, Nomura F, Child-pugh score is altered by the albumin measurement method, *Hepatology*, 2013 May;57(5):2093-4. doi: 10.1002/hep.25972. Epub 2012 Sep 24.

② Sogawa K, Noda K, Umemura H, Seimiya M, Kuga T, Tomonaga T, Nishimura M, Kanai F, Imazeki F, Takizawa H, Yoneda M, Nakajima A, Tsutsumi M, Yokosuka O, Nomura F, Serum fibrinogen alpha C-chain 5.9 kDa fragment (FIC 5.9) as a biomarker for early detection of hepatic fibrosis related to hepatitis C virus, *Proteomics Clin Appl*, in press. doi: 10.1002/prca.201200094.

③ Mochizuki A, Kodera Y, Saito T, Satoh M, Sogawa K, Nishimura M, Seimiya M, Kubota M, Nomura F, Preanalytical evaluation of serum 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 measurements using LC-MS/MS, *Clin Chim Acta*, in press doi:pil: S0009-8981(12)00508-6. 10.1016/j.cca.2012.10.041.

④ Suzuki Y, Matsushita K, Seimiya M,

Yoshida T, Sawabe Y, Ogawa M, Nomura F. Serum cystatin C as a marker for early detection of chronic kidney disease and grade 2 nephropathy in Japanese patients with type 2 diabetes, *Clin Chem Lab Med*. 2012 Oct 1;50(10):1833-9. doi: 10.1515/cclm-2011-0777.

⑤ Yamada M, Satoh M, Seimiya M, Sogawa K, Itoga S, Tomonaga T, Nomura F. Combined proteomic analysis of liver tissue and serum in chronically alcohol-fed rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2013 Jan;37 Suppl 1:E79-87. doi: 10.1111/j.1530-0277.2012.01883.x.

⑥ Nomura F, Sogawa K, Noda K, Seimiya M, Matsushita K, Miura T, Tomonaga T, Yoshitomi H, Imazeki F, Takizawa H, Mogushi K, Miyazaki M, Yokosuka O, Serum anti-Ku86 is a potential biomarker for early detection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma, *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 May 18;421(4):837-43 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.099.

⑦ Nishimura M, Yamamoto H, Yoshida T, Seimiya M, Sawabe Y, Matsushita K, Umemura H, Sogawa K, Takizawa H, Yokosuka O, Nomura F, Decreases in the serum VLDL-TG/non-VLDL-TG ratio from early stages of chronic hepatitis C: alterations in TG-rich lipoprotein levels, *PLoS One*. 2011 Feb 25;6(2):e17309 doi: 10.1371/journal.pone.0017309.

⑧ Seimiya M, Yoshida T, Sawabe Y, Sogawa K, Umemura H, Matsushita K, Nomura F, Reducing the incidence of pseudohyperkalemia by avoiding making a fist during phlebotomy: a quality improvement report, *Am J Kidney Dis*. 2010 Oct;56(4):686-92. doi: 10.1053/j.ajkd.2010.06.014.

⑨ Sato K, Seimiya M, Kodera Y, Kitamura A, Nomura F, Application of Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy for simple and easy determination of chylomicron-triglyceride and very low density lipoprotein-triglyceride, *Clin Chim Acta*. 2010 Feb;411(3-4):285-90. doi: 10.1016/j.cca.2009.11.026.

〔学会発表〕(計2件)

① Seimiya M, Tokita K, Matsushita K, Tomonaga T, Onodera K, Ohki S, Tanizawa T,

Shimada H, Uesato M, Matsubara H, Nakatani Y, Nomura F, Roles of Clathrin Heavy Chain Immunohistochemistry for Esophageal Squamous Intraepithelial Neoplasia - Observations Originated from Proteomic Studies, HUPO (Human Proteome Organisation) 11th Annual World Congress (Boston), 2012

②清宮正徳、時田和也、朝長毅、松下一之、中谷行雄、野村文夫、クラスリン重鎖の組織診断マーカーとしての有用性の検討、第23回生物試料分析科学会年次学術集会、大阪、2013

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清宮 正徳 (SEIMIYA MASANORI)  
千葉大学・医学部附属病院・主任臨床検査技師  
研究者番号：20554265

### (2) 研究分担者

野村 文夫 (NOMURA FUMIO)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：80164739

松下一之 (MATSUSHITA KAZUYUKI)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号：90344994

### (3) 連携研究者

朝長 毅 (TOMONAGA TAKESHI)  
独立行政法人医薬基盤研究所・プロジェクトリーダー  
研究者番号：80227644

小寺 義男 (KODERA YOSHIO)  
北里大学・理学部・准教授  
研究者番号：60265733

大石 正道 (OH-ISHI MASAMICHI)  
北里大学・理学部・講師  
研究者番号：40233027