

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 6月10日現在

機関番号：15501
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22659117
 研究課題名（和文） ABO式血液型に注目し、胃癌に対する防御機構を追究する
 研究課題名（英文） Research which paid attention to the ABO type blood type about the protective mechanism over stomach cancer
 研究代表者
 小賀 厚徳 (OGA ATSUNORI)
 山口大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：90243633

研究成果の概要（和文）：市販のムチンに目的の物質が存在することを確認し、市販材料を用いて目的の抗体を評価するための検出法を考案した。その検出方法を用いて正常ヒト血清中に存在する、目的の抗体について評価した。さらに、精度の高い方法で目的の抗体を評価するための検出法の模索をした。

研究成果の概要（英文）：We confirmed that the target substance existed in commercial mucin, and devised the method of detecting for evaluating the target antibody using commercial materials. The antibody to exist in normal human serum using the detection method was evaluated. Furthermore, about evaluation of the target antibody, we tried to devise the more exact and simpler method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	510,000	3,210,000

研究分野：医歯薬学
 科研費の分科・細目：境界医学、病態検査学
 キーワード：胃癌、ELISA、腫瘍、免疫

1. 研究開始当初の背景

2009年に大規模ゲノム解析調査の結果、ABO式血液型の人には他の血液型よりも膵臓癌になりやすいことが報告された（Nature Genet. 41:986-990）。血液型と胃癌についてA型に多くO型に少ないという報告は1950年代（BMJ, 1: 799-801, 1953）や60年代（N. Engl. J. Med. 280:994-1006, 1969）からみられ、わが国でも同様の傾向があるものの、その理由は依然として不明である。胃癌はわ

が国で多い疾患であり、重要度の高い疾患である。また、ABO式血液型と関連があるとされる疾患は少なく、代表的な血液系の教科書 Wintrobe's Clinical hematology のなかにも僅かな記載しかない。また、胃癌の危険因子と認定されているバクテリアのヘリコバクターピロリであるが、感染の際、血液型と関連の有る物質と結合することが知られている。疫学的な研究ではA型に少し頻度高く胃癌が見られ、ピロリ菌の検討ではO型の人

の分泌タンパクと感染が関係有りそうである。つまり、後者の影響より強い因子がA型の人に見られる可能性がある。これらは解明が待たれる課題であるが国内外でほとんど研究はなされていない。発癌に関わるのか、発癌後癌細胞がごく少数のうちに自然に排除される程度の違いに関係があるのかもしれない。

70年代後半から、Springer GFらが癌全般についてNM式血液型、T抗原、Tn抗原に関する研究を次々に展開し、乳癌を血清学的に検出する方法やがん抗原ワクチンをヒトに投与するなど、先進的に取り組んだが(Cancer Biother. 9:7, J Mol Med. 75:594)、90年代でこれら研究は途絶えてしまい、この10年以上ほとんど進展していない。医療系の人でなくても関心を示しそうな身近な重要問題でありながら、多くの研究者から長期間ほとんど無視されてきた課題に取り組むことには、大きなチャレンジ性がある。

2. 研究の目的

胃癌では受診者の統計から、A型の人少し罹患しやすいというデータがあり、この理由に迫ることである。これらについて解明をすすめる、胃癌の発生頻度が高いわが国において国民の健康保持増進に役立つデータを得ることを目的とする。また本テーマから派生する分野にも積極的に関わることで研究代表者や分担者がベースとしている病理学、生化学、外科学に関する発展への寄与もめざす。

3. 研究の方法

正常人の血清を用いて、抗癌作用のある物質を評価する方法を考えた。我々の想定する抗癌作用のある抗体(Ab-Sと呼ぶ)は、物質Sと反応する。物質Sを用いて、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で、測定する方法を考えた。

物質Sの生成物は現時点で市販されていないので、物質Sを含むとされている市販のウシ顎下腺ムチン(ダコ社)を用いて、ELISAプレート(96穴、イモビライザープレート、クリア、Thermo-Nunc社)にコートし、エタノラミンを用いてブロッキング処理後、血清をBSA添加緩衝液で希釈(100-2000倍)しプレートにのせ反応させた。反応時間は1時間から1日とし、二次抗体(ヒトIgG, IgM)を作らせ、酵素反応を用いた発色を行い

(ThermoFisher scientific社)、マイクロプレートリーダー(ThermoFisher scientific社)で比色検定した。血清の希釈倍率、ムチン物質の希釈倍率、反応時間、ムチン物質からシアル酸やGlcNAcを除去し阻害物質による阻害実験を実施し、最適な条件を求めて行

った。また、使用した市販ムチンを材料とした試薬に標的の抗原が存在するかどうかについて、キットを用いてO型糖鎖を脱離させ質量分析計で分析した。陽性コントロールとして市販されている類似性のある抗原物質を用いた。

研究代表者、分担者のそれぞれのベースである病理学、生化学、外科学に関し各人が基礎力をあげ問題解決につなげる努力をする。

4. 研究成果

正常ヒト血清中のある抗体を評価する方法として、血清は1回に10 ul以内で十分であること、反応阻害用の糖はモルレベルの濃度が望ましいこと、反応物質をプレートにコートする際の濃度はマイクロモルのレベルで良いこと、市販の2次抗体は数百-数千倍希釈で使用可能なことなどが確認できた。使用した市販ムチンを材料とした試薬に標的の抗原が存在するかどうかについて、キットを用いてO型糖鎖を脱離させ大学の質量分析計で分析した結果を図1に示す。目的物質が存在すること、消化処理を実施したほうが結果に与えるノイズを減少させるであろうと予測される結果を得た。一般に顎下腺ムチンはヒツジが良いとされるが高価であり、今回はウシ顎下腺ムチンを使用した。安価なウシムチンでも検出系に使えることがわかった。ELISAプレートで反応を停止させ発色させた今回の結果の1つを図2に示す。

当該研究における中心課題についてはある程度の答えとなるデータが得られたので、1年以内をめどに、英論文として公表にこぎつけたい。また陽性コントロールは、調査しようとしている物質の類似物であるため、調査しようとしている物質に更に近いものを利用し、ノイズのより少ない方法を模索し、臨床の場へのデータ還元をめざしたい。今回検討課題のデータに関しては公表のタイミングを図っている部分があり、論文や学会発表として、本稿に取り上げているものは病理学や腫瘍学的な派生的なものとなっている。病理学的な細胞や組織の形態、ゲノムに関する検討、実験モデルとしてのメダカについての検討、バーチャル顕微鏡の検討にも関わり、文献や学会発表した。

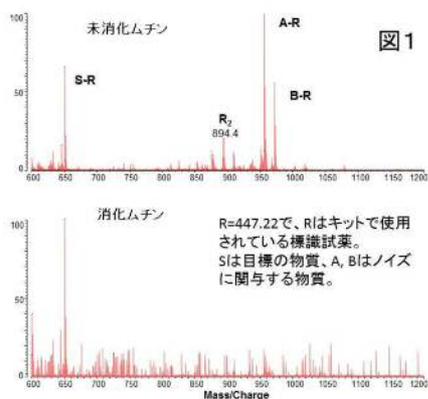


図 1

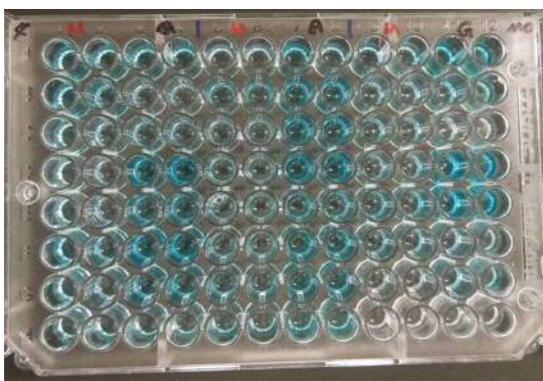


図 2。今回用いた ELISA 法でヒト血清を材料に反応させたもの。上は発色停止前の青色の状態。同一サンプルについて、二次抗体が IgM または IgG、阻害物質の使用の有無で 4 ウェル使っている。下は反応停止後、黄色に変化させ、マイクロプレートリーダーで読み取ろうとしているところ。

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 10 件)

- ① Ito H, Oga A, Furuya T, Ikemoto K, Amakawa G, Chochi Y, Kawauchi S, Sasaki K. Elucidation of proliferative capability of mononuclear tetraploid cells, emerging spontaneously from diploid cells, using image cytometry and fluorescence in situ hybridization. *Cell Prolif.* 2013 Jun;46(3):356-363. 査読あり. doi: 10.1111/cpr.12032.
- ② Suehiro Y, Okada T, Shikamoto N, Zhan Y, Sakai K, Okayama N, Nishioka M, Furuya T, Oga A, Kawauchi S, Maeda N, Tamesa M, Nagashima Y, Yamamoto S, Oka M, Hinoda Y, Sasaki K. Germline copy number variations associated with breast cancer susceptibility in a Japanese population. *Tumour Biol.* 2013. 34(2):947-952. 査読あり. doi:10.1007/s13277-012-0630-x.
- ③ 伊藤秀明、小賀厚徳、池本健三、近藤智子、帖地康世、河内茂人、佐々木功典。イメージサイトメトリーの細胞診への応用。病理解と臨床。31 (臨増)。2013。117-123。査読なし。
- ④ Yanagawa M, Ikemoto K, Kawauchi S, Furuya T, Yamamoto S, Oka M, Oga A, Nagashima Y, Sasaki K. Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype. *BMC Res Notes.* 2012 Jul 25;5:376. 査読あり. doi: 10.1186/1756-0500-5-376.
- ⑤ Yamamoto Y, Miyachika Y, Eguchi S, Chochi Y, Nakao M, Nagao K, Hara T, Sakano S, Furuya T, Oga A, Kawauchi S, Sasaki K, Matsuyama H, Misumi T. DNA copy number aberrations associated with lymphovascular invasion in upper urinary tract urothelial carcinoma. *Cancer Genet.* 2012. 205(6):313-318. 査読あり. doi: 10.1016/j.cancergen.2012.04.008.
- ⑥ 小賀厚徳、池本健三、上野富雄、尾田正二、佐々木功典。高解像度マルチディスプレイシステムを用いた理科教育の考察-理科教育におけるメダカや動物コンテンツ活用のための新ツール-。第 6 2 回日本理科教育学会 全国大会、論文集、2012、12G-103。査読なし。
- ⑦ Yamamoto Y, Misumi T, Eguchi S, Chochi Y, Kitahara S, Nakao M, Nagao K, Hara T, Sakano S, Furuya T, Oga A, Kawauchi

- S, Sasaki K, Matsuyama H. Centrosome amplification as a putative prognostic biomarker for the classification of urothelial carcinomas. *Hum Pathol.* 2011 Dec;42(12):1923-1930. 査読あり. doi:10.1016/j.humpath.2011.02.013.
- ⑧ Nakao M, Kawauchi S, Uchiyama T, Adachi J, Ito H, Chochi Y, Furuya T, Oga A, Sasaki K. DNA copy number aberrations associated with the clinicopathological features of colorectal cancers: Identification of genomic biomarkers by array-based comparative genomic hybridization. *Oncol Rep.* 2011. 25(6):1603-1611. 査読あり. doi:10.3892/or.2011.1246
- ⑨ Uchida K, Oga A, Nakao M, Mano T, Mihara M, Kawauchi S, Furuya T, Ueyama Y, Sasaki K. Loss of 3p26.3 is an independent prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2011. 26(2):463-469. 査読あり. doi: 10.3892/or.2011.1327.
- ⑩ OGA A, Uchida K, Nakao M, Kawauchi S, Furuya T, Chochi Y, Ikemoto K, Okada T, Ueyama Y, Sasaki k, Yousefpour F. Loss of 6q or 8p23 is associated with the total number of DNA copy number aberrations in adenoid cystic carcinoma. *Oncol Rep.* 2011. 26(6):1393-1398. 査読あり. doi: 10.1111/cpr.12032.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 小賀厚徳、西槇俊之、谷口善仁、尾田正二、近藤智子、伊藤秀明、太田博樹、池本健三、伊藤浩史。実験モデルとしての小型魚類、小動物組織へのバーチャルスライド活用をめざして。第 23 回日本サイトメトリー学会。2013. 6. 22-23。橘桜会館、東京都。(シンポジウム)
- ② 伊藤秀明、小賀厚徳、古屋智子、池本健三、帖地康世、佐々木功典。イメージサイトメトリーを用いた染色体不安定性の解析。第 102 回日本病理学会。2013. 6. 6-8。ロイトン札幌、札幌市。
- ③ 古屋智子、伊藤秀明、帖地康世、池本健三、小賀厚徳、河内茂人、佐々木功典。ヒト骨髄由来細胞の長期培養におけるゲノム変化の検討。第 102 回日本病理学会。2013. 6. 6-8。ロイトン札幌、札幌市。
- ④ 池本健三、小賀厚徳、名尾知絵、近藤智子、帖地康世、松山豪泰、河内茂人。膀胱洗浄液における Multi-color FISH 法による診断と細胞像。第 54 回日本臨床細胞学会 (春)。2013. 5. 31-6. 2。グラント
- プリンスホテル新高輪、東京都。(ワークショップ)
- ⑤ Oga A, Kawauchi S, Furuya T, Chochi Y, Ito H, Sasaki K. The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. Practice of Pathology education with a virtual slide system for medical studies in Yamaguchi University. 2012. 8. 26-29. 京都国際会議場、京都市。
- ⑥ 小賀厚徳、池本健三、上野富雄、尾田正二、佐々木功典。高解像度マルチディスプレイシステムを用いた理科教育の考察-理科教育におけるメダカや動物コンテンツ活用のための新ツール。第 6 2 回日本理科教育学会。2012. 8. 11-12。鹿児島大学、鹿児島市。
- ⑦ 小賀厚徳、河内茂人、古屋智子、帖地康世、伊藤秀明、佐々木功典。高解像度画像ディスプレイシステム (PowerWall) のポリクリ学生教育への応用。第 101 回日本病理学会総会。2012. 4. 26-28。京王プラザホテル、東京都。
- ⑧ 古屋智子、伊藤秀明、帖地康世、小賀厚徳、河内茂人、佐々木功典。各種乳癌培養細胞に対する 12q15 領域にコードされる遺伝子産物の影響。第 101 回日本病理学会総会。2012. 4. 26-28。京王プラザホテル、東京都。
- ⑨ 小賀厚徳、伊藤秀明、古屋智子、帖地康世、池本健三、河内茂人、佐々木功典。低コスト高解像度ディスプレイシステムの組織、細胞観察への応用。第 21 回日本サイトメトリー学会。2011. 6. 25-26。京都国際会館、京都市。
- ⑩ 伊藤秀明、池本健三、河内茂人、小賀厚徳、近藤智子、佐々木功典。乳癌におけるイメージサイトメトリーと FISH 技術を用いた DNA aneuploidy の解析。第 21 回日本サイトメトリー学会。2011. 6. 25-26。京都国際会館、京都市。
- ⑪ 小賀厚徳、近藤智子、帖地康世、伊藤秀明、河内茂人、佐々木功典。バーチャルスライド病理標本観察のための簡易型 3000 万画素ディスプレイシステムの構築。第 100 回日本病理学会。2011. 4. 28-30。パシフィコ横浜、横浜市。
- ⑫ 古屋智子、河内茂人、帖地康世、伊藤秀明、小賀厚徳、佐々木功典。乳癌における DNA コピー数異常領域に存在する遺伝子産物の乳癌培養細胞に対する影響についての検討。第 100 回日本病理学会。2011. 4. 28-30。パシフィコ横浜、横浜市。

[その他]

ホームページ

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~2byouri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小賀 厚徳 (OGA ATSUNORI)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90243633

(2) 研究分担者

三村 雄輔 (MIMURA YUSUKE)

独立行政法人国立病院機構山口宇部医療
センター・臨床研究部・生理生化学研究室長

研究者番号：00219718

上野 富雄 (UENO TOMIO)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70284255