

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591996

研究課題名(和文)鏡視下肝癌切除例の周術期血清抗SEREX抗体モニタリングの有用性に関する検討

研究課題名(英文) Perioperative monitoring of SEREX antibodies for HCC patients treated with laparoscopic hepatectomy.

研究代表者

金子 弘真 (KANEKO, Hironori)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：00169575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌特異抗原であるRa1A, Sui1, p62の3種類の抗原ペプチドに対する自己抗体を検出するELISAキットを作成して、肝細胞癌患者の血清抗体価を測定した。健常者血清におけるELISA測定レベルの平均値+3SDを基準値として、基準値を上回る症例を陽性と診断した。その結果、肝細胞癌患者における血清抗体陽性率はRa1A=17%, Sui1=6%, p62=9%であった。切除症例については、免疫染色の目的で切除標本から組織アレイを作成し免疫染色を行った。免疫染色強度と抗体価との関連性は、乏しかった。

研究成果の概要(英文)：Purpose of this study was (i) establish ELISA system to detect serum anti-c-SEREX antibodies, Ra1A, Sui1, p62 and (ii) evaluate positive rate of serum anti-SEREX antibodies in patients with hepatocellular carcinoma. Using a cut-off value of mean +3SD of serum anti-SEREX antibody level of healthy controls, positive rate of patients were evaluated. The positive rates were 17% for Ra1A, 6% for Sui1 and 9% for p62. No clinicopathological factors were associated with presence of anti-SEREX antibodies. Immunoreactivities of resected tissues were not associated with presence of autoantibodies.

研究分野：医歯薬学

キーワード：SEREX serum antibody malignant tumor

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の早期診断では簡便性の面からは血液検査法が望ましいが、既存の血液腫瘍マーカーでは癌細胞から分泌される微量なペプチドを検出するため早期癌診断は理論的に難しい。我々が開発した血清 p53 IgG 抗体検出による診断法(Cancer 2003)は、微量の癌抗原に対する抗原抗体反応を利用して、微小な癌細胞を検出することが可能であるため stage I 症例においても 10-20%程度の陽性率である。さらに、我々は Serological identification of antigens by recombinant cDNA expression libraries(SEREX)法を用いて種々の新規癌抗原遺伝子が同定してきた (Int J Cancer 2004, Cancer Sci. 2006, Int J Oncology 2005, 2007, 2009, J Gastroenterology 2009, BMC Cancer 2009)。この研究過程で、同定された複数の SEREX 抗原に対する肝細胞癌患者血清抗体の存在を検討した報告は少ない。p53, Sui1, RalA は癌抑制遺伝子であるが、肝細胞癌切除組織の解析、周術期の変化、手術後の再発などについての血清抗体の報告はない。鏡視下肝切除術は、ピンポイントでの標的腫瘍切除により、周術期の侵襲性サイトカインによる血液マーカー変化の修飾を最小化することが可能であり、より厳密な血液マーカーのモニタリングが可能である。特に、血清 SEREX 抗体は、宿主の免疫反応が修飾されると誤差を生ずる可能性があるため手術侵襲が最小化された症例での検討が理想的である。分担研究者(島田英昭)が開発し保険収載された血清 p53 抗体検査(Cancer 2003)は、微量の癌抗原に対する抗体反応を利用した血液検査法である。p53 分子異常を反映するバイオマーカーであり(Surgery 2003)、微小残存腫瘍を検出できるため食道癌周術期モニタリングに有用であることを報告している(W J Surgery 2009)。複数の血清抗体検査を併用することで、治療感受性予測、治療後の予後や転移率などをより正確に推測することが可能となると考えられる。

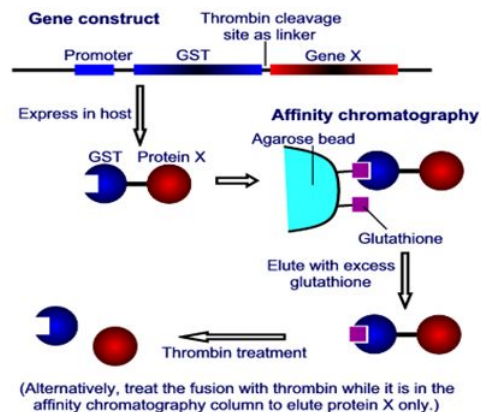
2. 研究の目的

本研究期間において、p53, Sui1, RalA の 3 種の抗体を同時に用いた血液検査法の有用性について以下の課題について明らかとする。最も陽性率が高い p53, Sui1, RalA の 3 種の抗体検出 ELISA 検査法を作成するために、WEB サイトにて、HLA class I に認識される各抗原のエピトープを選別する。選別したエピトープに対応するペプチド断片を精製して、ELISA の結合標的とする。Class I 結合エピトープは、最低 3 箇所同定されており、この部分を含むペプチド断片を cDNA クローニングにより精製する。試作した ELISA にて、治療開始前の肝細胞癌患者の血清 SEREX 抗体をスクリーニングする。これらの肝細胞癌患者において病期別の血清抗体の陽性率を明ら

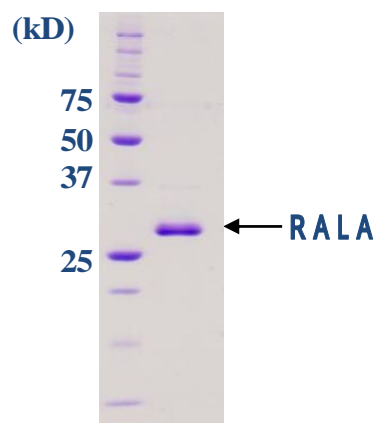
かとし、どのペプチドが最も陽性率が高いかを検討する。3 種の抗体の併用効果を検討する。最も陽性率の高いペプチドを標的とした ELISA を使用して、陽性症例の臨床病理学的特徴を検討する。周術期の抗体価の変化、陽性例と陰性例の予後を比較する。p53, Sui1, RalA の 3 種の抗原について切除標本の免疫染色を行う。免疫染色レベルと血清 SEREX 抗体価レベルとの相関関係を検討する。

3. 研究の方法

RalA, Sui1 cDNA の塩基配列をアミノ酸配列に変換し、MHCpred ウェブサイト (<http://www.jenner.ac.uk/MHCpred/>) を用いてクラス II 抗原部位を検索し、その領域を含むペプチドを人工合成する。アミノ末端にビオチンを付加しておき、予めアビジンを固相化したプレートを用いて合成ペプチドを特異的に結合させ、洗浄後に血清抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体を用いて血清抗体レベルを測定する(ELISA)。健常者血清に比べ患者血清の抗体レベルが有意に高いペプチドを選択する。作成した ELISA キットの性能試験を実施し、健常者の基準抗体価を設定する。健常者血清における ELISA 測定レベルの平均値 + 3SD をカットオフ値として、陽性と診断される患者血清中のそれぞれの抗体において最低 10%を上回った場合に診断用キットとして有用であると判断する。



12.5% SDS-PAGE (1.5 µg apply)



アミノ末端にビオチンを付加しておき、予めアビジンを固相化したプレートを用いて合成ペプチドを特異的に結合させ、洗浄後に血清抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体を用いて血清抗体レベルを測定した。健常者 73 名の血清抗体価の平均値 + 3SD をカットオフ値として陽性率を算出した。複数の SEREX 抗体を併用した場合の抗体価とそれぞれの標的抗原に対する単独抗原に対する抗体価との相関関係を検討した。解析対象は、治療前後の肝細胞癌患者血清である。

#### 4. 研究成果

健常者対照群の平均値 + 3SD を基準値として基準値を超える場合を陽性と定義した。健常者ならびに肝細胞癌における陽性率を示す。単独での陽性率は Sui1 が最も高く 9.6% であった。健常者の偽陽性率をゼロ前後に抑えるような基準値を設定すると複数併用での感受性ならびに偽陽性率が臨床的に有用なレベルに上昇させることが可能であった。免疫染色結果との相関は明らかではなかった。

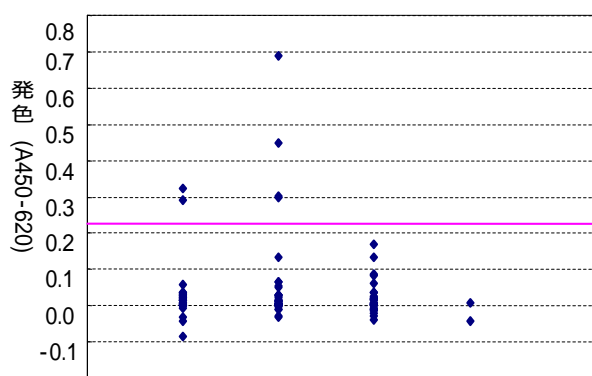
Liver cancer	No. of positive Liver cancer (n=10) n=10	sensitivity	No. of positive Liver cancer (n=10) n=10	sensitivity	No. of positive Liver cancer (n=10) n=10	sensitivity
SUI1	1	10.0%	0	0.0%	0	0.0%
Phl1p23	14	14.0%	1	10.0%	10	100.0%
Phl1p23+R9-1	20	20.0%	1	10.0%	19	190.0%
Phl1p23+R9-1+Lys-myc	26	26.0%	1	10.0%	25	250.0%
Phl1p23+R9-1+Lys-myc+RALA	28	28.0%	1	10.0%	27	270.0%
Phl1p23+R9-1+Lys-myc+RALA+p2	30	30.0%	1	10.0%	29	290.0%

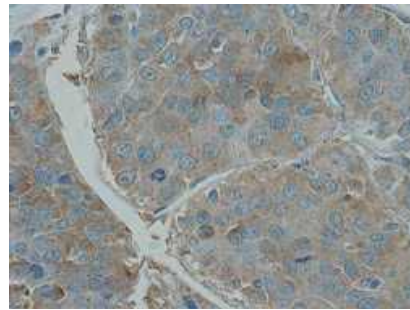
CE	No. of positive CE (n=10) n=10	sensitivity	No. of positive CE (n=10) n=10	sensitivity	No. of positive CE (n=10) n=10	sensitivity
SUI1	1	10.0%	0	0.0%	0	0.0%
Phl1p23	1	10.0%	0	0.0%	0	0.0%
Phl1p23+R9-1	1	10.0%	0	0.0%	0	0.0%
Phl1p23+R9-1+Lys-myc	2	20.0%	1	10.0%	1	10.0%
Phl1p23+R9-1+Lys-myc+RALA	0	0.0%	1	10.0%	0	0.0%
Phl1p23+R9-1+Lys-myc+RALA+p2	0	0.0%	2	20.0%	0	0.0%

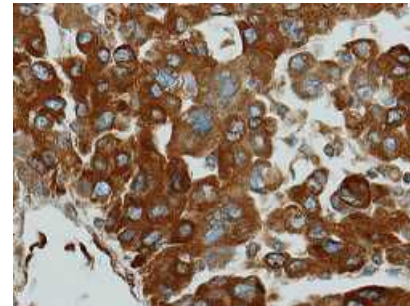
LC	No. of positive LC (n=10) n=10	sensitivity	No. of positive LC (n=10) n=10	sensitivity	No. of positive LC (n=10) n=10	sensitivity
SUI1	1	10.0%	0	0.0%	1	10.0%
Phl1p23	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
Phl1p23+R9-1	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
Phl1p23+R9-1+Lys-myc	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
Phl1p23+R9-1+Lys-myc+RALA	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
Phl1p23+R9-1+Lys-myc+RALA+p2	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%



ステージ	7.4%	10.3%	0%	0%
	2/27	4/39	0/28	0/2



SUI1



RALA

#### 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)

Belli G, Gayet B, Han HS, Wakabayashi G, Kim KH, Cannon R, Kaneko H, Gamblin T, Koffron A, Dagher I, Bucll JF: International Consensus Group for Laparoscopic Liver Surgery, Laparoscopic left hemihepatectomy a consideration for acceptance as standard of care, Surgical endoscopy, 査読有、27 巻(8)、2013、2721-2726

DOI:10.1007/s00464-013-2840-8

金子弘真、大塚由一郎、【エキスパートが教える内視鏡外科手術-ポイントとなる解剖の理解】肝・胆・膵・脾の鏡視下手術 肝臓に対する鏡視下手術 腹腔鏡下肝系統的切除術(葉切除を含む)、消化器外科、査読無、36 巻(5)、2013、793-803

島田英昭、谷島聡、船橋公彦、消化器癌における血清 p53 抗体検査の有用性、Surgery Frontier、査読無、20 巻(4)、2013、106-108

金子弘真、島田英昭、谷島聡、山崎有浩、食道癌におけるバイオマーカー 血液バイオマーカーの有用性について、消化器外科、査読無、34 巻(13)、2011、1889-1895

[学会発表](計 13 件)

島田英昭、(フォーラム：今、なぜ抗体マーカー?)血清 IgG 抗体の癌バイオマーカーとしての実用化と今後の展望、第 37 回日本分子生物学会年会、2014/11/26、「パシフィック横浜(神奈川県横浜市)」

島田英昭、金子弘真、高山忠利、河野辰幸、北川雄光、瀬戸泰之、田中洋一、村上雅彦、

矢永勝彦、山本雅一、早期消化器癌診断の為の癌抗原特異的血清 IgG 抗体検出法の開発、(多施設研究報告)、第 69 回日本消化器外科学会総会、2014/7/18、「郡山市民文化センター(福島県郡山市)」

島田英昭、久保田喜久、大塚由一郎、田村晃、土屋勝、前田徹也、石井淳、片桐敏雄、鏡哲、金子弘真、癌関連抗原を標的とした肝細胞癌症例における血清 IgG 抗体の検出、第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2014/6/12、アバローム紀の国(和歌山県和歌山市)

金子弘真、Laparoscopic Liver Resection in Japan、第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2014/6/11、「和歌山県民文化会館(和歌山県和歌山市)」

金子弘真、Laprosopic major hepatectomy、IPBA World Congress2014、2014/3/24、「ソウル(韓国)」

大塚由一郎、久保田喜久、土屋勝、前田徹也、石井淳、片桐敏雄、須磨崎真、金子弘真、完全鏡下肝葉切除 - 困難症例での対応とその克服にむけて、第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2013/6/14、「ホテル東日本宇都宮(栃木県宇都宮市)」

久保田喜久、大塚由一郎、田村晃、土屋勝、前田徹也、石井淳、片桐敏雄、金子弘真、大腸癌肝転移に対する腹腔鏡下肝切除術の有用性と安全性の検討、第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2013/6/13、「ホテル東日本宇都宮(栃木県宇都宮市)」

島田英昭、久保田喜久、大塚由一郎、田村晃、前田徹也、石井淳、大嶋陽幸、谷島聡、名波竜規、鷺澤尚宏、小池淳一、船橋公彦、山崎有浩、金子弘真、消化器癌患者における血清 NYESO-1 抗体は新規腫瘍マーカーとなるか?、第 10 回日本消化器外科学会大会(JDDW2012)、2012/10/12、「神戸国際展示場(兵庫県)」

島田英昭、久保田喜久、大塚由一郎、田村晃、前田徹也、石井淳、大嶋陽幸、谷島聡、名波竜規、鷺澤尚宏、片桐敏雄、金子奉暁、山崎有浩、金子弘真、大塚誠子、肝細胞症例における血清 galectin-1 抗体の解析 ~ 新規腫瘍マーカーの可能性 ~、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012/4/13、「幕張メッセ(千葉県千葉市)」

島田英昭、大塚由一郎、石井淳、大嶋陽幸、緒方秀昭、小池淳一、谷島聡、名波竜規、長嶋康雄、鷺澤尚宏、山崎有浩、船橋公彦、金子弘真、癌診療における p53 抗体マーカーの有用性 ~ Pubmed 文献から ~、第 73 回日本臨床外科学会総会、2011/11/17、「新宿 NS ビル(東京都新宿区)」

Shimada H、Oshima Y、Yajima S、Nanami T、Nagashima Y、Yamazaki K、Kaneko H、Clinical unility of serum p53 antibody for patients with esophageal carcinoma、21<sup>st</sup> World Congress of the International Association of

Surgeons,Gastroenterologists and Oncologists(IASGO2011)、2011/11/12、「京王プラザホテル(東京都新宿区)」

島田英昭、大嶋陽幸、谷島聡、名波竜規、長嶋康雄、鷺澤尚宏、山崎有浩、岡住慎一、金子弘真、食道癌診療における p53 抗体マーカーの使い方入門編 ~ Pubmed 文献から ~、第 65 回日本食道学会学術集会、2011/9/26、「仙台医療センター(宮城県仙台市)」

Shimada H、Oshima Y、Yajima S、Nanami T、Tamyra A、Yamazaki K、Kaneko H、Serum SEREX antibodies as new biomarkers for gastric cancer、9<sup>th</sup> International Gastric Cancer Congress、2011/4/21、「ソウル(韓国)」

〔その他〕  
ホームページ等なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金子 弘真 (KANEKO, Hironori)  
東邦大学・医学部・教授  
研究者番号：00169575

### (2) 研究分担者

島田 英昭 (SHIMADA, Hideaki)  
東邦大学・医学部・教授  
研究者番号：20292691

大塚 由一郎(OTSUKA, Yuichiro)  
東邦大学・医学部・講師  
研究者番号：70287499

久保田 喜久(KUBOTA, Yoshihisa)  
東邦大学・医学部・助教  
研究者番号：70385699