

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592408

研究課題名(和文)膀胱癌に対する抗体検出に付随する新規腫瘍マーカーの解析

研究課題名(英文)Detection of specific antibodies for bladder cancer

## 研究代表者

松本 和将 (MATSUMOTO, Kazumasa)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：70306603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は低侵襲性で患者への負担の少ない体液を対象とした膀胱がん診断法の確立である。膀胱癌特異的単クローン性抗体、患者血清中の自己抗体が認識する腫瘍関連蛋白質を同定した。検出蛋白質のうち膀胱癌と臨床病理的な相関関係が認められたものが数多く得られた。本研究で得られた成果の一部を特許申請した。残り多くの検出した蛋白質について、さらに検討・適正化を進め、臨床への実用化を目指す予定である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish the diagnostic tools for bladder cancer using patients' samples including blood and urine. We detected many monoclonal and autoimmune antibodies for bladder cancer in pathologic tissues and serum. We also found that these proteins were associated with clinicopathologic findings and prognosis. For example, the expression of nestin in bladder cancer tissues was associated with higher pathologic stage and poorer prognosis. Serum S100A6 was significant higher in non-muscle invasive bladder cancer than in controls. In additions, autoimmune antibodies of MMP2 and calreticulin were significantly increased in patients with bladder cancer compared to in controls. We will plan to examine whether the rest of bladder specific proteins detected in this project would be matched in real world clinical scenario.

研究分野：泌尿器科学、腫瘍学

キーワード：膀胱癌 尿路上皮癌 蛋白解析 腫瘍マーカー

### 1. 研究開始当初の背景

近年膀胱癌の罹患率・死亡率は増加の一途を辿っている。膀胱癌と診断される約 1/3 の症例で、初診時においてすでに筋層浸潤を認める進行癌である。進行性膀胱癌に対しての治療として一般的に、膀胱全摘除術、化学療法、放射線療法があげられる。しかし、初診時の進行癌である場合の治療成績は芳しくない。さらに、膀胱癌に対する特異的腫瘍マーカーが存在せず、検出および経過観察においても画像診断のみで行われているのが現状である。また、抗癌剤感受性に関与する分子として幾つかの報告はあるが、特定の抗癌剤に対する個々の患者の感受性を予測する分子の解析は遅れており、感受性の有無にかかわらず共通のプロトコールで治療されているのが現状である。今後、膀胱癌に対する根治的治療の可能性を広げ、その予後を改善するには、新たな検索方法やマーカーを用いた新しい診断基準に基づく検討が重要と考える。

### 2. 研究の目的

我々の最終目的は低侵襲性で患者への負担の少ない体液(血液、尿等)を対象としたがん診断法の確立である。膀胱癌の早期診断や抗がん剤感受性を事前に予測する等、膀胱癌の個別化医療の実現を検討するために、膀胱癌特異的単クローン性抗体を計 400 個、抗がん剤感受性に関与する分子に対する単クローン性抗体を 100 個すでに作製した。これらについて多数症例の膀胱癌組織マイクロアレイ、抗がん剤感受性の結果の出ている治療前組織、およびそれら患者の血清を用いた早期血清診断および抗がん剤感受性予測マーカーとしての有用性を検討する。また、膀胱癌患者血清中の自己抗体が認識する腫瘍関連タンパク質を計 163 個、126 種類すでに同定した。多数例の膀胱癌患者血清を用い、これら自己抗体の早期診断および抗がん剤感受性判定への応用の可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 膀胱癌特異的抗体と患者血清との反応性に関しては、まず血清からアルブミンと免疫グロブリンはカラムを用いて除いた後、PVDF 膜に所有のマイクロドットアレイヤーを用いてドットする。その後、樹立した単クローン性抗体の培養上清を用いて反応、HRP 標識二次抗体との反応を行う。化学発光試薬との反応を行い、その発光をイメージアナライザーに記録し、このドットプロット用に最適化されたソフトウェア(ダイナコム)上で解析する。膀胱癌患者血清とは反応するが、健常人とは反応しない抗体が幾つか認められてきている。全ての抗体に関してこの一次スクリーニングを行い、二次スクリーニングに持って行く抗体類を選択する。その後、症例の臨床病理学的検討、予後との相関関係、単変量、多変量解析を行い、腫瘍マーカーとしての有用性を検討する。

(2) さらに、獲得した単クローン性抗体を用いた一次スクリーニング、患者血清を一次抗体として用いた腫瘍関連タンパク質の一次スクリーニングを続けて行なう。その結果、健常人血清、非腫瘍性疾患患者血清と比較して、腫瘍特異的マーカーとして同定されたものについて、さらに多数例を用いて二次スクリーニングを行う。この検討で、統計学的に有意であり、ROC curve から AUC 値が 0.7 以上であるマーカーに関しては、さらに多数例の膀胱癌患者血清を用いて、単独で特定の膀胱癌の早期診断マーカーとして使用できるものか、複数のマーカーを組み合わせて使用することで診断できるか否かをバイオインフォマティクスの手法を用いて検討する。

(3) 早期診断に関する腫瘍関連タンパク質に関しては、精製タンパク質を用いて単クローン性抗体の作製を行うか、市販の抗体を購入して、膀胱癌組織マイクロアレイを用いて免疫染色する。

### 4. 研究成果

(1) 膀胱癌(尿路上皮癌)の腫瘍マーカーの探索を遂行してきた。膀胱癌特異的単クローン性抗体を 600 個、膀胱癌患者血清中の自己抗体が認識する腫瘍関連蛋白質 163 個を同定した。一次スクリーニングを行うことで膀胱癌特異的抗体を 204 個、自己抗体を 138 個獲得した。検出蛋白質のうち膀胱癌と臨床病理学的な相関関係が認められたものが数多く得られた。膀胱癌特異的蛋白として nestin、periplakin を、血清蛋白として S100A6、自己抗体として MMP2、calreticulin を同定した。Nestin、periplakin においては手術標本を用いた免疫染色の検討を行った。

(2) Nestin は進行癌組織で発現が増強していた。Nestin 発現は病理病期と相関していた。また、膀胱癌組織での nestin が陰性の場合、生命予後が有意に良好であった。多変量解析において、nestin 発現とリンパ節転移症例は癌死を予測する有意な独立因子であった。(参照発表論文)

(3) Periplakin は正常尿路上皮や炎症疾患、良性腫瘍では強発現し、癌組織で発現が低下もしくは消失していた。さらに、進行癌になると有意に発現の消失が認められた。また、多変量解析において、periplakin 発現消失とリンパ節転移は癌死を予測する有意な独立因子であった。(参照発表論文)

(4) 血清 periplakin の膀胱癌症例での動態を検討し、健常者と比較し膀胱癌症例での発現が有意に低下していた。本蛋白質は血清マーカーとして膀胱癌の検出に利用できる可能性を示唆していた。(参照発表論文)

(5) 血清 S100A6 は健常者と比較し膀胱癌症例で発現有意に上昇していた。筋層非浸潤癌症例でも健常者と比較し、有意に発現上昇していた。さらに、筋層浸潤癌症例では筋層非浸潤癌症例と比較し有意に上昇していた。本蛋白質は治療後など経過観察の腫瘍マーカーのとして有用性を示した。(参照発表論文)

(6) 自己抗体としての MMP2、calreticulin について、膀胱癌症例で有意に上昇していた。膀胱癌に関する自己抗体の存在について始めて報告した。(参照発表論文)

(7) 本研究で得られた成果の一部を膀胱癌の腫瘍マーカーとして特許申請を行った。(参照産業財産権 3 件出願) 残り多くの膀胱癌に関連する蛋白質、抗がん剤感受性に関する蛋白質を同定しているため、今後さらに検討、適正化を進め、特許取得、臨床への実用化を目指す予定である。

#### 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 8 件)

①Noguchi M, Arai G, Matsumoto K, Naito S, Moriya F, Suekane S, Komatsu N, Matsueda S, Sasada T, Yamada A, Itoh K. Phase I trial of a cancer vaccine consisting of 20 mixed peptides in patients with castrate-resistant prostate cancer: dose-related immune boosting and suppression. *Cancer Immunol Immunother.* 査読有り 64, 2015, 493-505. doi: 10.1007/s00262-015-1660-1.

Tsumura H, Matsumoto K, Ikeda M, Yanagita K, Hirano S, Hagiwara M, Nagashio R, Fujita T, Sato Y, Iwamura M. High expression level of preoperative serum uroplakin III is associated with biologically aggressive bladder cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 査読有り 16, 2015, 1539-1543.

[http://www.apocpcontrol.org/page/apjcp\\_issues\\_view.php?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:25743828&key=2015.16.4.1539](http://www.apocpcontrol.org/page/apjcp_issues_view.php?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:25743828&key=2015.16.4.1539).

Nishi M, Matsumoto K, Kobayashi M, Yanagita K, Matsumoto T, Ryo Nagashio, Ishii D, Fujita T, Sato Y, Iwamura M. Serum expression of S100A6 is a potential detection marker in patients with urothelial carcinoma in the urinary bladder. *Biomed Res.* 査読有り 35, 2014, 351-356. doi: 10.2220/biomedres.35.351.

Matsumoto K, Ikeda M, Matsumoto T, Nagashio R, Nishimori T, Tomonaga T, Nomura F, Sato Y, Kitasato H, Iwamura M. Serum periplakin as a potential biomarker for urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Asian Pac J Cancer Prev.* 査読有り 15, 2014, 9927-9931. [http://www.apocpcontrol.org/page/apjcp\\_issues\\_view.php?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:255201](http://www.apocpcontrol.org/page/apjcp_issues_view.php?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:255201)

30&key=2014.15.22.9927.

Matsumoto K, Ikeda M, Sato Y, Kuruma H, Kamata Y, Nishimori T, Tomonaga T, Nomura F, Egawa S, Iwamura M. Loss of periplakin expression is associated with pathological stage and cancer-specific survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Biomed Res.* 査読有り 35, 2014, 201-206. doi.org/10.2220/biomedres.35.201

Tabata K, Matsumoto K, Minami S, Ishii D, Nishi M, Fujita T, Saegusa M, Sato Y, Iwamura M. Nestin is an independent predictor of cancer-specific survival after radical cystectomy in patients with urothelial carcinoma of the bladder. *PLOS ONE.* 査読有り 9, 2014, e91548. doi: 10.1371/journal.pone.0091548.

Minami S, Nagashio R, Ueda J, Matsumoto K, Goshima N, Hattori M, Hachimura K, Iwamura M, Sato Y. Detection of tumor-associated antigens in culture supernatants using autoantibodies in sera from patients with bladder cancer. *Biomed Res.* 査読有り 35, 2014, 25-35. doi.org/10.2220/biomedres.35.25.

Tsumura H, Matsumoto K, Sato Y, Ikeda M, Fujita T, Satoh T, Iwamura M. Abnormal expression of multiple proteins predicts cancer-specific mortality in patients with high-grade non-muscle-invasive bladder cancer treated with transurethral resection. *Mol Clin Oncol.* 査読有り 1, 2013, 473-479. doi:10.3892/mco.2013.92.

[学会発表](計 12 件)

①Mochizuki K, Matsumoto K, et al, Detection of tumor-associated antigens in culture supernatants using autoantibodies in sera from patients with bladder cancer. 30th Annual European Association of Urology Congress, 2015.3.23, Madrid (Spain).

Matsumoto K et al, Loss of periplakin expression is associated with pathological stage and cancer-specific survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. 30th Annual European Association of Urology Congress, 2015.3.20, Madrid (Spain).

松本和将. 尿路上皮がんにおける腫瘍マーカーの探索. 第 12 回北里疾患プロテオーム研究会・第 65 回日本電気泳動学会シンポジウム, 2015.3.18, 北里大学(神奈川県・相模原市).

野口正典松本和将, 他, 化学療法抵抗性膀胱がんに対しするがんワクチン療法の第 II 相無作為比較試験. 第 52 回日本癌治療学会学術集会, 2014.8.29, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

Noguchi M, Matsumoto K, et al. Randomized phase II study of personalized peptide vaccination in patients with advanced bladder cancer progressing after chemotherapy. 50th Annual Meeting of the American Society of

Clinical Oncology, 2014.5.30, Chicago (USA).

松本和将他, 尿細胞診擬陽性症例に対する臨床的評価について. 第102回日本泌尿器科学会総会, 2014.4.24, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市).

H.Tsumura, M.Kazumasa, et al, Increased expression of serum uroplakin III is associated with the detection and pathological features of aggressive bladder cancer. 29th Annual European Association of Urology Congress, 2014.4.11, Stockholm (Sweden).

松本和将他, 膀胱癌における血清 uroplakin III 発現の臨床的意義について. 第71回日本癌学会学術総会, 2012.9.19, ロイトン札幌(北海道・札幌).

田畑健一、松本和将他, 膀胱癌におけるネスチンの免疫組織学的検討. 第100回日本泌尿器科学会総会, 2012.4.21, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

西 盛宏、松本和将他, 膀胱癌症例における血清 S100A6 発現の検討. 第100回日本泌尿器科学会総会, 2012.4.21, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

津村秀康、松本和将他, TURBT により得た High grade 筋層非浸潤性膀胱癌における免疫染色法を用いた予後予測因子の検討. 第100回日本泌尿器科学会総会, 2012.4.21, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

松本和将他, 血清 Uroplakin III 発現の臨床的意義について. 第100回日本泌尿器科学会総会, 2012.4.21, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

〔図書〕(計2件)

①Hirayama T, Matsumoto K, Nishi M, Fujita T, Iwamura M. Nova Science Publishers, Inc, Hematuria: Etiology, Management and Long-Term Prognosis. , 2015.1., 77-83

Matsumoto K, Ikeda M, Hirayama T, Fujita T, Iwamura M. Nova Science Publishers, Inc, Bladder Cancer: Risk Factors, Emerging Treatment Strategies and Challenges. 2014, 145-160.

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

①名称: 膀胱癌の診断

発明者: 松本和将、大草 洋、馬場志郎、小寺義男、前田忠計

権利者: 学校法人北里研究所

種類: 特許

番号: 特願 2015-020750

出願年月日: 平成 27 年 2 月 20 日

国内外の別: 国内

名称: 膀胱癌の診断

発明者: 松本和将、大草 洋、馬場志郎、小寺義男、前田忠計

権利者: 学校法人北里研究所

種類: 特許

番号: 特願 2013-172643

出願年月日: 平成 25 年 8 月 22 日

国内外の別: 国内

名称: 膀胱癌診断用ポリペプチドマーカー及び膀胱癌診断用キット並びにこれらを使用する方法

発明者: 佐藤雄一、松本俊英、松本和将、長塩 亮、鉢村和男、五島直樹、川上和孝

権利者: 学校法人北里研究所

種類: 特許

番号: 特願 2012-174602

出願年月日: 平成 24 年 8 月 7 日

国内外の別: 国内

取得状況(計1件)

名称: 膀胱癌の診断

発明者: 松本和将、大草 洋、馬場志郎、小寺義男、前田忠計

権利者: 学校法人北里研究所

種類: 特許

番号: 特許第 5445969 号

出願年月日: 平成 20 年 3 月 14 日

取得年月日: 平成 26 年 1 月 10 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 和将 (MATSUMOTO, Kazumasa)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 70306603

(2)研究分担者

佐藤 雄一 (SATO, Yuichi)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号: 30178793

佐藤 威文 (SATO, Takefumi)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 50286332