

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462471

研究課題名(和文) ラミニン分子を標的とした尿路上皮癌の新しい診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel diagnostic method for bladder cancer

研究代表者

越川 直彦 (Koshikawa, Naohiko)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・部長

研究者番号：70334282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では血清中のラミニン 2単鎖(2単鎖抗体)が膀胱がんを含む泌尿器がんの診断指標になりうる可能性と、2単鎖の特異抗体が膀胱がんの分標的治療のDDSツールになる可能性について検証した。結果、血清 2単鎖を測定するためのサンドイッチELISAを作製し、泌尿器がん血清中の 2単鎖を測定したところ、膀胱がん、腎がんの血清で高値を示し、尿同様に血清中の 2単鎖もこれら癌腫の診断指標となることを見出した。また、2単鎖がDDSの標的分子となる可能性を示す為に、マウスの膀胱内に膀胱がんの播種モデルを作製し、膀胱内注した 2単鎖抗体が膀胱がん細胞を認識しているか否かについての免疫組織解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：In this study we analyzed serum monomeric laminin 2 (Ln- 2) as a biomarker for urological cancers. First, we established a quantitative sandwich ELISA using a specific antibody to monomeric Ln- 2, and was able to measure 50 pg/mL of monomeric Ln- 2 in serum specimens. After screening using serum specimens obtained from patient with urological cancers, the high levels of monomeric Ln- 2 was observed in serum of bladder and renal cancers. Furthermore, to assess whether a specific antibody to monomeric Ln- 2 as a DDS tool for bladder cancer therapy, we established an intravesical model with bladder cancer cells expressing monomeric Ln- 2 in nude mice. Now the specific antibody is immunohistochemically assessing in the mouse model with HT-1197 cell expressing high level of endogenous monomeric Ln- 2.

研究分野：腫瘍生化学

キーワード：バイオマーカー 診断 治療奏効 膀胱がん

1. 研究開始当初の背景

泌尿器がん患者の尿中に浸潤マーカーとして知られるラミニン γ 2 単鎖が蓄積しており、また、免疫組織染色による検討により、尿にラミニン γ 2 単鎖が陽性患者より摘出した膀胱癌組織においてもその発現が確認された。以上から、尿中のラミニン γ 2 単鎖は膀胱がん診断の有用なバイオマーカーとして可能性が見出されている。

2. 研究の目的

本研究では、ラミニン γ 2 単鎖 (γ 2 単鎖) を泌尿器がんの診断・治療の標的分子として応用できる可能性を検証する。それらは、1) 血中 γ 2 単鎖がこれら癌腫の診断、治療の奏効をモニターするバイオマーカーとなりうる可能性、および、2) γ 2 単鎖抗体が、 γ 2 単鎖を分子標的とした膀胱癌治療の有望な Drug Delivery System (DDS) のためのツールになる可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) ラミニン γ 2 単鎖 (γ 2 単鎖) を指標とした膀胱がんの診断法の開発

(1-1) 膀胱がん患者より得られる血清、血漿のどちらの血液試料が ELISA やウエスタンブロットでの γ 2 単鎖の検出に適しているかについて、血清、血漿中の γ 2 単鎖をその特異抗体を用いた非還元条件のウエスタンブロットで検出する。

(1-2) 血中の γ 2 単鎖を高感度に定量するため、尿の γ 2 単鎖の解析で使用したサンドイッチ ELISA の改良を行う。界面活性剤の添加やポリクロ抗体の濃度を変えることで対応する。本検討の陽性コントロールは、 γ 2 単鎖の発現のない健常人血清に γ 2 単鎖リコンビナント蛋白質を添加したものをを用いる。

(1-3) 高感度化したサンドイッチ ELISA を用いて、組織型、病期の異なる膀胱がんを含む泌尿器疾患の患者から得られた血清中の γ 2 単鎖の定量を行う。この際、良性泌尿器疾患および健常血清を陰性対照とする。

(2) γ 2 単鎖抗体を用いた膀胱癌の治療法の開発 -DDS のツールとして可能性を探る-

(2-1) γ 2 単鎖抗体が、 γ 2 単鎖を高発現する膀胱がん細胞を選択的に認識するか否かを免疫細胞染色法にて確認する。使用する細胞は γ 2 単鎖を高発現するヒト膀胱癌細胞 (Ku-1、HT-1197) と陰性対照として γ 2 単鎖を発現していない T24 細胞を用いる。

(2-2) 発光タンパク質を導入した Ku-7、HT-1197、T24 細胞を樹立して、フィドラーらの樹立した膀胱癌の膀胱内播種モデルを用いて、これら細胞をマウスの膀胱に注入し、膀胱内に腫瘍をもつ単癌マウスを作製する。

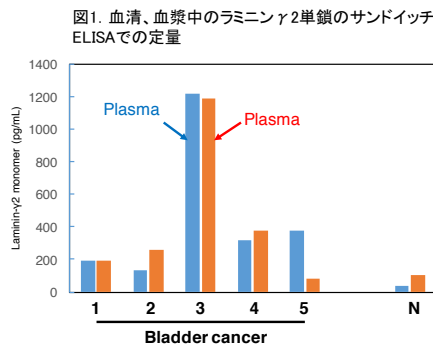
(2-3) IVIS® Imaging System で膀胱内に癌細胞が播種したことを確認した後、マウスの膀胱へ蛍光標識した γ 2 単鎖抗体を注入し、抗体を癌細胞と結合させる。その後、マウスより膀胱を全摘して、IVIS® Imaging System により蛍光、発光の共局在を観察することで抗体の癌細胞への結合を査定する。

4. 研究成果

(1-1)

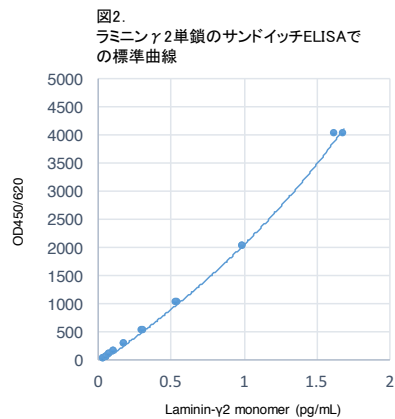
ラミニン γ 2 単鎖の測定に適する試料は血清、血漿のどちらかを調べるために、がん、非がん患者検体を用いたサンドイッチ ELISA で γ 2 単鎖値を測定した。対照として使用した良性疾患血清はがん血清に比べどちらも γ 2 単鎖値は下回っている。血漿が血清に比べ若干高値を示す結果であることから、結果が安定しており、採取が容易な血清を本研究

の試料として用いることに決めた (図 1)。次に、 $\gamma 2$ 単鎖抗体を含む種々の抗体によるウェスタンブロット解析を試みたが、抗体の検出感度の限界等の問題により、 $\gamma 2$ 単鎖の蛋白質を検出するには至らなかった (data not shown)。



(1-2)

Triton-X100、CHAPS、NP40 等の界面活性剤の検討を行い、2% (w/v) Tween-20/1% (w/v) BSA を添加することで、50pg/mL 以上の血清中の $\gamma 2$ 単鎖を定量可能なサンドイッチ ELISA を作製した (図 2)。

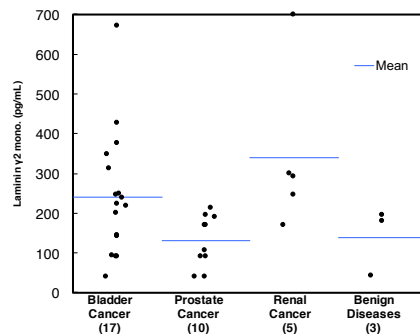


(1-3)

1-2 項で高感度化したサンドイッチ ELISA を用いて、膀胱がんを含む泌尿器疾患患者を用いた $\gamma 2$ 単鎖値の測定を行ったところ、膀胱がんは尿同様に血清においても $\gamma 2$ 単鎖が高値を示した (図 3)。一方、前立腺がん血清は良性疾患の血清と同レベルであった。一方、腎がんは 1 例の高値検体があったので、平均値が上昇していた。膀胱がん同様に高い傾向

にあると考えられる。以上から、膀胱がん、腎がんの患者血清には良性疾患患者に比較して高レベルの $\gamma 2$ 単鎖が発現している。

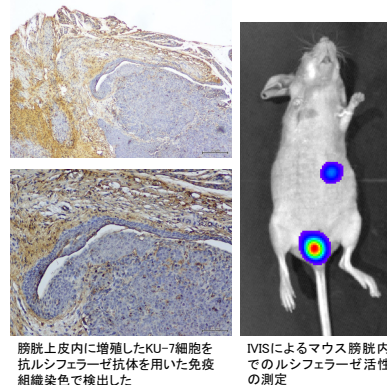
図3. 泌尿器がん血清中のラミニン $\gamma 2$ 単鎖の定量結果



(2-1)

まず、ルシフェラーゼ遺伝子を導入した Ku-7 細胞を膀胱内に播種して膀胱内に膀胱がんを作製したところ、Ku-7 細胞は膀胱内への造腫瘍性を示した。ルシフェラーゼ抗体を用いた免疫組織染色より、膀胱上皮にがん組織を確認することができた (図 4)。一方、HT-1197 細胞は膀胱内への播種を確認したが、がん細胞は正常上皮組織の下層で増殖していることが明らかとなった。

図4. ノドマウスの膀胱内に移植した膀胱がんKu-7細胞の検出



(2-2)

Ku-7 細胞を膀胱内へ播種させ $\gamma 2$ 単鎖抗体 (100 μ g/mouse) を膀胱へ注入して 1 時間後にマウスから膀胱を摘出し、注入した抗体を免疫組織染色で検出したが、現在までに対照抗体として用いた IgG との差がみられていな

い (data not shown)。今後、抗体の注入量、反応時間等の予備実験を行うことで、まずは注入した抗体を検出できるようにする。

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 2 件)

1. Kamada M, Koshikawa N, Minegishi T, Kawada C, Karashima T, Shuin T, & Seiki M. Urinary laminin- γ 2 is a novel biomarker of non-muscle invasive urothelial carcinoma. *Cancer Sci.* 106(12):1730-7. (2015).
2. 越川直彦、細胞外基質を指標とした膀胱がんの新しい診断法の開発、日薬理誌第 146 巻第 5 号 pp. 248, 2015 年 11 月

[学会発表] (計 4 件)

1. 中川将利、越川直彦、鎌田雅行、吉田栄作、吉村徹、執印太郎、清木元治：新規膀胱がん診断法の開発、第 74 回日本癌学会学術総会 (名古屋)、2015. 10. 8-10
2. 越川直彦：尿路上皮がんの新しいバイオマーカー、第 88 回日本薬理学会年会 (名古屋)、2015. 3. 18-20
3. Koshikawa N, Kamada M, Minegishi T, Kawada C, Shuin T & Seiki M.: Development of a novel screening system for diagnosis of urothelial cancer by detection of urinary monomeric laminin- γ 2 (Ln- γ 2), SOCIETY OF ONCOLOGY AND BIOMARKERS, Barcelona, Spain, 2014. 3. 10
4. Nakagawa M, Koshikawa N, Kamada M, Yoshida E, Yoshimura T, Shuint, & Seiki M.: Identification of Laminin- γ 2 monomer chain as a novel biomarker for bladder carcinoma

diagnosis, SOCIETY OF ONCOLOGY AND BIOMARKERS, Barcelona, Spain, 2014. 3. 10

[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 1 件)

名称：泌尿器科がんの検査方法及び検査用キット

発明者：越川直彦、清木元治、鎌田雅行、執印太郎

権利者：東京大学、高知大学

種類：発明

番号：特許第 5754844

取得年月日：平成 27 年 6 月 5 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://kcch.kanagawa-pho.jp/kccri/organization/seibutsu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越川直彦 (KOSHIKAWA Naohiko)

神奈川県立がんセンター臨床研究所・部長

研究者番号：70334282

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

執印太郎 (SHUIN Taro)

高知大学・副学長

研究者番号：70128601

鎌田雅行 (KAMADA Masayuki)

高知大学医学部泌尿器科学教室

非常勤講師

研究者番号：90304683

辛島尚 (KARASHIMA Takashi)

高知大学医学部泌尿器科学教室

講師

研究者番号：60304672