

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名            南            尚



論 文 題 目

**「Detection of tumor-associated antigens in culture supernatants using  
autoantibodies in sera from patients with bladder cancer」**

(膀胱癌患者血清中の自己抗体を用いた培養上清中の腫瘍関連抗原の検出)

指 導 教 授 承 認 印

佐藤 雄一

「Detection of tumor-associated antigens in culture supernatants using autoantibodies in sera from patients with bladder cancer」

(膀胱癌患者血清中の自己抗体を用いた培養上清中の腫瘍関連抗原の検出)

氏名 南 尚

【背景と目的】

膀胱癌は、尿路系癌（腎盂、尿管、膀胱）において、罹患数、死亡数ともに尿路系癌全体の半数以上を占め、外科的切除後に半数以上の患者で再発し、筋層浸潤を伴った患者の約 60%は術後 5 年以内に死亡する。加えて、組織学的異型度が高い非筋層浸潤膀胱癌の約 50% は筋層浸潤膀胱癌へ進行し、予後不良である。従って、より早期の段階での膀胱癌の発見や高悪性度な腫瘍を判別できる腫瘍マーカーが確立できれば患者の予後の大幅な改善が期待できる。しかし、現在までに膀胱癌の早期発見や再発、進展、予後を推定し得る血清診断マーカーや組織マーカーは存在せず、また既存の診断方法である病理組織診や尿細胞診でも極めて困難である。

種々の腫瘍細胞からは腫瘍の増殖や浸潤、転移に関与する腫瘍関連タンパク質が産生、分泌されており、癌患者の血液や尿などの様々な体液中や培養細胞の培養上清中に存在していることが報告されている。このことから、血清中の腫瘍関連タンパク質を対象としたスクリーニングは簡便かつ低侵襲性に癌の有無を知ることができる有用な方法であり、癌の治療効果予測や再発のモニタリングを行う際にも重要な役割を担うことが期待されている。よって、癌患者の体液を対象とした直接的なプロテオーム解析は腫瘍関連タンパク質を獲得する方法の一つとして有用と考えられ、実際に広く行われている。しかし、血清中にはアルブミンや免疫グロブリンなどの主要血清タンパク質が多量に存在しており、血清中の微量な腫瘍関連タンパク質の検出を困難にしている。

近年、腫瘍関連タンパク質に対して宿主より産生される腫瘍関連自己抗体を検出する方法は、血清中の腫瘍関連分子をより簡便かつ高感度に検出するための新たなバイオマーカーを見出す方法の一つとして注目されている。

その理由として、癌患者は腫瘍関連タンパク質に対する様々な腫瘍関連自己抗体を産生し、これらの自己抗体の対象となるタンパク質群の同定は様々な疾患のスクリーニングや免疫療法に有用であること、自己抗体を対象としたスクリーニングは PCR 法に匹敵するほどの感度を有していること等の報告がなされていることが上げられる。このことから本研究では、膀胱癌患者の血清中に含まれる腫瘍関連自己抗体を利用した腫瘍マーカー候補タンパク質の獲得を目指し、腫瘍の増殖や浸潤、転移に関与する腫瘍関連タンパク質を含むと報告されている膀胱癌細胞株の培養上清を対象として、組織学的異型度が異なる膀胱癌患者の血清中に含まれる自己抗体の検出を行った。

【材料と方法】

組織学的異型度の異なる 4 種類の膀胱癌細胞株を血清培地を用いて培養した。サブコンフルントとなった細胞株をリン酸緩衝食液で 2 度洗浄した。無血清培地を加え 48 時間培養後、その培養上清を回収した。限外濾過法により培養上清に含まれるタンパク質をそれぞれ濃縮した。濃縮試料より抽出したタンパク質を等量ずつ混合し、二次元電気泳動法により分離後、PVDF 膜にゲル中のタンパク質を転写した。4 例ずつの腫瘍の組織学的異型度が高い

(High-grade)または低い(Low-grade)膀胱癌患者の混合血清をそれぞれ一次抗体に用いた免疫ブロット(IB)法を行い自己抗体を検出した。IB法により PVDF 膜上で反応が検出できたスポットに対応するタンパク質スポットを CBB 染色後のゲルから切り出し、トリプシンを用いたゲル内消化後に質量分析計を用いて抗原タンパク質の同定を行った。さらに、14種類の同定したタンパク質に対応する合成タンパク質と 95例の膀胱癌患者血清ならびに 35例の健常者血清を用いた DotBlot 法により血清中に含まれる自己抗体の検証を行った。

#### 【結果】

培養上清中のタンパク質を対象とし、一次抗体に膀胱癌患者血清を用いた IB 法を行い、合計 138 個の自己抗体と反応するタンパク質スポットが検出できた。腫瘍の組織学的異型度に応じて反応を比較したところ、High-grade 膀胱癌患者血清のみで反応を示す 25 スポット、Low-grade 膀胱癌患者血清のみで反応を示す 32 スポットが確認できた。これらの自己抗体が認識したタンパク質スポットのうち、計 133 スポット(67種類)の抗原タンパク質が同定できた。DotBlot 法による解析の結果、膀胱癌患者血清中に含まれる Calreticulin 自己抗体と Matrix metalloproteinase-2 (MMP2)自己抗体の含有量は健常者群に比して優位に高いことが明らかとなった(それぞれ  $P < 0.05$ )。また、膀胱癌患者血清中に含まれる MMP2 自己抗体の含有量は Low-grade 群に比して High-grade 群で有意に増加していた( $P < 0.05$ )。さらに、多変量解析により膀胱癌患者血清中に含まれる MMP2 自己抗体の含有量は膀胱癌の癌特異的生存率を予測する独立した因子であることも明らかとなった( $P < 0.05$ , HR:2.62, 95%CI:1.04-6.58)。

#### 【考察】

今回同定したタンパク質には、培養細胞からのタンパク質抽出物を用いた検討では検出困難な MMP2 タンパク質を含む細胞外へ分泌される腫瘍関連タンパク質が多く含まれていた。

MMP2 タンパク質は様々な腫瘍細胞の細胞質や細胞膜で発現していることに加え、腫瘍細胞外へ分泌され、細胞外基質タンパク質の分解や血管新生、アポトーシス、細胞増殖などの様々な腫瘍促進プロセスに関与することが報告されている。膀胱癌患者血清中の MMP2 タンパク質の存在量は腫瘍の深達度や組織学的異型度に相関して増加しており、低発現群に比して高発現群患者では予後不良であることが報告されていたが、膀胱癌患者血清中に含まれる MMP2 に対する自己抗体の検出は行われていない。

MMP2 自己抗体は MMP2 タンパク質より早期に検出できる可能性も考えられることから今後、膀胱癌患者の血清中の MMP2 タンパク質と MMP2 自己抗体の存在量の関連性について検討を行い、膀胱癌患者血清中に含まれる自己抗体の存在量と臨床病理学的因子や患者の予後との関連性について解析を行う予定である。