

プロテオミクスを利用した尿路上皮癌のための 複合バイオマーカーの開発研究

課題番号 16591593

平成 16 年度~平成 17 年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))
研究成果報告書

平成 18 年 12 月

研究代表者 吉貴達寛
(滋賀医科大学医学部助教授)

滋賀医科大学附属図書館



2005016398

はしがき

われわれは、今回の助成金によって、下記のような研究を実施することができた。まず、膀胱癌に対してプロテオミクスを利用して、癌細胞で高発現する複数の蛋白質を同定し、それらが正常人に比べて癌患者の尿中でも量が多いことを明らかにした。次に、これら複数の尿中蛋白質を同時検出することが、尿路上皮癌の高い診断率につながることを証明した。まだ研究は臨床応用へ向けた途上にあるが、ここまでの進展に対する支援に対して深謝するものである。

論文としては、複合尿中マーカーに関するものだけでなく、まず単独マーカーとしてのカルレティキュリン論文と、新規蛋白質 C7orf24 論文も研究の全体像理解の参考として添付する。

研究組織

研究代表者: 吉貴達寛 (滋賀医科大学医学部助教授)

研究分担者: 若林賢彦 (滋賀医科大学医学部講師)

研究分担者: 金 哲将 (滋賀医科大学医学部講師)

研究分担者: 成田充弘 (滋賀医科大学医学部助手)

研究分担者: 上仁数義 (滋賀医科大学医学部助手)

交付決定額

	直接経費	間接経費
平成 16 年度	2,000 千円	0円
平成 17 年度	1,200 千円	0円
計	3,200 千円	

研究発表

(1) Iwaki H, Kageyama S, Isono T, Wakabayashi Y, Okada Y, Yoshimura K, Terai A, Arai Y, Iwamura H, Kawakita M, Yoshiki T. : Diagnostic potential in bladder cancer of a panel of tumor markers (calreticulin, gamma -synuclein, and catechol-o-methyltransferase) identified by proteomic analysis. Cancer Science 95:955-961, 2004

まず臨床応用の第一弾として、尿路上皮癌細胞で発現増加することが判明した9個の既知の蛋白質のうち、新規腫瘍マーカーとしてカルレティキュリン測定系を開発中である。この蛋白質について、各種疾患を含む251例の尿に対するウェスタンブロッティング法による検討では、尿路上皮癌検出率73%、特異性86%という非常に優れた結果であった。現在、市販の抗カルレティキュリン抗体を2種類使用して、商品に準じた測定系の開発に成功している。コストダウンと安定供給のために、現在、自前のマウス抗カルレティキュリンモノクローナル抗体を作製中である。標準物質についても、われわれが大腸菌で遺伝子工学的に作製した人工カルレティキュリン蛋白質が、測定系に採用可能な高品質であることが確認された段階にまで到達している。

さらに、カルレティキュリン単独の検出より成績を向上させるため、癌で発現増強する他の蛋白質の検出も組み合わせて検討中である。現時点では、ガンマシヌクレインとカテコール-O-メチルトランスフェラーゼという2種類の尿中蛋白質を同時検出することで、約5%の陽性率の改善に成功している。特異性に裏打ちされた約80%の検出率は、既存の腫瘍マーカーと比べ、驚異的である。しかも強調されるべき点は、一般の臨床応用キットで採用されている二抗体サンドウィッチ検出法より明らかに感度が低い実験室レベルのウェスタンブロッティング法によって、この優れた成績が達成されたことである。すなわち、予備的検出法の段階から臨床仕様のキットに完成されれば、さらに感度が高くなることが十分に期待できるとともに、その結果として既存の尿路上皮癌腫瘍マーカーを駆逐する可能性を秘めている。このようにして、順次互いに補完関係にある複数の蛋白質を検出系に組み込むことによって、従来の腫瘍マーカーの感度・信頼性を大幅に上回る測定系を開発可能である。

キーワード

(1) 尿路上皮癌、(2) 腫瘍マーカー、(3) プロテオミクス

ABSTRACTS OF RESEARCH PROJECT, GRANT-IN-AID FOR SCIENTIFIC RESEARCH

1. RESEARCH INSTITUTION NUMBER: 14202

2. RESEARCH INSTITUTION: The Department of Urology, Faculty of Medicine, Shiga University of Medical Science

3. CATEGORY: Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (2)

4. TERM OF PROJECT (2004 ~ 2005)

5. PROJECT NUMBER: 16591593

6. TITLE OF PROJECT: Development of combined tumor markers identified by proteomics in urothelial cancer

7. HEAD INVESTIGATOR

REGISTERED NUMBER	NAME	INSTITUTION, DEPARTMENT, TITLE OF POSITION
80230704	Tatsuhiro, Yoshiki	Shiga University of Medical Science, Faculty of Medicine, Associate Professor

8. INVESTIGATORS

(1)	REGISTERED NUMBER	NAME	INSTITUTION, DEPARTMENT, TITLE OF POSITION
(2)	80191724	Yoshihiko, Wakabayashi	Faculty of Medicine, Assistant Professor
(3)	10204968	Chol-Jang, Kim	Faculty of Medicine, Assistant Professor
(4)	00263046	Mitsuhiro, Narita	Faculty of Medicine, Assistant
(5)	90324590	Kazuyoshi, Johnin	Faculty of Medicine, Assistant

9. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

Using proteomic analysis, we previously identified calreticulin (CRT) as a potentially useful urinary marker for bladder cancer. Now, we have also identified gamma -synuclein (SNCG) and a soluble isoform of catechol-o-methyltransferase (s-COMT) as novel candidates for tumor markers in bladder cancer, by means of proteomic analysis. In the process of establishing a superior tumor marker system, we investigated the diagnostic value of a combination assay of these three proteins. Voided urine samples were obtained from 112 bladder cancer and 230 control patients. Urinary CRT, SNCG, and s-COMT were measured as a combined marker by quantitative western blot analysis. Relative concentration of each protein was calculated and the diagnostic value of a concomitant examination of these markers was evaluated by receiver operator characteristic analysis. With the best diagnostic cutoff, the overall sensitivity of the combined markers was 76.8% (95% confidence interval, 69-81%) with a specificity of 77.4% (72-80%),

while those of a single use of CRT were 71.4% and 77.8%, respectively. When evaluated in relation to tumor characteristics, such as grade, stage, size, and outcome of urinary cytology, the diagnostic capacity of the combined markers was equal to or better than that of CRT in all categories. Concomitant use of CRT, SNCG, and s-COMT had higher sensitivity for detection of bladder cancer than did single use of CRT. Our study suggests that use of this panel of markers will improve the diagnosis of bladder cancer and may allow the development of a protein microarray assay or multi-channel enzyme-linked immunosorbent assay.

10. KEY WORDS

(1) Urothelial cancer (2) Tumor marker (3) Proteomics

11. REFERENCES

AUTHORS , TITLE OF ARTICLE	JOURNAL, VOLUME-NUMBER,PAGES CONCERNED, YEAR
Iwaki H, et al. : Diagnostic potential in bladder cancer of a panel of tumor markers (calreticulin, gamma -synuclein, and catechol-o-methyltransferase) identified by proteomic analysis.	Cancer Science 95:955-961, 2004