

平成21年 6月 4日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591844

研究課題名（和文） 尿路上皮癌診断マーカー尿中カルレティキュリンテストの開発

研究課題名（英文） Development of urinary calreticulin test for the diagnosis of urothelial cancer.

研究代表者 影山 進

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：50378452

研究成果の概要： われわれは尿路上皮癌のプロテオーム解析により，小胞体タンパク質カルレティキュリン（CRT）が癌患者尿中で高率に検出されることを示し，尿中診断マーカーとしての可能性を示唆した（Kageyama et al., Clin Chem, 2004）. 今回，ELISA法による測定キットを作製したので，その診断能につき報告する. 【方法】リコンビナントヒトCRTを大腸菌に発現させ標準物質とした. ビーズに抗CRTモノクローナル抗体を固相化し96穴プレートに入れ，尿検体と反応後にPOD標識抗CRTポリクローナル抗体を結合させ化学発光で検出する，2抗体サンドイッチELISA法で測定した. 対象は膀胱癌患者尿（109検体），非膀胱癌患者尿（60検体，腎癌，前立腺癌，前立腺肥大症，尿路結石症など），および特に尿路異常を認めない健常者尿（40検体）である. 【結果】全209検体のCRT濃度測定の結果からROC曲線を作成し，もっとも診断効率の良い，2.85ng/mL以下を基準値と設定した. 膀胱癌患者尿（109検体）のCRT中央値は12.7ng/mL，74検体で陽性で感度は67.9%であった. 病理学的因子でみると，異型度G1:5.5±7.7（mean±SD），G2:42.3±63.8，G3:74.3±149.9，深達度Tis:15.6±17.5，Ta:48.9±130.6，T1:56.1±74.4，T2-4:69.0±86.0，腫瘍長径<1cm:16.4±30.6，1-3cm:60.4±83.4，3cm<:136.6±225.5ng/mLで，それぞれ臨床的悪性度が進むにつれてCRT値が増加した. 一方，非膀胱癌患者尿では中央値<0.5ng/mLで，15検体（25%）で偽陽性を呈した. 健常者尿と併せて非膀胱癌群とらえると，100検体中20検体で偽陽性を示し，特異度は80%であった. 【考察】尿中CRTは膀胱癌尿中診断マーカーとして臨床応用可能と考えられた.

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：尿路上皮癌；腫瘍マーカー；カルレティキュリン

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌を代表とする尿路上皮癌は泌尿器癌の中では前立腺癌に次いで罹患者が多い。わが国での膀胱癌の年間罹患者数は13700人(2000年)、死亡数は5046人(2001年)に上る。経尿道的切除術を受けた患者の約7割が膀胱内再発を繰り返すことから経過観察症例を含めて常時数万人におよぶ患者数が推測される。また、尿路上皮癌を示唆する最も重要な症状として血尿が挙げられるが、集団検診では成年女子の7%、男子の3%に顕微鏡的血尿を認め(木下ほか、日本医事新報, 1983)、尿路上皮癌のスクリーニング検査を要する被検者は数十万人以上に達すると見込まれる。

このように検査対象者が膨大であるにもかかわらず、尿路上皮癌の診断は必ずしも簡便ではない。通常、内視鏡検査が確定診断の決め手となるが、侵襲的・高コストで集団検診には適さない。多くの非癌患者も除外診断のためにこの侵襲的検査を受けているのも事実である。補助診断法として尿細胞診があるが、特異度(95~100%)に優れているものの感度(40~60%)は低く、殊に高分化癌では著しく不良である(0~15%)。また、主観的判定ゆえ診断士間の判定結果の相違もある。

われわれはこれらの問題点を解決できるような尿路上皮癌に特異的なタンパク質を求めて、尿路上皮癌組織と正常尿路上皮組織とを試料とした二次元電気泳動法によるプロテオーム解析を行ってきた(2002、2003、2004年日本泌尿器科学会総会、2002年日本癌学会総会にて発表)。この結果、癌組織で発現増強する10種の腫瘍マーカー候補タンパク質を同定した。カルレティキュリン(calreticulin、以下CRT)はこれらのうちの一つとして同定されたものである。

CRTは尿路上皮癌のみならず他臓器の癌でもその発現増強が確認されており、腫瘍増殖を間接的に反映すると推測されている。臓器選択性がないため血清マーカーでの使用には限界があると予測されるが、当該研究の扱う尿路上皮癌では尿中マーカーとしての可能性が考えられる。正常尿に混入するタンパク質としてアルブミンや β 2ミクログロブリンなどいくつかの代表的なものがあるが、CRTが多く含まれるという報告は見当たらない。よって当該物質を腫瘍マ-

ーカー候補とし、これまで検証実験をおこなってきた。

市販抗CRTモノクローナル抗体(SPA-601, StressGen, Canada)を用いて二次元ウェスタンブロット(WB)を行った。すると、当初より注目していたスポット(Mr 55 kDa, pI 4.3)以外に別のスポット(Mr 40 kDa, pI 4.4)にも免疫反応が認められた。癌と正常上皮の2DEゲル像で、Mr 55 kDaスポットは正常部に比べ癌部で明らかに強い反応を呈していたが、Mr 40 kDaスポットでは同等の強度であった。よって腫瘍マーカーとして利用するにはMr 55 kDa CRTの方が望ましいと考えた。両者のアミノ酸N末端シークエンスを行ったところ、ともにCRTの1から10番目のアミノ酸配列と一致した。続いてCRTのC末端に対するポリクローナル抗体(SPA-600, StressGen)を用いて、再び二次元WBを行ったところMr 55 kDaのスポットだけが認識された。これにより、Mr 40 kDaのスポットはCRTのC末端側のいずれかの部位で切断されたcleaved CRTであると推測された。以上より、われわれの目的とする腫瘍マーカーとしての性質を持ちうるのは、当初より着目していたMr 55 kDaのfull length CRTの方であると考え、この分子種を選択的に認識した抗C末端抗体を使用して多検体での検証を進めることとした。

膀胱癌組織22検体、正常上皮組織10検体を対象として、抗C末端抗体によるWBを行った。正常細胞にもCRTは存在しており両者の比較には定量化が必須であるため、標準物質にHeLa細胞lysateを使用し、その総タンパク1 μ gのWBから得られるCRTバンドの強度を1unitとした。癌組織、正常上皮組織とも総タンパク質1 μ gづつをロードしWBを行ったところ、膀胱癌では 1.02 ± 0.39 units/ μ g total protein (mean \pm SD)であるのに対し正常上皮では 0.40 ± 0.32 と有意に癌での発現増強が認められた(Mann-Whitney U検定、 $p=0.0003$)。

続いて実際に臨床応用の際の検体となる患者尿を試料として、WBによる検討を行った。膀胱癌70例、非膀胱癌179例による検討では、感度73%、特異度86%の高い診断効率を得た(2003年日本泌尿器科学会総会賞受賞; Clin Chem, 50: 857, 2004)。

米国FDAで臨床応用が承認され、わが国でも保険適応となっている尿中腫瘍マ-

一に BTA (bladder tumor antigen) と NMP22 (nuclear matrix protein-22) があるが、いずれも尿細胞診に比べ感度が向上したものの、特異度が低いのが難点である。より高い感度・特異度であることはもちろん、非侵襲的・低コスト・多数の検体に対応可能・短時間で結果が得られる、といった特長を持つ新しい検査法の開発が急務である。膀胱癌の罹患率、死亡率ともに高い米国では尿中診断マーカーの開発は熾烈を極めており、十数種類が候補物質として報告されているが、尿中 CRT を報告したのはわれわれが初めてである。当該研究の結果、尿中 CRT の高い有用性が明らかとなり臨床応用に至れば、多大な苦痛を伴う尿路内視鏡検査の要否の判断基準になり被検者にとって大きな福音となる。さらには、近年増加の一途をたどる医療費に対して抑制政策が施行されるなか、低コスト・高診断能の検査法の登場は患者、臨床医、健保支払機関のいずれにも待ち望まれており、医療経済的にも意義あるものになると考えられる。以上の背景から下記の研究を立案した。

2. 研究の目的

われわれはすでに ELISA の標準物質となるヒト CRT リコンビナントタンパク質を作製し、二種類の市販抗 CRT 抗体によるサンドイッチ ELISA アッセイシステムを試作した。今回の交付期間においては、(1) 独自の抗 CRT モノクローナル抗体を樹立し、市販抗体によらないアッセイシステムを作製すること、(2) われわれがすでに保有している数百検体にのぼる患者尿を対象として尿中 CRT を測定し診断能を確かめること、(3) 既存の検査室システムに汎用されている ELISA 法による定量的尿中 CRT 測定キットの作製を行い、臨床応用を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

1) モノクローナル抗体作製

大腸菌発現ヒト CRT リコンビナントタンパク質を作製し、これを免疫原として全長型 CRT だけを選択的に捉える ELISA システムを構築できる、少なくとも 2 クローンのモノクローナル抗体を樹立する。すなわち

C 末端を特異的に認識するクローンを 1 つ、N 末端側に近い所を認識するクローンを 1 つ、それぞれ樹立する必要がある。

なお、CRT は N 末端側が酵素分解に極めて強く、一方、C 末端側は分解されやすいという特性を持つ (Højrup P et al. *Eur J Biochem* 268: 2558, 2001)。したがって抗 C 末端抗体の樹立は必須事項である。

2) 2 抗体サンドイッチ ELISA 測定系の確立

モノクローナル抗体の樹立に成功したら、それらを用いて 2 抗体サンドイッチ ELISA 測定系の作製を目指し、アッセイ法諸条件 (固相抗体および検出抗体の濃度、発色方法の選択、反応時間など) の検討を行う。

3) 臨床検体 (自然排泄尿) の収集・保存

検体を得る患者には臨床材料の当該研究への使用につき十分な説明を行い、同意を得る。尿路上皮癌患者および対照者 (尿路上皮癌以外の泌尿器悪性腫瘍、尿路結石症、前立腺肥大症、尿路感染症などのほか、明らかな疾患を有さない健常者からも収集する) の自然排泄尿を採取する。確定診断名 (臨床病期等のデータを含む)、検尿所見はもちろん、可能な限り尿細胞診の結果も併せて記録する。

4) ELISA による尿中 CRT の測定

上記の検体から、先に確立した ELISA システムにより尿中 CRT 値を測定する。再現性保持のため、少なくとも duplicate で測定する。

5) データ解析

尿路上皮癌群と対照群の尿中 CRT 濃度を集計し、ROC 曲線を作成して最も有効なカットオフ値を決定する。

6) 論文作成

一連の結果を論文化する。

4. 研究成果

当初予定の自製モノクローナル抗体は研究期間中に樹立可能であったが、交差反応の有無、感度の検討などの基礎的検証がまだであったため、同時に行った市販抗体 2 種による ELISA キット構築を行った。

リコンビナントヒトCRTを大腸菌に発現させ標準物質とした。ビーズに抗CRTモノクローナル抗体(SPA-601, StressGen, Canada)を固相化し96穴プレートに入れ、尿検体と反応後にPOD標識抗CRTポリクローナル抗体(SPA-600, StressGen, Canada)を結合させ化学発光で検出する、2抗体サンドイッチELISA法で測定した。下図(Fig1)に標準曲線を示す。なお測定可能最小値は0.5ng/mLであった。

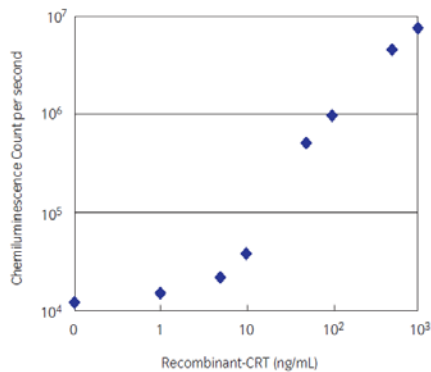


Fig. 1 Standard plots measured by recombinant calreticulin (CRT) protein.

対象を膀胱癌患者尿(Group 1; 109検体)、非膀胱癌患者尿(Group 2; 60検体、腎癌、前立腺癌、前立腺肥大症、尿路結石症など)、および特に尿路異常を認めない健常者尿(Group 3; 40検体)として我々のCRT測定ELISAで尿中濃度を測定した。各群の平均濃度はGroup 1, 2, および 3でそれぞれ12.7, <0.5, <0.5ng/mLであった。(Fig2)

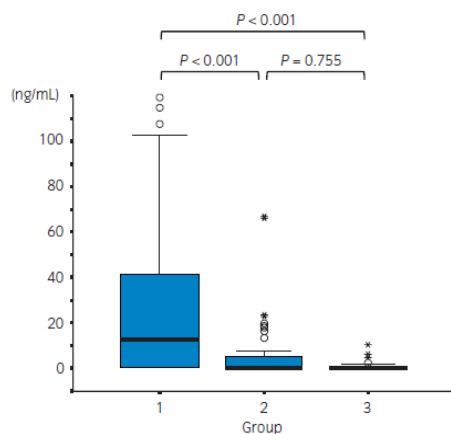


Fig. 2 Box plot shows results of concentrations of urinary calreticulin (CRT) of Groups 1, 2, and 3. Each box stretches from the 25th percentile at the lower edge to the 75th percentile at the upper edge; the median is shown as a line across the box. Each bar above and below boxes indicates the 90th and 10th percentile. Outside values above the maximum limit of Y-axis were omitted.

全209検体のCRT濃度測定の結果からROC曲線を作成し、もっとも診断効率の良い、2.85ng/mL以下を基準値と設定した。(Fig3)

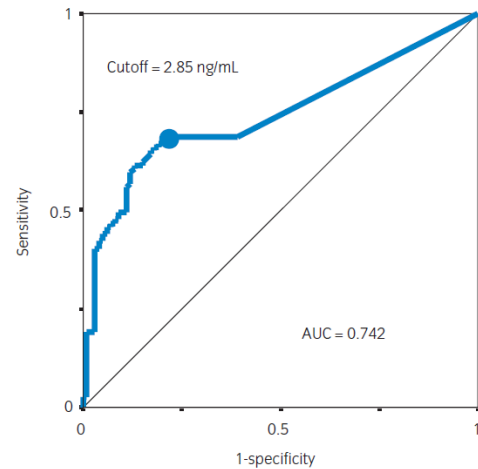


Fig.3 ROC 曲線

膀胱癌患者尿(109検体)のCRT中央値は12.7ng/mL、74検体で陽性で感度は67.9%であった。病理学的因子でみると、異型度G1:5.5±7.7(mean±SD)、G2:42.3±63.8、G3:74.3±149.9、深達度Tis:15.6±17.5、Ta:48.9±130.6、T1:56.1±74.4、T2-4:69.0±86.0、腫瘍長径<1cm:16.4±30.6、1-3cm:60.4±83.4、3cm<:136.6±225.5ng/mLで、それぞれ臨床的悪性度が進むにつれてCRT値が増加した。一方、非膀胱癌患者尿では中央値<0.5ng/mLで、15検体(25%)で偽陽性を呈した。健常者尿と併せて非膀胱癌群とらえると、100検体中20検体で偽陽性を示し、特異度は80%であった。

以上の結果から尿中CRTは膀胱癌尿中診断マーカーとして臨床応用可能と考えられた。

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1件)

- ① Kageyama S, Isono T, Matsuda S, Ushio Y, Satomura S, Terai A, Arai Y, Kawakita M, Okada Y, Yoshiki T. Urinary calreticulin in the

diagnosis of urinary bladder
urothelial carcinoma.
International Journal of Urology
16:481-486, 2009 (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

影山 進

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：50378452

(2) 研究分担者

吉貴 達寛

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80230704

成田 充弘

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：00263046

上仁 数義

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90324590

(3) 連携研究者

なし