第55回児玉賞受賞者論文
論文種目：総説

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

佐藤雄 — 1, 2, 3,*

¹ 北里大学医療衛生学部臨床検査学

² 北里大学大学院医療系研究科応用腫瘍病理学

³ 北里大学医療衛生学部附属再生医療・細胞デザイン研究施設

(受付 2017 年 2 月 22 日, 受理 2017 年 4 月 18 日)

SUMMARY

Autoantibodies (AABs) are antibodies detected in sera from patients with various autoimmune diseases. Because they are also observed in sera from patients with various malignancies before cancer-associated antigens can be detected and found even in sera up to five years before symptomatic disease, many researchers have paid attention to serum AABs for early cancer detection. In this review, we described our methodology to detect early tumor-specific, chemo-sensitivity predictive, and prognostic autoantigens that recognized by autoantibodies in sera from patients with lung and bladder cancers using by two-dimensional gel electrophoresis combined with immunoblot analysis.

Key words: serum, autoantibody, lung cancer, bladder cancer, chemoresistance

はじめに

当研究室では、各種プロテオーム解析手法を駆使して、肺癌や膀胱癌を中心とした癌の早期診断、患者の予後予測マーカー、化学療法効果予測マーカー等の獲得を目指した研究を臨床各科と共同で展開している。特に疾患診断マーカーとしての自己抗体の解析に関しては、臨床検査への応用を目指した研究を産業技術総合研究所の五島直樹チーム長が代表研究者、佐藤雄一は分担研究者の一人としてAMEDの研究費を獲得しながら進めている。

当研究室における自己抗体研究に関しては、2014、2015年の日本電気泳動学会総会のシンポジウムで発表し、その内容を電気泳動誌に発表してきた^{1,2)}。本論文では、我々の研究グループで行ってきた内容を整理して、分かりやすく紹介したい。

肺癌患者血清の自己抗体解析³⁾

肺の腺癌 (AC), 扁平上皮癌 (SCC), 小細胞癌 (SCLC), 大細胞性神経内分泌癌 (LCNEC) 由来細胞株から抽出したタンパク質を電気泳動しメンブレンに転写後、各種組織型の肺癌患者血清を一次抗体として反応させると、患者により様々な分子量のタンパク質と反応する自己抗体が検出されることを確認している。この実験結果から、今後の自己抗体解析の基本となる手法を確立するために、タンパク質を二次元に展開し PVDF 膜に転写後に、希釈した肺癌患者の血清を一次抗体として反応させ、二次抗体として HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を反応させ、最終的に AEC もしくは DAB 反応にて抗原抗体複合物を可視化する、いわゆる二次元免疫ブロット (2D-IB) 法を行うことで腫瘍特異的マーカー候補の獲得を目指した。反応したタンパク質スポットは、同時に電気泳動し CBB 染色を施したゲルから切り出し、トリプシン消化後に質量分析装置を用いて抗原

Acquisition of tumor-associated antigens using autoantibodies in sera from patients with cancer

Yuichi Sato

¹ Department of Molecular Diagnostics, School of Allied Health Sciences; ² Department of Applied Tumor Pathology, Graduate School of Medical Sciences; and ³ Research Facility for Regenerative Medicine and Cell Design, School of Allied Health Sciences, Kitasato University

* Corresponding author: Yuichi Sato; Department of Molecular Diagnostics, School of Allied Health Sciences, Kitasato University, 1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-0373, Japan
E-mail: yuichi@med.kitasato-u.ac.jp

第67回日本電気泳動学会総会・第55回児玉賞受賞者論文

の同定を行った。その結果、AC 患者から Cytokeratin 18 (CK18) を、SCLC 患者から Villin1 抗原を同定した。特異的抗体を用い肺癌組織を免疫染色した結果、CK18 の陽性率は AC, SCC, SCLC, LCNEC で有意な相違は認められなかったが、染色スコアでは AC が SCC や SCLC に比して有意に高いことを見出した。その後、2-DE 法を用いた検討で CK18 だけでなく CK7, CK8, CK19 の染色スコアは全て AC に比して SCC で有意に低いこと、神経内分泌肺癌である LCNEC に比して SCLC でも有意に染色スコアが低いことを見出し報告した⁴⁾。

Villin1 の発現は消化管からの転移性肺癌に発現しており、原発性肺癌との鑑別診断に有用であることが報告されている⁵⁾。しかし、今回の検討では 44 例中 17 例 (38.6%) の原発性肺腺癌に発現が認められたことから、両者の鑑別は困難であることを明らかにした。さらに、SCLC では 28 例中 1 例のみに弱い細胞質発現が認められたが、LCNEC では 34 例中 21 例 (61.8%) で明瞭な発現が認められ、AC や SCLC では見られない細胞膜発現が半数例以上で認められることから、villin1 の膜発現は LCNEC の鑑別に有用であることも合わせて報告した。

神経内分泌肺癌 SCLC と LCNEC の鑑別のための 自己抗体解析⁶⁾

神経内分泌肺癌のマーカーは種々知られているが、SCLC と LCNEC を鑑別するマーカーの報告はない。そこで、両者の鑑別診断マーカー獲得を目指し、患者血清を一次抗体として用いた 2D-IB 法を行った。SCLC 細胞株と SCLC 患者血清もしくは LCNEC 細胞株と LCNEC 患者血清の組み合わせで、それぞれの細胞株から抽出したタンパク質を二次元に展開し PVDF 膜に転写後、それぞれの患者血清を一次抗体として反応させ、患者血清中の自己抗体が認識する抗原をゲルから切り出し、抗原タンパク質の同定を行った。その結果、反応したタンパク質スポットは SCLC で 63 個、LCNEC で 62 個が見出され、それぞれ 41 抗原、32 抗原が同定された。両者で共通した抗原は 18 個のみであり、異なった抗原を認識する自己抗体が大半を占めた。この中で SCLC のみに認められた 15 個の抗原のうち、これまで SCLC のマーカーとして報告のある Hu-antigen C (Hu-C) とそのファミリーである Hu-antigen D (Hu-D) に対する自己抗体の有無を検討した結果、傍腫瘍性神経症候群の有無にかかわらず SCLC 患者では、それぞれ 31 例中 4 例と 6 例に認められたが、他の組織型の患者では全く認められなかった。組織での Villin1 と同様に血清中の Hu-C, Hu-D 自己抗体の有無は SCLC と LCNEC の鑑別に有用であることを報告した。さらに、高感度な手法を用いることにより、さらに検出率を上昇させられる可能性がある。

膀胱癌の分泌タンパク質に対する自己抗体解析⁷⁾

分泌タンパク質を対象とした 2D-IB を用いた膀胱癌の腫瘍特異的マーカー獲得を目指した研究。分泌タンパク質は様々な生理機能を有しており、癌の発症や進展に重要な役割を担っていることが報告されている⁸⁾。また、早期癌である非筋層浸潤癌でも組織学的異型度が高い腫瘍は高率に筋層浸潤を来し、予後不良であることも知られている。そこで今回は、膀胱癌細胞株から抽出したタンパク質を二次元展開し、一次抗体としては非筋層浸潤癌で組織学的異型度が低い患者群 (low-grade) もしくは高い患者群 (high-grade) の血清を反応させ、high-grade のみで検出される抗原を見出し、その確認を多数例の血清で行うこと、健常人との鑑別診断に有用か否か、膀胱癌患者の予後との関連性等を検討した。その結果、high-grade のみで認められた 25 個の自己抗体が反応するスポット中 17 個の抗原タンパク質が同定された。その中で、分泌タンパク質として登録されている Calreticulin, Cathepsin D, Serpin B5, Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 等を含んだ 6 種の抗原タンパク質を選び合成タンパク質を作製し、多数例の膀胱癌患者と健常人血清を用い、ドットプロット法で自己抗体量を検討した結果、Calreticulin と MMP-2 が健常人に比して膀胱癌患者血清で有意に自己抗体量が高いことを見出した。さらに、MMP-2 抗体量は low-grade に比して high-grade 膀胱癌患者血清で有意に高いことを証明した。また、MMP-2 自己抗体量は多変量解析の結果、cancer-specific survival において独立した予後不良因子であることも報告した。この研究により、非筋層浸潤癌でも MMP-2 に対する自己抗体量の高い患者は、より積極的治療を行う必要性があり、治療に対する症例の階層化に有用である可能性を指摘した。

Calreticulin と Calnexin はお互いに相同性のあるレクチン様分子シャペロンであり、Calreticulin/Calnexin cycle を通してタンパク質の合成や折りたたみを担っていることが報告されている。我々は reverse-phase protein array (RPPA) 法を用いた検討で、血清中の calnexin 量は健常人に比して肺癌患者血清で有意に高く、receiver-operating characteristics (ROC) 解析の結果、両者を AUC = 0.98 で鑑別可能であることを報告した⁹⁾。今後、両者の関連性等について検討していく予定である。

肺癌組織と同一患者血清を用いた自己抗体解析¹⁰⁾

患者血清を一次抗体として自己抗体解析を行う際に、対象とするタンパク質を細胞株にするか腫瘍組織にするかで獲得されるタンパク質が同じか異なるのかを詳細に検討した論文はない。この研究では従来行っている肺腺癌細胞株と肺腺癌患者血清を用いた解析に加えて、肺癌組織と同一

患者血清を用いた自己抗体解析を行い、両者で同定される抗原タンパク質が異なるのか否かの検討を行った。その結果、3例の腫瘍組織と同一患者の血清を用いた検討では58スポット45抗原タンパク質、細胞株と同じ3例の肺腺癌患者血清を用いた検討では53スポット41抗原タンパク質が同定され、同じような検出割合であったが、同じ血清を用いた検討でも両方で同定されたタンパク質は9個のみであり、肺腺癌組織もしくは肺腺癌細胞株のみに認められたタンパク質はそれぞれ36個、32個であり、用いるタンパク質により獲得できる抗原タンパク質は大きく異なることが明らかとなった。腫瘍組織を用いた解析で同定された Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 (BIGH3) や Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1) などは癌間質に発現しているタンパク質であり、腫瘍組織を用いた自己抗体解析では、腫瘍細胞に加えて腫瘍の浸潤、転移等に大きな役割を担っている癌間質成分に対する自己抗体も検出出来ることが明らかとなった。

また、肺腺癌組織のみに認められたタンパク質の中に Vimentin も同定されているが、Vimentin は微乳頭肺腺癌とその他の肺腺癌組織の 2-DE 解析で、その他の肺腺癌組織に比して微乳頭肺腺癌では 3.5 倍発現量が上昇しており、101 例の微乳頭肺腺癌を用いた Vimentin に対する免疫染色で 95 例 (94.1%) に発現が認められたことを最近報告した¹¹⁾。さらに、2-DE 法を基本とした解析で Vimentin 陽性の微乳頭肺腺癌はより脈管浸潤やリンパ節転移の頻度が有意に高く、多変量解析の結果、Vimentin 陽性の微乳頭肺腺癌は独立した予後不良因子であることを証明した。このように自己抗体解析で見つかったタンパク質は、他のプロテオーム解析でも証明されることが多い。

肺癌におけるシスプラチン感受性予測マーカー獲得のための自己抗体解析¹²⁾

肺癌は初診時、すでに進行癌のことが多く、完全切除が困難な場合、再発や遠隔転移のあるステージ IV 期を除きその一次治療にはプラチナ製剤を中心とした多剤併用療法や放射線化学療法が用いられている。しかし、現在は免疫チェックポイント阻害薬や種々の分子標的治療薬など、治療の選択範囲は広くなっており、治療前に特定の治療の効果予測が出来れば、効果の低い治療や副作用から患者を解放することが出来る。しかし、そのような治療前の検討はなされていない。今回、肺腺癌細胞株でシスプラチン耐性にした亜株からタンパク質を抽出し 2-DE 法で展開し、PVDF 膜に転写後、シスプラチンを基本とした多剤併用療法で、部分奏効 (Partial Response, PR) もしくは進行 (Progressive Disease, PD) のそれぞれ 3 例の治療前血清を混合し一次抗体として 2D-IB を行い、両者で自己抗体が認識する抗原タンパク質を検討した。その結果、PR 患者

では 63 スポット 12 抗原タンパク質、PD 患者では 95 スポット 51 抗原タンパク質が同定された。その中で PD 患者のみで認められた Galectin-3 について、シスプラチン耐性亜株とその感受性親株で免疫ブロット法と免疫染色法で発現の程度を検討した。その結果、シスプラチン耐性株で発現量が亢進していることを確認した。さらに、プラチナ製剤を基本とした治療で効果の分かっている肺癌患者の治療前血清における Galectin-3 に対する自己抗体量を比較検討した。この検討の際、反応させるタンパク質として合成したものと癌細胞から抽出したものをを用いて検討したが、肺癌患者血清中の自己抗体は合成タンパク質とは反応せず、肺癌細胞株から抽出したタンパク質とのみ反応した。このことから、癌組織中のタンパク質は様々な腫瘍特異的翻訳後修飾を受けており、癌患者が有する自己抗体も何等かの修飾を受けたタンパク質に対して反応している可能性が示唆される。検討の結果、PR や安定 (Stable Disease, SD) に比して PD では有意に高く、Galectin-3 はプラチナ製剤治療の疾患制御率の検討に使用できる可能性が示唆された。また、ROC 解析では両者を AUC が 0.84 で鑑別できることも明らかにした。今後、肺癌の術後補助化学療法や、放射線化学療法の効果予測因子の検討を同様な方法で検討していく予定である。

その他、乾癬の診断に有用なマーカー獲得に向けた自己抗体解析^{13, 14)}

尋常性乾癬や乾癬性関節炎の診断や両者の鑑別に有用なマーカー候補タンパク質を獲得することを目的に、ヒト正常上皮細胞とヒト類表皮癌細胞から抽出したタンパク質を等量混合し、2-DE 法で展開し PVDF 膜に転写後、それぞれ 3 例ずつの尋常性乾癬患者と乾癬性関節炎患者血清を一次抗体として 2D-IB を行い反応する自己抗原を解析した。その結果、尋常性乾癬と乾癬性関節炎患者では 37 スポットと 33 スポットのタンパク質がそれぞれの自己抗体と反応した。それらの中で健常人血清との反応性が 1.5 倍以上のタンパク質を陽性とした結果、尋常性乾癬患者と乾癬性関節炎患者でそれぞれ 11 種類ずつのタンパク質が自己抗原として同定された。さらに同定された抗原タンパク質の量を 31 例の尋常性乾癬、12 例の乾癬性関節炎、13 例の健常人血清を用いてドットブロット法で比較検討したところ、Moesin と Stress induced phosphoprotein 1 (STIP1) の発現は健常人に比して尋常性乾癬患者で有意に高いこと、ROC 解析ではそれぞれ AUC が 0.747 と 0.792 で両者を鑑別できることが明らかとなった。また、STIP1 と CK17 の発現は尋常性乾癬に比して乾癬性関節炎患者血清で有意に高く、両者をそれぞれ AUC が 0.69 と 0.72 で鑑別できることも明らかとなった。これらの結果から、STIP1 と moesin は尋常性乾癬と乾癬性関節炎患者を鑑別する

新たなマーカーとなることが示唆された。同様に Valosin containing protein (VCP) は尋常性乾癬や健康人血清に比して乾癬性関節炎患者血清で有意に高く、乾癬患者の鑑別に有用な新たなマーカーとなる可能性を新たに報告した¹⁴⁾。

おわりに

当研究室では2002年から腫瘍関連タンパク質の獲得に向けて、主に2-DE法を基盤とした各種プロテオーム手法を駆使した研究を行ってきた。今回はその中で、腫瘍マーカー獲得の一方法として患者血清を一次抗体として用いた2D-IB法を用いた研究を中心に当研究室での成果を報告した。これらの研究の積み重ねが、日本電気泳動学会の伝統ある児玉賞に結びついたものと考えている。今後も、臨床各科と密な共同研究体制を維持しながら、プロテオーム解析を中心とした疾患のTranslational Researchを進めていきたい。

謝 辞

この研究は当研究室の鉢村和男先生、長塩亮先生を初めポストドクの柳田憲吾先生、現在MDアンダーソンがんセンターに留学されている小林信先生、当研究室所属の大学院生、医学部病理学の三枝信先生、村雲芳樹先生、呼吸器内科学の益田典幸先生、呼吸器外科学の佐藤之俊先生、泌尿器科学の岩村正嗣先生、松本和将先生など多数の方々の協力で成り立っております。ここに深く感謝致します。

本論文に関して開示すべき利益相反状態は無い。

文 献

- 1) 佐藤雄一, 長塩亮, 小林信ら. 自己抗体が認識する抗原タンパク質の検出法の開発. 電気泳動. 2014;58:68-70.
- 2) 佐藤雄一, 長塩亮, 小林信ら. 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. 電気泳動. 2015;59:129-131.
- 3) Nagashio R, Sato Y, Jiang SX, *et al.* Detection of tumor-specific autoantibodies in sera of patients with lung cancer. Lung Cancer. 2008;62:364-372.
- 4) Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T, *et al.* Significant high expression of cytokeratins 7, 8, 18, 19 in pulmonary large cell neuroendocrine carcinomas, compared to small cell lung carcinomas. Pathol Int. 2010;60:71-77.
- 5) Nambu Y, Lannetoni MD, Orringer MB, *et al.* Unique expression patterns and alterations in the intestinal protein villin primary and metastatic pulmonary adenocarcinomas. Mol Carcinog. 1998;23:234-242.
- 6) Matsumoto T, Ryuge S, Kobayashi M, *et al.* Anti-HuC and -HuD autoantibodies are differential sero-diagnostic markers for small cell carcinoma from large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. Int J Oncol. 2012;40:1957-1962.
- 7) Minami S, Nagashio R, Ueda J, *et al.* Detection of tumor-associated antigens in culture supernatants using autoantibodies in sera from patients with bladder cancer. Biomed Res. 2014;35:25-35.
- 8) Stastna M, Van Eyk JE. Secreted proteins as a fundamental source for biomarker discovery. Proteomics. 2012;12:722-735.
- 9) Kobayashi M, Nagashio R, Jiang SX, *et al.* Calnexin is a novel sero-diagnostic marker for lung cancer. Lung Cancer. 2015;90:342-345.
- 10) Kobayashi M, Nagashio R, Ryuge S, *et al.* Acquisition of useful sero-diagnostic autoantibodies using the same patients' sera and tumor tissues. Biomed Res. 2014;35:133-143.
- 11) Nakashima H, Jiang SX, Sato Y, *et al.* Prevalent and up-regulated vimentin expression in micropapillary components of lung adenocarcinomas and its adverse prognostic significance. Pathol Int. 2015;65:183-192.
- 12) Yanagita K, Nagashio R, Ryuge S, *et al.* Serum anti-Gal-3 autoantibody is a predictive marker of the efficacy of platinum-based chemotherapy against pulmonary adenocarcinoma. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16:7959-7966.
- 13) Maejima H, Nagashio R, Yanagita K, *et al.* Moesin and stress-induced phosphoprotein-1 are possible sero-diagnostic markers of psoriasis. PLoS One. 2014;9:e101773.
- 14) Maejima H, Kobayashi M, Yanagita K, *et al.* Valosin-containing protein is a possible sero-diagnostic marker of psoriatic arthritis. Biomed Res-India. 2017;28:442-446.