

大腸がんの特異的に発現する新規分子を標的とした高感度検出法の確立

2017年3月修了 がん先端生命科学分野 47-156365 米山諒

指導教員 松村保広 教授

安永正浩 教授

【キーワード】 大腸がん、エクソソーム、TMEM180、CLEIA 法

【研究背景・目的】

TMEM180は11回膜貫通型タンパク質であり、その機能は明らかとなっていない。通常、大腸がん特異的タンパク質を同定するためには大腸がん組織と正常組織の比較を行うがこの方法ではがん組織と正常組織で共通する血球系細胞や血管内皮細胞、繊維芽細胞などの間葉系の細胞が比較の妨げになる。たとえレーザーマイクロディセクション法を使用したとしても、正常大腸組織から大腸がんのオリジナルである大腸粘膜細胞のみを得ることは不可能である。当研究室では便中にCD44バリエーションを発現する大腸がん細胞とCD44スタンダードのみを発現する多くの正常大腸上皮細胞が存在することを報告してきた。この研究より、大腸内視鏡検査時の大腸洗浄液から回収した正常大腸上皮細胞と大腸がん細胞株を比較することにより純粋に上皮細胞同士の比較を可能とした。同様の方法を用いて我々はTMEM180が大腸がん細胞に特異的に発現していることを明らかとした。

本研究では大腸がんにおいて特異的に発現するタンパクであるTMEM180に着目しChemiluminescent Enzyme Immunoassay(CLEIA法、図1-1)による検出方法の確立を目的とした。この系を用いて臨床検体を用いて大腸がんの腫瘍マーカーあるいは検診としての有用性を検討する。

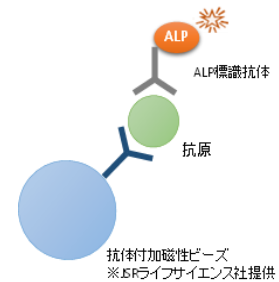


図1-1. CLEIA法概念図

【方法】

1. TMEM180が細胞外に放出されていれば体液中にて検出が可能であると考え、細胞培養上清を用いてELISAによる反応を確認した。さらに抗エクソソーム抗体である抗CD9抗体、抗CD63抗体、抗CD81抗体と抗TMEM180抗体を組み合わせたサンドイッチELISAを行いエクソソーム上におけるTMEM180の存在を調査した。また、単離したエクソソームの透過型電子顕微鏡写真の撮影を行った。
2. DLD-1細胞野生株から得た培養上清を用いて、1.で決定したサンドイッチELISAの組み合わせによりCLEIA法での測定を行った。
3. 血中でのTMEM180の検出が可能であるかの検討をするために、DLD-1細胞の培養上清と健常者血清を混合することで模擬大腸がん血液検体を作製しCLEIA法で測定した。その後、各ステージにおける大腸がん患者検体の測定を行い、健常者検体との比較を行った。

【結果】

1. 培養上清中のTMEM180

抗TMEM180抗体を用いてDLD-1細胞野生株から得た培養上清を測定したところ反応が見ら

れた。そこで抗エクソソーム抗体と抗 TMEM180 抗体でサンドイッチ ELISA を行ったところ TMEM180 はエクソソーム上に存在することが明らかとなった(図 1-2)。また、透過型電子顕微鏡写真からもエクソソーム上に TMEM180 が存在することが確認されている(図 1-3)。

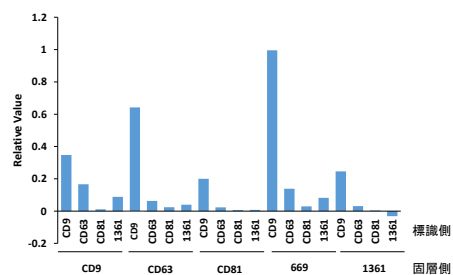


図 1-2. サンドイッチ ELISA 組み合わせ試験

2. 高感度タンパク検出法(CLEIA 法)

DLD-1 野生株から得た培養上清を段階希釈し、サンドイッチ ELISA にて最も感度が高い組み合わせを用いて検量線を作成した。その結果、サンドイッチ ELISA 法と比較して 8 倍の感度を有することが明らかとなった(図 1-4, 表 1-1)。

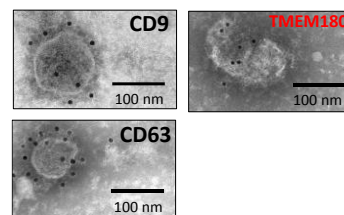


図 1-3. 透過型電子顕微鏡写真

3. 臨床検体を用いた解析

健康者ボランティアから得た健康人血清何例および、大腸がん患者血清 68 例の測定を行った。図 1-5 に測定結果の箱ひげ図(A)と健康者血清の測定結果(B)を示す。また、健康者血清の平均値である 410.8 の 3 倍の値である 1232.4 をカットオフ値として算出した各ステージによる陽性的中率を表 1-2 に示した。

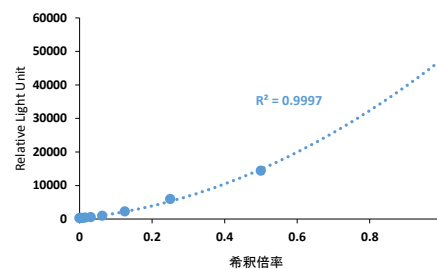


図 1-4. CLEIA 法による培養上清の希釈曲線

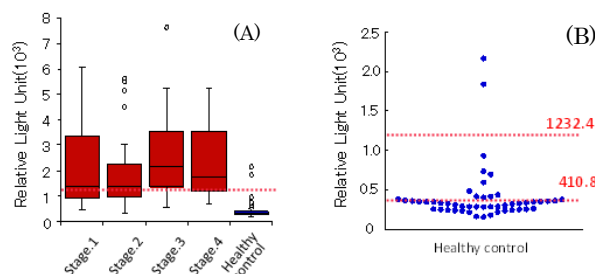


図 1-5. 各ステージにおける大腸がん患者血清および健康者血清の測定結果(A)および健康者血清測定結果の拡大図(B) (n=2)

表 1-1. CLEIA 法による大腸がん患者血清測定の陽性率

	St.1	St.2	St.3	St.4	Total
TMEM180/CD9	61.1% (11/18)	53.8% (14/26)	80.0% (16/20)	75.0% (3/4)	64.7% (44/68)
CEA	0% (0/18)	19.2% (5/26)	45.0% (9/20)	50.0% (2/4)	23.5% (16/68)

※ Specificity: 96%(48/50)
Cutoff value: average of healthy controls x 3

【結論】

本研究では CLEIA 法による検出基盤を構築することに成功した。サンドイッチ ELISA 法と比較すると 8 倍の感度が認められているため、より低発現の大腸がん抗原を検出することが可能となった。大腸がん患者血清と健康者血清の測定結果では S/N=3 で特異度 96% という高い値を達成した。特異度が高い TMEM180 をターゲットとした測定法は FOBT と組み合わせた検診法として期待される。臨床応用を実現させるためにはさらに測定検体を増やし、大腸がん陽性者と陰性者区別する閾値を設定する必要がある。今回構築したこの系は早期診断として使用していく方法や、リキッドバイオプシーとして抗がん剤の効果や副作用を事前に予測するためのコンパニオン診断に使用できる可能性も秘めており継続して開発を行っていく予定である。