

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医療分野研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラム(A-STEP)
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer
Adaptable and Seamless Technology Transfer Program Through Targetdriven R&D

研究開発課題名： (日本語) 血中のラミニン γ 2 単鎖をバイオマーカーとする膀胱癌の早期診断法の開発
(英語) Development of an early diagnostic method for bladder cancer targeted to monomeric laminin- γ 2

研究開発担当者 (日本語) 総合研究所 所長 吉村 徹
所属 役職 氏名： (英語) Diagnostic Division, Director, Toru Yoshimura.

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

1. 研究開発の目的

早期診断に有効な手段のない膀胱癌、消化器癌の検出マーカーとして、ラミニン γ 2 単鎖の有用性を確認する。癌化した細胞のみが産生するというラミニン γ 2 単鎖の特徴を生かした測定系を構築し、早期癌の診断薬、特に将来、検診への展開を念頭に開発を行う。

2. 研究開発の概要

(1) 測定条件の最適化

高感度化と測定値の信頼性確保を目標に挙げる。マーカー測定では、非特異的反応を最小限に抑えることが重要である。そこで、実検体、血清や尿を用い、測定系への影響を検討する。

(2) 腫瘍マーカーとしての臨床的有用性の確認

泌尿器、消化器疾病患者検体を用い、特異度、検出率等を検証する。臨床的な有用性確認のため、健常人、良性疾患、早期、進行がん患者検体中のラミニン γ 2 単鎖の測定を実施する。

3. 研究開発の成果 (平成 28 年度)

(1) アーキテクト測定試薬の評価【アボットジャパン株式会社、神奈川県立がんセンター】

ラミニン γ 2 単鎖と同じアミノ酸配列の γ 2 鎖を含むラミニン 332 との交差反応についての検討を

行った。ラミニン γ 2単鎖特異的抗体を固相化した磁性粒子を用いて免疫沈降実験を行ったところ、検体中のラミニン332との交差反応は認められなかった。また、血清、尿を用いたラミニン γ 2単鎖添加回収試験、希釈直線性試験を行い、試作測定キットの性能を評価した。

(2) **尿検体安定性検討【神奈川県立がんセンター】**

尿中のラミニン γ 2単鎖について、熱安定性試験を行い、検体採取、長期保存法についての知見を得た。

(3) **試作測定キットの性能検討用検体の採取、保存【高知大学、神奈川県立がんセンター、アボットジャパン株式会社】**

早期、進行膀胱癌を含む泌尿器系疾患患者、健常人の検体を採取し、試作測定キットを用いてラミニン γ 2単鎖の測定を実施した。その結果、膀胱癌患者の尿でラミニン γ 2単鎖の濃度が良性疾患、健常人より高いことが分かった。

(4) **癌種別のラミニン γ 2単鎖の測定値と、その特異性に関する検討による他癌種への適用性検討【アボットジャパン株式会社、神奈川県立がんセンター】**

複数の癌種の患者血清を入手し、ラミニン γ 2単鎖測定を実施した。膀胱癌以外では、肝癌、膵癌でラミニン γ 2単鎖の値が有意に上昇していることを確認した。

1. Aim of the study

So far, highly reliable biomarker is not available for clinical cancer diagnosis. We previously found a specific biomarker candidate, monomeric laminin- γ 2 (Ln- γ 2) that is specifically expressed in cancer but not normal cells and tissues. In this study, we are establishing the highly reliable diagnostic method using chemiluminescent immunoassay system (CLIA) targeted to monomeric Ln- γ 2 and are evaluating it as a specific diagnostic test for urinary and digestive cancers.

2. Outline of research and development

(1) Optimization of test kit reagents

To optimize diagnostic reagents for establishment of diagnostic test targeted to monomeric Ln- γ 2 on CLIA, we modified the buffer components to reduce the non-specific binding and increase specific reactions in serum and urine specimens collected from the cancer patients.

(2) Clinical evaluation of biomarker for urinary and digestive cancers.

To evaluate diagnostic ability of urinary or digestive cancers, we measured urine and/or serum monomeric Ln- γ 2 using a developed diagnostic test kit in normal, benign and cancer specimens.

3. Results (fiscal year 2016)

(1) Evaluation for our developed CLIA reagent kit (Abbott Japan Co., Ltd. and Kanagawa Cancer Center)

The cross reactivity of a monomeric Ln- γ 2 specific monoclonal antibody to laminin 332 (Ln-332) containing Ln- γ 2 as a component was investigated. The cross reactivity to Ln-332 in normal serum was not detected by the antibody. Spiked recovery and linearity tests were also performed to evaluate the reagent kit.

(2) Stability test of urine specimens (Kanagawa Cancer Center)

A heat stress test was performed to investigate the stability of monomeric Ln- γ 2 in urine specimens. We found that monomeric Ln- γ 2 in urine was stable for a long time period.

(3) Collection and evaluation of urine specimens. (Kochi University, Abbott Japan Co., Ltd. and Kanagawa Cancer Center)

Urine specimens including benign urinary disease, early and advanced bladder cancer and healthy donor specimens were collected and monomeric Ln- γ 2 levels were analyzed. Urine monomeric Ln- γ 2 levels in patient with bladder cancer showed a higher tendency compared with that of benign patients or healthy donors.

(4) Analysis of serum monomeric Ln- γ 2 levels in other cancer patients. (Abbott Japan Co., Ltd. and Kanagawa Cancer Center)

We collected serum specimens from patients with several digestive cancers and analyzed monomeric Ln- γ 2 levels. Hepatocellular carcinoma (HCC) and pancreatic cancer serum specimens showed higher monomeric Ln- γ 2 levels compared with that of other cancers.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 1 件)

1. Serum monomeric laminin- γ 2 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. Hirofumi Kiyokawa, Hiroshi Yasuda, Ritsuko Oikawa, Chiaki Okuse, Nobuyuki Matsumoto, Hiroki Ikeda, Tsunamasa Watanabe, Hiroyuki Yamamoto, Toshiya Ishii, Fumio Itoh, Takehito Otsubo, Toru Yoshimura, Eisaku Yoshida, Masatoshi Nakagawa, Naohiko Koshikawa, Motoharu Seiki, Cancer Science, in press.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 新規肝癌腫瘍マーカーとしての細胞外マトリックス関連分子の有用性, ポスター, 清川博史, 越川直彦, 中川将利, 吉田栄作, 吉村徹, 石井俊哉, 松本伸行, 奥瀬千晃, 山本博幸, 安田 宏, 伊東文生, 第 53 回日本臨床分子医学会学術集会, 2016/4/15, 国内。
2. ラミニン γ 2 単鎖を指標とした膀胱がんの早期診断法, 口頭, 中川将利, 吉田栄作, 吉村徹, 辛島尚, 井上啓史, 執印太郎, 清木元治, 越川直彦, 第 20 回日本がん分子標的治療学会総会, 2016/5/31, 国内。
3. A novel biomarker for early diagnosis of hepatocellular carcinoma, 口頭, Naohiko Koshikawa, Hiroshi Yasuda, Hirofumi Kiyokawa, Fumio Ito, Masatoshi Nakagawa, Eisaku Yoshida, Toru Yoshimura and Motoharu Seiki, The 43th ISOBM Annual Congress, 2016/9/6, 国外。
4. 新規バイオマーカーとしてのラミニン γ 2 単鎖の評価, ポスター, 清川博史, 安田 宏, 中川将利, 吉田栄作, 吉村徹, 越川直彦, 清木元治, 伊東文生, 第 36 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2016/10/5, 国内。
5. 新たな肝細胞がん診断のバイオマーカーの同定, 口頭, 越川直彦, 安田宏, 清川博史, 伊東文生, 中川将利, 吉田栄作, 吉村徹, 清木元治, 第 75 回日本癌学会学術集会, 2016/10/7, 国内。
6. 膀胱癌における新規診断マーカーとしてのラミニン-ガンマ 2 単鎖, 口頭, 辛島尚, 越川直彦, 中川将利, 吉田栄作, 吉村徹, 清木元治, 鎌田雅行, 井上啓史, 執印太郎, 第 81 回日本泌尿器科学会東部総会, 2016/10/9, 国内。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み: なし。

(4) 特許出願: なし。