

血清 p53 抗体測定法の開発と臨床的意義

Development and Clinical Significance of Serum p53 Antibodies

しま だ ひで あき
島 田 英 昭
Hideaki SHIMADA

はじめに

p53 遺伝子異常を有する固形癌では、タンパクの高次構造が変化する結果、半減期が延長するため、p53 タンパクの過剰発現を認める。この過剰発現した p53 タンパクに対して癌患者血清中に IgG 抗体が出現する。われわれは、血清 p53 抗体を新規腫瘍マーカーとして臨床応用するために ELISA キットを開発した。健常者 205 名の 95% が分布する値から 1.3U/ml を基準値とした。癌患者 1085 例で 20.4% の陽性率であった。比較的早期の症例でも既存の腫瘍マーカーに比較して陽性率が高いことから「食道癌」「大腸癌」「乳癌」の 3 種に対して 2007 年 11 月 1 日より保険収載され日常診療に応用できるようになった。早期診断・治療効果の予測・手術後のモニタリングなどに有用であることが明らかとなりつつある。本稿では、「血清 p53 抗体検査」の開発の経緯と臨床上の有用性について概説する。

I. 固形癌における p53 遺伝子異常と p53 タンパク過剰発現

各臓器別の p53 遺伝子異常の頻度を図 1 に示す。食道癌、大腸癌、膵臓癌、肺癌、頭頸部癌、膀胱癌では、30%以上の症例で遺伝子異常が認められている。前立腺癌、神経膠腫、肝細胞癌、などでは、10～20%の頻度である。一方、免疫染色による p53 タンパク過剰発現の頻度は、遺伝子異常の頻度とはほぼ同様の傾向を有しており(図 2)、これらの患者では血清中に抗 p53 抗体が誘導されることが明らかとなった¹⁾。

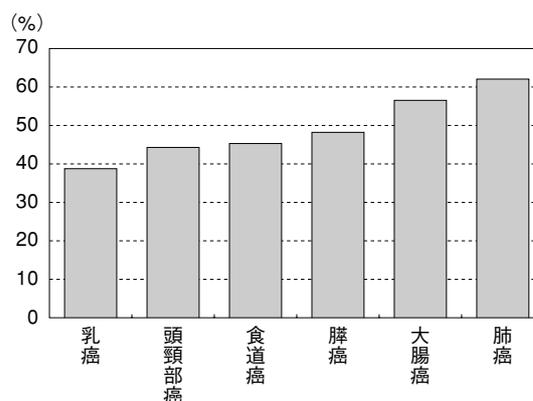


図 1 固形癌における p53 遺伝子異常の頻度

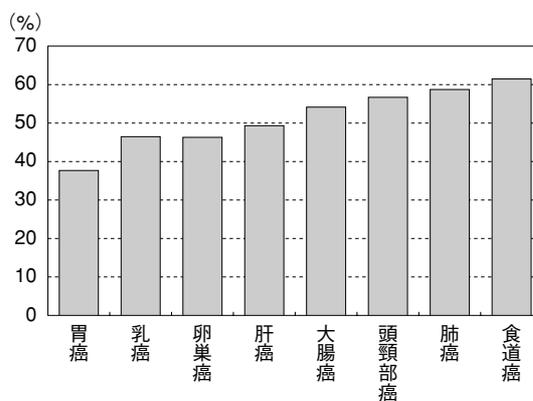


図 2 固形癌における p53 タンパク過剰発現の頻度

II. 血清 p53 抗体検出キットの開発

新たに開発した p53 抗体検出 ELISA キットを用いて、基礎性能試験ならびに多施設共同臨床研究を実施して臨床的有用性を検証した。用いた ELISA キットは、MESACUP anti-p53 TEST (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd, Nagoya, JAPAN.) である²⁾。

① p53 抗体測定方法

標的タンパクとして、バキュロウイルスにより産生した正常型ヒト p53 タンパクが固相化されている micro plate を用いた。100 倍希釈した血清サンプルを室温 1 時間反応させ、2 次抗体を結合する。2 次抗体をペルオキシダーゼ法にて発色させ、450nm の吸光度計で測定した (図 3)。あらかじめ、肺癌患者血清サンプルを陽性コントロールとして、希釈液から 15U/ml と設定して、直線状にプロットした吸光度からサンプルの抗体価を算出した。最小検出限界値は、0.05U/ml であった。検定者ならびに検定日における再現性試験による測定値の変動係数はすべて 7% 未満であった。ビリルビン値ならびにヘモグロビン値は、p53 抗体価に影響しなかった (図 4)。

② 健常者および良性疾患における p53 抗体の存在と基準値の設定

検診センターの協力を得て、文書により同意の得

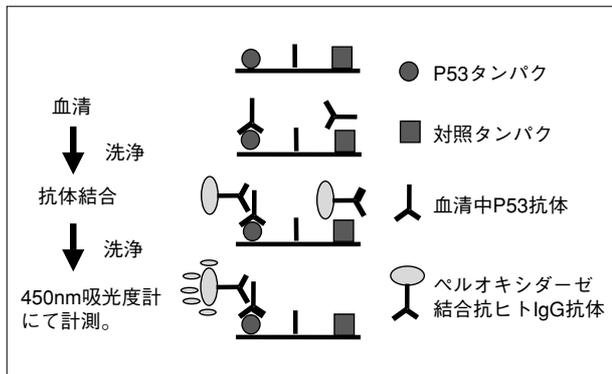


図 3 血清 p53 抗体測定方法

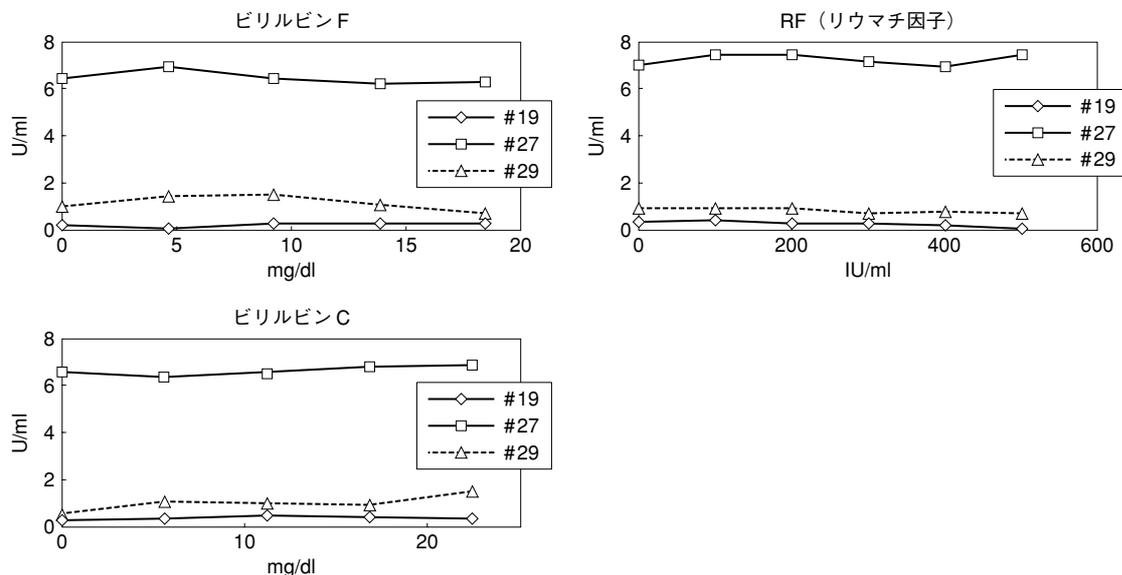


図 4 共存物質影響試験

られた 205 名の健常者ボランティア (男性 91 名、女性 114 名、平均年齢 42.6 歳) から採血し、血清 p53 抗体価を測定した。また、189 名の良性疾患患者 (男性 72 名、女性 17 名、平均年齢 59.4 歳) についても同様に検討した。健常者における中央値は、0.33U/ml (0.0 - 4.39U/ml) であった。健常者の抗体価の 95% 分布区間からカットオフ値を 1.3U/ml と設定した。

③ 保存試験と凍結融解試験

採血した検体を -80°C 、 0°C 、 4°C 、 25°C 、 37°C の条件で、1 週間保存し、24 時間毎の抗体価を測定した。その結果、1 週間にわたり、p53 抗体価は全く変化しなかった。血清保存および全血保存いずれの場合にも、p53 抗体価は、変化しなかった (図 5)。次に、 -80°C から 25°C の凍結融解繰り返し試験を行い p53 抗体価の変化を検討した。保存試験同様に、まったく抗体価は変化しなかった (図 6)。以上より、1 週間以内の保存および 10 回以内の凍結融解で抗体価が変化しないため、サンプルの輸送や取り扱いが非常に容易であり、臨床検査として優れていることを示している。

④ 各種固形癌における陽性率

各種固形癌症例、合計 1,085 例において血清 p53 抗体価を測定した。カットオフ値 1.3U/ml 以上を陽性とする 221 例 (20.4%) で陽性であった。各種固形癌における陽性率を図 7 に示す。陽性率 20% 以上を示した腫瘍は、頭頸部癌、食道癌、大腸癌、子宮癌であった。10 ~ 20% の陽性率の腫瘍は、子宮頸癌、

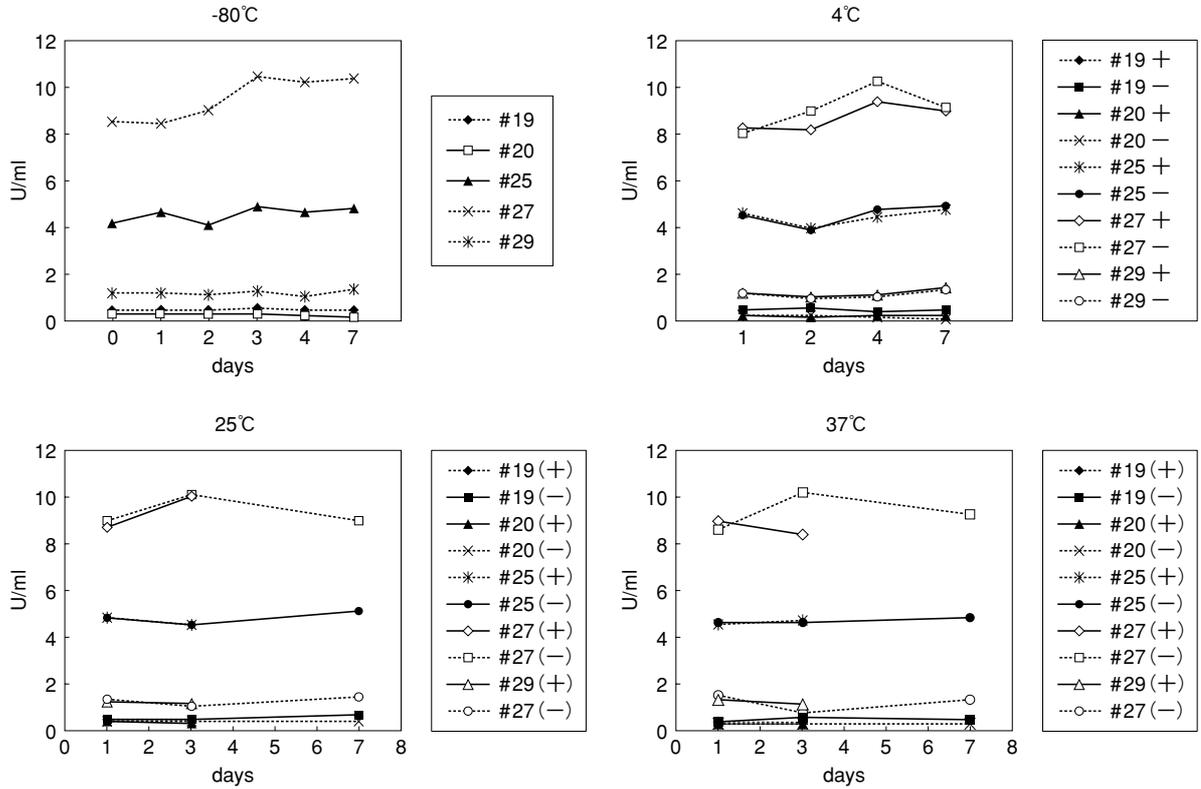


図5 温度別の血清保存試験

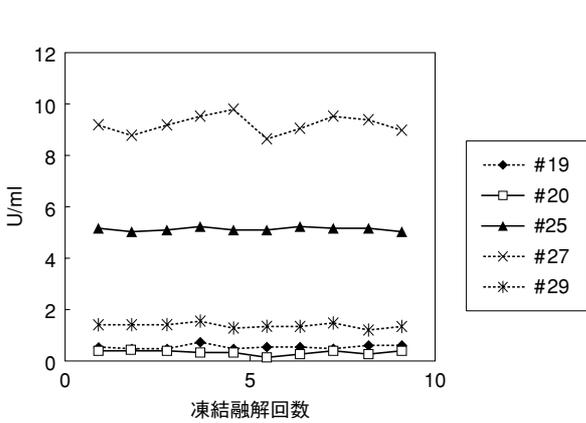


図6 凍結融解による血清 p53 抗体価への影響

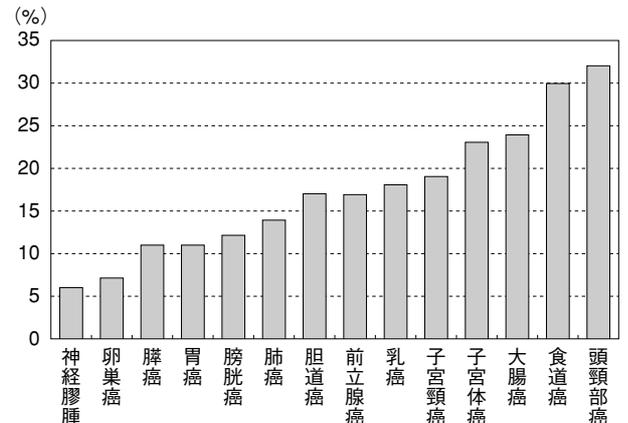


図7 臓器別血清 p53 抗体陽性率 (多施設臨床試験の結果から)

乳癌、前立腺癌、胆管癌、肺癌、膀胱癌、胃癌、膵癌であった²⁾。

⑤ CEA との陽性率の比較

血清 p53 抗体は、CEA と同様に種々の腫瘍で陽性を示すスペクトラムの広い腫瘍マーカーである。そこで、合計 1,085 例の対象症例のうち 603 例について、血清 CEA 値を測定して、陽性率を比較した。使用した CEA 測定キットは CEA-II EIA (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) であり、カットオフ値は 5.3ng/ml である。603 例のうち 301 例は扁平

上皮癌、302 例は腺癌である。全症例における陽性率は、p53 抗体 23.2%、CEA 25.5% であり、ほぼ同程度であった。これを組織型別に検討すると、CEA の陽性率は、扁平上皮癌で 22.9%、腺癌で 28.1% と腺癌が高い。p53 抗体の陽性率は、扁平上皮癌で 30.2%、腺癌で 16.6% と扁平上皮癌で有意に陽性率が高かった。扁平上皮癌における陽性率を CEA と比較すると p53 抗体の陽性率が有意に高いことが明らかとなった。

Ⅲ. 血清 p53 抗体 の存在 と臨床的意義

P53 抗体の有用性は、早期癌においても陽性率が高い点ならびに p53 遺伝子異常を反映している点である。

① 早期癌における陽性率

p53 抗体は、早期癌の段階から癌細胞中の p53 タンパクの過剰発現が認められることより、早期癌の診断マーカーとしての有用性が種々の固形癌で検討されている。肺癌高危険群におけるモニタリング試験では、p53 抗体価の上昇を認めた 2 例の早期肺癌を発見した、と報告されている³⁾。また、Barrett 上皮に由来する食道癌の早期発見に有用である、と報告されており⁴⁾、食道癌発生の高危険群である Barrett 食道の follow-up においてきわめて有用な腫瘍マーカーであるといえる。われわれの検討でも、表在食道癌において 35% の陽性率であり、既存の腫瘍マーカーより陽性率が高く、無症状の食道癌の早期発見に有用と考えられる⁵⁾。

② 治療後のモニタリングとしての意義

治療前後の血清 p53 抗体価の推移の検討によると、食道癌ならびに大腸癌症例において、内視鏡下粘膜切除術の治療後に p53 抗体が陽性から陰性化した症例を経験している^{5,6)}。手術施行例においては、術後 p53 抗体陽性持続例では、高率に再発することが確認された⁷⁾。また、食道癌手術症例において、術後再発病巣の確認できない血清 p53 抗体陽性持続症例で早期の大腸癌あるいは舌癌が合併していることが発見された症例を経験しており、重複癌診断にも有用と考えられる。

③ 血清 p53 抗体の存在と予後

p53 遺伝子異常と固形癌の予後については、一般に P53 遺伝子異常症例では根治切除手術後の予後が有意に不良であるとされている。血清 p53 抗体と予後に関する報告は、陽性例で予後不良とするものと両方で予後に有意差を認めないとする報告がある。当科における食道癌⁷⁾ならびに胃癌症例⁸⁾における検討では陽性例が予後不良の傾向を認めた。この予後因子は、多変量解析の結果 TNM 因子と独立した予後因子であり、なんらかの p53 遺伝子異常のパターンを認識している可能性がある。

④ 血清 p53 抗体の存在と抗癌剤感受性

P53 遺伝子異常を有する癌細胞では、抗癌剤や放

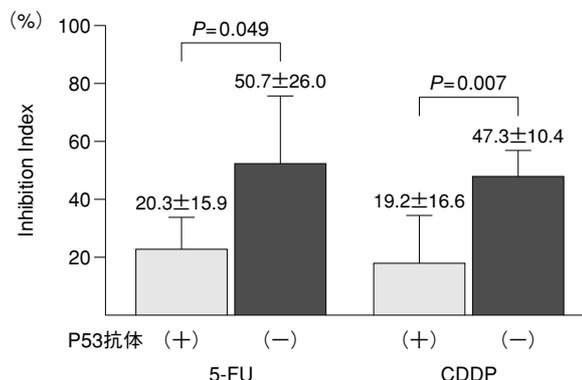


図 8 血清 p53 抗体と抗癌剤感受性

射線に対して抵抗性を示すことが多い。そこで、抗癌剤感受性試験として食道癌ならびに大腸癌切除標本を用いて Histoculture Drug Response Assay (HDRA) 試験を実施し、5-FU ならびにシスプラチンに対する感受性を検討した⁹⁾。5-FU (300 μg/ml)、シスプラチン (20 μg/ml) 濃度における増殖抑制効果を培養液のみのコントロールと比較して検討した。50%以上の増殖抑制効果を示したもの (Inhibition Index > 50%) を感受性ありと判定すると p53 抗体陽性例では、有意に Inhibition Index が低く抗癌剤に対して抵抗性を示した (図 8)。病変からの生検が容易な病変であれば、遺伝子解析やタンパク解析により抗癌剤感受性を予測することが可能であるが膵癌など深部に発生する癌あるいは再発リンパ節などの病変では、癌細胞を採取することが困難であり、生検時に播種性転移を誘発する可能性があるため臨床応用困難である。これに対して、血清 p53 抗体は、採血検査により p53 遺伝子異常をある程度評価できるので、簡便かつ有用な解析方法と思われる。

Ⅳ. 血清 p53 抗体の今後の展望

血清 p53 抗体は、従来の腫瘍マーカーが、癌細胞由来のタンパクを検出するものであったのと異なり、癌細胞由来のタンパクに対して反応性に出現する患者の抗体を検出するという点で、全く新しい腫瘍マーカーである。抗原抗体反応であることより、早期癌の段階から陽性となる可能性が高く、従来困難と考えられていた早期癌発見の腫瘍マーカーとしても期待される。一方、微量の抗原にも反応することから、治療後の微少残存癌細胞を検出して治療経

過を正確に判定できる可能性がある。また、p53 遺伝子異常を反映することから、癌細胞の生物学的特性を示す生物学的マーカーともいえる。臓器を問わず陽性率が高く、既存の腫瘍マーカーとまったく独立して陽性を示すことより、既存の腫瘍マーカーとの併用により、質の高い診断と治療が可能となるものと期待される。同様の概念で、新たな腫瘍マーカーとしての癌抗原に対する IgG 抗体をスクリーニングする手法として、Serological Identification of Recombinant cDNA expression Libraries (SEREX) という研究手法が開発されている¹⁰⁾。われわれは、SEREX 法を用いて、すでに 10 種類以上の新たな腫瘍マーカー候補を発見しており、より陽性率の高い検査法を開発中である。

謝 辞

p53 抗体研究会として多施設共同研究にご協力いただきました先生方に深く御礼申し上げます。また、直接ご指導いただきました千葉大学分子病態解析学 野村文夫教授、先端応用外科学 落合武徳名誉教授に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Lubin R, Schlichtholz B, Teillaud JL, et al.: p53 antibodies in patients with various types of cancer : assay, identification, and characterization. *Clin Cancer Res* **1** (12) : 1463-1469, 1995.
- 2) Shimada H, Ochiai T, Nomura F.: Titration of Serum p53 Antibodies in 1085 Patients with Various Cancers. A Multi institutional Analysis by Japan p53 Antibody Research Group. *Cancer* **97** : 682-689, 2003.
- 3) Lubin R, Zalcman G, Bouchet L, et al.: Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nat Med.* 1995l ; **1** : 701-702.
- 4) Cawley HM, Meltzer SJ, De Benedetti VM, et al.: Anti-p53 antibodies in patients with Barrett's esophagus or esophageal carcinoma can predate cancer diagnosis. *Gastroenterology* **115** : 19-27, 1998.
- 5) Shimada H, Okazumi S, Matsubara H, Ochiai T, et al.: Serum p53 antibody is a useful tumor marker in the patients with superficial esophageal cancer. *Cancer* **89** : 1677-1683, 2000.
- 6) Takeda A, Shimada H, Nakajima K, et al.: Serum p53 antibody as a useful marker for monitoring of treatment of superficial colorectal adenocarcinoma after endoscopic resection. *Int J Clin Oncol.* **6** : 45-49, 2001.
- 7) Shimada H, Okazumi S, Matsubara H, Ochiai T, et al.: Prognostic Significance of Serum p53 antibodies in the Patients with Esophageal Squamous cell carcinoma. *Surgery* **132** : 41-47, 2002.
- 8) Nakajima K, Suzuki T, Shimada H, et al.: Detection of pre-operative serum anti-p53 antibodies in gastric cancer. *Tumour Biol.* **20** : 147-152, 1999.
- 9) Shimada H, Okazumi S, Takeda A, et al.: Presence of serum p53 antibodies is associated with decreased in vitro chemosensitivity in patients with esophageal cancer. *Surg Today.* **31** : 591-596, 2001.
- 10) Nishikawa H, Tanida K, Ikeda H, et al.: Role of SEREX-defined immunogenic wild-type cellular molecules in the development of tumor-specific immunity. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98** : 14571-14576, 2001.