

氏 名（本籍） 石 渡 俊 二

学位の種類 博 士（薬 学）

学位記番号 薬 博 第 2 2 4 号

学位授与年月日 平 成 7 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科専門課程 東北大学大学院薬学研究科  
（博士課程）薬学専攻

学位論文題目 尿中及び血清中修飾核酸の腫瘍マーカーへの応用性  
に関する研究

論文審査委員 (主 査)  
教授 鈴木 康 男 教授 水 柿 道 直  
教授 後 藤 順 一

# 論文内容要旨

RNAの構成成分としてメチル化、異性化などの修飾を受けた修飾核酸が天然に存在することが知られている。修飾核酸は特にtRNA中に多く存在し、tRNAが受容するアミノ酸の変換やコドン-アンチコドン認識の正確さの向上など生命活動を営む上で必須の機能の一部を担っている。これらの修飾核酸はtRNA分子骨格形成後になされる転写後修飾により生成し、大多数の修飾核酸はモノヌクレオシドまで分解された後、核酸の再利用経路であるサルベージ回路に入ることなく細胞外に放出される。これらの遊離した修飾核酸は種々の生理活性を有することが知られ、石田らは、マウスのエールリッヒ癌性腹水中に存在する1-メチルアデノシンや5-メチルシチジンが免疫抑制活性を有することを報告している。

尿中に排泄された修飾核酸については、腫瘍マーカーとしての応用性が検討されてきたが、これまで、尿中の修飾核酸の定量には主にHPLC (High Performance Liquid Chromatography) が用いられ、癌患者尿中に修飾核酸が増加することが示されてきた。一方、当研究室では、モノクローナル抗体を用いたELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法を確立し、尿中シュドウリジンと1-メチルアデノシンが癌患者、特に白血病やリンパ腫患者のスクリーニングに有用なことを証明してきた。

ところで、血清中の修飾核酸の腫瘍マーカーへの応用性についても検討がなされてきた。血清検体を用いた場合、1) 尿検体で必要とされるクレアチニン補正を行う必要がないこと、2) 小児や腎障害を有する患者でしばしば認められる偽陽性例が発生しにくいこと、さらに、3) 動物モデルを作製した場合に試料の採取が容易であること、などの利点があげられる。しかし、検出感度上の問題から血清中の修飾核酸量の検討はほとんどシュドウリジンに限られ、また、迅速性と簡便性に優れたELISA法による測定もなされていなかった。血清中の修飾核酸の分析は腫瘍マーカーへの応用性の証明のみならず、修飾核酸の体内動態の解析にも応用可能であり、非常に興味深い検討事項と考えられる。

著者はこれらの研究背景を踏まえ、尿中及び血清中の修飾核酸の腫瘍マーカーとしての有用性を明らかにするため検討を行い、以下に述べる知見を得た。

## 1. 尿中修飾核酸量の検討

### (1) 尿中修飾核酸定量法の白血病モニタリングへの応用

健常人33人の尿中シュドウリジン、1-メチルアデノシン量の平均値は $31.2 \pm 9.9 \text{ nmol} / \mu \text{ mol}$ クレアチニン、 $1.91 \pm 0.66 \text{ nmol} / \mu \text{ mol}$ クレアチニンであった。そこで、平均値に2SD (SD: 標準偏差) を加えた値である $51.0 \text{ nmol} / \mu \text{ mol}$ クレアチニン、 $3.23 \text{ nmol} / \mu \text{ mol}$ クレアチニンをそれぞれカットオフ値として設定し、この値以上の症例を陽性とした。

白血病及びリンパ腫患者全例の尿中シュドウリジン量の平均値は $61.6 - 82.8 \text{ nmol} / \mu \text{ mol}$ クレアチニンであり、健常人と比較して有意に高値であった。同様に1-メチルアデノシン量の平均値は $3.70 - 4.90 \text{ nmol} / \mu \text{ mol}$ クレアチニンであり、健常人との差は有意であった。白血病及びリンパ腫患者の尿中シュドウリジンの陽性率は77% (46/60)、1-メチルアデノシンの陽性率は62% (37/60)であった。シュド

ウリジンあるいは1-メチルアデノシンのいずれかが陽性であったものは87% (52/60) であった。

次に、疾患の状態と尿中修飾核酸量の関係を検討した結果、寛解が導入されたほとんどの症例で尿中修飾核酸量がカットオフ値以下にまで減少した。一方、再発が認められた症例では尿中量の増加がみられた。

これらの結果から、尿中シュードウリジン、1-メチルアデノシン量は疾患の種類よりも、疾患の状態を良く反映することが明らかになった。尿中シュードウリジンと1-メチルアデノシンの白血病及びリンパ腫のモニタリングに対する有用性が示されたものと考えられる。尿検体を用いる本法は、骨髄穿刺などの方法に比べて、苦痛を与えずかつ簡便に実施できるため、患者病態のモニタリングへの応用が可能であり、従来の診断法の相補的な診断法として有用であると思われる。

## (2) 健常人の尿中修飾核酸量の詳細な検討

尿中修飾核酸の腫瘍マーカーへの応用性を検討する際に基礎となる、健常人の尿中量の変動を検討した。健常人300人以上を対象とし、尿中シュードウリジン、1-メチルアデノシン量の性差、年齢差を検討したが、いずれも有意差は認められなかった。また、日内変動、日差変動も認められなかった。これらの結果から、尿中シュードウリジン、1-メチルアデノシン量は腫瘍以外の内的あるいは外的要因の影響を受けにくく、腫瘍マーカーとして高い特異性を有していることが明らかになった。

## 2. 血清中修飾核酸定量法の開発

血清試料は、尿試料と比較して生体に対する侵襲があるという短所を持つ反面、前述のように、1) クレアチニン補正が必要ないこと、2) 腎障害を有する患者や小児でも偽陽性例が認められないと考えられること、さらに、3) 実験動物を利用する場合、定時の試料の採取が容易であり、基礎的検討が可能であること、などの長所を持っている。そこで、まず、血清中1-メチルアデノシンの定量法を確立した。

### (1) 高感度1-メチルアデノシン定量法の確立

従来の1-メチルアデノシンの阻害ELISA法に以下の改良を加えた。

- 1) ブロッキング剤として1% BSA/0.05% Tween 20 含有PBSを用い、2次抗体添加前に二回目のブロッキングを行った。
- 2) 二次抗体の標識酵素として西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) を利用し、テトラメチルベンチジンを発色基質とした。

本改良法により得られた検量線は1-1000ng/mlの範囲で良好な直線性を示し、従来法に比べ検出感度が10倍上昇した。

### (2) 血清の前処理法の確立

血清の前処理法としてセントリコン-10 (分画分子量10000) を用いた遠心限外ろ過法を検討した。限外ろ過操作により検体中の1-メチルアデノシン濃度が変化しないことを確認するため、前処理前血清への添加回収試験を行った。血清の限外ろ過前に標準品30ng/mlを添加した試料における回収率は87.0-112%であり、良好な値を示した。

### (3) 再現性試験

血清試料の同時再現性の変動係数 (C.V.) は 9.84–13.5%，日差再現性の変動係数 (C.V.) は 2.70–8.39% であり、いずれも良好な再現性が認められた。本測定法が信頼性の高い測定法であることが明らかになった。

### 3. 担癌マウス血清中修飾核酸量の検討

#### (1) 腹水癌モデル

BALB/c マウスに同系マウス由来の Meth A 線維芽細胞腫細胞を腹腔内移植し腹水癌モデルを作製した。腹腔内での癌細胞の増殖は移植後 5 日目以降に観察された。非担癌マウス血清中の 1-メチルアデノシン、シュードウリジン量はそれぞれ  $88.5 \pm 53.0 \text{ ng/ml}$ 、 $3.17 \pm 0.37 \mu\text{g/ml}$  であった。担癌マウス血清中の 1-メチルアデノシン量は移植後 5 日目までは変化が認められなかったが、その後増加し、12 日目には正常値の 4.6 倍の  $404 \pm 118 \text{ ng/ml}$  に達した。一方、シュードウリジンは移植後 9 日目以降に増加し、12 日目の血中量は正常値の 1.8 倍の  $5.82 \pm 0.29 \mu\text{g/ml}$  まで上昇した。

#### (2) 固形癌モデル

BALB/c マウスに Meth A 細胞を皮内移植し、固形癌モデルを作製した。腫瘍は移植後 5 日目に観察され、21 日目まではほぼ一定の速さで増大した。血清中の 1-メチルアデノシンは移植後 5 日目以降増加し、19 日目には正常値の 2.6 倍の  $112 \pm 5 \text{ ng/ml}$  に達した。その後 22 日までの 3 日間に急激に増加し、正常値の 5.9 倍の  $235 \pm 9 \text{ ng/ml}$  に達した。他方、血清中シュードウリジンは 11 日目に正常値の 3.0 倍の  $7.16 \pm 0.41 \mu\text{g/ml}$  まで増加した後、8 日後の 19 日にわずかに増加し、19 日目以降に再び増加が認められ、22 日目には正常値の 4.1 倍の  $10.0 \pm 1.0 \mu\text{g/ml}$  なる高値を示した。

癌細胞の増殖に伴い、血清中の修飾核酸量は増加し、血清中修飾核酸が腫瘍マーカーとして有用であることが予想された。腹水癌モデルと固形癌モデルを比較すると、血清中の修飾核酸量はいずれも 5 日目以降増加傾向を示すが、増加速度は腹水型の方が大きかった。これは、腫瘍細胞が皮内に比して腹腔内においてより速く増殖するためと考えられる。

### 4. 健常人及び癌患者血清中修飾核酸量の検討

#### (1) 健常人及び癌患者血清中修飾核酸量の検討

健常人の血清中 1-メチルアデノシンの平均値は  $28.3 \pm 7.9 \text{ ng/ml}$ 、シュードウリジンの平均値は  $1.28 \pm 0.27 \mu\text{g/ml}$  であり、年齢差及び性差は認められなかった。そこで、カットオフ値として平均値に 2 SD を加えた値である  $44.1 \text{ ng/ml}$  (1-メチルアデノシン)、 $1.82 \mu\text{g/ml}$  (シュードウリジン) を設定した。

固形癌及び白血病患者の血清中、尿中 1-メチルアデノシンの陽性率はそれぞれ 16% (4/25)、44% (11/25) であった。血清中 1-メチルアデノシンが陽性を示したのは肝細胞癌 2 例、大腸癌 1 例であった。同じ検体の血清中、尿中シュードウリジンの陽性率はそれぞれ 36% (9/25)、64% (16/25) であった。血清中シュードウリジンが陽性を示したのは、肝細胞癌、胆管癌、大腸癌各 2 例、胃癌、卵巣癌、子宮癌各 1 例であった。

癌患者血清であっても尿中で認められるほど高い陽性率が得られなかった理由として以下のことが考えられる。1-メチルアデノシンの分子量は281.3，シュードウリジンの分子量は244.2といずれも小さく，限外ろ過によりその濃度が変化しないことから明らかなように血清中のタンパク質との相互作用もない。従って，血清中のこれらの修飾核酸は血清中に保持されることなく速やかに尿中に排泄され，検出しうる量的差異として現れてこないものと思われる。しかし，血清中1-メチルアデノシン，シュードウリジンはC型肝炎ウィルス陽性の肝癌患者や大腸癌患者で陽性例が認められており，この様な病態の検討には応用可能であると考えられる。

## 審査結果の要旨

RNAの構成成分として知られる修飾核酸は、tRNAの機能保持等に関与するとともに遊離型として免疫抑制活性を示すなど、生体機能の維持に重要な働きをしている。著者は、これらの修飾核酸が腫瘍患者尿中に多く排泄されることから、尿中及び血清中の修飾核酸の腫瘍マーカーへの応用性について詳細に検討した。これまで、尿中の修飾核酸の定量には主にHPLCが用いられているが、本論文では、迅速かつ簡便で、感度に優れ、マススクリーニングの可能なモノクローナル抗体によるELISA法を用いて検討し、以下の知見を述べている。

### 1. 尿中修飾核酸量の検討

まず、健常人と白血病及びリンパ腫患者の尿中シュードウリジンと1-メチルアデノシン量を定量した。白血病及びリンパ腫患者では有意に高い値が示され、尿中シュードウリジンの陽性率は77%、1-メチルアデノシンの陽性率は62%であり、いずれかが陽性であったものは87%であった。次に、疾患の状態と尿中修飾核酸量の関係を検討した結果、寛解が認められたほとんどの症例で尿中修飾核酸量が減少した。一方、再発が認められた症例では尿中量の増加が認められた。さらに、健常人300人以上を対象とし、尿中シュードウリジン、1-メチルアデノシン量の性差、年齢差、日内変動及び日差変動について検討したが、いずれも有意差は認められなかった。

### 2. 血清中修飾核酸定量法の開発

これまで、感度の問題から測定法の無かった血清中1-メチルアデノシンの定量を目的とする分析法を確立した。血清の前処理にセントリコン-10を用いた遠心限外ろ過法を導入し、ブロッキング剤として1% BSA/0.05% Tween 20含有PBSを各抗体添加前に用い、さらに発色系として西洋わさびペルオキシダーゼとテトラメチルベンチジンをを用いた阻害ELISA系を開発した。同法は1-1000ng/mlの範囲で良好な直線性を示し、従来法に比べ検出感度が10倍上昇した。回収率、同時及び日差再現性に優れ、信頼性高い定量法の開発に成功した。

### 3. 血清中修飾核酸量の検討

BALB/cマウスへのMeth A細胞の移植モデルを用いた検討において、癌細胞の増殖に伴う、血清中の各修飾核酸量の増加が認められ、血清中修飾核酸の腫瘍マーカーとしての有用性が示された。

健常人の血清中の1-メチルアデノシン及びシュードウリジンを定量した結果、性差は認められなかった。固形癌及び白血病患者の血清中、尿中1-メチルアデノシン及びシュードウリジンの陽性率は、それぞれ16%、44%であった。陽性率の低い要因として速やかな尿中への排泄が考えられた。

以上、著者は本論文において、尿中1-メチルアデノシンとシュードウリジンの白血病及びリンパ腫の診断及びモニタリングへの有用性を明確にした。また新規に、血中1-メチルアデノシンとシュードウリジンの阻害ELISA系を構築し、迅速、簡便かつ高感度な血中濃度の測定を可能にした。その結果、動物レベルでは、血中濃度が癌の病態を反映しうるものと考えられたが、患者血中の測定では十分な陽性率が得られないことを明らかにし、その理由として速やかな尿中への排泄を提案した。これらの結果は、臨床応用可能な重要な知見であり、方法及び結果の新規性も認められる。よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として合格と認める。