

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

レトロウイルス技術による癌抗原の細胞表面上カタログ化と癌の診断治療への
応用に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北村 俊雄

平成19（2007）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

レトロウイルス技術による癌抗原の細胞表面上カタログ化と癌の診断治療への応用に関する総合的研究----- 1

北村俊雄

II. 分担研究報告

1. レトロウイルス技術による癌抗原の細胞表面上カタログ化と癌の診断治療への応用に関する総合的研究----- 10

北村俊雄

2. ユーイング肉腫における新規膜抗原・分泌蛋白の探索----- 19

野阪哲哉

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 23

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 24

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

総括研究報告書

レトロウイルス技術による癌抗原の細胞表面上カタログ化と癌の診断治療への応用に関する総合的研究

主任研究者 北村俊雄 東京大学医科学研究所 細胞療法分野教授

研究要旨

多くの先進国においてがんによる死亡は死因の一位を占め、がんの早期診断早期治療は社会的にも重要な課題である。近年、がんの診断や治療は着実に進歩し早期発見によって完治するケースが多くなってきた。しかしながら膵がんなど早期診断が困難ながんは発見された時には既に根治が難しい場合が多い。本研究の目的は、早期診断が難しく予後が悪い膵がん、グリオーマ（グリオブラストーマ）、ユーイング肉腫および日本に多い胃がんのマーカ分子を用いた血清診断を確立すること、抗体を用いた治療への応用を目指すことである。

本年度は、まず膵がん、胃がん、グリオブラストーマおよびユーイング肉腫の細胞株由来の分泌蛋白質および膜蛋白質をシグナルシーケンストラップ法でそれぞれ数十種類同定し、がん細胞マーカ候補とした。次に、これらががん細胞マーカ候補分子の一部に対して抗体を作成した。これまでにシグナルシーケンストラップ法で各々のがんから獲得した数百クロンのcDNAのうち、膵がん由来分子に対するモノクローナル抗体を8種類作成し、これらの抗体の解析を開始した。本年度の結果から、シグナルシーケンストラップ法 SST-REX法で得られる SST クローン（ヒトがん細胞由来の膜蛋白質あるいは分泌蛋白質を一種類ずつ細胞膜上に発現しているマウス細胞）を利用することによって効率良くモノクローナル抗体を作成できることが確認された。

本プロジェクトはまだ始まったばかりであるが、既に複数の興味深い分子を同定し得た。また、作成した8種類の抗体のうち膵がん細胞株の増殖を *in vitro* で抑制する抗体が1種類存在した。

北村俊雄 東京大学医科学研究所
先端医療研究センター
細胞療法分野 教授

野阪哲哉 三重大学大学院
医学系研究科 病態解明医学講座
感染症制御医学分野 教授

に役立つことに加え、増大する医療費の軽減効果も期待できる。従って、がんの早期診断および治療は社会的にも重要な課題である。近年、がんの診断や治療は着実に進歩し早期発見によってがんが完治するケースも多くなってきた。しかしながら膵がん、ユーイング肉腫、グリオブラストーマを代表とする脳腫瘍など早期診断が困難ながんは発見された時には既に根治が難しい場合が多い。特に膵がんが初期にみつかることは稀で、症状が出てからの発見例では極めて予後が悪い。

A. 研究目的

日本を含む多くの先進国においてがんによる死亡は死因の一位を占める。がんを早期に発見し適切な治療を速やかに行うことは、国民の健康増進

肝がんや大腸がんなど一部のがんでは α フェトプロテインや CEA など高頻度に血中で検出可能ながん細胞由来マーカー蛋白質が見つかっているが、膵がんやグリオブラストーマにおいても同様のマーカーがあればスクリーニング検査として利用可能である。また胃がんや肺がんなど胃カメラや胸部 X 線で早期発見が可能ながんにおいても、血液検査で検出できるマーカー分子があれば非侵襲的検査でスクリーニングができる利点がある。つまり胃カメラや胸部 X 線検査を受けない人に対するスクリーニングとして有効性が期待できる。

本研究の目的は、早期診断法が難しく予後が悪い膵がん、ユーイング肉腫、グリオーマ（グリオブラストーマを含む）および日本に多い胃がんのマーカー分子を同定し、これらのマーカー遺伝子に対する抗体を作成することおよび抗体療法に利用できるがん抗原および抗体を同定することである。

B. 研究方法

本研究では、研究代表者らが開発した高効率かつ正確なシグナルシーケンストラップ法 SST-REX (Kojima and Kitamura, Nat Biotech, 1999) を利用して、がん特異的抗原を同定し、モノクローナル抗体を作成する。

特定のがん細胞からシグナルシー

クエンストラップ用のライブラリーを作成し SST-REX を行うと、マウス pro-B 細胞株 Ba/F3 にヒトがん細胞由来の膜蛋白質あるいは分泌蛋白質がサイトカインレセプターMPL との融合蛋白質として一種類ずつ発現する細胞カタログが得られる。SST-REX 法では、本来 IL-3 依存性である Ba/F3 細胞の自律増殖能獲得を指標としてライブラリーをスクリーニングする。実験の原理は、シグナルシーケンスを有する分泌蛋白質あるいは膜蛋白質が恒常的活性型サイトカインレセプターMPL と融合して Ba/F3 表面に発現された場合は細胞の自律増殖が誘導されることである。自律増殖能を獲得した細胞に挿入されている cDNA は PCR で容易に回収できる。シグナルシーケンスを持たない蛋白質が恒常的活性型 MPL と融合しても細胞の自律増殖は誘導できない。

本研究においては SST-REX 法の過程で得られるがん細胞由来の分泌蛋白質あるいは膜蛋白質と MPL の融合蛋白質として発現している Ba/F3 細胞群（以後 SST クローンと呼ぶ）を免疫源としてマウスモノクローナル抗体を作製する。患者がん組織あるいはがん細胞株を利用して樹立した抗体の特異性およびがん細胞株に対する増殖抑制効果を調べる。

また上記の実験で樹立した SST ク

ローンを利用して細胞チップ作製し、モノクローナル抗体のスクリーニング、患者血清中の抗がん抗原抗体のアッセイに利用することを目指す。

(倫理面への配慮)

ここまでの研究ではヒトのサンプルを使用していない。ヒトサンプルを利用する場合は当該施設の倫理審査委員会の承認を得た研究計画書に基づき、該当者に説明を行い、同意書を得る。

動物実験においては、Sacrifice するとき麻酔を行うなど動物（主にマウス）に苦痛を与えないように配慮する。また1年に一回の動物慰霊祭に参加して動物に対する哀悼の意を持つ。

C. 研究成果

がん細胞株のシグナルシーケンストラップを行い、がん細胞由来の膜蛋白質および分泌蛋白質を一種類ずつ細胞表面に発現している SST クローンを樹立した。発現データベースなどによって興味深い発現分布を示す分子を提示する SST クローンを中心に、マウスに免疫することによりモノクローナル抗体を作成し、樹立した抗体のがん細胞株に対する反応性および増殖抑制効果を調べた。また、モノクローナル抗体作成をより効率良くすること、細胞チップの改善の目的で

SST ベクターの改変も試みた。

SST スクリーニングと抗体作成はまだ始まったばかりであるが、既に複数の興味深い分子を同定し得た。また、作成した8種類の抗体のうち膀胱がん細胞株の増殖を *in vitro* で抑制する抗体が1種類存在した。

1. 各種がん細胞株のシグナルシーケンストラップ法

以下の細胞株から、膀胱がん、グリオブラストーマ、ユーイング肉腫の SST-REX 用ライブラリーを作成し、シグナルシーケンストラップのスクリーニングを行った。膀胱がんについては AsPC-1/BxPC-3 由来のライブラリーと Capan-1 由来のライブラリーを作成し、グリオブラストーマとユーイング肉腫ライブラリーについてはそれぞれ mRNA を混合して一種類のライブラリーを作成した。胃がんについては組織型の異なる4種のライブラリーを樹立した。

膀胱がん

AsPC-1、BxPC-3、Capan-1

グリオブラストーマ

U87MG、U251、T98G

ユーイング肉腫

SJES2、SJES3、SJES5-8

胃がん

GCIY (スキルス)、MKN1 (adenosquamous)、KATOIII (signet

ring)、MKN45 (低分化腺がん)

SST-REX のスクリーニングを行った結果、膵がんから4 1.9クローン、8 8種、グリオブラストーマから2 6 4クローン、5 4種、ユーイング肉腫から2 9 1クローン、9 4種の SST クローンを樹立した。これらのライブラリーのスクリーニングをさらに継続すると同時に、胃がんのライブラリーのスクリーニングも1 9年度に開始予定である。

SST-REX のスクリーニングはまだ開始して間もないが、既に複数の興味ある SST クローンを同定した。例えばユーイング肉腫から得られた CD99L2 はユーイング肉腫に比較的特異的とされる膜蛋白質 MIC2 (CD99) に相同性を有する分子であり、その発現パターンや機能が注目される。また、膵がん由来分子で、一部の膵がん細胞および大腸がん細胞に極めて高い発現を示す分子を見いだした。

これらの分子については、今後、モノクローナル抗体を作成予定である。

2. 樹立したモノクローナル抗体の characterization

膵がん由来膜蛋白質および分泌蛋白質に対して作成したモノクローナル抗体 8 種について予備的な characterization を行った。そのうち1 種類の抗体は膵がん細胞株の増殖を

in vitro で抑制した。今後、担がんマウスを作製して in vivo での効果を調べて行く予定である。

3. がん細胞由来膜蛋白質あるいは分泌蛋白質に対するモノクローナル抗体作成

本研究プロジェクトの特徴は、マウス細胞がヒト癌細胞由来の膜蛋白質あるいは分泌蛋白質を一種類ずつ細胞表面に発現している SST クローンを免疫源として簡便にマウスモノクローナル抗体を作成する点である。現在までに膵がん由来分子に対するモノクローナル抗体を8 種樹立した。現在、膵がんについてはさらに9 種類、グリオブラストーマについては2 5 種類、ユーイング肉腫については1 0 種類の腫瘍由来蛋白質に対するモノクローナル抗体の作成を予定している。

4. 細胞チップの作成および条件検討

上記の SST クローンを細胞チップにして、モノクローナル抗体のスクリーニングや、患者血清中に存在する癌抗原に対する抗体の検出に利用する目的のために、細胞チップ作成の基礎条件を検討し、細胞固定後、PBS/5 % Sucrose、1 %BSA で3 0分間、室温でブロッキングを行うと免疫染色を行う場合のシグナル/ノイズ比が高

いことを明らかにした。この条件で SST クローンを細胞チップに固定し、モノクローナル抗体に対する反応性を調べたところ、セルソーターの結果と相関が認められた。

5. SST-REX 法および SST クローンを利用した抗体作成法の改良

抗体作成のさらなる効率上昇と細胞チップの感度上昇のためには、SST クローンにおけるがん細胞由来分子の発現レベルを高めることが一番効果的であることが予想される。そこで、本年度は以下に示したような工夫をした。

1) pMX-SST ベクターの改善

従来使用していた pMX-SST ベクターにはウイルスの gag 蛋白質遺伝子が残っており、gag 蛋白質の一部が翻訳され細胞表面に発現したり、cDNA との融合蛋白質を発現してしまうことがあった。この場合まれに gag に対する抗体ができることがあった。そこで、gag の開始コドン (ATG) に変異を導入し、また glyco-gag の開始コドン (CTG) の直下にストップコドンを挿入した。さらに cDNA を挿入する multi-cloning site の上流に3つ停止コドン (TAG) を挿入し、融合蛋白質産生の可能性を完全に排除した。新しいベクター pMXs-SST によって SST を行ったところ、従来のベクターと同等の

効率でシグナルシーケンストラップが行えた。また、SST クローンにおけるがん細胞由来蛋白質の発現レベルも同等であった。

2) pMXs-SST ベクターのプロモーターの変更

がん細胞由来の融合蛋白質 (ヒト MPL との融合) の発現をさらに高めるため、pMXs-SST の 3'LTR に欠失を挿入し、その部分に CMV、EF1 α 、CAG、SR α などの強力なプロモーターを挿入したベクターを作成した。しかしながら理由は不明であるが、がん細胞由来の融合蛋白質の発現は認められなかった。そこで、3'LTR を欠失した SI-pMXs-SST (self-inactivating vector) に内部プロモーターとして CMV、EF1 α 、CAG、SR α プロモーターを挿入した。これらのベクターは挿入後も内部プロモーターに依存した発現が認められた。ところが意外なことに Ba/F3 細胞中での発現量は LTR をプロモーターとした場合が最も強いことが判明した。また、これらのベクターによる蛋白質の発現量を他の IL-3 依存性細胞株 32D および繊維芽細胞株 NIH3T3 で調べたところ、やはり LTR が一番強かった。

D. 考察

SST ベクターの発現量については、通常 LTR より強力と考えられている

CMV、EF1 α 、CAG、SR α プロモーターがBa/F3だけでなく、32DおよびNIH3T3細胞でもLTRより弱いプロモーター活性しか示せなかった理由は不明である。またSSTクローンを利用した抗体作成は効率良く成功したが、なかにはうまく抗体が取得できない場合があった。うまく抗体を作成できなかったSSTクローンにおけるMPL融合蛋白質の発現量は必ずしも低くはなかった。現在、マウスモノクローナル抗体を作製しているが、今後ハムスターを使ったモノクローナル抗体作成も視野に入れている。そのためには、ヘルパーウイルスを利用してSSTクローンから挿入ベクターを回収し、CHOで発現させるなどの系の立ち上げも考慮している。CHOは遺伝子発現の効率もよく、ハムスターへの免疫にそのまま利用できるのも、マウスモノクローナル抗体がうまく取得できない場合、ハムスターのモノクローナル抗体も候補のひとつとして考える。ただ、この目的のためにはハムスターの系を立ち上げることと同時に確実かつ簡便にSSTクローンから挿入プロウイルスをウイルス粒子として回収する方法を確立することが必要となる。

E. 結論

本年度はSST-REXを膵がん、グリ

オーマ、ユーイング肉腫の細胞株から樹立したライブラリーで行い、効率良くSSTクローン（がん細胞由来膜蛋白質あるいは分泌蛋白質とヒトサイトカインレセプターMPLの細胞内、膜貫通ドメインの融合蛋白質を発現しているBa/F3細胞）を樹立し得た。これらのSSTクローンのうち一部をマウスに免疫することにより、効率良くモノクローナル抗体を作成することができた。一方、シグナルシーケンス用のベクターpMX-SSTを改良し、ウイルス構造蛋白質の発現の可能性を排除した改良型pMXs-SSTを作製し、新しいベクターを使ってSST-REXが同様に行えることを確認した。

今後は、胃がん細胞株も含めてSST-REXスクリーニングを継続し、より多くのがんマーカー候補分子に対するモノクローナル抗体を樹立することによって、がんの早期診断法の開発およびがん治療の分子標的となりうる分子の同定を目指すと同時に、実験系に対する以下の改良も並行して行う。

- 1) ベクターに改良を加えることによりSSTクローンにおける融合蛋白質の発現量を増強する工夫をする。
- 2) SST-REX法をさらに改善し、抗体作成効率を高める。
- 3) これらの改良により、感度の高い細胞チップの作成を目指す。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsubara, A., Iwama, A., Yamazaki, S., Fruta, C., Hirasawa, R., Morita, Y., Osawa, M., Motohashi, T., Eto, K., Ema, H., Kitamura, T., Vestweber, D., and Nakauchi, H. (2006) Endomucin, a CD34-like sialomucin, marks stem cells throughout development. **J. Exp. Med.** 202: 1483-1492.
2. Oki, T., Kitaura, J., Eto, K., Maeda-Yamamoto, M., Inagaki, N., Nagai, H., Yamanishi, Y., Kumagai, H. and Kitamura, T. (2006) Integrin α IIb β 3 induces the adhesion and activation of mast cells through interaction with fibrinogen. **J. Immunol.** 176:52-60.
3. Nakajima, H., Shibata, F., Fukuchi, Y., Goto-Koshino, Y., Ito, M., Urano, A., Nakahata, T., Aburatani, H., and Kitamura, T. (2006) Immune suppressor factor confers stromal cell line with enhanced supporting activity for hematopoietic stem cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 340: 35-42.
4. Nakajima, H., Watanabe, N., Shibata, F., Kitamura, T., Ikeda Y., and Handa, M. (2006) N-terminal region of CCAAT/ enhancer binding protein a is critical for cell cycle arrest, apoptosis and functional maturation during myeloid differentiation. **J. Biol. Chem.** 281:14494-14502, 2006.
5. Nakajima, H., Shibata, F., Kumagai, H., Shimoda, K., and Kitamura, T. (2006) Tyk2 is dispensable for induction of myeloproliferative disease by mutant FLT3. **Int. J. Hematol.** 84:54-59.
6. Fukuchi, Y., Shibata, F., Ito, M., Goto-Koshino, Y., Sotomaru, Y., Ito, M., Kitamura, T., and Nakajima, H. (2006) Comprehensive analysis of myeloid lineage conversion using mice expressing an inducible form of C/EBP α . **EMBO J.** 25: 3398-3410.
7. Huang, H., Ryu, R., Chang, E-J., Kim, H.J., Kim, H-M., Kitamura, T., Lee, Z.H., and Kim, H-H. (2006) Osteoclast differentiation requires TAK1 and MKK6 for NFATc1 induction and NF- κ B transactivation

- by RANKL. **Cell Death and Differentiation** 13: 1879-1891.
8. Kawashima, T., Bao, Y.C., Moon, Y., Tonozuka, Y., Minoshima, Y., Hatori, T., Kiyono, M., Nosaka, T., Nakajima, H., Williams, D.A., and Kitamura, T. (2006) Rac1 and a GTPase activating protein MgcRacGAP are required for nuclear translocation of STAT transcription factors. **J. Cell Biol.** 175: 937-946.
 9. Izawa, K., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Matsuoka, T., Oki, T., Shibata, F., Kumagai, H., Nakajima, H., Maeda-Yamamoto, M., Hauchins, J.P., Tybulewicz, V.L.J., Takai, T., and Kitamura, T. Functional analysis of an activating receptor LMIR4 as a counterpart of an inhibitory receptor LMIR3. **J. Biol. Chem.** in press.
 10. Nakayama, M., Underhill, D.M., Peterson, T.W., Li, B., Kitamura, T., Takai, T., and Aderem, A. (2007) Paired Ig-like receptors bind to bacteria and shape TLR-mediated cytokine production. **J. Immunol.** 178:4250-4259.
2. 学会発表
 - 1 Minoshima, Y., Hori, T., Okada, M., Kimura, H., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Bao, Y. C., Kawashima, T., Kitamura, T., and Fukagawa, T. CENP-50, a centromere component, is required for recovery from spindle damage. **20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FABMB Congress** kyoto, Japan 2006 Jun 18-23
 - 2 Hori, T., Minoshima, Y., Okada, M., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Okawa, K., Kimura, H., Kitamura, T., and Fukagawa, T. Analysis of the CENP-50 complex that required for the proper kinetochore functions. **20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FABMB Congress** kyoto, Japan 2006 Jun 18-23
 - 3 Kawashima, T., Tonozuka, Y., Minoshima, Y., and Kitamura, T. MgcRacGAP controls cell differentiation and cell division converting its target small GTPases through cell cycle. **20th IUBMB International Congress of**

Biochemistry and Molecular Biology and 11th FABMB Congress kyoto, Japan 2006 Jun 18-23

- 4 小埜良一、熊谷英敏、中島秀明、殿塚行雄、菱谷 愛、滝 智彦、林 泰秀、北村 俊雄、野阪 哲哉 MLL 融合蛋白による多段階発癌モデルマウス:MAP キナーゼの重要性 第65回日本癌学会学術総会 2006年9月28日-30日 横浜
- 5 Rac1 and MgcRacGAP are required for nuclear transport of the tyrosine phosphorylated form of STAT3 and STAT5. Kitamura, T. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology Colorado, USA 2007 January 5-10
- 6 Learning from model mice for myelodysplastic syndromes (MDS) and MDS/overt leukemia. Kitamura, T. USA-Japan Cooperative Cancer Research Kauai, Hawaii 2007 March 19-21
- 7 Integrin alphaIIb beta3 on megakaryocytes and its in vivo roles. Oki, T., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Inagaki, N., and

Kitamura, T. 第36回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2006年12月11-13日

- 8 The characterization of a novel immunoglobulin-like receptor, leukocyte mono-Ig-like receptor 5 (LMIR5). Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., Matsuoka T., Oki, T., TAKAI, T., and Kitamura, T. 第36回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2006年12月11-13日
- 9 Characterization of LMIR4, an activating receptor, which could pair with LMIR3, an inhibitory receptor. Izawa, K., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Oki, T., Matsuoka, T., Takai, T., and Kitamura, T. 第36回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2006年12月11-13日

H. 知的財産権の出願/登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

レトロウイルス技術による癌抗原の細胞表面上カタログ化と癌の診断治療への応用に関する総合的研究

分担研究者 北村俊雄 東京大学医科学研究所 細胞療法分野教授

研究要旨

多くの先進国においてがんによる死亡は死因の一位を占め、がんの早期診断早期治療は社会的にも重要な課題である。近年、がんの診断や治療は着実に進歩し早期発見によって完治するケースが多くなってきた。しかしながら膵がんなど早期診断が困難ながんは発見された時には既に根治が難しい場合が多い。本研究の目的は、早期診断が難しく予後が悪い膵がん、グリオーマ（グリオブラストーマ）、ユーイング肉腫および日本に多い胃がんのマーカ分子を用いた血清診断を確立すること、抗体を用いた治療への応用を目指すことである。

本年度は、まず膵がん、胃がんおよびグリオブラストーマの細胞株由来の分泌蛋白質および膜蛋白質をシグナルシーケンストラップ法でそれぞれ数十種類同定し、がん細胞マーカ候補とした。次に、これらがん細胞マーカ候補分子の一部に対して抗体を作成した。これまでにシグナルシーケンストラップ法で各々のがんから獲得した数百クロンの cDNA のうち、膵がん由来分子に対するモノクローナル抗体を8種類作成し、これらの抗体の解析を開始した。本年度の結果から、シグナルシーケンストラップ法 SST-REX 法で得られる SST クローン（ヒトがん細胞由来の膜蛋白質あるいは分泌蛋白質を一種類ずつ細胞膜上に発現しているマウス細胞）を利用することによって効率良くモノクローナル抗体を作成できることが確認された。

本プロジェクトはまだ始まったばかりであるが、既に興味深い分子を同定し得た。また、作成した8種類の抗体のうち膵がん細胞株の増殖を *in vitro* で抑制する抗体が1種類存在した。

A. 研究目的

日本を含む多くの先進国においてがんによる死亡は死因の一位を占める。がんを早期に発見し適切な治療を速やかに行うことは、国民の健康増進に役立つことに加え、増大する医療費の軽減効果も期待できる。従って、がんの早期診断および治療は社会的にも重要な課題である。近年、がんの診断や治療は着実に進歩し早期発見によってがんが完治するケースが多くなってきた。しかしながら膵がん、グリオブラストーマを代表とする脳腫瘍

など早期診断が困難ながんは発見された時には既に根治が難しい場合が多い。特に膵がんが初期にみつかることは稀で、症状が出てからの発見例では極めて予後が悪い。肝がんや大腸がんなど一部のがんでは α フェトプロテインや CEA など高頻度に血中で検出可能ながん細胞由来マーカ蛋白質が見つかっているが、膵がんやグリオブラストーマにおいても同様のマーカがあればスクリーニング検査として利用可能である。また胃がんや肺がんなど胃カメラや胸部 X 線で早

期発見が可能ながんにおいても、血液検査で検出できるマーカー分子があれば非侵襲的検査でスクリーニングができる利点がある。つまり胃カメラや胸部 X 線検査を受けない人に対するスクリーニングとして有効性が期待できる。

本研究の目的は、早期診断法が難しく予後が悪い膵がん、グリオーマ（グリオブラストーマを含む）および日本に多い胃がんのマーカー分子を同定し、これらのマーカー遺伝子に対する抗体を作成することおよび抗体療法に利用できるがん抗原および抗体を同定することである。

B. 研究方法

本研究では、研究代表者らが開発した高効率かつ正確なシグナルシーケンストラップ法 SST-REX (Kojima and Kitamura, Nat Biotech, 1999) を利用して、がん特異的抗原を同定し、モノクローナル抗体を作成する。

特定のがん細胞からシグナルシーケンストラップ用のライブラリーを作成し SST-REX を行うと、マウス pro-B 細胞株 Ba/F3 にヒトがん細胞由来の膜蛋白質あるいは分泌蛋白質がサイトカインレセプターMPL との融合蛋白質として一種類ずつ発現する細胞カタログが得られる。SST-REX 法では、本来 IL-3 依存性である Ba/F3 細

胞の自律増殖能獲得を指標としてライブラリーをスクリーニングする。実験の原理は、シグナルシーケンスを有する分泌蛋白質あるいは膜蛋白質が恒常的活性型サイトカインレセプターMPL と融合して Ba/F3 表面に発現された場合は細胞の自律増殖が誘導されることである。自律増殖能を獲得した細胞に挿入されている cDNA は PCR で容易に回収できる。シグナルシーケンスを持たない蛋白質が恒常的活性型 MPL と融合しても細胞の自律増殖は誘導できない。

本研究においては SST-REX 法の過程で得られるがん細胞由来の分泌蛋白質あるいは膜蛋白質と MPL の融合蛋白質として発現している Ba/F3 細胞群（以後 SST クローンと呼ぶ）を免疫源としてマウスモノクローナル抗体を作製する。患者がん組織あるいはがん細胞株を利用して樹立した抗体の特異性およびがん細胞株に対する増殖抑制効果を調べる。

また上記の実験で樹立した SST クローンを利用して細胞チップ作製し、モノクローナル抗体のスクリーニング、患者血清中の抗がん抗原抗体のアッセイに利用することを目指す。

（倫理面への配慮）

ここまでの研究ではヒトのサンプルを使用していない。ヒトサンプルを

利用する場合は当該施設の倫理審査委員会の承認を得た研究計画書に基づき、該当者に説明を行い、同意書を得る。

動物実験においては、Sacrificeするとき麻酔を行うなど動物（主にマウス）に苦痛を与えないように配慮する。また1年に一回の動物慰霊祭に参加して動物に対する哀悼の意を持つ。

C. 研究成果

がん細胞株のシグナルシーケンストラップを行い、がん細胞由来の膜蛋白質および分泌蛋白質を一種類ずつ細胞表面に発現している SST クローンを樹立した。発現データベースなどによって興味深い発現分布を示す分子を提示する SST クローンを中心に、マウスに免疫することによりモノクローナル抗体を作成し、樹立した抗体のがん細胞株に対する反応性および増殖抑制効果を調べた。また、モノクローナル抗体作成をより効率良くすること、細胞チップの改善の目的で SST ベクターの改変も試みた。

SST スクリーニングと抗体作成はまだ始まったばかりであるが、既に複数の興味深い分子を同定し得た。また、作成した8種類の抗体のうち膵がん細胞株の増殖を *in vitro* で抑制する抗体が1種類存在した。

1. 各種がん細胞株のシグナルシーケンストラップ法

以下の細胞株から、膵がん、グリオブラストーマの SST-REX 用ライブラリーを作成し、シグナルシーケンストラップのスクリーニングを行った。膵がんについては AsPC-1/BxPC-3 由来のライブラリーと Capan-1 由来のライブラリーを作成し、グリオブラストーマとユーイング肉腫ライブラリーについてはそれぞれ mRNA を混合して一種類のライブラリーを作成した。胃がんについては組織型の異なる4種のライブラリーを樹立した。

膵がん

AsPC-1、BxPC-3、Capan-1

グリオブラストーマ

U87MJ、U251、T98G

胃がん

GCIY (スキルス)、MKN1 (adenosquamous)、KATOIII (signet ring)、MKN45 (低分化腺がん)

SST-REX のスクリーニングを行った結果、膵がんから419クローン、88種、グリオブラストーマから264クローン、54種の SST クローンを樹立した。これらのライブラリーのスクリーニングをさらに継続すると同時に、胃がんのライブラリーのスクリーニングも19年度に開始予定である。

SST-REX のスクリーニングはまだ開始して間もないが、既に興味ある SST

クローンを同定した。膵がん由来分子で、一部の膵がん細胞および大腸がん細胞に極めて高い発現を示す分子を見いだした。当該分子については、今後、モノクローナル抗体を作成予定である。

2. 樹立したモノクローナル抗体の characterization

膵がん由来膜蛋白質および分泌蛋白質に対して作成したモノクローナル抗体 8 種について予備的な characterization を行った。そのうち 1 種類の抗体は膵がん細胞株の増殖を *in vitro* で抑制した。今後、担がんマウスを作製して *in vivo* での効果を調べて行く予定である。

3. がん細胞由来膜蛋白質あるいは分泌蛋白質に対するモノクローナル抗体作成

本研究プロジェクトの特徴は、マウス細胞がヒト癌細胞由来の膜蛋白質あるいは分泌蛋白質を一種類ずつ細胞表面に発現している SST クローンを免疫源として簡便にマウスモノクローナル抗体を作成する点である。現在までに膵がん由来分子に対するモノクローナル抗体を 8 種樹立した。現在、膵がんについてはさらに 9 種類、グリオブラストーマについては 25 種類の腫瘍由来蛋白質に対するモノ

クローナル抗体の作成を予定している。

4. 細胞チップの作成および条件検討

上記の SST クローンを細胞チップにして、モノクローナル抗体のスクリーニングや、患者血清中に存在する癌抗原に対する抗体の検出に利用する目的のために、細胞チップ作成の基礎条件を検討し、細胞固定後、PBS/ 5 % Sucrose、1 % BSA で 30 分間、室温でブロッキングを行うと免疫染色を行う場合のシグナル/ノイズ比が高いことを明らかにした。この条件で SST クローンを細胞チップに固定し、モノクローナル抗体に対する反応性を調べたところ、セルソーターの結果と相関が認められた。

5. SST-REX 法および SST クローンを利用した抗体作成法の改良

抗体作成のさらなる効率上昇と細胞チップの感度上昇のためには、SST クローンにおけるがん細胞由来分子の発現レベルを高めることが一番効果的であることが予想される。そこで、本年度は以下に示したような工夫をした。

1) pMX-SST ベクターの改善

従来使用していた pMX-SST ベクターにはウイルスの gag 蛋白質遺伝子が残っており、gag 蛋白質の一部が翻

訳され細胞表面に発現したり、cDNAとの融合蛋白質を発現してしまうことがあった。この場合まれに gag に対する抗体ができることがあった。そこで、gag の開始コドン (ATG) に変異を導入し、また glyco-gag の開始コドン (CTG) の直下にストップコドンを挿入した。さらに cDNA を挿入する multi-cloning site の上流に3つ停止コドン (TAG) を挿入し、融合蛋白質産生の可能性を完全に排除した。新しいベクター pMXs-SST によって SST を行ったところ、従来のベクターと同等の効率でシグナルシークエンストラップが行えた。また、SST クローンにおけるがん細胞由来蛋白質の発現レベルも同等であった。

2) pMXs-SST ベクターのプロモーターの変更

がん細胞由来の融合蛋白質 (ヒト MPL との融合) の発現をさらに高めるため、pMXs-SST の 3' LTR に欠失を挿入し、その部分に CMV、EF1 α 、CAG、SR α などの強力なプロモーターを挿入したベクターを作成した。しかしながら理由は不明であるが、がん細胞由来の融合蛋白質の発現は認められなかった。そこで、3' LTR を欠失した SI-pMXs-SST (self-inactivating vector) に内部プロモーターとして CMV、EF1 α 、CAG、SR α プロモーターを挿入した。これらのベクターは挿入

後も内部プロモーターに依存した発現が認められた。ところが意外なことに Ba/F3 細胞中での発現量は LTR をプロモーターとした場合が最も強いことが判明した。また、これらのベクターによる蛋白質の発現量を他の IL-3 依存性細胞株 32D および繊維芽細胞株 NIH3T3 で調べたところ、やはり LTR が一番強かった。

D. 考察

SST ベクターの発現量については、通常 LTR より強力と考えられている CMV、EF1 α 、CAG、SR α プロモーターが Ba/F3 だけでなく、32D および NIH3T3 細胞でも LTR より弱いプロモーター活性しか示せなかった理由は不明である。また SST クローンを利用した抗体作成は効率良く成功したが、なかにはうまく抗体が取得できない場合があった。うまく抗体を作成できなかった SST クローンにおける MPL 融合蛋白質の発現量は必ずしも低くはなかった。現在、マウスモノクローナル抗体を作製しているが、今後ハムスターを使ったモノクローナル抗体作成も視野に入れている。そのためには、ヘルパーウイルスを利用して SST クローンから挿入ベクターを回収し、CHO で発現させるなどの系の立ち上げも考慮している。CHO は遺伝子発現の効率もよく、ハムスターへの免疫にそ

のまま利用できるので、マウスモノクローナル抗体がうまく取得できない場合、ハムスターのモノクローナル抗体も候補のひとつとして考える。ただ、この目的のためにはハムスターの系を立ち上げることと同時に確実かつ簡便に SST クローンから挿入プロウイルスをウイルス粒子として回収する方法を確立することが必要となる。

E. 結論

本年度は SST-REX を膵がん、グリオーマの細胞株から樹立したライブラリーで行い、効率良く SST クローン（がん細胞由来膜蛋白質あるいは分泌蛋白質とヒトサイトカインレセプターMPL の細胞内、膜貫通ドメインの融合蛋白質を発現している Ba/F3 細胞）を樹立し得た。これらの SST クローンのうち一部をマウスに免疫することにより、効率良くモノクローナル抗体を作成することができた。一方、シグナルシーケンス用のベクター pMX-SST を改良し、ウイルス構造蛋白質の発現の可能性を排除した改良型 pMXs-SST を作製し、新しいベクターを使って SST-REX が同様に行えることを確認した。

今後は、胃がん細胞株も含めて SST-REX スクリーニングを継続し、より多くのがんマーカー候補分子に対するモノクローナル抗体を樹立する

ことによって、がんの早期診断法の開発およびがん治療の分子標的となりうる分子の同定を目指すと同時に、実験系に対する以下の改良も並行して行う。

- 1) ベクターに改良を加えることにより SST クローンにおける融合蛋白質の発現量を増強する工夫をする。
- 2) SST-REX 法をさらに改善し、抗体作成効率を高める。
- 3) これらの改良により、感度の高い細胞チップの作成を目指す。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsubara, A., Iwama, A., Yamazaki, S., Fruta, C., Hirasawa, R., Morita, Y., Osawa, M., Motohashi, T., Eto, K., Ema, H., Kitamura, T., Vestweber, D., and Nakauchi, H. (2006) Endomucin, a CD34-like sialomucin, marks stem cells throughout development. *J. Exp. Med.* 202: 1483-1492.
2. Oki, T., Kitaura, J., Eto, K., Maeda-Yamamoto, M., Inagaki, N., Nagai, H., Yamanishi, Y.,

- Kumagai, H. and Kitamura, T. (2006) Integrin α IIBb3 induces the adhesion and activation of mast cells through interaction with fibrinogen. **J. Immunol.** 176:52-60.
3. Nakajima, H., Shibata, F., Fukuchi, Y., Goto-Koshino, Y., Ito, M., Urano, A., Nakahata, T., Aburatani, H., and Kitamura, T. (2006) Immune suppressor factor confers stromal cell line with enhanced supporting activity for hematopoietic stem cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 340: 35-42.
4. Nakajima, H., Watanabe, N., Shibata, F., Kitamura, T., Ikeda Y., and Handa, M. (2006) N-terminal region of CCAAT/enhancer binding protein α is critical for cell cycle arrest, apoptosis and functional maturation during myeloid differentiation. **J. Biol. Chem.** 281:14494-14502, 2006.
5. Nakajima, H., Shibata, F., Kumagai, H., Shimoda, K., and Kitamura, T. (2006) Tyk2 is dispensable for induction of myeloproliferative disease by mutant FLT3. **Int. J. Hematol.** 84:54-59.
6. Fukuchi, Y., Shibata, F., Ito, M., Goto-Koshino, Y., Sotomaru, Y., Ito, M., Kitamura, T., and Nakajima, H. (2006) Comprehensive analysis of myeloid lineage conversion using mice expressing an inducible form of C/EBP α . **EMBO J.** 25: 3398-3410.
7. Huang, H., Ryu, R., Chang, E-J., Kim, H. J., Kim, H-M., Kitamura, T., Lee, Z.H., and Kim, H-H. (2006) Osteoclast differentiation requires TAK1 and MKK6 for NFATc1 induction and NF- κ B transactivation by RANKL. **Cell Death and Differentiation** 13: 1879-1891.
8. Kawashima, T., Bao, Y.C., Moon, Y., Tonozuka, Y., Minoshima, Y., Hatori, T., Kiyono, M., Nosaka, T., Nakajima, H., Williams, D.A., and Kitamura, T. (2006) Rac1 and a GTPase activating

- protein MgcRacGAP are required for nuclear translocation of STAT transcription factors. *J. Cell Biol.* 175: 937-946.
9. Izawa, K., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Matsuoka, T., Oki, T., Shibata, F., Kumagai, H., Nakajima, H., Maeda-Yamamoto, M., Hauchins, J.P., Tybulewicz, V.L.J., Takai, T., and Kitamura, T. Functional analysis of an activating receptor LMIR4 as a counterpart of an inhibitory receptor LMIR3. *J. Biol. Chem.* in press.
 10. Nakayama, M., Underhill, D.M., Peterson, T.W., Li, B., Kitamura, T., Takai, T., and Aderem, A. (2007) Paired Ig-like receptors bind to bacteria and shape TLR-mediated cytokine production. *J. Immunol.* 178:4250-4259.
- 2. 学会発表**
- 1 Minoshima, Y., Hori, T., Okada, M., Kimura, H., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Bao, Y. C., Kawashima, T., Kitamura, T., and Fukagawa, T. CENP-50, a centromere component, is required for recovery from spindle damage. **20th. IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FABMB Congress** kyoto, Japan 2006 Jun 18-23
 - 2 Hori, T., Minoshima, Y., Okada, M., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Okawa, K., Kimura, H., Kitamura, T., and Fukagawa, T. Analysis of the CENP-50 complex that required for the proper kinetochore functions. **20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FABMB Congress** kyoto, Japan 2006 Jun 18-23
 - 3 Kawashima, T., Tonozuka, Y., Minoshima, Y., and Kitamura, T. MgcRacGAP controls cell differentiation and cell division converting its target small GTPases through cell cycle. **20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FABMB Congress** kyoto,

Japan 2006 Jun 18-23

1 ~ 13日

- 4 小埜良一、熊谷英敏、中島秀明、殿塚行雄、菱谷 愛、滝 智彦、林 泰秀、北村 俊雄、野阪 哲哉 MLL 融合蛋白による多段階発癌モデルマウス：MAP キナーゼの重要性 第65回日本癌学会学術総会 2006年9月28日~30日 横浜
 - 5 Rac1 and MgcRacGAP are required for nuclear transport of the tyrosine phosphorylated form of STAT3 and STAT5. Kitamura, T. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology Colorado, USA 2007 January 5-10
 - 6 Learning from model mice for myelodysplastic syndromes (MDS) and MDS/overt leukemia. Kitamura, T. USA-Japan Cooperative Cancer Research Kauai, Hawaii 2007 March 19-21
 - 7 Integrin α IIb β 3 on mast cells and its in vivo roles. Oki, T., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Inagaki, N., and Kitamura, T. 第36回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2006年12月1
 - 8 The characterization of a novel immunoglobulin-like receptor, leukocyte mono-Ig-like receptor 5 (LMIR5). Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., Matsuoka T., Oki, T., TAKAI, T., and Kitamura, T. 第36回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2006年12月11~13日
 - 9 Characterization of LMIR4, an activating receptor, which could pair with LMIR3, an inhibitory receptor. Izawa, K., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Oki, T., Matsuoka, T., Takai, T., and Kitamura, T. 第36回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2006年12月11~13日
- H. 知的財産権の出願/登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし