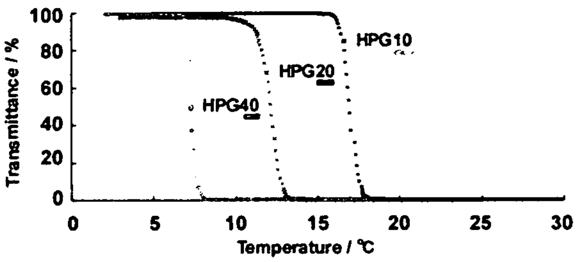
そして、サクシニル基をイソプロピルアミンと反応させることによって、温度応答性の N-イソプロピルアミド（NIPAM）基を導入した。

得られた NIPAM 基を有するポリグリシドールの親水性・疎水性転移を、曇点測定によって調べた。その結果、これらの高分子は、重合度 10 のものでは 17℃、重合度 20 のものでは 12℃、重合度 40 のものでは 7℃において、シャープな転移を示すことがわかった（図6）。

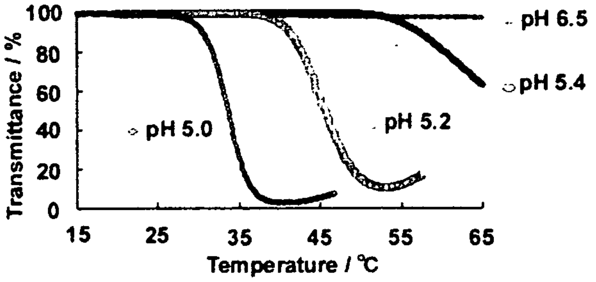


NIPAm$_1$-Suc-HPGの重合度の違いによる相転移温度の変化

図6．NIPAM 基を有する分岐型ポリグリシドール誘導体の温度応答性に及ぼす重合度の影響。重合度１０，２０および４０のポリグリシドールを用いて作成した NIPAM 基導入誘導体のリン酸緩衝生理食塩水溶液の濁度の温度依存性を示す。

NIPAM 基を導入したポリグリシドールの温度応答性はその導入率によって変化するものと考えられる。そこで、イソプロピルアミンとの反応度のことなる NIPAM 基導入ポリグリシドールを合成した。サクシニル基の N-イソプロピルアミン反応率の増大とともに、高分子の転移温度が上昇した。このことは、NIPAM 基の導入率を調節することで、高分子の転移温度を自在に調節できることを示している。

また、サクシニル化ポリグリシドールのサクシニル基の NIPAM 基への変換率が完全でない場合、残存するサクシニル基のため転移温度はｐH 依存性を示すと考えられる。そこで、NIPAM 基導入率が 60％のものを用いて、転移温度に及ぼすｐH の影響について検討した。図７に示されるように、ｐH の低下とともに転移温度が著しく低下することが確認された。この高分子は、３７℃、中性条件下では水溶性であるが、弱酸性条件では疎水性になることが分かる。この現象を利用して、この高分子をリポソームに複合化することで、細胞に取り込まれた後、弱酸性のエンドソーム内で不安定化するリポソームを得ることができる。このようなリポソームは、標的細胞の内部に生理活性分子を導入するためのキャリアとして利用できると考えられる。



NIPAm$_{0.6}$-Suc-HPG20の種々のpHでの濁度変化、50mM PBS

図７．NIPAM 基置換率が 60％のポリグリシドール誘導体の転移温度に及ぼすｐH の影響。

今後、NIPAM 基の導入率を調節することで、40℃付近において疎水性化するポリグリシドール誘導体を合成し、その複合化による感温性リポソームの作製を行う。

C-4. 感温性デンドロン脂質を用いたリポソームの作製

球状構造を有する新しいタイプの高分子化合物であるデンドリマーはナノカプセルとして機能することから薬物キャリアとして期待されている。これまでの研究において、デンドリマー分子の末端にイソブチルアミド（IBAM）基を集積させることによって、デンドリマーに温度応答機能を付与できることを明らかにした。ここでは、温度応答性デンドリマーの部分構造であるデンドロン部位を極性基とする新規脂質（図８）を作製し、そのリポソームの温度応答性について検討した。

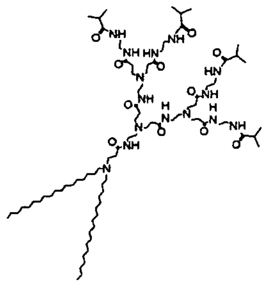


図８．温度応答性デンドロン脂質（IBAM-G2-DL）の構造。

IBAM-G1 デンドロンをもつ脂質（IBAM-G1-DL）

は水中において安定な会合体を形成しなかった。一方、IBAM-G2 デンドロンを有する脂質（IBAM-G2-DL）は低温においてベシクル（リポソーム）を形成した。しかし、分散液の温度を上昇させると特定の温度（約 30℃）において凝集して崩壊することがわかった。また、末端アルキルアミド基として、シクロプロパンアミド基および n-ブチルアミド基を導入したところ、異なる温度においてベシクルが崩壊することがわかった。

このベシクルの応答する温度領域は、末端アルキルアミド基によって制御可能であることから、このような温度応答性デンドロン脂質を用いることによって、マイルドな加温によって急激に崩壊する高感度型リポソームの構築が可能であると考えられる。

D．結論

本年度は、感温性を有する共重合体を ADR 包埋リポソームに複合化し、しかも、脂質組成を最適化することで高感度を示す温度応答性リポソームを開発することに成功した。また、生体適合性と温度応答性を併せ持つリポソームとして、PEG と感温性ブロックを含む新規ブロック共重合体で修飾したリポソームを作成した。このリポソームは、良好な温度領域において ADR の放出を促進することがわかった。さらに、新しいタイプの生体適合性感温性ポリマーの作成を行った。また、アルキルアミド基を持つデンドロン脂質を用いて、温度応答性ベシクルが得られることを明らかにした。今後これらの感温性リポソームの感度や温度領域の改善を試みる。また、感温性高分子や脂質を用いて、従来の感温性リポソームをしのぐ高感度の実現に向けて研究を進める。

E．研究発表

1. K. Kono, C. Kojima, N. Hayashi, E. Nishisaka, K. Kiura, S. Watarai, A. Harada, "Preparation and cytotoxic activity of poly(ethylene glycol)-modified poly(amidoamine) dendrimers bearing adriamycin.", **Biomaterials**, **29**, 1664-1675 (2008).
2. N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Koiwai, K. Shimizu, N. Emi, K. Kono, "Generation of highly potent nonviral gene vectors by complexation of lipoplexes and transferrin-bearing fusogenic polymer-modified liposomes in aqueous glucose solution.", **Biomaterials**, **29**, 1262-1272 (2008).
3. Y. Yuba, C. Kojima, N. Sakaguchi, A. Harada, K. Koiwai, K. Kono, "Gene delivery to dendritic cells mediated by complexes of lipoplexes and pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes", J. Controlled Release, submitted.
4. N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Kono, "Preparation of pH-sensitive poly(glycidol) derivatives with varying hydrophobicities: their ability to sensitize stable liposomes to pH", Bioconjugate Chemistry, submitted.

F．特許

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

「高磁場 MRI を用いた癌微少病変高感度検出システムの開発」に関する研究

分担研究者　青木伊知男
放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・先端生体計測研究グループ・計測システム開発チーム・チームリーダー

研究要旨 MRI による微少癌診断・治療システムの改善を図るため、優れた磁性体ナノ粒子あるいはナノキャリアを検討し、7 テスラー高磁場 MRI により画像診断における特異性、解像度及び感度の改善を図る。本年度は、感温性リポゾームを使用し、マウス腫瘍モデルへの集積性、感度、温度感受性などを検討した。

A. 研究目的

本プロジェクトでは将来の先端医療の実現に向け、２つのシステムを実現する。即ち、単クローン抗体・磁性体ナノ粒子と高磁場 MRI による微少病変の高解像度画像化および感温性リポソームによる局所 DDS の臨床応用に向けた基盤整備である。本分担では、主に後者を担当した。

B．研究方法

温度により疎水性に変化するポリマーを含んだリポソーム（以下、感温性リポゾーム）を作成、抗癌剤アドレアマイシン、MRI 造影剤であるマンガン、および蛍光色素ローダミンを内包し、PEG により血中滞留性を延長させた新規造影剤を開発した。7 テスラ水平型 MRI（JASTEC, Bruker 社製）に、送信および２ch フェイズドアレイ受信 RF コイルを用いて、パルスシーケンスを最適化することで良好な感度を得た。１）サンプル計測：新規造影剤の緩和時間を、蒸留水、室温、40℃10 分加温後で比較した。２）動物実験１（投与後の短時間集積観察）：Bulb/c nude 担癌マウスを対象とし、造影剤の投与前および IV 投与後撮像 3 時間後まで、連続して T1 強調 MRI を撮像した。３）動物実験２（投与後の長時間集積観察と加温）Bulb/c nude 担癌マウスを対象とし、造影剤の投与後直後、２時間後、４時間後、８時間後に蛍光イメージを取得した。また、投与８時間後に 42℃加温の前後に MRI を撮像した。

（倫理面への配慮）全ての実験は、放射線医学総合研究所が定める実験倫理委員会の承認を受け、動物に苦痛が生じないよう麻酔下にて実施した。

C．研究結果

1）サンプル計測：新規造影剤の緩和時間は、蒸留水、室温、40℃10分加温後の順に短縮し、とりわけ加温後には強い造影効果を発揮した。2）動物実験1（投与後の短時間集積観察）：Bulb/c nude担癌マウスにおいて、投影剤の投与前と比較し、T1 強調 MRI の信号強度は、投与後に僅かに上昇し、集積性が in vivo で観察可能であることが示された。3）動物実験2（投与後の長時間集積観察と加温）Bulb/c nude 担癌マウスにおいて、造影剤の投与後直後から蛍光イメージにおいて高い信号が観察され、8時間後までに徐々にその特異性が上昇した。また、投与8時間後に撮像されたMRIでは、42℃加温の前後で、MRI の信号が上昇し、薬剤の放出が示唆された。

D．考察

本研究では、高精度な温度感受性を持つリポソームを使用して、MRI と蛍光の両方のモダリティで使用可能な複合造影剤の作成および動物実験における DDS の可視化に関する有用性が示された。この造影剤は、腫瘍集積性・MRI 感受性・蛍光特性・抗腫瘍・温度感受による薬剤放出という5つの機能を併せ持ち、その過程が全て可視化可能な点に大きな特長を持つ。今後、より特異性が高い腫瘍への標的化を目指して、改良すると共に、高感度化を検討する。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1．論文発表

1. Bakalova, R., Zhelev, Z., Aoki, I., Kanno, I. Multimodal and biocompatible quantum dots - strategy of design. Nature Photonics, 2007, 1(9): 487-489.

2. Shimizu Y, Umeda M, Mano H, Aoki I, Higuchi T, Tanaka C. Neuronal response to Shepard's tones. An auditory fMRI study using multifractal analysis. Brain Res. 2007 Dec 19;1186:113-23. Epub 2007 Oct 16.

3. Silva AC, Lee JH, Wu CW, Tucciarone J, Pelled G, Aoki I, Koretsky AP. Detection of cortical laminar architecture using manganese-enhanced MRI. J Neurosci Methods. 2008 Jan 30;167(2):246-57. Epub 2007 Sep 2.

2．学会発表

1. Bakalova R, Masamoto K, Zhelev Z, Aoki I, Obata T, Kanno I. Polymer coating of quantum dots is crucial for their in vivo optical imaging application. Joint Molecular Imaging Conference, Providence, 0366, 2007; Sep 8-11.

2. Y. Kawai, I. Aoki, N. Matsumoto, M. Umeda, T. Higuchi, J. Kershaw, A. C. Silva, and C. Tanaka. Detection of Reactive Gliosis using Manganese-enhanced MRI (MEMRI). Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Scientific Meeting, 2007; 15: 1215.

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

膵臓癌に対する高性能標的化抗体の作製の基盤研究

分担研究者　濱田洋文　札幌医科大学医学部　分子医学研究部門

研究要旨　温感性リポソーム複合体の腫瘍標的ピンポイント DDS 開発に必要な高性能標的化抗体(STAAB: Super-targeting antibody)の作製を新規に開発したスクリーニング方法を用い行った。ファイバー改変アデノウイルスを用いた本スクリーニング法で樹立できる抗体は腫瘍細胞の細胞表面分子に対して高結合能・特異性を有することがこれまでの研究成果より明らかになっており、ヒト膵臓癌細胞(PK-1, AsPC1)等を免疫原として標的化抗体を作製した。これまでに膵臓癌に選択的に反応する抗体 S11 の認識抗原として新規膵臓癌・前立腺抗原 PAP2a の同定に成功し本プロジェクトへの共同研究を展開している。さらに本年度の研究で、膵臓癌特異的な抗体（1 種類）および腺癌特異的な抗体（2 種類）および多くの種類の癌組織で強反応性を示す抗体（1 種類）の樹立および認識抗原同定まで成功したことより本システムが有用性が示唆され、今後診断が困難な膵臓癌の検出および治療への応用研究が次年度以降期待される。

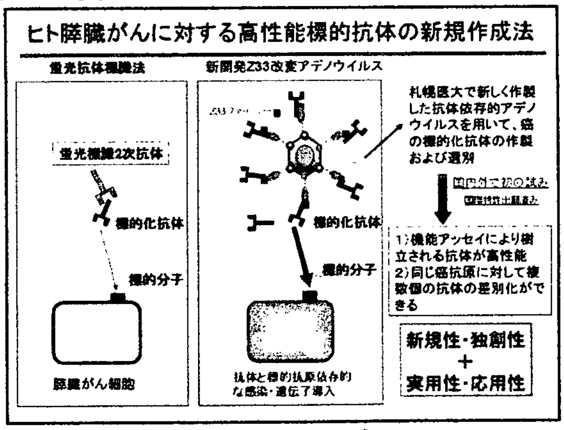
A.　研究目的

近年、癌の分子標的治療薬としての抗体が注目されている。治療効果を発揮する抗体を選別する方法は様々行われているが、反応特異性・結合力・生体内クリアランス等様々な問題を抱えており、より高性能の抗体の開発が望まれている。このことは診断薬でも同様であり、検出困難な癌を効率よく検出できる PET,MRI 等の分子イメージングに適している特異的標的化プローブを開発することが必要である。本研究では、抗体イムノグロブリン IgG のFc部との結合性を有した Z33 ペプチド導入アデノウイルスベクター（FZ33型アデノウイルス）を用いた癌標的化抗体スクリーニング系を利用し、癌を標的化できる抗体の作製を行い癌の治療・診断への応用を目指す。対象癌種としては検出・診断および治療が困難な膵臓癌を標的として、高性能抗体を樹立する。

標的となる膵臓癌細胞株としては高分化型の性状を有しているPK-1およびAsPC 1 を免疫原としてマウスを免疫し、ミエローマ細胞と細胞融合後は数千個のハイブリドーマ抗体ライブラリィからアデノウイルス感染法を用いて抗体を選別し、モノクローナル抗体として樹立後に質量分析等の手法を用いて認識抗原同定を行い、各抗原の性質解析・抗体の機能解析を通じて膵臓癌の標的抗体の検討を行った。

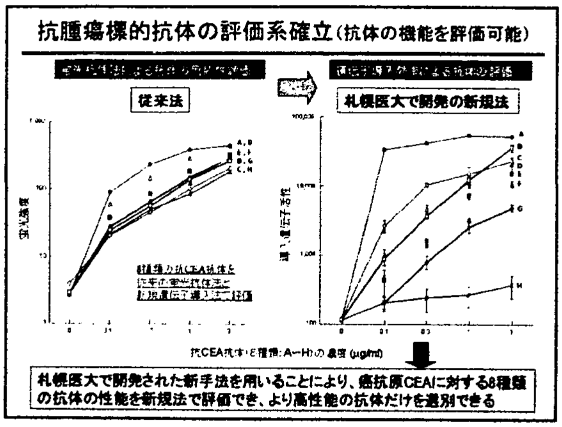
B.　研究方法

ヒト腺癌（膵臓癌・前立腺癌等）の標的化抗体のスクリーニング法として従来の蛍光抗体法 (FACS) やELISA法よりも高感度かつ高性能抗体を選別しやすい手法を用いた。図１に概要を示したが、アデノウイルスベクターのファイバー部に IgG のFc結合 Z33 モチーフ (FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD)

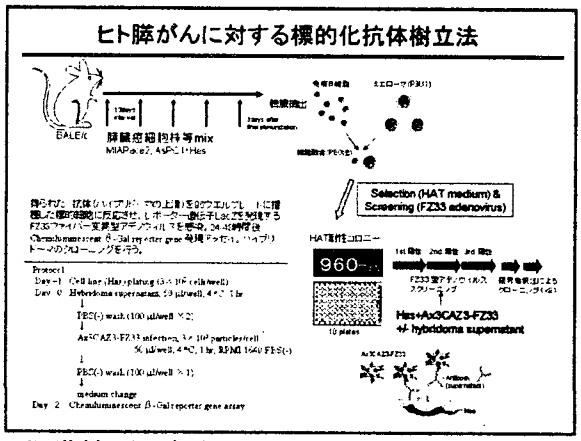


を含むファイバー変異型アデノウイルス Adv-FZ33 を作製した。上図に示すようにこのファイバー Z33 変異型アデノウイルスは細胞表面抗原に対する抗体依存的に細胞内に感染することが可能で、従来の蛍光抗体法やELISA法よりも抗体の性能の差異を明確にすることができる（次頁図）。そこで、がん細胞表面抗原と結合する標的化抗体依存的に癌細胞に遺伝子導入効率を高めることができる抗体産生ハイブリドーマ・ライブラリーを

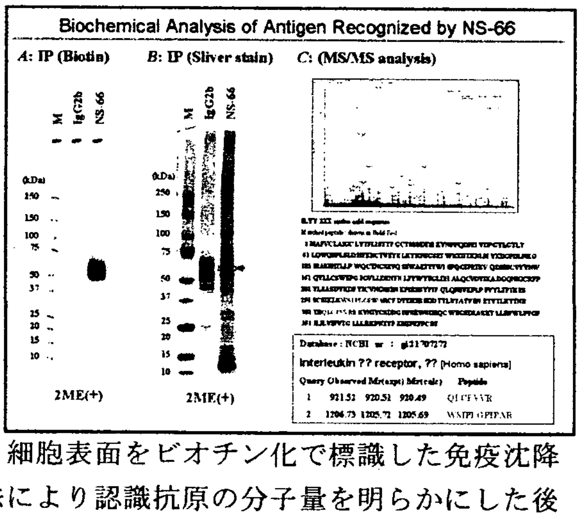
スクリーニングした。



Adv-FZ33 で陽性ウェルをスクリーニング後、限界希釈法によりモノクローナル抗体を数種類樹立した。



認識抗原の解析例を下図に示す。

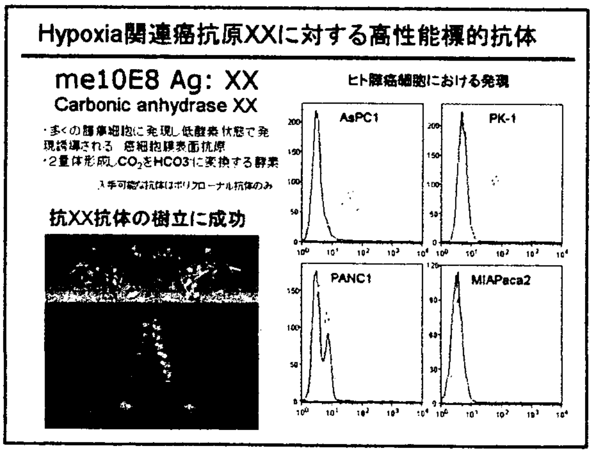


細胞表面をビオチン化で標識した免疫沈降法により認識抗原の分子量を明らかにした後に、大量(10^8 個以上)の細胞膜抗原から抗体の認識抗原を沈降し、銀染色により抗原分子のバンドを切り出す。切り出したバンドは質量分析にて由来タンパク分子を同定する。認識抗原の確認は候補抗原の cDNA 遺伝子導入細胞でその反応特異性で検討した。

C. 研究成果

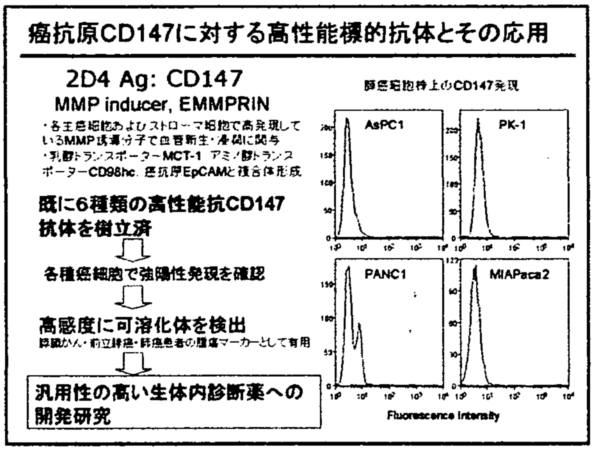
ヒト膵がん細胞に対する遺伝子導入効率を高める抗体産生ハイブリドーマ・ライブラリーをスクリーニングした。その結果、昨年度に引き続き今年度も膵がん細胞を始めとして多くの固形がん細胞を標的化できるモノクローナル抗体の樹立に成功した。

A) 膵臓癌・肺癌・前立腺癌等の癌細胞に反応性を示す抗体 me10E8 (mouse IgG1 kappa) の樹立に成功した。この抗体は Hypoxia (低酸素状態) の癌細胞で発現誘導され二酸化炭素分解酵素活性を有する膜表面糖タンパク質X (特許出願前のため非公開) を特異的に認識する。嫌気性代謝を特徴とする膵臓がん組織は間質細胞が多く浸潤する腫瘍であり、がん組織は低酸素状態に陥りやすい。この Hypoxia 関連分子と結合する抗体を用いてヒト膵がん移植マウスに対する抗腫瘍効果およびマウス膵臓癌細胞との反応性を検討中である。



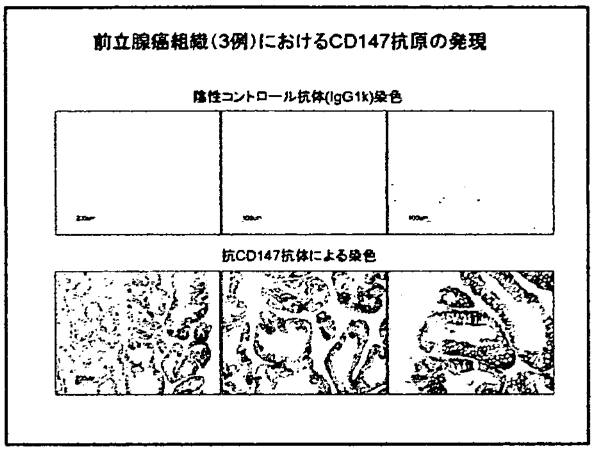
B) 前立腺癌細胞の免疫にて抗体クローン 1D4 (mouse IgG1, kappa) を樹立した。その後、膵臓癌を免疫し、標的化抗体を樹立した結果追加で6種類の抗体の樹立に成功した。質量分析および遺伝子導入細胞による認識抗原を同定した結果、CD147 (EMMPRIN)

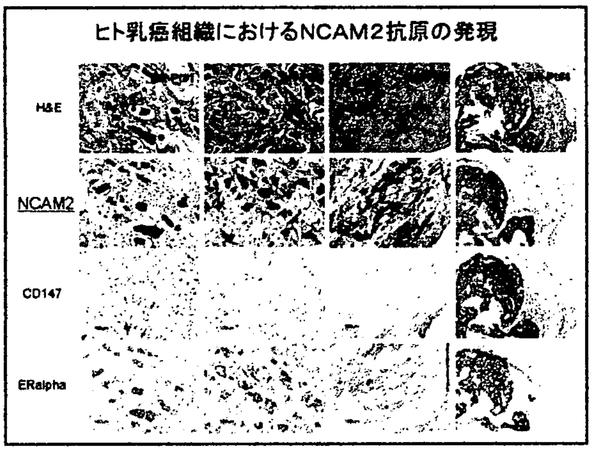
を認識する抗原であることが判明した。



CD147は癌の浸潤転移に重要なMMP（マトリックスメタロプロテアーゼ）の誘導活性化分子であり、前立腺癌・膵臓癌を始め多くの癌細胞で強発現していることを免疫病理組織解析で明らかにした。現在、癌の悪性度・浸潤度との関連を現在、Tissue arrayにて解析中である。また２種類の抗CD147抗体を用いることにより高感度で可溶化CD147を検出するELISA系の樹立に成功した。即ち、癌性胸膜炎患者の胸水に結核性胸膜炎胸水と比較し有意に高い値で可溶化CD147が産生されていることを確認し、癌の確定診断での有用性が確認された。現在可溶化ＣＤ１４７検出キットの開発を行っている。また今回樹立に成功した抗ヒトCD147抗体のうち２種類のクローンでマウス癌細胞との交差反応性を確認している。これらの結果より、温感性リポソームの特異的プローブとした抗CD147抗体の応用を検討する予定である。

C) 前立腺癌の免疫で樹立した抗体クローンLNI29（mouse IgG1, kappa）は前立腺癌・乳癌・肝臓癌・膵臓癌の一部の細胞に特異的に反応しており、ポリクローナル抗体を用いて各腫瘍組織との反応性を確認した結果、腫瘍組織で強発現している抗原であることが判明した（下図）。





さらに細胞内に治療遺伝子や抗癌剤を導入する効率の高い抗体であることから、温感性リポソーム等による生体内の腫瘍検出および治療に有用な抗体であることが示唆された。認識抗原はNCAM2(Neural cell adhesion molecule 2)でNCAM(CD56)とは異なり正常ＮＫ細胞には発現していない新規癌抗原である。現在、重篤な副作用を引き起こすことが予想される正常組織（肝臓・肺・脳）における NCAM2 の発現を再確認しており、今後温感リポソームへの応用研究を目指す予定である。

D) 膵臓癌細胞免疫で樹立した抗体クローンTGP2（IgG3,kappa）を樹立した。TGP2 は膵臓癌細胞および乳癌・卵巣癌・胃癌細胞の一部と反応するが、末梢血単核球、血小板、血管内皮細胞等の正常細胞とは全く反応しない抗体であった。認識抗原Ｙ（特許出願前のため非公開）はある増殖因子の受容体であり、おもにゴルジ体に存在しているが癌化に伴い

細胞表面に発現誘導される分子であることが判明した。また低酸素状態 Hypoxia で発現増強することから、固形腫瘍の標的化に適した分子として今後、分子イメージングへの実用化に繋げる予定である。

D. 考察

難治性癌を高感度で検出する in vivo 分子イメージングの最適化には従来の抗体よりもより高性能の癌標的化抗体が必要である。抗体が高性能であるためには、認識抗原への高親和性結合力・類似分子に対する反応交差性を示さない特異性・認識抗原の性状など複数の要素が必要である。この条件を満たすような抗体の選択システムを構築することは大切であり、我々はファイバーZ33型アデノウイルスを用いたスクリーニング系が高性能抗体を樹立する上で有用であることを明らかにしてきた。このシステムを用いて難治性癌である膵臓癌・前立腺癌に対する抗体を数種類樹立し、認識抗原を明らかにしてきた。現在までのところ、癌細胞および癌組織での反応性を確認しているだけであり、今後、分子イメージングへの適応を考慮し、 in vivo での抗体の集積性や抗腫瘍効果を解析し、温感性リポソームへの結合を行い、より特異性・集積性そして診断・治療効果の高いピンポイントＤＤＳの開発を次年度以降に目指す予定である。

E. 結論

膵臓癌を始めとした難治性腺癌に対する高性能標的化抗体の樹立に成功した。標的抗原としては、１）癌の浸潤転移に関連するＣＤ１４７、２）低酸素状態の癌組織で高発現すると予想される抗原Ｘ、３）抗原Ｙ、および４）ＮＣＡＭ２である。

本研究の最終目標である感温性リポソームの生体内標的化にこれらの抗体が応用できるかを次年度以降検討し、より感受性の高いプローブを作製する。

F．健康危険情報　ファイバー改変アデノウイルスベクターを本研究で用いているが、使用・管理とも指定の施設内で行い、汚染・持ち出し等の問題もなく、順調に研究が施行できている。またヒト手術材料を用いる臨床研究に関しては、倫理面に配慮した実施計画書・説明同意書などを作製し、すでに、札幌医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査委員会で許可を受けている。研究課題「新規標的化抗体による癌の診断・治療法の開発」、許可番号第 217-3 号、平成18年２月10日付け。以上のように健康危機情報としては特記すべきことなし。

G．研究発表

1.　論文発表

1. Suzuki K, Nakamura K, Kato K, Hamada H and Tsukamoto T. Exploration of target molecules for prostate cancer gene therapy. ***Prostate*** 67, 1163-1173, 2007.
2. Tomihara K, Kato K, Masuta Y, Nakamura K, Uchida H, Sasaki K, Tanaka T, Huang J, Hiratsuka H and Hamada H. Gene transfer of CD40-ligand to dendritic cells stimulates interferon-gamma production to induce growth arrest and apoptosis of tumor cells. ***Gene Therapy*** 15, 203-213, 2007.
3. Ishii, K., Nakamura, K., Kawaguchi, S., Li, R., Hirai, S., Sakuragi, N., Wada, T., Kato, K., Yamashita T. and Hamada, H. Selective gene transfer into neurons via Na, K-ATPase beta 1 targeting gene transfer with monoclonal antibody and adnovirus. ***J. Gene Med.***, in press 2008.

H．知的財産権の出願・登録状況

1.　特許取得　　　無
2.　実用新案登録　　無
3.　その他

特許出願

1.　公開番号：WO2006/123829

国際出願番号： PCT/JP2006/310406
発明の名称：PAP2aに対する抗体ならびにその診断的および治療的応用
発明者：濱田洋文、加藤和則、中村公則
出願日：２００６．５．１７

2. 出願番号：特願２００７－１４７４７８
発明の名称：ＩＬ－１３Ｒａ２に対する抗体およびこれを含む診断・治療薬
発明者：濱田洋文、加藤和則、中村公則
出願日：２００７．６．１

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

「膵臓癌発がんモデルの作成とMRI画像診断」に関する研究

分担研究者　中釜　斉　　国立がんセンター研究所

研究要旨　*N*-Nitrosobis(2 oxopropyl)amine (BOP)を用いる二つのハムスター膵臓発がんモデル、BOP 単独投与の膵臓発がん実験及びコリン欠乏食を用いた BOP 膵臓癌増強実験、で膵臓癌を誘発させた。誘発されたハムスター膵臓腫瘍の凍結切片及びホルマリン固定標本を用いて、免疫組織染色により、phosphatidic acid phosphatase 2a 及び epiregulin に対する抗体のハムスター膵癌組織に対する反応性を検討したが、陽性反応は認められなかった。また、変異型 Ha-*ras* Tg ラットに誘発される膵癌組織を用いた網羅的遺伝子発現解析及び、array Comparative Genomic Hybridization 解析によるゲノム構造異常の解析も試みた。

A. 研究目的

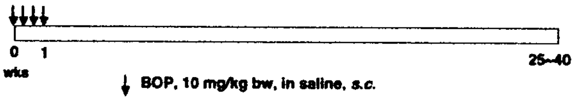
発がん要因への曝露からがん発生にいたるまでの多段階的な過程が詳細に解析されているハムスター及びラットの膵臓がんモデルを用いて、早期微小病変の非侵襲的な診断や治療システムを構築することを目的とする。膵臓癌微小病変を検出するために、膵癌特異的な単クローン抗体を磁性体ナノ粒子と結合させた MRI による検出を、*N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)誘発ハムスター膵癌を用いて検証する。BOP 単独投与の膵臓発がん実験及びコリン欠乏食を用いた膵臓癌増強実験で誘発された膵癌における腺癌特異的な抗 phosphatidic acid phosphatase 2a (PAP2a)、及び K-*ras* の活性化に伴って発現する膜分子である epiregulin 抗体との反応性を免疫組織染色により検討する。更に、変異型 Ha-*ras* Tg ラットの自然発生膵癌を用いて網羅的遺伝子発現解析及び、array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)解析によるゲノム構造異常の解析を行ない、より特異性の高い新規膵臓癌標的分子の同定を試みる。

B. 研究方法

a. BOP 誘発ハムスター膵癌モデルでの膵臓腫瘍の作成

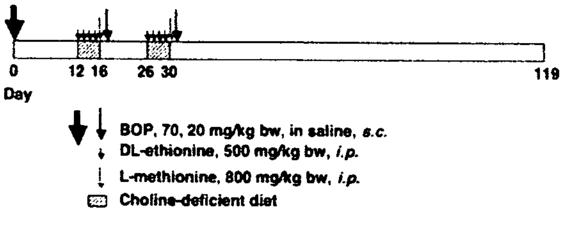
<u>BOP 単独投与の膵臓発がん実験</u>

雌 7 週令シリアンハムスターに BOP (10 mg/kg BW, *s. c.*)を 1 日おきに 4 回投与した (Kuroiwa Y et al., Cancer Lett, 241:, 275-280, 2006 を改変)。処置群 16 匹、未処置群 7 匹で実験を行った。



<u>コリン欠乏食を用いた BOP 膵臓癌増強実験</u>

雌 7 週令シリアンハムスターに BOP (70 mg/kg BW, s.c.)を単回投与し、投与開始から 12 日後からと 26 日後からの 2 回、膵癌促進圧力操作 (Mizumoto K et al., Carcinogenesis, 10:, 1457-1459, 1989)を行った。膵癌促進圧力操作は、5 日間コリン欠乏食を投与し、同時に、DL-ethionine (500 mg/kg bw, *i.p.*)を 1～4 日め、5 日めに L-methionine (800 mg/kg bw, *i.p.*)、8 日目に BOP(70 mg/kg BW, *s.c.*)を投与する操作である。処置群 10 匹、未処置群 5 匹で実験を行った。



b.免疫組織染色による抗 PAP2a 抗体及び抗 epiregulin 抗体のハムスター膵臓腫瘍での反応性の検討

コリン欠乏食を用いた膵臓癌増強実験で得

られた膵臓癌 2 例の凍結切片及び 3 例のホルマリン固定標本切片（ホルマリン標本 2 例は奈良医科大学・堤雅弘先生より供与）を用いて、2 種の抗 PAP2a 抗体(T13, S11)及び 2 種の抗 epiregulin (6E2. 9E5)抗体の免疫組織染色を行った。ホルマリン固定標本切片に関しては、抗原の賦活化操作として、クエン酸緩衝液(pH6)によるオートクレーブ加熱処理、Target Retrieval Solution (Dako Cytomation)によるオートクレーブ加熱処理、L.A.B. Solution (Polysciences)の 3 種の処理も行なった。

c.変異型 Ha-*ras* Tg ラットでの自然発生膵癌を用いてのレーザーマイクロダイセクション(LMD)による膵臓腫瘍の採取

名古屋市立大学・津田洋幸らが樹立した Cre/lox システムで制御されたヒト変異型 Ha-*ras*^{G12V}を導入した Tg ラットに、*Cre* を発現するアデノウィルスを膵管に注入することにより生じる膵癌(Ueda S et al., Carcinogenesis, 27:2497-2510,2006)から DNA 及び RNA を抽出して網羅的遺伝子発現解析及び、aCGH 解析によるゲノム構造異常の解析を行うことを試みた。膵臓腫瘍微小病変（名古屋市立大学・津田洋幸先生より供与）の凍結標本から凍結切片を作成し、LMD による検体の採取を試みた。

図 1　変異型 Ha-*ras* Tg ラットに導入されたヒト変異型 Ha-*ras*^{G12V}の構造

（倫理面への配慮）

本研究では、ヒト検体は取り扱っていない。

また、動物実験に関しては、各大学や研究機関の定める動物実験に関する規約を遵守し、動物実験に関する倫理審査委員会で承認を得た上で実施している。実験に用いる動物も統計学的検定に必要な最小限の匹数を用いることとし、動物の苦痛に対しても十分な配慮を払って行っている。

C．研究成果

a. BOP 誘発ハムスター膵癌モデルでの膵臓腫瘍の作成

<u>BOP 単独投与の膵臓発がん実験</u>

処置群 16 匹、未処置群 7 匹で実験を開始し、現在、経過観察中である（37 週経過）。実験開始後 23 週で、処置群 1 匹、未処置群 1 匹を放射線医学総合研究所青木伊知雄先生へ MRI の条件検討のために提供した。これまでに、5 例が死亡し、いずれにおいても肉眼的に膵臓腫瘍が認められている。検体の採取が可能であった膵臓腫瘍は、凍結及びホルマリン固定標本とした。

図 2　ハムスターに誘発された膵臓腫瘍

<u>コリン欠乏食を用いた BOP 膵臓癌増強実験</u>

処置群 10 匹、未処置群 5 匹で実験を開始し、投与開始から 119 日（17 週）で全例を解剖した。処置群の 6 匹において肉眼的に膵臓腫瘍が認められた。未処置群では、膵臓腫瘍は認められなかった。得られた膵臓腫瘍は、凍結及びホルマリン固定標本とし、膵臓腫瘍特異的な抗体の候補のハムスター膵臓腫瘍における反応性の検討のための検体とした。

b.免疫組織染色による抗 PAP2a 抗体及び抗 epiregulin 抗体のハムスター膵臓腫瘍での反応性の検討

ハムスター膵臓腫瘍の凍結切片を用いた 2 種の抗 PAP2a 抗体(T13, S11)及び 2 種の抗 epiregulin (6E2. 9E5)抗体の検討では、陰性コントロールであるマウス血清を 1 次抗体として用いた場合でも、間質における非特異的染色が認められた。ホルマリン固定標本に関しては、奈良医科大学・堤雅弘先生より供与された 2 例及び本研究の BOP 単独投与の膵臓発がん実験で得られた 1 例を用いて検討したが、陽性所見は得られていない。抗原の賦活化として、クエン酸緩衝液(pH6)によるオートクレーブ加熱処理、Target Retrieval Solution によるオートクレーブ加熱処理、L.A.B. Solution の 3 種の処理を行なったが、やはり陽性所見は得られなか

った。

c. 変異型 Ha-*ras* Tg ラットでの自然発生膵癌

変異型 Ha-*ras* Tg ラットでの自然発生膵癌の凍結標本を用いて、レーザーマイクロダイセクション(LMD)による膵臓腫瘍部のみの採取を試みたが、膵臓微小腫瘍の凍結標本のため、当該組織には腫瘍部分が認められず、採取できなかった。

D. 考察

BOP 誘発ハムスター膵癌モデルでの膵臓腫瘍の作成においては、BOP 単独投与の膵臓発がん実験及びコリン欠乏食を用いた膵臓癌増強実験のどちらにおいても、膵臓腫瘍が誘発された。腫瘍及び周囲組織の組織学的検討を行い、どちらか或いは両方の実験系で誘発された腫瘍を、MRI によるハムスター膵臓腫瘍の検出に用いる予定である。

免疫組織染色による抗 PAP2a 抗体及び抗 epiregulin 抗体のハムスター膵臓腫瘍での反応性の検討に関しては、現在のところ、陽性所見は認められていない。ハムスターの凍結切片での免疫染色は、膵管周囲に非特異的染色が認められやすく、ホルマリン固定切片で、抗原の賦活化を工夫するなどの手法で試みた方が陽性所見が得られやすいかもしれない。ハムスターの膵臓腫瘍のホルマリン固定切片で陽性所見が認められないのは、抗原の賦活化が適当でないのか、ハムスターでは、2 種の抗 PAP2a 抗体及び 2 種の抗 epiregulin 抗体への反応性が乏しいのの二つの可能性が考えられる。

変異型 Ha-*ras* Tg ラットでの自然発生膵癌に関しては、腫瘍が小さかったため、腫瘍を LMD で採取できなかった。しかし、新たにヒト変異型 K-*ras* Tg ラットが樹立されたので(名古屋市立大学・津田洋幸先生の私見)、この変異型 K-*ras* Tg ラットでの自然発生膵癌を用いて、網羅的遺伝子発現解析及び、aCGH 解析によるゲノム構造異常の解析を行ない、より特異性の高い新規膵臓癌標的分子の同定を試みる予定である。

E. 結論

2 種の BOP 誘発ハムスター膵癌モデルで膵臓腫瘍を作成し、抗 PAP2a 抗体及び抗 epiregulin 抗体等の膵臓腫瘍特異的抗体の候補抗体のハムスター膵癌での反応性を検討するための検体は確保できた。また、MRI でのハムスター膵癌検出のための個体の確保のための基礎的情報が得られた。抗PAP2a抗体(T13, S11)及び 2 種の抗 epiregulin (6E2. 9E5)抗体に関しては、ハムスター膵臓腫瘍での反応性は認められなかった。変異型 Ha-*ras* Tg ラットでの自然発生膵癌に関しては、腫瘍が小さかったため、LMD で採取できなかった。新たに樹立された変異型 K-*ras* Tg ラットでの自然発生膵癌を用いて、網羅的遺伝子発現解析及び、aCGH 解析によるゲノム構造異常の解析を行ない、より特異性の高い新規膵臓癌標的分子の同定を試みる予定である。

F. 健康危険情報　特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuchiya N, Ochiai M, Nakashima K, Ubagai T, Sugimura T, Nakagama H. SND1, a component of RNA-induced silencing complex, is up-regulated in human colon cancers and implicated in early stage colon carcinogenesis. Cancer Res., 67, 9568-9576, 2007.

2. 学会発表

1. Nakagama H, Ochiai M, Sugimura T, Nakashima K, Tsuchiya N. A component of RNA-induced silencing complex, SND1, is up-regulated in human colon cancers and implicated in colon carcinogenesis at early stages. 7th Joint Conference of the AACR and the JCA, Hawaii, USA, January, 2007.
2. Izumiya M, Ochiai M, Sugimura T, Nakagama H. Genome-wide array revealed possible microdeletions in inflammation-associated colon tumors in mice. 98th Annual Meeting of the AACR, Los Angeles, USA, April, 2007.
3. Fukuda H, Seki C, Takamura T, Nakagama H. Translesion DNA synthesis at PhIP-adducted dG. 第 66 回日本癌学会総会, 横浜, October, 2007.
4. Tsuchiya N, Sugimura T, Nakagama H. Biological role of SND1/Tudor-SN in early stage of colon carcinogenesis. 第 66 回日本

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

「ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による局所DDSの開発」に関する研究

分担研究者　山下克美　金沢大学大学院自然科学研究科

研究要旨　膵臓癌をはじめとする膵臓の初期病変を画像化する目的で、膵臓に特異的に発現するグルカゴン様ペプチドＩ受容体（GLP-1R）を標的としたイメージングを計画している。モデルシステムとして、GLP-1R に FLAG タグを付加した遺伝子を細胞へ導入し、ウエスタンブロッティングおよび間接蛍光抗体法にて導入遺伝子の発現を検定し、FLAG-GLP-1R 発現細胞を６株得た。さらに、FACS にて FLAG-GLP-1R が細胞表面に発現しているか否かの解析を行った結果、３株について陽性シグナルが得られた。これら３種類の FLAG-GLP-1R 発現細胞をヌードマウスに移植し Cy5.5 標識抗 FLAG 抗体を用いて画像解析を行ったが、３株の FLAG-GLP-1R 発現細胞とも移植部位への抗体の集積は検出されなかった。今後は、GLP1-R 分子への FLAG タグの挿入部位と、FLAG-GLP-1R タンパク質の効率的な細胞膜表面への移行について検討する必要がある。

A. 研究目的

膵臓癌の初期病変を画像にて検出することを目的として、膵臓における発現が高いグルカゴン様ペプチドＩ受容体（GLP-1R）をモデルとして、基盤技術の確立に取り組んでいる。従来の研究において、完全長の GLP-1R を NIH3T3 細胞へ発現させると、導入細胞の増殖が著しく低下し、恒常的 GLP-1R 発現細胞が得られないことがわかっていた。また、GLP-1R 発現細胞の間接蛍光抗体法による解析から、細胞内での高い発現にもかかわらず、細胞表面のシグナルが弱いことも判明していた。さらに、GLP-1R を認識する市販の抗体は存在しない。

これらの問題点を克服すべく、今年度は以下の方法を取り入れてモデルシステムの構築を試みた。

1. 細胞培養用培地、おそらく牛胎児血清中の GLP-1 様分子が GLP-1R に働き、細胞増殖にとって負のシグナル伝達系が活性化されることが、GLP-1R 導入細胞の増殖低下の原因であると考えられるため、GLP-1R の細胞外ドメインのみを細胞へ導入する。
2. GLP-1R タンパク質の小胞体-ゴルジ体からの細胞膜への輸送を促進するために、胎児性癌抗原（CEA）の glycophosphatidyl- inositol (GPI)アンカー配列を用いて、細胞表面への移行を促進させる。
3. 市販の抗体を発現タンパク質の検出に使うために、GLP-1R の細胞外ドメインと CEA-GPI の間に FLAG 配列を２個タンデムに配置したコンストラクトを作成する。

B. 研究方法

a. GLP-1R-FLAG-GPI プラスミドの作成

GLP-1R の細胞外ドメインは報告されている DNA 塩基配列をもとに、GeneCopoeia 社（TOYOBO）より購入した cDNA を鋳型に PCR で増幅した。同様に、CEA の GPI も Genbank に登録されている DNA 塩基配列をもとに、福岡大学医学部生化学教室の黒木政秀教授よりご分与いただいた cDNA を鋳型にして PCR で増幅した。これらの DNA 断片をヒト EF1αプロモーターの下流につないだのち、人工合成した FLAG 配列をタンデムに配置した DNA 断片を二つの cDNA 断片の間に挿入し、GLP-1R-FALG-GPI 発現プラスミドの作成をした。

b. NIH3T3 細胞への導入と発現細胞の分離

作成したプラスミドを、H-Ras 発現 NIH3T3 細胞（a１-１細胞）へ導入し、タンパク質の発現を FLAG 抗体によるウエスタンブロッティングにより確認したのち、プラスミド上の blasticidine 耐性遺伝子を利用して薬剤耐性

コロニーの選択を行い、安定発現細胞の分離を行った。

c. 細胞表面での発現の確認

GLP-1R 発現陽性 a1-1細胞を24時間培養後、2mM EDTA を含む PBS にて細胞をはがし回収後、細胞を一次抗体として抗 FLAG モノクローナル M2 抗体で処理し、さらに二次抗体として、AlexaFluor488 標識抗マウス IgG 抗体で処理した。同様の処理をベクターのみ導入した a1-1細胞をコントロールとして、FACS 解析を行った。

d. ヌードマウスへの移植と腫瘍の画像検出

FACS 解析にて、GLP-1R の細胞表面への発現が陽性と判断された細胞株について、細胞をヌードマウスへ移植し、腫瘍を形成させたのち、尾静脈より Cy5.5 標識 M2 抗体を投与し、投与後2時間および5時間の時点で蛍光標識 M2 抗体の腫瘍部位への集積を光イメージングシステム（浜松フォトニクス社製）にて解析した。

（倫理面への配慮）

特になし。

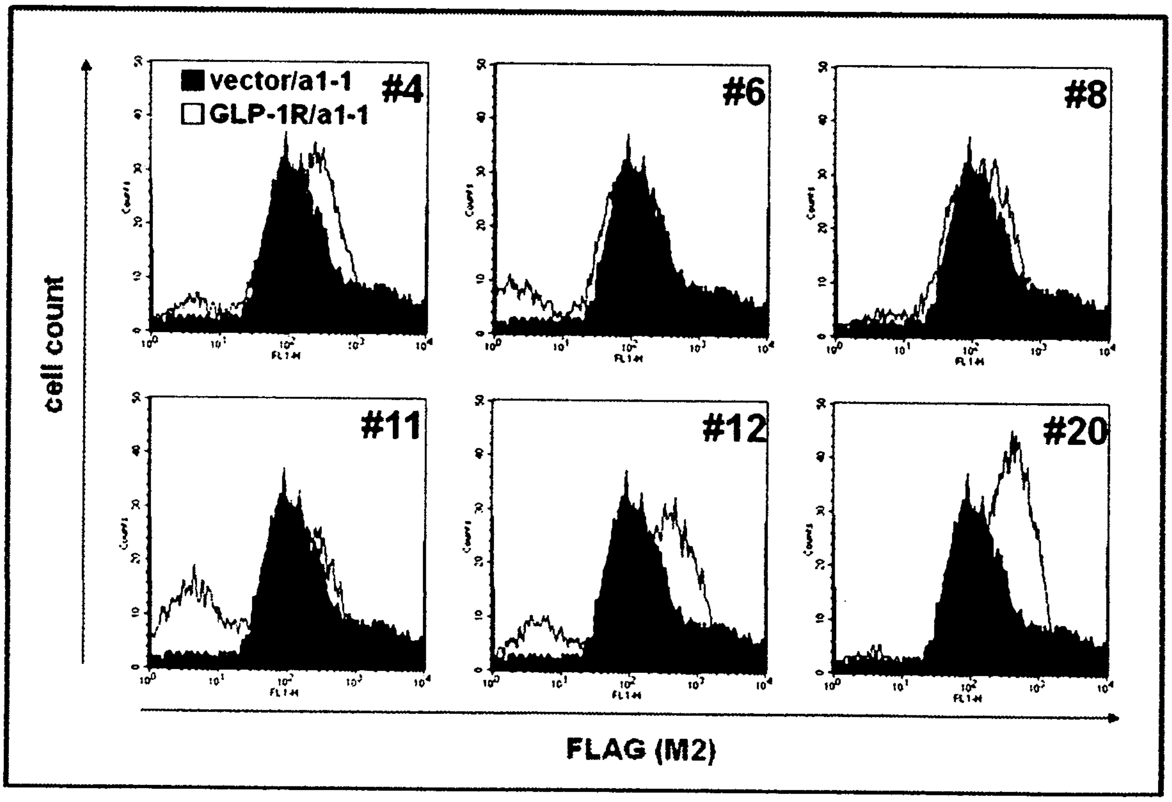
C. 研究成果

a. GLP-1R 発現細胞株の分離

50クローンの薬剤耐性株から、ウエスタン解析により25クローンの陽性株を得た。さらにそれらの中からタンパク質の発現レベルの高いクローン10個を選択し、間接蛍光抗体法にて細胞膜表面における発現が高いクローンを6株得た。

b. FACS 解析による、細胞表面での発現細胞の選択

上述の6株について FACS 解析を行い、GLP-1R が細胞表面において発現されているか否かの検討を行った。その結果、6株中3株について有意に発現が検出された（下図中の#4、#12、#20）。このうち、特に高い発現が検出されたクローン（#20）について、ヌードマウスへ移植後の腫瘍における画像解析実験を行うこととした。



c. ヌードマウスでの画像解析

5x10^{6} 個の GLP-1R 発現 NIH3T3a1-1 細胞をヌードマウスの大腿部に接種した。コントロールとして、ベクター導入 NIH3T3a1-1 細胞を反対側に同様に接種した。7-10 日後に、Cy5.5 標識 M2 抗体を尾静脈より接種し増殖した腫瘍の画像解析を行った。

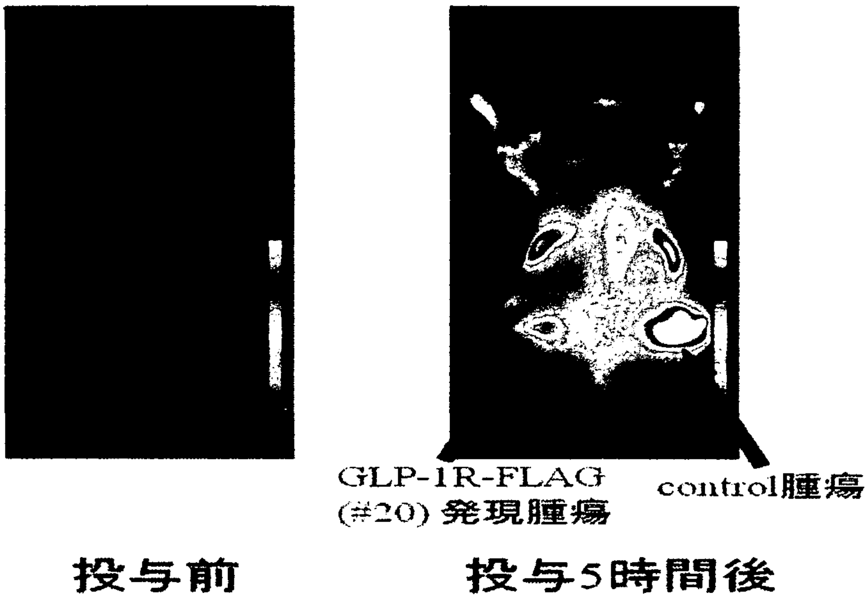
結果を、次ページの図に示す。Cy5.5 標識 M2 抗体投与後5時間において、GLP-1R 発現細胞 #20 により形成された腫瘍部位への抗体の集

積は見られず、非特異的なコントロール腫瘍部位への抗体の集積のほうが高いという結果となった。抗体投与後２時間での測定結果も基本的に同様であった（data not shown）。さらに
念のために行った他の二つの細胞表面発現陽性クローンについても、抗体の特異的な集積は見られないという結果となった（data not shown）。

D. 考察

a. GLP-1R 細胞外ドメイン発現細胞

GLP-1 受容体の細胞外ドメインのみを細胞で発現させることにより、細胞毒性のない状態で GLP-1R 発現細胞を得ることができた。この細胞では、ウエスタンブロッティングにより十分なシグナルが検出されてはいるが、間接蛍光抗体法での目的タンパク質の細胞内局在解析においては、以前の場合と同様にほとんどのシ



グナルが細胞質、おそらく小胞体に検出された。これは明らかに小胞体－ゴルジ体間の輸送が阻害されていることを示す。以前の結果からこのような可能性を予想していたために、今回は CEA の GPI アンカー配列を融合させ、発現タンパク質の細胞膜への効率的な輸送を目指した。この変更により、ある程度の輸送効率の上昇が達成でき、間接蛍光抗体法および FACS 解析により細胞膜におけるシグナルが検出された。しかしながら、ヌードマウスで形成された腫瘍への抗体の集積は確認されなかったことから、GLP-1R の細胞膜へのより効率的な膜輸送を達成する工夫が必要である。

b. ヌードマウスでの腫瘍への抗体の集積

GLP1-R が細胞表面で発現していると思われるクローンをヌードマウスへ接種し、腫瘍を形成させたのちに蛍光標識した抗体で腫瘍の画像化を試みたが、抗体の集積がコントロールの腫瘍よりも低いという結果となった。この理由は不明であるが、以下のことが考えられる。

1. GLP-1R の細胞膜表面での発現が低い。
2. FLAG 配列が GLP-1R 断片と GPI アンカーペプチドの間にあるために、GLP-1R によりマスクされる傾向にあり、抗体に認識されにくい。

１．が原因である場合は、前項でも述べたように、細胞膜移行がより効率よくおこなわれるようなペプチド配列を導入することで克服できる可能性がある。２．の場合は、FLAG タグの位置を GLP-1R のアミノ末端側に移せばエピトープの露出度が高くなることが期待されるが、アミノ末端には、細胞膜移行に必要なシグナル配列が存在するため、成熟タンパク質においては切断されてしまう。シグナルペプチド配列の直後に FLAG 配列を挿入することになるが、挿入によりシグナル配列の機能が抑制され、その結果、細胞膜への移行が低下することも考えられる。効率のよい挿入場所を探索する必要がある。

c. 今後の対策

今年度の研究により、FLAG 配列を利用した、GLP-1R を標的化するイメージングモデル系において克服すべき問題点がいくつか明らかになった。第一は、細胞膜への移行効率をあげることである。vesicular somatitis virus の G-protein(VSV-G) のなかに、同タンパク質のゴルジ体から細胞膜への移行を促進させる配列が存在することから、その配列を組み込むことを計画している。第二は FLAG 配列の挿入場所であるが、アミノ末端側のシグナル配列の下流の何カ所かに FLAG 配列を挿入したプラスミドを作成し、間接蛍光抗体法により適当な細胞株を分離することを試みる。このような改良により、モデル系を完成させるべく研究を行う。

GLP-1R が直接標的化できないのは、抗体がないことが原因である。そこで、GLP-1R のいろいろな部位に対する抗体の作成に挑戦する必要がある。このために、GLP-1R を発現させた細胞を直接マウスに免疫し、モノクローナル抗体を作成する。細胞表面に露出したエピトープを認識する抗体のみを選択し、イメージングに供することを試みる。

E. 結論

本研究においては、GLP-1 受容体を標的化し膵臓の初期病変を画像検出するモデルシステムとして、FLAG 配列を融合した GLP-1R の細胞外ドメインを発現させたペプチドを、GPI アンカー配列により細胞膜へ効率的に移行させることを試みた。細胞膜への移行は以前の結果よりも改善したが、まだ多くのペプチドが細胞質へ貯留しており、改善の余地があることが明らかとなった。さらに、細胞膜に発現するクローンの in vivo 解析においては、抗 FLAG 抗体の特異的な集積が観察されなかったことから、現在のシステムを大幅に改良する必要があることが判明した。今後は、システムを改良しモデル系を完成させると共に、GLP-1R の細胞外ドメインを特異的認識するモノクローナル抗体の作成を行い、直接 GLP-1R を標的化するための研究を進める必要がある。

F. 健康危険情報　特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Uchida, S., Yoshioka, K., Matsunaga, T., Yamashita, K. Degradation of Cdc25A and Cdc25B by non-genotoxic stress. Joint Meeting of the Japanese Society of Developmental Biology & the Japan Society for Cell Biology. Fukuoka, Japan. May, 2007.
2. Yamashita, K., Yoshioka, K., Matsunaga T., Nakagama, H., Ishizaka, Y. JNK targets Cdc25B for Degradation. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Yokohama, Japan. October, 2007.
3. 内田早苗、善岡克次、松永司、山下克美. JNK phosphorylates Cdc25B and indices its degradation. 第３０回日本分子生物学会年会、第８０回日本生化学会大会、合同大会、横浜、２００７年１２月.

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. 出願

なし

別紙5

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書　籍　名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki K et al.	Exploration of target molecules for prostate cancer gene therapy.	Prostate	67	1163-1173	2007
Tomihara K et al.	Gene transfer of CD40-ligand to dendritic cells stimulates interferon-gamma production to induce growth arrest and apoptosis of tumor cells.	Gene Therapy	15	203-213	2007
Ishi K et al.	Selective gene transfer into neurons via Na, K-ATPase beta 1 targeting gene transfer with monoclonal antibody and adnovirus.	J. Gene Med	In press		2008

Exploration of Target Molecules for Prostate Cancer GeneTherapy

Kazuhiro Suzuki,[1,2] Kiminori Nakamura,[1] Kazunori Kato,[1]
Hirofumi Hamada,[1] and Taiji Tsukamoto[2]*

[1]Department of Molecular Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan
[2]Department of Urology, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan

BACKGROUND. Focusing on Adv-FZ33, a modified adenovirus in which a synthetic 33-amino-acid immunoglobulin G-binding domain was inserted into the adenoviral fiber protein, we tried to identify suitable target molecules for prostate cancer-specific gene therapy.
METHODS. Hybridomas were established from mice immunized with prostate cancer cell lines. The hybridomas were screened using Adv-FZ33 to create monoclonal antibodies (mAbs) that induced high gene transfer efficiency for PC-3 cells. Furthermore, we identified target antigens of the mAbs by immunoprecipitation and mass spectrometry, and investigated the expression of target molecules by flow cytometry and immunocytochemistry.
RESULTS. Using Adv-FZ33, we established four different mouse mAbs that increased transduction efficiency for PC-3. The target antigens identified were Ep-CAM, CD155, HAI-1, and Na,K-ATPase β1. These antigens were expressed in several cancer cell lines, including prostate cancer. Human prostatic myofibroblast cells lacked expression of Ep-CAM and HAI-1.
CONCLUSIONS. We established anti-Ep-CAM mAb and anti- HAI-1 mAbs. Gene transduction via Ep-CAM and HAI-1 may be a novel strategy for treatment of prostate cancer. *Prostate 67: 1163–1173, 2007.* © 2007 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: **gene therapy; modified adenovirus vector; prostate cancer; monoclonal antibody**

INTRODUCTION

Prostate cancer is the most common cancer in the West and the second leading cause of male cancer-related death [1]. Advanced androgen-insensitive prostate cancer exhibits little or no response to conventional therapies [2]. Thus, gene therapy is anticipated as an alternative treatment for this type of disease [3].

Adenoviral vectors are commonly used in gene therapy. This is due to their ability to produce high titers and infect various cell types [4]. Genes are transferred to target cells via the Coxsackie adenovirus receptor (CAR), which is a cell-surface receptor required for adenovirus attachment [5]. However, because CAR is widely expressed on normal cells, its lack of specificity is still an obstacle for its clinical application in cancer-gene therapy. In this context, we focused on the function of fiber Z33 type adenovirus (Adv-FZ33). This adenovirus has a synthetic 33-amino-acid immunoglobulin G (IgG)-binding domain (Z33) derived from staphylococcal protein A inserted into the virus having fiber protein [6]. This modified fiber binds IgG with high affinity and allows an antibody to redirect the vector to a new target molecule on the cell surface.

In this study, we established hybridomas from mice splenocytes immunized with prostate cancer cell lines. Then we selected from them monoclonal antibodies

Grant sponsor: Stiftelsen Japanese-Swedish Research Foundation; Grant sponsor: Cancer Research from the Ministry of Health and Welfare of Japan; Grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology.

*Correspondence to: Taiji Tsukamoto, MD, Department of Urology, Sapporo Medical University School of Medicine, S-1, W-16, Chuo-Ku, Sapporo 060-8543, Japan. E-mail: taijit@sapmed.ac.jp

Received 12 January 2007; Accepted 4 April 2007
DOI 10.1002/pros.20613
Published online 21 May 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

(mAbs) that increased transduction efficiency by bridging Adv-FZ33 with prostate cancer.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines

We used human prostate cancer cell lines (PC-3, LNCaP, and DU145), a human renal cell carcinoma cell line (Caki-1), a bladder cancer cell line (T24), an ovarian cancer cell line (SKOV-3), normal dermal fibroblasts (PDF), normal prostate myofibroblasts (PrMFB), human embryonic kidney cells (293 T), and mouse myeloma (P3U1). These cell lines were purchased from American Type Culture collection (Manassas, VA). PrMFB was established in our department [7]. Cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 1% non-essential amino acids, 1 mm sodium pyruvate, and 1% streptomycin/penicillin solution.

Adenoviral Vectors

We generated adenoviral vectors containing the IgG-binding Z33 motif from Staphylococcal protein A at the HI-loop of the adenovirus type 5 (Ad5) fiber knob, and designated it Adv-FZ33 (represented in Fig. 1A). Details of Adv-FZ33 construction were described in a previous study [8].

Production and Screening of Hybridomas

Screening protocol for targeting mAbs is represented in Figure 1C. A Balb/c mouse was injected intraperitoneally with a mixture of PC-3, LNCaP, and DU145 cells (total: 2×10^6) every 14 days. Three days after the 5th injection, the mouse was sacrificed and 1×10^8 mouse splenocytes were fused with 2×10^7 P3U1 cells using polyethylene glycol (PEG). When hybridomas grew to about 50% confluence, culture supernatants were tested for antibody activity. PC-3

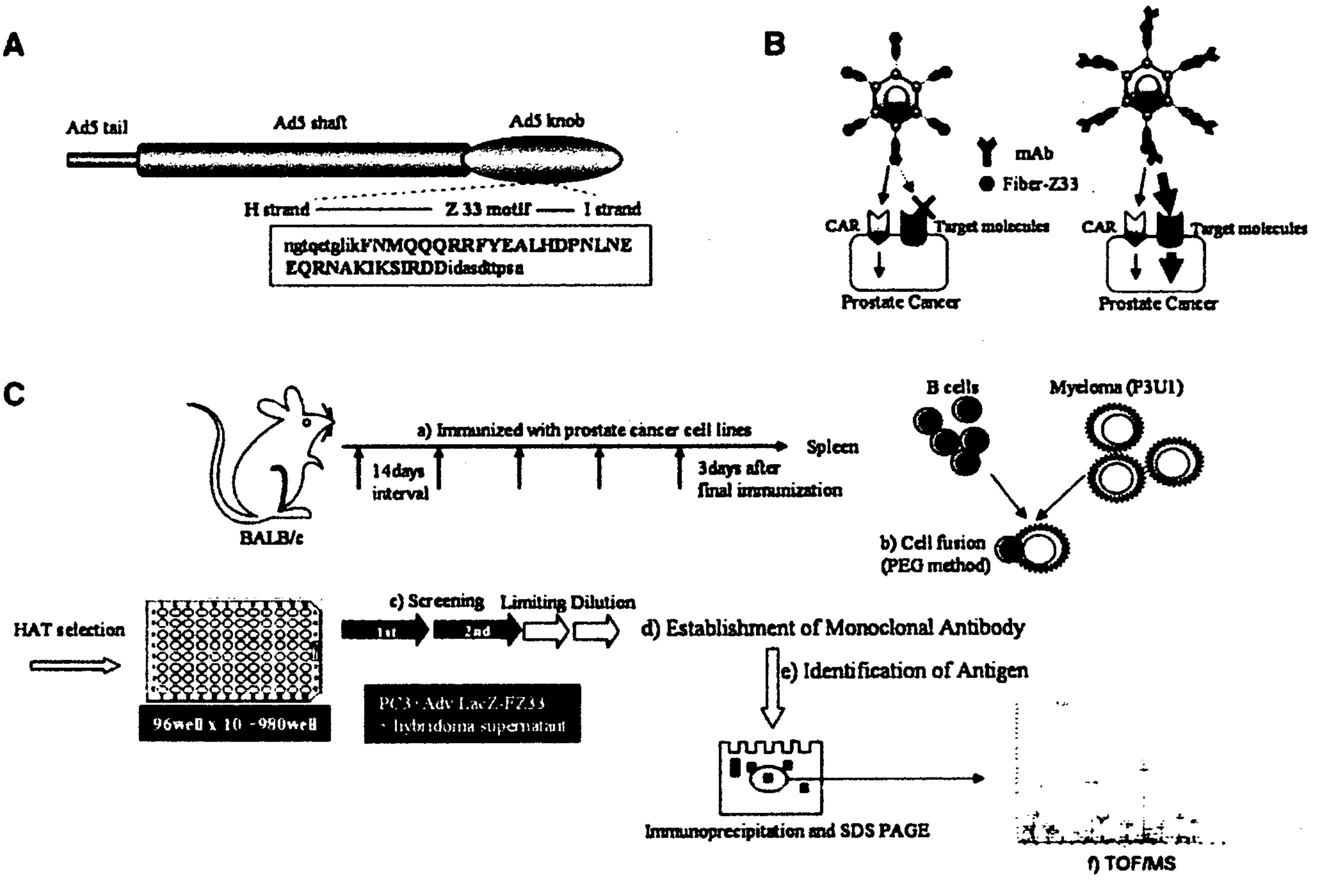


Fig. 1. Schematic representation of Adv-FZ33 and procedure for the establishment of cancer-targeting antibodies. **A**: Z33-modified Ad5 fiber A synthetic 33-amino acid IgG-binding domain (Z33), derived from staphylococcal protein A, was inserted into the HI loop of knob protein. **B**: Targeting with Adv-FZ33 Adv-FZ33 binds immunoglobulins and allows an antibody to redirect the vector to a new target molecule on the cell surface. Our Adv-FZ33 had intact CAR-binding structure and retained CAR-binding ability. **C**: Methods for establishment of novel cancer-targeting antibodies using Adv LacZ-FZ33. (a) Immunization with prostate cancer cell lines. (b) Cell fusion with PEG method. (c) Screening and limiting dilution. (d) Establishment of monoclonal antibody. (e) Identification of antigen by immunoprecipitation and SDS–PAGE. (f) Detection of molecule by mass spectorometry.

cells were prepared in 96-well microplates. After the removal of the culture medium, supernatants were added to each well and incubated for 1 hr at 4°C, after which supernatants were removed and microplates were washed with PBS. Adv-FZ33 inserted LacZ reporter gene (Adv LacZ -FZ33) prepared in FBS-free RPMI-1640 at a multiplicity of infection (MOI) of 1,000 vp/cell was added to each well and incubated for 1 hr at 4°C. Then microplates were washed twice with PBS and incubated at 37°C in a 5% CO_2 incubator. Twenty-four hours after infection, chemiluminescent β-Gal reporter gene assays (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) were performed according to the company's recommendations. Hybridomas that showed high β-Gal activity were picked through first and second screenings and cloned by twice limiting dilution. These hybridomas were injected into nude mice intraperitoneally. The mouse monoclonal antibody was purified from ascites of nude mice using protein G sepharose beads (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden). A commercial kit (Roche Diagnostics) was used to detect the isotypes of antibodies.

Identification of Target Molecules

Immunoprecipitation of biotinylated protein and detection of molecular weight. First, 2×10^6 PC-3 cells were prepared and the cell surface was biotinylated (PIERCE, Rockford, IL). Membranes were solubilized on ice for 30 min in 1 ml of buffer containing 1% NP40, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Samples were cleared of nuclear fragments by centrifugation for 20 min at 15,000*g* at 4°C, then mixed with protein G sepharose beads and incubated for 2 hr at 4°C, after which the beads were centrifuged to remove non-specifically bound proteins. Five μg of the mAbs established in this study and control mouse IgG (eBioscience, San Diego, CA) were added to the supernatant of each sample and allowed to incubate for 2 hr at 4°C. The immunocomplexes were precipitated by addition of protein G sepharose beads to each sample and incubated for 2 hr at 4°C. The supernatant was discarded and the beads were washed six times with solubilization buffer. Immunocomplexes binding with beads were boiled for 5 min in 20μl of SDS sample buffer containing 5% 2-mercaptethanol. Samples were separated using 5–20% gradient polyacrylamide gels (BioRad, Hercules, CA) and transferred onto nitrocellulose membranes (Millipore, MA). After blocking with 5% milk in TBS consisting of 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM sodium chloride, and 0.05% Tween-20, the membranes were incubated for 1 hr at room temperature with avidin-horseradish peroxidase (dilution 1:2,000; Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England). Detection was carried out by enhanced chemiluminescence (Amersham Bioscience) according to the manufacturer's instructions.

Silver stain and mass spectrometry. For this procedure, 1×10^9 PC-3 cells were solubilized in 40 ml of buffer as described above. After the removal of nuclear fragments by centrifugation, samples were mixed with protein G sepharose beads and incubated overnight at 4°C to remove non-specifically bound proteins. Five micrograms of the mAbs established in this study and control mIgG1 were added to the supernatant of each sample and allowed to incubate for 2 hr at 4°C. The immunocomplex was precipitated by addition of protein G sepharose beads to each sample and incubated for 2 hr at 4°C. Samples were separated by SDS–PAGE as described above. The polyacrylamide gel was stained using a Silver Stain kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) according to the company's recommendations. Specifically stained protein bands were extracted from the gel, digested by trypsin, and analyzed by oMALDI-Qq-TOF MS/MS QSTAR Pulsari (Applied Biosystems Japan Ltd, Tokyo, Japan).

Confirmation of results of mass spectrometry. The cDNAs of target molecules identified by mass spectrometry were synthesized by reverse transcription or obtained from Open Biosystems, Inc. (Huntsville, AL). Some cDNAs were ligated into the expression vector with pTarget vector (Promega, Madison, WI) or pcDNA3.1(+) vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). cDNA was transfected into 293 T cells or CHO cells using Lipofect AMINE Plus reagent (Invitrogen). Forty-eight hours after transfection, transfected cells were washed and then suspended in staining medium (2% FBS/PBS) containing saturating amounts of mAbs established in this study and negative control IgG1 (MOPC-21, BD PharMingen, San Diego, CA) as controls. The reactivity of each mAb was analyzed by flow cytometry using a FACS-Calibur® (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Transduction Efficiency in PC-3

Flow cytometric analysis. To examine transduction efficiency using Adv-FZ33 with established mAbs, PC-3 cells were prepared in six-well plates at the concentration of 1×10^5 cells/well. After removal of the culture medium, FBS-free RPMI-1640 containing the mAbs created in this study at a concentration of 2 μg/ml was added to each well and incubated for 1 hr at 4°C. Adv-FZ33 inserted the DNA fragment encoding