

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北村 俊雄

平成20（2008）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 応用に関する研究	-----	9
北村 俊雄		
2. ユーイング肉腫における新規膜抗原・分泌蛋白の探索に関する研究		
野阪 哲哉	-----	20

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	25
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	26
-----------------	-------	----

## 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

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

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の確立および抗体を用いた治療への応用を目指すことである。また、近年、我が国で増加しつつある大腸がん、前立腺がんや、早期発見の難しい腎がんも本年度から研究対象に加えた。

本年度は、前年度から開始していた膵がん、胃がん、グリオブラストーマ、ユーイング肉腫についてシグナルシーケンストラップを継続し、新たに前立腺がん、膀胱がん、腎がん、大腸がんのシグナルシーケンストラップも施行した。この結果、これらの癌細胞株由来の分泌蛋白質および膜蛋白質を420種類同定した。これらの分子のうち、16種類に対してモノクローナル抗体を作製したが、グリオブラストーマ細胞株の増殖をin vitroで抑制する抗体が1種類、前立腺がん細胞株の増殖をin vitroおよびin vivoで抑制する抗体が1種類存在する。また、ユーイング肉腫の早期発見に役立つ可能性のある分泌蛋白質に対する抗体は作成中である。

#### A. 研究目的

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場合も多くなってきた。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。肝がんや大腸がんなど一部のがんでは $\alpha$ 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）、日本に多い胃がん、最近増加しつつある前立腺がん、早期診断の難しい腎がんなど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、主任研究者らが開発し

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すでに他所で樹立されたヒトの細胞株を使用しており、患者サンプルを直接使用してい

ない。ヒトサンプルを利用する場合は当該施設の倫理予備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. 研究結果

#### 1) SST-REX スクリーニング

現在までに膵がん、胃がん、膀胱がん、グリオーマ/グリオブラストーマ、前立腺がん、ユーイング肉腫の cDNA ライブラリーをスクリーニングした。今年度行った胃がんについては 282 クローン/114 種類、グリオーマ/グリオブラストーマについては 82 クローン/41 種類、膀胱がんについては 153 クローン/70 種類、ユーイング肉腫については 257 クローン/81 種類のシグナル配列を有する遺伝子をそれぞれ同定した。これらの遺伝子産物を融合

蛋白質として細胞表面上に発現している SST クローンを免疫源としてモノクローナル抗体を現在までに 16 種類樹立した (前年度の膀胱がんに対する抗体 7 種類と合わせて計 23 種類の抗体を現在までに樹立した)。これらの抗体のうちグリオブラストーマに対する 1 種類の抗体が *in vitro* において腫瘍細胞株の増殖を抑制した。また、前立腺がんの SST クローンに対するモノクローナル抗体のうち、抗 EPHA2 抗体は前立腺がん細胞株の培養系および担がんマウス系における増殖を抑制した。腎臓ガン、大腸ガンについても cDNA ライブラリー作製を終了し、SST-REX を施行中である。現在までに、それぞれ 47 クローン/34 種類、11 クローン/9 種類のシグナル配列を有する遺伝子を同定した。

## 2) SST クローン上の融合蛋白質発現量増加試み

抗体作成をより効率よく行うために、SST クローン上の癌抗原発現量を

高める目的で、SST ベクターのマウス白血病ウイルス LTR の代わりに、EF1 $\alpha$ 、CAG、CMV、SR $\alpha$  など強力なプロモーターを使用したが、Ba/F3 細胞中において LTR より強い活性を有するプロモーターはなかった。

## 3) 細胞チップの開発

細胞チップに関しては感度をあげるために、ルシフェリンを利用した化学発光を導入した結果、感度は大幅に改善し、S/N 比も高くなった。しかしながら現在使用している 96 ウェルプレートでは隣のウェルに発光が漏れ込むことも明らかになった。実用化にはさらなる工夫が必要である

## D. 考察

シグナルシーケンスの結果得られる SST クローンをマウスに直接免疫することによってモノクローナル抗体が簡便かつ網羅的に樹立できることが確認できた。さらに、まだ抗体取得数が 2 3 種類と多くはないが、こ

の方法で樹立した抗体は細胞上に発現している自然な形の膜蛋白質を認識しやすいこと、細胞に増殖抑制などの機能を有する機能抗体である確率が比較的高いことが示唆された。今後、本研究計画を継続することによって、がんの早期診断や治療に利用できる抗体が樹立できることが期待できる。

SST クローン上の融合蛋白質の発現量を高めることができれば、モノクローナル抗体をさらに効率良く作製でき、また細胞チップへの応用も容易になると考えられたので、マウス白血病ウイルス LTR の代わりに EF1 $\alpha$ 、CMV、CAG、SR $\alpha$  など強力なプロモーターを使用した。使用している Ba/F3 細胞では、LTR が最も強い活性を有した。

SST クローンを利用した細胞チップの実用化にはさらなる工夫が必要であるが、抗体の評価のために代替手段も考案している。最近、患者がん組織のマイクロアレイを作成している富山大学の福岡先生と共同研究にお

いて、ある核内蛋白質に対する抗体で染色したところ、かなり良い結果を得ることができた。今後、本研究計画で樹立した癌マーカーに対するモノクローナル抗体についても同様の共同研究を行うことも予定している。

## E. 結論

癌細胞株のシグナルシーケンストラップを施行し、癌細胞株由来の分泌蛋白質および膜蛋白質を 420 種同定した。各種がん由来分子に対するモノクローナル抗体を 16 種類作成した。これらの抗体のうち 2 種類が *in vitro* あるいは *in vivo* で癌細胞株の増殖を抑制した。この結果は本方法によって高い確立で機能抗体が得られることを示唆している。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Izawa K, Kitaura J, Yamanishi Y, Matsuoka T, Oki T, Shibata F, Kumagai H, Nakajima H, Maeda-Yamamoto M, Hauchins JP,

Tybulewicz VLJ, Takai T and Kitamura T. (2007) Functional analysis of an activating receptor LMIR4 as a counterpart of an inhibitory receptor LMIR3. **J. Biol. Chem.** 25: 17997-18008.

2) Nakayama M, Underhill DM, Peterson TW, 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.

3) Sekine R, Kitamura T, Tsuji T and Tojo A. (2007) Identification and comparative analysis of Pax5 C-terminal isoforms expressed in human cord blood-derived B cell progenitors. **Immunol. Letters** 111:21-25.

4) Lu Y, Kitaura J, Oki T, Komeno Y, Ozaki K, Kiyono M, Kumagai H, Nakajima H, Nosaka T, Aburatani H and Kitamura T. Identification of TSC-22 as a potential tumor suppressor that is upregulated by Flt3-D835V but not Flt3-ITD. **Leukemia** 21: 2246-2257, 2007.

5) Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T and Nagata S. (2007) Identification of TIM4 as a phosphatidylserine

receptor for engulfment of apoptotic cells. **Nature** 450:435-440.

6) Morikawa Y, Komori T, Hisaoka T, Ueno H, Kitamura T and Senba E. (2007) Expression of mKirre in the developing sensory pathways: its close apposition to nephrin-expressing cells. **Neuroscience** 150:880-886.

7) Yamanishi Y, Kitaura J, Izawa K, Matsuoka T, Oki T, Lu Y, Shibata F, Yamazaki S, Kumagai H, Nakajima H, Maeda-Yamamoto M, Tybulewicz VLJ, Takai T and Kitamura T. (2008) Analysis of mouse LMIR5/CLM7 as an activating receptor: differential regulation of LMIR5/CLM7 between mouse and human. **Blood** 111:688-698.

8) Sugano, Y., Takeuchi, M., Hirata, A., Atsushita, H.M., Kitamura, T., Minoru, T., and Miyajima, A. (2008) Junctional adhesion molecule-A, JAM-A, is a novel cell-surface marker for long-term repopulating hematopoietic stem cells. **Blood** 111:1167-1172.

9) Watanabe-Okochi N, Kitaura J, Ono R, Harada H, Harada Y, Komeno Y, Nakajima H, Nosaka T,



Inaba T and Kitamura T. AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model. **Blood** in press.

10) Kawashima T and Kitamura T. Rac and Nuclear Translocation of STAT. Transcription Factors. **Methods in Enzymology** in press.

11) Kitamura T, Oki T, Watanabe-Okochi N, Komeno Y, Kato N, Yuji K, Ono R, Nakajima H, Tojo A, Nosaka T and Kitaura J. Identification of leukemia-related gene alterations: Molecular pathogenesis of leukemia, myeloproliferative disorders (MPD), and myelodysplastic syndromes (MDS). **Blood Cells, Molecules and Diseases** in press.

12) 中島秀明、北村俊雄 (2007) 造血幹細胞/造血器腫瘍と Wnt シグナル 血液腫瘍科 54:224-230

13) 北村俊雄、渡辺直子 (2007) 発癌機構: 概論 造血器腫瘍—基礎臨床領域における最近の研究動向 日本臨床 65:17-22.

14) 北村俊雄 (2007) レトロウイルスベクターによる蛍光タンパク質導入の有効活用法 バイオテクノロジージャーナル 3:4:222-227.

15) 北村俊雄、等泰道 (2008) FLT3 阻害剤と JAK 阻害剤: 造血器腫瘍に対するチロシンキナーゼ阻害剤の有効性と開発状況 医学のあゆみ 224:103-107.

## 2. 学会発表

1) Kitamura, T. (2007年1月) Rac1 and MgcRacGAP are required for nuclear transport of the tyrosine phosphorylated form of STAT3 and STAT5. キーストンシンポジウム、プレナリートーク

2) Kitamura, T. (2007年3月) Learning from model mice for myelodysplastic syndromes (MDS) and MDS/overt leukemia. 日米血液腫瘍セミナー、招待講演

3) 小埜良一、北村俊雄、野阪哲哉 (演者) . (2007年3月) MLL 融合蛋白による多段階発癌における Raf-MAP キナーゼ系活性化の重要性. 日本プロテインホスファターゼ研究会 第3回国内集会.

4) 渡辺・大河内直子、北浦次郎、小埜良一、原田浩徳、原田結花、中島秀明、野阪哲哉、稲葉俊哉、北村俊雄. (2007年5月) AML1 点変異はマウス BMT モデルにおいて MDS/ AML を発症させる. 第5回幹細胞シンポジウム、口演

5) 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. (2007年10月) Hoxa9 と Ras-MAP キナーゼ系の協調作用が MLL 融合蛋白による急性白血病の発症に重要である. 第 66 回日本癌学会学術総会、ポスター

6) 北村俊雄、野阪哲哉 (2007年10月) 白血病および MDS の分子病態：マウス骨髄移植モデルおよび発現クローニング法を利用した解析. 第 66 回日本癌学会学術総会、シンポジウム

7) 渡辺 (大河内) 直子、沖俊彦、小埜良一、原田浩徳、湯地晃一郎、東條有伸、中島秀明、野阪哲哉、稲葉俊哉、北浦次郎、北村俊雄 (2007年10月) RasGRP4 と変異型 AML1 はマウス BMT モデルにおいて協調的に働き、T 細胞性白血病を誘発する. 第 69 回日本血液学会総会、口演

8) 松下弘道、中島秀明、中村嘉彦、塚本秀雄、田中由美子、浅井さとみ、小埜良一、野阪哲哉、安藤潔、宮地勇人. (2007年10月) 活性誘導型 C/EBP  $\alpha$  および C/EBP  $\epsilon$  による MLL キメラ遺伝子を有する骨髄単球性白血病細胞の単球系分化. 第 69 回日本血液学会総会、口演

9) 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. (2007年10月) MLL 融合蛋白は Ras-MAP キナーゼ

系の活性化と相乗的に協調して急性白血病を発症する. 第 69 回日本血液学会総会、口演

10) 川島敏行、北村俊雄. (2007年10月) STAT3/5 の活性化メカニズムと分子標的療法  
第 69 回日本血液学会総会、シンポジウム

## G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

### 1. 特許取得

シグナルシーケンストラップ法

特許第 3499528 号

中外製薬株式会社、北村俊雄

発明者：北村俊雄、小嶋哲郎

パッケージング細胞

特許第 3904451 号

北村俊雄、中外製薬株式会社

発明者：北村俊雄、森田純代

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

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

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

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）、日本に多い胃がん、最近増加の傾向が認められる前立腺がん、大腸がん、早期発見が困難な腎がんのマーカー分子を用いた血清診断の確立および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、前年度から開始していた膵がん、胃がん、グリオブラストーマについてシグナルシーケンストラップを継続し、新たに前立腺がん、膀胱がん、大腸がん、腎がんのシグナルシーケンストラップも施行した。この結果、これらの癌細胞株由来の分泌蛋白質および膜蛋白質を420種類同定した。これらの分子のうち、16種類に対してモノクローナル抗体を作製したが、グリオブラストーマ細胞株の増殖をin vitroで抑制する抗体を1種類、前立腺がん細胞株の増殖をin vitroおよびin vivoで抑制する抗体を1種類樹立した。

### A. 研究目的

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、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、大腸がん、肺がんなど内視鏡や胸部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）、日本に多

い胃がん、最近、欧米化、高齢化に伴い我が国で増加しつつある大腸がん、前立腺がん、早期診断の難しい腎がんなど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

主任研究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 の融合蛋白質を発現している Ba/F3 細胞群 (SST クローンと呼んでいる) を免疫源として直接マウスに免疫を行い、モノクローナル抗体を作製する。樹立した抗体を利用して、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。

本研究計画の特徴は、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製する点である。また細胞表面に自然な形で発現する蛋白質に対して作製した抗体は、精製蛋白質を抗原として作成した抗体と比較して、naturalな蛋白質を効率良く認識する機能抗体である確率が高い。

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すでに他所で樹立されたヒトの細胞株を使用しており、患者サンプルを直接使用していない。ヒトサンプルを利用する場合は当該施設の倫理予備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製し、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。

本年度作製した 16 種類の抗体のうち、グリオブラストーマ細胞株の増殖を *in vitro* で抑制する抗体が 1 種類、前立腺がん細胞株の増殖を *in vitro* および *in vivo* 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

平成18年度に主に施行した膀胱がん以外に、本年度は前立腺がん、胃がん、膀胱がん、グリオーマなど由来の細胞株を用いて、各がん細胞における膜蛋白質および分泌蛋白質の発現解析を行った。以下にその進行状況の概

要を示す。

前立腺がんについて、Du145、PC3、LNCap の 3 種類の cDNA ライブラリーを混ぜて多様化を持たせ解析を行い、207 クローンを得て、67 種類の遺伝子発現リストを作成した。シグナルシーケンストラップ法に使用したライブラリーは、計  $1 \times 10^7$  のクローン有し（ここでは力価と呼ぶ）を平均 cDNA サイズ：1.7kbp であった。

胃ガンについては、昨年度作製した GCIY、MKN1、KATOIII の cDNA ライブラリーについて解析を行い、282 クローンを得て、114 種類の遺伝子発現リストを作成した（以下のテーブルを参照）。

#### 胃がんのライブラリー

細胞株	力価	平均サイズ
MKN1	$9.6 \times 10^6$	0.9kbp
GCIY	$1.5 \times 10^7$	1.0kbp
KATOIII	$7.8 \times 10^6$	1.5kbp

また、膀胱ガンについては、T24 細胞株を用いて 153 クローンを得て、70 種類の遺伝子発現リストを作成した。cDNA ライブラリーの情報は以下の通りである。

#### 膀胱がんのライブラリー

細胞株	力価	平均サイズ
T24	$5.0 \times 10^7$	1.1kbp

グリオーマ/グリオブラストーマについては、T98G、U87MG、および混合の cDNA ライブラリーを用いて 442 クローンを得て、99 種類の遺伝子を得た。cDNA ライブラリーの情報は以下の通りである。

#### グリオブラストーマのライブラリー

細胞株	力価	平均サイズ
T98G	$1.3 \times 10^7$	1.0kbp
U87MG	$3.9 \times 10^6$	1.1kbp

腎がん、大腸がんについても cDNA ライブラリー作製までは終了し、それぞれ 47 クローン、34 遺伝子、11 クローン、9 遺伝子まで解析を終えて、引き続き進行中である。

#### 腎がん、大腸がんのライブラリー

細胞株	力価	平均サイズ
Caki1(腎臓)	$7.4 \times 10^6$	0.9kbp
HCT116(大腸)	$1.9 \times 10^7$	1.3kbp
DLD1(大腸)	$2.7 \times 10^7$	1.4kbp

## 2. 樹立したモノクローナル抗体の解析

各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 16 種について予備的な解析を行った。そのうち 1 種類の抗体はグリオブラストーマ細胞株の増殖を *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。

また、前立腺ガンより得られた 1 種類の抗体は、*in vivo* においてもがん細胞の増殖抑制機能を有していた。

## 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製

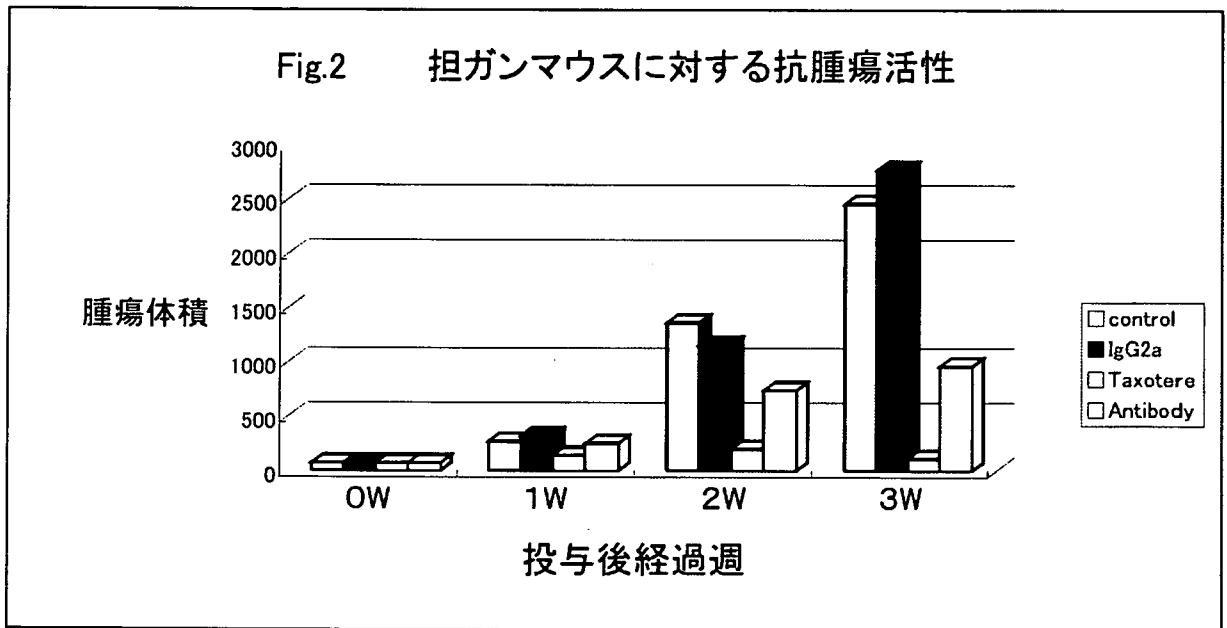
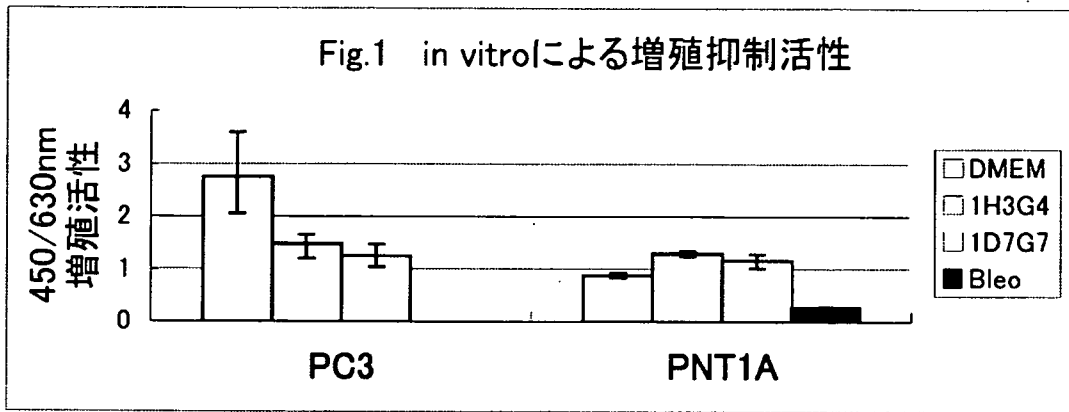
今年度は、胃がん、グリオブラストーマ、膀胱がん、前立腺がん由来分子に対するモノクローナル抗体を 16 種樹立した。本年度 cDNA ライブラリー作製まで終了した大腸がん、腎がんなどについても、来年度解析を進め候補の選択を行い、モノクローナル抗体を作製する予定である。

## 4. 機能抗体の *in vivo* での抗がん活性

我々は、前立腺がんから樹立した 10 種類の抗体について、*in vitro* および *in vivo* におけるがん細胞の増殖抑制活性について検討し、抗 EphA2 抗体にがん細胞増殖抑制活性が存在することを明らかにした。

*in vitro* では、前立腺がん細胞株 (PC3) と正常組織由来の前立腺細胞株 (PNT1A) を用いて、抗体添加 2 日後の増殖が約 1/2 に抑制されていた。正常前立腺細胞では、増殖抑制を示さない事から、副作用の少ない抗がん作用を持つ機能抗体である事が示唆された (Fig. 1)。

また 5 週齢の SCID マウスに PC3 細胞を移植すると 3 週間で約 5mm 画大の腫瘍が認められるが、マウスの尾静脈より抗 EphA2 抗体を 250  $\mu$ g/回にて 1 週間おきに 3 回投与すると陰性コントロールと比較して、腫瘍体積が約 1/3 に留まっていることが確認され、本抗体が *in vivo* における前立腺がん細胞の増殖を抑制することが示唆された (Fig. 2)。



### 5. 細胞チップの高感度化

これまでに作成した細胞チップは、96 穴マイクロタイタープレートによる ELISA と比較すると感度が十分とは言えず、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ために、細胞チップのさらなる高感度化が必要である。

近年の体外診断用医薬品は、高感度

化、測定時間の短縮などの要望により、ELISA から化学発光測定法に切り替わりつつある。そこで本細胞チップに対しても化学発光による検出を試みた。その結果、ELISA よりもシグナル/ノイズ比 (S/N 比) が向上し、高感度化を示唆する結果が得られた。さらに ELISA では検出限界を超える (オーバーフローする) 高値のサンプルに対しても測定が可能となり、測定域が



広がる可能性が示唆された。

一方、化学発光を用いる場合の課題も明確になった。高値を示すスポットからは非常に強い光が発せられる為、隣接するスポットから発せられる光と干渉し、シグナルに影響を与えることを確認した。従って、光の干渉を生じない程度のスポットサイズやスポット間距離、固定細胞数の最適化が必要である。

また、発光基質液の種類によってS/N比やシグナル強度が大きく異なることも判明した。これは細胞の固定に使用している豊田中央研究所が開発した基質の吸収波長帯と関係していると推測する。発光波長は使用する発光基質液によって決まるため、スポットから発せられる光が固定基質に吸収されないような細胞チップに適した基質液を選択することが必要となる。

今回、化学発光測定系を採用することにより、細胞チップの高感度化の可能性を見出すことができたが、チップ作成条件を含めたプロトコルの見直しが必要となった。

## D. 考察

SST クローン免疫法によるモノクローナル抗体作製は、あらかた順調に進んでいる。しかし、なかにはうまく作製できない場合があった。本計画をさらに効率良く進めるために、以下の検討をしている。

### (1) ハムスターあるいはラット抗体の作成

ハムスターあるいはラットのモノクローナル抗体を簡便に樹立するためには、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し、CHO 細胞あるいはラット Y3AG 細胞に感染する系を確立することが必要となる。

### (2) SST クローンの改良

SST クローン上の融合蛋白質の発現量を高めることができれば、モノクローナル抗体をさらに効率良く作製でき、また細胞チップへの応用も容易になる。そこでマウス白血病ウイルス LTR の代わりに EF1 $\alpha$ 、CMV、CAG、SR $\alpha$  など強力なプロモーターを使用して結果を比較したが使用している Ba/F3 細胞では、LTR が最も強い活性を有した。現在、SST クローン樹立

後に発現を高めるためプロモーター変更以外の方法を考案中である。

## E. 結論

本年度は SST-REX を前立腺ガン、胃がん、グリオーマ、膀胱がん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製することができた。作製した抗体の一部は、がん細胞の増殖を *in vitro* で抑制する機能を有しており、さらに前立腺ガンから得た抗 EphA2 抗体は、*in vivo* でもがん細胞の増殖抑制効果を有していた。

これまでの検討の結果から、SST-REX 法を利用したターゲット探索と SST クローンを用いたモノクローナル抗体作製では、単に作製効率が良いというだけでなく、機能を有する抗体の取得にも有効な手段である事が

示唆された。

今後は、本年度得た抗体の更なる解析と平行して、大腸がん、腎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新規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ことによって本研究計画を推進して行く予定である。

- 1) ヘルパーウイルスを用いて SST クローンから挿入ベクターを回収し、ラットやハムスターなど、他の免疫動物を用いた抗体作製法の確立を目指す。
- 2) SST-REX 法をさらに改善し、抗体作成効率を高める。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Izawa K, Kitaura J, Yamanishi Y, Matsuoka T, Oki T, Shibata F, Kumagai H, Nakajima H, Maeda-Yamamoto M, Hauchins JP, Tybulewicz VLJ, Takai T and Kitamura T. (2007) Functional analysis of an activating receptor LMIR4 as a counterpart of an

inhibitory receptor LMIR3. **J. Biol. Chem.** 25: 17997-18008.

2) Nakayama M, Underhill DM, Peterson TW, 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.

3) Sekine R, Kitamura T, Tsuji T and Tojo A. (2007) Identification and comparative analysis of Pax5 C-terminal isoforms expressed in human cord blood-derived B cell progenitors. **Immunol. Letters** 111:21-25.

4) Lu Y, Kitaura J, Oki T, Komeno Y, Ozaki K, Kiyono M, Kumagai H, Nakajima H, Nosaka T, Aburatani H and Kitamura T. Identification of TSC-22 as a potential tumor suppressor that is upregulated by Flt3-D835V but not Flt3-ITD. **Leukemia** 21: 2246-2257, 2007.

5) Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T and Nagata S. (2007) Identification of TIM4 as a phosphatidylserine receptor for engulfment of apoptotic cells. **Nature** 450:435-440.

6) Morikawa Y, Komori T, Hisaoka T, Ueno H, Kitamura T and Senba

E. (2007) Expression of mKirrein in the developing sensory pathways: its close apposition to nephrin-expressing cells. **Neuroscience** 150:880-886.

7) Yamanishi Y, Kitaura J, Izawa K, Matsuoka T, Oki T, Lu Y, Shibata F, Yamazaki S, Kumagai H, Nakajima H, Maeda-Yamamoto M, Tybulewicz VLJ, Takai T and Kitamura T. (2008) Analysis of mouse LMIR5/CLM7 as an activating receptor: differential regulation of LMIR5/CLM7 between mouse and human. **Blood** 111:688-698.

8) Sugano, Y., Takeuchi, M., Hirata, A., Atsushita, H.M., Kitamura, T., Minoru, T., and Miyajima, A. (2008) Junctional adhesion molecule-A, JAM-A, is a novel cell-surface marker for long-term repopulating hematopoietic stem cells. **Blood** 111:1167-1172.

9) Watanabe-Okochi N, Kitaura J, Ono R, Harada H, Harada Y, Komeno Y, Nakajima H, Nosaka T, Inaba T and Kitamura T. AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model. **Blood** in press.

10) Kawashima T and Kitamura T. Rac and Nuclear Translocation of STAT Transcription Factors. **Methods in Enzymology** in press.

11) Kitamura T, Oki T, Watanabe-Okochi N, Komeno Y, Kato N, Yuji K, Ono R, Nakajima H, Tojo A, Nosaka T and Kitaura J. Identification of leukemia-related gene alterations: Molecular pathogenesis of leukemia, myeloproliferative disorders (MPD), and myelodysplastic syndromes (MDS). **Blood Cells, Molecules and Diseases** in press.

12) 中島秀明、北村俊雄 (2007) 造血幹細胞/造血器腫瘍と Wnt シグナル 血液腫瘍科 54:224-230

13) 北村俊雄、渡辺直子 (2007) 発癌機構: 概論 造血器腫瘍—基礎臨床領域における最近の研究動向 日本臨床 65:17-22.

14) 北村俊雄 (2007) レトロウイルスベクターによる蛍光タンパク質導入の有効活用法 バイオテクノロジージャーナル 3-4:222-227.

15) 北村俊雄、等泰道 (2008) FLT3 阻害剤と JAK 阻害剤: 造血器腫瘍に対するチロシンキナーゼ阻害剤の有効性と開発状況 医学のあゆみ 224:103-107.

## 2. 学会発表

1) Kitamura, T. (2007年1月) Rac1 and MgcRacGAP are required for nuclear transport of the tyrosine phosphorylated form of STAT3 and STAT5. キーストンシンポジウム、ブレナリートーク

2) Kitamura, T. (2007年3月) Learning from model mice for myelodysplastic syndromes (MDS) and MDS/overt leukemia. 日米血液腫瘍セミナー、招待講演

3) 小埜良一、北村俊雄、野阪哲哉 (演者). (2007年3月) MLL 融合蛋白による多段階発癌における Raf-MAP キナーゼ系活性化の重要性. 日本プロテインホスファターゼ研究会 第3回国内集会、口演

4) 渡辺・大河内直子、北浦次郎、小埜良一、原田浩徳、原田結花、中島秀明、野阪哲哉、稲葉俊哉、北村俊雄. (2007年5月) AML1 点変異はマウス BMT モデルにおいて MDS/ AML を発症させる. 第5回幹細胞シンポジウム、口演

5) 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. (2007年10月) Hoxa9 と Ras-MAP キナーゼ系の協調作用が MLL 融合蛋白による急性白血病の発症に重要である. 第66回日本癌学会学術総会、ポスター

6) 北村俊雄、野阪哲哉 (2007年10月) 白血病および MDS の分子病態: