200823008A

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

レトロウィ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

平成２０年度　総括・分担研究報告書

主任研究者　北村　俊雄

平成２１（２００９）年4月

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

レトロウィ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２０年度　総括・分担研究報告書

主任研究者　北村　俊雄

平成２１（２００９）年４月

目　次

Ⅰ. 総括研究報告

レトロウィ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　北村　俊雄----------------1

II. 分担研究報告

1．レトロウィ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　北村　俊雄-------------- 11

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------------- 22

III. 研究成果の刊行に関する一覧表　------------- 28

IV. 研究成果の刊行物・別刷　------------- 29

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）

平成２０年度　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

研究代表者　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場合が多くなってきた。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。本研究の研究対象は、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、予後は中等度であるが同じく早期診断が難しい腎がん、また本邦に多い胃がんおよび近年本邦で増加しつつある大腸がん、前立腺がん、膀胱がんに設定した。本研究の目的は、これらのがんに対する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。

主任研究者らがレトロウイルス技術に基づき開発したシグナルシークエンストラップ SST-REX 法によって、上記がん細胞株に発現するマーカー候補分子、治療標的候補分子を同定した。本年度はシグナルシークエンストラップ法の解析数が増加し、１８、１９年度の総計の約２倍を解析し得た。本研究においては、これらの候補分子に対するモノクローナル抗体樹立法を考案することにより、抗腫瘍活性などの生理活性機能を有する抗体を効率良く取得することに成功した。

研究分担者　北村　俊雄
東京大学医科学研究所
細胞療法分野　教授

研究分担者　野阪　哲哉
三重大学大学院医学系研究科
感染症制御医学分野　教授

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）、予後は中等度であるがやはり早期診断の難しい腎がん、本邦に多い胃がん、本邦で最近増加しつつある前立腺がん、大腸がん、膀胱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クエンストラップ法 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 法でスクリーニングを行うと、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、IL-3 依存性 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、シグナルシークエ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。シグナルシークエ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、患者血清中に存在すると考えられるがん抗原に対する抗体のアッセイに利用する。

(倫理面への配慮)

本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。樹立した抗体を利用してヒト血清中のがん抗原をアッセイする利用する目的で、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、該当者に説明し同意書を得たうえで検体を採取した。

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

主任研究者らが開発したレトロウイルスベクターを利用したシグナルシークエンストラップSST-REX法を利用して総計2,350クローンの解析を行い、のべ588種類の膜蛋白質および分泌蛋白質に対する遺伝子を同定した。同定したがん細胞マーカー候補分子のうち34種類に対してモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体は様々ながん細胞を認識したことに加え、約1/3の抗体がヒトがん細胞株の増殖を培養系で抑制し、2種類の抗体が3種類の担がんマウスにおけるヒトがん細胞株の増殖を抑制した。また、ユーイング肉腫については3種のマーカー候補遺伝子を同定したが、1種類は早期発見に役立つ可能性のある分泌蛋白質である。

本研究によってSST-REX法で得られた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がん細胞を認識するモノクローナル抗体を効率良く作製できることが確認され、さらには得られた抗体が抗腫瘍活性などの生理活性機能を有する事が確認された。

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、大腸がん、腎がん、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。計2,350クローンの解析を行い、のべ588種類の膜蛋白質および分泌蛋白質に対する遺伝子を同定した。同定したがん細胞マーカー候補分子のうち34種類に対してモノクローナル抗体を作製した。作製した34種類の抗体のうちin vitro実験において、ヒトがん細胞株の増殖を抑制する抗体が17種類存在し、複数のがん種にまたがって機能を有するものを加えると、延べ26種類においてヒトがん細胞株の増殖抑制効果を

認めた。

1. 各種がん細胞株のシグナルシークエンストラップ法(SST-REX 法)の実施

我々は、この 3 年間で膵臓がん、前立腺がん、グリオーマ、胃がん、膀胱がん、ユーイング肉腫、腎臓がん、大腸がんという8種類のがん種について、細胞株 28 種のシグナルシークエンストラップを行い、2,350 クローンを解析した。その結果、それぞれの細胞株に発現する膜蛋白質・分泌蛋白質として、合計 588 種類の同定を行った。下記にがん種ごとの内訳並びに Table1 で一覧表を示す。

Table1. 各がん種における SST-REX 法の解析クローンおよび同定遺伝子数

ガン種	細胞種	解析クローン数	遺伝子数
前立腺ガン	Du145, PC3, LNCap	311	78
膵臓ガン	AsPC1, BxPC3, Capan1	35	26
グリオーマ	T98G, U251, U87MG	82	41
胃ガン	MKN1, GCIY, KATOIII	423	54
膀胱ガン	T24, UM-UC-3, 5637	429	145
腎臓ガン	Caki1, KMRM-M1, KMRC2	573	99
大腸ガン	HCT116, DLD1, SW480, WiDr	497	145
合計		2350	588

2．がんマーカーおよび分子標的の候補分子に対するモノクローナル抗体の作成

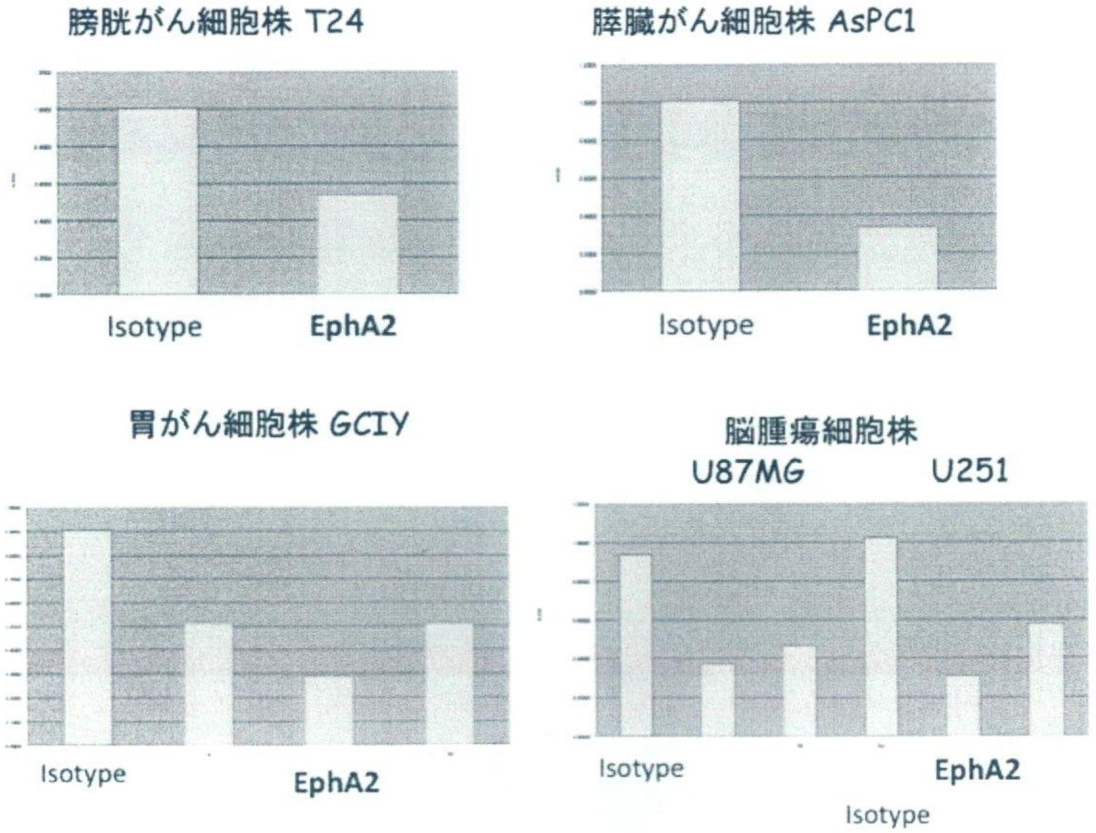
SST-REX 法で同定した上記のがん細胞由来膜蛋白質および分泌蛋白質のうち、データベースを参考にして、がん診断マーカーおよび治療の分子標的の候補分子 34 種を選別し、当該分子を発現する SST クローンを免疫原としてモノクローナル抗体を作成した。

これらのモノクローナル抗体はいずれも種々のがん細胞を認識するが、１７種遺伝子産物に対する抗体はヒトがん細胞株の増殖を in vitro 培養系で抑制することが判明した。また、そのうち 3 種類の抗体は担がんマウスにおけるヒトがん細胞株の増殖も抑制した。

例えば、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。また抗 EPHA2 抗体は胃癌、膀胱がん、グリオブラストーマ、膵がんなど複数のヒトがん細胞の培養系での増殖も抑制した（図１）。また、抗 EHPHA2 抗体と抗 SPARC 抗体は担がんマウスの胃癌の増殖を抑制した。

図1 抗EphA2抗体の腫瘍細胞増殖抑制効果(in vitro)



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および細胞チップへの応用に向けて、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、EF1α、CAG、CMV、SRαなど強力なプロモーターを使用して SST クローン上のMPL 融合蛋白質の発現を高めることを試みた。しかしながら、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く、LTR によって最も高い発現が得られた。このことは一過性のトランスフェクションで行ったルシフェラーゼアッセイにおいても確認された。

3) 細胞チップの開発

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。さらに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エ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

シグナルシークエ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。がん細胞が発現する膜蛋白質、分泌蛋白質３４種に対しモノクローナル抗体を作成したが、すべての抗体が細胞上に発現している自然な形の膜蛋白質を認識した。また、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予想以上に高いことが判明した。３４種の分子に対して抗体を作成し、in vitro でがん細胞の増殖を抑制する抗体が１７種の分子に対する抗体で取得でき、そのうち２種の遺伝子 (EPHA2 と SPARC) は延べ３種の担がんマウス系でのがん細胞増殖を抑制した。また抗体作成は途上であるが、ユーイング肉腫の早期発見に利用できる分泌蛋白質を同定している。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複数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 EF1α、CMV、CAG、SRαなど強力なプロモーターを使用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。

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クエ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５８８種同定した。がん由来分子を３４種選別し、これらの分子に対するモノクローナル抗体を作成した。これらの抗体のうち１／４程度が何らかのがん細胞

の in vitro での増殖を抑制し、さらに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した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugano, Y., Takeuchi, M., Hirata, A., Atsushita, H.M., Kitamura, T., Tanaka, M., 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.

2. Watanabe-Okochi, N, Kitaura, J., Ono, R., Harada, H., Harada, Y., Nakajima, H., Nosaka, T., Inaba, T., and Kitamura, T. (2008) AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model. Blood 111: 4297-4308.

3. Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., Matsuoka, T., Oki, T., Lu, Y., Shibata, F., Yamazaki, S., Kumagai. H., Nakajima, H,, Maeda-Yamamoto, M., Tybulewicz, V.L.J., 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.

4. Kawashima, T., and Kitamura, T. (2008) Rac and Nuclear Translocation of STAT Transcription Factors. Methods in Enzymology 431:171-180.

5. Sekine, R., Kitamura, T., Tsuji, T. and Tojo, A. (2008) Efficient retroviral transduction of human B-lymphoid and myeloid progenitors: mark inhibition of their growth by the Pax5 transgene. Int. J. Hemal. 87:351-362.

6. Komori, T., Gyobu, H., Ueno, H., Kitamura, T., Senba, E. and Morikawa Y. (2008) Expression of kin of irregular chiasm-like 3/mKirre in proprioceptive neurons of the dorsal root ganglia and its interaction with nephrin in muscle spindles. J. Comp. Neurol. 511:92-108.

7. Ikeya, M., Nosaka, T., Fukushima K., Kawada, M., Furuta, Y., Kitamura, T., and Sasai, Y. (2008) Twisted gastrulation mutation suppresses skeletal defect phenotypes in Crossveinless 2 mutant mice. Mech. Dev. 125: 832-842.

8. Hiwatari, M., Ono, R., Taki, T., Hishiya, A., Ishii, E., Kitamura, T., Hayashi, Y., and Nosaka, T. (2008) Novel gain-of-function mutation in the extracellular domain of the PDGFRA gene in infant acute lymphoblastic leukemia with t(4;11)(q21;q23). Leukemia 22: 2279-2280.

9. Nishio M, Ohtsuka J, Tsurudome M, Nosaka T, and Kolakofsky D. (2008) Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits genome replication by binding to the L protein; a possible role in promoting viral fitness. J Virol 82: 6130-6138.

10. Shibata, F., Goto-Koshino, Y., Morikawa, Y., Komori, T., Ito, M., Fukuchi, Y., Hauchins, J.P., Tsang, M., Kitamura, T., and Nakajima, H. (2008) Robo4 is expressed on hematopoietic stem cells and potentially involved in the niche-mediated regulation of the side population phenotype. Stem cells

27:183-190.

11. Fukuchi, Y., Ito, M., Shibata, F., Kitamura, T., and Nakajima, H. (2008) Activation of C/EBPa or PU.1 in hematopoietic stem cells leads to their reduced self-renewal and proliferation. Stem cells 26: :3172-3188.

12. Nakajima, H., Tamura, T., Ito, M., Shibata, F., Kuroda, K., Fukuchi, Y., Watanabe, N., Kitamura, T., Ikeda, Y., and Handa M. (2008) SHD1 is a novel cytokine-inducible, negative feedback regulator of STAT5- dependent transcription. Blood113: 1027-1036.

13. Islam, S.M., Shinmyo, Y., Okafuji, T., Su, Y., Naser, I.B., Ahmed, G., Zhang, S., Chen, S., Ohta, K., Kiyonari, H., Abe, T., Tanaka, S., Nishinakamura, R., Terashima, T., Kitamura, T., and Tanaka, H. (2009) Draxin, a novel repulsive guidance protein for spinal cord and forebrain commissures. Science 323:388-393.

14. Komeno, Y., Kitaura, J. and Kitamura, T. (2009) Molecular bases of myelodysplastic syndromes: Lessons from animal models. J Cell. Physiol. in press.

15. Kitamura, T., Oki, T., Watanabe-Okochi, N., Komeno, Y., Kato, N., Yuji, K., Ono, R., Nakajima, H., Tojo, A., Nosaka, T. and Kitaura, J. (2009) Identification of leukemia-related gene alterations: Molecular pathogenesis of leukemia, myeloproliferative disorders (MPD), and myelodysplastic syndromes (MDS). Blood Cells, Molecules and Diseases in press.

16. Kawashima, T., Bao, Y.C., Minoshima, Y., Nomura, Y., Hatori, T., Hori, T., Fukagawa, T., Takahashi, N., Nosaka, T., Inoue, M., Sato, T., Kukimoto-Niino, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S., and Kitamura, T. (2009) A Rac GTPase activating protein MgcRacGAP is an NLS-containing nuclear chaperone in the activation of STAT transcription factors. Mol Cell Biol., 29:1796-1813.

17. Watanabe-Okochi, N., Oki, T., Komeno, Y., Kato, N., Yuji, K., Ono, R., Harada, Y., Harada, H., Hayashi, Y., Nakajima, H., Nosaka, T., Kitaura, J., and Kitamura, T. (2009) Possible involvement of RasGRP4 in leukemogenesis. Int J. Hematology, in press.

18. 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.

19. 米野由希子、北村俊雄（2008）癌幹細胞と遺伝子異常—マウス骨髄移植モデルの有用性　医学のあゆみ　227:67-71.

20. 野阪哲哉（2008）造血器腫瘍マウスモデル．がん分子標的治療 6:101-109.

21. 沖俊彦、北村俊雄（2009）iPS 細胞と発現ベクター　細胞工学 28:209-214.

22. 北村俊雄、沖俊彦（2009）iPS 細胞作製におけるウイルスベクターの役割と問題点　臨床検査 53:231-235.

23. 北村俊雄、渡辺直子、米野由希子、加藤菜穂子、中原史雄、土岐典子、沖俊彦、北浦次郎（2009）白血病、骨髄増殖性疾患、骨髄異形成症候群発症の分子メカニズム　臨床血液　印刷中

2. 学会発表

1. 山西吉典、北浦次郎、伊沢久未、沖　俊彦、北村俊雄　活性型レセプターLMIR5 の機能解析：マウスおよびヒトLMIR5 の相違.第 4 回麒麟塾、口演　(2008 年 7 月)

2. Yamanishi Y, Kitaura J, Izawa K, Matsuoka T, Oki T, Lu Y, Shibata F, Yamazaki S, Kumagai H, Nakajima H, Maeda-Yamamoto M, Tybulewicz V.L, Takai T, and Kitamura T. Analysis of mouse LMIR5/CLM-7 as an activating receptor: differential regulation of LMIR5/CLM-7 in mouse versus human cells. The 15th East Asia Joint Conference. (2008 年 7 月)

3. Komeno Y, Kitaura J, Watanabe-Okochi N, Kato N, Oki T, Honjo T and Kitamura T. Overexpression of AID causes both T and B lymphoma in a mouse BMT model. ISEH 37th Annual Scientific Meeting, Poster Session (2008 年 7 月)

4. 北村俊雄　白血病、骨髄増殖性疾患、骨髄異形成症候群発症の分子メカニズム.第 70 回日本血液学会総会、シンポジウム (2008 年 10 月)

5. 渡辺(大河内)直子、北浦次郎、原田浩徳、米野由希子、加藤菜穂子、小埜良一、野阪哲哉、中島秀明、北村俊雄　マウス骨髄移植モデルにおいて、Evi1 は MDS/AML を誘発する. 第 70 回日本血液学会総会、口演 (2008 年 10 月)

6. 加藤菜穂子、米野由希子、渡辺(大河内)直子、原田浩徳、原田結花、北浦次郎、北村俊雄 AML,MDS でみられた C/EBPα 変異体のマウス BMT model. 第 70 回日本血液学会総会、口演(2008 年 10 月)

7. 米野由希子、北浦次郎、渡辺(大河内)直子、加藤菜穂子、沖俊彦、本庶佑、北村俊雄 BMT モデルを用いた AID 高発現による白血病・リンパ腫の解析. 第 70 回日本血液学会総会、口演 (2008 年 10 月)

8. 川島敏行、土屋秋穂、北村俊雄　新しいメカニズムで JAK/STAT シグナルを抑制する阻害剤の同定. 第 70 回日本血液学会総会、口演 (2008 年 10 月)

9. 中島秀明、越野裕子、柴田文、福地由美、Dean Li、北村俊雄 Robo4 の造血幹細胞における生理学的機能. 第 70 回日本血液学会総会、ポスター (2008 年 10 月)

10. 和田妙子、菊池次郎、清水瑠美、北村俊雄、古川雄祐　ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)による血球分化の制御と白血病における過剰発現. 第 70 回日本血液学会総会、ポスター (2008 年 10 月)

11. 米野由希子、加藤菜穂子、北村俊雄 BMT モデルを用いた AID 高発現による白血病・リンパ腫の解析. 第 67 回日本癌学会学術総会、口演 (2008 年 10 月)

12. 山西吉典、北浦次郎、伊沢久未、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄　可溶性 LMIR5 は LPS による炎症反応を増強する.第 38 回日本免疫学会総会、口演　(2008 年 12 月)

13. 榎本豊、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄　活性化レセプター LMIR7 の機能解析.第 38 回日本免疫学会総会、口演　(2008 年 12 月)

14. 伊沢久未、北浦次郎、山西吉典、松岡孝幸、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄 LMIR3 はマスト細胞において細胞内領域の ITIM を介した抑制化

シグナルとITAMを有するFcRgammaとの会合を介した活性化シグナルを伝達する.第38回日本免疫学会総会、口演 (2008年12月)

15. 杉内正弘、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄 活性化レセプターのLMIR6は末梢血の樹状細胞に高発現する.第38回日本免疫学会総会、ポスター (2008年12月)

16. 土屋秋穂、川島敏行、北村俊雄 インターロイキン6(IL-6)阻害剤のスクリーニング法の開発と阻害剤の評価.第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、ポスター (2008年12月)

17. Yamanishi Y, Kitaura J, Izawa K, Oki T, Takai T and Kitamura T. Analysis of Mouse LMIR5/CLM-7 as An Activating Receptor: Differential Regulation of LMIR5/CLM-7 in Mouse Versus Human Cells. 50th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting (2008年12月)

18. 北村俊雄 Lessons from mouse BMT models for leukemia, MDS and MPD. 日米血液腫瘍ワークショップ、招待口演 (2009年3月)

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特許取得

シグナルシークエンストラップ法

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

パッケイジング細胞

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

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）
平成２０年度　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

研究分担者　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場合が多くなってきた。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臓がん、グリオーマ（グリオブラストーマ）、および日本に多い胃がん、食の欧米化によって増加傾向にある大腸がん、さらにはがん以外の他疾患との区別が難しい前立腺がん、膀胱がん、腎臓がんなどのマーカー分子を用いた血清診断を確立するなど、がん疾患を対象として、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、全７種類のがん種すべてについて解析数を増やし、それぞれ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クエンストラップ法でそれぞれ 100 種類前後同定し、がん細胞マーカー候補とした。これらがん細胞マーカー候補分子の一部を選別し抗体を作製した。これまでにシグナルシークエンストラップ法で各々のがんから獲得した数百クローンの cDNA のうち、本年度は３４種類のがん由来分子に対するモノクローナル抗体を作製し、これらの抗体を解析した。

昨年度の解析結果から、シグナルシークエンストラップ法(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製できることが確認された。本年度の解析結果からは、これらの手法で得たモノクローナル抗体が、効率よく抗腫瘍活性を有する事が確認された。

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）、予後は中等度であるがやはり早期診断の難しい腎がん、本邦に多い胃がん、本邦で最近増加しつつある前立腺がん、大腸がん、膀胱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クエンストラップ法 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 法でスクリーニングを行うと、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、IL-3 依存性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、シグナルシークエ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。シグナルシークエ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、患者血清中に存在すると考えられるがん抗原に対する抗

体のアッセイに利用する。

（倫理面への配慮）

本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。樹立した抗体を利用してヒト血清中のがん抗原をアッセイする利用する目的で、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、該当者に説明し同意書を得たうえで検体を採取した。

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クエ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。

作製した 34 種類の抗体のうち新規に膵臓がん細胞株、グリオーマ細胞株、胃がん細胞株において、in vitro で増殖を抑制する抗体がのべ 19 種類存在した。

1. 各種がん細胞株のシグナルシークエンストラップ法

我々は、昨年度までに既に各ガン細胞株において cDNA ライブラリーを作製し、随時 SST-REX 法による膜蛋白質・分泌蛋白質の解析を実施している。本年度は、さらなる解析を行い、ターゲット分子の母数を増やす事に注力した。

前立腺ガンについて、Du145、PC3、LNCap の 3 種類の cDNA ライブラリーの解析を行い、311 クローンを得て、78 種類の遺伝子発現リストを追加し、合計で 145 種類の遺伝子発現リストを作成した。

膵がんについて、AsPC1、BxPC3、Capan1 の 3 種類の cDNA ライブラリーの解析を行い、35 クローンを得て、26 種類の遺伝子発現リストを追加し、合計で 106 種類の遺伝子発現リストを作成した。

グリオーマについて、T98G、U251、U87MG の 3 種類の cDNA ライブラリーの解析を行い、82 クローンを得て、41 種類の遺伝子発現リストを追加し、合計で 99 種類の遺伝子発現リストを作成した。

胃がんについては、GCIY、MKN1、KATOIII の cDNA ライブラリーについて解析を行い、423 クローンを得て、54 種類の遺伝子発現リストを追加し、合計で 114 種類の遺伝子発現リストを作成した。

膀胱がんについて、T24、UMUC3、5637 の 3 種類の cDNA ライブラリーを解析し、429 クローンを得て、145 種類の遺伝子発現リストを追加し、合計で 215 種類の遺伝子発現リストを作成した。

腎臓がんについて、Caki1、KMRM-M1、KMRC2 の 3 種類の cDNA ライブラリーを解析し、573 クローンを得て、99 種類の遺伝子発現リストを追加し、合計で 130 種類の遺伝子発現リストを作成した。

大腸がんについて、HCT116、DLD1、SW480、WiDr の 4 種類の cDNA ライブラリーを解析し、497 クローンを得て、145 種類の遺伝子発現リストを追加し、合計で 154 種類の遺伝子発現リストを作成した。

Table1 本年度解析クローン数まとめ

ガン種	細胞種	解析クローン数	遺伝子数
前立腺ガン	Du145, PC3, LNCap	311	78
膵臓ガン	AsPC1, BxPC3, Capan1	35	26
グリオーマ	T98G, U251, U87MG	82	41
胃ガン	MKN1, GCIY, KATOIII	423	54
膀胱ガン	T24, UM-UC-3, 5637	429	145
腎臓ガン	Caki1, KMRM-M1, KMRC2	573	99
大腸ガン	HCT116, DLD1, SW480, WiDr	497	145
合計		2350	588

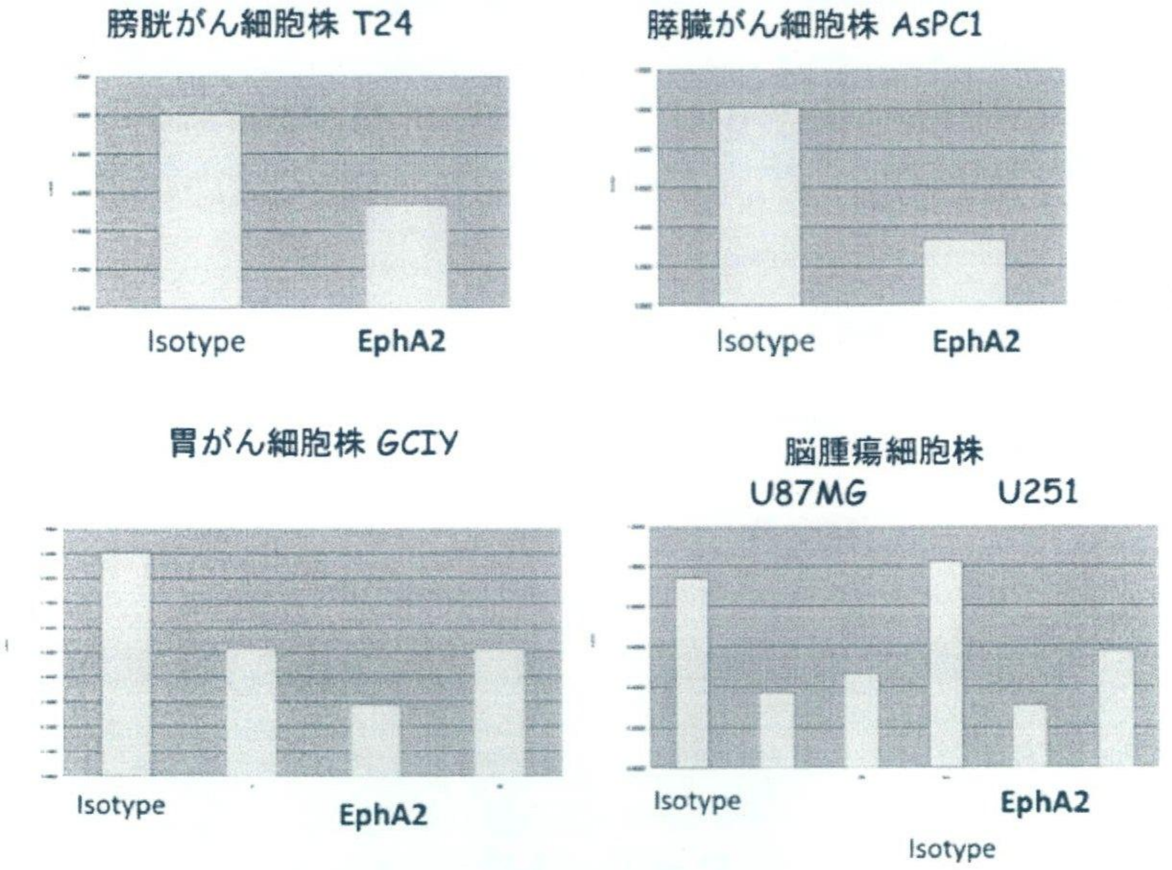
2. がん細胞由来膜蛋白質あるいは分泌蛋白質に対するモノクローナル抗体作製

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 クローンを免疫原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。本年度は、SST-REX 法で解析を行ったがん種のうち、前立腺がん、膵臓がん、胃がん、グリオーマの由来分子に対するモノクローナル抗体を 34 種樹立した。

3. 樹立したモノクローナル抗体の Characterization

各がん由来膜蛋白質および分泌蛋白質に対して作製したモノクローナル抗体 34 種について予備的な characterization を行った。そのうち膵臓がん細胞株に対して 2 種類、グリオーマに対して 8 種類、胃がんに対して 9 種類の抗体が、in vitro で細胞の増殖を抑制した。さらに担がんマウスを作製して *in vivo* での効果を調べた結果、胃がんで 2 種類の抗体が増殖抑制を持つ事が確認された。(図 1)

図1 抗EphA2抗体の腫瘍細胞増殖抑制効果(in vitro)



4. 機能抗体の *in vivo* での抗がん活性

我々は、胃ガンから樹立した機能抗体を用いて、SCID マウス(重度免疫不全マウス)にヒトがん細胞を移植し、*in vivo* での抗腫瘍活性について検討を行った。

膵臓がんに対する機能抗体は、膵臓がん細胞株(AsPC1、BxPC3)に対して MTT アッセイを実施し、それぞれ 1 種類ずつ抗体単独で増殖抑制活性を示した為、AsPC1 と BxPC3 を SCID マウスに移植して検討を行った。

胃がんに対する機能抗体では、スキルス胃がん細胞株(GCIY) に対して MTT アッセイを実施し、抗体単独で増殖抑制活性を示した為、GCIY 細胞を SCID マウスに移植して検討を行った。

in vivo の活性試験については、5 週齢の SCID マウスに各種ヒトがん細胞を移植し、3～6 週間観察したところ約 5mm 角大の腫瘍を確認した。マウスの尾静脈より、開発した抗体を 10mg/kg・回にて 1 週間おきに 3 回～4 回投与し、4 週目～5 週目のがん細胞の発育を観察した。

【膵がん機能抗体】

陰性コントロールに比較したが、抗体投与群の腫瘍体積について有意な差が確認できなかった。

【胃がん機能抗体】

陰性コントロールに比較して、抗体投与群の腫瘍体積が、約半分に留まっている事から、がんの増殖抑制を示す事が示唆された。

D．考察

SST-REX 法における膜蛋白質・分泌蛋白質の同定は、本年度に 2350 クローンを解析し、600 近い遺伝子を同定した。昨年度までの実績結果から約 1.8 倍に解析数が増えた事により、当初特異的と思われていたが他の SST 解析により出現した分子や、特異的と思われる新たな分子が散見された。本研究プロジェクトにおける SST-REX 法の利点は、蛋白質の発現を原理として膜蛋白質・分泌蛋白質の発現同定ができる事である。多くのがん細胞株を使用した SST-REX を実施する事で、蛋白質レベルとして各がん細胞に特異的に発現が予想される因子の探索が行え、ターゲットの絞込みに有意であると考えている。実際、本方法でターゲットを絞り込んだ後、SST クローン免疫法によるモノクローナル抗体作製では、実際に機能を有する抗体が数多く取得できており、予想通りのガン細胞への発現が確認できている。

一方で、SST-REX 法にて発現が確認できた細胞においても、染色が弱陽性であるなどの一見ネガティブな試験もあるが、逆に蛋白質の発現量が少ない場合においても、SST-REX 法で拾えている事は、ターゲット探索には有用な知見であると考えている。

E．結論

本年度は全がん種において、SST-REX をさらに解析することで、有用な因子のターゲット幅を増す事ができた。

また、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、作製した抗体の一部は、がん細胞の増殖を抑制する機能を有していることが明らかになった。本年度の検討の結果から、SST-REX 法を利用したターゲット探索では、数多くの解析を進めると、特異的に発現していると思われる因子が徐々に明らかになり、ターゲットとしての科学的根拠を増す事、SST クローンを用いたモノクローナル抗体作製は、単に作製効率が良いだけではなく、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。

F. 研究発表

1．論文発表

1. Sugano, Y., Takeuchi, M., Hirata, A., Atsushita, H.M., <u>Kitamura, T</u>., Tanaka, M., 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.

2. Watanabe-Okochi, N, Kitaura, J., Ono, R., Harada, H., Harada, Y., Nakajima, H., Nosaka, T., Inaba, T., and <u>Kitamura, T</u>. (2008) AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model. Blood 111: 4297-4308.

3. Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., Matsuoka, T., Oki, T., Lu, Y., Shibata, F., Yamazaki, S., Kumagai. H., Nakajima, H,, Maeda-Yamamoto, M., Tybulewicz. V.L.J., 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.

4. Kawashima, T., and Kitamura, T. (2008) Rac and Nuclear Translocation of STAT Transcription Factors. Methods in Enzymology 431:171-180.

5. Sekine, R., Kitamura, T., Tsuji, T. and Tojo, A. (2008) Efficient retroviral transduction of human B-lymphoid and myeloid progenitors: mark inhibition of their growth by the Pax5 transgene. Int. J. Hemal. 87:351-362.

6. Komori, T., Gyobu, H., Ueno, H., Kitamura, T., Senba, E. and Morikawa Y. (2008) Expression of kin of irregular chiasm-like 3/mKirre in proprioceptive neurons of the dorsal root ganglia and its interaction with nephrin in muscle spindles. J. Comp. Neurol. 511:92-108.

7. Ikeya, M., Nosaka, T., Fukushima K., Kawada, M., Furuta, Y., Kitamura, T., and Sasai, Y. (2008) Twisted gastrulation mutation suppresses skeletal defect phenotypes in Crossveinless 2 mutant mice. Mech. Dev. 125: 832-842.

8. Hiwatari, M., Ono, R., Taki, T., Hishiya, A., Ishii, E., Kitamura, T., Hayashi, Y., and Nosaka, T. (2008) Novel gain-of-function mutation in the extracellular domain of the PDGFRA gene in infant acute lymphoblastic leukemia with t(4;11)(q21;q23). Leukemia 22: 2279-2280.

9. Shibata, F., Goto-Koshino, Y., Morikawa, Y., Komori, T., Ito, M., Fukuchi, Y., Hauchins, J.P., Tsang, M., Kitamura, T., and Nakajima, H. (2008) Robo4 is expressed on hematopoietic stem cells and potentially involved in the niche-mediated regulation of the side population phenotype. Stem cells 27:183-190.