

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と高集積がん組織アレイを利用した癌抗原同定と  
がんの早期診断治療への応用に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北村 俊雄

平成23(2011)年 5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

レトロウイルス技術と高集積がん組織アレイを利用した癌抗原同定と  
がんの早期診断治療への応用に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北村 俊雄

平成23（2011）年 5月

## 目 次

I. 総括研究報告 レトロウイルス技術と高集積がん組織アレイを利用した癌抗原同定とがんの早期診断治療への 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と高集積がん組織アレイを利用した癌抗原同定と がんの早期診断治療への応用に関する研究	-----	10
北村 俊雄		
2. 多種がんの高集積アレイを用いた分子標的抗体薬候補の特異性検討、および 全身がんにおける横断的分布の観察と機能の評価に関する研究	-----	16
福岡 順也		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	22

## 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22年度 総括研究報告書

### レトロウイルス技術と高集積がん組織アレイを利用した癌抗原同定とがんの早期診断治療への応用

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

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、抗体を用いた診断・治療への応用を目指すことである。

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ーンの cDNA のうち、各がん由来分子に対するモノクローナル抗体を 51 種類作製し、これらの抗体の解析を行った。昨年までの解析結果から、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腫瘍細胞を認識し、腫瘍増殖を抑制するモノクローナル抗体を作製できることが確認された。一方、がん組織に特異的に発現を認める蛋白質、あるいはがん診断に適した抗体を探索する目的で、分担研究者である富山大学の福岡が作製した、高集積がん組織アレイによる、正常組織、がん組織における発現プロファイリングを行うための予備的実験を行い、固定化した細胞を免疫源としてモノクローナル抗体を作成すれば、組織アレイに使用可能なモノクローナル抗体を効率良く取得できることを明らかにした。また本年度は分担研究者の福岡が、モノクローナル抗体検定用のパイロットがん組織アレイおよび脳腫瘍のがん組織アレイを作製した。また、さらにこれらの患者の診断、予後などの臨床情報を収集した。

#### 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、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。しかしながら膵臓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、がん疾患を対象とした抗体を用いた治療応用、診断応用を目指している。多くの場合、治療、診断のターゲット因子は、疾患部位への特異発現が認められる事が必要であり、診断の確度や副作用の予測など、全身の組織における発現プロファイリングは重要な情報を提供する。

本年度の主な目的は、病理組織染色に使用できる抗体を作製し、正常組織、患者がん組織の高集積組織アレイを利用して発現プロファイルを作製する事である。

## B. 研究方法

本研究では、各種がん細胞株を材料として SST-REX 法にて膜蛋白質・分泌蛋白質を解析し、その中からターゲットを絞り込んで SST クローン免疫法でモノクローナル抗体を作製する。SST-REX 法にて膜蛋白質・分泌蛋白質を解析し、その中からターゲットを絞り込んで SST クローン免疫法でモノクローナル抗体を作製する。

### 1. 組織アレイで使用可能な抗体の作製 (北村)

本年度までに作製したモノクローナル抗体でがん病理組織をパイロットとして染色してみたが、固定された病理標本を効率良く染色する抗体はなかった。そこで、下記のターゲットについて、SST クローン免疫法の改変し、組織染色用抗体作製を行った。

- ・抗 C1orf56 抗体
- ・抗 F11R 抗体
- ・抗 FSTL1 抗体
- ・抗 GPNMB 抗体
- ・抗 GPR56 抗体
- ・抗 MPZL1 抗体
- ・抗 PROCR 抗体
- ・抗 TMED2 抗体

組織アレイで使用できる抗体を取得するために2つの戦略をとった。まず固定化した抗原を認識する抗体を取得するために、各抗原蛋白質を発現している SST クローンを 10%ホルマリンで固定し、免疫源として

使用した。具体的には、免疫感作したマウスからリンパ節を摘出し、リンパ球とミエローマ細胞を融合して、選択培地中で選択培養した。10%ホルマリン固定した細胞を用いて反応性を確認した。10%ホルマリン固定した細胞を用いる事で、変性蛋白質に対して反応を示す抗体 (=病理切片染色に適した抗体) をスクリーニングできる事を期待した。

もう一つの戦略として分子をエピトープ毎に分けて発現させることによって多様性の多いモノクローナル抗体を作製することも試みた。この戦略は抗 EPHA2 抗体についておこなった。この試みの狙いは、病理組織特有の抗原固定による変性 (=構造変化) に対して、あらかじめ免疫原の **deletion mutant** を作製する事で高次構造の変化した蛋白質を作り、その結果変性抗原に対する反応性にポジティブな影響を及ぼす事を期待した。抗原ドメインの作製は、1-700bp、1-1500bp、1-1757bp の3ドメインを構築した。病理染色のアプリケーションに対応させるため、前述の8抗体と同様、10%ホルマリン固定による蛋白質変性処理を行って免疫し、抗体を作製した。

得られた抗体で高集積がん組織アレイによる解析を行うため、まず SST クローンのペレットをホルマリン固定して作製したパラフィン切片での組織染色条件検討を検討した。当該パラフィン切片で発現プロファイル解析を行った。

### 2. 高集積組織アレイ作製および臨床情報の収集 (福岡)

昨年度収集された脳腫瘍 95 例、食道癌、子宮頸部癌、皮膚癌、頭頸部癌などの扁平

上皮癌症例のブロックより作製されたパイロット高集積組織アレイについて、臨床データの収集を行った。脳腫瘍では、年齢、性別、組織型、MIB-1 index、overall survival (OS)、progression free survival (PFS)、治療方針、治療効果についての情報を収集した。

### 3. パイロットアレイの作製 (福岡)

抗体の染色条件を決定するため、28 症例の腫瘍組織を有する検討用アレイ (パイロットアレイ) の症例を選定し、アレイブロックを作製した。含まれた腫瘍は、1999 年から 2006 年までの富山大学における病理アーカイブにおける肺扁平上皮癌、乳癌、胆管癌、肝臓癌、胃癌、肺腺癌、腎癌、甲状腺癌、大腸癌、前立腺癌、膵癌、膀胱癌、卵巣癌および子宮体部癌である。4 $\mu$  薄切切片を用いて染色条件検討に使用した。

### 4. ハイブリドーマ培養上清による免疫染色の条件検討 (福岡)

SST-REX 法で得られるクローンをホルマリン固定化してから免疫源として利用することで、ホルマリン固定パラフィンブロックに使用可能な抗体の取得率を上げることを目指した。本方法により得られた培養上清を、検討用アレイにて染色して評価を行った。上清は原液を染色に使用した。

## C. 研究成果

### 1. 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。しかしながらこの方法で作製したモノクローナル抗体の多くは組織アレイをうまく染色できなかった。そこで本年度は上記の方法で固定化した分子を認識するモノクローナル抗体を作製した。各抗原 (C1orf56、F11R、FSTL1、GPNMB、GPR56、MPZL1、PROCR、TMED2、EPHA2) を細胞表面に発現する SST クローンを 10%ホルマリンで固定した細胞を免疫源として利用しモノクローナル抗体を作製した。

また、EPHA2 については上記に加えて、欠失変異体を利用してより多様性のある抗原エピトープを認識する抗体を取得することを期待した。得られたハイブリドーマ培養上清をスクリーニングした結果、全ての遺伝子に対する抗体の作製に成功し、合計で 25 クローンのモノクローナル抗体を得た。

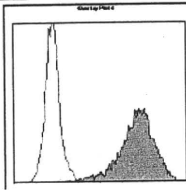
### 2. 樹立したモノクローナル抗体の組織染色用抗体選抜 (北村)

得られた 25 クローンのモノクローナル抗体の内、同一抗原で複数の抗体が取得されているものもあったが、固定化細胞をより効率良く染める抗体を選別した。

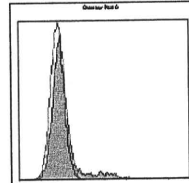
以下に示すように、得られた抗体から 10%ホルマリン固定処理免疫原細胞に反応し、10%ホルマリン固定陰性コントロール細胞には反応しない、7 因子 8 クローンを選抜した。

抗 C1orf56 抗体

固定化免疫原細胞

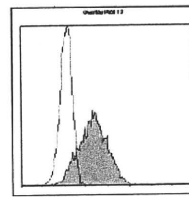


固定化陰性細胞

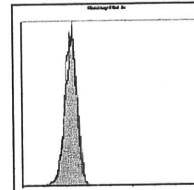


抗 IGFBP1 抗体

固定化免疫原細胞

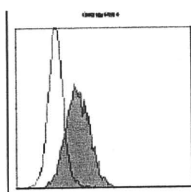


固定化陰性細胞

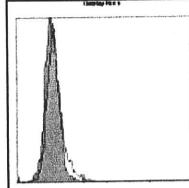


抗 FSTL1 抗体

固定化免疫原細胞

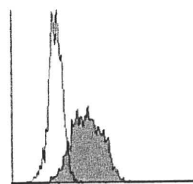


固定化陰性細胞

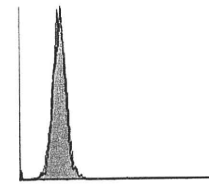


抗 EPHA2 抗体 (クローン 6B10)

固定化免疫原細胞

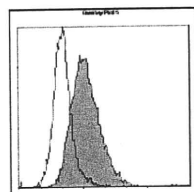


固定化陰性細胞

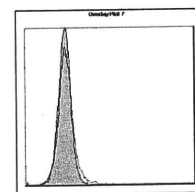


抗 GPNMB 抗体

固定化免疫原細胞

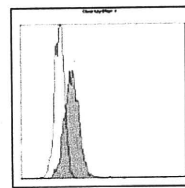


固定化陰性細胞

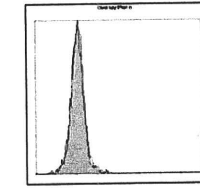


抗 EPHA2 抗体 (クローン 1C8E6-3)

固定化免疫原細胞

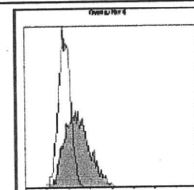


固定化陰性細胞

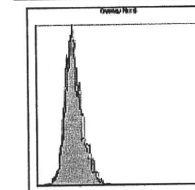


抗 MPZL1 抗体

固定化免疫原細胞

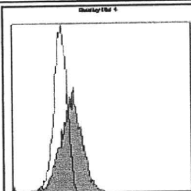


固定化陰性細胞

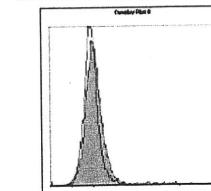


抗 GPR56 抗体

固定化免疫原細胞



固定化陰性細胞



これらの抗体を用いて、まず SST クローンのペレットを、固定しパラフィン包埋したアレイでの染色試験を行った。その結果、各種抗原を発現するすべてのクローンが染色性を示した。

### 3. 組織アレイでの染色

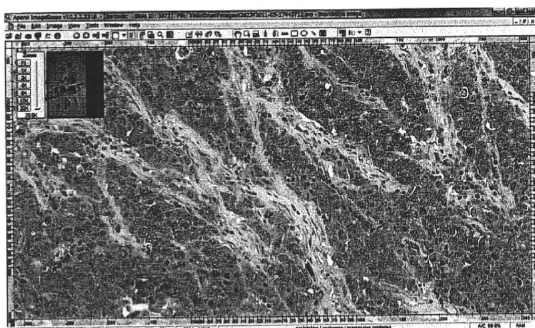
通常の方法で取得したモノクローナル抗体は組織アレイでほとんど使用できなかったが、ホルマリン固定した細胞を免疫源とすることで取得した 8 種の抗体のうち C1orf56 と FSTL1 を認識する抗体において、特異的染色結果を観察することが出来た。



#### < Clorf56 の染色結果 >

染色性は、上皮細胞特になん細胞の細胞質に観察された。

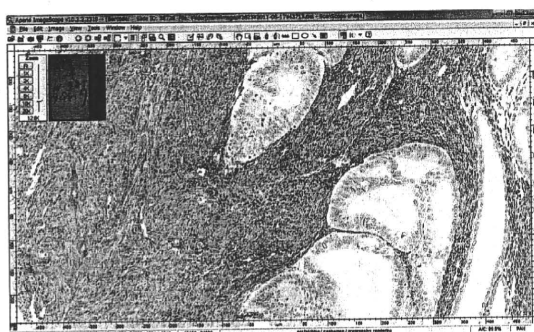
#### Clorf56 の免疫染色



#### < FSZZTL1 の染色結果 >

FSZZTL1 においては、腫瘍性間質の紡錐形細胞において、diffuse な染色性が確認された。非腫瘍性の間質においては、陽性細胞はほとんど観察されなかった。

#### FSZZTL1 の免疫染色



脳腫瘍（グリオーマ）を標的にして作製された抗体 ACT00140-0044 (clone 4H12G5)にて、染色条件の検討を行ったが、明瞭な特異的陽性像は認められなかった。

#### D. 考察

SST-REX 法における膜蛋白質・分泌蛋白質の同定および、モノクローナル抗体の開発との連動は、高い効果を有する事が明らかになっている。

本年度は、固定化した SST クローンを免疫源として使用することによって、組織染色に適したモノクローナル抗体を取得する確率が高まることが示唆された。組織アレイを作製するのと同様に 10%ホルマリン固定処理を行った細胞を免疫源として使用し抗体を作製することにより、組織アレイを効率良く染色しうる抗体を取得できたと考えている。しかしながら、目的の 8 種の分子に対する抗体のうち 2 種のみ取得できたが、他の 6 種類については未だ取得できていない。さらに取得する抗体数を増やして、高集積がん組織アレイを染色しうる抗体を作製することが急務である。

EPHA2 に関しては、作製した欠失変異株を免疫源とすることによって、抗体に多様性を持たせ、組織アレイを染色しうるモノクローナル抗体の取得を目指した。しかしながらがん組織アレイで使用可能な抗体は取得できなかった。しかしながら、一つの因子についての検討であり、いくつかの因子で試す価値はある。ただし長い部分長の抗原の方が候補となるクローンは多く選抜できる傾向は見受けられたため、通常は全長のクローンを免疫源として、抗体を取得することで良いと考えられる。

本年は、2 クロンの培養上清において癌に染色性を有するものを得ることが出来た。今後、精製抗体において染色性を検討し、高集積組織アレイへの応用を行って抗原の病的意義、機能を検討する。また各分



子の各種がん細胞における発現プロファイルを調べる予定である。FSZTL1 については、腫瘍性間質における染色性が強く観察された。このことは、腫瘍の EMT (epithelial mesenchymal transition) との関連性を示唆するものと考えた。更なる検証が必要である。

## E. 結論

SST-REX 法によって SST クローンを樹立し、これらの SST クローンをホルマリン固定化してマウスに免疫することにより、効率良くパラフィン包埋組織への染色に応用可能なモノクローナル抗体を作製することができた。脳腫瘍の組織アレイ、各種癌のパイロットアレイを作製し、臨床情報を収集した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Farris, A.B. III, Demicco, E.G., Le, L.P., Finberg, K.E., Miller, J., Mandal, R., Fukuoka, J., Cohen, C., Gaissert, H.A., Zukerberg, L.R., Lauwers, G.Y., Iafrate, A.J., and Knudson, M.M. (2011) Clinicopathologic and Molecular Profiles of Microsatellite Unstable Barrett Esophagus-associated. **Am J Surg Pathol**, in press
2. Demicco, E.G., Farris, A.B., Baba, Y., Etang, B.A., Bergethno1, K., Mandal, D., Daives, D., Fukuoka, J., Shimizu, M., Santagata, D.D., Ogino, S., Iafrate, A.J., Gaissert, H.A., and Knudson, M.M. (2011) The dichotomy in carcinogenesis of the distal esophagus and esophagogastric junction: Intestinal type vs. cardiac-Type mucosa associated adenocarcinoma. **Modern Pathol.**, in press.
3. 岡澤成祐, 河岸由紀男, 猪又峰彦, 山田 徹, 三輪敏郎, 林 龍二, 松井祥子, 菓子井達彦, 土岐善紀, 長田啓史, 福岡順也, 戸邊一之 (2011) 肺過誤腫を合併した若年発症肺癌の 1 例 **日呼吸会誌** 印刷中
4. Kubo, A., Koh, Y., Kawaguchi, T., Isa, S., Okamoto, I., Fukuoka, J., Kusunoki, Y., Kitaichi, M., Takada, M., and Nakagawa, K. (2011) Malignant pleural effusion from lung adenocarcinoma treated by gefitinib **Internal Medicine**, in press.
5. Kato, N., Kitaura, J., Doki, N., Komeno, Y., Watanabe-Okochi N., Togami, K., Nakahara, F., Oki, T., Enomoto, Y., Fukuchi, Y., Nakajima, H., Harada, Y., Harada, H., and Kitamura, T. (2011) Two types of C/EBPa mutations play distinct roles in leukemogenesis: Lessons from clinical data and BMT models. **Blood** 117:221-233.
6. Yoshimi, Y., Goyama, S., Watanabe-Okochi, N., Yoshiki, Y., Nannya, Y., Nitta, E., Arai, S., Sato, T., Shimabe, M., Nakagawa, M., Imai, Y., Kitamura, T. and Kurokawa, M. (2011) Evil represses PTEN expression by interacting with polycomb complexes and

- activates PI3K/AKT/mTOR signaling. **Blood**, 117:3617-3628.
7. Lordier, L., Chang, Y., Jalil, A., Aurade, F., Garçon, L., Lécluse, Y., Larbret, F., Kawashima, T., Kitamura, T., Larghero, J., Debili, N. and Vainchenker, W. (2010) Aurora B is dispensable for megakaryocyte polyploidization, but contributes to the endomitotic process. **Blood**, 116:3245-3255.
  8. Nakajima, H., Ito, M., Smookler, D.S., Shibata, F., Fukuchi, Y., Morikawa, Y., Ikeda, Y., Arai, F., Suda, T., Khokha, R. and Kitamura, T. (2010) TIMP-3 recruits quiescent hematopoietic stem cells into active cell cycle and expands multipotent progenitor pool. **Blood** 116:4474-4482.
  9. Enomoto, Y., Yamanishi, Y., Izawa, K., Kaitani, A., Takahashi, M., Maehara, A., Oki, T., Kajikawa, M., Takai, T., Kitamura, T., and Kitaura, J. (2010) Characterization of leukocyte mono-Ig receptor 7 (LMIR7)/CLM3 as an activating receptor: Its similarities to and differences from LMIR4/CLM5. **J. Biol. Chem.** 285: 35274-35283.
  10. Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., Kaitani, A., Komeno, Y., Nakamura, M., Yamazaki, S., Enomoto, Y., Oki, T., Akiba, H., Komori, T., Morikawa, Y., Kiyonari, H., Takai, T., Okumura, K., and Kitamura, T. (2010) TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b and LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury. **J. Exp. Med.** 207:1501-1511.
  11. Minobe, K., Ono, R., Matsumine, A., Shibata-Minoshima, F., Izawa, K., Oki, T., Kitaura, J., Iino, T., Iwamoto, S., Hori, H., Komada, Y., Uchida, A., Hayashi, Y., Kitamura, T. and Nosaka, T. (2010) Expression of ADAMTS4 in Ewing's sarcoma. (2010) **Int. J. of Oncol.** 37:569-581.
  12. Ikeya, M., Fukushima, K., Kawada, M., Onishi, S., Furuta, Y., Yonehara, S., Kitamura, T., Nosaka, T., and Sasai, Y. (2010) Cv2, functioning as a pro-BMP factor via twisted gastrulation, is required for early development of nephron precursors. **Dev. Biol.** 337:405-414.
  13. Nakahara, F., Sakata-Yanagimoto, M., Komeno, Y., Kato, N., Uchida, T., Haraguchi, K., Kumano, K., Harada, Y., Harada, H., Kitaura, J., Ogawa, S., Kurokawa, M., \*Kitamura, T., and \*Chiba, S. (2010) Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. **Blood** 115: 2872-2881.
  14. Komeno, Y., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Kato, N., Oki, T., Nakahara, F., Harada, Y., Harada, H., Shinkura, R., Nagaoka, H., Hayashi, Y., Honjo, T., and Kitamura, T. (2010) AID-induced T-lymphoma or B-leukemia/lymphoma in a mouse BMT model. **Leukemia** 24:1018-1024.
  15. 中村さやか, 河岸由紀男, 加藤慎平, 辻博, 高川清, 福岡順也. (2011) 無治療で長期生存した Lambert-Eaton 症候群合併肺小細胞癌の 1 例 日呼吸会

## 2. 学会発表

1. Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., and Kitamura, T. 「TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b: LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury」第14回国際免疫学会議 ワークショップ 2010年8月神戸
2. Enomoto, Y., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Izawa, K., Takai, Y., and Kitamura, T. 「Comparative analysis of leukocyte mono-Ig-like receptor 7 (LMIR7)/CLM-3 with LMIR4/CLM-5 as an activating receptor: lessons from association with FcRg.」第14回国際免疫学会議 ワークショップ 2010年8月神戸
3. Kitamura, T., Nakahara, F., Kato, N., Watanabe-Okochi, N., Komeno, Y., Doki, N., Togami, K., Uchida, T., Kagiya, Y., Inoue, D., Enomoto, Y., Oki, T., Harada, H., and Kitaura, J. Molecular Basis for AML, MDS and MPN 第39回国際実験血液学会招待講演 2010年9月16日メルボルン
4. 榎本豊 「Comparative analysis of leukocyte mono-Ig-like receptor 7 (LMIR7)/CLM-3 with mouseLMIR4/CLM-5 as an activating receptor: lessons from association with FcRg 」 2nd Symposium of the IMSUT & RCAST Global COE 2010年3月2日東京
5. 沖俊彦、北村俊雄 「Screening of surface antigens on iPS cells with SST-REX」第8回幹細胞シンポジウムポスター 2010年5月10日 淡路夢舞台国際会議場
6. 中原史雄、坂田(柳元)麻実子、北浦次郎、加藤菜穂子、黒川峰夫、千葉 滋、北村俊雄 「Hes1による造血前駆細胞の不死化と、慢性骨髄性白血病の急性転化誘導」第6回麒麟塾 口演 2010年6月5日 東京
7. 榎本豊、北浦次郎、園木孝志、中熊秀喜、北村俊雄 「A functional analysis of microRNA aberrantly expressed in leukemic cells」第16回日本遺伝子治療学会学術集会 ポスター 2010年7月栃木
8. 榎本豊、北浦次郎、西村耕太郎、北村俊雄 「Development of new pMXs-based retrovirus vectors expressing shRNA」第16回日本遺伝子治療学会学術集会 ポスター 2010年7月 栃木
9. 榎本豊、島貫栄弥、畠山金太、谷脇雅史、麻生範雄、中熊秀喜、北村俊雄、園木孝志 「MiR125 induces hematological malignancies in vivo」第72回日本血液学会学術集会 プレナリー 2010年9月 横浜
10. 中村真樹、北村俊雄 「TSC-22の発現は Ras/MAPK の活性化により上昇する」第69回日本癌学会学術総会 ポスター 2010年9月22日~24日 大阪
11. 福岡順也. 「Inter-observer Agreement -

Lung Cancer and IIPs -」大阪呼吸器談  
話会 2010, 7, 大阪

12. 福岡順也. 「Inter-observer agreement  
-Lung Cancer と IIPs-」 Shiga Chest  
Disease Conference, 2010, 7, 滋賀.
13. 福岡順也. 「NSCLC の治療を考慮した  
病理診断の標準化について」 NSCLC  
Treatment Forum, 2010, 9, 福岡
14. 福岡順也. 「肺がん治療における病理組  
織診断の重要性と標準化について。」第  
69 回日本癌学会学術総会ランチョンセ  
ミナー, 2010, 9, 大阪
15. 福岡順也. 「肺がんの組織分類と一致率  
および治療への影響」臨床細胞学会広  
島県支部会 2010, 11, 広島

#### 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(第3次対がん総合戦略研究事業)

平成22年度 分担研究報告書

レトロウィルス技術と高集積がん組織アレイを利用した癌抗原同定とがんの  
早期診断治療への応用

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。

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ーンのcDNAのうち、各がん由来分子に対するモノクローナル抗体を51種類作製し、これらの抗体の解析を行った。昨年までの解析結果から、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腫瘍細胞を認識し、腫瘍増殖を抑制するモノクローナル抗体を作製できることが確認された。一方、がん組織に特異的に発現を認める蛋白質、あるいはがん診断に適した抗体を探索する目的で、分担研究者である富山大学の福岡が作製した、高集積がん組織アレイによる、正常組織、がん組織における発現プロファイリングを行うための予備的実験を行い、固定化した細胞を免疫源としてモノクローナル抗体を作成すれば、組織アレイに使用可能なモノクローナル抗体を効率良く取得できることを明らかにした。

### A. 研究目的

本研究の目的は、がん疾患を対象とした抗体を用いた治療応用、診断応用を目指している。多くの場合、治療、診断のターゲット因子は、疾患部位への特異発現が認められる事が必要であり、診断の確度や副作

用の予測など、全身の組織における発現プロファイリングは重要な情報を提供する。

本年度、病理組織染色に使用できる抗体を作製し、正常組織、患者がん組織での発現プロファイルを作製する事を目的とする。

## B. 研究方法

本研究では、各種がん細胞株を材料として SST-REX 法にて膜蛋白質・分泌蛋白質を解析し、その中からターゲットを絞り込んで SST クローン免疫法でモノクローナル抗体を作製する。て SST-REX 法にて膜蛋白質・分泌蛋白質を解析し、その中からターゲットを絞り込んで SST クローン免疫法でモノクローナル抗体を作製する。

本年度、モノクローナル抗体のアプリケーションとして求められる仕様は、病理組織切片での免疫染色を可能とするものである。そこで、下記のターゲットについて、SST クローン免疫法の改変し、組織染色用抗体作製を行った。

- ・抗 C1orf56 抗体
- ・抗 F11R 抗体
- ・抗 FSTL1 抗体
- ・抗 GPNMB 抗体
- ・抗 GPR56 抗体
- ・抗 MPZL1 抗体
- ・抗 PROCR 抗体
- ・抗 TMED2 抗体

まず、各抗原蛋白質を発現している SST クローンを 10%ホルマリンで固定した。固定操作により、抗原蛋白質を変性させ、変性蛋白質に対しての免疫応答を期待したためである。

免疫感作したマウスからリンパ節を摘出し、リンパ球とミエローマ細胞を融合して、選択培地中で選択培養した。10%ホルマリン固定した細胞を用いて反応性を確認した。10%ホルマリン固定した細胞を用いる事で、変性蛋白質に対して反応を示す抗体(=病理切片染色に適した抗体)をスクリーニングできる事を期待した。

また、抗 EPHA2 抗体については、上記のような固定化免疫法による試みに合わせて免疫原とする発現蛋白質をドメイン毎に分けて作製する方法も並行させた。この試みの狙いは、病理組織特有の抗原固定による変性(=構造変化)に対して、あらかじめ免疫原の **deletion mutant** を作製する事で高次構造の変化した蛋白質を作り、その結果変性抗原に対しての反応性にポジティブな影響を及ぼす事を期待した。抗原ドメインの作製は、1-700bp、1-1500bp、1-1757bp の 3 ドメインを構築した。病理染色のアプリケーションに対応させるため、前述の 8 抗体と同様、10%ホルマリン固定による蛋白質変性処理を行って免疫し、抗体を作製した。

得られた抗体をマルチティシューアレイによる解析を行うため、パラフィン切片での組織染色条件検討を経て、マルチティシューアレイにて発現プロファイル解析を行った。

## C. 研究成果

### 1. 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、各抗原(C1orf56、F11R、FSTL1、GPNMB、GPR56、MPZL1、PROCR、TMED2、EPHA2)を細胞表面に発現する SST クローンを 10%ホルマリンで固定した細胞を免疫源として利用しモノクローナル抗体を作製した。

また、EPHA2 については上記に加えて、

欠変異体による高次構造変化の影響を期待した工夫も凝らした。得られたハイブリドーマ培養上清をスクリーニングした結果、全ての遺伝子に対する抗体の作製に成功し、合計で 25 クローンのモノクローナル抗体を得た。

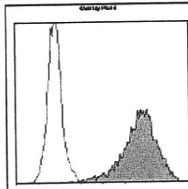
## 2. 樹立したモノクローナル抗体の組織染色用抗体選抜

得られた 25 クローンのモノクローナル抗体の内、同一抗原で複数の抗体が取得されているものもあった。さらに、富山大学福岡らのもつマルチ組織アレイは、貴重なサンプルであり、抗体を厳選して組織染色試験を行う事とした。

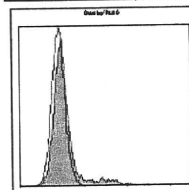
以下に示すように、得られた抗体から 10%ホルマリン固定処理免疫原細胞に反応し、10%ホルマリン固定陰性コントロール細胞には反応しない、7 因子 8 クローンを選抜した。

### 抗 C1orf56 抗体

固定化免疫原細胞

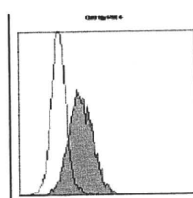


固定化陰性細胞

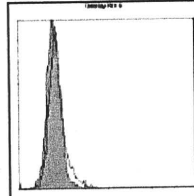


### 抗 FSTL1 抗体

固定化免疫原細胞

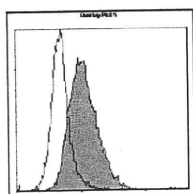


固定化陰性細胞

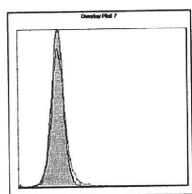


### 抗 GPNMB 抗体

固定化免疫原細胞

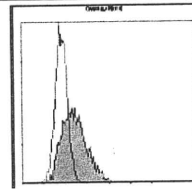


固定化陰性細胞

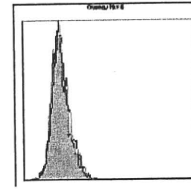


### 抗 MPZL1 抗体

固定化免疫原細胞

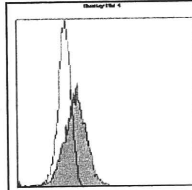


固定化陰性細胞

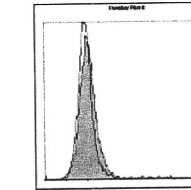


### 抗 GPR56 抗体

固定化免疫原細胞

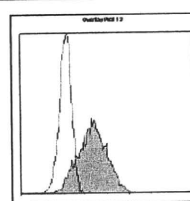


固定化陰性細胞

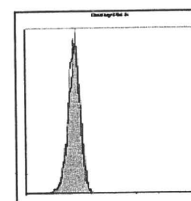


### 抗 IGFBP1 抗体

固定化免疫原細胞

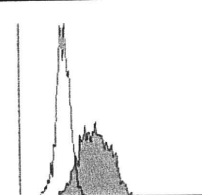


固定化陰性細胞

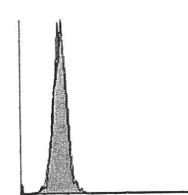


### 抗 EPHA2 抗体 (クローン 6B10)

固定化免疫原細胞

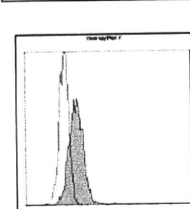


固定化陰性細胞

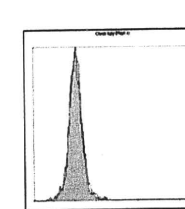


### 抗 EPHA2 抗体 (クローン 1C8E6-3)

固定化免疫原細胞



固定化陰性細胞



これらの抗体を用いて、組織アレイでの染



色試験を行った。

### 3. 組織アレイでの染色

通常の方法で取得したモノクローナル抗体は組織アレイでほとんど使用できなかったが、ホルマリン固定した細胞を免疫源とすることで取得した8種の抗体のうち Clorf56 と FSZTL1 を認識する抗体において、特異的染色結果を観察することが出来た（詳細は分担研究者の福岡の報告参照のこと）。

### D. 考察

SST-REX 法における膜蛋白質・分泌蛋白質の同定および、モノクローナル抗体の開発との連動は、高い効果を有する事が明らかになっている。

本年度は、固定化した SST クローンを免疫源として使用することによって、組織染色に適したモノクローナル抗体を取得する確率が高まることが示唆された。組織アレイを作製するのと同様に 10%ホルマリン固定処理を行った細胞を免疫源として使用し抗体を作製することにより、組織アレイを効率良く染色しうる抗体を取得できたと考えている。しかしながら、目的の8種の分子に対する抗体のうち2種のみ取得でしたが、他の6種類については未だ取得できていない。さらに取得する抗体数を増やして、高集積がん組織アレイを染色しうる抗体を作製することが必要である。

EPHA2 に関しては、作製した欠失変異株を免疫源とすることによって、抗体に多様性を持たせ、組織アレイを染色しうるモノクローナル抗体の取得を目指した。しかしながらがん組織アレイで使用可能な抗体

は取得できなかった。しかしながら、一つの因子についての検討であり、いくつかの因子で試す価値はある。ただし長い部分長の抗原の方が候補となるクローンは多く選抜できる傾向は見受けられたため、通常は全長のクローンを免疫源として、抗体を取得することで良いと考えられる。

### E. 結論

本年度は新規に病理組織染色に使用できる抗体の開発を行い、一定の成果を上げる事ができた。SST クローン免疫による抗体作製は、目的とするアプリケーションに対応した工夫をする事で、より効率的で汎用性の高い技術であると考えられる。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Yoshimi, Y., Goyama, S., Watanabe-Okochi, N., Yoshiki, Y., Nannya, Y., Nitta, E., Arai, S., Sato, T., Shimabe, M., Nakagawa, M., Imai, Y., Kitamura, T. and Kurokawa, M. (2011) Ev11 represses PTEN expression by interacting with polycomb complexes and activates PI3K/AKT/mTOR signaling. **Blood** 117:3617-3628..
2. Kato, N., Kitaura, J., Doki, N., Komeno, Y., Watanabe-Okochi N., Togami, K., Nakahara, F., Oki, T., Enomoto, Y., Fukuchi, Y., Nakajima, H., Harada, Y., Harada, H., and Kitamura, T. (2011) Two types of C/EBPα mutations play distinct roles in leukemogenesis: Lessons from

- clinical data and BMT models. **Blood** 117:221-233.
3. Lordier, L., Chang, Y., Jalil, A., Aurade, F., Garçon, L., Lécuse, Y., Larbret, F., Kawashima, T., Kitamura, T., Larghero, J., Debili, N. and Vainchenker, W. (2011) Aurora B is dispensable for megakaryocyte polyploidization, but contributes to the endomitotic process. **Blood** 116:3245-3255.
  4. Nakajima, H., Ito, M., Smookler, D.S., Shibata, F., Fukuchi, Y., Morikawa, Y., Ikeda, Y., Arai, F., Suda, T., Khokha, R. and Kitamura, T. (2010) TIMP-3 recruits quiescent hematopoietic stem cells into active cell cycle and expands multipotent progenitor pool. **Blood** 116:4474-4482.
  5. Enomoto, Y., Yamanishi, Y., Izawa, K., Kaitani, A., Takahashi, M., Maehara, A., Oki, T., Kajikawa, M., Takai, T., Kitamura, T., and Kitaura, J. (2010) Characterization of leukocyte mono-Ig receptor 7 (LMIR7)/CLM3 as an activating receptor: Its similarities to and differences from LMIR4/CLM5. **J. Biol. Chem.** 285: 35274-35283.
  6. Minobe, K., Ono, R., Matsumine, A., Shibata-Minoshima, F., Izawa, K., Oki, T., Kitaura, J., Iino, T., Iwamoto, S., Hori, H., Komada, Y., Uchida, A., Hayashi, Y., Kitamura, T. and Nosaka, T. (2010) Expression of ADAMTS4 in Ewing's sarcoma. (2010) **Int. J. of Oncol.** 37:569-581.
  7. Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., Kaitani, A., Komeno, Y., Nakamura, M., Yamazaki, S., Enomoto, Y., Oki, T., Akiba, H., Komori, T., Morikawa, Y., Kiyonari, H., Takai, T., Okumura, K., and Kitamura, T. (2010) TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b and LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury. **J. Exp. Med.** 207:1501-1511.
  8. Ikeya, M., Fukushima, K., Kawada, M., Onishi, S., Furuta, Y., Yonehara, S., Kitamura, T., Nosaka, T., and Sasai, Y. (2010) Cv2, functioning as a pro-BMP factor via twisted gastrulation, is required for early development of nephron precursors. **Dev. Biol.** 337:405-414.
  9. Nakahara, F., Sakata-Yanagimoto, M., Komeno, Y., Kato, N., Uchida, T., Haraguchi, K., Kumano, K., Harada, Y., Harada, H., Kitaura, J., Ogawa, S., Kurokawa, M., \*Kitamura, T., and \*Chiba, S. (2010) Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. **Blood** 115: 2872-2881.
  10. Komeno, Y., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Kato, N., Oki, T., Nakahara, F., Harada, Y., Harada, H., Shinkura, R., Nagaoka, H., Hayashi, Y., Honjo, T., and Kitamura, T. (2010) AID-induced T-lymphoma or B-leukemia/lymphoma in a mouse BMT model. **Leukemia** 24:1018-1024.

## 2. 学会発表

1. Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K.,

- and Kitamura, T. 「TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b: LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury」第14回国際免疫学会議 ワークショップ 2010年8月神戸
2. Enomoto, Y., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Izawa, K., Takai, Y., and Kitamura, T. 「Comparative analysis of leukocyte mono-Ig-like receptor 7 (LMIR7)/CLM-3 with LMIR4/CLM-5 as an activating receptor: lessons from association with FcRg.」第14回国際免疫学会議 ワークショップ 2010年8月神戸
  3. Kitamura, T., Nakahara, F., Kato, N., Watanabe-Okochi, N., Komeno, Y., Doki, N., Togami, K., Uchida, T., Kagiya, Y., Inoue, D., Enomoto, Y., Oki, T., Harada, H., and Kitaura, J. Molecular Basis for AML, MDS and MPN 第39回国際実験血液学会招待講演 2010年9月16日メルボルン
  4. 榎本豊 「Comparative analysis of leukocyte mono-Ig-like receptor 7 (LMIR7)/CLM-3 with mouseLMIR4/CLM-5 as an activating receptor: lessons from association with FcRg 」 2<sup>nd</sup> Symposium of the IMSUT & RCAST Global COE 2010年3月2日東京
  5. 沖俊彦、北村俊雄 「Screening of surface antigens on iPS cells with SST-REX」第8回幹細胞シンポジウム  
ポスター 2010年5月10日 淡路夢舞台国際会議場
  6. 中原史雄、坂田(柳元)麻実子、北浦次郎、加藤菜穂子、黒川峰夫、千葉 滋、北村俊雄 「Hes1による造血前駆細胞の不死化と、慢性骨髄性白血病の急性転化誘導」第6回麒麟塾 口演 2010年6月5日 東京
  7. 榎本豊、北浦次郎、園木孝志、中熊秀喜、北村俊雄 「A functional analysis of microRNA aberrantly expressed in leukemic cells」第16回日本遺伝子治療学会学術集会 ポスター 2010年7月栃木
  8. 榎本豊、北浦次郎、西村耕太郎、北村俊雄 「Development of new pMXs-based retrovirus vectors expressing shRNA」第16回日本遺伝子治療学会学術集会 ポスター 2010年7月 栃木
  9. 榎本豊、島貫栄弥、畠山金太、谷脇雅史、麻生範雄、中熊秀喜、北村俊雄、園木孝志 「MiR125 induces hematological malignancies in vivo」第72回日本血液学会学術集会 プレナリー 2010年9月 横浜
  10. 中村真樹、北村俊雄 「TSC-22の発現は Ras/MAPK の活性化により上昇する」第69回日本癌学会学術総会 ポスター 2010年9月22日～24日 大阪
- G. 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（第3次対がん総合戦略研究事業）

平成22年度 分担研究報告書

多種がんの高集積アレイを用いた分子標的抗体薬候補の特異性検討、および全身がんにおける横断的分布の観察と機能の評価に関する研究

研究分担者 富山大学附属病院外科病理学講座  
客員教授 福岡順也

## 研究要旨

がんの治療は大きく分子標的薬へとシフトしており、新薬の開発は、がん細胞で活性化しているシグナル伝達系を抑制、もしくは正常化する小分子か、抗体薬へと絞られてきている。分子の検討を行う為には、標的とする分子がどの程度、治療対象としている疾患に発現しており、その局在がどこに存在するかを観察することは極めて重要である。また、標的分子の発現が対象疾患でどのような生物学的機能を有しているかの検討も治療デザインの観点から極めて重要である。しかし、このような網羅的解析を組織上にて行う事の出来るツールである組織アレイは、ホルマリン固定後のパラフィン包埋ブロックを用いて作製されるため、作製抗体が、うまく特異的な染色性を示すことの出来る頻度は低い。今回、ホルマリン固定された標的分子を発現する細胞株上のエピトープを認識する複数のクローンを作製し、これらが組織アレイ上で染色されるかどうかにつき検討した。今回試されたハイブリドーマ培養上清抗体は7種(8クローン)。染色条件検討用組織アレイを作製し、これらの8クローンに対して4種類の染色プロトコルを施行し、特異性と感受性の高い染色条件を有するクローンを選定、精製抗体作製過程を効率化した。その結果、抗 Clorf56 抗体 (ACT230-0015 2A1)では、腫瘍細胞を認識する特異性の高い染色性が、FSZTL1 (ACT141-385:9C8H7)では、腫瘍性間質を認識する特異性の高い染色性が確認された。

### A. 研究目的

がんの治療は大きく分子標的薬へとシフトしており、新薬の開発は、がん細胞で活性化しているシグナル伝達系を抑制、もしくは正常化する小分子か、抗体薬へと絞られてきている。分子の検討を行う為には、標的とする分子がどの程度、治療対象としている疾患に発現しており、その局在がどこに存在するかを観察することは極めて重

要である。また、標的分子の発現が対象疾患でどのような生物学的機能を有しているかの検討も治療デザインの観点から極めて重要である。しかし、このような網羅的解析を組織上にて行う事の出来るツールである組織アレイは、ホルマリン固定後のパラフィン包埋ブロックを用いて作製されるため、作製抗体が、うまく特異的な染色性を示すことの出来る頻度は低い。また、今ま

での分子標的薬の治療成績を見てみると、治療効果は明瞭なバイオマーカーの発現によって規定されており、同時に投薬の指標となる組織上の染色性検討を行い、診断薬と治療薬を同時に開発することが重要であることは明瞭である。患者群の選定を検討することが必須である。今回、ホルマリン固定された標的分子を発現する細胞株上のエピトープを認識する複数のクローンを作製し、これらが組織アレイ上で染色されるかどうかにつき検討した。また、次年度にむけて、脳腫瘍組織アレイの作製と、臨床情報の取得を行った。

## B：研究方法

＜高集積組織アレイ作製およびクリニカルデータの収集＞

1) 昨年度収集された脳腫瘍 95 例、食道癌、子宮頸部癌、皮膚癌、頭頸部癌などの扁平上皮癌症例のブロックより作製された高集積組織アレイについて、臨床データの収集を行った。脳腫瘍では、年齢、性別、組織型、MIB-1 index、overall survival (OS)、progression free survival (PFS)、治療方針、治療効果についての情報を収集した。

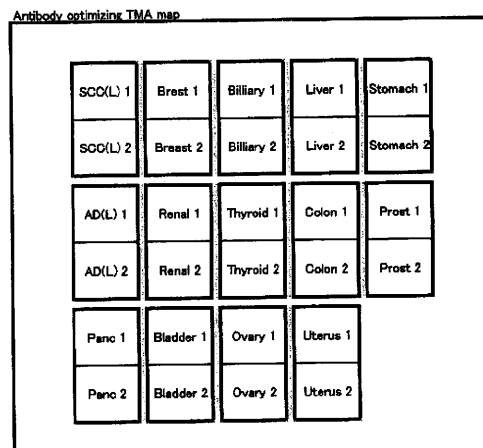
Table1 脳腫瘍高集積アレイにおける症例の分布：

年齢	1~79 歳	中央値 50 歳
性別	男性 58	女性 37
組織型	グリオーマ	81 例 (total 95 例)
	Grade I	11 例
	≥Grade II	70 例
	ependymoma	5 例
	Meningioma 他	9 例

2) 抗体の染色条件を決定するため、28 症例の腫瘍組織を有する検討用アレイの症例を選定し、アレイブロックを作製した。含まれた腫瘍は、1999 年から 2006 年までの富山大学における病理アーカイブにおける肺扁平上皮癌、乳癌、胆管癌、肝臓癌、胃癌、肺腺癌、腎癌、甲状腺癌、大腸癌、前立腺癌、膵癌、膀胱癌、卵巣癌および子宮体部癌である (図 1)。

4 μ 薄切切片を用いて染色条件検討に使用した。

図 1：条件検討用アレイデザイン



＜ハイブリドーマ培養上清抗体による免疫染色の条件検討＞

SST-REX法で得られるクローンをホルマリン固定化してから利用することで、よりホルマリン固定パラフィンブロックにおける染色頻度を上げる工夫がおこなわれた。それにより得られた培養上清を、検討用アレイにて染色して評価を行った。染色条件検討用プロトコルとしては、table 2 のとおり。上清より濃度は原液とした。

Table 2: 染色条件検討用プロトコル