

20118008A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北村俊雄

平成24（2012）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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北村俊雄

平成24（2012）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	
	北村俊雄……………1
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	
	北村俊雄……………12
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	
	福岡順也……………19
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	……………26
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	……………27

# 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23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に関する研究

研究代表者 東京大学医科学研究所 細胞療法分野  
教授 北村俊雄

## 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。

今年度は、4種のモノクローナル抗体（抗FSTL1抗体、抗C1orf56抗体、抗2B9抗体、抗2F3J抗体）を解析し、*in vitro*においてさまざまながん細胞増殖抑制効果を示すことを見いだした。これらの抗体のうち抗2B9抗体は*in vivo*で担がんマウスにおけるがん細胞の増殖も有意に抑制した。FSTL1およびC1orf56について固定化細胞を免疫源として再度樹立したモノクローナル抗体は研究分担者が作製した高集積がんマイクロアレイで各種がん組織での発現を解析した。

また本年度は各種がん細胞から作成した発現型ライブラリーから機能性発現クローニング法によってオンコジーンとしてホメオボックス分子RHOXF2を同定した。高集積がんマイクロアレイを利用して調べたところRHOXF2は多くのがん組織で発現が高いことが判明した。RHOXF2を過剰発現している胃がん細胞でRHOXF2をノックダウンすると増殖が抑制された。また肺扁平上皮がん、肺腺がん、大腸がんでは高分化型において、RHOXF2の発現が高い場合に予後が有意に悪いことも判明した。

## 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、*in vitro*での培養細胞系での機能試験、あるいは担がんモデル

マウス等を用いた*in vivo*試験により、治療効果を評価することが必要である。

本年度は、開発したモノクローナル抗体の薬効機能を評価した。また、昨年度までの結果で、取得したモノクローナル抗体が

固定標本である高集積がん組織アレイでは使用できないことが多く、昨年度は免疫法に工夫をしてモノクローナル抗体を再度作製したが、今年度はこれらの抗体の高集積がん組織アレイでの解析も併せて行なった。

## B. 研究方法

### <モノクローナル抗体の *in vitro* 細胞増殖抑制活性の検定>

取得したモノクローナル抗体の各種がん細胞株に対する増殖抑制公開を評価するため、培養系に抗体を添加しがん細胞株の増殖に対する影響を WST 法で調べた。がん細胞株は、各がん種について下記の細胞株を選択した。

脳腫瘍細胞：U251、U87MG、T98G

すい臓がん細胞：BxPC3、AsPC1

胃がん細胞：MKN1

スキルス胃がん細胞：GCIY

前立腺がん細胞：PC3、Du145

膀胱がん細胞：T24

各細胞株を 3000 個/well になるように、96well マイクロプレートに播種後、1 晩培養し細胞の接着を確認した。培養液に抗体の培養上清を添加し、抗体添加後 3 日間培養した後、培養液をアスピレーターで除去し、WST-1 試薬入りの培地に培地交換した。5% CO<sub>2</sub>/37°C インキュベーターで 4 時間培養し、吸光度 A<sub>450nm</sub> を測定した。3 日間培地のみで培養したウェルを陰性コントロールとして使用し、吸光度を 100% として抗体添加ウェルならびに陽性コントロール添加ウェルの吸光度の割合を計算した。

### <モノクローナル抗体の *in vivo* 細胞増殖抑制活性の検定>

上記試験で活性を認めたモノクローナル抗体について、担がんモデルマウスによる動物試験を行なった。SCID マウスを購入後 1 週間、環境馴化のため飼育した。その後各細胞株をマウス頸背部皮下に接種し、約 5mm 角の腫瘍形成を認めるまで 3~4 週間飼育した。5mm 角の腫瘍を確認し、ネガティブコントロール、ポジティブコントロール、抗体治療群の各群の均等性を保つため、群分けを行なった。

ネガティブコントロールとして生理食塩水、ポジティブコントロールとして抗がん剤（タキソテール）を使用し、抗体を 10mg/kg の投与量で 1 週間に 1 回ずつ 3 週間（合計 3 回）投与し、治療した。

投与開始を 0 週として計算し、ノギスでの短径、長径測定による体積変化を測定し、最終治療の 1 週間後に剖検した。

### <再度作製した抗体の高集積がん組織アレイでの検定>

本プロジェクトによって作製したモノクローナル抗体は生細胞を免疫源としているために高率に機能抗体が含まれているという利点がある一方で、固定した標本を染色しにくいという欠点がある。そこで昨年度、固定した細胞を免疫源として再度作製したモノクローナル抗体および各ドメイン毎に発現して免疫を行なって作製したモノクローナル抗体が分担研究者の福岡が作製した高集積がん組織アレイに使用可能かを検定した。

### <がん遺伝子の発現クローニングとその解析>

本年度は各種がん細胞から作成した発現

型ライブラリーからマウス L-3 依存性造血細胞株 HF6 の自立性増殖の誘導を指標として行った機能性発現クローニング法によってホメオボックス分子 RHOXF2 を同定した。RHOXF2 については高集積がんマイクロアレイを利用して発現、予後との関連などを調べた。

<高集積組織アレイにおける染色と評価>

染色条件検討にて充分に特異性と感受性を有すると判断したのものにおいて、精製抗体を作製し、さらに染色プロトコルを最適化したのちに高集積アレイへの染色を行った。染色スライドは全てバーチャルスライドにてスキャンを行い、ビューワー上にてスコアリングを行った。評価は細胞の局在毎、つまり細胞質、細胞膜、核ごとに評価した。それぞれの局在部位毎に強度と分布（染色範囲）を検討し、それぞれ、強度スコア：0:染色性なし、1:弱陽性、2:中等度、3:強陽性、分布スコア：0:染色性無し 1:50%未満の腫瘍細胞が陽性、2:50%以上の腫瘍細胞が陽性と評価した。強度スコアと分布スコアの総和が 3 以上を基本的に陽性とみなした。

<統計解析>

染色性と組織型、分化度、性別、年齢、Stage、脈管侵襲（癌腫）の相関を  $\chi$  自乗検定およびフィッシャー検定を用いて評価した。生命予後情報のある癌腫では、ログランクテストを用いて生存解析を行い、 Kaplan-Meier 曲線をプロットした。P 値<0.05 未満を統計学的に優位と認識した。

<倫理的配慮>

個人情報とは非連結可能匿名化を行っている。本研究のプロトコルは富山大学倫理委

員会の承認を受けている。(認 19-12)

C. 研究成果

<モノクローナル抗体の *in vitro* 細胞増殖抑制活性の検定>

図 1-4 に細胞株を用いた *in vitro* での抗体の生理機能試験の結果を示す。

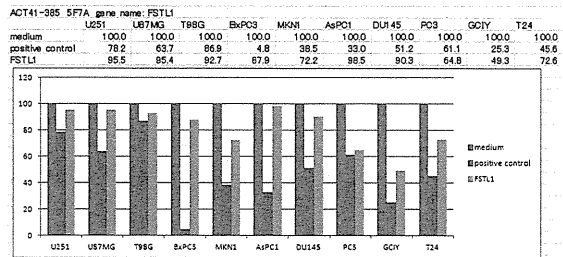


図 1 抗 FSTL1 抗体 *in vitro* 試験

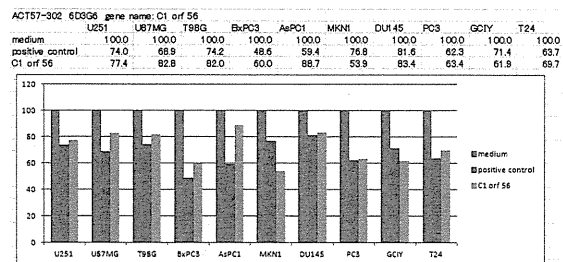


図 2 抗 C1orf56 抗体 *in vitro* 試験

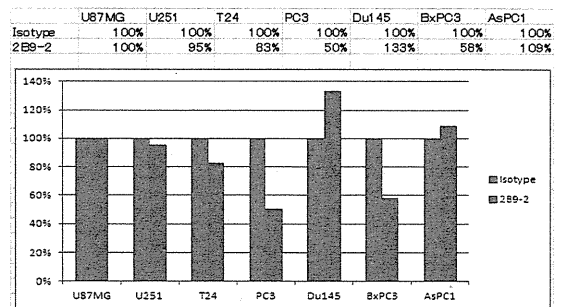


図 3 抗 2B9 抗体 *in vitro* 試験

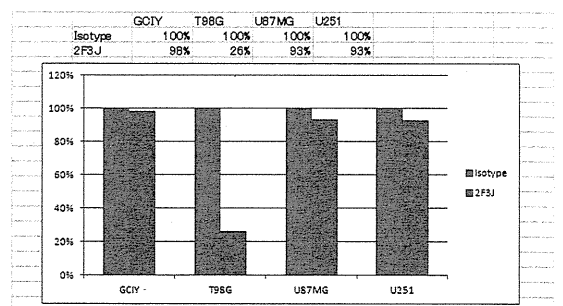


図 4 抗 2F3J 抗体 *in vitro* 試験

図に示す 4 種類の抗体を用いて機能試験を行なったところ、いくつかの細胞株で増殖抑制活性を有することが確認された。図 1、図 2 における陽性コントロール（中央のバー）はタキソテールによる細胞増殖抑制を示す。

<モノクローナル抗体の *in vivo* 細胞増殖抑制活性の検定>

*in vitro* で生理活性を発揮した抗体について、対象の細胞株を用いて担がんモデルマウスによる *in vivo* 薬効試験をした。

図 5-8 に細胞株を用いた *in vivo* での抗体の生理機能試験の結果を示す。

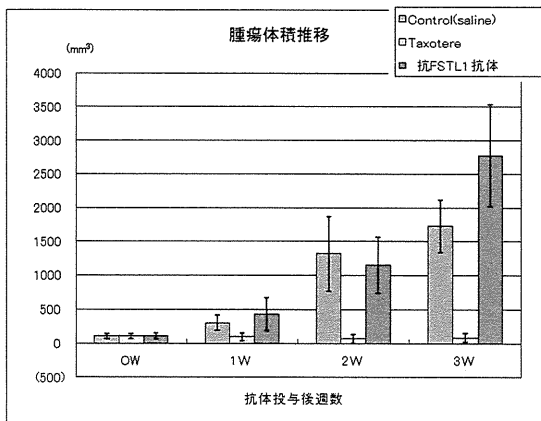


図 5 抗 FSTL1 抗体 *in vivo* 試験

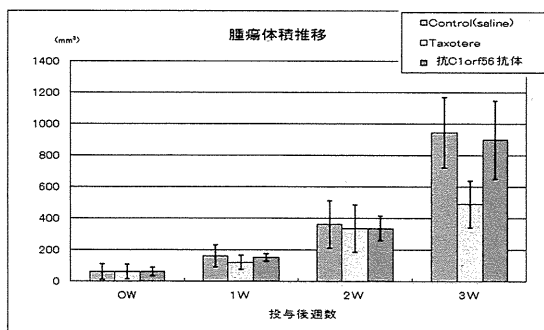


図 6 抗 C1orf56 抗体 *in vivo* 試験

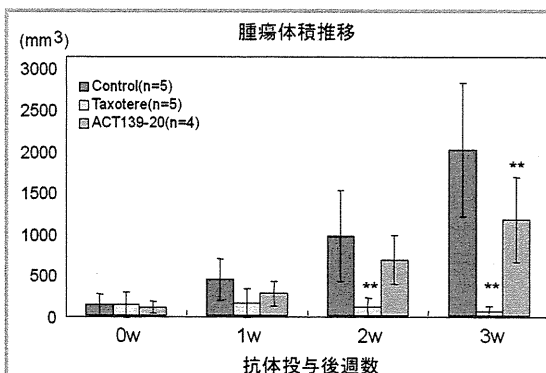


図 7 抗 2B9 抗体 *in vivo* 試験

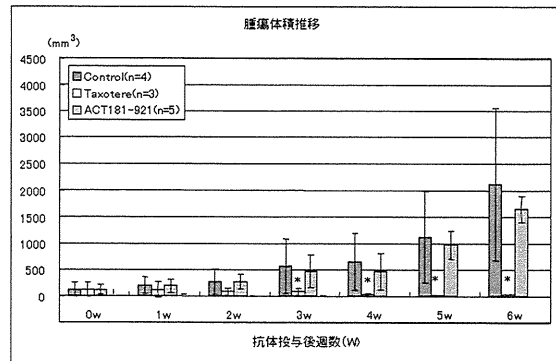


図 8 抗 2F3J 抗体 *in vivo* 試験

図に示す 4 種類の抗体を用いて機能試験を行なったところ、動物試験においてもいくつかの細胞株で増殖抑制活性を有することが確認された。

抗 FSTL1 抗体は、*in vitro* 試験で最も増殖抑制効果のあったスキルス胃がん GCIY 細胞株のモデルで検討したが、GCIY 担がんモデルでは腫瘍増殖抑制活性は認められなかった。

抗 C1orf56 抗体は、前立腺がん PC3 細胞株のモデルで検討した。さらに効果の高い BxPC3 細胞、MKN1 細胞で行わなかった理由は、BxPC3 細胞モデルは腫瘍定着までに 8 週間を有し、個体間のバラつきも大きいことから、確立した系ではないと考えた。また、MKN1 細胞モデルは、腫瘍の定着や増大とは関係なく、体重減少による短期での死亡例が出ることから、腫瘍増殖抑制を検討する系には向かないと判断した。PC3 モデルで腫瘍増殖抑制活性は認められなかった。

抗 2B9 抗体（抗原名非開示）は、最も効果のあった前立腺がん PC3 細胞株のモデルで検討した結果、PC3 担がんモデルで統計的に有意に腫瘍増殖抑制活性が認められた。

抗 2F3J 抗体は (抗原名非開示) は、唯一効果のあったグリオブラストーマ T98G 細胞株のモデルで検討した。本系は、腫瘍確認に 6-8 週間有し、その後の増殖抑制試験で 6 週間を有するなど、個体間のバラつきも多く確立した系ではないが、唯一効果のあった細胞であるため本系を用いて評価した。その結果、予想通りバラつきのため統計有意差は出なかったが、20%程度の増殖抑制効果を認めた。

#### <再度作製した抗体の高集積がん組織アレイでの検定>

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 FSTL1 を認識する抗体において、特異的染色結果が得られた。また、ドメインに区切って発現した細胞を免疫源とした EPHA2 を認識する抗体でも特異的染色が得られた。

#### <がん遺伝子の発現クローニングとその解析>

造血細胞株にサイトカイン非依存性増殖能を寄与する分子として、ホメオボックス分子 RHOXF2 を同定した。研究分担者の福岡が作製した高集積がん組織アレイを利用して調べたところ RHOXF2 は多くのがん組織で発現が高いことが判明した。また RHOXF2 を過剰発現している胃がん細胞で RHOXF2 をノックダウンすると増殖が抑制された。また肺扁平上皮がん、肺腺がん、大腸がんでは高分化型において、RHOXF2 の発現が高い場合に予後が有意に悪いことも判明した。

#### <高集積がんマイクロアレイによる解析>

SST-REX 法にホルマリン固定を加えた変法にて研究代表者の北村らが作製した抗体のうち、EphA2 に対する抗体 (clone 1CBE6-3)、Clorf56 に対する抗体 (clone 2A1)、FSTL1 に対する抗体 (clone 9C8H7) の 3 クローンにおいて、染色を確認し、スコアを取得、結果につき臨床病理学的検討を行った。

#### 1. EphA2 の免疫染色

2 種の抗体にて組織アレイを染色した。

##### 1) clone 1CBE6-3

上皮性がんが発現が高く認められたが、特に甲状腺癌、子宮癌において高い発現が確認された。脳腫瘍では、核の染色が優位であった。発現は細胞質が中心で、核、膜にも発現が観察された。腎癌、膀胱癌、卵巣癌において高く観察された。ただし、EphA2 は膜蛋白質であり、核における発現の意味は今後の検討を要する。

肺腺がんでは、分化度との負の相関をしめし ( $p=0.031$ )、腎癌では stage との負の相関を認めた ( $p=0.006$ )。大腸癌では stage との負の相関がみられ ( $p=0.007$ )、また、少数ではあるものの、膀胱がんでは、細胞膜の発現が病期との負の相関を示した ( $p=0.006$ )。細胞質の発現では、胃がんにおいて病期との負の相関がみられた ( $p=0.009$ )。

##### 2) Clone 6B10

Clone 6B10 ではより ubiquitous な発現を認め、大腸癌、乳癌、肺腺癌、甲状腺癌、胃癌においてより高い発現を観察した。発現は clone 1CBE6-3 と同様、腎癌、卵巣



癌において高い傾向を示した。

また、肺腺癌では、弱陽性を含めた群を陽性と認識すると、clone 1CBE6-3と同様に核における発現が予後良好因子として認識された( $P < 0.001$ )。

興味深いことに大腸がんでは、核の発現が予後不良因子として認識された( $P = 0.02$ )。癌腫により機能が異なる可能性を示した。

### 3. Clorf56 の染色結果

染色性は、上皮細胞特にながん細胞の細胞質に観察された。発現は肝臓癌において特に高く観察された。肺腺癌においても比較的高い発現が観察された。予後との関連性は脳腫瘍、多種癌ともに確認されなかったが、腺がんでは、血管侵襲と負の相関を示した( $p = 0.021$ )。また、胃がんでは、リンパ節転移と負の相関がみられ( $p = 0.002$ )、またリンパ管侵襲とも強い負の相関を認めた( $p < 0.001$ )。肝癌では、他臓器転移と負の相関がみられ( $p = 0.014$ )、膵癌においてもリンパ節転移との負の相関を認めた( $p = 0.009$ )。

### 4. FSTL1

培養上清でパイロットアレイの特異的染色が確認されたが精製抗体ではなぜか染色性が認められなかった。そこで今回は培養上清で高集積がんマイクロアレイを解析した。FSTL1の発現は大腸癌と子宮体部癌において強く観察された。予後との相関はいずれの癌腫においても見られなかった。ただし、胃癌では、分化度との正の相関がみられ( $P = 0.001$ )、胆道系癌では、他臓器転移と負の相関がみられた( $P = 0.04$ )。

## 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を、*in vitro*、*in vivo*機能試験のレベルで裏付ける結果となった。一方で、*in vitro*での機能試験の結果どおりに*in vivo*で機能を発揮しないことも明らかとなったが、抗がん作用としての機能試験ではある程度予想された結果である。4種類の抗体のうち1種類で統計的に有意に抗がん作用を認めたことは、機能抗体創出技術として優位なテクノロジーと考えられる。また、いずれのモデルも抗がん剤タキソテールに見られる体重減少は認められなかった。

一方、上記の方法論で取得したモノクローナル抗体は固定標本を染色するものがないのが本事業の問題点でもある。今回、固定細胞を免疫源とする、あるいはドメインに分けて免疫することによってある程度の確率で固定標本を染色するモノクローナル抗体が得られることを確認した。

## E. 結論

本年度は新規にながん細胞に対する昨日抑制試験を行い、担がんモデルマウスで抗がん作用を示唆する抗体を2種類見出した。比較的効率よくがん細胞増殖抑制効果を有する抗体が取得可能である一方で、固定標本を染色しうる抗体は取得し直す必要があることが多い。この問題点を解決するためには、高集積がんマイクロアレイを凍結切片で作製することが効果的である可能性がある。

一方、発現クローニング法など他の方法で同定したオンコジーンなどの分子にも高

集積がんマイクロアレイが有効であることも確認できた。研究分担者の福岡らが開発した高集積がんマイクロアレイは癌治療における分子標的を解析するための有効なツールとなりうる。

## F. 研究発表

1. Komori, K., Doi, A., Nosaka, T., Furuta, H., Akamizu, T., Kitamura, T., Senba, E., and Morikawa, Y. Regulation of AMP-activated protein kinase signaling by AFF4, a member of the AF4 (ALL1-fused gene from chromosome 4) family of transcription factors, in hypothalamic neurons. **J. Biol. Chem.** in press.
2. Doki, N., Kitaura, J., Inoue, D., Kato, N., Kagiya, Y., Uchida, T., Togami, K., Isobe, M., Ito, S., Maehara, A., Izawa, K., Oki, T., Harada, Y., Nakahara, F., Harada, H., and Kitamura, T. (2012) Fyn is not essential for Bcr-Abl-induced leukemogenesis in mouse bone marrow transplantation models. **Int. J. Hematol.** 95:167-175.
3. Oki, T., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Nishimura, K., Maehara, A., Uchida, T., Komeno, Y., Nakahara, F., Harada, Y., Sonoki, T., Harada, H., and Kitamura, T. (2012) Aberrant expression of RasGRP1 cooperates with gain-of-function NOTCH1 mutations in T-cell leukemogenesis. **Leukemia** in press.
4. Tran, P.T., Bendapudi, P.K., Lin, H.J., Choi, P., Koh, S., Chen, J., Horng, G., Hughs, N.P., Schwartz, L.H., Miller, J.H., Kawashima, T., Kitamura, T., Paik, D., and Felsner, D.W. (2012) Survival and death signals can predict tumor response to therapy after oncogene inactivation. **Science Translational Medicine**, in press.
5. Nakamura, M., Kitaura, J., Enomoto, Y., Lu, Y., Nishimura, K., Isobe, M., Ozaki, K., Komeno, Y., Nakahara, F., Oki, T., Kume, H., Homma, Y., and Kitamura, T. (2012) TSC-22 is a negative-feedback regulator of Ras/Raf signaling: Implications for tumorigenesis. **Cancer Science** 103:26-33.
6. Suzuki, K., Ono, R., Ohishi, K., Masuya, M., Kataoka, I., Liu, B., Nakamori, Y., Ino, K., Monma, F., Hamada, H., Kitamura, T., Katayama, N., and Nosaka, T. (2012) IKAROS isoform 6 enhances BCR-ABL-mediated proliferation of human CD34+ hematopoietic cells on stromal cells. **Int J Oncology** 40:53-62.
7. Shibata-Minoshima, F., Oki, T., Doki, N., Nakahara, F., Kageyama, S., Kitaura, J., Fukuoka, J. and Kitamura, T. (2012) Identification of RHOXF2 (PEPP2) as a cancer-promoting gene by expression cloning. **Int J Oncology** 40:93-98.

8. Kawamura, S., Sato, I., Wada, T., Yamaguchi, K., Li, Y., Li, D., Zhao, X., Ueno, S., Aoki, H., Tochigi, T., Kuwahara, M., Kitamura, T., Takahashi, K., Moriya, S., and Miyagi, T. (2012) Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) regulates progression of prostate cancer to androgen-independent growth through modulation of androgen receptor signaling. **Cell Death and Differentiation** 19:170-179.
9. Zhang C, Elkahloun AG, Robertson M, Gills JJ, Tsurutani J, Shih JH, Fukuoka J, Hollander MC, Harris CC, Travis WD, Jen J, and Dennis PA. Loss of cytoplasmic CDK1 predicts poor survival in human lung cancer and confers chemotherapeutic resistance. *PLoS One*. 6(8):1-15, 2011.
10. Turner BM, Cagle PT, Sainz IM, Fukuoka J, Shen SS, Jagirdar J. and Napsin A. A new marker for lung adenocarcinoma, is complementary and more sensitive and specific than thyroid transcription factor 1 in the differential diagnosis of primary pulmonary carcinoma: evaluation of 1674 cases by tissue microarray. *Arch Pathol Lab Med*. 136(2):163-71, 2012
11. Whithaus K, Fukuoka J, Prihoda TJ, Jagirdar J. Evaluation of napsin A, cytokeratin 5/6, p63, and thyroid transcription factor 1 in adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma of the lung. *Arch Pathol Lab Med*. 136(2):155-62, 2012
12. Kanazawa Y, Shojaku H, Takakura H, Fujisaka M, Tachino H, Watanabe Y, Tomizawa G, Kawabe H, Shojaku H, Seto H, Otani K, Fukuoka J. An essential dose of cisplatin for super-selective intra-arterial infusion concomitant with radiotherapy in patient with maxillary squamous cell carcinoma. *Eur Arch Oto-phino-l*. 10.1007/s00405-011-1857-7O 2011.
13. Shibata-Minoshima F, Oki T, Doki N, Nakahara F, Kageyama S, Kitaura J, Fukuoka J, and Kitamura T. Identification of RHOXF2 (PEPP2) as a cancer-promoting gene by expression cloning. *Int J Oncol*. 40(1): 93-8, 2012.
14. Fukuoka J, Hofer MD, Hori T, Tanaka T, Ishizawa S, Nomoto K, Saito M, Uemura T, Chirieac LR. *Spiral Array. A New High-Throughput Technology Covers Tissue Heterogeneity*. *Arch Pathol Lab Med*. 2012: in press.
15. Farris, AB III, Demicco EG, Le LP,

- Finberg KE, Miller J, Mandal R, Fukuoka J, Cohen C, Gaissert HA, Zukerberg LR, Lauwers GY, Iafrate AJ, and Mino-Kenudson, M. Clinicopathologic and Molecular Profiles of Microsatellite Unstable Barrett Esophagus-associated . Am J Surg Pathol in press.
16. Demicco EG, Farris AB, Baba Y, Etang BA, Bergethon T, Mandal, Daives D, Fukuoka J, Shimizu M, Santagata DD, Ogino S, Iafrate AJ, Gaissert HA, and Kenudson MM. The Dichotomy in Carcinogenesis of the Distal Esophagus and Esophagogastric Junction: Intestinal-Type vs. Cardiac-Type Mucosa-Associated Adenocarcinoma. Modern Pathology, in press.
17. Nagata T, Shimada Y, Sekine S, Hori R, Matsui K, Okumura T, Sawada S, Fukuoka J, Tsukada K. Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer. Breast Cancer, 10:12282, 2012.
18. 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 肺過誤腫を合併した若年発症肺癌の1例 日呼吸会誌 2011 49(5):349-354,2011.
19. Nishimizu T, Minemura M, Kajiura S, Tokimitsu Y, Itaya Y, Yamawaki, H, Kawai K, Tajiri K, Nakayama Y, Hosokawa A, Takahara T, Yasumura S, Shimizu S, Fukuoka J, Ishizawa S, Sawasaki T, Yanagisawa A, and Sugiyama T. A case of pancreatic acinar cell carcinoma with a giant liver metastasis successfully treated with combination of gemcitabine and peroral s-1. 癌と化学療法, 38(2): 309-12, 2011.
2. 学会発表
1. 北村俊雄 Lessons from mouse models for myelodysplastic syndromes/overt leukemia and chronic myelogenous leukemia in blast crisis: Insertional mutagenesis induced Evi-1 expression but not Hes1 expression 日本学術振興会 二国間交流事業セミナー (2011年7月14日九州大学百年講堂)
2. 北村俊雄 Animal models for AML, MDS and MPN 日本遺伝子治療学会教育講演 (2011年7月14日九州大学百年講堂)
3. Oki, T., Watanabe-Okouchi, N., Nishimura, N., Komeno, Y., Nakahara, F., Kitaura, J., and Kitamura, T. "The Roles of RasGRPs in Hematological Malignancies" 40th Annual Scientific Meeting of International Society of Experimental Hematology (2011年8月25日28日)

- Westin Bayshore Hotel, Vancouver, Canada)
4. 北村俊雄 Two types of C/EBPa mutations collaborate in inducing leukemia in a mouse BMT model. 第25回 IACRLRD (2011年9月15-17日 東京大学本郷キャンパス)
  5. 北村俊雄 Molecular basis of leukemia, MPN and MDS 第70回 日本癌学会学術総会 (2011年10月3-5日 名古屋国際会議場)
  6. 中原史雄、北村俊雄 Molecular mechanisms of blast crisis in chronic myelogenous leukemia 第70回 日本癌学会学術総会 (2011年10月3-5日 名古屋国際会議場)
  7. 北村俊雄 Mouse models for MDS/overt leukemia and CML-BC 第73回 日本血液学会学術集会 (2011年10月14-16日 名古屋国際会議場)
  8. 伊沢久未、北浦次郎、山西吉典、沖俊彦、奥村康、北村俊雄 LMIR3 ノックアウトマウスにおけるアレルギー反応の亢進 日本免疫学会 (2011年11月29日 幕張メッセ)
  9. 福岡順也. 「肺癌の病理における最近の話題」 兵庫医科大学大学院特別講義 2011, 02, 兵庫
  10. 福岡順也. 「肺癌の個別化医療と組織型診断」 第26回京滋肺癌研究会 2011, 02, 京都
  11. Whithaus K, Fukuoka J, Jagirdar J. Evaluation of Napsin A, CK 5/6, p63, and TTF-1 in Adenocarcinoma (ACA) vs. Squamous Cell Carcinoma (SCC) of the Lung. 100th USCAP Annual meeting, Mar 1-3, 2011, San Antonio, USA.
  12. Fukuoka J, Sano H, Tanaka T. Central vs. Peripheral Squamous Cell Carcinoma. Are they really different morphologically?. Pulmonary Pathology Society, Biennial Meeting, 2011, 8, 18-20, New York City, USA.
  13. Fukuoka J, and Hori T. Ki-67 is a strong prognostic marker for NSCLC when tissue heterogeneity is considered. 101th USCAP Annual meeting, Mar 19-21, 2011, Vancouver, Canada.
  14. Sano H, Tanaka T, Saito M, Otani K, Hori T, Nunomura S, and Fukuoka J. Difference of morphology and molecular expression between central and peripheral squamous cell carcinoma 101th USCAP Annual meeting, Mar 19-21, 2011, Vancouver, Canada.
  15. Arora K, Zhang W, Fukuoka J, Kitano H, and Jagirdar J. Detection of

EGFR mutations in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry using mutant specific antibodies: Are we there yet?  
101th USCAP Annual meeting, Mar 19-21, 2011, Vancouver, Canada.

**E. 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23年度分担研究報告書

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に関する研究

研究分担者 東京大学医科学研究所 細胞療法分野  
教授 北村俊雄

### 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。

これまでにシグナルシーケンストラップ法で各々のがんから獲得した数百クロンのcDNAのうち、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てきた。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モノクローナル抗体を作製できることが確認された。また、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らの持つマルチ組織アレイによる、正常組織、がん組織における発現プロファイリングを行った。以前の抗体の解析結果から、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、本プロジェクトの進め方について発展性のある非常にマッチした手法である事を再認識した。さらに機能解析の拡大によって、担がんモデルマウスにおける動物試験で、薬理効果のある抗体を見出した。

また本年度は各種がん細胞から作成した発現型ライブラリーから機能性発現クローニング法によってオンコジーンとしてホメオボックス分子RHOXF2を同定した。高集積がんマイクロアレイを利用して調べたところRHOXF2は多くのがん組織で発現が高いことが判明した。RHOXF2を過剰発現している胃がん細胞でRHOXF2をノックダウンすると増殖が抑制された。また肺扁平上皮がん、肺腺がん、大腸がんでは高分化型において、RHOXF2の発現が高い場合に予後が有意に悪いことも判明した。

## 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、*in vitro*での培養細胞系での機能試験、あるいは担がんモデルマウス等を用いた *in vivo* 試験により、治療効果を評価することが必要である。

本年度は、開発したモノクローナル抗体の薬効機能を評価した。また、昨年度までの結果で、取得したモノクローナル抗体が固定標本である高集積がん組織アレイでは使用できないことが多く、昨年度は免疫法に工夫をしてモノクローナル抗体を再度作製したが、今年度はこれらの抗体の高集積がん組織アレイでの解析も併せて行なった。

## B. 研究方法

### <モノクローナル抗体の *in vitro* 細胞増殖抑制活性の検定>

取得したモノクローナル抗体の各種がん細胞株に対する増殖抑制公開を評価するため、培養系に抗体を添加しがん細胞株の増殖に対する影響を WST 法で調べた。がん細胞株は、各がん種について下記の細胞株を選択した。

脳腫瘍細胞：U251、U87MG、T98G

すい臓がん細胞：BxPC3、AsPC1

胃がん細胞：MKN1

スキルス胃がん細胞：GCIY

前立腺がん細胞：PC3、Du145

膀胱がん細胞：T24

各細胞株を 3000 個/well になるように、96well マイクロプレートに播種後、1 晩培養し細胞の接着を確認した。培養液に抗体の培養上清を添加し、抗体添加後 3 日間培養した後、培養液をアスピレーターで除去

し、WST-1 試薬入りの培地に培地交換した。5% CO<sub>2</sub>/37°C インキュベーターで 4 時間培養し、吸光度 A450nm を測定した。3 日間培地のみで培養したウエルを陰性コントロールとして使用し、吸光度を 100% として抗体添加ウエルならびに陽性コントロール添加ウエルの吸光度の割合を計算した。

### <モノクローナル抗体の *in vivo* 細胞増殖抑制活性の検定>

上記試験で活性を認めたモノクローナル抗体について、担がんモデルマウスによる動物試験を行なった。SCID マウスを購入後 1 週間、環境馴化のため飼育した。その後各細胞株をマウス頸背部皮下に接種し、約 5mm 角の腫瘍形成を認めるまで 3~4 週間飼育した。5mm 角の腫瘍を確認し、ネガティブコントロール、ポジティブコントロール、抗体治療群の各群の均等性を保つため、群分けを行った。

ネガティブコントロールとして生理食塩水、ポジティブコントロールとして抗がん剤 (Taxotere) を使用し、抗体を 10mg/kg の投与量で 1 週間に 1 回ずつ 3 週間 (合計 3 回) 投与し、治療した。

投与開始を 0 週として計算し、ノギスでの短径、長径測定による体積変化を測定し、最終治療の 1 週間後に剖検した。

### <再度作製した抗体の高集積がん組織アレイでの検定>

本プロジェクトによって作製したモノクローナル抗体は生細胞を免疫源としているために高率に機能抗体が含まれているという利点がある一方で、固定した標本を染色しにくいという欠点がある。そこで昨年度、



固定した細胞を免疫源として再度作製したモノクローナル抗体および各ドメイン毎に発現して免疫を行なって作製したモノクローナル抗体が分担研究者の福岡が作製した高集積がん組織アレイに使用可能かを検定した。

<がん遺伝子の発現クローニングとその解析>

本年度は各種がん細胞から作成した発現型ライブラリーから機能性発現クローニング法によってオンコジーンとしてホメオボックス分子 RHOXF2 を同定し、高集積がんマイクロアレイを利用して発現、予後との相関などを調べた。

C. 研究成果

<モノクローナル抗体の *in vitro* 細胞増殖抑制活性の検定>

図 1-4 に細胞株を用いた *in vitro* での抗体の生理機能試験の結果を示す。

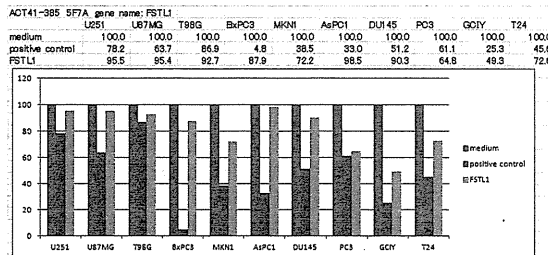


図 1 抗 FSTL1 抗体 *in vitro* 試験

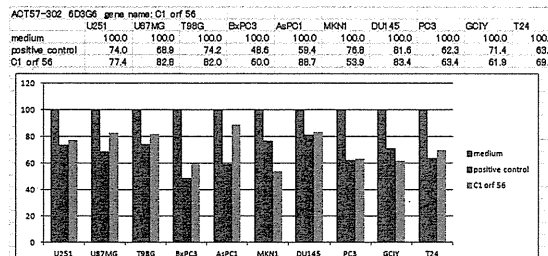


図 2 抗 C1orf56 抗体 *in vitro* 試験

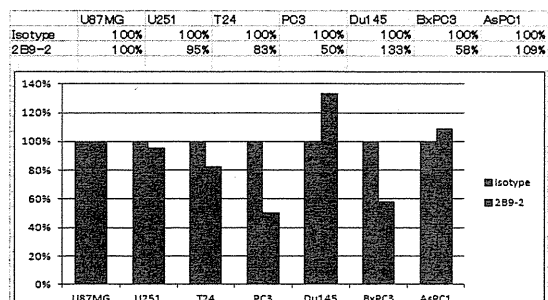


図 3 抗 2B9 抗体 *in vitro* 試験

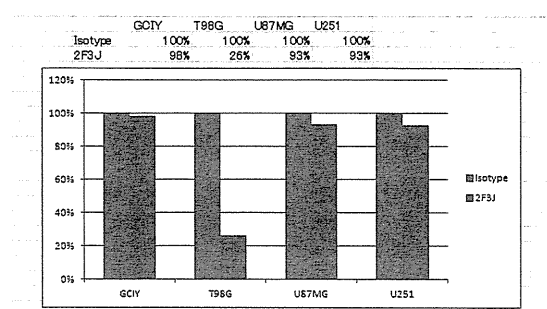


図 4 抗 2F3J 抗体 *in vitro* 試験

図に示す 4 種類の抗体を用いて機能試験を行なったところ、いくつかの細胞株で増殖抑制活性を有することが確認された。図 1、図 2 における陽性コントロール（中央のバー）はタキソテールによる細胞増殖抑制を示す。

<モノクローナル抗体の *in vivo* 細胞増殖抑制活性の検定>

*in vitro* での機能試験の結果、生理活性を発揮した抗体について、対象の細胞株を用いて担がんモデルマウスによる *in vivo* 薬効試験をした。

図 5-8 に細胞株を用いた *in vivo* での抗体の生理機能試験の結果を示す。

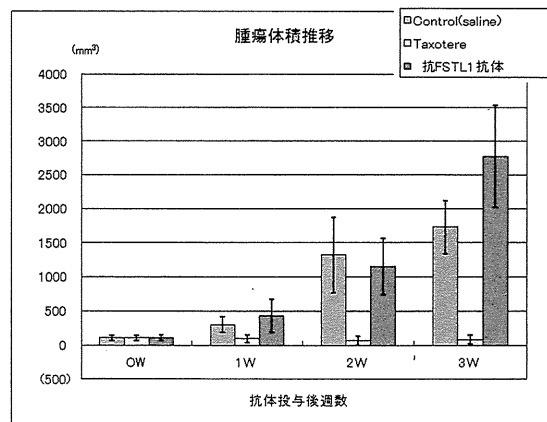


図 5 抗 FSTL1 抗体 *in vivo* 試験

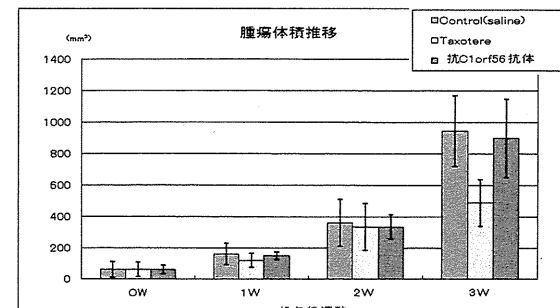


図 6 抗 Clorf56 抗体 *in vivo* 試験

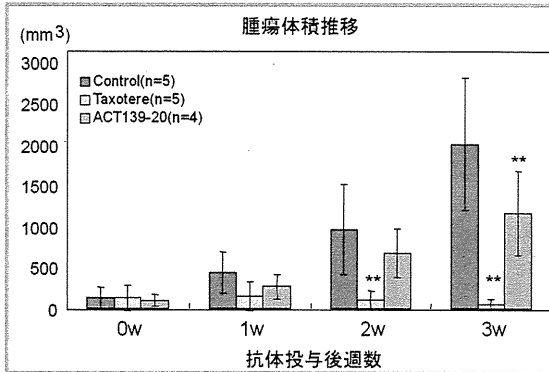


図 7 抗 2B9 抗体 *in vivo* 試験

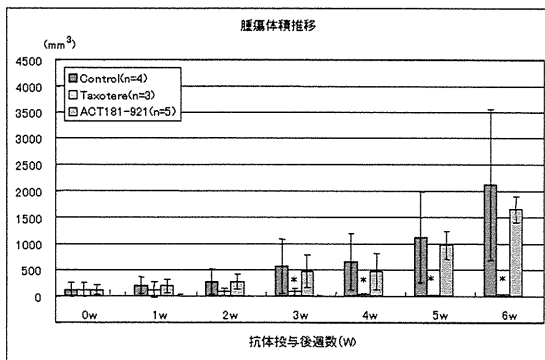


図 8 抗 2F3J 抗体 *in vivo* 試験

図に示す 4 種類の抗体を用いて機能試験を行なったところ、動物試験においてもいくつかの細胞株で増殖抑制活性を有することが確認された。

抗 FSTL1 抗体は、*in vitro* 試験で最も増殖抑制効果のあったスキルス胃がん GCIY 細胞株のモデルで検討したが、GCIY 担がんモデルでは腫瘍増殖抑制活性は認められなかった。

抗 Clorf56 抗体は、前立腺がん PC3 細胞株のモデルで検討した。さらに効果の高い BxPC3 細胞、MKN1 細胞で行わなかった理由は、BxPC3 細胞モデルは腫瘍定着までに 8 週間を有し、個体間のバラつきも大きいことから、確立した系ではないと考えた。また、MKN1 細胞モデルは、腫瘍の定着や

増大とは関係なく、体重減少による短期での死亡例が出ることから、腫瘍増殖抑制を検討する系には向かないと判断した。PC3 モデルで腫瘍増殖抑制活性は認められなかった。

抗 2B9 抗体 (抗原名非開示) は、最も効果のあった前立腺がん PC3 細胞株のモデルで検討した結果、PC3 担がんモデルで統計的有意に腫瘍増殖抑制活性が認められた。

抗 2F3J 抗体は (抗原名非開示) は、唯一効果のあったグリオブラストーマ T98G 細胞株のモデルで検討した。本系は、腫瘍確認に 6-8 週間有し、その後の増殖抑制試験で 6 週間を有するなど、個体間のバラつきも多く確立した系ではないが、唯一効果のあった細胞であるため本系を用いて評価した。その結果、予想通りバラつきのため統計有意差は出なかったが、20%程度の増殖抑制効果を認めた。

#### <再度作製した抗体の高集積がん組織アレイでの検定>

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、特異的染色結果が得られた。また、ドメインに区切って発現した細胞を免疫源とした EPHA2 を認識する抗体でも特異的染色が得られた。

#### <がん遺伝子の発現クローニングとその解析>

造血細胞株にサイトカイン非依存性増殖能を寄与する分子として、ホメオボックス分子 RHOXF2 を同定した。研究分担者の福岡が作製した高集積がん組織アレイを利

用して調べたところ RHOXF2 は多くのがん組織で発現が高いことが判明した。また RHOXF2 を過剰発現している胃癌細胞で RHOXF2 をノックダウンすると増殖が抑制された。また肺扁平上皮がん、肺腺がん、大腸がんでは高分化型において、RHOXF2 の発現が高い場合に予後が有意に悪いことも判明した。

#### 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を、*in vitro*、*in vivo* 機能試験のレベルで裏付ける結果となった。一方で、*in vitro* での機能試験の結果どおりに *in vivo* で機能を発揮しないことも明らかとなったが、抗がん作用としての機能試験ではある程度予想された結果である。4 種類の抗体のうち 1 種類で統計的有意に抗がん作用を認めたことは、機能抗体創出技術として優位なテクノロジーと考えられる。また、いずれのモデルも抗がん剤タキソテールに見られる体重減少は認められなかった。

一方、上記の方法論で取得したモノクローナル抗体は固定標本を染色するものが少ないのが本事業の問題点でもある。今回、固定細胞を免疫源とする、あるいはドメインに分けて免疫することによってある程度の確率で固定標本を染色するモノクローナル抗体が得られることを確認した。

#### E. 結論

本年度は新規にがん細胞に対する昨日抑制試験を行い、担がんモデルマウスで抗がん作用を示唆する抗体を 2 種類見出した。

比較的効率よくがん細胞増殖抑制効果を有する抗体が取得可能である一方で、固定標本を染色しうる抗体は取得し直す必要があることが多い。この問題点を解決するためには、高集積がんマイクロアレイを凍結切片で作製することが効果的である可能性がある。

#### F. 研究発表

1. Komori, K., Doi, A., Nosaka, T., Furuta, H., Akamizu, T., Kitamura, T., Senba, E., and Morikawa, Y. Regulation of AMP-activated protein kinase signaling by AFF4, a member of the AF4 (ALL1-fused gene from chromosome 4) family of transcription factors, in hypothalamic neurons. **J. Biol. Chem.** in press.
2. Doki, N., Kitaura, J., Inoue, D., Kato, N., Kagiya, Y., Uchida, T., Togami, K., Isobe, M., Ito, S., Maehara, A., Izawa, K., Oki, T., Harada, Y., Nakahara, F., Harada, H., and Kitamura, T. (2012) Fyn is not essential for Bcr-Abl-induced leukemogenesis in mouse bone marrow transplantation models. **Int. J. Hematol.** 95:167-175.
3. Oki, T., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Nishimura, K., Maehara, A., Uchida, T., Komeno, Y., Nakahara, F., Harada, Y., Sonoki, T., Harada, H., and Kitamura, T. (2012) Aberrant expression of RasGRP1 cooperates with gain-of-function NOTCH1 mutations in T-cell

leukemogenesis. **Leukemia** in press.

4. Tran, P.T., Bendapudi, P.K., Lin, H.J., Choi, P., Koh, S., Chen, J., Horng, G., Hughs, N.P., Schwartz, L.H., Miller, J.H., Kawashima, T., Kitamura, T., Paik, D., and Felsher, D.W. (2012) Survival and death signals can predict tumor response to therapy after oncogene inactivation. **Science Translational Medicine**, in press.
  5. Nakamura, M., Kitaura, J., Enomoto, Y., Lu, Y., Nishimura, K., Isobe, M., Ozaki, K., Komeno, Y., Nakahara, F., Oki, T., Kume, H., Homma, Y., and Kitamura, T. (2012) TSC-22 is a negative-feedback regulator of Ras/Raf signaling: Implications for tumorigenesis. **Cancer Science** 103:26-33.
  6. Suzuki, K., Ono, R., Ohishi, K., Masuya, M., Kataoka, I., Liu, B., Nakamori, Y., Ino, K., Monma, F., Hamada, H., Kitamura, T., Katayama, N., and Nosaka, T. (2012) IKAROS isoform 6 enhances BCR-ABL-mediated proliferation of human CD34+ hematopoietic cells on stromal cells. **Int J Oncology** 40:53-62.
  7. Shibata-Minoshima, F., Oki, T., Doki, N., Nakahara, F., Kageyama, S., Kitaura, J., Fukuoka, J. and Kitamura, T. (2012) Identification of RHOXF2 (PEPP2) as a cancer-promoting gene by expression cloning. **Int J Oncology** 40:93-98.
  8. Kawamura, S., Sato, I., Wada, T., Yamaguchi, K., Li, Y., Li, D., Zhao, X., Ueno, S., Aoki, H., Tochigi, T., Kuwahara, M., Kitamura, T., Takahashi, K., Moriya, S., and Miyagi, T. (2012) Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) regulates progression of prostate cancer to androgen-independent growth through modulation of androgen receptor signaling. **Cell Death and Differentiation** 19:170-179.
2. 学会発表
1. 北村俊雄 Lessons from mouse models for myelodysplastic syndromes/overt leukemia and chronic myelogenous leukemia in blast crisis: Insertional mutagenesis induced Evi-1 expression but not Hes1 expression 日本学術振興会 二国間交流事業セミナー (2011年7月14日九州大学百年講堂)
  2. 北村俊雄 Animal models for AML, MDS and MPN 日本遺伝子治療学会 教育講演 (2011年7月14日九州大学百年講堂)
  3. Oki, T., Watanabe-Okouchi, N., Nishimura, N., Komeno, Y., Nakahara, F., Kitaura, J., and Kitamura, T. "The Roles of RasGRPs in Hematological Malignancies" 40th Annual Scientific Meeting of