

201433002A

厚生労働科学研究委託費

創薬基盤推進研究事業

新規癌抗原 Glypican-1 に対する抗体医薬品の奏功性を予測する
コンパニオン診断薬の開発

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 仲 哲治

独立行政法人 医薬基盤研究所

平成 27(2015)年 3 月

本報告書は、厚生労働省の平成 26 年度厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、独立行政法人医薬基盤研究所が実施した平成 26 年度「新規癌抗原 Glypican-1 に対する抗体医薬品の奏功性を予測するコンパニオン診断薬の開発」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費
創薬基盤推進研究事業

**新規癌抗原 Glypican-1 に対する抗体医薬品の奏功性を予測する
コンパニオン診断薬の開発**

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 仲 哲治

独立行政法人 医薬基盤研究所

平成 27(2015)年 3 月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

新規癌抗原 Glypican-1 に対する抗体医薬品の奏功性を予測する
コンパニオン診断薬の開発に関する研究

仲 哲 治 1

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 血液中 Glypican-1 定量システム (ELISA) の開発に関する研究

柳 町 守

（資料）Glypican-1 を定量する ELISA システムの開発 7

2. 血液中 Glypican-1 定量システム (ELISA) の開発に関する研究

豊 浦 雅 義

（資料）Glypican-1 モノクローナル抗体の精製 10

3. 血液中 Glypican-1 定量システム (ELISA) の開発に関する研究

藤 尾 慈

（資料）Glypican-1 モノクローナル抗体の性状解析 12

4. 消化器癌患者血清と手術組織の収集に関する研究

土 岐 祐一郎

（資料）消化器癌患者血清と手術組織の収集

（Glypican-1 血清抗体価測定に向けて） 16

5. 癌患者血清と手術組織の収集に関する研究

高 橋 剛

（資料）食道癌切除標本における Glypican-1 発現と

臨床病理学的検討 20

6. 血液中 Glypican-1 定量システム (ELISA) の開発に関する研究

世 良 田 聡

（資料）抗 Glypican-1 モノクローナル抗体のエピトープ解析 25

III. 学会等発表実績 33

IV. 研究成果の刊行物・別刷 44

新規癌抗原 Glypican-1 に対する抗体医薬品の奏功性を予測するコンパニオン診断薬の開発

業務主任者 仲哲治 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 創薬基盤研究部長

研究要旨

Glypican-1 は業務主任者が同定した食道癌の新規癌抗原である。業務主任者等は独自に開発した Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を食道癌に対する抗体医薬品として、エーザイ（株）、ファーマフーズ（株）と開発中である。本研究の目的は、上記抗体医薬品の奏功性が期待される患者を選定するためのコンパニオン診断薬を同時開発し、実用化することである。

食道癌の治療成績は手術手技等の向上に加え、化学療法の進歩により改善しつつあるものの、Stage II・IIIの食道癌に術前化学療法を施行し切除した症例でも5年生存率はわずか55%であり、進行食道癌の治療成績は未だ低いというのが現状である(Ando et al. Ann Surg Oncol. 2012)。化学療法に対する耐性も予後不良の因子の1つであることから、食道癌の治療成績の向上には新規治療法の開発が急務である。業務主任者が同定した Glypican-1 は食道癌に高発現する膜タンパク質であり、食道癌患者血液中においても可溶型の Glypican-1 が検出される。業務主任者等は食道癌に対する新規抗体医薬品として Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を開発し、担癌マウスにおける優れた抗腫瘍効果を明らかにし、抗 Glypican-1 抗体が重篤な毒性も見られないことも明らかにした（国際出願 PCT/JP2014/006455）。

抗 Glypican-1 抗体の効果的な臨床応用にあたり、その適応対象となる Glypican-1 を高発現する食道癌患者を適切に選定するためのコンパニオン診断薬が必要となる。そのため、低侵襲且つ簡便な血液中の Glypican-1 を定量する ELISA システムを開発する。本年度においては、Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を組み合わせることにより ELISA システムの系を構築する事に成功した。現在、血液中に存在する微量な Glypican-1 を定量するため、より高感度な ELISA システムを確立すべく、条件を改良中である。本研究により抗 Glypican-1 抗体の奏功性を予測するコンパニオン診断薬が開発されれば、医療の質の向上のみならず、医療費の削減に寄与できることが期待される。

担当責任者

柳町守	エーザイ株式会社 エーザイ・プロダクトクリエーション・システムズ バイオマーカー&パーソナライズド・メディシン機能ユニット バイオマーカーリサーチグループ 主幹研究員
豊浦雅義	株式会社ファーマフーズ開発部 バイオメディカル事業担当部長
藤尾慈	大阪大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学 教授
土岐祐一郎	大阪大学大学院医学系研究科外科学講座消化器外科 教授
高橋剛	大阪大学大学院医学系研究科外科学講座消化器外科 助教
世良田聡	独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 免疫シグナルプロジェクト 研究員

A. 研究目的

本研究の目的は、業務責任者が同定した食道癌の新規癌抗原である Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を食道癌に対する抗体医薬品として開発するにあたり、上記抗体医薬品の奏功性が期待される患者を選定するためのコンパニオン診断薬を同時開発し、実用化することである。

本年度において、担当責任者の豊浦（ファーマフーズ(株)）グループは Glypican-1 の ELISA システム構築用に必要となる抗 Glypican-1 モノクローナル抗体を複数クローン精製した。これらのクローンを用いて、研究分担者の柳町(エーザイ（株））のグループにおいて、Glypican-1 の ELISA システムを構築した。

業務主任者は、研究初年度である本研究において担当責任者の柳町(エーザイ（株））のグループで構築された Glypican-1 の ELISA システムを用いて、癌患者血液中の Glypican-1 の定量を目的とした。

B. 研究方法

(1)Glypican-1 の ELISA

担当責任者の柳町(エーザイ（株））の委託業務成果報告書（業務項目）の研究方法を参照。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセント

本研究は大阪大学医学部医学倫理委員会、及び医薬基盤研究所研究倫理審査委員会にて承認された研究計画書、「個人情報保護法」、「臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）」に準じて実施した。対象患者に対し、大阪大学医学部附属病院の共同研究者である医師が説明資料に従い研究について説明し、十分の理解を得た上で、文書に同意を得た。

個人情報保護

大阪大学医学部附属病院においては消化器外科 高橋剛助教を個人情報管理者とし連結可能匿名化することで個人情報の管理を行った。医薬基盤研究所には大阪大学医学部附属病院において連結可能匿名化された情報が試料とともに提供され、提供される情報は年齢、性別、病名、生化学データとした。

C. 研究結果

結果はD項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

担当責任者の柳町(エーザイ（株））のグループでは、抗 Glypican-1 モノクローナル抗体（#4、#7、#17、#18、#19）を2種類ずつ用いて ELISA システムの構築を試みた結果、いずれの組み合わせにおいても Standard の human Glypican-1 (R&D systems 4519-GP-050) に対して 0、1.56、3.125、6.25、12.5、25、50、100 (ng/ml) の範囲で検量線を作成出来る事を明らかにした。癌細胞に発現している Glypican-1 はプロテアーゼにより切断される事で、可溶性 Glypican-1 が血液中に遊離する。可溶性の Glypican-1 を ELISA で検出するには、N 末端のエピトープを認識する、抗 Glypican-1 モノクローナル抗体を2種類組み合わせでサンドイッチ ELISA を構築することが望ましいと考えられる。担当責任者の世良田(医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 免疫シグナルプロジェクト)は抗 Glypican-1 モノクローナル抗体のエピトープ領域の解析を行った結果、#7 と #19 はエピトープ領域が Glypican-1 の 33 から 61 番目のアミノ酸領域に存在する事を明らかにした。抗 Glypican-1 モノクローナル抗体#7 と #19 を ELISA に用いても検量線を作成出来るため、これら2種類のモノクローナル抗体のエピトープ領域の解析は 33 から 61 番目のアミノ酸の領域に存在するがわずかに異なる位置を認識する事が明

らかとなった。

(1)固相化抗体として抗 Glypican-1 モノクローナル抗体#7、検出用抗体として biotin 標識#19 の組み合わせと、(2) 固相化抗体として抗 Glypican-1 モノクローナル抗体#19、検出用抗体として biotin 標識#7 の組み合わせについて、ELISA の検量線データを調べた結果、#19 を固相化用抗体、#7 を検出用抗体としたサンドイッチ ELISA システムの方が低濃度の検量線においても直線性が保たれていたことから、#19 を固相化用抗体、#7 を検出用抗体とした ELISA 系の方が適していることが明らかとなった。

得られたサンドイッチ ELISA システムを用いて手術前の担癌患者血清中の Glypican-1 の定量を試みた。食道癌患者血清(N=12)・卵巣癌患者血清(N=6)、肺癌患者血清(N=2)と健康人血清中(N=5)の Glypican-1 を定量した結果、健康人と比較して、癌患者において有意に血中 Glypican-1 が高い事が明らかとなった(図 1)。血清には様々なタンパク質が存在するため Glypican-1 の抗体による反応が妨害されている可能性も考えられる。そこで、血清中の正確な Glypican-1 濃度を定量するため、ELISA の buffer など条件の改良に取り組んでいる。担当責任者の柳町(エーザイ(株))のグループに蓄積されている ELISA 系構築のノウハウを活用する。

E. 結論

本研究にて、血液中の Glypican-1 を定量できることが明らかとなった。現在、感度の向上、バックグラウンドの軽減を目指して ELISA システムの条件の最適化を進めている。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Furukawa K, Kawamoto K, Eguchi H, Tanemura M, Tomimaru Y, Akita H, Hama N, Wada H, Kobayashi S, Nonaka Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kumada T, Satomura S, Ito T, Serada S, **Naka T**, Mori M, Doki Y, Miyoshi E, Nagano H. Clinico-Pathological Significance of Leucine-Rich Alpha-2-Glycoprotein-1 in Sera of Patients with Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2015 Jan ;44(1):93-98.

2. Yang L, Fujimoto M, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Yamada K, Suzuki K, Nishikawa A, Hosono Y, Yoneda Y, Takehara K, Imura Y, Mimori T, Takeuchi T, Katayama I, **Naka T**. Proteomic identification of heterogeneous nuclear RNP-K as a novel cold-associated autoantigen in patients with secondary Raynaud's phenomenon. *Rheumatology*. 2014 In Press.

3. Kawabata A, Serada S, **Naka T**, Mori Y. Human herpesvirus 6 gM/gN complex interacts with v-SNARE in infected cells. *J Gen Virol* 2014 Dec;95(Pt 12):2769-77.

4. Azuma K, Serada S, Takamatsu S, Terao N, Takeishi S, Kamada Y, **Naka T**, Miyoshi E. Identification of sialylated glycoproteins in doxorubicin-treated hepatoma cells with glycoproteomic analyses. *J Proteome Res* 2014 Nov 7;13(11):4869-77.

5. Morimoto A, Serada S, Enomoto T, Kim A, Matsuzaki S, Yokoyama T, Takahashi T, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Fujimoto M, Kimura T, **Naka T**. Annexin A4 induces platinum resistance in a chloride- and calcium-dependent manner. *Oncotarget*.

2014 Sep 15;5(17):7776-87.

6. Kotobuki Y, Yang L, Serada S, Tanemura A, Yang F, Nomura S, Kudo A, Izuhara K, Murota H, Fujimoto M, Katayama I, **Naka T**. Periostin Accelerates Human Malignant Melanoma Progression by Modificating the Melanoma Microenvironment. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014 Jul;27(4):630-9.

7. Oji Y, Tatsumi N, Fukuda M, Nakatsuka S, Aoyagi S, Hirata E, Nanchi I, Fujiki F, Nakajima H, Yamamoto Y, Shibata S, Nakamura M, Hasegawa K, Takagi S, Fukuda I, Hoshikawa T, Murakami Y, Mori M, Inoue M, **Naka T**, Tomonaga T, Shimizu Y, Nakagawa M, Hasegawa J, Nezu R, Inohara H, Izumoto S, Nonomura N, Yoshimine T, Okumura M, Morii E, Maeda H, Nishida S, Hosen N, Tsuboi A, Oka Y, Sugiyama H. The translation elongation factor eEF2 is a novel tumor-associated antigen overexpressed in various types of cancers. *Int J Oncol.* 2014 May;44(5):1461-9.

8. Yang L, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Kudo A, **Naka T**, Katayama I. Histamine Contributes to Tissue Remodeling via Periostin Expression. *J Invest Dermatol.* 2014 Aug;134(8):2105-13.

9. Matsuzaki S, Enomoto T, Serada S, Yoshino K, Nagamori S, Morimoto A, Yokoyama T, Kim A, Kimura T, Ueda Y, Fujita M, Fujimoto M, Kanai Y, Kimura T, **Naka T**. Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A. *Int J Cancer.* 2014 Apr

15;134(8):1796-809.

10. Sadaoka T, Serada S, Kato J, Hayashi M, Gomi Y, **Naka T**, Yamanishi K, Mori Y. Varicella-zoster virus ORF49 functions in the efficient production of progeny virus through its interaction with essential tegument protein ORF44. *J Virol.* 2014 Jan;88(1):188-201.

11. Ota M, Serada S, **Naka T**, Mori Y. MHC class I molecules are incorporated into human herpesvirus-6 viral particles and released into the extracellular environment. *Microbiol Immunol.* 2014 Feb;58(2):119-25.

G-2. 学会発表

1. 2014 ACR/ARHP Annual Meeting: November 14 - 19 Boston, Massachusetts. Boston Convention & Exhibition Center. Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein Is a Potential Disease Activity Marker Under IL-6 Suppression in Autoimmune Arthritis. Yusuke Takahashi, Minoru Fujimoto, Satoshi Serada and **Tetsuji Naka**

2. 2014 ICIS: 26th - 29th October 2014 Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne. Leucine-rich $\alpha 2$ glycoprotein promotes TGF β 1-induced apoptosis in the lewis lung carcinoma cell lines. Norihiko Takemoto, Tomoshige Matsumoto, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, **Tetsuji Naka**

3. EULAR2014 Paris: June 14 2014 Measurement of serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein a novel disease

activity biomarker in rheumatoid arthritis
for the detection of biologic-associated
tuberculosis. Tomoharu Ohkawara, Minoru
Fujimoto, Satoshi Serada, Tetsuji Naka.

H. 知的財産権の出願・登録状況

名 称 : 食道がんのマーカーおよび
その利用
発明者 : 仲哲治、世良田聡、
藤本穰、豊浦雅義、
庄屋雄二
出願人 : 独立行政法人
医薬基盤研究所
名称 : 悪性腫瘍の治療薬
出願日 : 2013 年 12 月 27 日
出願番号 : 特願 2013-272085
国際出願番号 : PCT/JP2014/006455
出願日 : 2014 年 12 月 25 日

名称 : 悪性腫瘍の治療薬
発明者 : 仲哲治、世良田聡、
藤本穰、豊浦雅義、
庄屋雄二
出願人 : 独立行政法人
医薬基盤研究所
出願日 : 2013 年 12 月 27 日
出願番号 : 特願 2013-272084
国際出願番号 : PCT/JP2014/006456
出願日 : 2014 年 12 月 25 日

I. 研究協力者

藤本 穰 医薬基盤研究所
免疫シグナルプロジェクト

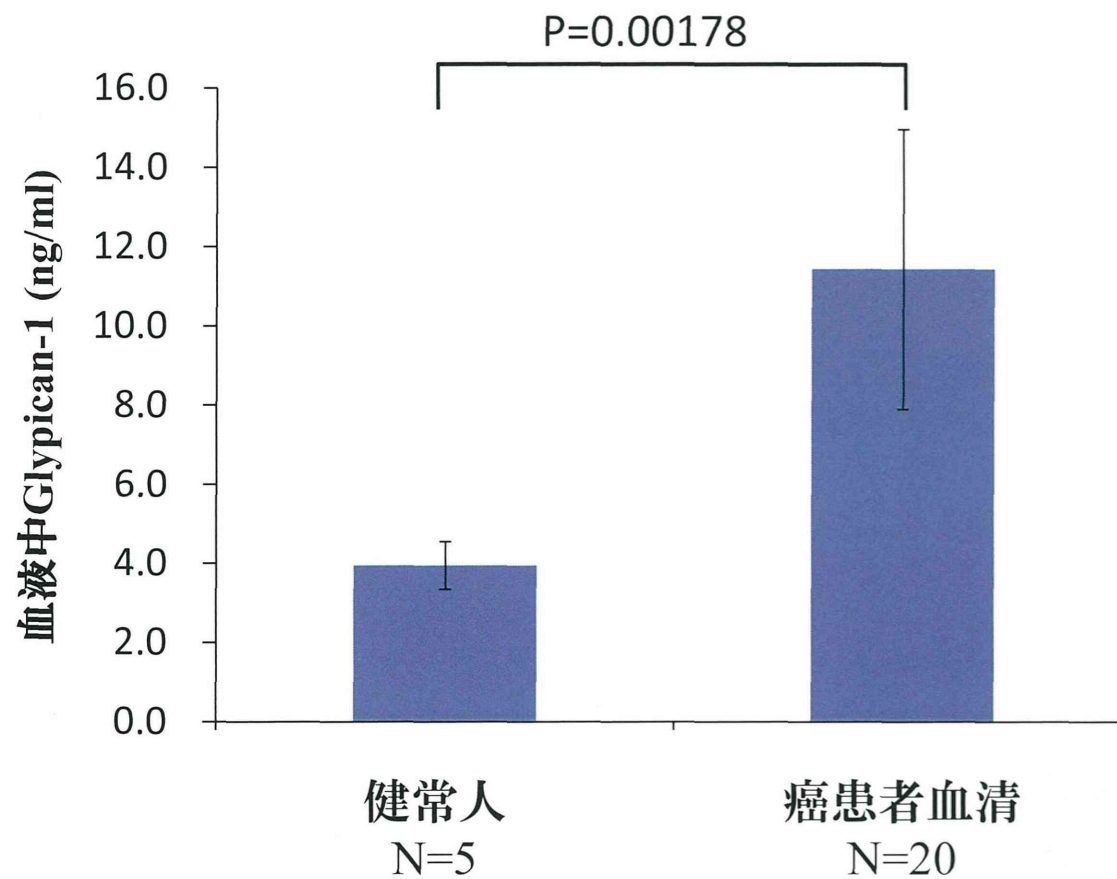


図1. サンドイッチ ELISAによる血清中Glypican-1の定量結果

Glypican-1 を定量する ELISA システムの開発

担当責任者 柳町守 主幹研究員

エーザイ株式会社

エーザイ・プロダクトクリエーション・システムズ

バイオマーカー&パーソナライズド・メディスン機能ユニット

バイオマーカーリサーチグループ

研究要旨

Glypican-1 は業務主任者が同定した食道癌の新規癌抗原である。業務主任者等は独自に開発した Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を食道癌に対する抗体医薬品として、エーザイ（株）、（株）ファーマフーズと開発中である。本研究の目的は、上記抗体医薬品の奏功性が期待される患者を選定するためのコンパニオン診断薬を同時開発し、実用化することである。

食道癌の治療成績は手術手技等の向上に加え、化学療法の進歩により改善しつつあるものの、Stage II・IIIの食道癌に術前化学療法を施行し切除した症例でも5年生存率はわずか55%であり、進行食道癌の治療成績は未だ低いというのが現状である(Ando et al. Ann Surg Oncol. 2012)。化学療法に対する耐性も予後不良の因子の1つであることから、食道癌の治療成績の向上には新規治療法の開発が急務である。業務主任者が同定した Glypican-1 は食道癌に高発現する膜タンパク質であり、食道癌患者血液中においても可溶性の Glypican-1 が検出される。業務主任者等は食道癌に対する新規抗体医薬品として Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を開発し、担癌マウスにおける優れた抗腫瘍効果を明らかにし、抗 Glypican-1 抗体が重篤な毒性も見られないことも明らかにした（国際出願 PCT/JP2014/006455）。抗 Glypican-1 抗体の効果的な臨床応用にあたり、その適応対象となる Glypican-1 を高発現する食道癌患者を適切に選定するためのコンパニオン診断薬が必要となる。そのため、低侵襲且つ簡便な血液中の Glypican-1 を定量する ELISA システムを開発する。

本年度において担当責任者は業務主任者等が独自に開発した Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を2種類ずつ組み合わせることによりサンドイッチ ELISA システムの構築を試みた。その結果、Glypican-1 を定量的に検出出来る ELISA システムを開発した。

A. 研究目的

本研究の目的は、業務主任者が同定した食道癌の新規癌抗原である Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を食道癌に対する抗体医薬品として開発するにあたり、上記抗体医薬品の奏功性が期待される患者を選定するためのコンパニオン診断薬を同時開発し、実用化することである。

本研究では、業務主任者等が独自に開発した Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を2種類ずつ組み合わせることによりサンドイッチ ELISA システムの構築を目的とした。

B. 研究方法

（1）抗 Glypican-1 モノクローナル抗体の biotin 標識

業務主任者等が独自に開発した Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を用いてサンドイッチ ELISA を構築するため、抗体を biotin 標識し、検出用抗体として用いることとした。200 µg の抗 Glypican-1 モノクローナル抗体(#4、#7、#17、#18、#19)をビオチンラベリングキット(同仁化学、#LK03)を用いてビオチン標識した(#18のみ抗体残量が少ないため、100 µg をビオチン標識に用いた)。

(2) 抗 Glypican-1 モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA システムの構築

抗 Glypican-1 モノクローナル抗体(#4、#7、#17、 #18、 #19)を 50mM Carbonate Bicarbonate buffer pH9.6 で10 μ g/ml に希釈した。続いて、Nunc Plate Maxisorp 96 well plate (型番 439454)に、100 μ l/well で添加し、プレートにシールをして4度で一晩インキュベートすることで抗体をプレートに固相化した。翌日、ウェルを200 μ l の PBS+0.05% Tween 20(PBST)で3回洗浄した。その後、dilution buffer (50 mM Tris-HCl, 138mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.05% Tween 20, pH8.0 (TBST) + 0.5% BSA + 0.4% BLOCK ACE)を200 μ l/well 添加し、プレートにシールをして室温で1時間静置した。ウェルを200 μ l の PBST で3回洗浄した。Standard の human Glypican-1 (R&D systems 4519-GP-050) (0、 1.56、 3.125、 6.25、 12.5、 25、 50、 100 ng/ml)を100 μ l/well で添加 (n=2)し、プレートにシールをして室温で1時間振とうした。ウェルを200 μ l の PBST で3回洗浄した。Biotin 標識抗 Glypican-1 モノクローナル抗体(#4、 #7、 #17、 #18、 #19)を Dilution buffer で1.0 μ g/mL に希釈し、100 μ l/well で96well マイクロプレートに添加し、プレートにシールをして室温で1時間振とうした。ウェルを200 μ l の PBST で3回洗浄した。NeutrAvidin-HRP (Invitrogen:A2664) を Dilution buffer で3000倍希釈し、100 μ l/well で96well マイクロプレートに添加し、プレートにシールをして室温で1時間振とうした。ウェルを200 μ l の PBST で3回洗浄した。TMB (SurModics, TMBW-1000-01) を使用前に常温に戻し、100 μ l/well ずつ96well マイクロプレートに添加し、プレートにシールをして室温、遮光下で振とうし、発色させた。発色反応は1N-Sulfuric acid を50 μ l/well 加えることで停止し、マイクロプレートリーダー(BioRad, model 680)を用いて測

定した。主波長 450 nm、参照波長 630 nm を測定した。

(倫理面への配慮)

該当無し。

C. 研究結果

結果はD項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

5種類の抗 Glypican-1 モノクローナル抗体について、biotin 標識を行い、2種類ずつクロンを組み合わせることで Glypican-1 のサンドイッチ ELISA 定量システムの構築を試みた。その結果、いずれのクロンの組み合わせによっても、Glypican-1 を定量出来る事が明らかになった(図 1)。今後、感度をより高めた ELISA システムの構築を試みる。

E. 結論

本研究にて、5種類の抗 Glypican-1 モノクローナル抗体より、2種類ずつ組み合わせることで、Glypican-1 を定量出来る ELISA システムの構築に成功した。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

該当無し。

G-2. 学会発表

該当無し。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

I. 研究協力者

該当無し

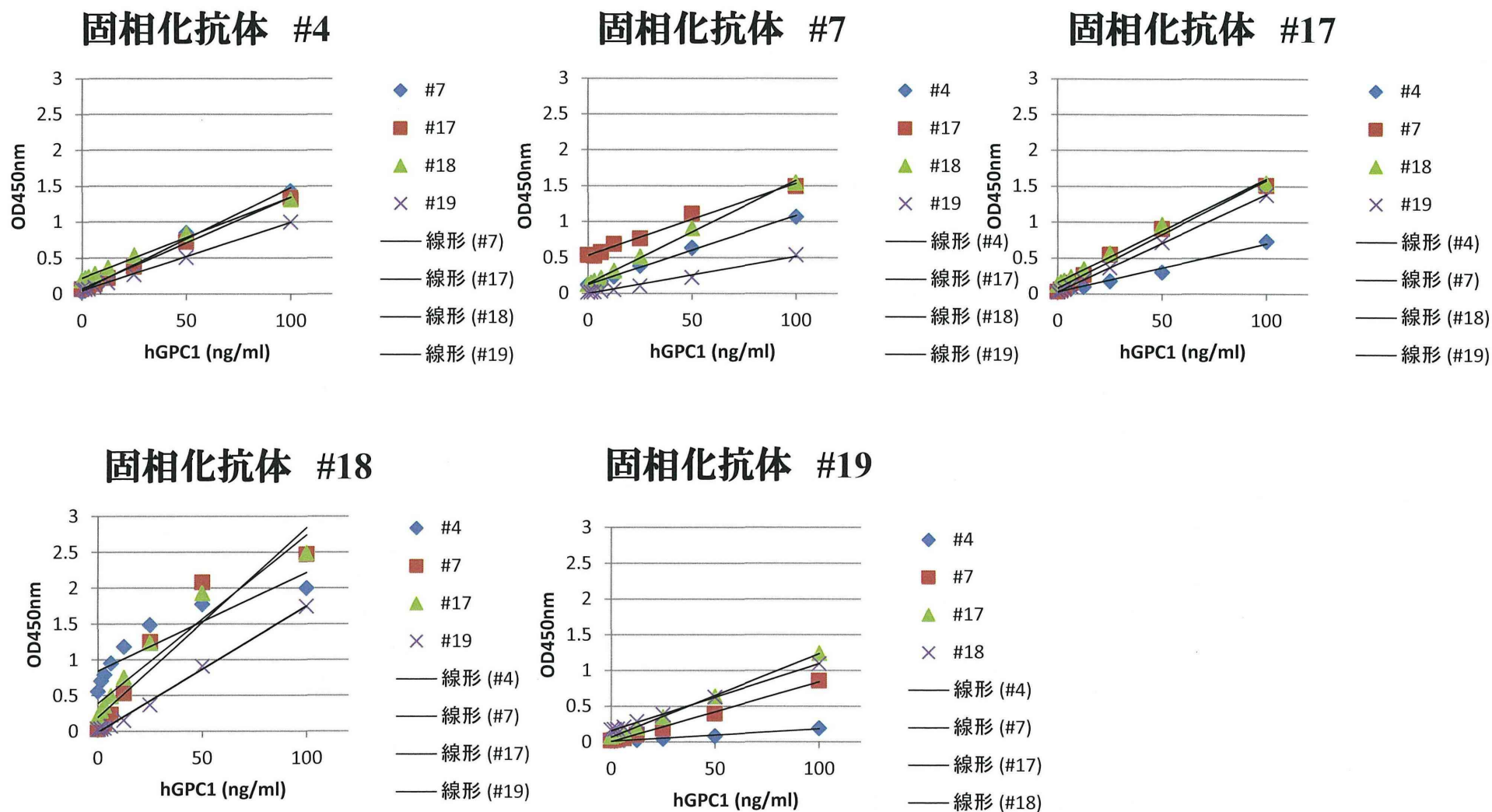


図1. 各種クローン組み合わせによるGPC1のサンドイッチ ELISAの結果

Glypican-1 モノクローナル抗体の精製

担当責任者 豊浦雅義 株式会社ファーマフーズ開発部 バイオメディカル事業担当部長

研究要旨

Glypican-1 は業務主任者が同定した食道癌の新規癌抗原である。業務主任者等は独自に開発した Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を食道癌に対する抗体医薬品として、エーザイ（株）、（株）ファーマフーズと開発中である。本研究の目的は、上記抗体医薬品の奏功性が期待される患者を選定するためのコンパニオン診断薬を同時開発し、実用化することである。

食道癌の治療成績は手術手技等の向上に加え、化学療法の進歩により改善しつつあるものの、Stage II・III の食道癌に術前化学療法を施行し切除した症例でも 5 年生存率はわずか 55% であり、進行食道癌の治療成績は未だ低いというのが現状である (Ando et al. Ann Surg Oncol. 2012)。化学療法に対する耐性も予後不良の因子の 1 つであることから、食道癌の治療成績の向上には新規治療法の開発が急務である。業務主任者が同定した Glypican-1 は食道癌に高発現する膜タンパク質であり、食道癌患者血液中においても可溶性の Glypican-1 が検出される。業務主任者等は食道癌に対する新規抗体医薬品として Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を開発し、担癌マウスにおける優れた抗腫瘍効果を明らかにし、抗 Glypican-1 抗体が重篤な毒性も見られないことも明らかにした（国際出願 PCT/JP2014/006455）。抗 Glypican-1 抗体の効果的な臨床応用にあたり、その適応対象となる Glypican-1 を高発現する食道癌患者を適切に選定するためのコンパニオン診断薬が必要となる。そのため、低侵襲且つ簡便な血液中の Glypican-1 を定量する ELISA システムを開発する。

本年度において担当責任者は業務主任者等が独自に開発した Glypican-1 に対するモノクローナル抗体の精製を試みた。精製抗体を業務主任者、担当責任者に輸送し、抗体の性状解析、ELISA システム構築に用いた。

A. 研究目的

本研究の目的は、業務主任者が同定した食道癌の新規癌抗原である Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を食道癌に対する抗体医薬品として開発するにあたり、上記抗体医薬品の奏功性が期待される患者を選定するためのコンパニオン診断薬を同時開発し、実用化することである。

本研究において担当責任者は、血液中の Glypican-1 を定量できる ELISA システムを構築するために必要な Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を精製する事を目的とした。

B. 研究方法

（１）抗 Glypican-1 モノクローナル抗体の発現と精製

これまでにニワトリにヒト Glypican-1 を免疫し、ファージディスプレイ法を用いて Glypican-1 に対するモノクローナル抗体の開発を行った結果、#2、#4、#7、#10、#17、#18、#19 の 7 種類のクローンの開発に成功している。それぞれのクローンについて Fc 領域をマウス IgG2a に改変した発現ベクターを調製した。これらのクローンについて、H 鎖、L 鎖の抗体遺伝子発現ベクターのプラスミドを精製し、Expi 293 Expression system (Life technologies) を用いて Expi293 細胞に一過性にトランスフェクションし、96 時間後に培

養上清を回収した。

培養上清中の抗体はProtein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Bio-Sciences Corp)に結合させ、PBS で洗浄後、100 mM glycine-100 mM sodium chloride buffer (pH 3.0) を用いて酸溶出を行い、溶出した抗体を中和した後、Amicon Ultra (Millipore)を用いて1.0 から 2.0 mg/ml の濃度に濃縮した。

(倫理面への配慮)

該当無し。

C. 研究結果

結果はD 項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

これまでに作成した Glypican-1 に対するモノクローナル抗体として7 種類のクローンを開発することに成功した。これらのクローンについて、抗体遺伝子発現ベクターを増幅、精製し、Expi293 細胞に一過性にトランスフェクションした培養上清から抗体を精製した結果、7 種類の抗体それぞれについて精製することに成功した。研究代表者の仲のグループに抗体を輸送し、得られたクローンの性状を評価しつつ、ELISA システムの構築に抗体を使用した。

E. 結論

本研究にて、血液中の Glypican-1 を定量できる ELISA システムを構築するために必要な Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を7 種類精製することに成功した。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

該当無し。

G-2. 学会発表

該当無し。

H. 知的財産権の出願・登録状況

名称 : 食道がんのマーカーおよび

その利用

発明者 : 仲哲治、世良田聡、藤本穰、
豊浦雅義、庄屋雄二

出願人 : 独立行政法人医薬基盤研究所

名称 : 悪性腫瘍の治療薬

出願日 : 2013 年 12 月 27 日

出願番号 : 特願 2013-272085

国際出願番号 : PCT/JP2014/006455

出願日 : 2014 年 12 月 25 日

名称 : 悪性腫瘍の治療薬

発明者 : 仲哲治、世良田聡、藤本穰、
豊浦雅義、庄屋雄二

出願人 : 独立行政法人医薬基盤研究所

出願日 : 2013 年 12 月 27 日

出願番号 : 特願 2013-272084

国際出願番号 : PCT/JP2014/006456

出願日 : 2014 年 12 月 25 日

I. 研究協力者

該当無し。

Glypican-1 モノクローナル抗体の性状解析

担当責任者 藤尾慈 大阪大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学 教授

研究要旨

Glypican-1 は業務主任者が同定した食道癌の新規癌抗原である。業務主任者等は独自に開発した Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を食道癌に対する抗体医薬品として、エーザイ（株）、（株）ファーマフーズと開発中である。本研究の目的は、上記抗体医薬品の奏功性が期待される患者を選定するためのコンパニオン診断薬を同時開発し、実用化することである。

食道癌の治療成績は手術手技等の向上に加え、化学療法の進歩により改善しつつあるものの、Stage II・III の食道癌に術前化学療法を施行し切除した症例でも 5 年生存率はわずか 55% であり、進行食道癌の治療成績は未だ低いというのが現状である (Ando et al. Ann Surg Oncol. 2012)。化学療法に対する耐性も予後不良の因子の 1 つであることから、食道癌の治療成績の向上には新規治療法の開発が急務である。業務主任者が同定した Glypican-1 は食道癌に高発現する膜タンパク質であり、食道癌患者血液中においても可溶型の Glypican-1 が検出される。業務主任者等は食道癌に対する新規抗体医薬品として Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を開発し、担癌マウスにおける優れた抗腫瘍効果を明らかにし、抗 Glypican-1 抗体が重篤な毒性も見られないことも明らかにした（国際出願 PCT/JP2014/006455）。抗 Glypican-1 抗体の効果的な臨床応用にあたり、その適応対象となる Glypican-1 を高発現する食道癌患者を適切に選定するためのコンパニオン診断薬が必要となる。そのため、低侵襲且つ簡便な血液中の Glypican-1 を定量する ELISA システムを開発する。

本年度において担当責任者は業務主任者等が独自に開発した Glypican-1 に対するモノクローナル抗体の親和性の解析を実施した。Biacore 解析の結果、クローン#4 を始め親和性の高い抗体を取得できていることが確認された。血液中の Glypican-1 を定量する ELISA システムを構築するにあたり、本研究成果から得られた情報を活用する。

A. 研究目的

本研究の目的は、業務主任者が同定した食道癌の新規癌抗原である Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を食道癌に対する抗体医薬品として開発するにあたり、上記抗体医薬品の奏功性が期待される患者を選定するためのコンパニオン診断薬を同時開発し、実用化することである。

本研究では、血液中の Glypican-1 を定量できる ELISA システムを構築するために必要な Glypican-1 に対する複数種類のモノクローナル抗体について Biacore を用いて親和性を解析する事を目的とした。

B. 研究方法

（１）FACS による抗 Glypican-1 モノクローナル抗体のエピトープ解析

抗 Glypican-1 抗体の親和性解析は Biacore3000 を用いて測定した。まず、CM5 sensor tip (GE, 型番 BR1000-12) に EDC/NHS 試薬を用いたアミンカップリング法によりウサギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体を Mouse Antibody Capture Kit (GE, 型番 BR1008-38) を用いて固相化した。続いて抗 Glypican-1 抗体の各種クローンをキャプチャーし、リガンドとして リコンビナント human Glypican-1 (R&D systems 4519-GP-050) を各種濃度 (3.125 nM-400 nM) で添

加し、結合と解離をモニターした。得られたセンサーグラムは BIAevaluation 4.1 software を用いて解析し、 K_D 値を算出した。

(倫理面への配慮)

該当無し。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

研究代表者等が開発した抗 Glypican-1 モノクローナル抗体 7 クローンについて、Biacore3000 を用いて K_D 値の算出を試みた。図 1、図 2 に示すとおり、 K_D 値は #4 が 2.61 nM、#18 が 6.19 nM、#19 が 6.88 nM、#7 が 13.0 nM、#17 が 15.25 nM、#2 が 20.9 nM、#10 が 176 nM であった。

E. 結論

本研究にて 7 種類の抗 Glypican-1 モノクローナル抗体の親和性を明らかにすることに成功した。本研究にて得られた成果を血液中の Glypican-1 を定量できる ELISA システムを構築する際に活用する。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Matsuo, R., Morihara, H., Mohri, T., Murasawa, S., Takewaki, K., Nakayama, H., Maeda, M., Fujio, Y. The inhibition of N-glycosylation of glycoprotein 130 molecule abolishes STAT3 activation by IL-6 family cytokines in cultured cardiac myocytes. *PLoS One* 2014; 9: e111097.

G-2. 学会発表

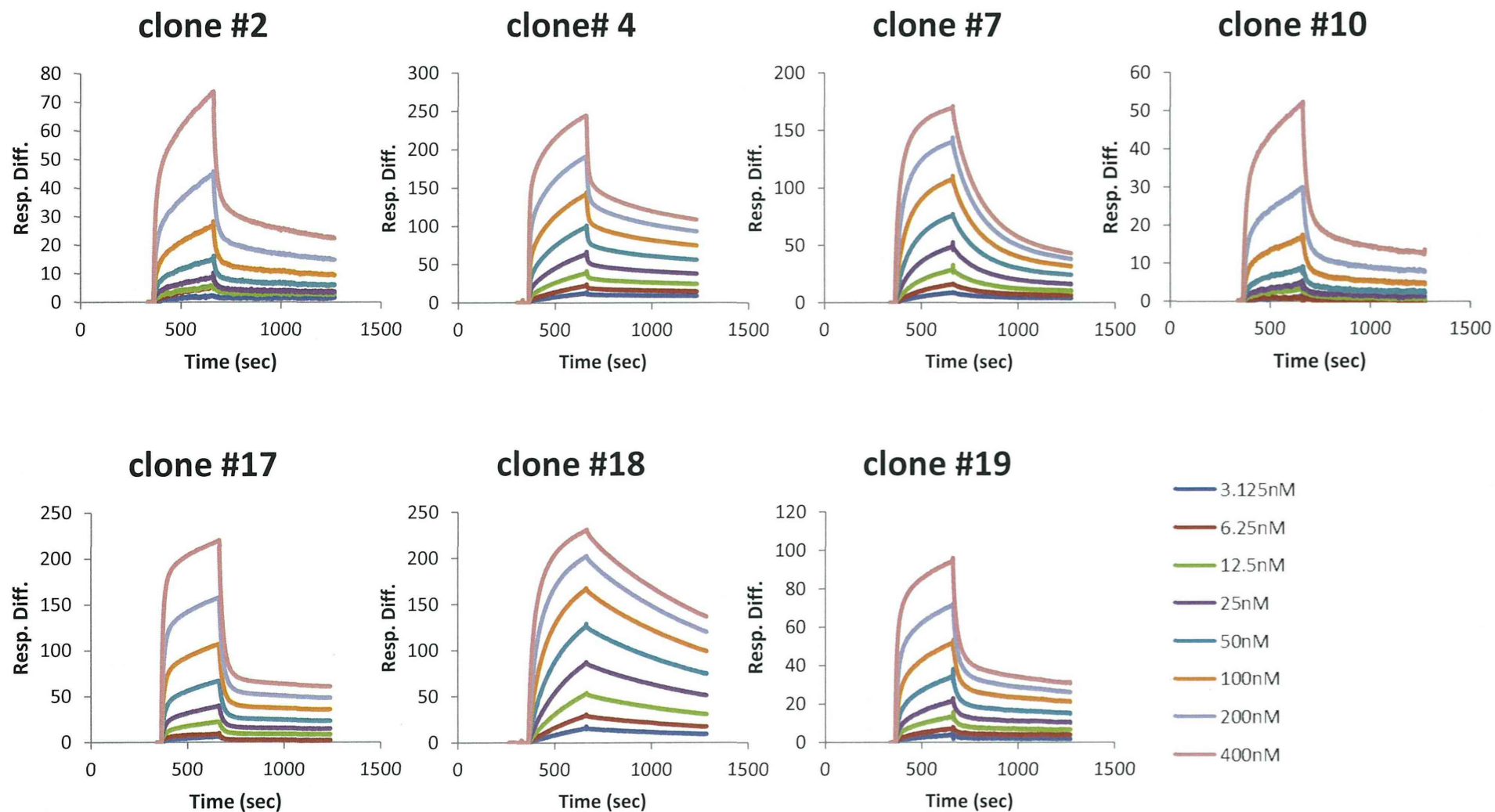
該当無し。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

I. 研究協力者

該当無し。



Recombinant Human Glypican 1 (R&DSystems)

Catalog Number: 4519-GP

図1. Biacore解析による解離定数の算出

	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	K _D
#2	4.55x10 ⁴	9.51x10 ⁻⁴	20.9 nM
#4	1.87x10 ⁵	4.88x10 ⁻⁴	2.61 nM
#7	1.64x10 ⁵	2.13x10 ⁻³	13.0 nM
#10	1.21x10 ⁴	2.13x10 ⁻³	176 nM
#17	6.91x10 ⁴	1.05x10 ⁻³	15.25 nM
#18	1.37x10 ⁵	8.48x10 ⁻⁴	6.19 nM
#19	1.23x10 ⁵	8.45x10 ⁻⁴	6.88 nM

図2. Biacore解析による解離定数の算出

消化器癌患者血清と手術組織の収集（Glypican-1 血清抗体価測定に向けて）

担当責任者 土岐祐一郎 大阪大学大学院医学系研究科外科学講座消化器外科 教授

研究要旨

Glypican-1 は業務主任者が同定した食道癌の新規癌抗原である。業務主任者等は独自に開発した Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を食道癌に対する抗体医薬品として、エーザイ（株）、（株）ファーマフーズと開発中である。本研究の目的は、上記抗体医薬品の奏功性が期待される患者を選定するためのコンパニオン診断薬を同時開発し、実用化することである。

食道癌の治療成績は手術手技等の向上に加え、化学療法の進歩により改善しつつあるものの、Stage II・IIIの食道癌に術前化学療法を施行し切除した症例でも5年生存率はわずか55%であり、進行食道癌の治療成績は未だ低いというのが現状である(Ando et al. Ann Surg Oncol. 2012)。化学療法に対する耐性も予後不良の因子の1つであることから、食道癌の治療成績の向上には新規治療法の開発が急務である。業務主任者が同定した Glypican-1 は食道癌に高発現する膜タンパク質であり、食道癌患者血液中においても可溶性の Glypican-1 が検出される。研究代表者等は食道癌に対する新規抗体医薬品として Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を開発し、担癌マウスにおける優れた抗腫瘍効果を明らかにし、抗 Glypican-1 抗体が重篤な毒性も見られないことも明らかにした（国際出願 PCT/JP2014/006455）。

抗 Glypican-1 抗体の効果的な臨床応用にあたり、その適応対象となる Glypican-1 を高発現する食道癌患者を適切に選定するため、低侵襲且つ簡便な血液中可溶性 Glypican-1 を定量する ELISA システムを開発する予定である。本年度は、この ELISA キットを用いて、食道癌患者をはじめとした消化器癌の血清を測定できるように、大阪大学医学部附属病院消化器外科において検体バンクの構築を行なった。この検体バンクのシステムを用いて、食道癌患者だけでなく、その他各種の消化器癌の貴重な血液サンプルを収集するシステムを整備した。本システムにより抗体医薬品の対象患者の選定につながる成果と考える。

A. 研究目的

本研究の目的は、業務主任者が同定した食道癌の新規癌抗原である Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を食道癌に対する抗体医薬品として開発するにあたり、上記抗体医薬品の奏功性が期待される患者を選定するためのコンパニオン診断薬を同時開発し、実用化することである。

担当責任者が所属する大阪大学消化器外科では、これまで、担当責任者は個別の臨床検体のニーズに対して個別に必要な検体を準備することとして対応していたが、個別の研究計画書を臨床研究倫理審査委員会に提出して承

認を得てから患者検体の収集をしていたため、非常に煩雑であり、検体の収集に時間がかかるといった問題点があった。そのため、臨床研究に利用する目的で検体を収集する包括同意のもと検体を常時収集する検体バンクを作成し、すみやかに基礎研究への臨床検体提供を行なうシステムの構築を行なった。本研究においてもこのシステムを用いて検体を供給する予定である。

B. 研究方法

担当責任者が中心となり、大阪大学医学部附属病院において臨床検体の収集し検体バン