

クに集積するために「消化器疾患患者生体試料の保存」という課題名で、大阪大学医学部附属病院の臨床研究倫理審査委員会において承認を得た（承認番号 08226-4）。この検体バンクシステムは、担当責任者が所属する大阪大学消化器外科を中心に大阪大学医学部附属病院にて血清検体、切除標本の収集を行ない、大阪大学消化器外科内に検体を保存する。臨床データの収集と管理は大阪大学消化器外科において行い必要があれば臨床検体を提供する体制を整備する。将来的に検体を収集でき施設を増やし、バンクの充実を図って行く予定である。

（倫理面への配慮）

大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会により承認を得て、文書により包括同意を得て、検体を収集する。今後、本研究への利用に関し、大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会に改めて承認審査予定である。その際に、医薬基盤研究所を共同研究者、研究協力者としている。

C. 結果・考察

検体バンクとして包括同意のもと、検体の収集を開始している。特に初診時、術前化学療法後、手術後と各治療に応じた血清サンプル、切除標本サンプルを臨床情報と対応させ蓄積している。

現時点で本研究の対象とならないものも含めて 600 検体以上のサンプルが集積され、検体バンクとしてのシステムは順調に稼働している。次年度は本研究への利用に関し、大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会への承認審査などの手続きを行なう。

さらに、大阪大学関連施設において、同様のサンプルの蓄積を図るべく各病院での臨床研究倫理審査委員会に提出予定である。

E. 結論

本研究において必要な臨床検体の収集する

ためのシステムが構築でき、順調に検体を蓄積しており、さらに検体の集積を広く行なっていく準備が整った。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Eguchi H., Nagano H., Kobayashi S., Kawamoto K., Wada H., Hama N., Tomimaru Y., Akita H., Sakai D., Satoh T., Kudo T., Isohashi F., Mori M., **Doki Y.** A phase I trial of combination therapy using gemcitabine and S-1 concurrent with full-dose radiation for resectable pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014;73(2):309-315.

2. Takemasa I., Uemura M., Nishimura J., Mizushima T., Yamamoto H., Ikeda M., Sekimoto M., **Doki Y.**, Mori M. Feasibility of single-site laparoscopic colectomy with complete mesocolic excision for colon cancer: a prospective case-control comparison. *Surg Endosc* 2014;28(4):1110-1118.

3. Hata T., Yasui M., Murata K., Okuyama M., Ohue M., Ikeda M., Ueshima S., Kitani K., Hasegawa J., Tamagawa H., Fujii M., Ohkawa A., Kato T., Morita S., Fukuzaki T., Mizushima T., Sekimoto M., Nezu R., **Doki Y.**, Mori M. Safety of fondaparinux to prevent venous thromboembolism in Japanese patients undergoing colorectal cancer surgery: a multicenter study. *Surg Today* 2014;44(11):2116-2123.

4. Kurokawa Y., Sugimoto N., Miwa H.,

Tsuda M., Nishina S., Okuda H., Imamura H., Gamoh M., Sakai D., Shimokawa T., Komatsu Y., Doki Y., Tsujinaka T., Furukawa H. Phase II study of trastuzumab in combination with S-1 plus cisplatin in HER2-positive gastric cancer (HERBIS-1). *Br J Cancer* 2014;110(5):1163-1168.

5. Wada H., Yamamoto H., Kim C., Uemura M., Akita H., Tomimaru Y., Hama N., Kawamoto K., Kobayashi S., Eguchi H., Umeshita K., Doki Y., Mori M., Nagano H. Association between ephrin-A1 mRNA expression and poor prognosis after hepatectomy to treat hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2014;45(3):1051-1058.

6. Hara J., Miyata H., Yamasaki M., Sugimura K., Takahashi T., Kurokawa Y., Nakajima K., Takiguchi S., Mori M., Doki Y. Mesenchymal phenotype after chemotherapy is associated with chemoresistance and poor clinical outcome in esophageal cancer. *Oncol Rep* 2014;31(2):589-596.

7. Miyazaki Y., Nakajima K., Sumikawa M., Yamasaki M., Takahashi T., Miyata H., Takiguchi S., Kurokawa Y., Tomiyama N., Mori M., Doki Y. Magnetic resonance imaging for simultaneous morphological and functional evaluation of esophageal motility disorders. *Surg Today* 2014;44(4):668-676.

8. Sugimura K., Miyata H., Yamasaki M., Takahashi T., Kurokawa Y., Motoori M., Nakajima K., Takiguchi S., Morii E., Yano

M., Mori M., Doki Y. Clinical significance of muscle layer interruption in T3 esophageal Esophagus 2014;11(2):117-125.

9. Takahashi H., Yamasaki M., Hirota M., Miyazaki Y., Moon JH., Souma Y., Mori M., Doki Y., Nakajima K. Automatic smoke evacuation in laparoscopic surgery: a simplified method for objective evaluation. *Surr Endosc* 2014;27(8):2980-2987.

10. Tanaka K., Takiguchi S., Miyashiro I., Hirao M., Yamamoto K., Imamura H., Yano M., Mori M., Doki Y. Impact of reconstruction method on visceral fat change after distal gastrectomy: results from a randomized controlled trial comparing Billroth I reconstruction and roux-en-Y reconstruction. *Surgery* 2014;155(3):424-431.

11. Hirota M., Kato M., Yamasaki M., Kawai N., Miyazaki Y., Yamada T., Takahashi T., Takehara T., Mori M., Doki Y., Nakajima K. A novel endoscopic submucosal dissection technique with robust and adjustable tissue traction. *Endoscopy* 2014;46:499-502.

12. Hirota M., Miyazaki Y., Takahashi T., Yamasaki M., Takiguchi S., Mori M., Doki Y., Nakajima K. Dynamic Article: Steady Pressure CO2 Colonoscopy: Its Feasibility and Underlying Mechanism. *Dis Colon Rectum* 2014;57:1120-1128.

13. Takata A., Takiguchi S., Okada K., Takahashi T., Kurokawa Y., Yamasaki M., Miyata H., Nakajima K., Mori M., Doki Y. Clinicopathological and Prognostic

Significance of FOXM1 Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Anticancer Res 2014;34(5):2427-2432.

14. Takata A., Takiguchi S., Okada K., Takahashi T., Kurokawa Y., Yamasaki M., Miyata H., Nakajima K., Mori M., Doki Y. Expression of insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein-3 as a marker for predicting clinical outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Oncol Lett 2014;8(5):2027-2031.

15. Takata A., Nakajima K., Kurokawa Y., Takahashi T., Yamasaki M., Miyata H., Takiguchi S., Mori M., Doki Y. Single-incision laparoscopic partial gastrectomy for gastric submucosal tumors without compromising transumbilical stapling. Asian J Endosc Surg. 2014;7(1):25-30.

16. Saito T., Kurokawa Y., Takiguchi S., Masaki M., Doki Y. Current status of function-preserving surgery for gastric cancer. World J Gastroenterol 2014;20(46):17297-17304.

17. Wada N., Kurokawa Y., Takiguchi S., Takahashi T., Yamasaki M., Miyata H., Nakajima K., Mori M., Doki Y. Feasibility of laparoscopy-assisted total gastrectomy in patients with clinical stage I gastric cancer. Gastric Cancer 2014;17(1):137-140.

18. Wada N., Kurokawa Y., Takiguchi S., Takahashi T., Yamasaki M., Miyata H., Nakajima K., Mori M., Doki Y. Subgroups of patients with very large gastrointestinalstromal tumors with

distinct prognoses: A multicenter study. J Surg Oncol 2014; 109(2):67-70.

19. Endo S., Takiguchi S., Miyazaki Y., Nishikawa K., Imamura H., Takachi K., Kimura Y., Takeno A., Tamura S., Mori M., Doki Y. Efficacy of endoscopic gastroduodenal stenting for gastric outlet obstruction due to unresectable advanced gastric cancer: a prospective multicenter study. J Surg Oncol 109(3):208-212.

20. Kato M., Nakajima K., Yamada T., Hirota M., Miyazaki Y., Yamasaki M., Nishida T., Mori M., Doki Y., Tujii M., Takehara T. Esophageal submucosal dissection under steady pressure automatically controlled endoscopy (SPACE) : a clinical feasibility study. Endoscopy 2014;76(8):680-684.

G-2. 学会発表

1. 2014年 ISDE 14th World Congress: November 22 - 24 Vancouver, Canada GEJ TUMORS: ARE THEY ESOPHAGEAL OR GASTRIC? Doki Y.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し。

I. 研究協力者

山崎誠（大阪大学大学院医学研究科消化器外科学助教）、牧野知紀（大阪大学大学院医学研究科消化器外科学助教

食道癌切除標本における Glypican-1 発現と臨床病理学的検討

担当責任者 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

研究要旨

Glypican-1 は業務責任者が同定した食道癌の新規癌抗原である。業務責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。業務責任者が同定した 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。業務責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。まず、食道癌切除標本を用いて、食道癌患者における GPC1 発現状況を検討し、臨床的特徴を明らかにすることを目的とした。2000-2012年に当院において、R0切除を施行した胸部食道癌患者178例を対象とした。抗 GPC1 抗体による免疫染色を施行し、臨床病理学的因子（pTNM, ly 因子、v 因子、組織学的分化度分類、術前化学療法施行の有無）との関係を検討した。さらに、全生存期間との関係について検討を行った。免疫組織学的評価は、発色強度および腫瘍部染色面積よりスコア化を行い、低発現群、高発現群を決定した。免疫染色を行った結果、176例（99%）が陽性であった。GPC1 低発現群(100例)及び高発現群(78例)の2群間での検討では年齢、性別、pT、pN、pM、ly、v、組織型との関連性は認めなかった。全生存期間については、高発現群（5年生存率:38%）が低発現群（5年生存率:71%）に比べて有意に予後不良を示した（ $P<0.0001$ ）。また、全生存に関わる多変量解析では、pT、pN 因子に加えて GPC1 強発現が独立した予後因子になることがわかった。その結果、食道癌切除検体についての臨床病理学的検討より GPC1 強発現は独立した予後因子の一つであった。

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、標的となる食道癌患者における GPC1 発現状況を検討し、

さらにはその臨床的特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 対象患者

2000-2012年に当院において、治療切除を施

行した胸部食道癌患者 178 例を対象とした。年齢の中央値（範囲）は 64（39-80）歳、性別は男:女=157：21 人であった。

D. 結果・考察

（1）免疫染色

免疫組織学的評価は、（正常基底層を internal control として同等以上の発色があるものを陽性とした。）、発色強度および腫瘍部染色面積よりスコア化を行い、低発現群、高発現群を決定した（図 1）。免疫染色を行った結果、176 例（99%）が陽性であった。GPC1 低発現群（100 例）及び高発現群（78 例）の 2 群間での検討では年齢、性別、pT、pN、pM、ly、v、組織型との関連性は認めなかった。高発現群では、術前化学療法施行例が多く認められた（ $P=0.044$ ）。

（2）臨床病理学的検討

全生存期間については、高発現群（5 年生存率：38%）が低発現群（5 年生存率：71%）に比べて有意に予後不良を示した（ $P<0.0001$ ）（図 2）。また、死亡に関わる多変量解析では、pT、pN 因子に加えて GPC1 強発現が独立した予後因子になることがわかった。

（3）化学療法感受性への関与。

術前化学療法後の組織学的効果との検討において、高発現群で低発現群に比べ有意に効果不良（Grade0-1）となった割合を多く認めた（ $P<0.0001$ ）。

（倫理面への配慮）

大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会により承認を得て、文書により包括同意（承認番号 08226-4）を得て、検体を収集した。

E. 結論

食道癌切除検体についての臨床病理学的検討より GPC1 強発現は独立した予後因子の一つであり、化学療法耐性に関与する可能性が

示唆された。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. **Takahashi T**, Nakajima K, Miyazaki Y, Miyazaki Y, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Takiguchi S, Nishida T, Mori M, Doki Y. Surgical Strategy for the Gastric Gastrointestinal Stromal Tumors (GISTs) Larger Than 5 cm: Laparoscopic Surgery is Feasible, Safe, and Oncologically Acceptable. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech. 2014 in press.

2. Takata A, Nakajima K, Kurokawa Y, **Takahashi T**, Yamasaki M, Miyata H, Takiguchi S, Mori M, Doki Y. Single-incision laparoscopic partial gastrectomy for gastric submucosal tumors without compromising transumbilical stapling. Asian J Endosc Surg. 2014 Jan;7(1):25-30.

3. Miyata H, Yamasaki M, **Takahashi T**, Murakami K, Tanaka K, Yukinori K, Nakajima K, Takiguchi S, Morii E, Hatazawa J, Mori M, Doki Y. Determinants of response to neoadjuvant chemotherapy for esophageal cancer using 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (18F-FDG-PET). Ann Surg Oncol. 2014 Feb;21(2):575-82.

4. Hara J, Miyata H, Yamasaki M, Sugimura K, **Takahashi T**, Kurokawa Y, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y. Mesenchymal phenotype after

chemotherapy is associated with chemoresistance and poor clinical outcome in esophageal cancer. *Oncol Rep.* 2014 Feb;31(2):589-96.

5. Takata A, Kurokawa Y, Fujiwara Y, Nakamura Y, **Takahashi T**, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y. Prognostic value of CEA and CK20 mRNA in the peritoneal lavage fluid of patients undergoing curative surgery for gastric cancer. *World J Surg.* 2014 May;38(5):1107-11.

6. Yamasaki M, Miyata H, Miyazaki Y, **Takahashi T**, Kurokawa Y, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y. Evaluation of the Nodal Status in the 7th Edition of the UICC-TNM Classification for Esophageal Squamous Cell Carcinoma: Proposed Modifications for Improved Survival Stratification : Impact of Lymph Node Metastases on Overall Survival after Esophagectomy. *Ann Surg Oncol.* 2014 21(9):2850-6.

7. Takata A, Takiguchi S, Okada K, **Takahashi T**, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Mori M, Doki Y. Clinicopathological and prognostic significance of FOXM1 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2014 May;34(5):2427-32.

8. Wada N, Kurokawa Y, Takiguchi S, **Takahashi T**, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Mori M, Doki Y. Feasibility of laparoscopy-assisted total gastrectomy in patients with clinical stage I gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2014;17(1):137-140.

9. Miyazaki Y, Nakajima K, Sumikawa M, Yamasaki M, **Takahashi T**, Miyata H, Takiguchi S, Kurokawa Y, Tomiyama N, Mori M, Doki Y. Magnetic resonance imaging for simultaneous morphological and functional evaluation of esophageal motility disorders. *Surg Today.* 2014;44(4):668-76.

10. Hirota M, Kato M, Yamasaki M, Kawai N, Miyazaki Y, Yamada T, Takahashi T, Takehara T, Mori M, Doki Y, Nakajima K. A novel endoscopic submucosal dissection technique with robust and adjustable tissue traction. *Endoscopy.* 2014;46(6):499-502.

11. Hirota M, Miyazaki Y, Takahashi T, Yamasaki M, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, Nakajima K. Dynamic article: steady pressure CO2 colonoscopy; its feasibility and underlying mechanism. *Dis Colon Rectum.* 2014;57(9):1120-8.

12. Takata A, Takiguchi S, Okada K, Takahashi T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Mori M, Doki Y. Expression of insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein-3 as a marker for predicting clinical outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2014;8(5):2027-2031.

G-2. 学会発表

1. 26th EORTC-NCI-AACR symposium on molecular targets and cancer therapies 20141114–1118, Barcelona Spain, Gastrointestinal stroma tumor associated with neurofibromatosis type 1. **Takahashi T**, Nishida T, Nakatsuka R, Kaneda M,

Hirota S, Miyazaki Y, Kurokawa Y,
Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K,
Takiguchi S, Mori M, Doki Y, Serada S,
Naka T.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

I. 研究協力者

瀧口修司（大阪大学消化器外科講師）、原尚
志（大阪大学消化器外科医員）

図1. 食道癌免疫染色(GPC1)

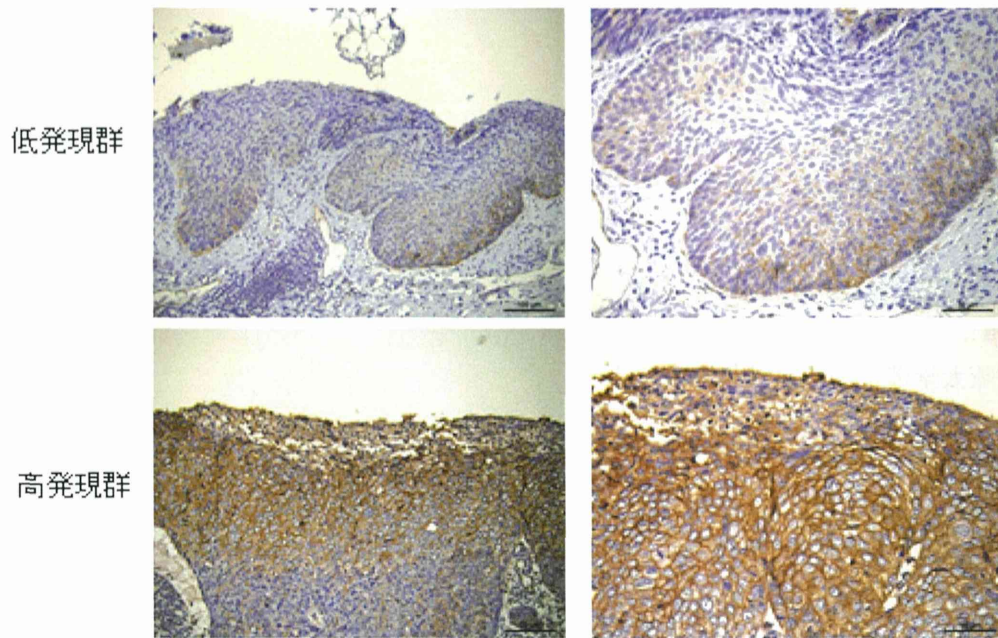
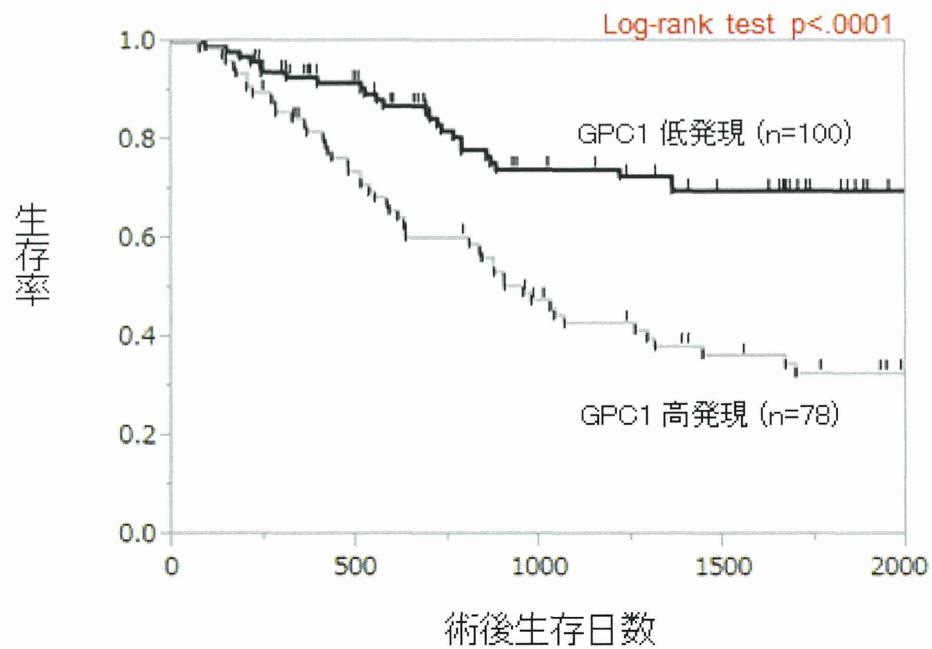


図2. 食道癌全生存率



抗 Glypican-1 モノクローナル抗体のエピトープ解析

担当責任者 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

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エピトープ領域の解析を実施した。Turncate mutation および hGlypican-1/hGlypican-3 キメラタンパク質を用いた FACS 解析、および、質量分析計を用いた解析の結果、各種クローンのエピトープ解析を明らかにした。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 に対するモノクローナル抗体のエピトープ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

Human Glypican-1 (GPC1) の全長をコードする発現ベクター pcDNA3.1-hGPC1 を構築した。pcDNA3.1-hGPC1 を鋳型として PCR 法により、33-61 番目のアミノ酸を欠失する pcDNA3.1-hGPC1 Δ 33-61 を構築した。さらに、hGPC1 の N 末端 FLAG タグ融合タンパク質発現ベクターとして pFLAG-CMV3-hGPC1 (24-558)、hGPC3 の N 末端 FLAG タグ融合タンパク質発現ベクターとして pFLAG-CMV3-hGPC3 (25-580)、

hGPC1/hGPC3 キメラタンパク質発現ベクターと し て pFLAG-CMV3-hGPC1 (24-429)hGPC3 (438-580) を作成した(図 1)。

これらの発現ベクターを lipofectamine2000(Life technologies)を用いて 293 細胞に遺伝子導入し一過性に発現させた。Transfection27 時間後に、細胞を PBS で洗浄し、0.02% EDTA で剥離し、遠心分離により回収した。細胞を 2×10^5 個ずつ 96 ウェルプレートに移し、 $10 \mu\text{g/ml}$ の各種抗体を添加し、4 度で 30 分染色した。染色後、細胞を洗浄し、goat-anti-mouse IgG(H+L) chain specific FITC conjugate を用いて 4 度で 30 分、遮光下で染色した。細胞を洗浄し、FACS Canto II を用いて測定を行った。得られた結果は FlowJo ソフトウェアを用いて解析した。

(2) 質量分析計による抗 Glypican-1 モノクローナル抗体のエピトープ解析

抗 Glypican-1 抗体#4 のエピトープ領域を明らかにするため、免疫沈降した抗原抗体複合体をトリプシン消化し、抗体に結合した、ペプチド領域を質量分析計で同定した。

抗 Glypican-1 抗体#4 を $2.0 \mu\text{g}$ あるいはマウス IgG2 (biolegend 社、400224、MOPC-173) を $2.0 \mu\text{g}$ と リ コ ン ビ ナ ント Glypican-1(R&Dsystems 4519-GP-050) を $2.0 \mu\text{g}$ を混合し、protein G sepharose を用いて免疫沈降した。その後、を $0.2 \mu\text{g}$ のトリプシンを用いてビーズ上で酵素消化し、さらにビーズを洗浄した後、抗体に結合したペプチドを 0.2%ギ酸水で溶出し、LC-MS/MS 解析と MASCOT search program(version 2.4.1; Matrix Science)によるデータベースサーチを行う事で、ペプチドの解析を行った。

(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

(株)ファーマフーズにて精製された Glypican-1 に対するモノクローナル抗体として 7 種類のクローンのエピトープ解析を試みた。

ヒト Glypican-1 の全長の発現ベクターより 33-61 番目のアミノ酸を欠失させた truncate mutant を作成した。この発現ベクターを 293 細胞にトランスフェクションし、各種抗 Glypican-1 抗体との反応性を FACS により解析した。その結果、#7 と #19 の 2 クローンにおいて、FACS での反応性が消失していたことから、#7 と #19 のエピトープは 33-61 番目の領域に存在すると考えられた(図 2)。

続いて、各種抗 Glypican-1 抗体が Glypican-1 とは反応するが、Glypican-3 とは反応しない性質を利用して、Glypican-1 の 430 番目以降のアミノ酸配列を Glypican-3 に置換したキメラタンパク質発現ベクターを作成した。各種発現ベクターを 293 細胞にトランスフェクションし、各種抗 Glypican-1 抗体との反応性を FACS により解析した。その結果、#17、#2、#10 の 3 クローンにおいては、FACS での反応性が認められなかったため、これらのクローンにおいて、エピトープ領域は Glypican-1 の細胞外領域に相当する 430 から 530 番目に存在すると考えられた(図 3)。

抗 Glypican-1 抗体#4 のエピトープ領域について、質量分析計を用いて解析を行った。その結果、コントロール抗体と比較して抗 Glypican-1 抗体#4 のサンプルに特異的に検出されたペプチド配列として、339-358, 388-404, 405-421 が検出された。従って、抗 Glypican-1 抗体#4 のエピトープは 339-358 番目のアミノ酸領域および 388-421 のアミノ酸領域に存在する事が確認された。以上を図 4 にまとめた。

E. 結論

本研究にて、研究代表者が開発した Glypican-1 に対するモノクローナル抗体のエピトープを解析することに成功した。エピトープ解析より得られた情報を、サンドイッチ 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. 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 Modifying the Melanoma Microenvironment. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014 Jul;27(4):630-9.

7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. 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 $\beta 1$ -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、藤本稔、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、藤本稔、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。

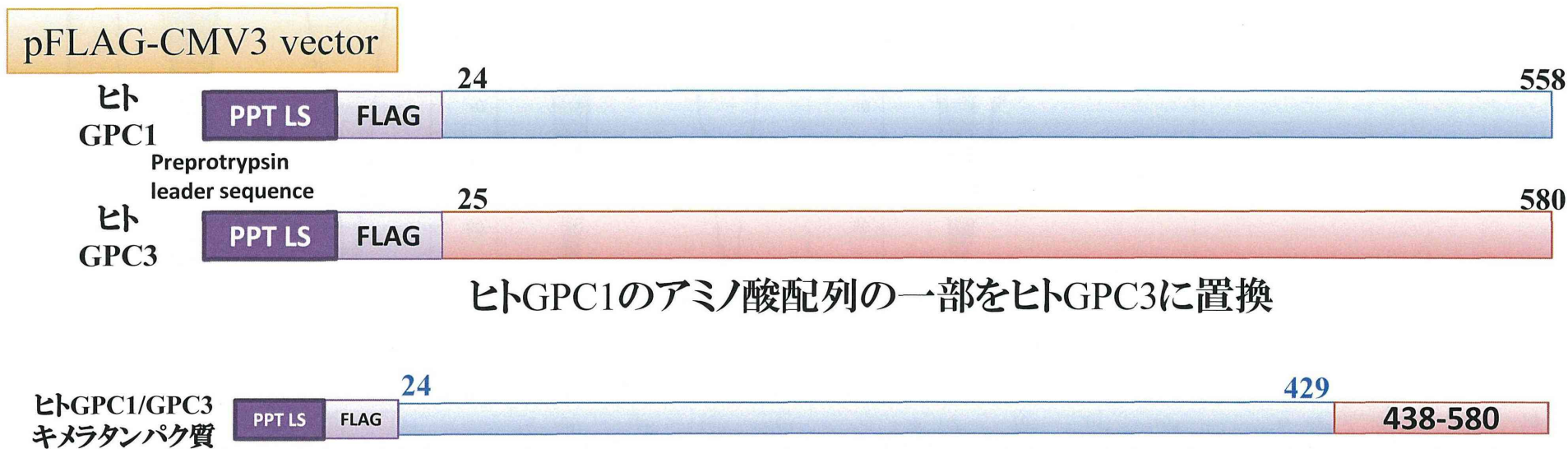


図1. ヒトGPC1/GPC3キメラタンパク質を用いた抗GPC1抗体のエピトープ解析

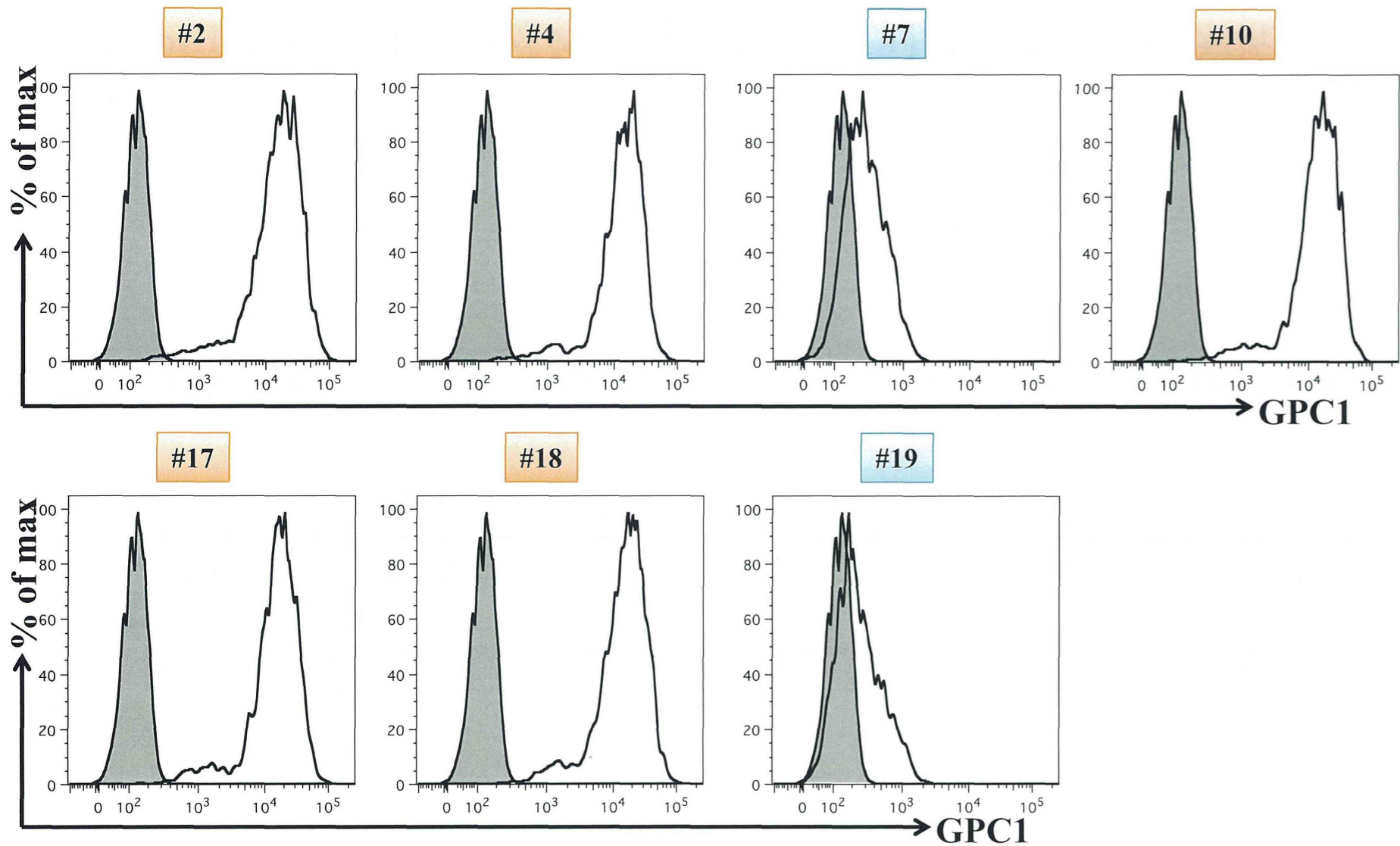


図2. Anti-GPC-1mAb (#7、#19)は33-61番目のアミノ酸にエピトープ領域が存在する

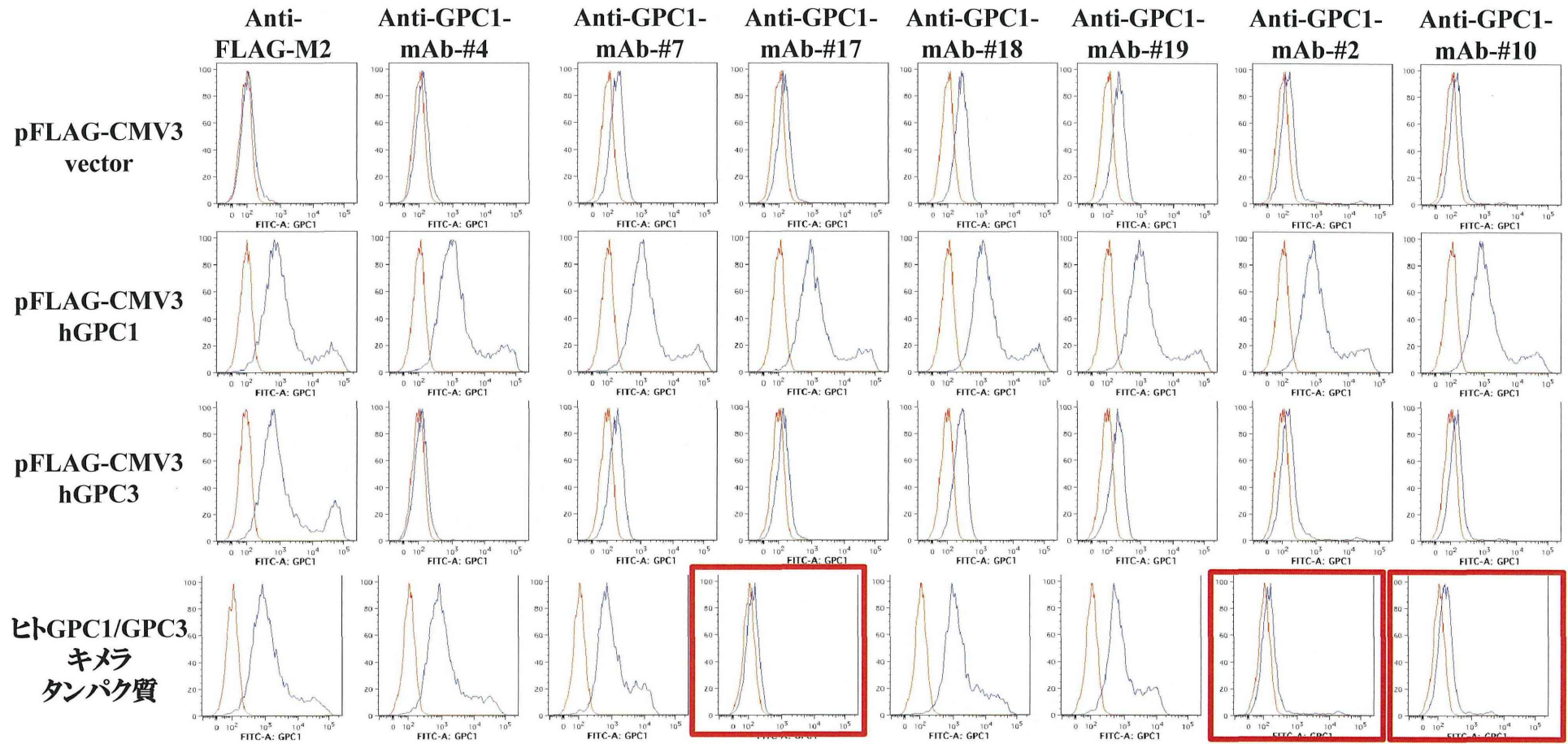


図3. ヒトGPC1/GPC3キメラタンパク質を用いた抗GPC1抗体のエピトープ解析


```

10      20      30      40      50
MELRARGWWL LCAAAALVAC ARGDPASKSR SCGEVQRQIYG AKGFSLSDVY
60      70      80      90      100
QAEISGEHLR LCPQGYTCCT SEMEENLANR SHAELETALR DSSRYLQAML
110     120     130     140     150
ATQLRSFDDH FQHLLNDSER TLQATFPGAF GELYTQNARA FRDLYSELRL
160     170     180     190     200
YYRGANLHLE ETLAEFWARL LERLFKQLHP QLLLPPDYLD CLGKQAEALR
210     220     230     240     250
PFGAEPRELRLRATRAFYAA RSFVQGLGVA SDVYRKYAQV PLGPECSRVA
260     270     280     290     300
MKLVYCAHCL GVPGARPCPD YCRNVKLGCL ANQADLDAEW RNLLDSMYLI
310     320     330     340     350
TDKFWGTSGV ESVGISVHTW LAEAINALQD NRDTLTAKVI QGCGNPKVNP
360     370     380     390     400
QGPQPEEKRR RGKLAPRRERPSGTLEKLYS EAKAQLFDYQ DFWISLPGTL
410     420     430     440     450
CSEKMALSTA SDDRCWNGMA RGRYLPEVMG DGLANQINNP EVEVDITKPD
460     470     480     490     500
MTIRQQIMQL KIMTNRLRSA YNGNDYDFQD ASDDGSGSGS GDGCLDDLCS
510     520     530     540     550
RKVSRKSSSS RTPLTHALPG LSEQEGQKTS AASCPQPPTF LLPLLLFLAL
TVARPRWR

```

	hGPC1
#4	339-358, 388-421
#7	33-61
#17	430-530
#19	33-61
#2	430-530
#10	430-530

図4. 抗GPC1抗体のエピトープ領域一覧

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目：「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」

機関名：独立行政法人 医薬基盤研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein Is a Potential Disease Activity Marker Under IL-6 Suppression in Autoimmune Arthritis. (Poster) <業務主任者>	Takahashi Y, Fujimoto M, Serada S, <u>Naka T.</u>	2014 ACR/ARHP Annual Meeting: Massachusetts Boston Convention & Exhibition Center	2014 November 14 - 19	国外
Leucine-rich $\alpha 2$ glycoprotein promotes TGF $\beta 1$ -induced apoptosis in the lewis lung carcinoma cell lines. (Poster) <業務主任者>	Takemoto N, Matsumoto T, Serada S, Fujimoto M, <u>Naka T.</u>	2014 ICIS: Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne	2014 October 26 - 29	国外
Measurement of serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein a novel disease activity biomarker in rheumatoid arthritis for the detection of biologic-associated tuberculosis. (Poster) <業務主任者>	Ohkawara T, Fujimoto M, Serada S, <u>Naka T.</u>	EULAR 2014: Paris	2014 June 14	国外
1GEJ TUMORS: ARE THEY ESOPHAGEAL OR GASTRIC? <担当責任者>	<u>Doki Y.</u>	2014年ISDE 14th World Congress: Vancouver, Canada	2014 November 22 - 24	国外
Gastrointestinal stroma tumor associated with neurofibromatosis type 1. (Poster) <担当責任者>	<u>Takahashi T.</u> , Nishida T, Nakatsuka R, Kaneda M, Hirota S, Miyazaki Y, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, Serada S, Naka T.	26th EORTC-NCI-AACR symposium on molecular targets and cancer therapies. Barcelona Spain	2014 November 14-18	国外

Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein Is a Potential Disease Activity Marker Under IL-6 Suppression in Autoimmune Arthritis (Poster) <担当責任者>	Takahashi Y, Fujimoto M, <u>Serada S</u> and Naka T.	ACR/ARHP Annual Meeting: Boston, Massachusetts	2014 November 14 - 19	国外
Leucine-rich $\alpha 2$ glycoprotein promotes TGF $\beta 1$ -induced apoptosis in the lewis lung carcinoma cell lines (Poster) <担当責任者>	Takemoto N, Matsumoto T, <u>Serada S</u> , Fujimoto M, Naka T.	ICIS Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne	2014 October 26-29	国外
Measurement of serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein a novel disease activity biomarker in rheumatoid arthritis for the detection of biologic-associated tuberculosis. (Poster) <担当責任者>	Ohkawara T, Fujimoto M, <u>Serada S</u> , Naka T.	EULAR 2014: Paris	2014 June 14	国外

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Clinico-Pathological Significance of Leucine-Rich Alpha-2-Glycoprotein-1 in Sera of Patients with Pancreatic Cancer. <業務主任者>	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, <u>Naka T</u> , Mori M, Doki Y, Miyoshi E, Nagano H.	Pancreas	2015Jan; 44(1):93-98	国外
Proteomic identification of heterogeneous nuclear RNP-K as a novel cold-associated autoantigen in patients with secondary Raynaud's phenomenon. <業務主任者>	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, <u>Naka T</u> .	Rheumatology	2014 In Press	国外

Human herpesvirus 6 gM/gN complex interacts with v-SNARE in infected cells. <業務主任者>	Kawabata A, Serada S, <u>Naka T.</u> , Mori Y.	J Gen Virol	2014 Dec; 95 (Pt 12): 2769-77.	国外
Identification of sialylated glycoproteins in doxorubicin-treated hepatoma cells with glycoproteomic analyses. <業務主任者>	Azuma K, Serada S, Takamatsu S, Terao N, Takeishi S, Kamada Y, <u>Naka T.</u> , Miyoshi E.	J Proteome Res	2014 Nov 7:13(11): 4869-77.	国外
Annexin A4 induces platinum resistance in a chloride- and calcium-dependent manner. <業務主任者>	Morimoto A, Serada S, Enomoto T, Kim A, Matsuzaki S, Yokoyama T, Takahashi T, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Fujimoto M, Kimura T, <u>Naka T.</u>	Oncotarget	2014 Sep 15; 5(17): 7776-87.	国外
Periostin Accelerates Human Malignant Melanoma Progression by Modifying the Melanoma Microenvironment. <業務主任者>	Kotobuki Y, Yang L, Serada S, Tanemura A, Yang F, Nomura S, Kudo A, Izuhara K, Murota H, Fujimoto M, Katayama I, <u>Naka T.</u>	Pigment Cell Melanoma Res	2014 Jul;27(4): 630-9	国外
The translation elongation factor eEF2 is a novel tumor-associated antigen overexpressed in various types of cancers. <業務主任者>	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, <u>Naka T.</u> , 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.	Int J Oncol	2014 May;44(5): 1461-9.	国外
Histamine Contributes to Tissue Remodeling via Periostin Expression. <業務主任者>	Yang L, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Kudo A, <u>Naka T.</u> , Katayama I.	J Invest Dermatol	2014 Aug;134(8): 2105-13	国外

Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A. <業務主任者>	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, <u>Naka T.</u>	Int J Cancer	2014 Apr 15; 134(8): 1796-809	国外
Varicella-zoster virus ORF49 functions in the efficient production of progeny virus through its interaction with essential tegument protein ORF44. <業務主任者>	Sadaoka T, Serada S, Kato J, Hayashi M, Gomi Y, <u>Naka T.</u> , Yamanishi K, Mori Y.	J Virol	2014 Jan;88(1): 188-201	国外
MHC class I molecules are incorporated into human herpesvirus-6 viral particles and released into the extracellular environment. <業務主任者>	Ota M, Serada S, <u>Naka T.</u> , Mori Y.	Microbiol Immunol	2014 Feb; 58(2): 119-25	国外
The inhibition of N-glycosylation of glycoprotein 130 molecule abolishes STAT3 activation by IL-6 family cytokines in cultured cardiac myocytes. <担当責任者>	Matsuo R, Morihara H, Mohri T, Murasawa S, Takewaki K, Nakayama H, Maeda M, <u>Fujio Y.</u>	PLoS One	2014; 9:e111097.	国外
A phase I trial of combination therapy using gemcitabine and S-1 concurrent with full-dose radiation for resectable pancreatic cancer. <担当責任者>	Eguchi H, Nagano H, Kobayashi S, Kawamoto K, Wada H, Hama N, Tomimaru Y, Akita H, Sakai D, Satoh T, Kudo T, Isohashi F, Mori M, <u>Doki Y.</u>	Cancer Chemother Pharmacol	2014; 73(2): 309-315.	国外
Feasibility of single-site laparoscopic colectomy with complete mesocolic excision for colon cancer: a prospective case-control comparison. <担当責任者>	Takemasa I, Uemura M, Nishimura J, Mizushima T, Yamamoto H, Ikeda M, Sekimoto M, <u>Doki Y.</u> , Mori M.	Surg Endosc	2014; 28(4): 1110-1118	国外