

令和元年6月17日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10595

研究課題名(和文) 膵がん細胞表面に存在する抗原分子の機能解析と早期診断・治療法への応用

研究課題名(英文) Two types of monoclonal antibodies generated by immunizing mice with MIA-PaCa-2 human pancreatic cancer cell line for diagnostic and therapeutic strategies for pancreatic cancer

研究代表者

田島 義証 (Tajima, Yoshitsugu)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：20264228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト膵がん細胞株を免疫源として、がん細胞表面を認識するマウスモノクローナル抗体を産生する2種類のハイブリドーマを樹立した。質量解析の結果、4-6.8は上皮成長因子受容体(EGFR)を認識する抗体であった。12-13.8はプロテインアレイ解析および遺伝子ノックアウト解析により抗原として膜タンパク質を同定した。12-13.8は1)ヒトがん組織を用いた免疫組織学的解析でがん細胞表面を特異的に染色し、2)その染色強度は肺がんおよび膵がん患者の予後と相関していた。3)担がんモデルマウスにおいて、同標識抗体の腫瘍部への集積、4)同抗体修飾抗腫瘍薬内包リポソームによる腫瘍増殖抑制効果を有することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト膵がん細胞株MIA-PaCa-2を免疫源として樹立した、がん細胞表面を認識するマウスモノクローナル抗体12-13.8はその染色強度は肺がんおよび膵がん患者の予後と相関しており、同抗体修飾抗腫瘍薬内包リポソームを用いた治療実験により腫瘍増殖抑制効果を有することを確認した。12-13.8はがんの早期診断・予後診断、さらにバイオ医薬品開発の重要なシーズとなる。

研究成果の概要(英文)：Two types of monoclonal antibodies were generated by immunizing mice with MIA-PaCa-2 human pancreatic cancer cell line. Mass spectrometry analysis revealed that mAb 4-6.8 recognizes human epidermal growth factor receptor (EGFR). Protein array analysis and CRISPR/Cas9 system showed that mAb 12-13.8 recognizes a cell membrane glycoprotein. mAb 12-13.8 stained the cell membrane of cancer cells and increased 12-13.8-positive staining worsened the prognosis of lung and pancreatic cancer patients using immunohistochemistry. *in vivo* imaging system (IVIS) elucidated that mAb 12-13.8 labeled with indocyanine green (ICG) was concentrated at palpable tumors of MIA-PaCa-2 cells implanted subcutaneously in nu/nu mice. And Liposome-based cancer drug delivery system with mAb 12-13.8 as an active targeting ligand markedly suppresses the growth of MIA-PaCa-2 cells implanted subcutaneously in nu/nu mice.

The mAb 12-13.8 will be very useful for diagnostic and therapeutic strategies for pancreatic cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：モノクローナル抗体 膵がん 早期診断 治療法 がん表面抗原 バイオ医薬品開発

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

がんは我が国において死亡原因の第1位である。今後も高齢者を中心に増加が予想され、国民の健康に対する最大の脅威となっている。がんのなかでも膵がんの5年相対生存率は10%以下と最も低い。難治性がん、特に膵がんに対する早期診断・治療法の早急な構築は喫緊の課題であり、がん特異的ながん細胞膜表面タンパク質を標的とした新しい分子標的の探索が切望されている。

平成27年度上半期の報告では、日本の医薬品輸出額 2,300 億円に比べ、海外からの輸入額は1兆4千億円を超え、年間では約2兆5千億円以上の輸入超過になる。世界中で広く使われるような日本発の対がんバイオ医薬品の開発は、輸入超過を食い止めるための極めて重要な国家プロジェクトである。本研究課題より生み出される特徴的な抗体は、抗体医療に応用できる日本発のバイオ医薬品を生み出す可能性があり、研究を推進するに十分な意義があると考えている。また、膵がん患者はその5年相対生存率の低さから“死亡宣告”を受けたにも等しい状況である。島根県は日本で膵がん罹患率が高いことが知られおり、膵がんに対する早期診断およびよりよい治療法の開発は地域における高齢者の安心な暮らしと直結している。

### 2. 研究の目的

がん細胞膜表面を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、細胞膜表面抗原を同定する。膵がんの臨床検体を用いて免疫組織染色により抗原分子の染色強度と予後との相関を明らかにする。さらに担がんマウスにおいてがん治療に応用できるかどうかを検討することで、がんの早期診断/予後診断、さらに抗体治療の開発基盤を確立することが本研究課題の目的である。

### 3. 研究の方法

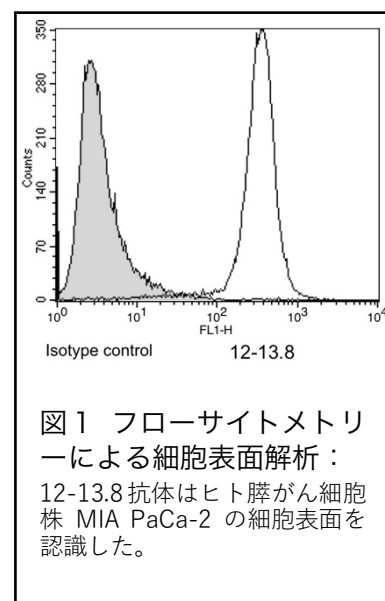
- (1) ヒト膵がん細胞株 MIA PaCa-2 を免疫源として、MIA PaCa-2 細胞膜表面を認識するモノクローナル抗体を樹立する。
- (2) 免疫沈降可能なモノクローナル抗体について、膵がん細胞膜表面に存在する抗原分子を質量解析により同定する。
- (3) 膵がん臨床検体を用いたモノクローナル抗体による免疫組織染色と予後解析を行う。
- (4) ヒト膵がん細胞株 MIA PaCa-2 を移植した担がんモデルマウスを用いて、抗体修飾抗腫瘍薬内包リポソームによる腫瘍増殖抑制効果を確認する。

### 4. 研究成果

(1) ヒト膵がん細胞株 MIA PaCa-2 を免疫源として、MIA PaCa-2 細胞膜表面を認識するモノクローナル抗体（以下、抗体）を7種類樹立した（図1）。線維芽細胞株など正常細胞株では認めず、膵がんや肺がんをはじめ多くのがん腫の細胞株の細胞膜表面を認識した。

(2) 免疫沈降可能な抗体について、膵がん細胞膜表面に存在する抗原分子の質量解析による同定：

質量解析により未知の抗原分子を同定するためには抗体による免疫沈降が必須である。7種類のうち免疫沈降が可能であった抗体は3種類（12-13.8, 4-6.8 および 10-15.1）であった（図2）。その後 10-15.1 は抗体価が消失した。夾雑物を除くため細胞膜分画を精製後それぞれの抗体を用いて免疫沈降し、質量解析をおこなった。



質量解析の結果、4-6.8 は上皮成長因子受容体 (EGFR) を認識する抗体であった。MIA-PaCa-2 を 4-6.8 抗体で免疫沈降後、EGFR 抗体によるウエスタンブロット法により、再検した。

12-13.8 の認識する抗原は、タンパク質分解酵素などを変更するなど質量解析を計 6 回行ったが、同定できなかった。そのため、ヒトタンパク質をコードする 16,152 の遺伝子を基に発現させたタンパク質を搭載したプロテインアレイ解析 (CDI Laboratories 社、「HuProt Human Proteome Microarray v3.1」) を行い、直接抗原タンパク質を同定することとした。

プロテインアレイ解析のランキングトップ 5 の人工遺伝子を合成し、大腸菌で発現させ 12-13.8 抗体によるウエスタンブロット法を行ったところ、細胞膜タンパク質であることが判明した。そこで、その遺伝子を CRISPR/Cas9 システムを用いて、MIA-PaCa-2 細胞株からノックアウトしたところ、ウエスタンブロット法で 12-13.8 が認識できなため、同定した遺伝子が本物であることが確認された。

(3) 12-13.8 抗体を用いたヒト肺がんおよび膵がん組織の免疫組織学的解析：

12-13.8 抗体はがん組織においてがん細胞を特異的に染色した (図 3)。その染色強度は肺がんおよび膵がん患者の予後と関連していた (図 4)。

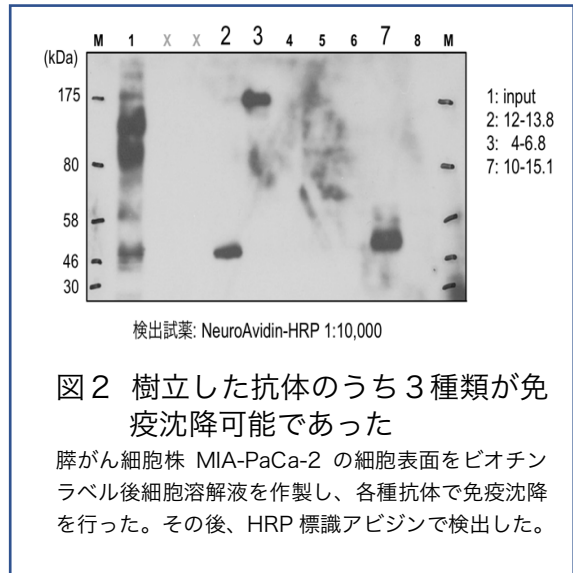


図 2 樹立した抗体のうち 3 種類が免疫沈降可能であった

膵がん細胞株 MIA-PaCa-2 の細胞表面をビオチンラベル後細胞溶解液を作製し、各種抗体で免疫沈降を行った。その後、HRP 標識アビジンで検出した。



図 3 免疫組織染色：

12-13.8 抗体は肺がん組織においてがん細胞を特異的に認識した。

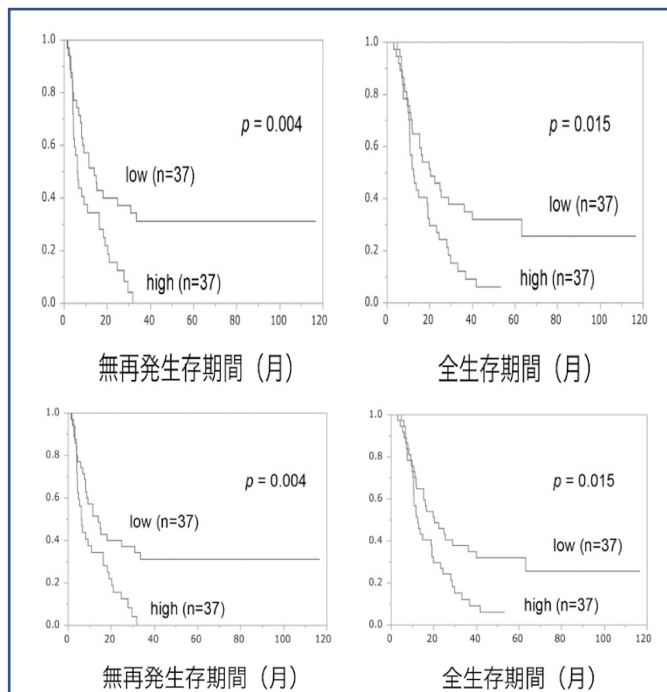


図 4 予後解析：

肺がん (上段) および膵がん (下段)

(4) 担がんモデルマウスにおける 12-13.8 抗体の腫瘍部位への集積性：

島根大学動物実験計画の承認を受け、ヒト膵がん細胞株 MIA PaCa-2 を接種した担がんモデルマウスを作製した。近赤外線を発するインドシアニングリーンで標識した 12-13.8 抗体

をマウス尾静脈から静注し、48 時間後に小動物蛍光イメージングシステムを用いて標識抗体の腫瘍部位への集積性を確認した (図 5 右)。

(5) 担がんモデルマウスを用いた 12-13.8 抗体修飾抗がん剤内包リポソームによる腫瘍増殖抑制効果：

抗がん剤 (ゲムシタビン) を内包した 12-13.8 抗体修飾リポソーム (図 6 右) は、抗体修飾しなかったものや PBS 投与群 (図 6 左) などに比べ、明らかな腫瘍抑制効果を示した。

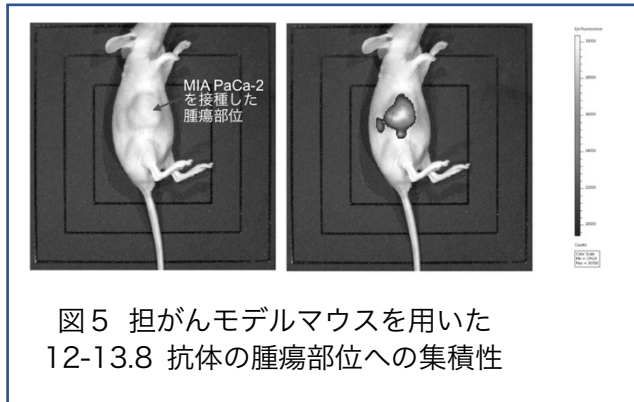


図 5 担がんモデルマウスを用いた 12-13.8 抗体の腫瘍部位への集積性

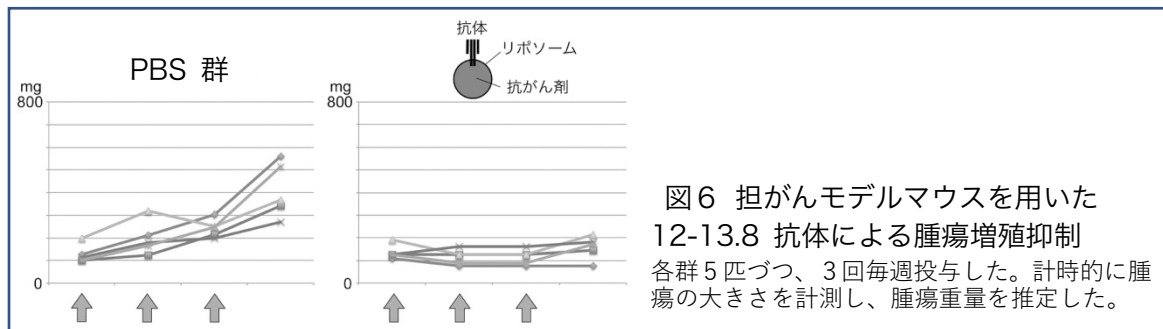


図 6 担がんモデルマウスを用いた 12-13.8 抗体による腫瘍増殖抑制  
各群 5 匹づつ、3 回毎週投与した。計時的に腫瘍の大きさを計測し、腫瘍重量を推定した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- ① **Tajima Y**, Kawabata Y, Hirahara N. Preoperative imaging evaluation of pancreatic pathologies for objective prediction of pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy Surg Today 2018 48:140–150
- ② Akimoto M, Maruyama R, Kawabata Y, **Tajima Y**, Takenaga K. Antidiabetic adiponectin receptor agonist AdipoRon suppresses tumour growth of pancreatic cancer by inducing RIPK1/ERK-dependent necroptosis Cell Death and Disease 2018 9: 804 doi: 10.1038/s41419-018-0851-z
- ③ Monma H, Iida Y, Moritani T, Okimoto T, Tanino R, **Tajima Y**, Harada M. Chloroquine augments TRAIL-induced apoptosis and induces G2/M phase arrest in human pancreatic cancer cells. PLoS One. 2018 13(3):e0193990. doi: 10.1371/journal.pone.0193990
- ④ Kawabata Y, Hayashi H, Yano S, **Tajima Y**. Liver Parenchyma Transection-first Approach in Hemihepatectomy with en bloc Caudate Lobectomy for Hilar Cholangiocarcinoma: A Safe Technique to Secure Favorable Surgical Outcomes. J Surg Oncol. 2017 115(8):963-970 doi: 10.1002/jso.24612.
- ⑤ Kawabata Y, Tanaka T, Ishikawa N, Hayashi H, **Tajima Y**. Modified total meso-pancreatoduodenum excision with pancreaticoduodenectomy as a mesopancreatic plane surgery in borderline resectable pancreatic cancer. Eur J Surg Oncol. 2016 42(5): 698-705

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① **Tajima Y**. Risk evaluation and prediction for POPF. AOPA & KPBA & KPSC 2018. Seoul, Korea, 2018.4.27
- ② Kawabata Y, Hayashi H, Nishi T, Kishi T, **Tajima Y**. Efficacy of adjuvant chemoradiation therapy on survival in patients with curative resected pancreatic cancer. International association of pancreatology/Latin America pancreatic study group Joint Meeting 2017, Buenos Aires, Argentina, 2017. 9. 29

③ Kishi T, Kawabata Y, Nishi T, Hayashi H, **Tajima Y**. Preliminary study on the efficacy of conversion surgery following intensive chemotherapy for initially unresectable pancreatic cancer. International association of pancreatology/Latin America pancreatic study group Joint Meeting 2017, Buenos Aires, Argentina, 2017.9. 29

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.shimane-u-dgs.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：浦野 健

ローマ字氏名：(URANO, takeshi)

所属研究機関名：島根大学

部局名：学術研究院医学・看護学系

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：70293701

研究分担者氏名：西 健

ローマ字氏名：(NISHI, takeshi)

所属研究機関名：島根大学

部局名：学術研究院医学・看護学系

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：80538893

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。