

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390157
 研究課題名（和文） スーパー標的抗体による新規腫瘍マーカーの探索とその低侵襲的高感度検出法の開発研究
 研究課題名（英文） Research and development of low-invasive and high-sensitive detection system for novel tumor markers by super-targeting monoclonal antibody
 研究代表者
 加藤 和則（KATO KAZUNORI）
 順天堂大学大学院 医学研究科 准教授
 研究者番号：60233780

研究成果の概要：

札幌医大および順天堂大学で開発した独自の癌標的化抗体作成法を通じて樹立に成功した新規腺癌抗原PAP2aおよび数種の癌関連抗原に対する多くの高性能抗体を用いて癌の高感度かつ低侵襲性の診断法の開発を目指した。1) 大腸癌検診の精度を高めるために癌標的抗原を便中から高感度で検出する検査方法の開発を進めた。これまでに当該研究で樹立した高性能がん標的抗体を用いて確立できたELISA系は5種類である。その中でも特に大腸癌と関連のある標的分子の測定を行った結果、癌関連プロテアーゼ誘導分子CD147および胎児性癌抗原CEAは健常人、大腸癌患者由来の便中では全く差が認められなかった。それに対して癌抗原XXXXX（特許出願準備中のため抗原名省略）は大腸癌患者由来便中に検出され、その値は健常人由来便中の抗原量よりも有為に高いことが示された。この結果をもとに現在、国内診断薬開発企業と金コロイド粒子法を用いた簡便迅速な大腸癌検査キットの開発を進めている。2) 膀胱癌の早期診断のために癌標的抗原を高感度で検出する検査方法の開発を進めた。3種類の癌標的分子の測定を行った結果、尿中の上皮癌抗原EpCAMおよびCEA値は健常人、膀胱癌患者間で全く差がなかった。それに対して癌抗原YYYY（特許出願準備中）値は健常人由来尿中の抗原量よりも明らかに高いことが示された。この結果をもとに現在、国内診断薬開発企業と共同でイムノクロマト法を用いた簡便迅速な検査キットの開発を進めている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2008年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

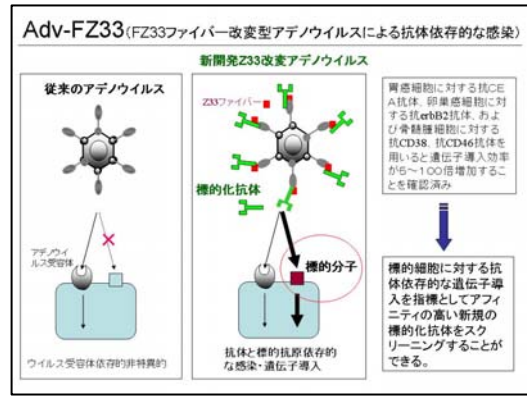
キーワード：免疫血清学

1. 研究開始当初の背景

癌は日本のみならず世界において死因の中でも常に上位を占める疾患であり、その診

断・治療法の確立は人類の生活に直結した 21 世紀の重要な課題である。これまで、消化器系癌、呼吸器系癌、婦人科系癌などの早期診断と治療に関する医学技術の進歩はめざましく国民の医療・健康維持に大きく貢献してきた。しかしながら依然として早期診断に至らない癌の種類はまだ多く、膵臓癌・卵巣癌・脳腫瘍のようにひとたび発症が確認されれば進行癌として見つかる例が多く、外科手術を施しても根本的な治療にはならず、多くの場合癌細胞が残存して再発する例が多い。そのため早期診断が困難な難治性の進行癌に対する早期診断法の確立は必須であり、多くの被験者を対象とできる低侵襲性で簡易的さらには高感度の新しい診断法・検査法を開発することは国内外の産官学の共通の研究課題である。近年、癌の血清腫瘍マーカーとして診断が確立している従来の糖鎖抗原や癌胎児性抗原以外に、癌ゲノム・ポストゲノム解析の結果を元にして新規腫瘍マーカーの探索研究が進み、その成果が実際に臨床で実用化されつつある。しかしながら新規腫瘍マーカーを効率的に検出するためのツール（抗体、DNA プローブ等）、特に高性能のツールをいかに効率的に作製できるかが重要課題となっている。

この課題を克服するために申請者らは新たな発想に基づくツールの開発研究を行っている。これまでに癌細胞・組織に対して選択的かつ効果的に治療薬や遺伝子を運搬する標的化の重要性は深く認識されており、申請者はこれまで継続して、癌細胞・組織選択的な「標的化遺伝子治療法の開発」を目指して研究を行ってきた。その研究の中で「癌標的化ベクター」のモデル系としてアデノウイルスを用い、右図に示すように抗体の Fc ドメインに結合する Protein A の Z33 モチーフを含むファイバー変異型 Adv-FZ33 を用いて、ウイルスと腫瘍細胞とをモノクローナル抗体で架橋できる系に樹立に成功した（学術論文報告・特許出願済）。この系を用いると、既に臨床診断および治療医薬として実用化されている癌表面抗原に対する抗 C E A 抗体、抗 CD20 抗体、抗 erbB2 抗体等は各種癌に標的化が可能であることだけでなく、それぞれの抗体の性能および性質をこのアデノウイルス感染系で評価できることが判明した。そこでこの抗体依存的に標的癌細胞に感染可能な改変型アデノウイルスを用いて、従来の ELISA 法、Cytometry 法では評価・選別できなかった新規癌標的分子・マーカーを探索することを新たに着想した。



2. 研究の目的

本研究では早期診断が困難な難治性の進行癌に対する早期診断法の確立を目指し、多くの被験者を対象とできる低侵襲性で簡易的さらには高感度の新しい診断法を開発することを目的とする。目的達成のために、抗体依存的に標的癌細胞に感染可能な改変型アデノウイルスを用いて、従来の ELISA 法、Cytometry 法では評価・選別できなかった新規癌標的分子・マーカーを探索することを新たに着想した。この手法を用いてこれまでに、ヒト膵臓癌・前立腺癌・悪性中皮腫・メラノーマ・多発性骨髄腫等を免疫源として 10,000 以上のモノクローナル抗体をスクリーニングし、1 年間で 10 種類以上の優秀な癌標的化抗体（スーパー標的抗体）を樹立することができた。本研究ではこれらスーパー標的抗体を用いて新規腫瘍マーカーとしての有用性を解析し、従来の病理組織学的・免疫血清学的解析に加えて、尿中腫瘍抗原マーカー、便潜血中腫瘍マーカー、唾液中腫瘍マーカーなどへの低侵襲性の診断方法への実用化研究にも発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

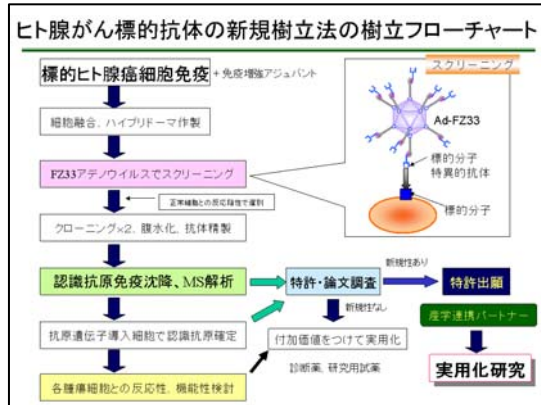
難治性上皮性腫瘍（前立腺癌・膵臓癌・大腸癌等）に対するスーパー標的抗体の樹立と新規腫瘍マーカーの探索研究を下記の計画に乗っ取り施行する。

a) スーパー標的抗体ライブラリーの作製：難治性癌である膵臓がん・前立腺癌を免疫源としてハイブリドーマ数約 15,000 クロオンを当初の目標として抗体スクリーニングを行う。

b) スクリーニングとハイブリドーマ・クロオンの樹立：各癌細胞に対して遺伝子導入効率が高まるような抗体をスクリーニングし、スーパー標的抗体を選別しクローニングする。

c) 抗体で認識される標的抗原の決定：癌細胞株また正常細胞との反応性を解析し、癌関連抗原と想定される抗体を優先的に選

択する。認識抗原の分子量を決定し、免疫沈降の条件検討の結果に基づき、大量（標準的には 10^9 個以上）の細胞を用いて免疫沈降を行い、SDS-PAGE・銀染色で得られた抗原バンドを切り出す。これをトリプシン消化し、脱塩後 TOF 測定・MS/MS 質量分析を行う。データベース検索により、抗原タンパクを同定する。



アデノウイルス感染法で樹立した高性能標的抗体と認識抗原一覧

癌関連抗原	ウイルス受容体	接着分子	トランスポーター
・PAP2a* (Phosphatidic acid phosphatase 2a)	・CD9	・Integrin $\alpha 3$	・CD98
・CD213a2* (IL-13 receptor $\alpha 2$)	・CD13	・Integrin $\beta 5$	・CD298
・Antigen-X (expressed on various carcinoma)	・CD44	・CD321	・CD81
・Antigen-Y (expressed on various carcinoma)	・CD46		
・Antigen-A (expressed on limited Breast cancer)	・CD50		
・Antigen-B (expressed on limited Pancreas and Colon cancer)	・CD54		
・EpCAM* (Epithelial cell adhesion molecule)	・CD55		
・NCAM2 (Neural cell adhesion molecule 2)	・CD59		
・CD147* (EMMPRIN)	・CD155		
・CA12* (Carbonic anhydrase XII)	・CD230		
・CD146* (Melanoma cell adhesion molecule)			
・MCSF* (Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan)			
・EGFR (Epidermal growth factor receptor)			
・PSMA* (Prostate specific membrane antigen)			
・CEA* (Carcinoembryonic antigen)			
・CD10 (CALLA)			
・CD20 (B1 antigen)			
・CD109* (r150)			

d) 腫瘍マーカーとしての有用性の検討：得られた同一抗原に対して競合阻害しない抗体を2種類選択し、一方をビオチン標識し、ELISA条件を検討する。ELISAの測定系が確立できた新規腫瘍マーカー候補に関して、ヒト由来サンプル（血清、血漿）で検討する。

上記の研究によって得られたスーパー抗体を利用して腫瘍マーカーの低侵襲的高感度検出技術の基盤研究を施行する。

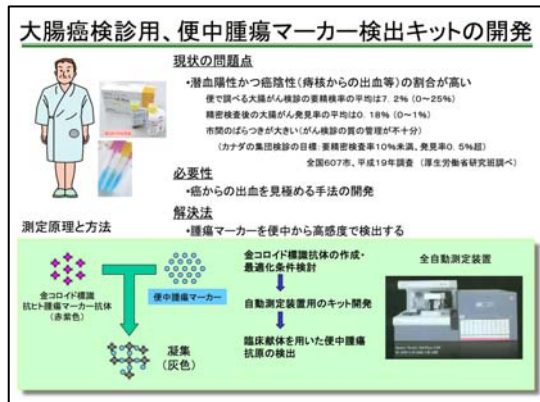
a) 便中腫瘍マーカーとしての可溶性がん浸潤関連抗原の検出系確立の研究：可溶性上皮性癌抗原 Exxx を ELISA で高感度で検出できる独自の系を確立している。そこで患者血清中の可溶性 Exxx 値が癌患者で有意に上昇しているかを測定するとともに、尿中に存在する Exxx を ELISA で測定可能であるかを検討する。また簡便検出法としてイムノクロマト法への応用研究を行う。

b) 尿中腫瘍マーカー新規腫瘍マーカー候補の ELISA：癌の浸潤転移に関連するマトリックスポロテアーゼの誘導因子 CDxxx、TGF シグナルによる上皮間葉移行に関連する分子、癌の免疫寛容に関わる CD276、癌組織での低酸素状態に誘導される膜型酵素等のスーパー標的抗体が既に樹立済みであるので、これらを用いて各可溶性体の産生を検出できる ELISA 系の条件を検討する。

4. 研究成果

1 大腸癌患者を対象とした便中癌抗原の迅速測定方法の開発

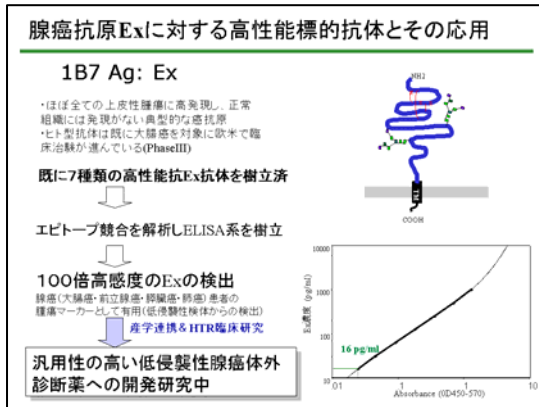
現在定期健康診断に於いて40歳以上の全人を対象とした便潜血検査が実施されている。これは大腸癌組織からの出血を便中ヘモグロビン値を指標として検査する方法であり、主に金コロイド粒子法またはラテックス粒子法にて検出している。この方法は大変簡便で且つ感度も高いことから大腸癌のマスクリーニングとして確立されている。しかしながら便潜血が陽性であるにもかかわらず大腸癌が陰性の対象者、すなわち擬陽性の割合が高いことが知られており、擬陽性対象者への負担が増大している。この原因は



内痔核もしくは外痔核からの出血であり、癌組織からの出血と痔核からの出血を現手法で見極めることは不可能である。そこで便検査で大腸癌の発見率の精度を向上させるために、札幌医大で樹立された高性能癌標的抗体を用いて、便中に溶出される癌標的抗原を高感度で検出する方法の開発研究を行った。

既に基礎シーズとして樹立済みの癌標的抗原に対する抗体を用いてサンドウィッチ ELISA法を確立した。各ELISA系の陽性コントロールとしては大腸癌細胞の培養上清を用いて検討した。候補分子としては上皮性がん抗原Exxxを対象とした（下図）。Exxxに対す

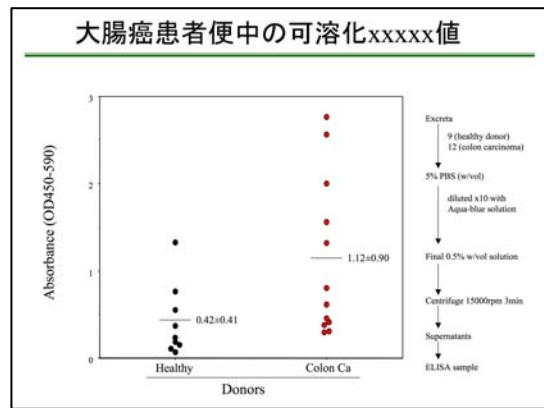
る標的化抗体は既に本研究で7種類以上樹立済みでELISAの条件検討を行い可溶性癌抗原の検出系を確立した。



大腸癌患者由来便(12例)および健康人由来便(9例)を可溶性溶液を用いて希釈後遠心し、その上清をサンプルとして用いて測定した。

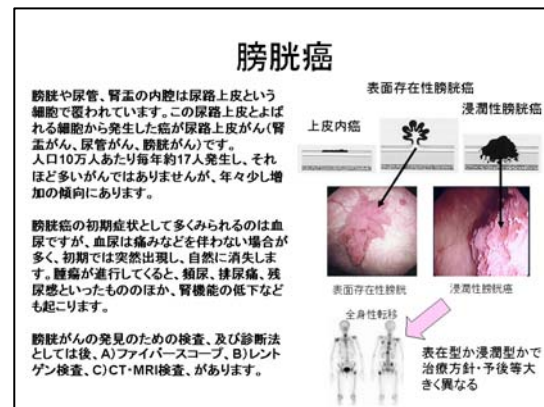
現在までのところ札幌医大のシーズ抗体を用いて確立できたELISA系は5種類である。その中でも特に大腸癌と関連のある標的分子の測定を行った結果、CD147抗原およびCEA抗原は健康人、大腸癌患者間で全く差がなかった。それに対して癌抗原EXXXX(特許出願準備中のため抗原名省略)は大腸癌患者由来便中に検出され、その値は健康人由来便中の抗原量よりも有為に高いことが示された(図参照)。この結果をもとに現在、国内診断薬開発企業A社と共同で金コロイド粒子法を用いた簡便迅速な大腸癌検査キットの開発を進めている。

【考察と今後の方針】大腸癌検診の精度を高めるために癌標的抗原を高感度で検出する検査方法の開発を進めている。現在までのところ対象となる抗原EXXXXに対する標的化抗体を6種類樹立しており、各抗体の組み合わせを変えながら最適条件を検討している。本年度中には金コロイド粒子による大腸癌抗原EXXXXの測定キットのプロトタイプを企業と共同で作製し、HTRのプロトコルのもとにTR研究を実施する方針である。



2 膀胱癌患者を対象とした尿中癌抗原の迅速測定方法の開発

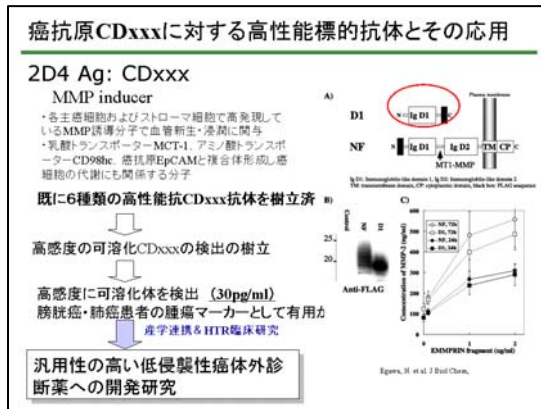
膀胱癌は大腸癌・胃癌・肺癌等に比べると発症率は少ない癌ではあるが、成人60歳以上から発症率が増加し男性のほうが女性より約5倍発症する癌で、血尿と排尿痛を伴う。しかしながら血尿・排尿痛は感染性膀胱炎でも頻繁に見られることから、早期発見が難しい癌でもある。膀胱癌は表在性膀胱癌(全体



の約80%)と浸潤性膀胱癌(20%)の2種類のタイプが存在し、浸潤型は癌組織が膀胱外にまで達することから予後不良の癌で、表在型は治療・手術後の再発が頻繁に認められ、それぞれ治療方針が異なる。血尿などで膀胱癌が疑われたときは尿道内から内視鏡を挿入し癌組織を確認するが、尿中に溶出される癌抗原の測定法も開発されつつある。科研費基盤B研究では札幌医大で樹立された高性能癌標的抗体を用いて、尿中に溶出される癌標的抗原を高感度で検出し膀胱癌の早期検査法の開発および表在型/浸潤型の膀胱癌を判別できる簡便測定法(イムノクロマト法)の開発を行った。

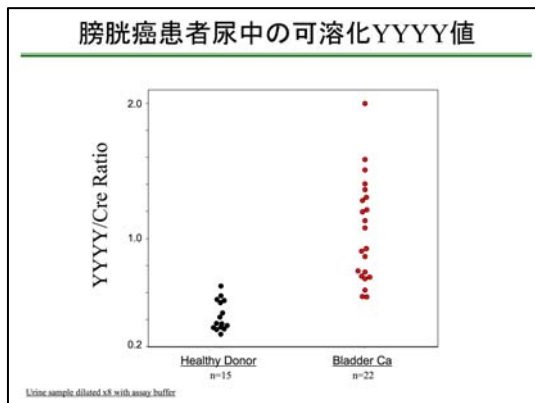
前述したように既に基礎シーズとして樹立済みの癌標的抗原に対する抗体を用いてサンドウィッチELISA法を確立し、各ELISA系の陽性コントロールとしては膀胱癌細胞の培養上

清を用いて検討した。対象とした癌抗原は細胞浸潤に関与するCDyyyで、この抗原に関しては既に6種類の抗体を樹立している。各抗体の組み合わせでELISAの条件検討を行い可溶性癌抗原を高感度で検出できる系を確立した。



その後、膀胱癌患者由来尿サンプル（22例）および健常人由来尿（15例）を希釈後遠心し、その上清をサンプルとして用いて測定した。また尿の濃度はクレアチニン値にて補正した。

現在までのところ3種類の癌標的分子の測定を行った結果、尿中のEpCAM抗原およびCEA抗原値は健常人、膀胱癌患者間で全く差がなかった。それに対して癌抗原YYYY（特許出願準備中のため抗原名省略）は膀胱癌患者由来尿中に検出され、その値は健常人由来尿中の抗原量よりも明らかに高いことが示された。尿の濃度を補正するためにクレアチニン値でYYYY値を割り計算した。その結果も同様で健常人平均値 \pm 2SDと比較しても、膀胱癌患者では優位に高値を示した。この結果をもとに現在、国内診断薬開発企業T社と共同でイムノクロマト法を用いた簡便迅速な検査キットの開発を進めている。



【考察と今後の方針】膀胱癌の早期診断のために癌標的抗原を高感度で検出する検査方法の開発を進めている。現在までのところ対象となる抗原 YYYYY に対する標的化抗体を7種類樹立しており、各抗体の組み合わせを交

えながら最適条件を検討している。本年度中にはイムノクロマトキットのプロトタイプを企業と共同で作製し、実用化に向けて研究開発を行っている。

さらに下図に示すようにこれまでに 10 種類程度の独自の ELISA 系の樹立に成功した。現在もこの測定システムを用いて、がん患者の体液中（血液・尿・便・唾液、涙液等）の可溶性癌抗原の存在を検討している。今後、新たな腫瘍マーカーを測定し、より早期かつ確実な癌の検査システムを樹立する予定である。

腫瘍抗原の可溶化体検出ELISAの開発状況

- Ex (上皮癌抗原)
- CD213 (IL-13 receptor α 2)
- CA12 (低酸素関連抗原)
- CD1xx (MMP関連抗原)
- CEACAMs (with sugar-chain modification)
- Ephrin receptor x (癌関連抗原)
- CD2 xxx (癌関連免疫補助刺激分子)
- CD1xxx (新生血管・血管障害マーカー)
- Tx (上皮癌抗原)
- 糖鎖修飾コア蛋白 (各種癌抗原)
- メチル化制御癌抗原

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

1. **Kato K**, Chu P, Takahashi S, **Hamada H** and Kipps TJ. Metalloprotease inhibitors block release of soluble CD27 and enhance the immune stimulatory activity of chronic lymphocytic leukemia cells. *Exp Hematol* 2007; 35: 434-442. 査読有り
2. Tomihara K, **Kato K**, Masuta Y, Nakamura K, Tanaka T, Hiratsuka H and **Hamada H**. Gene transfer of the CD40-ligand to human dendritic cells induces NK-mediated anti-tumor effects against human carcinoma cells. *Int J Cancer* 2007; 120: 1491-1498. 査読有り
3. Suzuki K, Nakamura K, **Kato K**, **Hamada H** and Tsukamoto T. Exploration of target molecules for prostate cancer gene therapy. *Prostate* 2007; 67: 1163-1173. 査読有り
4. Masuta Y, **Kato K**, Tomihara K, Nakamura K, Sasaki K, Takahashi S and **Hamada H**. Gene transfer of non-cleavable cell surface mutants of human CD154 induces the immune response and diminishes systemic inflammatory reactions. *J Immunother* 2007; 30: 694-704. 査読有り
5. Tanaka T, Kuroki M, **Hamada H**, **Kato K**,

- Kinugasa T, Shibaguchi H, Zao J and Kuroki M. Cancer-targeting gene therapy using tropism-modified adenovirus. *Anticancer Res* 2007; 27: 3679-3684. 査読有り
6. Tanaka T, **Hamada H**, Kuroki, M, **Kato K**, Kinugasa T, Shibaguchi H and Kuroki M. Targetting strategies by coupling of adenovirus vector and antibody for cancer gene therapy. *Recent Development in Gene Therapy* 2007: 319-326. 査読有り
 7. Tomihara K, **Kato K**, Masuta Y, Nakamura K, Uchida H, Sasaki K, Tanaka T, Huang J, Hiratsuka H and **Hamada H**. Gene transfer of CD40-ligand to dendritic cells stimulates interferon-gamma production to induce growth arrest and apoptosis of tumor cells. *Gene Therapy* 2008; 15: 203-213. 査読有り
 8. Ishii, K., Nakamura, K., Kawaguchi, S., Li, R., Hirai, S., Sakuragi, N., Wada, T., **Kato, K.**, Yamashita T. and **Hamada, H.** Selective gene transfer into neurons via Na, K-ATPase beta 1 targeting gene transfer with monoclonal antibody and adenovirus. *J. Gene Med.*, 2008; 10:597-209. 査読有り

[学会発表] (計1件)

1. 加藤和則 創薬・診断シーズとしての癌標的抗体の作製・選別と応用 第12回基盤的癌免疫研究会シンポジウム、2008年、大宮

[図書] (計2件)

1. 加藤和則、濱田洋文、標的細胞への選択的遺伝子導入法の開発、Drug Delivery System, 2007, 22: 628-635.
2. 加藤和則、ファイバー改変型アデノウイルスを用いた抗腫瘍標的抗体の樹立とその応用、Annual Review 免疫 2008, 240-247.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

1. 濱田洋文、加藤和則、中村公則、出願番号：特願2007-147478、発明の名称：IL-13Ra2に対する抗体およびこれを含む診断・治療薬、出願日：2007. 6. 1
2. 濱田洋文、加藤和則、中村公則、公開番号：WO2006/123829、国際出願番号：PCT/JP2006/310406、発明の名称：PAP2aに対する抗体ならびにその診断的および治療的応用、出願日：2006. 5. 17

○取得状況 (計1件)

特許第4097041号 (日本国)

発明の名称：PAP2a に対する抗体ならびにその診断的および治療的応用
発明者：濱田洋文、加藤和則、中村公則 出願人：札幌医科大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 和則 (KATO KAZUNORI)

順天堂大学大学院 医学研究科 准教授
(前職 H19)

札幌医科大学 医学部 分子医学研究部門
准教授

研究者番号：60233780

(2) 研究分担者

濱田洋文 (HAMADA HIROFUMI)

札幌医科大学 医学部 分子医学研究部門
教授

研究者番号：00189614

(3) 連携研究者

なし