

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基礎研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390430
 研究課題名（和文） 癌の進展に対して抑制的に作用するヒトモノクローナル抗体の開発
 研究課題名（英文） DEVELOPMENT OF HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES WHICH SHOW INHIBITORY EFFECTS TUMOR PROGRESSION.
 研究代表者
 青木 大輔 (AOKI DAISUKE)
 慶應義塾大学・医学部・教授
 研究者番号：30167788

研究成果の概要(和文):我々が開発した婦人科癌特異的なヒトモノクローナル抗体 HMMC -1 は、ヒト子宮体癌細胞に対して抗腫瘍活性を持つ。HMMC -1 抗原解析の結果、少なくとも糖タンパク質 CD166 であることが判明し、CD166 分子上の糖鎖が抗体の機能を担っていることが示唆された。HMMC -1 抗原糖鎖は硫酸化修飾を受けており、CD166 分子上の糖鎖に付加している硫酸基が HMMC -1 の抗腫瘍活性に関与していることが推定された。

研究成果の概要(英文): We have developed a human monoclonal antibody HMMC -1 specific to gynecological cancers and it showed anti tumor activity for gynecological cancers. Mass spectrometry analysis revealed that HMMC -1 antigen was at least CD166. HMMC -1 intereaction with possibly CD166, may have a direct effect on the growth of cells with high metastatic potential. The chlorate treatment demonstrates that sulfation is necessary for HMMC -1 antigen activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総 計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科癌、抗体医薬、モノクローナル抗体、糖鎖抗原、CD166

1. 研究開始当初の背景

子宮体癌は子宮体部の内膜に発生する癌で、閉経後の中高齢女性に多く、従来は日本人には少ない癌と言われていたが、食生活の欧米化にともなって発症例が増加、また低年齢化している。子宮体癌の治療は子宮頸癌や卵巣癌と比較すると放射線療法や化学療法

の効果が乏しいので手術療法が主な治療法となっている。術式は子宮頸部に癌が及んでいない場合は準広汎子宮完全摘出術、頸部に及んでいる場合は広汎子宮全摘出術を行うこととなり、いずれも広範囲の組織摘出は患者にとって負担が大きい。したがって、癌特異的抗体を併用して化学療法の効果を高め

ることや、抗体を使った新たな治療法、治療薬を開発することは臨床的に意義が大きい。

2. 研究の目的

癌化に伴い新たに発現してくる分子に高い特異性を有するヒトモノクローナル抗体 (Mab) を作成し、これをヒトに投与するなど、正常細胞に対する傷害を最小限とし、癌細胞を選択的に殺すことを目的とした抗体療法は理想的な癌の治療法として注目されている。我々が開発した HMMC-1 は、完全ヒト型抗体産生マウス (KM mouse) を用いて作製され、ヒトに対する抗原性が少なく、頻回に投与しても異種タンパクによる抗体産生は起こらない特徴を有するヒトモノクローナル抗体である。本研究では HMMC-1 の認識抗原を同定すると同時に、癌細胞に対する直接的な抗腫瘍効果とその分子レベルでのメカニズムを生化学的および分子生物学的手法を用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

本研究室にて樹立したヒト子宮体癌由来細胞 Hec-1A をシングルセルクローニングした細胞をマウスに移植し、その中でもっとも転移形成率の高かった細胞を子宮体癌由来高転移株として研究に使用した。

(2) 抗体による細胞増殖への影響

2×10^4 個のヒト子宮体癌由来高転移株に HMMC-1 を $5 \mu\text{g/ml}$ 、コントロールはヒト-IgM を $5 \mu\text{g/ml}$ を含む培地で培養した。培地は 24 時間ごとに交換した。1、3、5、7 日培養後にトリプシン-EDTA 溶液にて細胞を剥離し、遠心して採取後、PBS に懸濁して細胞数を計測した。

(3) 抗原解析

ヒト子宮体癌由来高転移株の細胞抽出液について UEA-1 レクチンアフィニティークロマトグラフィーを行った。100mM フコースで溶出した画分を電気泳動にて分離し、HMMC-1 と反応するバンドについてプロテアーゼ消化後、フラグメントの質量分析を行った。

(4) RT-PCR

ヒト子宮体癌由来高転移株細胞より、RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA 合成を行った。合成した cDNA をテンプレートにして PCR 反応を行い、G3BP、CD49c、CD166 の mRNA 発現量を調べた。

(5) 免疫沈降

抗 CD166 抗体を結合させたプロテイン A セファロースビーズとヒト子宮体癌由来高転移

株の細胞抽出液をインキュベーションした後、電気泳動にて分離した。免疫沈降した画分はイムノブロットングにて検出した。

(6) 免疫細胞化学

ガラスカバースリップにヒト子宮体癌由来高転移株細胞を培養後、パラホルムアルデヒドで固定し、Alexa Fluor 488 および Alexa Fluor 594 にて二重染色を行い共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

(7) 硫酸化阻害試験

50mM 塩素酸ナトリウム (NaClO_3) を 3 日間培地に添加して培養し、硫酸化阻害したヒト子宮体癌由来高転移株の細胞抽出液を HMMC-1 でイムノブロットングした。また、硫酸化阻害を行った細胞抽出液については、抗 CD166 抗体で免疫沈降した後、HMMC-1 でイムノブロットングを行った。

4. 研究成果

(1) HMMC-1 の細胞増殖への影響

抗体の持つ生理活性として直接的腫瘍活性、補体依存性細胞傷害 (CDC)、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) がある。現在臨床に応用されている抗体の多くについては直接的抗腫瘍活性が認められている。このため、HMMC-1 抗体による直接的抗腫瘍活性を調べた。ヒト子宮体癌由来高転移株に HMMC-1 を $5 \mu\text{g/ml}$ の濃度で、7 日間培地に添加して細胞増殖を調べたところ、7 日目でコントロールのヒト IgM ($5 \mu\text{g/ml}$) と比較して約 45% 細胞増殖が低下した。HMMC-1 はヒト子宮体癌由来高転移株に対して有意な直接的抗腫瘍活性を持つことが示された (図 1)。

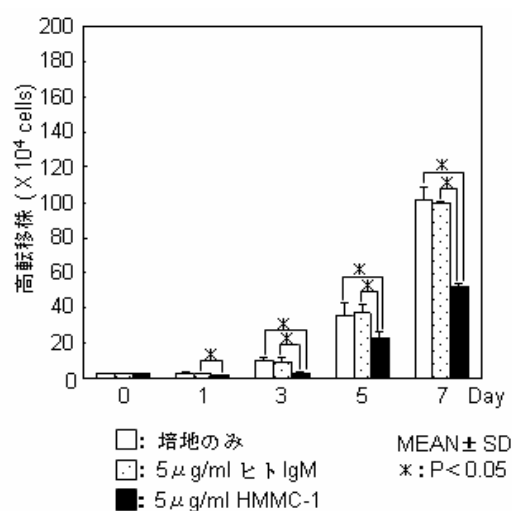


図 1 HMMC-1 の細胞増殖抑制効果

(2)HMMC -1 抗原解析

これまでの研究で HMMC -1 抗原は糖タンパク質であり、フコースを含む糖鎖を持つことがわかっている。このため、フコース特異的レクチンである UEA -I を利用して HMMC -1 抗原の精製および濃縮を試みた。ヒト子宮体癌由来高転移株の細胞抽出液について UEA -I レクチン アフィニティークロマトグラフィーを行い、フコースで溶出した画分を電気泳動にて分離し、HMMC -1 と反応する 97kDa、100kDa、137kDa のバンドについてプロテアーゼ消化後、フラグメントの質量分析を行った。その結果、97kDa のバンドは CD166、100kDa のバンドはガレクチン 3 結合タンパク質 (G3BP)、137kDa のバンドは CD49c である可能性が示唆された。RT -PCR によりヒト子宮体癌由来高転移株には CD166、G3BP、CD49c が発現していることが確認できた(図 2)。その中で、細胞接着、転移、細胞増殖に関係する CD166 について、さらに解析を進めるため、抗 CD166 抗体を使用してヒト子宮体癌由来高転移株細胞の抽出液を免疫沈降した。免疫沈降画分のイムノブロットングから HMMC -1 と反応するバンドが CD166 と同じ位置に検出された(図 3)。さらに、ヒト子宮体癌由来高転移株を抗 CD166 抗体および HMMC -1 で二重染色したところ、ほぼ同局在を示し、HMMC -1 エピトープを担う主要な糖タンパク質が CD166 であることが判明した (図 4)。



図 2 RT -PCR

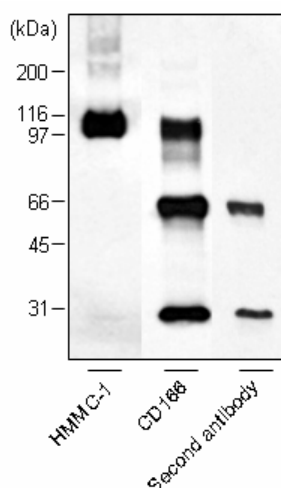


図 3 免疫沈降

HMMC -1 の抗原解析

図 2 は HMMC -1 抗原解析の結果で HMMC -1 抗

原である可能性が示唆された G3BP、CD49c、CD166 についてヒト子宮体癌由来高転移株に mRNA レベルで発現を RT -PCR で調べた。

actin は内部標準を示す。

図 3 は、抗 CD166 抗体でヒト子宮体癌由来高転移株の細胞抽出液を免疫沈降後、免疫沈降画分をイムノブロットングした結果。免疫沈降画分を左から HMMC -1、CD166、二次抗体のみで染色した図を示す。

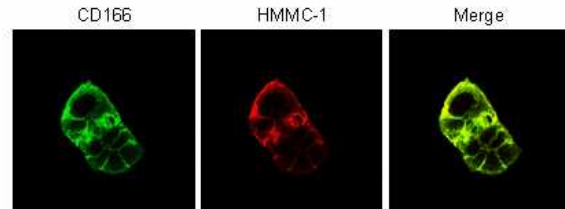


図 4 抗 CD166 抗体と HMMC -1 の二重染色

ヒト子宮体癌由来高転移株を抗 CD166 抗体および HMMC -1 で細胞共染色を行った。二次抗体に抗 CD166 抗体は Alexa Fluor 488 (green)、HMMC -1 は Alexa Fluor 594 (red) を使用して検出し、これらを merge した結果も示した。

(3)HMMC -1 が認識する糖鎖抗原

細胞の硫酸基代謝を阻害する NaClO_3 をヒト子宮体癌由来高転移株の培地に添加して硫酸化阻害を行ったところ、 NaClO_3 を添加した細胞は NaClO_3 を添加していないコントロールと比較して HMMC -1 抗体反応性は低下し、HMMC -1 が認識する糖鎖抗原は硫酸化修飾を受けていることがわかった (図 5)。さらに HMMC -1 が認識する抗原タンパク質である CD166 分子上の糖鎖についても硫酸化修飾を受けているか否かを調べるため、 NaClO_3 を培地に添加して硫酸化阻害を施した子宮体癌由来高転移株の細胞抽出液を抗 CD166 抗体で免疫沈降した後、イムノブロットングより HMMC -1 抗体反応性を確認した。図 6 に示すように NaClO_3 を添加した細胞について免疫沈降すると NaClO_3 を添加していない細胞と比較して著しく HMMC -1 抗体反応性は低下したため、CD166 分子上の糖鎖は硫酸化されており、CD166 分子上の糖鎖に付加している硫酸基が HMMC -1 の抗腫瘍活性に関与していることが示唆された。硫酸化糖鎖は癌や炎症、感染症などの疾患に関与していることが知られており、硫酸化糖鎖の研究が、ヒト疾患の病態の理解に大きく寄与することが期待される。これまで、癌においては、細胞増殖、分化、接着、浸潤に関連していることが報告されている。今後、HMMC -1 が結合する CD166 分子上の硫酸基に発現している硫酸基転移酵素について解析を進める。

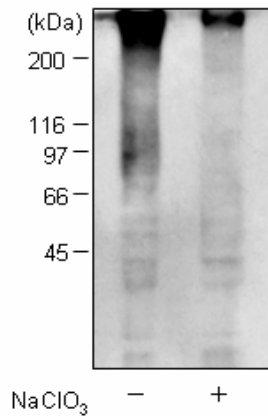


図5 硫酸化阻害

50mM NaClO₃を3日間培地に添加して培養し、硫酸化阻害したヒト子宮体癌由来高転移株の細胞抽出液を HMMC-1 にてイムノブロッティングした図。+は NaClO₃を添加したサンプルを示し、-は NaClO₃を添加していないサンプルを示す。

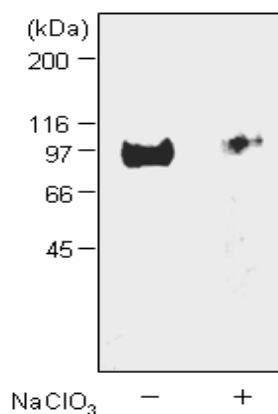


図6 硫酸化阻害 (免疫沈降)

図5で硫酸化阻害した細胞抽出液を抗 CD166 抗体で免疫沈降し、HMMC-1 にてイムノブロッティングした図。+は NaClO₃を添加したサンプルを示し、-は NaClO₃を添加していないサンプルを示す。

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6件)

Aoki D, Oda Y, Hattori S, Taguchi K, Ohishi Y, Basaki Y, Oie S, Suzuki N, Kono S, Tsuneyoshi M, Ono M, Yanagawa T, Kuwano M, Overexpression of class III β -tubulin

predicts good response to taxane-based chemotherapy in ovarian clear cell adenocarcinoma., Clin Cancer Res, 査読有, 15 (4), 2009, 1473-1480

Suzuki N, Tamada Y, Shigirahara K, Suzuki A, Susumu N, Ishida I, Aoki D, Human monoclonal antibody for ovarian clear cell carcinoma-2, a human monoclonal antibody with antitumor activity against ovarian cancer cells that recognizes CA125-like antigen., Int J Gynecol Cancer, 査読有, 18, 2008, 996-1006

Nishimura S, Tsuda H, Miyagi Y, Hirasawa A, Suzuki A, Kataoka F, Nomura H, Chiyoda T, Banno K, Fujii T, Susumu N, Aoki D, Can ABCF2 protein expression predict the prognosis of uerine cancer?, Br J Cancer, 査読有, 99, 2008, 1651-1655

Kuwabara Y, Yamada T, Yamazaki K, Du WL, Banno K, Aoki D, Sakamoto M, Establishment of an ovarian metastasis model and possible involvement of E-cadherin down-regulation in the metastasis., Cancer Sci, 査読有, 99 (10), 2008, 1933-1939

Banno K, Yanokura M, Kawaguchi M, Kuwabara Y, Akiyoshi J, Kobayashi Y, Iwata T, Hirasawa A, Fujii T, Susumu N, Tsukazaki K, Aoki D, Epigenetic inactivation of the CHFR gene in cervical cancer contributes to sensitivity to taxanes., Int J Oncol, 査読有, 31 (4), 2007, 713-720

Tamada Y, Takeuchi H, Suzuki N, Susumu N, Aoki D, Irimura T, Biological and therapeutic significance of MUC1 with sialoglycans in clear cell adenocarcinoma of the ovary., Cancer Sci, 査読有, 98, 2007, 1586-1591

〔学会発表〕(計18件)

富永英一郎, 進 伸幸, 赤羽智子, 山上 亘, 東口敦司, 平沢 晃, 青木大輔: 子宮体癌における腹腔細胞診の臨床的意義と新規診断マーカーの検索, 第50回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2009.9.26~9.27, 大津

鈴木 直: 新たな治療を求めて 卵巣明細胞腺癌に対する新たな分子標的治療の開発を志向した基礎的研究, 第47回日本癌治療学会学術集会, 2009.10.22~24, 横浜

鈴木 淳, 山上 亘, 富永英一郎,
末盛友浩, 野村弘行, 片岡史夫, 平沢 晃,
進 伸幸, 青木大輔, 吉村泰典:
子宮体癌高転移株の細胞表面糖鎖および分子
発現解析, 第 60 回日本産科婦人科学会学
術講演会, 2008. 4.12~15, 横浜

津田浩史, 西村貞子, 進 伸幸,
阪埜浩司, 片岡史夫, 河村直樹, 青木大輔:
子宮体癌における hypoxia-inducible
protein2 (HIG2) 蛋白発現, 第 44 回日本婦
人科腫瘍学会学術集会, 2008.7.17~7.19,
名古屋

富永英一郎, 鈴木 淳, 鶴田智彦,
山上 亘, 野村弘行, 片岡史夫, 平沢 晃,
進 伸幸, 青木大輔:
ヒトモノクローナル抗体 HMMC -1 標的抗原が
卵巣癌細胞の後腹膜リンパ節転移に与える
影響, 第 7 回日本婦人科がん分子標的研究会
学術集会, 2008.7.18, 名古屋

進 伸幸, 平沢 晃, 阪埜浩司,
青木大輔: シンポジウム (基調講演): 子宮
内膜癌の発ガンメカニズム,
第 40 回日本臨床分子形態学会, 2008.10.3~
10.4, 福岡

Aoki D: Interactive session: tumor
board: endometrial (uterine confined), I
12th biennial meeting international
gynecologic cancer society (IGCS),
2008.10.25~10.28, Bangkok

富永英一郎, 荒尾徳三, 津田浩史,
山上 亘, 野村弘行, 平沢 晃, 鈴木 淳,
進 伸幸, 西村貞子, 青木大輔, 西尾和人:
ワークショップ: 標準治療を施行した進行上
皮性卵巣癌の網羅的探索, 第 67 回日本癌学
会学術総会, 2008.10.28~10.30, 名古屋

鶴田智彦, 井本逸勢, 平沢 晃,
小崎健一, 阪埜浩司, 進 伸幸, 青木大輔,
稲澤譲治:
ワークショップ: エピジェネティック異常に
より発現抑制される子宮体がん関連癌抑制
遺伝子の MPA 療法における役割, 第 67 回日
本癌学会学術総会, 2008.10.28~10.30,
名古屋

野村弘行, 鶴田智彦, 山上 亘,
片岡史夫, 平沢 晃, 富永英一郎, 鈴木 淳,
津田浩史, 進 伸幸, 青木大輔:
ワークショップ: 再発卵巣癌に対する治療戦
略 - 卵巣癌初回治療後のサーベランスの観
点から -, 第 46 回日本癌治療学会総会,
2008.10.30~11.1, 名古屋

笈川文子, 鈴木淳, 相川京子, 川本元子, 青
木大輔:
婦人科癌特異的ヒトモノクローナル抗体
HMMC -1 の細胞増殖抑制作用, 第 31 回日本分
子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会
合同大会, 2008.12.9~12.12, 神戸

鈴木 直, 青木大輔, 吉岡範人,
小林陽一, 木口一成, 石塚文平:
卵巣癌細胞に対する抗腫瘍効果を有し CA125
関連分子を認識するヒトモノクローナル抗
体 HMOCC -2 の作製, 第 59 回日本産科婦人科
学会総会・学術講演会, 2007.4.14~17, 京
都

末盛友浩, 進 伸幸, 矢野倉 恵,
市川義一, 野村弘行, 平沢 晃, 玉田 裕,
阪埜浩司, 鈴木 淳, 塚崎克己, 青木大輔,
吉村泰典:
COX -2 発現量および CD8 陽性リンパ球数が進
行期子宮体癌の予後に与える影響, 第 59 回
日本産科婦人科学会総会・学術講演会,
2007.4.14~17, 京都

富永英一郎, 鈴木 淳, 鶴田智彦,
末盛友浩, 山上 亘, 東口敦司, 野村弘行,
平沢 晃, 進 伸幸, 青木大輔:
卵巣癌細胞に発現する HMMC -1 認識抗原がリ
ンパ節転移能へ与える影響についての検討,
第 42 回日本婦人科腫瘍学会学術集会,
2007.6.29~7.1, 東京

Kyoung-Young Seo, A. Suzuki,
H. Nakagawa, W. Yamagami, H. Nomura,
T. Suemori, N. Susumu, Y. Yshimura,
D. Aoki:
Establishment and characterization of an
Endometrial cancer lymph node metastasis
mouse model, The XXth asian and oceanic
congress of obsterics and gynecology,
2007. 9.21~9.25, Tokyo Japan

鈴木 淳, 富永英一郎, 山上 亘,
笈川文子, 徐 敬用, 野村弘行, 片岡史夫,
進 伸幸, 石田 功, 青木大輔:
ヒトモノクローナル抗体 HMMC -1 を用いた子
宮体癌に対する新規治療法の開発, 第 27 回
日本分子腫瘍マーカー研究会, 2007.10.2,
東京

笈川文子, 鈴木 淳, 富永英一郎,
末盛友浩, 市川義一, 野村弘行, 片岡史夫,
平沢 晃, 進 伸幸, 青木大輔:
ヒトモノクローナル抗体 HMMC -1 の子宮体癌
細胞に対する増殖抑制効果の検討, 第 46 回

日本臨床細胞学会秋期大会，2007.11.30～
12.1，仙台

笈川文子，ストリート美代子，有山宏美，
奥村佳代，川本元子，鈴木淳，青木大輔，
石田功，相川京子：
婦人科癌特異的ヒトモノクローナル抗体
HMMC-1の抗原解析と細胞増殖抑制作用，
第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学
学会大会 合同大会，2007.12.11～12.15，
横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

青木 大輔 (AOKI DAISUKE)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：30167788

(2)研究分担者

進 伸幸 (SUSUMU NOBUYUKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90206459

(H19 H20)

鈴木 直 (SUZUKI NAO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：90246356

鈴木 淳 (SUZUKI ATSUSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00255514

阪埜 浩司 (BANNO KOUJI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70265875

(H19 H20)

平沢 晃 (HIRASAWA AKIRA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90296658
(H19 H20)

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者

笈川 文子 (OIKAWA FUMIKO)

慶應義塾大学・医学部・研究員