

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 20 日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591451

研究課題名（和文）メラノーマ特異的血清バイオマーカーの同定とその臨床応用

研究課題名（英文）Identification of melanoma-specific serum biomarker and its clinical application

研究代表者

秋山 靖人（AKIYAMA YASUTO）

静岡県立静岡がんセンター（研究所）・免疫治療研究部・部長

研究者番号：70222552

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、我々が新規のメラノーマバイオマーカー候補として同定した Pro-platelet basic protein precursor (PPBP) に対する抗体を作成し、臨床応用に向けた測定系（ELISA）の開発を目指すことである。完全フロイドアジュバンドと PPBP 全長タンパクを用いた従来法（脾細胞を使用）では、ハイブリドーマのクローン数が十分に得られなかったが、腸骨リンパ節を回収する新しい方法を用いることにより、非常に効率化された。今後新しく得られたハイブリドーマのスクリーニングを行い、より感度の高い測定系の構築を目指す。

研究成果の概要（英文）：We identified pro-platelet basic protein precursor (PPBP) as novel melanoma-biomarker previously. In the present study, we are aiming at developing specific anti-PPBP antibody and establish PPBP-specific ELISA system contributing to a clinical application. The conventional method to make hybridoma using spleen cells was not successful; however novel approach using regional lymph node enabled us to obtain many functional hybridoma clones. We plan to construct a high sensitive ELISA specific for PPBP through a screening of newly obtained hybridomas.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：メラノーマ、バイオマーカー、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景：5-S-CD は現在メラノーマの臨床において最も多く使用されているバイオマーカーであるが、その精度は十分でなく、新しいマーカーの開発が必要である。我々は、メラノーマの新規の血清バイオマーカー候補として pro-platelet basic protein precursor (PPBP) を同定しており、今後、臨床応用に向けた測定系（ELISA）の

開発研究を行う予定である。

2. 研究の目的：PPBP は、簡易的な半定量法の検討では、5-S-CD に比較して、感度や陰性予測率に優れ、また優れた予後予測因子であることも示されている (Takikawa et al, Proteomics clinical application, 2009)。今後、本バイオマーカーの臨床応用

に向けた測定系 (ELISA) の開発を目指した応用研究を施行する予定である。

3. 研究の方法:

(1) PPBP タンパク(ペプチド)のマウスへの免疫によるハイブリドーマの作製:

①PPBP タンパクより選定したアミノ酸配列より下記のペプチド合成を行い、in vivo での免疫を施行し、ハイブリドーマの作成を行い、PPBP 特異的なマウスモノクローナル抗体の作成を行う。

	Position	Sequence	
1.	19 - 28	ALQVLLLLSL	10 mer
2.	35 - 47	SSTKGQTKRNLAK	13 mer
3.	48 - 58	GKEESLDSPLY	11 mer
4.	56 - 65	DLYAELRCMC	10 mer
5.	88 - 97	HCNQVEVIAT	10 mer
6.	101 - 110	GRKICLDPDA	10 mer
7.	112 - 121	RIKKIVQKKL	10 mer
8.	Full length	PPBP	128 mer

免疫の方法は、従来どおり[完全フロイドアジュバンド(CFA)+PPBP 50ugx1, 不完全フロイドアジュバンド(IFA)+PPBP 50ugx2]にてマウスへの免疫(皮下)を3回施行し、boosting後、脾細胞を回収した。

② 新しい腸骨リンパ節法によるハイブリドーマの作製を行う。上記のPPBPペプチドまたは全長タンパク 50ug+CFAを尾部に1回筋肉内注射をし、2週間後腸骨リンパ節を回収した。

(2) PPBP 特異的なマウスモノクローナル抗体を用いた ELISA 測定系を確立:

一方で既存のPPBPに対するモノクローナル抗体を組み合わせたELISA系の構築を試みた。市販のマウス抗ヒトPPBPモノクローナル抗体とウサギ抗ヒトPPBPポリクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチELISA法を構築した。

4. 研究成果:

(1) PPBP タンパク(ペプチド)のマウスへの免疫によるハイブリドーマの作製:

①IFAにて処理した7種類のPPBPペプチド用いて抗原感作を行ったマウスにおいてペプチドに対する血清抗体価の上昇が見られたが、作成したハイブリドーマの中ではPPBPタンパク(全長)との反応は極めて弱かった。

②次にCFA+PPBP 50ugx1, IFA+PPBP 50ugx2(従来法)にてマウスへの免疫(皮下)を3回施行後、作成したハイブリドーマでは、最終的にPPBPタンパクに結合の親和性があると思われる3クローンを得た。この中でPPBPタンパクに対するELISAで最も結合の強かったク

ローン(IgM抗体、Kd:2.83x10⁻⁸)につき測定系の構築を行ったが、十分な感度が得られなかった。

③その後免疫を効率よく行うため、マウスの大腿部にCFA+PPBP 50ugを1回のみ免疫後、腸骨リンパ節を回収し、ハイブリドーマの作製を試みた。ELISA法によるスクリーニングにてPPBPタンパクに反応する陽性クローンは、全体の約30%に認められ、従来法(5%)と比較してハイブリドーマ作製行程が非常に効率化された。また免疫の回数も1回で済むことより、コストや労力の削減にも繋がるものと思われた。今後得られた30クローンのPPBPタンパクを認識するハイブリドーマのスクリーニングを行い、抗体の機能的な選別を施行し、より感度の高い測定系の構築を目指す。

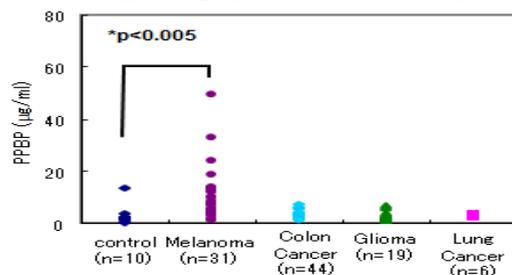
ハイブリドーマ株のスクリーニング

免疫抗原	EIA (sup.)		
	KLH-Peptide	Peptide	GST-PPBP
Peptide-1	29	11/29	1/11
Peptide-2	38	6/38	0/6
Peptide-7	4	0/4	
PPBP (従来法)			51/1000
PPBP (リンパ節法)			30/100

(2) PPBP 特異的なマウスモノクローナル抗体を用いた ELISA 測定系を確立:

市販のマウス抗ヒトPPBPモノクローナル抗体とウサギ抗ヒトPPBPポリクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチELISA法では、1ng/mlのPPBP濃度を検出可能であった。メラノーマ患者31症例中4μg/mlをカットオフとすると24症例でPPBPが検出され、血漿中の平均値は、メラノーマ10.1μg/ml、健常人1.7μg/mlであった。測定系の感度は77.4%、特異性は90.0%であった。また本ELISA系を利用してメラノーマ以外の大腸がんや脳腫瘍患者の血漿中のPPBPを測定するも、健常人と差は見られず、メラノーマでの特異性が示唆された。以上の結果よりPPBPが新しいメラノーマの血清バイマーカーとなりうる可能性が示唆された。今後ハイブリドーマ細胞株より質の高い抗体が得られ、より感度の高い測定系の構築が望まれる。

各種がん患者の血清中のPPBP濃度



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 12 件, すべて査読有)

- ① Takikawa M, Akiyama Y, Ashizawa T, Yamamoto A, Yamazaki N, Kiyohara Y, Oku N, Yamaguchi K. Identification of melanoma-specific serological markers using proteomic analyses. *Proteomics-CA* . 2009 May 3:552-562.
- ② Akiyama Y, Tai S, Komiyama M, Takikawa M, Ohshita C, Yamamoto A, Yamazaki N, Kiyohara Y. Characterization of cytomegalovirus (CMV)pp65-HLA-A24 peptide-specific CTL lines from metastatic melanoma patients. *Oncol Rep* 2009 Jul 22(1):185-191.
- ③ 秋山 靖人 一細胞分離技術を用いたがん特異的免疫細胞の遺伝子スクリーニング法の開発 応用物理 2009年12月 78(12); 1123-1127.
- ④ Suzuki A, Iizuka A, Komiyama M, Takikawa M, Kume A, Tai S, Ohshita C, Kurusu A, Nakamura Y, Yamamoto A, Yamazaki N, Yoshikawa S, Kiyohara Y, Akiyama Y. Identification of melanoma antigens using SERPA (serological proteome approach). *Cancer Genomics and Proteomics* 2010 Jan-Feb 7(1), 17-23.
- ⑤ Kutsuzawa K, Tada S, Hossain S, Fukuda K, Maruyama K, Akiyama Y, Akaike T, Chowdhury EH. Disrupting actin filaments promotes efficient transfection of a leukemic cell line using cell adhesive protein-embedded carbonate apatite particles. *Anal Biochem* 2009, 388:164-166.
- ⑥ Arakaki A, Ooya K, Akiyama Y, Hosokawa M, Komiyama M, Tai S, Iizuka A, Yamaguchi K, Matsunaga T. TCR-β Repertoire Analysis of Antigen-specific Single T Cells Using a High-density Microcavity Array. *Biotechnol Bioeng* 2010 Jun1 106(2), 311-318.
- ⑦ Nakamura Y, Komiyama T, Furue M, Gojobori T, Akiyama Y. CIG-DB: the database for human or mouse immunoglobulin and T cell receptor genes available for cancer studies. *BMC Bioinformatics* 2010 Jul27 11:398.
- ⑧ Shimizu M, Ishii H, Ogo N, Unno Y, Matsuno K, Sawada J, Akiyama Y, Asai A. S-trityl-L-cysteine derivative indices caspase-independent cell death

in K562 human chronic myeloid leukemia cell line. *Cancer Lett* 2010 Dec1 298 (1);99-106.

- ⑨ Matsuno K, Masuda Y, Uehara Y, Sato H, Muroya A, Takahashi O, Yokotagawa T, Furuya T, Okawara T, Otsuka M, Ogo N, Ashizawa T, Oshita C, Tai S, Ishii H, Akiyama Y, Asai A. Identification of a new series of STAT3 inhibitors by virtual screening. *ACS Med Chem Lett* 2010 Jul13 1(8):371-375.
- ⑩ Iizuka A, Komiyama M, Tai S, Oshita C, Kurusu A, Kume A, Ozawa K, Nakamura Y, Ashizawa T, Yamamoto A, Yamazaki N, Yoshikawa S, Kiyohara Y, Yamaguchi K, Akiyama Y. Identification of cytomegalovirus (CMV)pp65 antigen-specific human monoclonal antibodies using single B cell-based antibody gene cloning from melanoma patients. *Immunol Lett* 135:64-73, Mar30 2011.
- ⑪ Ashizawa T, Miyata H, Ishii H, Oshita C, Matsuno K, Masuda Y, Furuya T, Okawara T, Otsuka M, Ogo N, Asai A, and Akiyama Y. Antitumor activity of a novel small molecule STAT3 inhibitor. *Int J Oncol* 38(5): 1245-52, May 2011.
- ⑫ Nakamura Y, Oshita C, Iizuka A, Ashizawa T, Saito S, Yamaguchi S, Kondo H, Yamaguchi K, Akiyama Y. Analysis of HLA-A24-restricted peptides of Carcinogenic embryonic antigen (CEA) using a novel structure-based peptide-HLA docking algorithm. *Cancer Sci* 102(4): 690-6, Apr 2011.

[学会発表] (計 2 件)

- ① Akiyama Y, “Novel approach to the characterization of melanoma associated-peptide-specific CTL lines from metastatic melanoma patients” China-Japan Symposium on Cancer Research, May 19-20, 2011, Pattaya Hotel, Shenzhen, China.
- ② 秋山靖人, “HLA-ペプチドドッキング解析に基づいた免疫創薬的アプローチ” 第20回日本組織適合性学会大会 シンポジウム IV HLA と創薬 2011年8月31日, ツインメッセ静岡 静岡市

[図書] (計 2 件)

- ① 秋山 靖人、新垣 篤史, シーエムシー出版, シングルセル解析の最前線 第4章 mRNAをターゲットとしたデジタル精密計測技術の開発 10. 1細胞分離技術を用いたがん特異的免疫細胞の遺伝子スクリーニング法の開発 2010, 274

- ② Akiyama Y, et al. Melanoma/Book1, ISBN 978-953-307-291-3, Intech, Novel approach to the characterization of melanoma-peptide-specific CTL lines from metastatic melanoma patients.2011, 495.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

①名称：プロテオミクス解析を用いたメラノーママーカーの同定

発明者：秋山靖人、瀧川雅子

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2008-149728

出願年月日：2008 年 6 月 6 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計◇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

秋山靖人 (Akiyama Yasuto)

静岡県立静岡がんセンター研究所

免疫治療研究部

部長

研究者番号：70222552

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

清原 祥夫 (Kiyohara Yoshio)

静岡がんセンター病院

皮膚科・部長

研究者番号：70205037