

## 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25年3月31日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390118

研究課題名（和文） スーパー標的抗体による婦人科系癌の新規診断マーカー探索と低侵襲性迅速検出法の開発

研究課題名（英文） Research for novel diagnostic marker of gynecologic tumors and establishment of rapid and low invasive detection system by super-targeting antibody.

研究代表者

加藤 和則（KATO KAZUNORI）

東洋大学・理工学部・教授

研究者番号：60233780

研究成果の概要（和文）：婦人科系腫瘍に対する標的抗体の樹立と新規腫瘍マーカーの高感度検出系の樹立を目指し以下の研究成果を得ることができた。まず、ホルモン依存性腫瘍抗原として新たに NCAM2 を同定することに成功した。さらに卵巣癌に対する特異的抗体7種類および乳癌に対する抗体1種類を樹立した。次に腫瘍マーカー sEpCAM, sCD147, sEphA2 および sTROP2 に対する標的抗体を用いて高感度サンドウィッチ ELISA およびイムノクロマトの開発に成功した。さらに子宮体癌の癌幹細胞抗原候補を同定し、非侵襲的かつ高感度の検出システムを開発している。

研究成果の概要（英文）：We could succeed to generate the target antibody against the gynecologic cancers and to establish a high-sensitive detection system of novel tumor marker. The first, we generated mAb to human NCAM2 expressed on hormone-dependent prostate and breast cancer. In addition, we established seven mAbs against ovarian cancer and one to breast cancer. The second, in attempt to improve diagnosis for gynecologic cancers, we developed new sandwich ELISA and immunochromatography systems detecting human sEpCAM, sCD147, sEphA2 and sTROP2, respectively, with high sensitivity and specificity. The third, we examined the biomarker candidates that were predominantly expressed in cancer stem cells of endometrial cancers. Thus, this approach is feasible for non-invasive and high sensitive diagnosis for gynecologic cancers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2012年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

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：癌、腫瘍マーカー、抗体、診断薬、婦人科腫瘍

### 1. 研究開始当初の背景

癌は日本のみならず世界の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。

婦人科系癌では乳癌（年間約 45,000 人が罹患）がマンモグラフィ検査で、子宮頸部癌（年間罹患数約 8,000 人）に対しては内診・細胞診等の検査システムが構築されており、早期発見により治癒率・生存率ともに向上している。しかし依然として早期診断に至らない癌の種類はまだ多く、ひとたび発症が確認されれば進行癌として見つかり、化学療法・外科手術を施しても根本的な治療にはならず、残存癌細胞が増殖し予後不良となる例が多い。

本申請研究課題で対象とした子宮体癌（子宮内膜癌）（年間罹患数約 7000 人）は 50～60 歳代をピークとして発症し、年々増加傾向にある癌である。初期症状として月経と無関係な不正出血が主症状であるが、癌が子宮内部に発生するために通常の子宮頸部癌の細胞診検査では検出できず、経管拡張と搔爬器具を用いる侵襲性の高い細胞診検査により初めて診断される。また特異的な血液中の腫瘍マーカーも存在せず、一般の検査による早期発見が困難な癌の 1 種である。もう一つの研究対象である卵巣癌は卵巣に発生する腫瘍で卵巣腫瘍の約 8 割が良性であるが、約 2 割は悪性化した卵巣癌であり年間約 1 万人の女性が罹患している。卵巣は腹部の中に存在する組織のため超音波検査、CT、MRI 検査などの機器診断が主流となっているが、進行初期症状が出にくい癌であるため、自覚症状として現れたときは腹膜播種、腹水貯留、遠隔転移しており予後不良の婦人科系癌である。そのため早期診断が困難な難治性の子宮体癌と卵巣癌に対する早期診断法の確立は治癒率・生存率を向上するためには必須であり、多くの被験者を対象とできる低侵襲的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と考え研究を着手するに至った。

## 2. 研究の目的

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ると、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・マーカーを探索できることを明らかにし、これまでに約 50 種類の癌関連抗原の同定および 200 種以上の癌に対する高性能のスーパー標的化抗体 (Staab) の樹立に成功してきている。そこで本研究ではこれらの抗体シーズを有効に活用し、従来の技術では検出が不可能であった微量の癌抗原（腫瘍マーカー）を癌患者の血液、便、尿などから検出することを目的とした。具体的には高性能スーパー標的抗体を用いて 1) 婦人科系癌に対する新規腫瘍マーカーの探索研究と、2) 低侵襲性高感度診断法の開発研究を目指す。研究機関終了時にはそ

の研究成果が臨床研究・産学連携開発研究の次のステップに移行し実用化を目指すことを最終目標とする。

## 3. 研究の方法

以下の実験計画に従って研究を施行した。

(1) 既に樹立済みのスーパー標的抗体 20 数種に加えて新たに婦人科系腫瘍に対する抗体を樹立し、その抗原を同定し標的分子としての有用性を検討する。

(2) 既に樹立済みのスーパー標的抗体を使用し腫瘍マーカー候補分子 (TROP2, EphA2 等) の高感度検出系 (ELISA 法) を確立し、癌細胞培養上清および精製蛋白抗原を用いて検出限界濃度の測定、抗体標識条件などの最適条件を確定する。さらに健常人および対象癌患者の末梢血・生殖器からの出血・腔内分泌液・尿サンプルで各種腫瘍マーカー値を測定し新規腫瘍マーカーとしての有用性を解析する。さらに ELISA 以外の迅速検出法 (イムノクロマト法、循環癌細胞検出法) を開発し、従来の病理組織学的・免疫血清学的解析に加えて、低侵襲的かつ迅速な診断方法への可能性を検討する。

(3) 婦人科系腫瘍の癌幹細胞に有為に発現上昇している分子を DNA マイクロアレイなどの手法で同定し、候補抗原に対する抗体の樹立を行う。

## 4. 研究成果

(1) 婦人科系腫瘍に対する特異抗体の樹立  
①ホルモン依存性腫瘍 (乳癌、卵巣癌、前立腺癌) に対する標的化抗体 LNI-29 と認識抗原 NCAM2 の発現解析

婦人科系腫瘍の多くはホルモン依存性に増殖、活性化そして薬剤耐性を獲得する機構を有することが報告されている。図 1 に示した LNI-29 抗体は前立腺癌初代培養細胞を免疫原として樹立したモノクローナル抗体であり、認識抗原が神経細胞接着分子 2 (NCAM2; neural cell adhesion molecule isoform 2) であることが判明した。

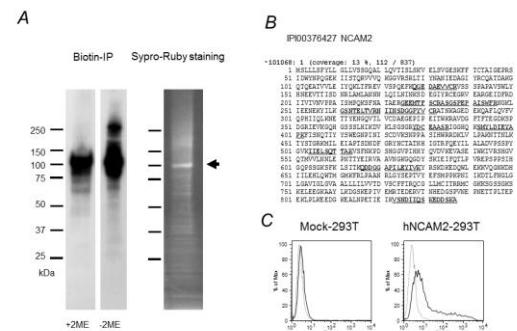


図1. 抗ヒトNCAM2抗体(LNI-29)の認識抗原の解析  
A, 免疫沈降、B, MS解析データ、C, 特異性確認

NCAM2 はアンドロジェン依存的な前立腺癌細胞

胞に発現し、非依存性前立腺癌には反応性を示さない。さらにエストロゲン受容体(ERα)陽性の乳癌細胞に対しては発現陽性であり、癌患者由来組織(組織アレイ)においても陽性を示した。さらにこの分子は慢性炎症時に産生されるIL-6の刺激によりNCAM2の発現が上昇することから、可溶化体の産生も考えられる。現在、もう1種類のNCAM2抗体を作製しELISA系を樹立する予定であり、ホルモン依存的腫瘍の検出を検討する予定である。

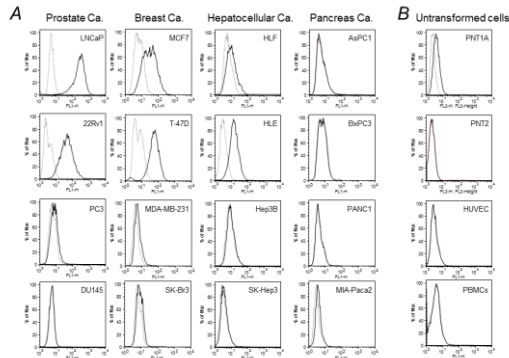


図2. 抗ヒトNCAM2抗体(LNI-29)の各種癌細胞に対する反応性解析  
A, 前立腺癌、乳癌、肝癌、膵臓癌細胞株、B, 正常細胞株

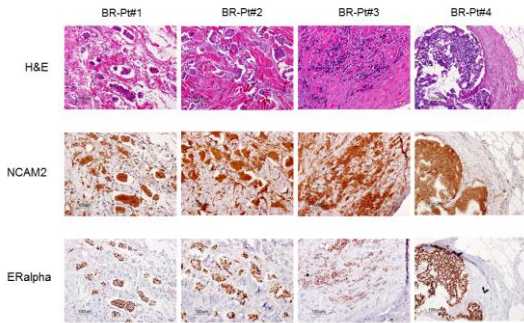


図3. 乳癌組織におけるNCAM2およびERαの免疫組織染色  
上段:H&E染色、中段:NCAM2、下段:ERα

## ② 卵巣癌におけるエピジェネティクス制御性癌抗原に対する標的化抗体の樹立

癌の進行が進むと癌組織周辺の微小環境の影響(低酸素、炎症、オートファジー)により、癌細胞の遺伝子発現制御がエピジェネティックに制御され治療抵抗性、浸潤機能などを獲得する。その多くは細胞内に発現しているシグナル伝達分子や転写制御分子等であるが、細胞表面抗原も変化することが知られている。そこでエピジェネティック制御を受けている癌抗原をこのDNAメチル化阻害剤で処理をした卵巣癌細胞SK-OV-3を免疫原として、DNAメチル化解除により発現増強する細胞表面抗原に対しての抗体スクリーニングを行った(図4)。その結果、9種類のモノクローナル抗体の樹立に成功した(図5)。いずれの抗体もDNAメチル化制御を解除することにより発現増強してくる分子であり、現

在も継続して認識抗原を免疫沈降および質量分析により同定を検討中である。また図6に示すように乳癌に対するMg-yyy抗体および卵巣癌・前立腺癌に対するxxxx抗体(いずれも特許出願準備中)もエピジェネティクス制御を受けている抗原を認識している。抗体xxxxの反応陽性および反応陰性卵巣癌SK-OV3細胞を分取して増殖能の違いを検討した結果、xxxx陰性SK-OV3細胞では増殖能

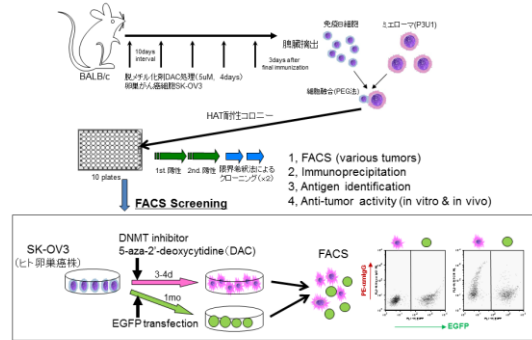


図4. 抗ヒト卵巣癌SK-OV3におけるエピジェネティクス制御抗原に対する抗体樹立方法

が亢進していることが判明した。この認識抗原の同定を現在も継続して実施中であるが、癌幹細胞との関連が示唆されていることから今後癌の治療抵抗性の指標となり得る可能性も推測できるので可溶化分子検出系の樹立を目指す予定である

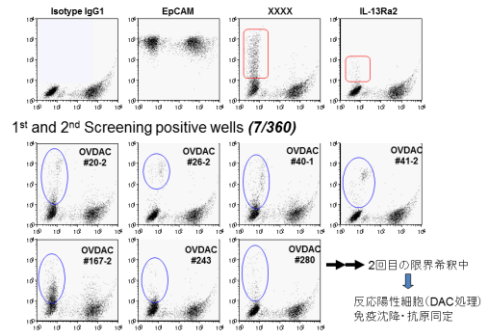


図5. 脱メチル化剤処理卵巣癌に優位に反応性を示す抗体(7種)

上段は有為に反応性を示した抗原2種(xxxx, IL13Ra2)

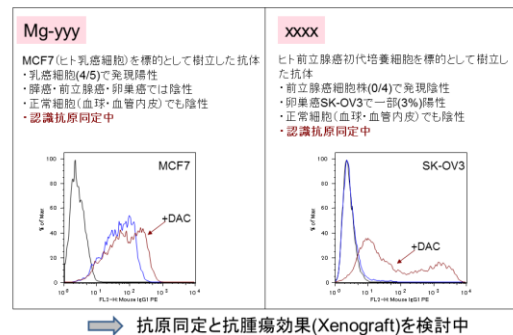


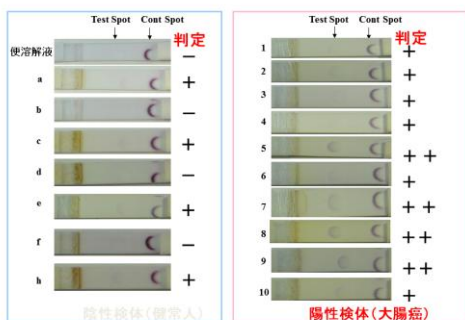
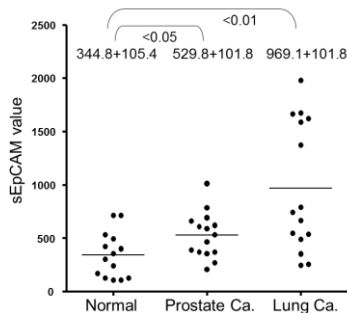
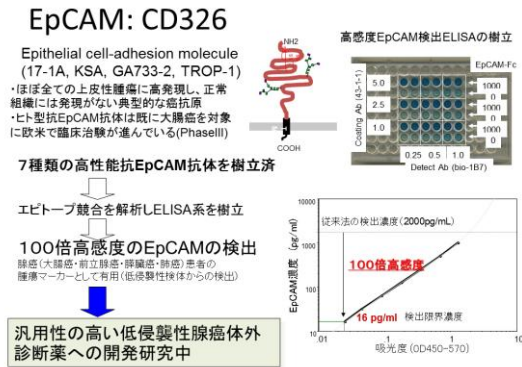
図6. 乳癌、卵巣癌でエピジェネティクス制御を受けている抗原の発現解析

## (2) 腫瘍マーカー検出高感度ELISAおよび

イムノクロマトの構築と各試料からの可溶性抗原測定

①可溶性 EpCAM

上皮性腫瘍抗原 EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule)は多くの上皮性腫瘍(腺癌)に幅広く発現している抗原であり、抗体医薬の標的分子としても製薬企業などで検討されている。これまでにEpCAMに対する抗体7種類を独自に樹立し各抗体認識エピトープの競合試験により、高感度(検出限界16pg/ml)かつ低バックグラウンドの抗体の組み合わせを選択してきた(図7)。



樹立したサンドウィッチ ELISA で腺癌患者の血清を測定した結果有為な上昇を認めており、その有用性が証明できた(図8)。さら

に大腸癌患者の便中にも可溶性EpCAMを検出することができ(ELISA法、データ非公開)、ELISAで使用した抗体を用いてイムノクロマトを作成した結果、図9に示すように癌患者便中でEpCAMを検出することに成功した。そこで現在、婦人科系腫瘍の患者血清および経血においてこのEpCAM抗原が検出できるか研究分担者と検討中である。

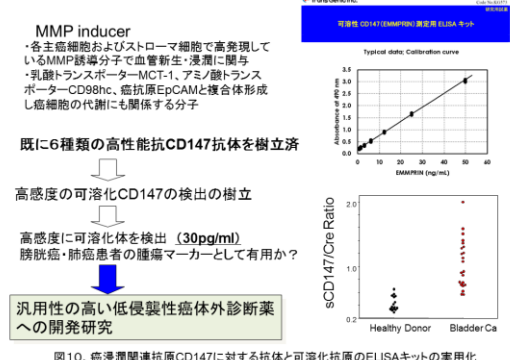
②可溶性 CD147 検出キットの開発

CD147は広範囲の腫瘍で発現増強する抗原分子であり、可溶性体も癌細胞の培養上清中に大量に産生されることを確認している。本研究では独自に作製した抗CD147抗体6種類のエピトープ解析により最適に可溶性体を検出できる抗体を選択し、ELISAキットを株式会社トランスジェニックと開発し、特許出願および製品化に成功した(図10)。現在は癌患者尿中に存在する可溶性CD147の臨床的有用性を検討する予定である。

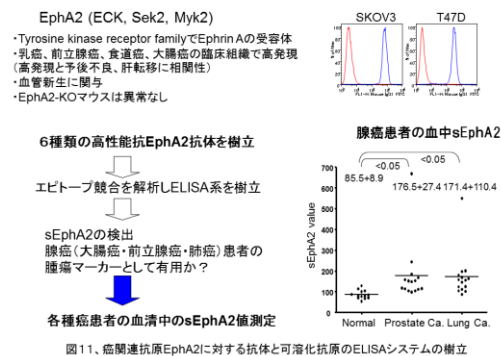
③可溶性 EphA2

EphA2は癌細胞で高発現している受容体型チロシンキナーゼで、癌細胞の浸潤転移に重要な分子である。これまでに6種類の抗EphA2抗体の樹立に成功しており、サンドウィッチELISAシステムを構築した。その結果、図11に示すように前立腺癌・肺癌患者において有為に血中EphA2値が上昇していることが判明した。現在、高感度および低バックグラウンドの検出系を再構築中で、婦人科系癌の血中EphA2を測定する予定である。

EMMPRIN: CD147



EphA2: Ephrin Receptor A2





(3) 癌幹細胞標的分子の同定と抗体作製

ヒト由来子宮内膜細胞の Ras トランスフォーム細胞をヘキスト染色陰性の SP (Side population) と染色陽性の NSP (non-side population) ソーティングで分取し発現遺伝子の違いを cDNA アレイで測定した結果を解析した。その結果、SP (癌幹細胞に類似した細胞) で高発現している膜型蛋白質 7 種類、分泌性蛋白質 9 種類を選択した。逆に SP で低発現している遺伝子 (膜型 7 種類、分泌型 12 種類) も選択した。発現変化の再確認のために real-time PCR 法にて解析した結果、sp 細胞で発現亢進 4 種類、発現減少 3 種類の抗原候補を選択した (図 12)。現在、これらの候補蛋白質に対する標的抗体の樹立を実施中である。

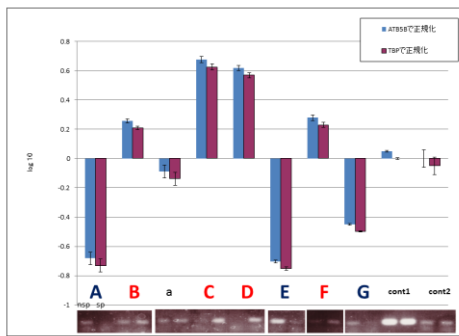


図 12. ヒト子宮内膜由来 sp 細胞 / nsp 細胞における発現遺伝子解析  
sp 細胞 (幹細胞) で発現上昇 (B, C, D, F)、発現減少 (A, E, G) している遺伝子

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Fujiwara D, Kato K, Nohara S, Iwanuma Y and Kajiwara Y. The Usefulness of three-dimensional cell culture in induction of cancer stem cells from esophageal squamous cell carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Comm.* 2013, 434: 773-778. 査読有
- ② Kato K. Endometrial cancer stem cells: a new target for cancer therapy. *Anticancer Res.* 2012, 32:2283-2293. 査読有
- ③ Kato K, Kusunoki S, Inagaki T, Yusuf N, Suga S, Terao Y, Arima T, Tsukimori K, Takeda S. Side-population cells derived from non-tumorigenic rat endometrial cells are a candidate cell of origin for malignant endometrial tumors. *J Stem Cell Res Ther.* 2012, doi:10.4172/2157-7633.S7-003. 査読有
- ④ Fukushima K, Tsukimori K, Li D, Takao T, Morokuma S, Kato K, Seki H,

Takeda S, Matsumura S, Wake N. Effect of transient TCDD exposure on immortalized human trophoblast-derived cell lines. *Hum Exp Toxicol.* 2012, 31:550-556. 査読有

- ⑤ Miura G, Kato K, Shimizu T, Shiga D and Shirasawa T. Heme oxygenase-1 (HO-1) is constitutively up-regulated in top alpinists. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012, 417: 104-108. 査読有
- ⑥ Takao T, Asanoma K, Kato K, Fukushima K, Tsunematsu R, Hirakawa T, Matsumura S, Seki H, Takeda S, Wake N. Isolation and Characterization of Human Trophoblast Side-Population (SP) Cells in Primary Villous Cytotrophoblasts and HTR-8/SVneo Cell Line. *PLoS One.* 2011, 6: e21990. 査読有
- ⑦ Onoda A, Ueno T, Uchiyama S, Hayashi SI, Kato K, Wake N. Effects of S-equal and natural S-equal supplement (SE5-OH) on the growth of MCF-7 in vitro and as tumors implanted into ovariectomized athymic mice. *Food Chem Toxicol.* 2011, 49: 2279-2284, 査読有
- ⑧ Kato K, Kuhara A, Yoneda T, Inoue T, Takao T, Ohgami T, Dan L, Kuboyama A, Kusunoki S, Takeda S, Wake N. Sodium Butyrate inhibits the Self-Renewal Capacity of Endometrial Tumor Side-Population Cells by Induction a DNA Damage Response. *Mol Cancer Ther.* 2011, 10:1-10. 査読有
- ⑨ Takenouchi M, Hirai S, Sakuragi N, Yagita H, Hamada H and Kato K. Epigenetic modulation enhances the therapeutic effect of anti-IL-13Ra2 antibody in human mesothelioma xenografts. *Clin Cancer Res.* 2011, 17: 2819-2829. 査読有
- ⑩ Takahashi S, Kato K, Nakamura K, Nakano R, Kubota K and Hamada H. Neural cell adhesion molecule 2 as a target molecule for prostate and breast cancer gene therapy. *Cancer Sci.* 2011, 102: 808-814. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 藤原 大介、加藤 和則、野原 茂夫、松原 久昭、岩沼 佳美、梶山 美明、Stemness property of the human esophageal squamous cell carcinoma in three-dimensional culture. 第 71 回日本癌学会総会、2012 年 9 月 20 日、札幌

- ② 野原茂夫、加藤和則、藤原大介、柳原五吉、岩沼佳美、梶山美明、Side population analysis and high aldehyde dehydrogenase activity in cancer stem cells of human scirrhous gastric cancer. 第71回日本癌学会総会、2012年9月19日、札幌
- ③ Kato K, Takeunochi Y, Sakuragi N and Yagita H. Epigenetic modulation enhances the therapeutic effect of anti-IL-13 receptor a2 antibody in human mesothelioma xenografts. 2012 アメリカ癌学会 AACR 総会、2012年4月3日、シカゴ、アメリカ
- ④ 加藤和則、中村公則、山口美樹、濱田洋文、薬剤運搬に適した腫瘍標的化抗体のスクリーニング法と創薬シーズ開発、日本薬学会第132年会、2012年3月29日、札幌

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：抗 Trop-2 抗体

発明者：山口美樹、加藤和則、濱田洋文、中

村和靖、杉本義幸、久保田麗夫、池田昌弘

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/J P 2 0 1 1 / 6 3 2 9 4

出願年月日：2011年6月9日

国内外の別：国内、国外

〔その他〕

ホームページ等

[http://ris.toyo.ac.jp/details/index.php?user\\_id=1640](http://ris.toyo.ac.jp/details/index.php?user_id=1640)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 和則 (KATO KAZUNORI)

東洋大学・理工学部・教授

研究者番号：60233780

### (2) 研究分担者

加藤 聖子 (KATO KIYOKO)

九州大学・医学部・教授

研究者番号：10253527

### (3) 連携研究者 (0)