

## 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 5 月 24 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501054

研究課題名（和文） ウイルスベクターを用いた膵標的化抗体の作製と膵癌治療法の開発

研究課題名（英文） Pancreas-specific antibody production and development of pancreatic cancer therapy using virus vector

## 研究代表者

田中 俊裕 (TANAKA TOSHIHIRO)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：00398314

研究成果の概要（和文）：抗体と架橋することが出来るように遺伝子改変したアデノウイルスベクター（Adv-FZ33）を用いて、膵癌細胞上の表面抗原と強く結びつくモノクローナル抗体をスクリーニングしさらにその抗原を同定することにより、膵癌の標的化治療を試みた。スクリーニングで得られた抗体は20種類で、それら抗体中でF2-27は特に腫瘍選択性に優れており、TOF-MASSによる抗原解析から\*\*であることが判明した。F2-27は膵癌細胞のみならず、胃癌、前立腺癌、肺癌細胞株にも反応した。Adv-FZ33に治療遺伝子であるHSV-tk遺伝子を組み込んだvectorを作製し、GCV(ganciclovir)との併用療法を行ったところ、胃癌、前立腺癌細胞株においてF2-27選択的tk遺伝子導入出来、GCVの濃度依存的にkillingが認められた。

研究成果の概要（英文）：We have recently developed the fiber modified adenovirus vector (Adv-FZ33). This vector can binds immunoglobulin-G (IgG) with high affinity. We demonstrated that monoclonal antibody (mAb) screened by Adv-FZ33, which is capable of binding to suitable target antigens on pancreatic cancer cell lines. Through this screening, we established twenty different mAbs. Among these mAbs, F2-27 is highly selective for cancer cell. The target antigens were identified as \*\* by MALDI-TOF mass spectrometry. These antigens were expressed in several cancer cell lines, including gastric, lung, and prostate cancer. We generated Ax3CMTK-FZ33 (tk-FZ33), which is an Adv-FZ33 derivative vector expressing a therapeutic gene, HSV-tk. tk-FZ33 with F2-27 enhanced the cytotoxicity of GCV (ganciclovir) compared with control mAb. These data suggest that F2-27-targeted FZ33-mutant adenovirus-mediated gene delivery offers a strong and selective therapeutic modality against cancers.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学、臨床腫瘍学

キーワード：癌、遺伝子治療、抗体療法、分子標的

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、アデノウイルスのファイバータンパクに標的化ペプチドを組み込むことにより、特定のがん細胞に感染効率が低い「がん標的化ウイルスベクター」を作製し、その生物活性を検討してきた。平成17年度からの2年間では、基盤研究Cの助成を受け、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アデノウイルスベクター(Adv-FZ33)を作製し、ウイルスベクターと腫瘍細胞とを癌胎児性抗原(CEA)に対するヒトモノクローナル抗体で架橋することによって、CEA産生細胞で遺伝子導入効率が上がる事、さらにCEA産生がん細胞株を用いたヌードマウス腹膜播種モデルでの治療実験においても、CEA特異的な遺伝子治療が可能であることを証明した。

本研究では、腫瘍細胞とAdv-FZ33アデノウイルスとを架橋することによって遺伝子導入効率が上がるモノクローナル抗体をスクリーニングし、腫瘍細胞に対して標的化可能な表面分子と抗体との、組み合わせ探索が出来るものと考え、正常膵組織を免疫にすることによって膵組織(主に膵管)由来のモノクローナル抗体のライブラリーを作製、同様のスクリーニング方法による膵臓器に対する選択的標的化の候補となる新しい表面分子の同定を試みるものである。

## 2. 研究の目的

本研究では、モノクローナル抗体のFcドメインに結合するProtein A由来のZ33モチーフを含むファイバー変異型Adv-FZ33を用いて、膵組織に対する標的化の候補となる新しい分子の同定を試みる。さらに、これらの新規標的化の可能なアデノウイルスベクターシステムを活用して、臨床応用への可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

正常膵管を含む組織を免疫することにより膵管に対する抗体ライブラリーを作製し、抗体結合能を有するウイルスベクター(Adv-FZ33)を利用するユニークなスクリーニング方式で膵管に強くレポーター遺伝子を導入出来る抗体を樹立する。またTissue Microarrayを用いて膵特異的な抗体を選択した後、抗原の同定は質量分析を用いて行う。樹立抗体を利用した膵癌の標的化治療はHSV-tk遺伝子を組み込んだAdv-FZ33を作製

し、GCV(ganciclovir)との併用療法を行い、治療効果を検討する。

## 4. 研究成果

膵癌細胞と抗体と架橋することが出来る遺伝子改変したアデノウイルスベクター: Adv-FZ33を用いて遺伝子導入効率が上がるモノクローナル抗体を作製、スクリーニングを行い、癌細胞に対して標的化可能な表面抗原と抗体との組み合わせ探索を行い、20クローンの抗体を樹立した。

これらの抗体と一緒にAdv-FZ33を膵癌細胞株に感染させると、Adv-FZ33単独の感染に比べて、約100倍のレポーター遺伝子を導入できることを確認している。これら得られた20種類の抗体のうち、7種類の抗体に対する抗原の同定に成功した。この中の、抗体クローン名F2-27は、膵癌細胞のみならず胃癌、前立腺癌、肺癌細胞株にも反応したが、正常コントロールとして用いた細胞線維芽細胞には反応を示さないものであり、腫瘍選択に優れていた。抗原はTOF-MASSによる解析から\*\*であることが判明した。

F2-27を用いて、さらにin vitroの系で抗原(抗体)特異的な治療実験を行った。Adv-FZ33に治療遺伝子であるHSV-tk遺伝子を組み込んだvectorと、GCVとの併用療法を行ったところ、PC-3、MKN-1細胞でF2-27選択的tk遺伝子導入出来、GCVの濃度依存的killingが認められた。

F2-27は新規抗原ではなかったため、相互作用するタンパク質の探索は行っていない。また、F2-27単独では、抗原を過剰発現する細胞株の形態変化や増殖活性に変化をおこさせなかった。

今後はsiRNAの系を用いて、細胞接着や増殖活性、抗癌剤の感受性変化を調べる。

## 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9件)

1. Toshihiro Tanaka and Kazuo Tamura, Recent Advances in Molecular Targeted Therapy for advanced Colorectal, J Phys Chem Biophys, 査読有, Vol. 2, 2012, 1-9, doi:10.4172/2161-0398.1000108

2. Mishima T, Tsuboi Y, Enomoto T, Higuchi MA, Tsugawa J, Yamada T, Tanaka T, Tsugu H, Hayashi H, Nabeshima K., [Primary central nervous system lymphoma: a case report and evaluation of the diagnostic value of IL-10 level in the

cerebrospinal fluid], Brain Nerve, 査読有, 64(11), 2012, 1347-1351

3. Khalili S, Liu Y, Kornete M, Roescher N, Kodama S, Peterson A, Piccirillo CA, Tran SD., Mesenchymal stromal cells improve salivary function and reduce lymphocytic infiltrates in mice with Sjögren's-like disease. PLoS One, 査読有, 7(6):e38615. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0038615

4. Isobe Y, Kosaka T, Kuwahara G, Mikami H, Saku T, Kodama S, Oriented Collagen Scaffolds for Tissue Engineering, Materials, 査読有, 5(3), 2012, 501-511, doi:10.3390/ma5030501

5. Mikami H, Kuwahara G, Nakamura N, Yamato M, Tanaka M, Kodama S, Two-layer tissue engineered urethra using oral epithelial and muscle derived cells, J Urol, 査読有, 187(5), 2012, 1882-1889, DOI:10.1016/j.juro.2011.12.059

6. Kojima D, Mera T, Nishinakamura H, Itoh T, Ogata T, Matsuoka N, Kodama S, Yasunami Y., Prevention of High-Mobility Group Box 1-Mediated Early Loss of Transplanted Mouse Islets in the Liver by Antithrombin III, Transplantation, 査読有, 93(10), 2012, 983-988, doi: 10.1097/TP.0b013e31824d3508

7. Ashida N, Senbanerjee S, Kodama S, Foo SY, Coggins M, Spencer JA, Zamiri P, Shen D, Li L, Sciuto T, Dvorak A, Gerszten RE, Lin CP, Karin M, Rosenzweig A., IKK $\beta$  regulates essential functions of the vascular endothelium through kinase-dependent and -independent pathways, Nat Commun, 査読有, 2, 318, 2011, doi: 10.1038/ncomms1317

8. 米良利之、小玉正太、安波洋一、膵臓・膵島移植の現状と最。新の研究 移植早期膵島障害。機序の解明と新規制御法開発。膵臓。査読有、26 (2) , 2011、183-189.

9. Dieguez-Acuña F, Kodama S., Okubo Y., Paz AC., Gygi SP., Faustman DL., Proteomics Identifies Multipotency and Low Oncogenic Risk Stem Cells of the Spleen, Int J Biochem Cell Biol, 査読有, 42(10), 2010, 1651-1660

[学会発表] (計 5 件)

1. Kojima D., Nishinakamura H., Ogata

T., Nagaishi M., Mera T., Itoh T., Matsuoka N., Kodama S., Yasunami Y., Inhibitory Effect of Thrombomodulin on HMGB1-Stimulated IFN- $\gamma$  Production of Hepatic NKT and Gr-1+ Cells, Facilitating to Prevent Early Loss of Transplanted Islets in the Liver of Mice, 24th International Congress of the Transplantation society, July15-19, 2012, Berlin, Germany

2. Shohta Kodama, Islet Regeneration - The possible inductions from Adult -, The Fourth International Cell Therapy Conference, November 11. 2010, Seoul, Korea

[図書] (計 2 件)

1. 田中俊裕、田村和夫、金原出版、抗癌薬の薬理・薬剤耐性・薬物有害反応の評価方法/乳腺腫瘍学/日本乳癌学会編、2012、368 (273-276)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
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

田中 俊裕 (TANAKA TOSHIHIRO)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号 : 00398314

(2)研究分担者

小玉 正太 (KODAMA SYOUTA)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：90549338

(3)連携研究者

(0)

研究者番号：