

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 6 日現在

機関番号：84420

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22800095

研究課題名（和文）抗体エンジニアリングによる有用な癌幹細胞バイオマーカーの探索と抗体の開発に関する研究

研究課題名（英文）Discovery of biomarker candidates for Cancer stem cell and isolation of the specific antibody

研究代表者

村岡 賢 (MURAOKA SATOSHI)

独立行政法人医薬基盤研究所・プロテオームリサーチプロジェクト・研究員

研究者番号：50582681

研究成果の概要（和文）：癌の発生、転移に関わる癌幹細胞に特異的抗体の単離をマウス由来の抗体ファージライブラリを用いて行ったが、特異的抗体ファージの単離に至らなかった。そこで、癌幹細胞をもつ癌患者由来の抗体ファージライブラリを作製することで特異的な抗体ファージの単離に成功するのではないかと考え、少し方向を変更し、胃癌患者由来の抗体ファージライブラリの作製を試みた。現在構築が終わり、この抗体ファージライブラリを用いて癌幹細胞特異的抗体の単離を試みているところである。

研究成果の概要（英文）：Although we had performed to isolate cancer stem cell specific antibody from mouse antibody phage libraries, there were failed. The next idea was to construct human antibody phage library from cancer patients with cancer stem cell. We had finished constructing them. In the future, we will perform to isolate antibody against stomach cancer stem cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学、腫瘍診断学

キーワード：癌幹細胞・ファージディスプレイ技術・次世代質量分析

1. 研究開始当初の背景

多くの癌において治療後の転移、再発が大きな問題となっている。その原因とされているのが癌幹細胞である。そのことより、癌幹細胞の新たなバイオマーカーの発見、治療用抗体が必要であり、いくつかのタンパク質が癌幹細胞のバイオマーカーとして報告されているが、臨床的に有益性が認められたものはまだ無い。

2. 研究の目的

多くの癌は、自己複製、分化、増殖能を有する癌幹細胞によって維持されていると考えられており、また、癌幹細胞は、化学療法などの治療に対して耐性を有していることより癌の再発の原因であることが報告されている。しかしながら、その癌幹細胞を標的とした有効な治療薬がまだなく発見が期待されている。そこで、本研究では、細胞株と比較してより病態を反映している患者癌組織

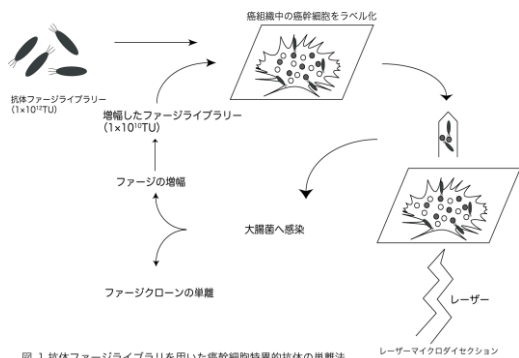
を用い、癌組織から癌幹細胞だけを取り出すことが可能なレーザーマイクロダイセクション技術と微量の抗原（細胞）があれば迅速に抗体を単離することが可能な抗体ファージディスプレイ技術および次世代質量分析計を用いた微量タンパク質同定技術の3つの手法を用いることにより癌幹細胞の新規バイオマーカー候補を探索し、同時に特異的抗体を単離することを試みる。

3. 研究の方法

本研究では、患者癌組織に存在する癌幹細胞の新規バイオマーカーの探索と特異的抗体を開発するために以下の手順で研究を進めた。

(1) 癌幹細胞新規バイオマーカー候補の探索と特異的抗体の単離方法を確立

大腸癌、乳癌患者の癌組織を幹細胞マーカーとして報告されている ALDH1 と CD133 の抗体を用いて免疫染色をおこなった。確認後、マウスナイブ抗体ファージライブラリを反応させ、レーザーマイクロダイセクションを用いて癌幹細胞(抗体で染色された部位)の回収を行った。回収した癌幹細胞から酸により抗体ファージの溶出を行い、大腸菌に感染させるという過程を3回繰り返して特異的に反応する抗体ファージの濃縮を行った(図1)。濃縮後、抗体ファージのクローン化を行い、癌幹細胞に特異的に反応しているかを癌細胞株及び癌組織をもちいて免疫染色により確認を行った。



(2) 癌患者由来の抗体ファージライブラリの構築

①cDNA の合成

胃癌患者の血液より Ficoll 法を用いて末梢血リンパ球を調整後、ISOGEN を添加してホモジェナイズを行いクロロホルム抽出により total RNA を精製した。抽出した total RNA から Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit (Roche) を用いて cDNA の合成を行い、GAPDH の増幅により確認を行った。

②1st PCR の精製 (Vh, Vk)

cDNA 産物を鋳型に 1st PCR 用に準備した primer を用いて PCR により増幅後、Agarose

③2nd PCR の精製 (Vh, Vk)

1st PCR 産物に制限酵素サイトを付加させるために 1st PCR 産物を鋳型に 2nd PCR 用に準備した primer を用いて PCR を行い増幅後、Agarose gel から切り出しを行い精製した。

④Vh-Vk の overlap PCR

Vh, Vk の 2nd PCR 産物を linker primer を用いて Vh-linker-Vk となるように overlap PCR を行った。

⑤抗体ファージライブラリの作製

Overlap PCR 産物及びファージミドベクターを SfiI, NotI により制限酵素処理を行い、DNA ligase を用いて ligation 後、エレクトロポレーション法を用いてコンピテント細胞 (TG-1) へと形質転換を行った。形質転換後の大腸菌を回収してヘルパーファージを感染させ、抗体ファージライブラリの作製を行った。

4. 研究成果

(1) 大腸癌組織を用いた癌幹細胞の免疫組織染色

大腸癌組織を幹細胞マーカーとして知られている ALDH1, CD133 に対する抗体を用いて免疫組織染色をおこなった。図2に結果を示している。大腸癌患者の組織で ALDH1, CD133 の染色が確認された。

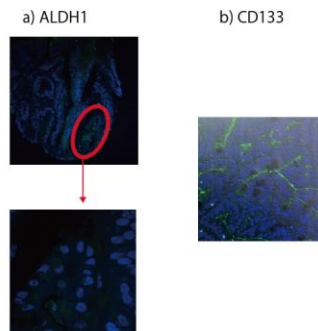


図2. 大腸癌患者組織の癌幹細胞マーカー抗体による免疫染色
a) ALDH1 (上段: ×200, 下段: ×630), b) CD133 (上段: ×200, 下段: ×630)

(2) 癌幹細胞特異的な抗体ファージの単離

(1)で癌幹細胞が染色されることが示されたので組織切片とマウス scFv 抗体ファージライブラリを反応させ、レーザーマイクロダイセクションを用いて蛍光染色された癌幹細胞を回収した。回収後、酸で抗体ファージの溶出を行い、大腸菌に感染させ増幅を行い特異的抗体ファージの濃縮を行った。この操作を繰り返したのち、クローン化を行い、癌幹細胞と反応するかを検討したが、癌幹細胞に特異的に反応する抗体を得ることができなかった理由としてマウスのナイブ抗体ファージを用いたことが1つ考えられたので、癌幹細胞を有している癌患者由来の抗体ファージライブラリを用いれば癌幹細胞に反応す

る自己抗体が含まれていると考えられるので癌患者由来の抗体ファージライブラリを構築すると特異的に反応する抗体を容易に単離できるのではないかと考えた。よって癌患者由来の抗体ファージライブラリの構築に着手した(図3)。ここで胃癌患者の血液を恵与いただけることになったので胃癌に標的を変更して胃癌幹細胞に特異的な癌抗原、癌抗原に特異的な抗体の単離を行っていくこと最終目標と以下の研究をおこなった。

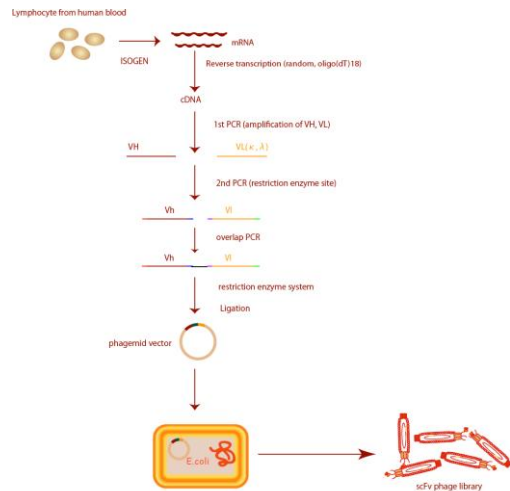


図3. 胃癌患者由来の抗体ファージライブラリの構築の流れ図

(3) 癌患者由来の抗体ファージの構築

①胃癌患者由来の cDNA の合成

Total RNA の調製千葉大学、岩手医科歯科大学の倫理委員会により承認を受け、同意を頂いた胃癌患者の血液から末梢血リンパ球を調製後、total RNA の精製を行った。抽出した total RNA を用いて cDNA の合成を行い、cDNA の合成を GAPDH の増幅により確認を行った。(図4)すべての患者さんの cDNA の合成に成功した。

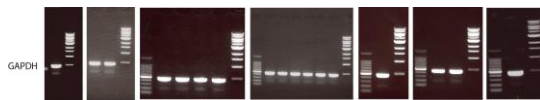


図4. 胃がん患者の total RNA から合成された cDNA の確認

②1st PCR の精製 (Vh, Vk)

Total RNA から合成した cDNA 産物を mixture させ、それを鋳型として 1st PCR 用の primer を用いて PCR を行い増幅後、Agarose gel から切り出して精製をおこなった。

③2nd PCR の精製 (Vh, Vk)

制限酵素サイトを付加させるために 1st PCR 産物を鋳型として 2nd PCR 用の primer を用いて PCR を行い増幅後、Agarose gel から切り出し精製した。

④Vh-Vk の overlap PCR

③で精製した Vh, Vk の 2nd PCR 産物を鋳型と

して linker primer を用いて overlap PCR を行った。その結果を図5に示す。このように Vh-linker-Vk(scFv)の精製ができたのでこれをファージミドベクターへと組み込みファージライブラリの調製を行う。

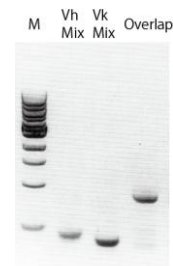


図5. Overlap PCR 産物

⑤抗体ファージライブラリの調製

④で精製した overlap PCR 産物とファージミドベクターを制限酵素処理、精製後、ligase により ligation を行ってエレクトロポレーション法により TG-1 へと形質転換を行った。その後、大腸菌を回収してヘルパーファージを感染することにより抗体ファージライブラリの調製を行った。

(4) 今後の展望

胃癌患者由来の抗体ファージの構築が終わったので、現在は、ライブラリーの評価を行うと同時に目的の癌幹細胞に特異的な癌抗原、抗体の単離を胃癌患者の組織を用いて行っている。

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0件)

[学会発表] (計3件)

1. 村岡 賢、久米 秀明、渡邊 史生、川崎 直子、足立 淳、鳴海 良平、石飛 真人、稲治 英生、宮本 泰豪、加藤 菊也、小寺 義男、朝長 毅：乳癌膜タンパク質の大規模プロテオーム解析とSRM/MRMを用いたバイオマーカー候補タンパク質の検証および予後予測診断への応用。第34回日本分子生物学会、横浜、2011年12月13-16日

2. Satoshi Muraoka, Hideaki Kume, Jun Adachi, Yasuhide Miyamoto, Kikuya Kato, Yoshio Kodera, Takeshi Tomonaga: A strategy for Shotgun Proteomics and SRM-based systematic validation of membrane proteins in breast cancer tissues. 第70回日本癌学会、名古屋、2011年10月3-5日

研究者番号：

3. 村岡 賢、久米 秀明、渡邊 史生、川崎 直子、足立 淳、鳴海 良平、石飛 真人、稲治 英生、宮本 泰豪、加藤 菊也、小寺 義男、朝長 毅：乳癌膜タンパク質の大規模プロテオーム解析とSRM解析による検証．日本プロテオーム学会 2011 年大会 日本人プロテオーム機構第 9 回大会、新潟、2011 年 7 月 28-30 日

〔図書〕（計 0 件）

〔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

<http://www.nibio.go.jp/proteome/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村岡 賢 (MURAOKA SATOSHI)
独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロテオームリサーチプロジェクト・研究員
研究者番号：50582681

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()