

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：22701
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2012～2012
 課題番号：24650636
 研究課題名（和文）人工癌幹細胞モデルを用いた癌幹細胞特異的モノクローナル抗体の作製と応用
 研究課題名（英文）Generation of monoclonal antibodies targeting induced cancer stem cells.
 研究代表者
 梁 明秀 (RYO AKIHIDE)
 横浜市立大学・医学研究科・教授
 研究者番号：20363814

研究成果の概要（和文）：癌幹細胞を標的とするモノクローナル抗体を作製するため、ラットの腹腔に人工癌幹細胞（iCSC）を3回投与後、ハイブリドーマを作製した。iCSCおよびヒト乳がん細胞株を用いてスクリーニングを実施したところ、iCSCのみを特異的に認識する2種類のモノクローナル抗体を選別した。プロテインアレイを用いて抗原タンパク質の同定を試みたところ、ABL1が同定された。iCSCにABL阻害薬であるイマチニブを投与したところ、自己増殖能の阻害が認められた。

研究成果の概要（英文）：To obtain monoclonal antibodies specifically targeting cancer stem cells, we immunized rat with induced cancer stem cells (iCSC) followed by the production of hybridomas. By using iCSC and breast cancer cell lines, we selected two monoclonal colonies that only recognize iCSC but not breast cancer cell line. Protein array analysis revealed that ABL1 could be a target of the monoclonal antibodies. When iCSCs were treated with an ABL inhibitor, imatinib, self-renewal property of iCSCs was inhibited.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,300,000	390,000	1,690,000

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：細胞、再生医学、癌、トランスレーショナルリサーチ、抗体

1. 研究開始当初の背景

近年、癌組織は自己複製能を持ち半永久的に子孫細胞を作り続けることのできる「癌幹細胞」と呼ばれる細胞と、最終的には老化・分化・死によって増殖能を失う運命にあるいわゆる癌細胞の二群から構成されていることが分かってきた。癌幹細胞は放射線や化学療法に対して抵抗性を示すことから、その性状解析は新たな治療を考案する上で極めて重要である。また、癌の再発は癌幹細胞の再活性化、転移は癌幹細胞の多臓器への移動と定着であり、癌幹細胞を根絶することが癌の根治につながると考えられている。

癌および癌幹細胞の根絶には癌幹細胞の性質をよく理解することが重要である。そのためには *in vitro* の癌幹細胞モデルを構築し、それをを用いた癌幹細胞の性状解析や創薬開発が必須となる。最近、幹細胞生物学の技術を応用した人工癌幹細胞の樹立が盛んにおこなわれている。しかしながら、それらの細胞モデルはマウス由来の細胞が主であったり、*in vivo* 継代を繰り返すことによる遺伝子変異の蓄積が懸念されている。また、癌幹細胞の悪性化形質の有無を確認されていないものが多いのが現状であり、新たなヒト癌幹細胞モデルの樹立が望まれている。

ヒトの腫瘍組織から癌幹細胞を分離することは技術的な問題がネックとなる。腫瘍組織からの癌幹細胞の同定・分離には、細胞表面マーカーを用いた手法が主に使用されている。しかし細胞表面マーカーによる癌幹細胞の分離法はすべての癌幹細胞を分離しておらず、又、分離した細胞の維持や増幅が極めて困難であることが問題とされる。更にこれらの表面マーカーは癌幹細胞の機能とは結びついておらず、治療の標的とはなりえない。最近我々は遺伝子変異の少ない正常ヒト上皮細胞から直接リプログラミング操作を経て癌幹細胞を誘導する新規の方法を開発した。これらの細胞は種々の癌幹細胞マーカーを発現し、免疫不全マウスに移植すると、未分化な癌幹細胞を中心として神経、筋肉、骨などの間葉系成分を含む上皮系の腫瘍を構築する。我々の手法を用いることで遺伝子変異のきわめて少ない純粋な癌幹細胞を無制限に作製することが可能であり、癌幹細胞のバイオマーカー探索、癌の早期および再発診断法の確立、さらには抗体医薬の開発に大いに役立つと考えられる。

2. 研究の目的

人工癌幹細胞を抗原とした癌幹細胞特異的なモノクローナル抗体を作製する。これらの抗体を活用し、新規の癌幹細胞バイオマーカーの探索、さらには癌幹細胞の早期診断法や治療法の開発を目指す。また、本抗体を活用して癌幹細胞のバイオマーカーを探索し、癌の再発マーカーや転移マーカーとして役立つ。

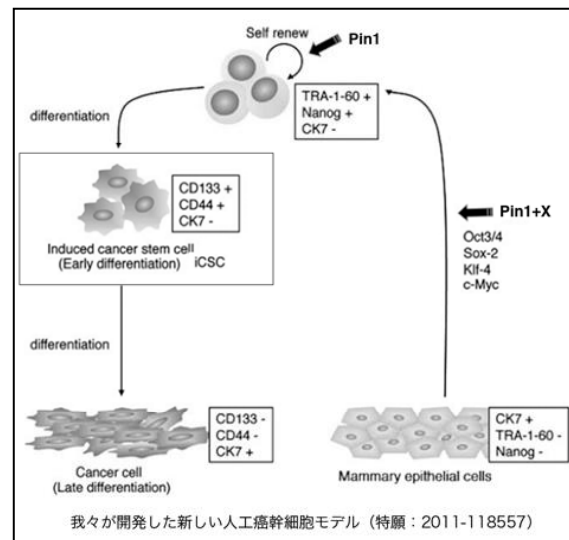
3. 研究の方法

(1) 人工癌幹細胞の作製

ヒト乳腺上皮由来不死化細胞にリプログラミング遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入し、リプログラミングを実施した。未分化性の獲得は、TRA1-60 および Nanog タンパク質の免疫染色および胎児型アルカリフォスファターゼ染色の発現陽性細胞を蛍光検出機で確認した。また、複数の多能性幹細胞マーカーの発現をリアルタイム RT-PCR およびウエスタンブロット法を用いて検出した。また当該細胞群をさらに胚様体を介して限定的に分化誘導を行った結果、癌幹細胞マーカーである CD44 および ALDH1 を発現し、免疫不全マウス内で複数人工癌幹細胞が樹立した。本細胞を DMEM 培地/10%牛胎児血清で馴化を行った後、癌幹細胞および悪性化形質の確認を行った（本ページ右上図）。

(2) 人工癌幹細胞を抗原としたモノクローナル抗体の作製

癌幹細胞 (iCSC) 特異的 mAb を作製するため、WKAH/Hkm ラット (雌) の腹腔に iCSC を投与し、



3 回免疫 (1st: 1x10⁷ cells, 2nd: 1x10⁷ cells: 2 週後, 3rd: 2x10⁶ cells: 8 週後) をおこなった。初回免疫から 3 週後に採血し、ウエスタンブロット法により iCSC 特異的抗体が発現していることを確認した。最終免疫の 2 日後、免疫ラットの脾臓を摘出し、マウス骨髄腫細胞 (SP2/0) と 1:5 の割合で懸濁し、Polyethylene Glycol (PEG) を使用して融合させ、96 well プレートに播種。細胞接着後、抗体を産生し、増殖能を有する融合細胞 (hybridoma) のみを選択培養するために、ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む HAT 培地で 2 週間培養した後、細胞内に残留したアミノプテリンの影響を緩和するため、ヒポキサンチンとチミジンを含む HT 培地で 1 週間培養した。

(3) 抗体のスクリーニング

作製したハイブリドーマをクローニングし、癌幹細胞特異的に認識するモノクローナル抗体をスクリーニングした。免疫した抗原に対する抗体は hybridoma 上清中に分泌されるため、この上清を一次抗体とし、二次抗体に FITC 標識された抗ラット抗体を使用して、Flow cytometer によりスクリーニング実験をおこなった。まず、ヒト胎児腎細胞 (HEK293) と iCSC-1 を 1:10、10:1 の割合で混合し、細胞の割合と同様の傾向の蛍光強度ヒストグラムを示す上清を選択した。次に、iCSC (2 クローン)、ヒト乳がん細胞株 (MCF7, T-47D) を使用して蛍光強度を観察し、iCSC 特異的な反応を呈示するモノクローナル抗体クローンを選別した。

4. 研究成果

(1) 人工癌幹細胞を抗原としたモノクローナル抗体の作製

まず、癌幹細胞特異的抗体を得るため、WKAH/Hkm ラットの腹腔に iCSC を 3 回免疫し、

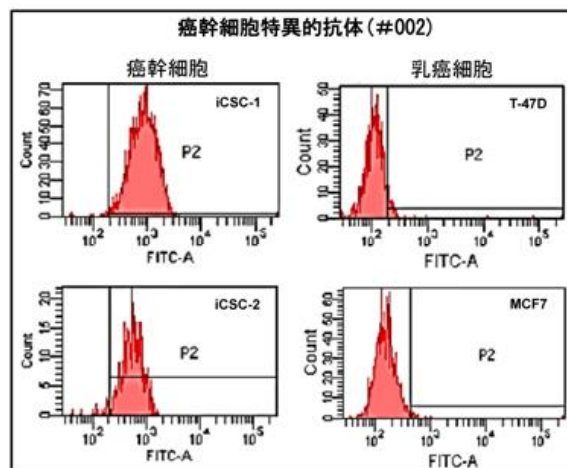
ハイブリドーマを作製した。限界希釈法でクローン化した約 100 クローンのハイブリドーマについて上清を一次抗体としてフローサイトメトリーを行った。対象として、元細胞である MCF-10A、2 つの乳癌細胞株 (MCF7 および MDA-MB231) および 293T を用いた。スクリーニングの結果、iCSC のみに特異的に反応するモノクローナル抗体 2 クローンを抽出することに成功した。また、これらの上清を一次抗体として iCSC の免疫染色を行った結果、本抗体は iCSC の細胞質および細胞膜で強く発現していた。

従来の方法は既に癌化 (悪性化) した細胞を用いてリプログラミング操作を行うことで、癌幹細胞様の細胞を樹立している。我々のモデルでは、元来腫瘍形成能を持たない正常組織由来のヒト不死化上皮細胞から癌幹細胞を作製出来る点が新規であり、世界で初めての技術である。癌細胞株には、少量であるが腫瘍形成能 (tumor initiating ability) を持った癌幹細胞が存在する。癌細胞に山中 4 因子を入れて癌細胞を作製する方法は、そのようなもともと存在していた癌幹細胞を増やしただけの可能性が拭いきれず、リプログラミングが確かに行われたのか判然としない。一方、当該研究で使用する癌幹細胞は腫瘍形成能を持たない不死化細胞から癌幹細胞を作製する技術を提供できる。また、癌細胞は染色体不安定性が増大しているため、多数の遺伝子変異や染色体異常の蓄積が存在している。そのため、個々の癌細胞の遺伝子に大きなバラツキがある。そのような細胞集団から癌幹細胞を取得した際、同じ形質を有する癌幹細胞を再現性を持って分離することは困難である。このことから、癌細胞株から作製した癌幹細胞を薬剤スクリーニングなどへ利用することは理論上困難であると考えられている。

(2) 癌幹細胞特異的モノクローナル抗体が標的とする抗原の同定

癌幹細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製した。具体的には、我々が独自に開発した人工癌幹細胞を直接ラットに 3 回免疫し、脾細胞とミエローマ細胞のハイブリドーマを作製する。核種スクリーニングにより、作製したハイブリドーマ培養上清から癌幹細胞特異的抗体を選別した。スクリーニング方法として、我々の癌幹細胞モデル細胞および既存の 2 種類の乳癌細胞株 (MCF7, T-47D) を用いて、フローサイトメトリーにて癌幹細胞のみを特異的に検出する抗体を選別した (本ページ右上図)。

次に選択された抗体の標的となる抗原の同定のため、2 次構造を有する全長タンパク質を搭載した Protein Active Array (セルフリーサイエンス社) を活用し、当該抗体の認識



するタンパク質のスクリーニングを行った。Protein Active Array はヒトの約 2 万種のタンパク質を未変性状態で搭載しており、本アレイを用いることで抗原不明抗体の標的タンパク質を効果的に決定することができる。解析の結果、上記 2 種類の抗体はともに癌遺伝子産物の一つである ABL1 チロシンキナーゼを標的としていることが明らかとなった。続いて ABL1 の市販抗体を使用して iCSC ライセートのウェスタンブロットを行ったところ、ABL1 は iCSC において高発現していることが確認された。また、ABL1 阻害剤であるイマチニブを iCSC に投与したところ、iCSC の増殖および自己複製能 (スフェア形成) の抑制が認められた。

(3) 生体内における癌幹細胞動態の観察

癌幹細胞を生体で非侵襲的に検出・観察する方法として、癌幹細胞特異的な抗原抗体反応を利用した分子イメージングが考えられる。本研究では、第一段階として免疫不全マウス皮下にホタルルシフェラーゼを恒常的に発現させた人工癌幹細胞を接種し、発光の観察により、生体内での癌幹細胞の増殖を非侵襲的に観察することを試みた。iCSC にホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入し、当該遺伝子を恒常的に発現する細胞のクローニングを実施した。抽出した 25 クローン中、3 クローンが iCSC において強い発現が認められた。これらを NOG マウスの大腿部近くの背面皮下に注射した。腫瘍の成長を IVIS Spectrum を使ってモニタリングしたところ、iCSC 特異的な発光 (Luciferase) が観察された。今後は本モデルを活用し、iCSC 特異的モノクローナル抗体を用いた生体イメージングを実施する予定である。

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1件)

1. Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. Induction of cells with cancer stem-cell properties from non-tumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene*. 2013 Jan 14. 査読有 DOI:10.1038/onc.2012.614.

〔学会発表〕(計3件)

1. 西 真由子、梁 明秀 : Induction of cells with cancer stem-cell properties from human mammary epithelial cells. 第71回 日本癌学会学術総会. 2012年9月19-21日、ロイトン札幌(北海道).
2. 坂井 祐介、西 真由子、梁 明秀 : Identification of differentially expressed genes in induced cancer stem cells. 第71回 日本癌学会学術総会. 2012年9月19-21日、ロイトン札幌(北海道).
3. 渡邊 夕紀子、西 真由子、梁 明秀 : Production of monoclonal antibody targeting cancer stem cells. 第71回 日本癌学会学術総会. 2012年9月19-21日、ロイトン札幌(北海道).

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：人工癌幹細胞の作製方法及びその分化誘導方法

発明者：梁明秀、西真由子

権利者：公立大学法人 横浜市立大学

種類：特許

番号：PCT/JP2012/063302

出願年月日：2012年5月27日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梁 明秀 (RYO AKIHIDE)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：20363814

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：