

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640075

研究課題名(和文) 抗がん幹細胞完全ヒトモノクローナル抗体単離法の開発

研究課題名(英文) Development of methods for isolation of human monoclonal antibodies recognizing cancer stem cells

研究代表者

磯部 正治 (Isobe, Masaharu)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授

研究者番号：70211050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは独自に開発した抗体産生単一細胞由来抗体発現迅速単離システムを用いて大腸がん患者由来の抗体産生細胞からヒトモノクローナル抗体クローンを大規模に単離した。得られた抗体クローンの中から大腸がん細胞株に対する結合能を示す抗体を選別した。さらにそれらの抗体クローンの中からCD44vなどのがん幹細胞マーカー陽性細胞に対する結合能を示す抗体クローンを複数同定した。これらの抗体クローンが認識する抗原候補タンパク質を同定するため免疫沈降法と質量分析法を用いた解析を行った。さらにプロテインアレイを用いた抗原候補タンパク質の同定も行った。

研究成果の概要(英文)：We have conducted a large-scale isolation of human monoclonal antibodies from patients with colon cancer by using our high-throughput isolation system for monoclonal antibodies from single cells. We have selected antibody clones that were capable of binding with colon cancer cell lines. Those clones were further selected based on the reactivity against colon cancer stem cells identified by cancer stem cell positive markers including CD44v. We have identified candidate antigens for those clones by using immunoprecipitation combined with mass spectrum analysis as well as reactivity against protein arrays.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：大腸がん がん幹細胞 ヒトモノクローナル抗体

### 1. 研究開始当初の背景

近年、がん治療の重要な標的として、がん幹細胞に注目が集まっている。腫瘍組織にごく少数存在し自己複製能力を持つがん幹細胞は、わずか数個で元の腫瘍組織と同様の腫瘍を形成する。しかし、がん幹細胞は、癌組織中にわずかしか存在しないことから、がん幹細胞に対する有効なマーカーや治療薬の開発が阻まれてきた。

がん患者の血清中には自己の成分に対する抗体がしばしば出現し、その中にはがん細胞由来の成分を認識する抗体や、がんの早期診断マーカーとして有用な抗原を認識する抗体が含まれている。しかし生体内で検出されるこれら多数の抗体を単一抗体として取り出し効率的に生産する手法がなかったため、個々の抗体の生物学的意義に関する解析はこれまで非常に遅れている。

最近われわれは、ヒトの抗体産生単一細胞から抗体遺伝子を迅速に単離し、効率的に発現ユニットに組み込み、培養細胞で発現させることで、ヒトモノクローナル抗体をわずか5日間で単離する、世界最速のヒトモノクローナル抗体高効率単離システムを開発した。このシステムを用いて、ヒトモノクローナル抗体を単離し、がん細胞に対する結合能を調べたところ、高い頻度でがん細胞を認識する完全ヒトモノクローナル抗体が単離されることを見いだした。そこでがん患者由来の抗体産生細胞から、より大規模にヒトモノクローナル抗体を単離できれば、その中に、がん細胞のみならず、がん幹細胞に対する抗体も含まれているのではないかと考え本研究に至った。

### 2. 研究の目的

本研究は、われわれが独自に開発した抗体産生単一細胞からの完全ヒトモノクローナル抗体迅速単離システムを用いて、がん患者由来の抗体産生細胞から、抗体遺伝子を大規模に単離・発現させ、ヒトモノクローナル抗体を大規模に単離し、得られた抗体を用いて、がん細胞株に対するスクリーニングを行い、がん細胞との高い結合能を示すヒトモノクローナル抗体を多数選別し、その中からがん幹細胞との結合能を示すヒトモノクローナル抗体を単離するための手法開発を目的に行った。

### 3. 研究の方法

われわれが独自に開発した、抗体産生単一細胞由来抗体発現迅速単離システムを用いて、大腸結腸がん患者に由来する抗体産生細胞からヒトモノクローナル抗体を大規模に単離した。大腸がん細胞株 10 種類と正常繊維芽細胞株に対して得られた抗体をそれぞれ反応させ、がん細胞株との反応性を示す抗体を選別した。大腸がん細胞株の中からセルソーターを用いて単離した CD44v、CD133、ALDH などのがん幹細胞マーカーで強陽性を

示すがん幹細胞様細胞に対して、がん細胞株に対する反応性を示した抗体をそれぞれ反応させ結合性を評価した。がん幹細胞様細胞に対する結合性を示した抗体が認識する抗原を明らかにするため、がん細胞株由来の細胞抽出液とその細胞株に対する結合性を示す抗体を用いて免疫沈降法と質量分析法を適用し抗原候補タンパク質の同定を行った。加えて、プロテインアレイに対する反応性も利用して抗原候補タンパク質の同定を行った。

### 4. 研究成果

3 症例の大腸がん患者と 1 症例の S 字結腸がん患者由来の抗体産生細胞から、合計 713 種類のヒトモノクローナル抗体を単離した。それらの抗体のうち 629 クローンを用いて 10 種類の大腸がん細胞株と 1 種類の繊維芽細胞株に対してそれぞれ免疫染色を行い、がん細胞株に対する反応性を示す抗体クローンを選択した。その結果、いずれかのがん細胞株に対する染色性を示す抗体が 182 クローン見いだされた。この結果から、がん患者由来の抗体産生細胞では平均約 30% という極めて高い頻度でがん細胞を認識する抗体が産生されていることが明らかとなった。がん細胞株に対する染色性を示したこれら抗体 182 クローンの中から繊維芽細胞に対する染色性をほとんど示さないクローンが 32 クローン同定された。これら抗体の内 28 クローンを用いて CD44v 強陽性を示す「がん幹細胞様細胞」に対する反応性を調べたところ、ほとんどのクローンにおいて、がん細胞株のみならず、その細胞集団中のわずかに含まれる CD44v 強陽性の「がん幹細胞様細胞」に対しても同等の染色性が認められた。そこでこれらの抗体が認識している抗原を明らかにする目的で、抗体に反応性を示したがん細胞株に由来する細胞抽出液とそれぞれの抗体を用いて免疫沈降法と質量分析法を適用し抗原の同定を試みたところ、いくつかの候補タンパク質が同定された。さらに約 9000 種類の組換えタンパク質が載ったプロテインアレイに対してこれらの抗体クローンを反応させたところ、抗体との結合性を示す候補タンパク質が合計数 10 種類同定された。そこで現在、これらの候補タンパク質が真の抗原であるか否かの検証実験を進めている。がん患者では、がんの進行に伴い血清中に自己抗体の増加することが知られている。しかしこれらの自己抗体のがん細胞に対する生物学的意義については未だ十分には明らかにされていない。今回の研究によって、がん細胞を認識する抗体産生細胞ががん患者の体内で高頻度に出現することが明らかとなった。また、それらの中にはがん細胞のみならずがん幹細胞に対しても反応性を示す抗体が存在する可能性が強く示唆された。これらの抗体はがん細胞とがん幹細胞の両者を同時に攻撃するための道具として生体が産生して

いる可能性もあることから、がんの診断やがんの根治療法開発への応用が期待される。

#### 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 4 件)

Kano Y, Ishii H, Konno M, Yamasaki M, Miyata H, Nishikawa S, Hamabe A, Ogawa H, Takahashi H, Ohta K, Hasegawa S, Tanaka K, Fukusumi T, Otsuka M, Kawamoto K, Haraguchi N, Fujimoto R, Isobe M, Tomita Y, Matsuura N, Takiguchi S, Mori M, Doki Y. Cells of origin of squamous epithelium, dysplasia and cancer in the head and neck region after bone marrow transplantation. International journal of oncology. 2014;44(2):443-450. Epub 2013/12/10.

2. Yasumitsu H, Tajima H, Isobe M, Kutsuna S, Kawsar SM, Fujii Y, Kanaly RA, Ozeki Y, Yokota E. Fine bubble mixing (FBM) culture of E. coli: a highly cost-effective middle scale-size culture system. Protein and peptide letters. 2013;20(2):213-217. Epub 2012/08/17.

3. Kurosawa N, Fujimoto R, Ozawa T, Itoyama T, Sadamori N, Isobe M. Reduced Level of the BCL11B Protein Is Associated with Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. PLoS one. 2013;8(1):e55147. Epub 2013/02/06.

4. Akbor MM, Tomobe K, Yamada T, Kim J, Mano H, Kurosawa N, Sasaki K, Nomura Y, Isobe M. Possible involvement of Hcn1 ion channel in learning and memory dysfunction in SAMP8 mice. Biochemical and biophysical research communications. 2013;441(1):25-30. Epub 2013/10/16.

[学会発表](計 2 件)

磯部 正治 , 黒澤 信幸 : 種々の免疫動物に由来するプラズマ細胞からの 1 細胞抗体遺伝子スクリーニング : 第 66 回日本生物工学会大会(2014)札幌

Masaharu Isobe: A robust and rapid system for high-throughput generation of recombinant monoclonal antibodies from a variety of species. : Toyama Barsel mini symposium (2013) Basel, Switzerland

[産業財産権]

取得状況 (計 10 件)

名称 : 反応治具及び反応方法、並びに cDNA の合成方法

発明者 : 磯部正治、黒澤信幸  
権利者 : 富山大学  
種類 : 日本国特許  
番号 : 5244130  
出願年月日 : 2009 年 1 月 16 日  
取得年月日 : 2013 年 4 月 12 日  
国内外の別 : 国内

名称 : REACTION DEVICE, REACTION METHOD AND METHOD OF SYNTHESIZING cDNA  
発明者 : 磯部正治、黒澤信幸  
権利者 : 富山大学  
種類 : ドイツ連邦共和国特許  
番号 : 602009017012.0  
出願年月日 : 2009 年 1 月 16 日  
取得年月日 : 2013 年 7 月 10 日  
国内外の別 : 国外

名称 : REACTION DEVICE, REACTION METHOD AND METHOD OF SYNTHESIZING cDNA  
発明者 : 磯部正治、黒澤信幸  
権利者 : 富山大学  
種類 : オーストラリア連邦特許  
番号 : 2009205104  
出願年月日 : 2009 年 1 月 16 日  
取得年月日 : 2014 年 3 月 6 日  
国内外の別 : 国外

名称 : 反応治具及び反応方法、並びに cDNA の合成方法  
発明者 : 磯部正治、黒澤信幸  
権利者 : 富山大学  
種類 : 中華人民共和国特許  
番号 : ZL200980102879.8  
出願年月日 : 2009 年 1 月 16 日  
取得年月日 : 2014 年 8 月 13 日  
国内外の別 : 国外

名称 : REACTION DEVICE, REACTION METHOD AND METHOD OF SYNTHESIZING cDNA  
発明者 : 磯部正治、黒澤信幸  
権利者 : 富山大学  
種類 : アメリカ合衆国特許  
番号 : 8993241  
出願年月日 : 2009 年 1 月 16 日  
取得年月日 : 2015 年 3 月 31 日  
国内外の別 : 国外

名称 : 相同組換え方法及びクローニング方法並びにキット  
発明者 : 磯部正治、黒澤信幸  
権利者 : 富山大学  
種類 : 中華人民共和国特許  
番号 : ZL200980108826.7  
出願年月日 : 2009 年 3 月 6 日  
取得年月日 : 2013 年 11 月 20 日  
国内外の別 : 国外

名称 : HOMOLOGOUS RECOMBINATION METHOD, CLONING METHOD, AND KIT

発明者：磯部正治、黒澤信幸  
権利者：富山大学  
種類： オーストラリア連邦特許  
番号： 2009220532  
出願年月日：2009年3月6日  
取得年月日：2014年2月13日  
国内外の別：国外

名称：HOMOLOGOUS RECOMBINATION METHOD,  
CLONING METHOD, AND KIT  
発明者：磯部正治、黒澤信幸  
権利者：富山大学  
種類： アメリカ合衆国特許  
番号： 8841094  
出願年月日：2009年3月6日  
取得年月日：2014年9月23日  
国内外の別：国外

名称：相同組換え方法及びクローニング方法  
並びにキット  
発明者：磯部正治、黒澤信幸  
権利者：富山大学  
種類： 日本国特許  
番号： 5628664  
出願年月日：2009年3月6日  
取得年月日：2014年10月10日  
国内外の別：国内

名称：METHOD FOR SPECIFICALLY PRODUCING A  
JOINED DNA FRAGMENT COMPRISING A SEQUENCE  
DERIVED FROM A TARGET GENE  
発明者：黒澤信幸、磯部正治  
権利者：富山大学  
種類： オーストラリア連邦特許  
番号： 2010290426  
出願年月日：2010年9月2日  
取得年月日：2015年3月26日  
国内外の別：国外

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

磯部 正治 (Isobe, Masaharu)  
富山大学・大学院理工学研究部(工学)・  
教授  
研究者番号：70211050