

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 3 月 7 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670508

研究課題名(和文) プロテオミクス手法による悪性黒色腫の新規癌抗原の同定と遠隔転移の抗体治療法の開発

研究課題名(英文) Proteomic screening for malignant melanoma antigen and development of antibody-based medicine for metastasis.

研究代表者

仲 哲治 (NAKA, TETSUJI)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・免疫シグナルプロジェクト・シニアプロジェクトリーダー

研究者番号：30303936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： 定量的プロテオーム解析により、正常ヒト色素細胞と比較して悪性黒色腫細胞株にて高発現する膜タンパク質を探索し、癌抗原候補分子としてLSRを同定した。悪性黒色腫細胞株に本癌抗原候補分子が高発現することをFACS解析により明らかにした。また、悪性黒色腫組織中に本癌抗原が高発現することも免疫組織化学染色法により明らかにした。本癌抗原に対するニワトリ・マウスキメラモノクローナル抗体を6種類取得することに成功した。一部のクローンは癌抗原陽性細胞に対してin vitroで細胞増殖抑制効果を示したため、抗腫瘍効果の詳細な機序について、in vitroおよびin vivoで検証を進めている。

研究成果の概要(英文)： By quantitative proteomic approach, cell surface membrane proteins were screened by comparing normal human melanocytes and malignant melanoma cell lines. Elevated expression levels of the melanoma candidate antigen, Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR), was confirmed by FACS analysis against cell lines compared to normal melanocytes. By immunohistochemical staining analysis, increased expression levels of the melanoma candidate antigen was also confirmed using malignant melanoma tissue sections. We developed 6 clones of novel chicken/mouse chimeric monoclonal antibody targeting this antigen. Several clones showed direct tumor growth inhibition in vitro. The detailed mechanisms of anti-tumor effects were investigated in vitro and in vivo.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：癌 プロテオーム タンパク質 抗体

### 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫はメラノサイトを起源とする悪性腫瘍と考えられている。悪性黒色腫は診断される癌全体のわずか 4%であるが、非常に転移しやすい性質を持つことと、化学療法も効果が低いため、皮膚癌の死亡の 80%を占めており、非常に予後不良な腫瘍である。従って、悪性黒色腫に対する治療標的分子を同定することは、悪性黒色腫の新規治療法の開発につながる可能性が極めて高い。

近年、Her2 など癌に高発現する受容体に対する抗体医薬品が癌に対する特異性の高さから従来の抗癌剤よりも副作用が少なく、癌治療薬として有用性が明らかにされている。そのため、悪性黒色腫に特異的に高発現する癌抗原を同定することは、癌の進展機序の解明や、治療薬の開発につながる可能性がある。研究代表者はこれまでに定量的プロテオミクス手法 iTRAQ(isobaric tag for relative and absolute quantitation)法を用いて、正常子宮内膜と比較して子宮内膜癌の細胞表面膜タンパク質を網羅的に定量解析し、子宮内膜癌の新規癌抗原として Bone marrow stromal cell antigen 2(BST2)を同定した。そして、抗 BST2 抗体が担癌マウスに対して子宮内膜癌の抗体医薬品の標的として優れた有用性を示すことに成功し、癌抗原探索基盤技術の開発に成功している(Yokoyama T, Naka T et al 2013 Int J Cancer)。

### 2. 研究の目的

本研究では悪性黒色腫の新規癌抗原の同定とそれを標的とした抗体医薬開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) iTRAQ 法による悪性黒色腫細胞表面膜タンパク質の定量解析

iTRAQ(isobaric tags for relative and absolute quantitation)法を用いた定量的プロテオミクス手法を細胞表面膜タンパク質に応用する。細胞株として市販されている正常メラノサイトをコントロールとして、悪性黒色腫細胞株(A2058、G361、Mewo、SK-MEL5、SK-MEL28、VMRC-MELG、WM266-4)に特異的に高発現する細胞表面膜タンパク質を網羅的にスクリーニングした。正常メラノサイトはタカラバイオ株式会社より、A2058、G361、Mewo、VMRC-MELG は JCRB より、WM266-4 は DS ファーマより入手した。細胞を 15cm plate で培養し、ビオチン標識試薬である sulfo-NHS-SS-biotin にて細胞表面膜タンパク質を選択的に標識した。標識した細胞よりタンパク質を抽出、定量した。抽出したタンパク質 1 mg に対してビオチン標識タンパク質の精製過程での誤差を補正する目的で、内部標準として sulfo-NHS-SS-biotin にて標識した BSA タンパク質を各検体に 2.5 µg ずつ加えた。Neutravidin-agarose にてビオチン標識タンパク質を精製し、DTT で還元するこ

とでビーズに結合したビオチン標識タンパク質を溶出した。タンパク質をトリプシンにて消化することで、得られたペプチドを iTRAQ 試薬にて標識した。その後、8 つの検体を 1 つに混合し、イオン交換 HPLC にて分画後、nano LC-MS/MS(LTQ-Orbitrap-XL)にてペプチドを解析しデータ解析ソフトウェア(proteome discoverer ver1.3)にてタンパク質の網羅的な同定と定量を行った。サンプル間の誤差は内部標準を指標として補正し正確な定量解析を行った。

### (2) FACS による癌抗原発現解析

細胞は PBS (Nacalai Tesque) で 2 回洗浄し、0.02% EDTA solution (Nacalai Tesque) で dish より剥離した。細胞を FACS staining buffer (PBS supplemented with 1% FBS and 0.1% sodium azide) で洗浄し、癌抗原に対する特異的抗体で染色し、続いて 100 倍希釈した Goat Anti-Mouse IgG (H+L chain specific) (southernbiotech 社) で染色した。染色した細胞は FACS Canto II cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) で測定し、FlowJo software (Tree Star, Stanford, CA, USA) を用いてデータ解析した。

### (3) 免疫組織化学染色法による悪性黒色腫における癌抗原発現解析

ホルマリン固定、パラフィン包埋された悪性黒色腫組織アレイの薄切は脱パラフィン処理、アルコールによる脱水を行った。癌抗原に対する免疫組織化学染色は ABC 法により行った。

(4) 癌候補タンパク質に対するニワトリ・マウスキメラモノクローナル抗体の作成  
ニワトリに Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) 発現 T リンパ球様細胞を免疫し、ニワトリモノクローナル抗体を樹立した。得られた抗体の Fab 領域をマウス IgG2a の Fc 領域をコードする発現ベクターに組み込み、ニワトリ・マウスキメラモノクローナル抗体発現ベクターを作成した。本抗体を 293 細胞に産生させ、培養上清より protein G sepharose を用いて精製した。精製抗体が LSR と反応する事を確認した。

### 4. 研究成果

正常メラノサイトと悪性黒色腫細胞株を用いた iTRAQ 解析により細胞表面膜タンパク質の 490 個のタンパク質を定量的に同定した。これらの内、正常メラノサイトと比較して悪性黒色腫細胞に高発現する癌抗原候補分子として LSR を同定した。

FACS 解析により LSR が悪性黒色腫細胞株 SK-MEL28 に高発現し、Mewo、G361、SK-MEL5 では発現が弱いことを確認した。

また、免疫組織化学染色法による解析においても、LSR が悪性黒色腫組織において、高発現することを確認した。正常組織アレイを

用いて、市販のポリクローナル抗体により本癌抗原の正常組織における発現分布を解析した結果、本癌抗原は肝臓および精巣にやや陽性反応を示すが、その他の臓器では発現が低く、癌治療標的に適した分子と考えられた。

LSRを安定発現させたLSR発現Tリンパ球様細胞をニワトリに免疫する事で本癌抗原に対する特異的なモノクローナル抗体を取得した。抗体遺伝子を単離し、Fc領域をマウスIgG2aに改変したニワトリ・マウスキメラモノクローナル抗体を6クローン開発することに成功した。癌抗原陽性細胞株に対して、本モノクローナル抗体のクローンの一部は直接的な細胞増殖抑制効果を発揮した。本モノクローナル抗体による *in vitro*、*in vivo* での詳細な抗腫瘍効果について検証を進める。

#### 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 11 件)

(1) Hiramatsu K, Serada S, Kobiyama K, Nakagawa S, Morimoto A, Matsuzaki S, Ueda Y, Fujimoto M, Yoshino K, Ishii K, Enomoto T, Kimura T, Naka T.

CpG ODN potentiates the anti-tumor activity of anti-BST2 antibody.

Cancer Sci. 2015 Oct;106(10):1474-8.

doi: 10.1111/cas.12738.

査読有

(2) Tagami N, Serada S, Fujimoto M, Tanemura A, Nakatsuka R, Ohkawara T, Murota H, Kishimoto T, Katayama I, Naka T.  
Suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) induces significant preclinical anti-tumor effect in malignant melanoma cells

Exp Dermatol. 2015 Nov;24(11):864-71.

doi: 10.1111/exd.12802.

査読有

(3) Natatsuka R, Takahashi T, Serada S, Fujimoto M, Ookawara T, Nishida T, Hara H, Nishigaki T, Harada E, Murakami T, Miyazaki, Makino T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Kishimoto T, Mori M, Doki Y, Naka T.

Gene therapy with SOCS1 for gastric cancer induces G2/M arrest and has an anti-tumor effect on peritoneal carcinomatosis

Br J Cancer. 2015 Jul 28;113(3):433-42.

doi: 10.1038/bjc.2015.229.

査読有

(4) Takemoto N, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Ohkawara T, Takahashi T, Nomura S, Inohara H, Naka T.

Leucine-rich  $\alpha$ -2-glycoprotein promotes TGF $\beta$ 1-mediated growth suppression in the Lewis lung carcinoma cell lines

Oncotarget. 2015 May 10;6(13):11009-22.

査読有

(5) Kotobuki Y, Yang L, Serada S, Tanemura A, Yang F, Nomura S, Kudo A, Izuhara K, Murota H, Fujimoto M, Katayama I, Naka T.  
Periostin Accelerates Human Malignant Melanoma Progression by Modifying the Melanoma Microenvironment.

Pigment Cell Melanoma Res. 2014 Jul;27(4):630-9.

doi: 10.1111/pcmr.12245.

査読有

(6) Yang L, Fujimoto M, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Yamada K, Suzuki K, Nishikawa A, Hosono Y, Yoneda Y, Takehara K, Imura Y, Mimori T, Takeuchi T, Katayama I, Naka T.

Proteomic identification of heterogeneous nuclear RNP-K as a novel cold-associated autoantigen in patients with secondary Raynaud's phenomenon.

Rheumatology. 2015 Feb;54(2):349-58.

doi: 10.1093/rheumatology/keu325.

査読有

(7) Morimoto A, Serada S, Enomoto T, Kim A, Matsuzaki S, Yokoyama T, Takahashi T, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Fujimoto M, Kimura T, Naka T.

Annexin A4 induces platinum resistance in a chloride- and calcium-dependent manner.

Oncotarget. 2014 Sep 15;5(17):7776-87.

査読有

(8) Shimada K, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Nakatsuka R, Harada E, Iwahori K, Tachibana I, Takahashi T, Kumanogoh K, Kishimoto T, Naka T.

The molecular mechanism underlying anti-proliferative effect of SOCS-1 in non-small cell lung cancer cells.

Cancer Sci. 2013 Nov;104(11):1483-91.

doi: 10.1111/cas.12266.

査読有

(9) Takahashi T, Serada S, Ako M, Fujimoto M, Miyazaki M, Nakatsuka R, Ikezoe I, Yokoyama A, Taguchi T, Shimada K, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, Naka T, Nishida T.

New findings of kinase switching in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic analysis

Int J Cancer. 2013 Dec 1;133(11):2737-43.

doi: 10.1002/ijc.28282.

査読有

(10) Nishioka C, Ikezoe T, Furihata M, Yang J, Serada S, Naka T, Nobumoto A, Kataoka S, Tsuda M, Udaka K, Yokoyama A.

CD34(+)/CD38(-) acute myelogenous leukemia cells aberrantly express CD82 which regulates adhesion and survival of leukemia stem cells.

Int J Cancer. 2013 May 1;132(9):2006-19.

doi: 10.1002/ijc.27904.

査読有

(11) He P, Kuhara H, Tachibana I, Jin Y, Takeda Y, Tetsumoto S, Minami T, Kohno S, Hirata H, Takahashi R, Inoue K, Nagatomo I, Kida H, Kijima T, Naka T, Morii E, Kawase I, Kumanogoh A.

Calretinin mediates apoptosis in small cell lung cancer cells expressing tetraspanin CD9.

FEBS Open Bio. 2013 May 10;3:225-30.

doi: 10.1016/j.fob.2013.04.005.

査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

仲哲治 (NAKA TETSUJI)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 医薬基盤研究所 免疫シグナルプロジェクト シニアプロジェクトリーダー

研究者番号：30303936

### (2) 連携研究者

藤本穰 (FUJIMOTO MINORU)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 医薬基盤研究所 免疫シグナルプロジェクト 主任研究員

研究者番号：00379190

世良田聡 (SERADA SATOSHI)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 医薬基盤研究所 免疫シグナルプロジェクト 研究員

研究者番号：50463302