

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860290

研究課題名(和文) 抗MCM2細胞内抗体を用いた新規癌治療モデルの開発

研究課題名(英文) New Cancer Treatment Model Using Anti-MCM2 Intrabody

研究代表者

阿部 晋也 (Abe, Shinya)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：70596725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、MCM2高発現細胞においてフレンド白血病ウイルスタンパクであるgp70が存在すると、MCM2の核移行が阻害され、DNA損傷誘発アポトーシスを増強するという現象を見出した。本研究では、MCM2に対する細胞内抗体を用い、MCM2の核移行を阻害することによる、新たな癌治療モデルの作製を目指した。まず、ファージディスプレイ法を用いて抗MCM2抗体の分離を行い、MCM2に特異的な抗体の分離に成功した。さらに、この抗体が細胞内でMCM2と結合し抗癌剤によるアポトーシスを増強することを確認した。さらに研究を進展させることにより、この抗MCM2細胞内抗体による治療は新規腫瘍治療モデルになると考えている。

研究成果の概要(英文)：In a previous study, we showed that Friend leukemia virus (FLV) envelope protein gp70 bound MCM2, impaired its nuclear translocation, and enhanced DNA-damage-induced apoptosis in hematopoietic cells when the cells expressed high levels of MCM2. Here, we aimed to create a new cancer treatment model by interrupting the nuclear transition of MCM2 using the anti-MCM2 intrabody instead of gp70. We first conducted separation of anti-MCM2 antibody by phage display method, and were successful to separate specific antibody against MCM2. We, furthermore, confirmed that, in vitro and in vivo, this antibody connects with MCM2 in the cell and fortifies apoptosis caused by the anti-cancer drug. It is thought that, by furthering the study, this treatment by anti-MCM2 intrabody would be a model for new tumor treatments.

研究分野：実験病理

キーワード：MCM2 アポトーシス 治療モデル 細胞内抗体 ファージディスプレイ

1. 研究開始当初の背景

現在の癌治療において、放射線治療や抗癌剤による治療は一般的に行われている。しかし、これらの治療法は癌細胞特異的でなく、正常細胞にも作用するため、様々な副作用を呈する。よって、腫瘍細胞特異的な治療薬、治療法が望まれている。また近年、様々な分子標的薬や抗体医薬が開発、臨床応用され、腫瘍細胞特異的な治療が可能となっている。しかし、これらの分子標的薬は特定の腫瘍細胞にしか作用せず、腫瘍全般に幅広く用いることは不可能である。我々のこれまでの研究で、マウスにおいて minichromosome maintenance (MCM) 2 という分子が高発現している細胞において、フレンド白血病ウイルス (FLV) のエンベロープタンパクである gp70 が存在すると、MCM2 の核移行シグナル (nuclear localization site :NLS) の部分に gp70 が結合して MCM2 の核移行を阻害し、この細胞質にとどまった MCM2 が DNA 損傷誘発アポトーシスを著明に増強するという現象を見出した (図1)。この MCM2 という分子はもともと DNA 複製、細胞増殖に関わる分子で、ほとんどすべての腫瘍細胞において高発現していることが知られている。このように広範な腫瘍細胞において発現している MCM2 をターゲットとして、分子動態を制御し、アポトーシス感受性を増強することで、様々な腫瘍における治療が可能になると考えられる。しかし、gp70 は外来タンパクであり、ヒトの細胞においては毒性が強いということが判明した。そこで、本研究ではこれまでの研究を進展させて、MCM2 に対する抗体を用い、これを細胞内で gp70 と同様に作用させることで、細胞毒性がなく、MCM2 の核移行を阻害することが可能になると考えられた。

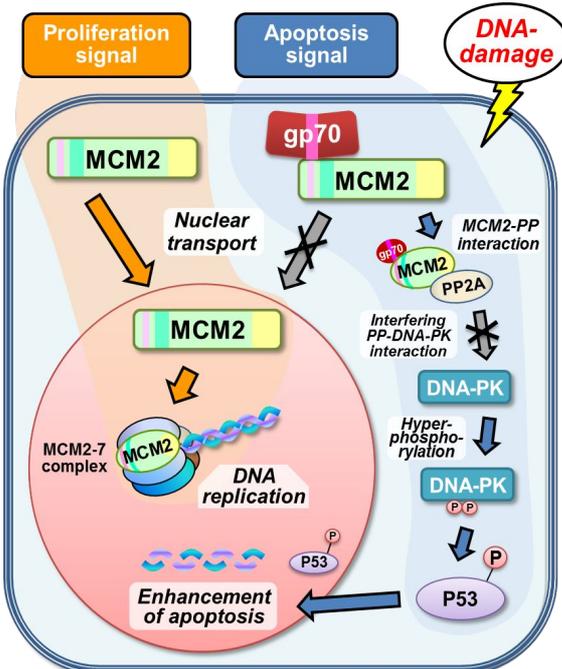


図1. MCM2 によるアポトーシス増強機構

2. 研究の目的

上記の背景から、毒性のある gp70 の代わりに、ファージディスプレイ法によって分離した MCM2 に対する細胞内抗体を用いて、gp70 が存在する場合と同様の現象を再現する。これを用いて、MCM2 の核移行を阻害することによる新たな癌治療モデルの作製を目指した。

3. 研究の方法

(1) マウス並びにヒト MCM2 抗体の分離。  
ファージディスプレイ法を用いて抗 MCM2 抗体を分離する。本研究では MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, UK) より提供された、ファージライブラリを用いた。MCM2 の NLS 領域ペプチドを抗原としてファージの選択・精製を行なった。まず抗原にファージライブラリを反応させ、結合するクローンのみを選択しこれを大腸菌 TG1 に感染させ、選択したファージのみを増殖させる。この工程を 2~3 回繰り返すことで、MCM2 に特異的なファージ抗体を得ることができる (図2)。さらに、得られたポリクローナルなファージを希釈し、単クローンになるように TG1 に感染させ、ファージ抗体を単クローン化した。

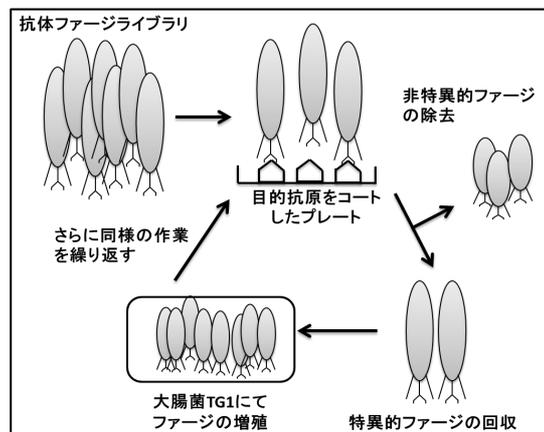


図2. ファージディスプレイによる抗体の選別

(2) 分離した抗体の特異性の確認

得られたファージ抗体が MCM2 に特異的に結合できるか確認を行った。MCM2 の NLS 領域ペプチドを用いた ELISA 法で、MCM2 に対する特異性を確認した。さらに選別された抗体の塩基配列をシーケンス法を用いて確認し、すべて異なるクローンのファージ抗体の選別を行った。さらに得られた各クローンをクローニングし、FLAG タグ付きの発現ベクターに組込んだ。これを HEK293 細胞、または HeLa 細胞に遺伝子導入し、lysete を回収し、免疫沈降法にてファージ抗体と MCM2 の結合を確認した。

(3) 抗体への Protein transduction domain (PTD) の付加

MCM2 に結合することが確認できたファージ

ジ抗体クローンに PTD を付加した。PTD とは 10~20 個のアミノ酸で構成され、任意のタンパクやペプチドに融合させることで細胞内に目的のタンパクを直接導入することを可能になる。これまでに様々な PTD が同定されている。本研究ではヒト転写因子 Hph-1 由来ペプチド (VARVRRRGPRR) を用いた。この配列をファージ抗体の遺伝子とともにタンパク発現ベクター-pRSET ( invitrogen ) に組み込み、大腸菌 BL21 に導入してタンパク誘導を行い、PTD 付加抗 MCM2 細胞内抗体を作製した。

( 4 ) 培養細胞における抗 MCM2 細胞内抗体によるアポトーシス増強効果の確認

精製した PTD 付加抗 MCM2 細胞内抗体をチャンバーに播種した HEK293 細胞に添加した後、蛍光免疫染色を行い MCM2 の細胞内における局在を観察した。次に、細胞内での抗体の安定性を確かめるために、各細胞に PTD 付加 MCM2 細胞内抗体を添加した後に 1 時間おきに細胞を回収し、抗体の保持能力の比較を行なった。さらに DNA ダメージを誘発する抗癌剤である Doxorubicin で処理し、Annexin 染色を用いてアポトーシス頻度の測定、さらにはウエスタンブロット法を用いてアポトーシス関連分子の動態を確認した。

( 5 ) *In vivo* における抗 MCM2 細胞内抗体による治療モデルの作製

次に *in vivo* における細胞内抗体の治療効果を検討した。まず SCID マウスにヒト由来の腫瘍細胞 HeLa, A549 を移植した。2 週間後、ある程度腫瘍が大きくなった時点で、作製した PTD 付加 MCM2 細胞内抗体を投与した。投与経路については皮下、静脈内、腹腔内、腫瘍に直接投与などの方法で試みた。抗体投与後、各時間において、マウスから腫瘍細胞を摘出し、細胞内抗体に対する免疫組織染色を施行して、腫瘍細胞における抗体の送達度合、抗体の組織内での保持安定性の検討を行った。さらに、同様に腫瘍を移植したマウスに抗体を投与し、さらに低線量の放射線照射、または Doxorubicin をマウスに投与した後に、腫瘍を摘出し、TUNEL 法を用いて腫瘍細胞におけるアポトーシス頻度の比較を行なった。また、この治療を継続したときの腫瘍径の変化、生存日数の比較を行い、治療効果の判定を行なった。

#### 4 . 研究成果

まず、ファージディスプレイ法を用いて抗 MCM2 抗体の分離をおこなった。このライブラリによって得られる抗体は抗原結合部位である VH および VL から構成される可変領域をフレキシブルなペプチドリンカーで結合した一本鎖抗体 ( scFv ) である ( 図 3 )。MCM2 の NLS 部分のペプチドを用いて特異的に結合するファージの分離を試みたところ、約 50 クローン程の MCM2 に特異

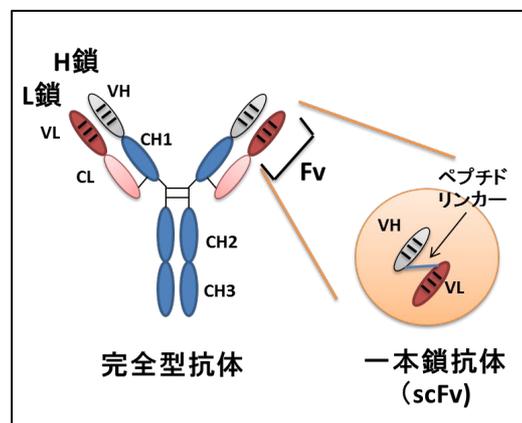


図 3 . 一本鎖抗体 ( scFv ) の構造

的なファージを分離することができた。

次にファージより、抗体遺伝子を PCR 法によって単離し、発現プラスミドに組み込み、HEK293、HeLa 細胞に遺伝子導入した。この細胞より lysate を回収し、免疫沈降法を用いて、細胞内における MCM2 と各抗体の結合能ならびに MCM2 の細胞内局在を蛍光免疫染色にて確認した。免疫沈降法を施行した結果、分離した抗体は細胞内で MCM2 と結合していることが確認できた。また蛍光免疫染色の結果、MCM2 の細胞内局在は、クローンの種類により、本来のとおり核に局在するもの、細胞質に局在するもの、両方に存在するものなどさまざまであった。免疫沈降法と蛍光免疫染色によって、確実に MCM2 が細胞質に存在するクローンは 20 クローン程存在していた。

さらに HEK293、HeLa 細胞にこの抗体を発現させた時に、抗癌剤である Doxorubicin 処理でアポトーシスが增強するか確認した。もその結果、もともと MCM2 の発現の高い HeLa 細胞においては、選別したクローンの抗体を導入したものにおいて、アポトーシスの增強が確認できた。一方、MCM2 の発現が低い HEK293 細胞においては、アポトーシスの增強がみられなかった。しかし MCM2 を強制発現させた後に同様の処理を行うことで、アポトーシスの增強が確認できた。

次に、この細胞内抗 MCM2 抗体を直接細胞に導入するシステムを構築するために、Protein Transduction domain (PTD) である HIV-1 Tat 由来 (GRKKRRQRRRPPQ)、ヒト転写因子 Hph-1 由来ペプチド (VARVRRRGPRR) を融合させた抗 MCM2 細胞内抗体を構築した。この抗体は完全型抗体に比べて分子量が小さいため、大腸菌などの微生物による抗体発現が可能である。大腸菌にて発現させた PTD 付加細胞内抗 MCM2 抗体を HEK293 細胞、HeLa 細胞に添加すると、約 1 時間で速やかに細胞内に導入されることを確認した。また、この抗体を導入した HeLa 細胞に Doxorubicin を処理することでアポトーシスが增強されることを確認した。

さらに *in vivo* における細胞内抗体による治療効果を検討した。SCID マウスに腫瘍細胞である HeLa 細胞、A549 細胞を移植し、作製

した PTD 付加細胞内抗 MCM2 抗体を腫瘍部分に直接投与した。投与後腫瘍細胞を摘出し、病理組織学的に抗体の送達度合を確認したところ、投与後 1 時間で腫瘍細胞に抗体が導入されていることが確認できた。しかし、その後急速に腫瘍細胞内の抗体が減少し、5 時間後には細胞内の抗体のほとんどが消失していた。さらにこの抗体を用いて治療実験を行った SCID マウスに PTD 付加細胞内抗 MCM2 抗体投与後に Doxorubicin を処理することで腫瘍細胞に対してアポトーシスを比較的強く誘導することが可能であった。現在、この治療継続中であり、生存期間の比較を行う予定である。

今後は PTD 付加細胞内抗 MCM2 抗体による治療効果の確認をより詳しく調べていく。また、本研究で作成した PTD 付加細胞内抗 MCM2 抗体は生体において安定性に欠いている様であったので、抗体の安定性の確保、抗体を安定的に生体内に供給するシステムの構築、投与経路や投与量などの検討を重ねて行かなければならない。今回 Protein Transduction domain (PTD)として HIV-1 Tat 由来 (GRKKRRRPPQ)、ヒト転写因子 Hph-1 由来ペプチド (VARVRRRGPRR) を使用したが、これらの PTD は組織特異性がなく、すべての臓器にタンパクが導入されていることが考えられる。このことが腫瘍細胞における細胞内抗体の安定性の欠如の原因の一つと考えられる。近年、組織特異的な PTD がいくつか発見されているため、これを利用することでより副作用が少なく、腫瘍特異的な治療が可能になると考えられる。まだまだ課題はあるが、さらに研究を進展させることにより、この抗 MCM2 細胞内抗体による治療は新規腫瘍治療モデルになると考えている。

## 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 5 件)

Onishi I, Nakagawa Y, Murayama T, Hidaka M, Yamamoto K, Abe-Suzuki S, Abe S, Kurata M, Kitagawa M. Expression of multidrug resistance 1 gene in association with CXCL12 in chronic myelogenous leukemia. Pathology. 2014; 46 (7): 623-9. DOI: 10.1097/PAT.000000000000180.

Abe-Suzuki S, Kurata M, Abe S, Onishi I, Kirimura S, Nashimoto M, Murayama T, Hidaka M, Kitagawa M. CXCL12+ stromal cells as bone marrow niche for CD34+ hematopoietic cells and their association with disease progression in myelodysplastic syndromes. Laboratory Investigation. 2014; 94(11): 1212-23. DOI: 10.1038/labinvest.2014.110.

Li N, Abe S, Kurata M, Abe-Suzuki S, Onishi I, Kirimura S, Murayama T, Hidaka M, Kawano F, Kitagawa M. Over-Expression of Cancerous Inhibitor of PP2A (CIP2A) in Bone Marrow Cells from Patients with a Group of High-Risk Myelodysplastic Syndromes. Pathol Oncol Res. 2014; 20: 399-407. DOI: 10.1007/s12253-013-9709-y.

Miwa Y, Tomohito H, Suzuki S, Abe S, Onishi I, Kirimura S, Kitagawa M, Kurata M: Up-regulated expression of CXCL12 in spleens with extramedullary hematopoiesis. Pathology 2013; 45(4): 408-416. DOI: 10.1097/PAT.0b013e3283613dbf

Kurata M, Suzuki S, Abe S, Onishi I, Kitagawa M: Bone marrow cell death and proliferation: Controlling mechanisms in normal and leukemic state (review). World Journal of Hematology 2013; 2(1):1-5.

以上、すべて査読あり。

[学会発表](計 9 件)

阿部晋也、山本浩平、阿部志保、桐村進、北川昌伸: A novel model of cancer therapy by enhancing DNA-damage-induced apoptosis. 第 73 回日本癌学会総会; 2014. パシフィコ横浜。横浜(神奈川)。

北川昌伸、阿部晋也、阿部志保、倉田盛人、山本浩平、大西威一郎、桐村進、木原淳、遠藤祐子: Apoptotic enhancement by MCM2. 第 73 回日本癌学会総会; 2014. パシフィコ横浜。横浜(神奈川)。

阿部晋也、山本浩平、阿部志保、大西威一郎、桐村進、北川昌伸: MCM2 の作用を用いた新規腫瘍治療モデル。第 103 回日本病理学会; 2014. 広島国際会議場。広島(広島)。

北川昌伸、阿部晋也、倉田盛人、山本浩平、阿部志保、大西威一郎、桐村進: MCM2 によるアポトーシス増強機構。第 103 回日本病理学会; 2014. 広島国際会議場。広島(広島)。

阿部晋也、阿部志保、山本浩平、北川昌伸: DNA 損傷誘発アポトーシス増強における MCM2 の役割。第 36 回日本分子生物学会; 2013. 神戸ポートアイランド。神戸(兵庫)。

**阿部晋也**、倉田盛人、阿部志保、大西威一郎、小川弘恵、**北川昌伸**: MCM2 bound with retroviral gp70 is localized to cytoplasm and enhanced DNA-damage-induced apoptosis. 第72回日本癌学会総会; 2013. パシフィコ横浜. 横浜(神奈川県).

**北川昌伸**、**阿部晋也**、倉田盛人、阿部志保、大西威一郎、桐村進: In vivo model of cancer therapy by enhancing DNA-damage-induced apoptosis. 第72回日本癌学会総会; 2013. パシフィコ横浜. 横浜(神奈川県).

**阿部晋也**、倉田盛人、鈴木志保、小川弘恵、**北川昌伸**: DNA 損傷誘発アポトーシス増強による in vivo 腫瘍治療モデル. 第102回日本病理学会総会; 2013. ロイトン札幌. 札幌(北海道).

**北川昌伸**、鈴木志保、倉田盛人、**阿部晋也**、大西威一郎、桐村進: 造血器腫瘍の最近の展開-造血器 Niche と骨髄性腫瘍-. 第102回日本病理学会総会; 2013. ロイトン札幌. 札幌(北海道).

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/med/pth2/pth2-J.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿部 晋也 (ABE SHINYA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 70596725

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

北川 昌伸 (KITAGAWA MASANOBU)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 10177834