

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860575

研究課題名(和文) プロテオミクス手法による膵臓癌の抗体医薬品標的分子の同定と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Proteomic screening for pancreatic cancer antigen and development of antibody-based medicine.

研究代表者

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・免疫シグナルプロジェクト・研究員

研究者番号：50463302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：定量的プロテオーム解析により、正常ヒト膵臓上皮細胞と比較して膵臓癌細胞株にて高発現する膜タンパク質を探索した。同定された癌抗原候補分子が膵臓癌組織中に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。本癌抗原に対するマウスモノクローナル抗体を取得することに成功した。開発した抗体が標的とする癌抗原と結合することで細胞内へ取り込まれる活性を示す事が確認出来たため、チューブリン阻害活性を有する抗癌剤結合2次抗体を用いたin vitro ADCアッセイを行った結果、癌抗原陽性細胞に対して1nM以下のIC50値を示し、標的抗原の発現に特異性を示した強い抗腫瘍効果を確認することに成功した。

研究成果の概要(英文)：By quantitative proteomic approach, cell surface membrane proteins were screened by comparing normal human pancreatic epithelial cells and pancreatic carcinoma cells. Elevated expression levels of the candidate cancer antigen was confirmed by immunohistochemical staining analysis using pancreatic carcinoma tissue sections. We developed novel monoclonal antibody targeting this antigen and found that some clone represented internalization into cells. When in vitro antibody-drug conjugate (ADC) assay was performed using primary antibody and second antibody, which was conjugated with tubulin inhibitor, the value was IC50 was less than 1 nM against antigen positive pancreatic carcinoma cells. We confirmed specific anti-tumor effect of the monoclonal antibody by ADC toward pancreatic carcinoma.

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 抗体医薬

### 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は毎年新たに約 23,000 人が診断され、2009 年では年間 26,800 人が死亡する悪性腫瘍であり近年著しく増加傾向にある。さらに、膵臓癌は現在の診断技術では早期発見が難しいため診断時にはすでに進行期であることが多く、従来手術、化学療法、放射線治療に抵抗性を示すため、極めて予後不良な悪性腫瘍である。従って、膵臓癌に対する新規治療法の開発が早急に望まれている。

近年、乳がんにおいて Her2 などの受容体などに対する抗体医薬品が抗体の特異性の高さから従来の抗癌剤よりも副作用が少なく優位性を示す事が明らかにされている。膵臓癌に対して特異性の高い癌抗原タンパク質を同定することが出来れば、これを用いて開発された膵臓癌細胞に特異的なヒト型モノクローナル抗体によって、より効果的な新規治療法を臨床応用することが出来るものと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は研究代表者らが確立した細胞表面膜タンパク質に対する定量的プロテオミクス手法を用いて膵臓癌の抗体医薬品開発の標的となる癌抗原を同定し、腫瘍の増殖との関係の解明、及び癌抗原に対するモノクローナル抗体の開発と抗腫瘍効果を証明する事とした。

### 3. 研究の方法

(1) iTRAQ 法による膵臓癌細胞表面膜タンパク質の発現差解析

1 度の解析で最大 8 サンプル間のタンパク質発現の網羅的な定量が可能でハイスループットな 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膵臓上皮細胞をコントロールとして、膵臓癌細胞株 (AsPC-1, BxPC-3, Capan-1, Capan-2, MIAPACA2, PANC-1, SUIT-2) 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。正常膵臓上皮細胞、AsPC-1, BxPC-3, PANC-1 は DS ファーマより、MIAPACA2, SUIT-2 は JCRB より、Capan-1, Capan-2 は ATCC 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 による癌抗原発現の確認

細胞は PBS (Nacalai Tesque) で 2 回洗浄し、0.02% EDTA solution (Nacalai Tesque) で dish よりはがした。細胞を FACS staining buffer (PBS supplemented with 1% FBS and 0.1% sodium azide) で 2 回洗浄し、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癌抗原の発現解析

ホルマリン固定されたパラフィン包埋組織は大阪大学医学部附属病院にて手術を受けた患者より得た。

パラフィン包埋組織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マウスモノクローナル抗体の作成と antibody-drug conjugate (ADC) アッセイ

Balb/c マウスに市販のリコンビナント精製癌抗原を免疫し、マウスモノクローナル抗体を樹立した。得られた抗体が膵臓癌の癌抗原候補タンパク質と反応する事を確認した。

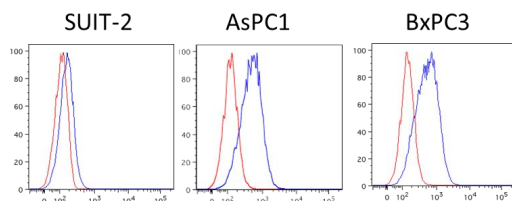
ADC アッセイは 96 ウェルホワイトプレート (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて実施した。細胞を 10% FBS 含有培地で 2,000 cells/well (80 µl/well) で播種した。翌日、一次抗体を 10 µl、抗癌剤結合 2 次抗体 (Fab-aMFC-CL-MMAF, Moradec 社) を 10 µl 添加し、溶液を混合し、144 時間、37 度、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescence Cell Viability Assay 試薬 (promega) を用いて細胞増殖阻害活性を評価した。

### 4. 研究成果

正常膵臓上皮細胞と膵臓癌細胞株を用いた iTRAQ 解析を実施した。その結果、767 種類のタンパク質を同定し、262 種類 (34.16%) の細胞表面膜タンパク質が含まれていた。正常膵臓上皮細胞と比較して膵臓癌細胞の BxPC3 で 5.51 倍、AsPC1 で 1.67 倍に高発現するタンパク質を同定した。この分子は正常

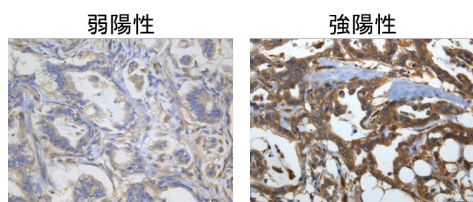
膵臓上皮細胞と比較して SUIT-2 では0.81 倍であり、SUIT-2 においては発現差が見られなかった。FACS 解析により本癌抗原分子が膵臓癌細胞株 AsPC1、BxPC3 に高発現し、SUIT-2 では発現が弱いことを確認した(図 1)。

図 1 フローサイトメトリーによる膵臓癌細胞株における癌抗原候補分子の発現解析。



また、免疫組織化学染色法による解析においても、膵臓癌組織において、癌抗原候補分子が 13 症例中、陰性は 1 例、弱陽性は 10 例、強陽性は 2 例存在し、92%の患者に発現が陽性となることが明らかとなった(図 2)。

図 2 免疫組織化学染色法による膵臓癌組織における、癌抗原候補分子の発現解析。



癌抗原候補分子に対するマウスモノクローナル抗体を独自に樹立し、FACS 可能なクローンを開発した。得られたクローンの内、細胞表面に結合した抗体が細胞内に取り込まれる活性の高いクローンが含まれていた。そこで、抗癌剤コンジュゲート抗体の開発に応用できる可能性を考え、抗癌剤(MMAF)を結合した抗マウス 2 次抗体を組み合わせた ADC アッセイを実施した。その結果、癌抗原候補分子を発現する膵臓癌細胞株 AsPC1 および BxPC3 にて強力な抗腫瘍効果が認められたが、癌抗原候補分子を発現しない SUIT-2 では細胞増殖抑制効果が見られなかった(表 1)。

表 1 ADC アッセイの IC<sub>50</sub> 値

	IC <sub>50</sub> (nM)
SUIT-2	Not determined
AsPC1	0.204
BxPC3	0.070

これらの結果、本研究で同定した癌抗原候補分子は ADC の優れた標的となり得る事が示唆された。

## 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 8 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) 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

(5) Serada S, Naka T.

Screening for Novel Serum Biomarker for Monitoring Disease Activity in Rheumatoid Arthritis Using iTRAQ Technology-Based Quantitative Proteomic Approach.

Methods Mol Biol. 2014;1142:99-110.

doi: 10.1007/978-1-4939-0404-4\_12.

査読有

(6) 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

(7) 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

(8) 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

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

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