

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893086

研究課題名(和文) 卵巣癌腹膜転移に対するヒトモノクローナル抗体を用いたトランスレーショナルリサーチ

研究課題名(英文) Translational research using human monoclonal antibody for ovarian cancer peritoneal metastasis

研究代表者

柴田 俊章 (Shibata, Toshiaki)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50529568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の骨子は「卵巣癌特異的なヒトモノクローナル抗体であるHMOCC-1抗体が卵巣癌表面のMUC16と正常腹膜表面のMSLNタンパク質との結合を阻害する」という仮説の証明にある。当該研究により、HMOCC-1抗体による卵巣癌細胞と正常腹膜細胞の接着阻害作用はMSLNとMUC16の結合阻害ではないと分かり、その他の分子機構を介して作用している可能性が示唆された。HMOCC-1抗体による卵巣癌腹膜転移抑制作用の分子機構の新たな解明や臨床応用に向けたin vivo実験の確認など課題を残し終了している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to prove the hypothesis that HMOCC-1, an ovarian cancer-specific human monoclonal antibody, inhibits adhesion of MUC16 on the surface of ovarian cancer to MSLN protein on the surface of normal peritoneum. This study revealed that the inhibitory effect of HMOCC-1 antibody against the adhesion of ovarian cancer cells to normal peritoneal cells is not caused through inhibition of binding of MSLN and MUC16, which suggests a possibility that HMOCC-1 antibody may function through the other molecular mechanisms. The study will be required further studies to define the molecular mechanisms of the HMOCC-1 function against ovarian cancer peritoneal metastasis.

研究分野：産婦人科学

キーワード：卵巣癌 腹膜転移 治療 トランスレーショナルリサーチ

### 1. 研究開始当初の背景

近年、卵巣癌腹膜転移の分子機構の解析を応用して、新しい治療法が検討されている。卵巣癌の転移機序に関して“接着”に関連するメカニズムとして、卵巣癌細胞表面に発現する糖タンパク質である MUC16 と、正常腹腔表面に存在する中皮細胞に発現している GPI アンカー結合タンパク質である MSLN を介しての細胞-細胞間接着が関与していること、その接着は N 結合型糖鎖依存性であると報告されている<sup>1</sup>。

一方、我々は、ヒト卵巣明細胞癌細胞株の RMG-1 細胞を免疫抗原としてヒト型モノクローナル抗体 HMOCC-1(Human Monoclonal antibody for Ovarian Clear cell Carcinoma-1)抗体を用いて研究してきた。HMOCC-1 抗体は N 結合型糖鎖を主とする糖タンパク質上の糖鎖を認識し、卵巣癌細胞に特異的に反応する<sup>2</sup>。我々は、HMOCC-1 のエピトープがモノまたはジ硫酸化 N-アセチルラクタサミンオリゴ糖構造であることを明らかにした<sup>3</sup>。また、HMOCC-1 抗体は、正常腹腔中皮の初代培養細胞と RMG-1 細胞との接着を阻害する<sup>2</sup>。

本研究では、「卵巣癌の腹膜接着阻害能をもつ HMOCC-1 抗体が、N 結合型糖鎖依存性である MUC16 (卵巣癌細胞表面に発現) と MSLN (腹腔に存在する中皮細胞に発現) の結合を阻害する」との仮説を立て、HMOCC-1 抗体が認識する糖鎖と MSLN の相互作用を阻害する事を指標に卵巣癌腹膜転移に対する新規分子標的治療薬が開発できるのではないかと考えるに至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、卵巣癌腹膜転移に対する分子標的治療薬 (抗体治療薬) の開発にある。我々は、卵巣癌の治療を目的としてヒト型モノクローナル抗体 HMOCC-1 抗体のエピトープの構造を決定した<sup>3</sup>。HMOCC-1 抗体は、N 結合型糖鎖を抗原として卵巣癌特異的に結合し、卵巣癌細胞と正常腹膜細胞の接着を阻害する。本研究では、HMOCC-1 抗体が卵巣癌腹膜転移のメカニズムに関与しているかを検討し、得られた基礎的な研究成果を踏まえて、転移抑制剤を開発する方向で臨床応用を目指す。

### 3. 研究の方法

研究方法として、(1)HMOCC-1 抗原発現卵巣癌細胞を用いて、MSLN と MUC16 結合モデルを作成する、(2)in vitro において HMOCC-1 抗体が MSLN と MUC16 の結合を阻害するか証明する、(3)in vivo、卵巣癌腹膜転移モデルマウスにおいて、HMOCC-1 抗体による腹膜転移抑制効果を証明する、この3段階を設定した。

(1) HMOCC-1 抗原発現卵巣癌細胞を用いて、MSLN と MUC16 結合モデルを作成する。作成に際して、下記の事項について検証を行い

確認していく。

①検出可能なタグが付加された MSLN タンパク質を作成する：Rabbit IgG の Fc 断片タグが付加された MSLN (Meso-Fc) 遺伝子の cDNA 発現ベクターを使用する。その Meso-Fc 遺伝子 cDNA 発現ベクターを、遺伝子導入効率の高い HEK293T 細胞に導入し過剰発現させ、その上清から Meso-Fc を抽出・精製する。抽出・精製の確認は、吸光度法と抗 Rabbit IgG 抗体を用いた免疫染色法により行う。

②HMOCC-1 抗原発現卵巣癌細胞株の準備：既存の卵巣癌株において HMOCC-1 の発現株を数種類同定した。細胞免疫染色法によりその発現を確認する。

③Meso-Fc が HMOCC-1 抗原発現卵巣癌細胞株と結合するか確認する：卵巣癌細胞培養液に Meso-Fc を加え、細胞免疫染色法により卵巣癌細胞への結合を確認する。

④Meso-Fc が卵巣癌細胞株上の MUC16 に結合したか確認する。Meso-Fc タンパク質結合可能な HMOCC-1 発現卵巣癌細胞株に MUC16 が発現している事を免疫染色で確認する。

(2) in vitro において HMOCC-1 抗体が MSLN と MUC16 の結合を阻害するか証明する。

① Meso-Fc タンパク質結合可能な MUC16/HMOCC-1 発現卵巣癌細胞株を用い、抗 MUC16 抗体の存在下で HMOCC-1 抗体の結合が減弱するか細胞免疫染色法により確認する。

② Meso-Fc タンパク質結合可能な MUC16/HMOCC-1 発現卵巣癌細胞株を用い、HMOCC-1 抗体の存在下で Meso-Fc の結合が減弱するか細胞免疫染色法により確認する。

(3)in vivo、卵巣癌腹膜転移モデルマウスにおいて、HMOCC-1 抗体による腹膜転移抑制効果を証明する。

### 4. 研究成果

(1) HMOCC-1 抗原発現卵巣癌細胞における MSLN と MUC16 結合モデルの作成。

①検出可能なタグが付加された MSLN タンパク質を作成する。

Rabbit IgG の Fc 断片タグが付加された MSLN (Meso-Fc) 遺伝子の cDNA 発現ベクターを他施設より譲り受け、HEK293T 細胞に遺伝子導入した。その培養上清中より、Fc タグ付きの MSLN タンパク質を回収することができた。(図1、図2)

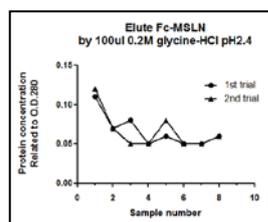


図1：遺伝子導入細胞上清より抽出・精製した Meso-Fc タンパク質の回収 (吸光度法)

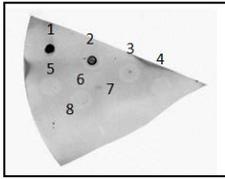


図 2 :  
抽出・精製した Meso-Fc  
タンパク質の抗 Rabbit  
IgG 抗体を用いた免疫  
染色法

②HMOCC-1 抗原発現卵巣癌細胞株の準備。  
HMOCC-1 抗原発現卵巣癌細胞株として、  
OVCAR3 細胞株、SKOV3 細胞株、RMG-1  
細胞株を準備することができた。(図 3)

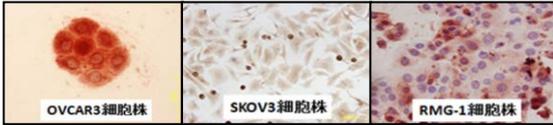


図 3 : 各細胞株の HMOCC-1 抗体による細胞  
免疫染色法

③Meso-Fc が HMOCC-1 抗原発現卵巣癌細胞  
株と結合するか確認する。  
OVCAR3 細胞株とのみ Meso-Fc タンパク質  
は結合が確認できた。(図 4)

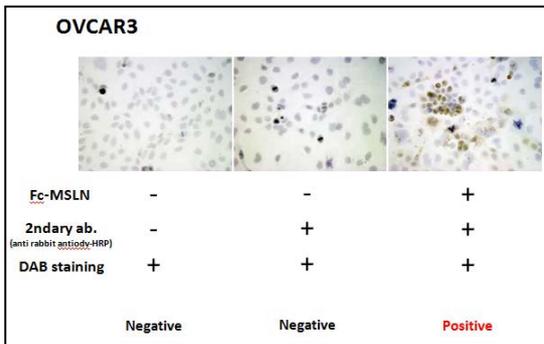


図 4 : OVCAR3 細胞株における MSLN-Fc  
タンパク質による細胞免疫染色

④同段階は、実験方法 (2) ①及び②の結果  
を待って、施行することとした。

(2)

①前述の Meso-Fc 結合可能な OVCAR3 細胞  
株を用い、抗 MUC16 抗体の存在下では  
HMOCC-1 抗体の結合が減弱するか細胞免  
疫染色法で実験を行った。Image J ソフトを  
使用し、免疫染色強度を比較したが、抗  
MUC16 抗体存在下における免疫染色強度比  
較に有意差は認めなかった。

②Meso-Fc 結合可能な OVCAR3 細胞株を用  
い、HMOCC-1 抗体の存在下では MSLN-Fc  
の結合が減弱するか細胞免疫染色法で実  
験を行った。Image J ソフトを使用し、免疫  
染色強度を比較したが、HMOCC-1 抗体存在  
下における免疫染色強度比較に有意差は認  
めなかった。

以上より、以前報告している HMOCC-1 抗体  
による卵巣癌細胞と正常腹膜細胞の接着阻  
害作用は MSLN と MUC16 の結合阻害では  
ないと結論付けられ、その他の分子機構を介  
して作用を発揮している可能性が示唆され

る。HMOCC-1 による卵巣癌腹膜転移抑制作  
用の分子機構の新たな解明とそれに基づく  
臨床応用に向けた in vivo 実験の確認を課題  
として残し、当該研究を終了している。

<引用文献>

1 Gubbels JA et al., Mesothelin-MUC16  
binding is a high affinity, N-glycan  
dependent interaction that facilitates  
peritoneal metastasis of ovarian tumors.  
Mol Cancer 5(1), 2006: 50.

2 Suzuki N et al., HMOCC-1, a human  
monoclonal antibody that inhibits adhesion  
of ovarian cancer cells to human  
mesothelial cells. Gynecol Oncol 95(2),  
2004: 290-8.

3 Shibata TK et al., Identification of mono-  
and disulfated N-acetyl-lactosaminyl  
Oligosaccharide structures as epitopes  
specifically recognized by humanized  
monoclonal antibody HMOCC-1 raised  
against ovarian cancer. J Biol Chem 287(9),  
2012: 6592-602.

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 7 件)

① Park SK, Yoon J, Wang L, Shibata TK,  
Motamedchaboki K, Shim KJ, Chang MS,  
Lee SH, Tamura N, Hatakeyama S,  
Nadano D, Sugihara K, Fukuda MN,  
Enhancement of mouse sperm motility by  
trophinin-binding peptide. Reprod Biol  
Endocrinol 10, 2012: 101. (査読有)

② Hatakeyama S, Shibata TK, Tobisawa Y,  
Ohyama C, Sugihara K, Fukuda MN,  
Tumor targeting by a carbohydrate  
ligand-mimicking peptide. Methods Mol  
Biol, 1022, 2013: 369-86. (査読有)

③ Sugihara K, Shibata TK, Takata K,  
Kimura T, Kanayama N, Williams R,  
Hatakeyama S, Akama TO, Kuo CW, Khoo  
KH, Fukuda MN, Attenuation of fibroblast  
growth factor signaling by  
poly-N-acetyllactosamine type glycans.  
FEBS Lett 587(19), 2013: 3195-201. (査読  
有)

④ 畠山 真吾, 柴田 俊章, 田村 直頭, 飛澤  
悠葵, 米山 徹, 杉原 一廣, 大山 力, 福田  
道子, 腫瘍組織血管内皮細胞を標的とした前  
立腺癌化学療法的基础研究、泌尿器外科、  
査読有、26 巻 8 号、2013、Page1203-1206

⑤ 安立 匡志, 平井 強, 児嶋 裕香, 勝又 佳  
菜, 田村 直頭, 福嶋 真由, 馬場 聡, 川合  
健太, 加藤 誠, 村上 浩雄, 下山 華, 柴田  
俊章, 伊東 宏晃, 杉原 一廣, 金山 尚裕、成  
熟嚢胞性奇形腫より発生した卵巣粘表皮癌  
の一例、静岡産科婦人科学会雑誌、査読有、  
2 巻 1 号、2013、Page4-10

⑥ 望月 亜矢子, 宮部 勇樹, 柏木 唯衣, 仲谷 傳生, 柴田 俊章, 田村 直顕, 村上 浩雄, 伊東 宏晃, 杉原 一廣, 金山 尚裕, 恥骨上単一創で腹腔鏡補助下卵巣嚢腫核出術と単孔式腹腔鏡下虫垂切除術を同時に施行した一例、静岡産科婦人科学会雑誌、査読有、3 巻 1 号、2014、Page39-44

⑦ 神藤 里枝, 幸村 康弘, 金森 隆志, 村上 裕介, 村上 浩雄, 仲谷 傳生, 安立 匡志, 柴田 俊章, 田村 直顕, 伊東 宏晃, 杉原 一廣, 金山 尚裕、円錐切除後に断端遺残を認め光線力学療法を施行した 2 例、静岡産科婦人科学会雑誌、査読有、3 巻 1 号、2014、Page58-62

〔学会発表〕(計 6 件)

① ポスター発表、Identification of mono- and di-sulfated N-acetyl-lactosaminyl oligosaccharide structures as epitopes specifically recognized by humanized monoclonal antibody HMOCC-1 raised against ovarian cancer、日本産科婦人科学会、2013/5/10、札幌市。

② 一般口演発表、精液へ分泌される糖鎖ポリラクトサミンによる精子運動の調節機構、日本受精着床学会、2013/8/8、別府市。

③ 一般口演 (ミニワークショップ)、精液へ分泌される糖鎖ポリラクトサミンによる精子運動の調節機構、日本産科婦人科学会、2014/4/19、東京。

④ 一般口演、精液へ分泌される糖鎖ポリラクトサミンによる精子運動の調節機構、中部生殖医学会、2014/6/7、浜松。

⑤ 一般口演、精液へ分泌される糖鎖ポリラクトサミンによる精子運動の調節機構、日本生殖医学会、2014/12/5、東京。

⑥ ポスター発表、Attenuation of fibroblast growth factor signaling by poly-N-acetyl-lactosamine type glycans. 62nd Society for Reproductive Investigation Annual Scientific Meeting, 3/26, San Francisco, CA, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 俊章 (SHIBATA Toshiaki)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50529568

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：