

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670377

研究課題名(和文) 幹細胞を標的とした新しい大腸がん画像診断法開発

研究課題名(英文) New method for diagnosis for colon cancers by using stem cell as a target

研究代表者

柴崎 芳一 (Shibasaki, Yoshikazu)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任教授

研究者番号：80196419

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)：大腸などのがんの特異的に発現し、再生など大腸幹細胞活性時に上昇する、エピレギュリンに対する抗体(9E5)を作成した。エピレギュリン高発現大腸がん細胞株を用いると、エピレギュリン抗体が、効率的に、エンドサイトーシスにより取り込まれることが確認された。これを利用してマウスのインビボイメージングを行った。エピレギュリン高発現細胞の担がんマウスを作成し、9E5抗体を、近赤外波長のインドシアニングリーンで標識し、尾静脈から投与することにより、腫瘍特異的に集積することが確認され、特異的なイメージングに使用できることが明らかになった。これを診断、さらに治療に応用するように検討中である。

研究成果の概要(英文)：Epiregulin (EPR) is a member of EGF family ligands and exert numerous cellular functions including stem cell stimulation. EPR is synthesized as a membrane-anchored protein (pro-EPR) and then proteolytically cleaved to yield a soluble form of EPR. While it is expressed at relatively low levels in most adult tissues, EPR is overexpressed in human colon, breast, and other cancers. We developed several anti-EPR monoclonal antibodies that specifically recognize human EPR, but not other EGF family ligands. Anti-EPR antibody is internalized into epiregulin expressing cancer cells. Using this system, we developed a mouse in vivo imaging system for epiregulin producing tumor. Our results suggest that anti-EPR antibodies represent valuable tools for medical imaging and for delivering agents for the treatment of cancers

研究分野：細胞生物学

キーワード：インビボイメージング 幹細胞 大腸がん EGFファミリー

1. 研究開始当初の背景

(1) 再生と腸上皮幹細胞

腸管内側の上皮は一層の細胞からなり、傷害を受けると上皮細胞が欠損し潰瘍を形成するが、再生によりもとに戻り恒常性を保つ。腸上皮細胞は、生成後エレベーター状に移動、5日位で腸管内腔に脱落し、哺乳類細胞のうちでも最も回転の速い細胞の一つである。腸上皮を生成する幹細胞は、「クリプト」と呼ばれる構造に存在し、特定のマーカー分子も同定され、再生・増殖における、幹細胞の増殖調節が注目されている。

(2) 腸上皮幹細胞増殖シグナル

増殖を調節するシグナルの代表的なものはウイントシグナルであるが、現在知られるシグナル分子は診断に応用されていない。我々は、がん細胞で特異的に発現する分子を追跡し、上皮成長因子(EGF)ファミリー分子の発現が上昇していることから、腸管上皮幹細胞調節における EGF シグナル系の意義を追跡した。

本研究により、EGF ファミリーの腸上皮幹細胞機能への関与が調べられ、がん化機構に新しい視点を提供するとともに、高感度診断法に結び付ける。

2. 研究の目的

現在、大腸がん診断に内視鏡が威力を発揮しているが、がん細胞検出にはさらなる高感度化が求められている。腸管には定常状態の再生に加え、急激な損傷時の再生機構が備わっている。この調節は腸上皮幹細胞を通して行われるが、再生・増殖シグナルが入り続けると、細胞のがん化につながることもある。

我々の目的は、幹細胞増殖における EGF ファミリーの重要性を明らかにし、この機構に基づき、高感度の新しい大腸がん画像診断法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) EGF 各メンバーのタンパク質発現と特異的抗体作成

EGF ファミリーは膜1回貫通たんぱく質を前駆体として、その細胞外が切り出されて生成される。この前駆体の細胞外ドメインに対する特異的な単クローン抗体を作成する。抗原である EGF ファミリーメンバーはどれも分子内に3つのSS結合を有する複雑な構造を持つため、タンパク質発現も工夫が必要であるが、哺乳類培養細胞で分泌経路を介して発現させ、立体構造を維持する系を用いる。

(2) 培養細胞株を用いた解析

大腸がん細胞株を用いて、抗体の結合親和性などの検定を行う。解析は、蛍光免疫染色、セルソーター(FACS)、表面プラズモン共鳴測定(SPR)等を用いる。細胞膜に存在する前駆体 EGF ファミリーと、細胞外に存在する最終切断産物への結合の差を見分ける方法などを検討する。

(3) マウス個体を用いた解析

EGF ファミリー高発現細胞がんマウスを用いた体外イメージング

EGF メンバー分子の高発現大腸がん細胞株をヌードマウスに移植し、作成した抗体を蛍光標識して静脈内に投与し、体外イメージング(Clairvivo OPT plus, 島津製作所)により、抗体の体内動態、各臓器への集積、がんの検出、がん細胞増殖への作用評価などを解析する。

腸炎による再生モデル解析

マウスにSDSを用いた腸炎モデルを作成して腸上皮を障害し、再生時のEGFファミリー分子の発現を、腸組織切片の蛍光検出により顕微鏡解析し、どのEGFファミリーの上昇が見られるかを検出する。

また、再生時の幹細胞への作用解析に

ルカゴン様ペプチドを利用する。これは腸管上皮で生成され、腸管上皮増殖を促進するが、その作用機構は不明で、腸組織内の細胞間相互作用が関与している。その候補の一つとして、我々は EGF ファミリー分子が局所でパラクリン様に作用するかを検証する。

4. 研究成果

(1) EGF 各メンバーのタンパク質発現と特異的抗体作成

ヒト EGF ファミリーに対する、複数の特異的な単クローン抗体を作成した。その中で特に抗体価の高いエピレギュリンに対する抗体を主に解析した。この抗体はマウスのエピレギュリンは認識しない。

(2) 培養細胞株を用いた解析

エピレギュリン高発現大腸がん細胞株を用いて、抗体の結合親和性などの検定を行った。蛍光免疫染色やセルソーターにより、抗体は細胞膜に高濃度に集積されたが、時間経過とともに、エンドサイトーシスにより取り込まれ、細胞内に集積することが判明した。

エピレギュリン抗体による、エピレギュリン高発現大腸がん細胞株の増殖抑制は大きくなかった。

(3) マウス個体を用いた解析

エピレギュリン高発現大腸がん細胞株をマウスを用いた、エピレギュリン抗体による体外イメージング

エピレギュリン分子の高発現大腸がん細胞株をヌードマウスに移植し、作成した抗体を蛍光標識して静脈内投与による体外イメージングにより、がんの検出、抗体集積の時間経過などを解析した(図1参照)。

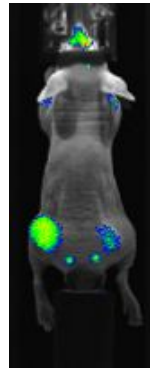


図1：我々の、EGF ファミリー高発現がん細胞移植マウスに対する抗体による体外蛍光イメージング例

マウスを背部から示す。

左の腰にエピレギュリン高発現細胞(陽性)、右の腰にエピレギュリン無発現細胞(陰性)により皮下腫瘍形成し、蛍光(緑)ラベルした抗体を静脈投与により検出した。

我々の体外イメージング系で、ヒトエピレギュリン発現腫瘍を高感度に検出できることが判明した。

(ヒトエピレギュリンに特異的に作用するので、マウスに内在するエピレギュリンは検出しない。)

腸炎による再生モデル解析

マウスに腸炎モデルを作成して腸上皮を障害し、再生時の EGF ファミリー分子の発現を、腸組織切片の蛍光検出により顕微鏡解析した。複数の EGF ファミリーの上昇が見られ、その時間経過も腸管上皮再生経過に見合う結果だった。EGF 受容体に作用して、増殖を促進することが、腸管修復の機構であることが示唆された。グルカゴン様ペプチドについては明らかな結果が得られなかった。

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 1件)

飯嶋麻里子、穴井元暢、児玉龍彦、柴崎芳

二

Epiregulin-blocking antibody inhibits
epiregulin-dependent EGFR signaling

BBRC 査読有 489 (2017) pp.83-88

doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.006

[学会発表](計 0件)

[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:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴崎 芳一 (SHIBASAKI Yoshikazu)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任
教授

研究者番号: 80196419

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()