

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23650608

研究課題名（和文） がん幹細胞特異的殺傷抗体作成技術の創出

研究課題名（英文） Establishment of protocol for building up monoclonal antibodies targeting cancer stem cells

研究代表者

阪口 政清（SAKAGUCHI MASAKIYO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70379840

研究成果の概要（和文）：がん幹細胞クローニング用プラスミドベクターを完成させたこと、このベクターを使用して、がん幹細胞の特性を備えたクローン化がん幹細胞株を樹立できたこと、があげられる。クローン化の高効率化を目指し、独自のプラスミドベクターを完成させるまでに多大な時間を費やした。現在、膜タンパク質を調製し、免疫のステップに移行している。

研究成果の概要（英文）：In this study, we succeeded to establish a cancer stem cell (CSC) clone by the innovative plasmid construct. Now, we are in the process of immunization of functional membrane proteins derived from the established CSC clone to generate a panel of monoclonal antibodies against CSCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：がん幹細胞、抗体、膜タンパク質、腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞の存在が、がん治療後の再発や転移に大きく関わってくるため、がん幹細胞を標的とする治療法の開発は緊急の課題である。そこで、がん幹細胞を標的とした治療法を開発するためには、がん幹細胞の特性を解析しなければならない。しかし、がん幹細胞は不均一ながん細胞集団に非常に少ない割合でしか含まれていないため、効率良く単離できたとしてもその解析には困難を要する。

それは、培養により純粋な細胞集団として増殖維持させることが極めて困難であるからである。代表者は、このような問題を克服するための新しい技術を提案した。そのアイデアは、同じ性質を持つがん幹細胞をクローン化し、増殖させるためのコンストラクトにある。当コンストラクトにより作成できたがん幹細胞の膜タンパク質を調製し、これを免疫すればがん幹細胞標的化抗体が得られるはずである。

2. 研究の目的

代表者発案のがん幹細胞クローニング技術を確立し、これとがん幹細胞機能性膜タンパク質回収技術を組み合わせることで、選択的がん幹細胞殺傷抗体の創出に挑戦する。期間内の達成目標は以下の通りである。

(1) クローン化がん幹細胞を作成し、膜タンパク質を調製する。

(2)、これを抗原としてマウスに免疫することで得られた抗体産生B細胞をハイブリドーマ化(株化)し、各クローンにより得られた種々多様なモノクローナル抗体から、がん幹細胞のみを選択し殺傷する性質のものをスクリーニングする。それぞれの効能は、培養細胞レベルと個体レベルで検証する。

3. 研究の方法

(1) 細胞と培地: ヒト前立腺がん細胞株 PC3 (Human cell line derived from bone metastasis of prostate gland adenocarcinoma)、ヒト乳がん細胞株 MCF7 は ATCC (Rockvill, MD) より購入した。いずれの細胞も DMEM/ F12 培地 (Gibco, Carlsbad, CA) にそれぞれ最終濃度が 10% となるように牛胎児血清 (FBS) を加えて培養した。

(2) plasmid の作製: がん幹細胞特異的プロモーターの下流に抗生剤耐性遺伝子を挿入したプラスミドベクターを独自に開発した。

(3) 機能性膜タンパク質の調整: クローン化がん幹細胞から、膜たんぱく質に富んだ出芽小胞を、Invitrogen 社の MembranePro 機能性タンパク質発現システムを用いて調製した。

(4) マウスへの免疫: 芽小胞をアジュバンドによりエマルジョン化し、マウスに免疫した。

4. 研究成果

(1) クローン化がん幹細胞樹立用コンストラクト: 単一の性質を示すがん幹細胞をクローン化し、増殖させるための新規コンストラクトの開発を行った。計画一年目でプロトタイプを作成し、その効果(がん幹細胞をク

ローン化できるかについて)を検証した。結果、限られた細胞株(前立腺がんのみ)でしか機能しないことが判明し、再度、広範囲細胞種に適応できるよう改変した。新規に作成した改変型ベクターでがん幹細胞の特性を備えた種々クローン化がん幹細胞株(前立腺がんと乳がん)を樹立できた。樹立のプロセスは以下の通りである。

遺伝子導入後、抗生剤含有培地で培養することにより1次セレクションを行った。その後、生存してきたコロニーを培養し、GFP 強陽性クローンに関して、GFP 発現を目印に FACS によるシングルセルソーティングを行った。得られた数クローンに関して、幹細胞マーカーの共通した発現を示す細胞を選別した。この一連の操作で本計画に使用する代表的クローンを選別した。

(2) クローン化がん細胞からの機能性膜タンパク質の調製: 上記の操作から選択したクローン化がん幹細胞から、膜たんぱく質に富んだ出芽小胞を、Invitrogen 社の MembranePro 機能性タンパク質発現システムを用いて調製した。具体的には、キット内の gag 遺伝子発現ベクターを本細胞にトランスフェクションすることで、培養上製中に遊離してきた出芽小胞を沈殿操作により回収した。この時、クローン化がん幹細胞は、キット内のトランスフェクション試薬では遺伝子導入効率が低いいため、幹細胞に有効な TAKARA 社の X-fect stem 試薬を用いる必要があった。

(3) 機能性膜タンパク質のマウスへの免疫: 得られた出芽小胞をアジュバンドによりエマルジョン化し、マウスに免疫した。

今後、マウス脾臓から抗体産生B細胞を単離し、ミエローマ細胞と融合させることでハイブリドーマ化し、種々のクローンを得ること、得られた抗体群に関して、CSC 特異的殺傷機能を持つ抗体をスクリーニングにより同定すること、選択抗体の機能性評価を動物モデルで検証すること、を完遂する予定である。

がん幹細胞の存在が、がん治療後の再発や転移に大きく関わってくるため、がん幹細胞を標的とする治療法の開発は緊急の課題である。このような治療法を開発するためには、がん幹細胞の特性を解析しなければならない。しかし、がん幹細胞は不均一ながん細胞集団に非常に少ない割合でしか含まれていないため、効率良く単離できたとしてもその解析には困難を要する。それは、培養により純粋な細胞集団として増殖維持させることが極めて困難であるからである。代表者は、当計画により、上記問題を克服した技術をようやく完成することができた。この技術は、今まで不可能であった分子細胞生物学的解析をも、がん幹細胞で可能とする。例えば、大量のタンパク質や mRNA が、がん幹細胞から調製可能であることより、プロテオーム解析、遺伝子マイクロアレイ解析等にも利用可能となり、本技術の完成の意義は大きいと考える。

当計画は現在も進行中であるが、本案が成功した場合、すなわち、正常分化細胞、正常幹細胞を傷害しないがん幹細胞特異的殺傷抗体が得られた場合、本方法を利用した様々な種類のヒトがんの治療にむけた抗体開発が可能となる。ヒト化-キメラ抗体作製へのさらなる移行によりその価値は計り知れない（副作用の極度な軽減や再発の改善など）。

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 16 件）

以下、全て査読あり

- ① Saito K, Sakaguchi M, Iioka H, Matsui M, Nakanishi H, Huh NH, Kondo E. Coxsackie and adenovirus receptor is a critical regulator for the survival and growth of oral squamous carcinoma cells. *Oncogene* 2013. doi: 10.1038/onc.2013.66. (in press).
- ② Yamamoto K, Murata H, Putranto EW, Kataoka K, Motoyama A, Hibino T, Inoue Y, Sakaguchi M, Huh NH. DOCK7 is a

critical regulator of the RAGE-Cdc42 signaling axis that induces formation of dendritic pseudopodia in human cancer cells. *Oncol Rep.* 29: 1073-1079, 2013.

- ③ Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, Hosoi J, Shimokata T, Ito T, Tsuboi R, Huh NH. S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cancer Res.* 73: 172-183, 2013.
- ④ Sugimoto M, Watanabe M, Kaku H, Li SA, Noguchi H, Ueki H, Sakaguchi M, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. Preclinical biodistribution and safety study of reduced expression in immortalized cells/Dickkopf-3-encoding adenoviral vector for prostate cancer gene therapy. *Int J Oncol.* 28: 1645-1652, 2012.
- ⑤ Hirata T, Watanabe M, Kaku H, Kobayashi Y, Yamada H, Sakaguchi M, Takei K, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector as a potentially effective therapeutic agent for bladder cancer. *Int J Oncol.* 41: 559-564, 2012.
- ⑥ Kataoka K, Ono T, Murata H, Morishita M, Yamamoto K, Sakaguchi M, Huh NH. S100A7 promotes the migration and invasion of osteosarcoma cells via the receptor for advanced glycation end products. *Oncol Lett.* 3: 1149-1153, 2012.
- ⑦ Kawauchi K, Watanabe M, Kaku H, Huang P, Sasaki K, Sakaguchi M, Ochiai K, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. Preclinical Safety and Efficacy of in Situ REIC/Dkk-3 Gene Therapy for Prostate Cancer. *Acta Med Okayama.* 66: 7-16, 2012.
- ⑧ Kataoka K, Du G, Maehara N, Murata H, Sakaguchi M, Huh N. Expression pattern of REIC/Dkk-3 in mouse squamous epithelia. *Clin Exp Dermatol.* 37: 428-431. 2012.
- ⑨ Jin Y, Murata H, Sakaguchi M, Kataoka

- K, Watanabe M, Nasu Y, Kumon H, Huh NH. Partial sensitization of human bladder cancer cells to a gene-therapeutic adenovirus carrying REIC/Dkk-3 by downregulation of BRPK/PINK1. *Oncol Rep.* 27: 695-699, 2012.
- ⑩ Ochiai K, Watanabe M, Ueki H, Huang P, Fujii Y, Nasu Y, Noguchi H, Hirata T, Sakaguchi M, Huh NH, Kashiwakura Y, Kaku H, Kumon H. Tumor suppressor REIC/Dkk-3 interacts with the dynein light chain, Tctex-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 412: 391-395, 2011
- ⑪ Sakaguchi M, Murata M, Yamamoto K, Ono T, Sakaguchi Y, Motoyama A, Hibino T, Kataoka K, Huh NH. TIRAP, an Adaptor Protein for TLR2/4, Transduces a signal from RAGE Phosphorylated upon Ligand Binding. *PLoS ONE*, 6: e23132, 2011.
- ⑫ Kubo T, Toyooka S, Tsukuda K, Sakaguchi M, Fukazawa T, Soh J, Asano H, Ueno T, Muraoka T, Yamamoto H, Nasu Y, Kishimoto T, Pass HI, Matsui H, Huh NH, Miyoshi S. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c plays an important role in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 17: 4965-4974, 2011.
- ⑬ Aochi S, Tsuji K, Sakaguchi M, Huh NH, Tsuda T, Yamanishi K, Komine M, Iwatsuki K. Markedly elevated serum levels of calcium-binding S100A8/A9 proteins in psoriatic arthritis are due to activated monocytes/macrophages. *J Am Acad Dermatol.* 64: 879-887, 2011.
- ⑭ Than SS, Kataoka K, Sakaguchi M, Murata H, Abarzua F, Taketa C, Du G, Yashiro M, Yanagihara K, Nasu Y, Kumon H, Huh NH. Intraperitoneal administration of an adenovirus vector carrying REIC/Dkk-3 suppresses peritoneal dissemination of scirrhus gastric carcinoma. *Oncol Rep.* 25: 989-995, 2011.
- ⑮ Murata H, Sakaguchi M, Jin Y, Sakaguchi Y, Futami JI, Yamada H, Kataoka K, Huh NH. A new cytosolic pathway from a Parkinson's disease-associated kinase, BRPK/PINK1: activation of AKT via MTORC2. *J Biol Chem.* 286: 7182-7189, 2011.
- ⑯ Du G, Kataoka K, Sakaguchi M, Abarzua F, Than SS, Sonogawa H, Makino T, Shimizu T, Huh NH. Expression of REIC/Dkk-3 in normal and hyperproliferative epidermis. *Exp Dermatol.* 20: 273-277, 2011.
- [学会発表] (計4件)
- ① 阪口政清、Identification of novel receptors for pro-inflammatory S100A8/A9 proteins and their roles in melanoma metastasis、IEIIS2012. Homeostatic Inflammation Symposium、2012年10月23日～2012年10月26日、東京
- ② 阪口政清、S100A8およびS100A9タンパク質の新規受容体の探索とそのがん進展における役割、第71回日本癌学会学術総会、2012年09月19日～2012年09月21日、札幌
- ③ 阪口政清、A Novel Tumor Suppressor, REIC/Dkk-3 Gene Identified by our in Vitro Transformation Model of Normal Human Fibroblasts Works as a Potent Therapeutic Anti-tumor Agent、2012 World Congress on In Vitro Biology (招待講演)、2012年06月03日～2012年06月07日、アメリカ、Bellevue
- ④ 阪口政清、多機能受容体 RAGE の下流信号伝達機構の解明、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日～2011年10月5日、名古屋
- [産業財産権]
- 出願状況 (計3件)
- ① 名称: NPTNβとS100A8の結合の阻害を指標とする細胞増殖抑制剤のスクリーニング方法
発明者: 阪口政清、日比野利彦、山本真実、許南浩

権利者：同上
種類：特許
番号：特願2012-204279
出願年月日：2012年09月18日
国内外の別：国内

② 名称：PINK1のユビキチンアッセイ及びスクリーニングへの利用

発明者：村田 等、阪口政清、許南浩

権利者：同上

種類：特許

番号：特許、特願 2012-165160

出願年月日：2012年07月25日

国内外の別：国内

③ 名称：アデノウイルスベクターをがん細胞に対して選択的に導入可能なポリペプチドおよび当該ポリペプチドを備えるアデノウイルスベクター

発明者：阪口政清、近藤英作、許南浩、手塚克成

権利者：同上

種類：特許

番号：特願2012-085969

出願年月日：2012年04月04日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪口 政清 (SAKAGUCHI MASAKIYO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授

研究者番号：70379840

(2) 研究分担者

片岡 健 (KATAOAKA KEN)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：10293317

村田 等 (MURATA HITOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

研究者番号：90579096

許 南浩 (HUH NAMHO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・

教授

研究者番号：70142023

(3) 連携研究者

該当無し