

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 5月20日現在

機関番号：37114

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659884

研究課題名（和文）PLAG-免疫グロブリンキメラ蛋白による抗腫瘍免疫の誘導

研究課題名（英文）Chimeric PLAG-immunoglobulin protein-induced anti-tumor immune response

研究代表者

沢 禎彦 (SAWA YOSHIHIKO)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70271666

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ポドプラニン特異抗体を開発した：①ラット抗マウスポドプラニン抗体(PMab-1)、②ラット抗ヒトポドプラニン抗体 (NZ-1.2) (MBL, Imgenex, Sigma, Millipore で販売)。これらの抗体は、マウス皮下に移植したポドプラニン陽性腫瘍細胞株の増殖を抑制し、この効果はポドプラニンペプチド免疫で増強したことから、ポドプラニンはペプチドと抗体による腫瘍の免疫療法に有用な分子である可能性が見出された。

研究成果の概要（英文）：

We developed novel rat antibodies specific for human and mouse podoplanin (NZ-1.2, PMab-1) sold by MBL, Imgenex, Sigma, and Millipore. The antibodies suppressed the growth of podoplanin positive tumor cells transplanted under mouse buccal mucosa and the effect enhanced in mice immunized with podoplanin peptide. Podoplanin may useful molecule for immunotherapy of cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学・免疫療法

1. 研究開始当初の背景

ポドプラニンは頭頸部扁平上皮癌が浸潤

領域に強く発現する。申請者らは、頭頸部の正常組織では唾液腺筋上皮と脈絡叢上皮が

ポドプラニンを発現することを、またポドプラニンの分子構造を明らかにし、自作のポドプラニン中和抗体がポドプラニン陽性腫瘍の肺転移を阻止することをマウスで示した。

2. 研究の目的

ポドプラニン陽性腫瘍細胞の頭頸部担癌マウスに対する、PLAG と免疫グロブリン G Fc のキメラ蛋白の投与が抗腫瘍効果を発揮する可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

1. マウスの免疫と抗血清の確立

1) 試料の収集

C57BL/6N の 4 週齢♀通常マウスを用いた。精製マウスポドプラニン蛋白で免疫し、抗血清を採取した。

2) 抗体価の測定

抗血清からカラム精製した抗ポドプラニン抗体について抗体価を測定した。

3) 抗体依存性細胞傷害活性の測定

収集した抗体のマウス単球系細胞を用いた抗体依存性細胞傷害活性を測定した。

2. 抗腫瘍効果の検討

1) In vitro 解析

市販の口腔扁平上皮癌細胞株 HSC3 にポドプラニン遺伝子を導入した HSC3-PDPN を用いた。マトリゲルにて培養したヒトリンパ管内皮細胞に対する HSC3-PDPN の浸潤試験とポドプラニン遺伝子特異抗体による接着阻害試験を行った。HSC3-PDPN を単球系細胞と抗ポドプラニン抗体とともに共培養して、細胞傷害の有無を組織解析により判定した。

2) In vivo 解析

・HSC3-PDPN とマウスメラノーマ B16-F10 をポドプラニンとアジュバントとともに、さらに抗ポドプラニン抗体とともに C57BL/6 マウスあるいはヌードマウス類粘膜下に移植して腫瘍の顎下リンパ節と肺転移を判定し、細胞単独移植の場合と比較した。

4. 研究成果

1. 新規抗ポドプラニン抗体の開発

マウスとヒトポドプラニンの血小板結合領域を特異的に認識する新しい抗体を開発した：①ラット抗マウス podoplanin 抗体 IgG2a (PMab-1)、②ラット抗ヒト podoplanin 抗体 IgG2a (NZ-1.2) (MBL, Imgenex, Sigma, Millipore で販売)。

Products **Wako**

脳腫瘍細胞マーカー抗体
抗ヒトポドプラニン、モノクローナル抗体
抗マウスポドプラニン、モノクローナル抗体

ポドプラニンは、Aggrus、gp44、T1α などとしても知られ、さまざまな作用が報告されている1型膜貫通型タンパク質です。細胞外領域であるN末端側には血小板凝集活性に関わるPLAGドメインを持ちます。ポドプラニンは血管内皮細胞には免疫ゼリン血管内皮細胞に発現しているためリンパ管のマーカーとして注目されている他、さまざまな腫瘍で発現が亢進され、腫瘍マーカーとしても利用が進められています。脳腫瘍においては悪性度に応じてポドプラニン発現量が増加することが報告されています。

本品は、ポドプラニンのPLAG領域を認識する抗体で、腫瘍やリンパ管のマーカータンパク質ポドプラニンを検出する他、血小板凝集活性抑制に使用することができます。

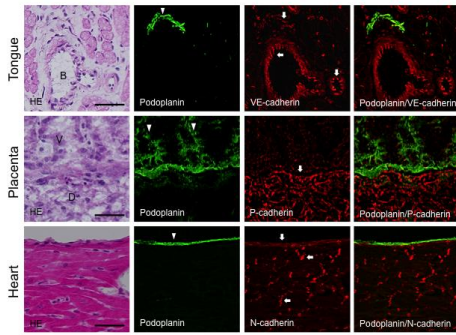
●形状：PBS(-)、0.05%アジ化ナトリウム
●抗体濃度：1mg/ml

【参考文献】
1) Kaji, C. et al.: Acta Histochem. Cytochem. in press.

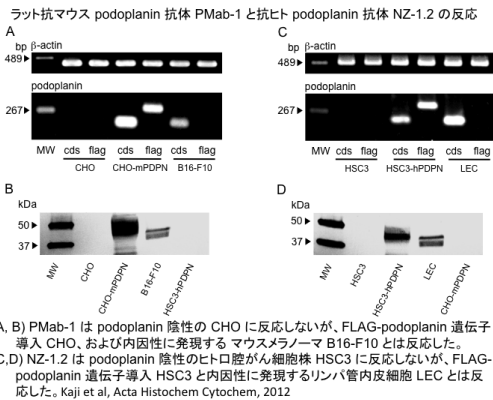
コードNo.	品名	72-79%	全動物	用途	規格	容量	希釈納入価格(円)
018-24101	Anti Human Podoplanin, Monoclonal Antibody	NZ-1.2	ラット	ELISA, WB, FC, IP, IHC	免疫化学用	100 µg	34,000
015-24111	Anti Mouse Podoplanin, Monoclonal Antibody	PMab-1	ラット	ELISA, WB, FC, IP, IHC	免疫化学用	100 µg	34,000

2. 健常個体の頭頸部正常組織における podoplanin の発現

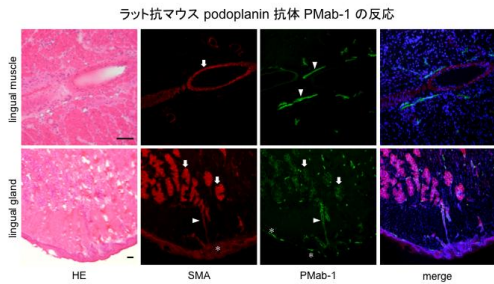
頭頸部におけるポドプラニン発現細胞は、唾液腺筋上皮、歯胚上皮と象牙質形成期の象牙芽細胞、神経周皮細胞および脈絡叢上皮と軟膜であることがわかった。



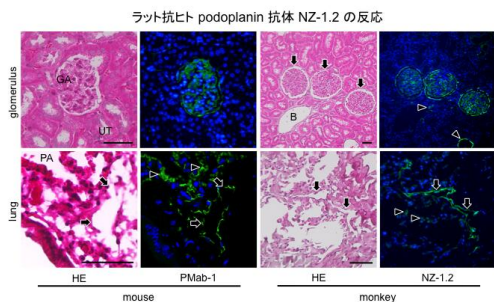
抗 podoplanin 抗体 (矢頭) は舌リンパ管、胎盤絨毛、心外膜と反応し、交叉反応は見られない。抗 cadherin 抗体 (矢) との反応は VE-cadherin が血管内皮で、またリンパ管で弱く、P-cadherin が脱落膜で、さらに N-cadherin が心外膜と介在板で見られる。血管 (blood vessels, B)、絨毛 (villus, V)、脱落膜 (decidua, D)。Bar: 50 μm. (Kaji et al., J Anat., 2010)



A, B) PMab-1 は podoplanin 陰性の CHO に反応しないが、FLAG-podoplanin 遺伝子導入 CHO、および内因性に発現する マウスメラノーマ B16-F10 とは反応した。C, D) NZ-1.2 は podoplanin 陰性のヒト口腔がん細胞株 HSC3 に反応しないが、FLAG-podoplanin 遺伝子導入 HSC3 と内因性に発現するリンパ管内皮細胞 LEC とは反応した。Kaji et al, Acta Histochem Cytochem, 2012



PMab-1 はマウスリンパ管と唾液腺筋上皮に反応した。Kaji et al, Acta Histochem Cytochem, 2012



NZ-1.2 は免疫源の FLAG 含有ペプチドのアミノ酸配列が同じであるサルにおいて、腎系球体と肺上皮・肺リンパ管に反応した。Kaji et al, Acta Histochem Cytochem, 2012

3. 新規に作製した抗ポドプラニン抗体とポドプラニタンパクによる癌ワクチン効果

1) In vitro 解析

ヒトリンパ管内皮細胞に対する HSC3-PDPN のインベーションアッセイでは、接着と浸潤が HSC3 より有意に増大し、且つポドプラニン特異抗体によって阻害された。B16-F10 と HSC3-PDPN を単球系細胞と抗ポドプラニン抗体とともに共培養した結果、細胞傷害が見られた (投稿準備中)。

2) In vivo 解析

マウス頬粘膜下に移植した HSC3-PDPN と B16-F10 の抗ポドプラニン抗体 NZ-1.2, PMab-1 による肺転移阻止効果が見られた。この効果はポドプラニンとアジュバント投与で増強した (投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者・分担者に下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

1. Noda Y, Sawa Y. Immunohistochemical examination on the distribution of cells expressed lymphatic endothelial marker podoplanin and LYVE-1 in the mouse tongue tissue. Acta Histochem Cytochem 2010;43:61-68
2. Hata, Tsuruga E, Sawa Y. Immunoelectron microscopic study of podoplanin localization in mouse salivary gland myoepithelium. Acta Histochem Cytochem 2010;43:77-82.
3. Imaizumi Y, Tsuruga E, Sawa Y. Immunohistochemical examination for the distribution of podoplanin-expressing cells in developing mouse

- molar tooth germs. *Acta Histochem Cytochem* 2010;43:115-121.
4. Yamauchi Y, Tsuruga E, Sawa Y. Ishikawa H. Fibulin-4, and -5, but not Fibulin-2, are associated with tropoelastin deposition in elastin-producing cell culture. *Acta Histochem Cytochem* 2010; 43:131-138.
 5. Nakatomi Y, Tsuruga E, Sawa Y. EMILIN-1 regulates the amount of oxytalan fiber formation in periodontal ligaments in vitro. *Connect Tissue Res* 2011;52:30-35.
 6. Nakashima K, Tsuruga E, Sawa Y. Stretch stimuli increase fibulin-5 /EMILIN-1 complex on oxytalan fibers in human periodontal ligament cells. *Orthodontic Waves* 2011;70:15-20.
 7. Kaneko MK, Sawa Y, Kato Y. Establishment of a novel monoclonal antibody SMab-1 specific for IDH1-R132S mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 406:608-613.
 8. Hatakeyama Y, Oka K, Tsuruga E, T, Sawa Y. The effect of valproic acid on mesenchymal pluripotent cell proliferation and differentiation in extracellular matrices. *Drug Target Insights* 2011;5:1-9.
 9. Yahiro J, Sawa Y. Immunohistochemical and Immunocytochemical Localization of Amylase in Rat Parotid Glands and von Ebner's Glands by Ion Etching-Immunoscanning Electron Microscopy *Acta Histochem Cytochem* 2011;44:201-212.
 10. Amano I, Sawa Y. Expression of podoplanin and classical cadherins in salivary gland epithelial cells of klotho-deficient mice, *Acta Histochem Cytochem* 2011;44:267-276.
 11. Hatakeyama Y, Oka K, Tsuruga E, Sawa Y. Growth Differentiation Factor 5 induces matrix metalloproteinase 2 expression in periodontal ligament cells and modulates MMP-2 and MMP-13 activity in osteoblasts. *Bone and Tissue Regeneration Insights* 2011;4:1-10.
 12. Kaji C, Kato Y, Sawa Y. The expression of podoplanin and classic cadherins in the mouse brain. *J Anat* 2012;220:435-446.
 13. Yamanouchi K, Tsuruga E, Oka K, Sawa Y. Fibrillin-1 and fibrillin-2 are essential for formation of thick oxytalan fibers in human nonpigmented ciliary epithelial cells in vitro. *Connect Tissue Res* 2012;53:14-20.
 14. Nakatomi Y, Tsuruga E, Sawa Y. Intracellular interaction of EMILIN-1 with fibrillin-1 in human periodontal ligament cells. *Orthodontic Waves* 2012;71:66-69.
 15. Tsuruga E, Oka K, Hatakeyama Y, Sawa Y. Latent transforming growth

- factor- β binding protein 2 negatively regulates coalescence of oxytalan fibers induced by stretching stress. *Connect Tiss Res* 2012;53:521-527.
16. Kaji C, Tsujimoto Y, Kaneko, MK, Kato Y and Sawa Y. Immunohistochemical examination of novel rat monoclonal antibodies against mouse and human podoplanin. *Acta Histochem Cytochem* 2012;45:227-237.
17. Kaneko MK, Sawa Y, Kato Y. A chimeric anti-podoplanin antibody suppresses tumor metastasis via neutralization and antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Sci* 2012;103:1913-1919.
18. Oka K, Tsuruga T, Hatakeyama Y, Sawa Y. Roles of collagen and periostin expression by cranial neural crest cells during soft palate development. *J Histochem Cytochem* 2012;60:57-68.
19. Oka K, Sawa Y. Cellular turnover in epithelial rests of Malassez in the periodontal ligament of the mouse molar. *Eur J Oral Sci* 2012;120:484-494.
20. Nishimura S, Sawa Y. Risk factors to cause tooth formation anomalies in chemotherapy of paediatric cancers. *Eur J Cancer Care*, 2013;22:353-360.
21. Takata S, Sawa Y. Expression of Toll-Like Receptor 4 in Glomerular Endothelial Cells under Diabetic Conditions. *Acta Histochem Cytochem* 2013;46:35-42.
22. Uchiyama, Sawa Y. Altered dynamics in the renal lymphatic circulation of type 1 and type 2 diabetic mice. *Acta Histochem Cytochem* 2013;46:97-104.
- (総説)
1. Sawa Y. New trends in the study of podoplanin as a cell morphological regulator. *Japanese Dental Science Review* 2010;46:165-172.
- [図書] (計 2 件)
1. 沢 (分担)、臨床免疫・アレルギー サイトカインのすべて、科学評論社 292-295
2. 沢 (分担)、ネッター頭頸部・口腔顎顔面の臨床解剖アトラス、医歯薬出版社 399-492
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- ・ 沢 禎彦 (SAWA YOSHIHIKO)
- 福岡歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：70271666
- (2) 研究分担者
- ・ 加藤幸成 (KATO YUKINARI)
- 東北大学・医学部・教授
研究者番号：00571811
- ・ 谷口邦久 (TANIGUCHI KUNIHISA)
- 福岡歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：90105685
- ・ 敦賀英知 (TSURUGA EICHI)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：30295901

・ 畠山雄次 (HATAKEYAMA YUJI)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：40302161

・ 岡暁子 (OKA KYOKO)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60452778