

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890172
 研究課題名（和文） 低酸素状態の乳癌特異的抗体を用いた高感度体液診断法および遺伝子治療法の開発
 研究課題名（英文） Development of gene therapy and sensitive diagnostic method using an antibody for hypoxic breast cancer.
 研究代表者 濱 進 (HAMA SUSUMU)
 京都薬科大学・薬学部・助教
 研究者番号：60438041

研究成果の概要：

低酸素状態の癌は、浸潤・転移の支配要因になると考えられている。そこで、このような低酸素状態の乳癌に対する抗体を用いた診断法および治療法を開発するために、H19年度は遺伝子導入に有効な7種のモノクローナル抗体を樹立し、H20年度は、体液診断に有効な2種のモノクローナル抗体を樹立した。これらの抗体の中には、低酸素状態の癌に結合性の高い抗体および正常酸素状態の癌に結合性の高い抗体があり、治療・診断のデバイスとして有効であると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：乳癌、低酸素、抗体

1. 研究開始当初の背景

現在の疾患別死亡率で上位を占める癌は、従来均一な細胞群として捉えられてきた。しかし、近年癌は間質、血管を含む複雑な組織であり、刻々と変化する物理的環境にも対応する為に、個性を持った集団を形成して、増殖・転移をもたらすことが明らかになりつつあり、予後不良の主要な原因の一つであると考え

られている。このような厄介な癌に対抗する為には、微小環境により制御された「癌細胞の顔を知ること」と「顔を狙い撃ちすること」の両方が必要であり、分子標的治療および分子診断システムの早急な開発が期待されている。

しかし、腫瘍自身の有効な抗原は未だに少なく、現在乳癌に対してHER2特異的抗体のトラスツズマブが臨床応用されているが、適用が限定されているこ

と、および予後不良であることが問題であり、新規の標的抗原の同定が求められている。

そこで、難治性の癌に対する治療・診断システムを構築する為に、固形腫瘍特異的な低酸素状態に着目した。固形腫瘍は増殖に伴い腫瘍内酸素が低下し、サイトカインの放出を介した血管およびリンパ管新生を促進する（パラクリン作用）だけでなく、がん細胞自身の増殖・浸潤を活性化することにより（オートクリン作用）、転移の支配要因になり得る。また、現在の低侵襲性の主要な治療方法である放射線治療および化学療法においても低酸素状態の癌は抵抗性を示す為（放射線治療：酸素効果の低下、化学療法：薬物排出トランスポーターの発現）、主要な再発原因の一つである。これまで低酸素状態の癌を克服する為に、hypoxia inducible factor (HIF) を標的とした研究が一定の成功を収めているが、治療・診断への凡用性の高い表面分子に関する研究は少数にとどまる。

上述の背景のもと、代表者は腫瘍の増殖に有利に働く微小環境を利用し、より生体内環境に即した癌自身を標的とした治療・診断法を開発する為に、低酸素培養した癌細胞で免疫することにより、低酸素状態の癌に特異的な抗体を作製することを着想した。

2. 研究の目的

がん微小環境モデル（がん細胞の低酸素培養系）を用いて、低酸素刺激によりダイレクトおよびオートクリン作用を介してインダレクトにより発現する、がん細胞自身の新規表面分子の同定および特異的なモノクローナル抗体をし、作製したモノクローナル抗体の臨床応用を目指して、標的化治療または診断の為にデバイスとしての有効性についての検討も併せて行うことである。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子治療に有望な低酸素状態の乳癌特異的な抗体の樹立

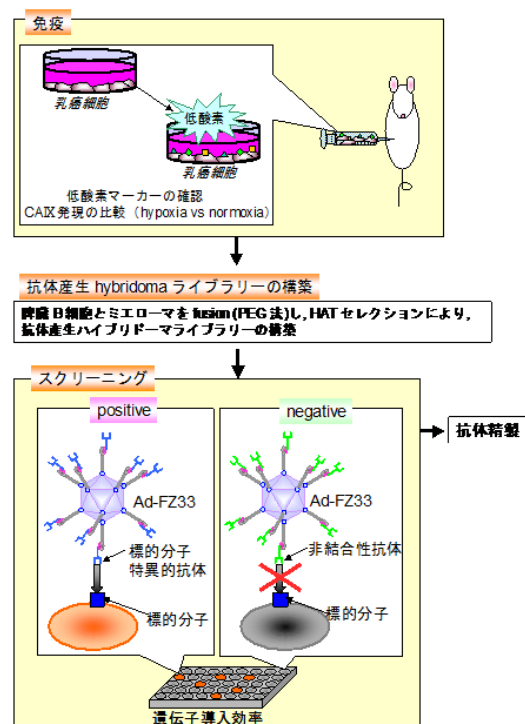
①免疫に用いる低酸素状態の乳癌細胞の特性

低酸素培養した乳癌細胞（MCF-7）の低酸素刺激状態を確認するために、HIF の発現をウエスタンブロッティングにより解析し、正常酸素培養した乳癌細胞の発現と比較した。また、低酸素マーカーの膜タンパク質である

carbonic anhydrase IX の発現をフローサイトメトリーにて確認し、正常酸素培養した乳癌細胞と比較した。さらに、低酸素刺激した乳癌細胞が、低酸素状態の乳癌細胞の特性を示すのか否かを確認するために、オートクリン作用については、低酸素培養した細胞の増殖を wst-1 アッセイにより、パラクリン作用については、低酸素培養した乳癌細胞の培養上清を微小血管内皮細胞または微小リンパ管上皮細胞に添加し、それらの増殖を wst-1 アッセイにより評価した。

②低酸素刺激細胞のマウスへの免疫およびハイブリドーマ・ライブラリーの構築

低酸素刺激細胞を Balb/c マウス に 4 回免疫し、免疫マウスの脾細胞とミエローマ細胞（P3U1）を PEG 法を用いて細胞融合した。得られたハイブリドーマを HAT 含有培地で培養を行うことにより、低酸素状態の乳癌特異的なモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ・ライブラリーを作製した（図 1）。

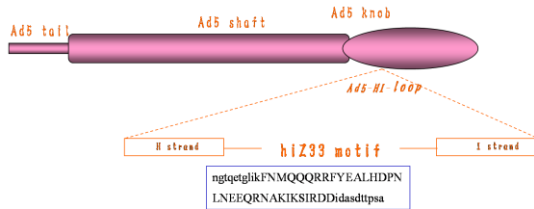


[図 1. 抗体樹立の方法]

③スクリーニング

遺伝子導入用の抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングするために、Ad-FZ33 を用いた。この Ad-FZ33 はアデノウイルスの細胞への結合部位である ファーバーに抗体の Fc ドメインに結合する Protein A の Z33 モチーフを含むファイバー変異型であり、モノクローナル抗体とウイルスとの架橋を介して、標的分子特異的に遺伝子導入を行うことができる（図 2）。

具体的には、正常酸素または低酸素培養した乳癌細胞 (MCF-7) に、抗体を含むハイブリドーマ上清を添加し、洗浄後、続いて Ad-FZ33 を添加し、一定時間後のレポーター遺伝子 (LacZ) の発現を指標として、低酸素状態の乳癌特異的な抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングを行った (図1)。



[図2. Ad-FZ33 の構造]

Adenovirus 5 (Ad5)は宿主細胞の受容体と fiber の結合を介して細胞内に取り込まれる。一方, fiber に抗体の Fc ドメインに結合する ProteinA の Z33 モチーフを含む fiber 改変型 adenovirus (Ad-FZ33)は抗体とウイルスとの架橋を介して、膜表面の抗原依存的に細胞に結合し、遺伝子を発現する。

(2) 体液診断に有望な低酸素状態の乳癌特異的抗体の樹立

① 抗体産生ハイブリドーマ・ライブラリーの構築

(1) の ② と同様に行った。

② スクリーニング

体液診断用の抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングするために、低酸素状態または正常酸素状態の乳癌細胞への抗体の結合性をフローサイトメトリーを用いて検討を行った。

具体的には、正常酸素または低酸素培養した乳癌細胞 (MCF-7) に、抗体を含むハイブリドーマ上清を添加し、洗浄後、蛍光標識した抗マウス抗体を添加し、FACS により得られる蛍光強度を指標として、スクリーニングを行った。

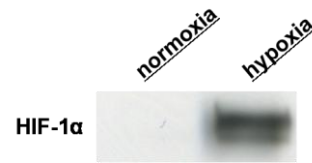
4. 研究成果

(1) 低酸素状態の乳癌細胞の特性

① HIF-1 発現の確認

免疫に用いる低酸素刺激した乳癌細胞の低酸素状態を確認するために、HIF-1 の発現をウエスタンブロッティングにより解析した。その結果、正常酸素状態で培養した細胞では、全く HIF-1 発現は認められなかったのに対して、低酸素培養した細胞においては、HIF-1 発現が顕著に認められた (図3)。

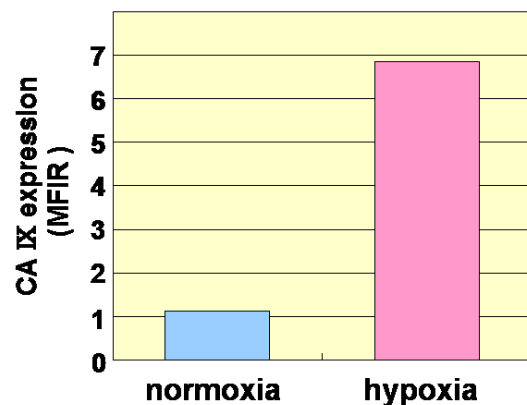
このことから、本研究課題で用いた低酸素培養条件は適切であり、従来より報告されていたように、正常酸素培養においては、HIF タンパク質の安定性が低いことを支持するものである。



[図3. HIF-1 発現の確認]

②低酸素マーカーCAIX 発現の確認

本研究課題では、標的化治療および体液診断において有用である膜タンパク質に対する抗体を樹立することが目的であるため、低酸素刺激によって誘導される膜タンパク質である CAIX の発現をフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、正常酸素培養に比べて、低酸素培養した細胞では、CAIX 発現が約7倍増大した (図4)。このことから、本研究で用いた低酸素培養条件において、膜タンパク質の低酸素マーカーの発現誘導が確認できた。また、CAIX 発現は72時間以上の発現増大が認められており、各膜タンパク質の安定性に依存するが、CAIX と同程度の安定性を示す膜タンパク質に対する抗体の樹立においては問題がないと考えられる。



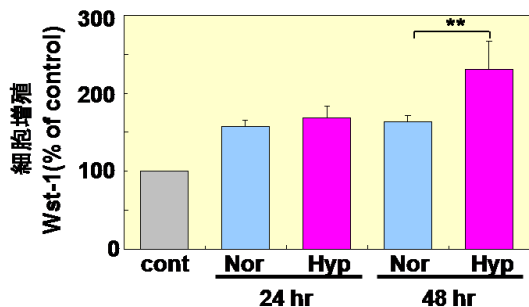
[図4. CAIX 発現の確認]

③低酸素培養した乳癌細胞のオートクリン・パラクリン作用

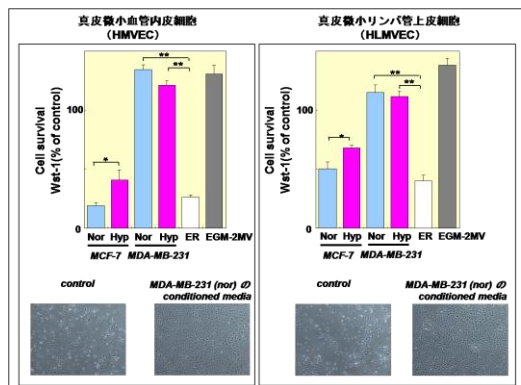
低酸素培養した乳癌細胞の特性を検討するために、オートクリン作用およびパラクリン作用について、各々乳癌細胞の増殖および低酸素培養した癌細胞の培養上清で刺激した内皮細胞の増殖を評価した。

その結果、低酸素培養した MCF-7 細胞において、正常細胞に比べて、有意な細胞増殖の増大が認められた (図5)。また、低酸素培養した MCF-7 細胞の上清を添加した微小血管内皮細胞または微小リンパ管上皮細胞は、非

添加の場合と比べて、有意な細胞増殖作用を示した。一方、低酸素刺激に対して応答性の低いMDA-MB-231細胞では、培養上清の添加の有無に関わらず、顕著な細胞増殖作用を示した(図6)。このことは、血管内皮およびリンパ管上皮細胞の増殖に関与する血管増殖因子(VEGF)量によるものと考えられ、低酸素応答性の高いMCF-7細胞では、低酸素刺激により培地中に分泌されるVEGF量が増大するのに対して、非応答性のMDA-MB-231細胞では、低酸素刺激の有無に関わらず、培地中のVEGF量は顕著に高かった。本研究課題で用いたMCF-7細胞は、オートクリンおよびパラクリン作用を有し、低酸素環境を反映した細胞応答を示すため、低酸素刺激したMCF-7細胞は、低酸素状態の乳癌に対する抗体を樹立する上で、免疫原として適していると考えられる。



[図5. 低酸素刺激によるオートクリン作用]



[図6. 低酸素刺激によるパラクリン作用]

(2) 遺伝子治療用の抗体の樹立

遺伝子治療を成功に導くためには、標的細胞の核内に効率的に核酸を導入することが大きな鍵を握る。本研究課題では、特に標的化および細胞内導入に優れた抗体を樹立するために、細胞内動態、すなわちエンドソーム脱出および核内移行性に優れたアデノウイルスに着目した。スクリーニングに用いたアデノウイルス(Ad-FZ33)は、その細胞内結合部位に抗体結合配列を付加されており、レポーター遺伝子の発現を指標とすること

により、細胞内動態の効率を無視し、標的細胞への結合および細胞内導入に優れた抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングすることができる。低酸素刺激したMCF-7細胞へ抗体産生ハイブリドーマの上清を添加し、Ad-FZ33によるスクリーニングを行った結果、約20倍高い遺伝子発現効率を示す7種の抗体産生ハイブリドーマを得ることができた。しかし、これらの抗体は、正常酸素培養した細胞に対しても高い遺伝子発現効率を示し、両培養条件下での著しい違いは認められなかった。本研究課題で樹立した抗体は低酸素細胞への特異性に欠けるものの、乳癌細胞に対して高い応答性を示し、細胞内への導入にも優れていることから、今後、抗原同定を行い、新規の乳癌標的分子であるのか、否か検討を行う予定である。また、細胞内導入に優れていることから、エピトープ解析を行い、細胞内導入活性配列を見出し、新規の細胞内導入デバイスとして有効性を見出す予定である。

(3) 体液診断用の抗体の樹立

血液、唾液などの体液を用いた診断法において、特異的抗体を用いたELISAベースの診断法が主流である。しかし、診断に有効な分子およびその特異的抗体が少ないことがネックとなっている。そこで、本研究では特に標的細胞の膜タンパク質への抗体の結合性に着目し、抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングをフローサイトメトリーを用いて行った。低酸素刺激細胞および正常酸素刺激細胞に対して、ハイブリドーマ上清を添加し、各々に対する結合性を蛍光強度を指標として比較した結果、2種のモノクローナル抗体を樹立することができた。1つは低酸素刺激細胞に対して強く結合するものであり、もう1種は、正常細胞に強く結合するものであった。両抗体の抗原同定は現在進めているが、これらの抗体は低酸素刺激により発現増大または発現低下する膜タンパク質である可能性が高く、診断用分子として有望であると考えられる。また、低酸素刺激において発現増大する分子が着目されがちであるが、本研究課題で得られたような発現の低下する分子にも着目することで、診断用分子の同定だけでなく、低酸素誘導性の癌進展メカニズムを明らかにする鍵となる可能性が考えられる。

以上、本研究課題において、9種の抗体産生ハイブリドーマを得ることができ、その中でも、2種は低酸素刺激細胞および無刺激細胞間で異なる結合性を示したことから、今後、抗原同定を進め、遺伝子治療および診断用デバイスとしての有効性の検討を行いたいと考えている。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱 進 (HAMA SUSUMU)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60438041

(2) 研究分担者

該当なし。

(3) 連携研究者

該当なし。