

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07713

研究課題名(和文)細胞膜タンパクSdc4を標的とした癌幹細胞の診断と治療

研究課題名(英文)Diagnosis and therapy for cancer stem cells by targeting membranous Sdc4

研究代表者

呉 しん (Wu, Xin)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：00764739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：新たに取得したSdc4モノクローナル抗体に微小管阻害剤MMAEを結合させたADC (antibody drug conjugate) は癌幹細胞モデル細胞に著効したが、正常の膵管上皮細胞や腎近位尿細管上皮細胞には細胞障害を与えなかった。膵臓癌細胞由来のCSCモデル細胞を皮下移植した担癌マウスを用いて治療実験を行ったところ、ADC抗体投与群では肉眼的に腫瘍は消退し、組織学的にも腫瘍細胞は認められず癌幹細胞の根治が達成された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌幹細胞は癌の根源であり、その駆除が究極の癌治療と考えられている。しかし、放射線や抗癌剤など各種の治療抵抗性の癌幹細胞を全滅させることは容易ではなくこれまでに実現されていない。本研究課題の中で私達は独自に作成したモノクローナル抗体によって、マウス実験で癌幹細胞モデル細胞を移植した皮下腫瘍を消滅させ、組織検索でも癒痕化させることに成功した。この結果は、癌幹細胞の治療開発に大きな意義があり、癌の根治の可能性を切り拓くもので、その医学的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We obtained a monoclonal antibody detecting the Sdc4 protein. By conjugating MMAE antimicrotubule agent to the antibody, a potent anti-tumor effect to cancer stem model cells was observed, but it was not found to normal epithelial cells of pancreatic duct and renal uriniferous tubule although both normal cells expressed high levels of Sdc4 protein. Finally in vivo therapeutic experiments using mice bearing tumors derived from pancreatic cancer stem cells showed histologically complete remission by treatment of the ADC. This antibody is a promising agent that may cure cancers.

研究分野：歯学、医工学

キーワード：癌幹細胞 モノクローナル抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌組織は自己複製能や多分化能を有し、子孫の細胞を作り続ける少数の細胞集団(癌幹細胞)と最終的に腫瘍形成能を失う細胞集団(非癌幹細胞)の二群からなる。現在臨床で行われている抗癌剤治療や放射線治療によって非癌幹細胞は死滅するが、治療抵抗性を示す癌幹細胞集団は生き残り、これが後に癌の再発や転移をきたす。従って、「癌幹細胞を標的」とした治療剤の研究開発は究極の癌治療であるが、未だ有効な治療法の開発には至っていない。

2. 研究の目的

本研究課題では(1)癌幹細胞に対して新規癌幹細胞遺伝子 Sdc4 がどのような機能を賦与するのかそのメカニズムを解明すること、(2)Sdc4 の蛋白発現を細胞株と臨床サンプルで調べて癌診断マーカーとしての意義を明らかとすること、(3)Sdc4 を標的とした抗体、核酸を作製すること、を目的として、診断・治療の両面から癌の根治を目指す。

3. 研究の方法

Sdc4 の癌幹細胞における役割を明らかとする。Sdc4 の下流にあるシグナル伝達系が正常細胞、非癌幹細胞と、癌幹細胞で各々どの程度に活性化されているかをウエスタンブロットによって検討する。

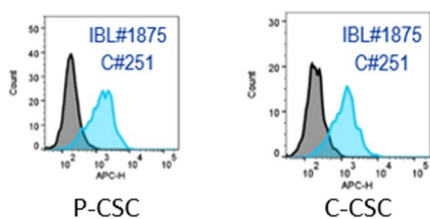
Sdc4 の発現を細胞株と臨床サンプルで確認して癌幹細胞並びに癌細胞の診断マーカーとしての意義を明らかとする。

Sdc4-siRNA、抗 Sdc4 抗体を作用させ、非癌細胞、癌幹細胞への細胞殺傷効果を検討する。各種の抗腫瘍剤との併用効果について検討する。

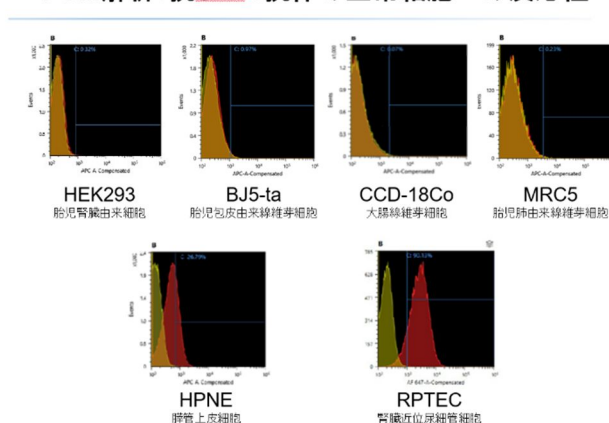
癌幹細胞モデル細胞をヌードマウスの皮下に移植し Sdc4 抗体、及び Sdc4-siRNA による治療実験を行う。Sdc4-siRNA の in vivo デリバリーはこれまで初期の研究で使ってきたスーパーアパタイトの進化型である iNaD を用いる。

4. 研究成果

FACS での Sdc4 の発現は 1-10 個の細胞で腫瘍を造る Panc1 由来の癌幹細胞モデル細胞 (P-CSC)、あるいは臨床の転移性大腸癌由来の癌幹細胞(C-CSC)で高く、一方、正常細胞では膀胱上皮細胞 HPNE や腎臓近位尿細管細胞 RPTEC での発現がみられ、HEK293 や MRC5 は Sdc4 を発現していなかった。

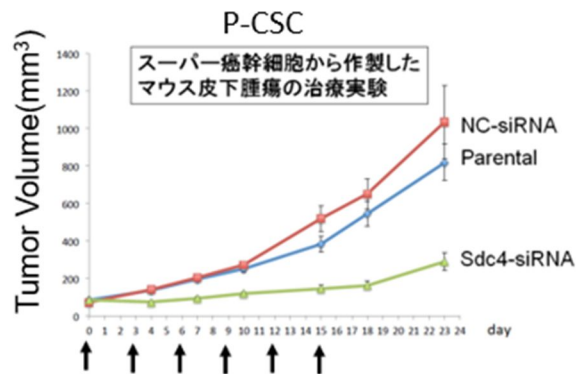


FCM解析: 抗Sdc4抗体の正常細胞への反応性



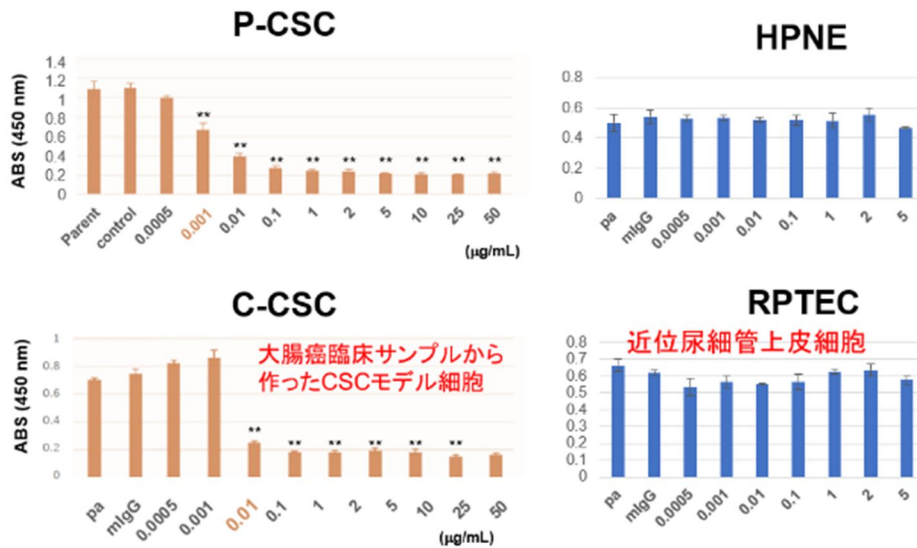
Sdc4 に対する siRNA を独自に 7 種類作成し、そのうち二つの siRNA#6, #7 が濃度依存性に Sdc4 発現を効率よく阻害した。これらの核酸による Sdc4 阻害は P-CSC や C-CSC を死滅させたが正常細胞には影響を与えなかった。

P-CSC を用いてマウス癌幹細胞治療モデルを作成し、iNaD デリバリー技術を用いた Sdc4-siRNA の血中投与により明らかな皮下腫瘍の増殖抑制効果がみられた。



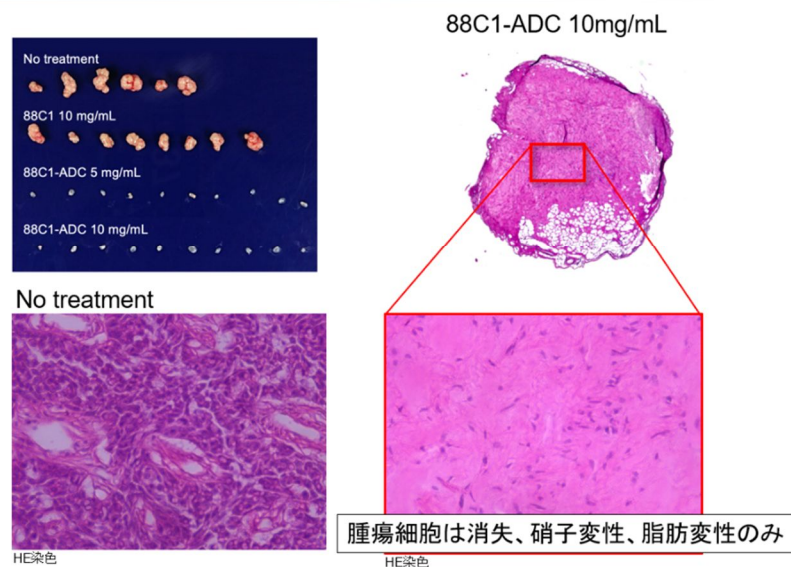
転移性大腸癌由来の癌幹細胞モデル細胞 C-CSC に対して既存の治療薬(オキサリプラチン、ラパマイシン、Wnt 阻害剤)では *in vitro* 増殖抑制効果はみられなかったが、Sdc4-siRNA との併用によって WST-8 アッセイで測定した生細胞活性は 20%程度に大幅に低下した。このことは、Sdc4 が治療抵抗性に関与していることを示唆する。

Sdc4 は膜蛋白であることから、モノクローナル抗体の作製を試みた。約 200 種類のモノクローナル抗体を作成し、これらの抗体が人工的に過剰発現させた正常の Sdc4 細胞外ドメインに反応することを確認した。この中で正常細胞には反応せず、癌幹細胞モデルに反応する抗体を FACS で繰り返し探索した結果、6 種類の抗体が得られた。多くの抗体は正常の Sdc4 蛋白には反応するにもかかわらず、癌幹細胞モデルに反応したものは僅かであったことから、癌幹細胞で発現する Sdc4 は単に正常 Sdc4 の過剰発現ではなく、何らかの構造的な相違があると考えられた。更にクローニングを繰り返して最終的に 2 種のモノクローナル抗体を取得した。これらの抗体は可変領域の Light chain は同じ配列であったため Sdc4 蛋白に対する認識性能は実質的に同じと考えられる。この抗体を蛍光標識して細胞への取り込みを経時的にモニターすると、1 時間から細胞に取り込まれ 6 時間でピークに達した。この抗体は、mTOR, AKT, p38 などの生存シグナル分子を低減させたが、Sdc4-siRNA と異なり抗体単独での細胞障害性は限定的であったので、抗体に微小管阻害剤 MMAE を結合させた ADC としての性能を評価した。その結果、P-CSC や C-CSC には 50ng/ml 程度の抗体濃度で高い細胞障害性を示す一方で、正常細胞の中で Sdc4 を高発現する膵管上皮細胞や腎近位尿管上皮細胞では 5000ng/ml でも細胞障害性を与えなかった。



癌幹細胞由来の担癌マウスの治療実験を行ったところ、コントロール群では21日の間、腫瘍の増大がみられたが、ADC 抗体投与群では低濃度群(5mg/mL)、高濃度群(10mg/mL)共に肉眼的に腫瘍は消退し、組織学的にも腫瘍細胞は認められず、脂肪変死と線維芽細胞の核が散在する硝子変性に置換されていたことから癌幹細胞の根治が達成された。

88C1-ADCは癌幹細胞 (P-CSC)由来のマウス腫瘍を根治させた



正常膀胱細胞 HPNE と P-CSC とで細胞染色を行うと、IBL 社のポリクローナル抗体では両者ともに強い Sdc4 蛋白発現が細胞質に観察された。一方、作成したモノクローナル抗体では P-CSC は強い Sdc4 蛋白発現を認めたのに対し、HPNE での Sdc4 蛋白発現は僅かであった。この傾向は他の正常細胞でもみられた。

パラフィン包埋した癌組織切片での Sdc4 蛋白発現には IBL 社またはシグマ社の抗体が最も強く Sdc4 蛋白を検出した。例えばこれらの抗体で染色すると正常の大腸粘膜もかなり強く Sdc4 を発現し、大腸癌細胞も同程度に染色された。一方、新たに作成したモノクローナル抗体は癌での特異性が高く、正常粘膜での発現は低レベルであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 浩文 (Yamamoto Hirofumi) (30322184)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関