

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590593

研究課題名(和文) 新しい腫瘍マーカーMK-1の癌の診断と治療における有用性の検討

研究課題名(英文) Study on the Usefulness of the Novel Tumor Marker MK-1 in the Diagnosis and Therapy of Cancer

研究代表者

黒木 政秀 (KUROKI MASAHIDE)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40122692

研究成果の概要(和文)：MK-1測定用のELISAを確立した結果、癌患者の血清MK-1陽性率は他のマーカーに比べ低いが、疾患によっては有用であった。また、本研究室で作製したヒト抗MK-1モノクローナル抗体M13-57は、ヒト補体やヒトNK-LAK細胞との組み合わせで抗腫瘍効果を示し、その単鎖抗体57scFvとCD28/CD3 $\zeta$ からなるキメラT細胞レセプターを発現したT細胞は、MK-1発現癌細胞で活性化され、癌の免疫療法や遺伝子療法に有用と思われた。

研究成果の概要(英文)：Using the ELISA for MK-1, we found that MK-1 is useful for some malignant tumors. A human monoclonal anti-MK-1 antibody, M13-57, revealed antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity against MK-1-expressing cells, suggesting that this antibody may be useful for antibody-based therapy of cancer. Also, a chimeric T-cell antigen receptor consisting of M13-57 scFv, CD28 and CD3  $\zeta$  induced a wild-type T-cell receptor-like molecular event upon MK-1 binding, suggesting that this may be useful for cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：癌、免疫学、バイオテクノロジー、モノクローナル抗体、MK-1

## 1. 研究開始当初の背景

1993年、本学の渡辺らは、ヒトの胃の低分化腺癌を免疫原として新しいモノクローナル抗体FU-MK-1を作製開発し、その認識する新しい腫瘍マーカーMK-1が、消化器癌をはじめとするほとんどの腺癌に存在することを免疫組織化学的に証明した。その後我々は、このMK-1が分子量約4万の膜貫通型の糖蛋白であることを明らかにするとともに、新たなマウスおよびヒト抗MK-1モノ

クローナル抗体を作製し、MK-1が癌の診断と治療に有用である可能性を示唆してきた。

一方、我々自身の遺伝子解析により、MK-1は、CEA, AFP, TSP, CA19-9, CA125, CA72-3, CA-50, CA15-3など臨床的に既に利用されているいずれの腫瘍マーカーとも違うことを証明するとともに、17-1AやGA733-2などと命名されている抗原と類似するものであることも明らかになった。その17-1Aでは、マウス抗体による免疫療法の有

用性が証明されており、我々の結果を裏付けている。また、MK-1 は細胞接着分子としての機能も有しており、我々の解析で癌の転移にも関係する物質であることも明らかになっている。しかしながら、このMK-1 は、細胞から遊離したあとは極めて易分解性で精製することが極めて困難であり、その測定系の開発は我々を除いて誰も成功していない。また、分子標的としてのMK-1 に対する完全ヒト型モノクローナル抗体の開発の報告も本教室を除いて、まだ誰も成功していないのが現状である。

## 2. 研究の目的

(1) 確立した腫瘍マーカーMK-1 のイムノアッセイ系による血中MK-1 の癌の診断における有用性を検討する。

(2) MK-1 抗原を標的分子にした癌の免疫療法におけるヒト型抗MK-1 モノクローナル抗体の有用性を検討する。

(3) MK-1 抗原を標的分子にした癌の遺伝子療法におけるヒト型抗MK-1 モノクローナル抗体の有用性を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) MK-1 の癌の診断における有用性の解析  
BioVender Laboratory Medicine, Inc. との共同で確立したMK-1 のイムノアッセイ・キット (Human MK-1 ELISA) を用いて、各種癌患者の血中MK-1 レベルを測定する。各種癌患者血清は本大学病院の臨床各科との協力で、患者の同意を得て採血収集する。現時点では、確立したイムノアッセイは用手法で酵素法であり、既存の設備機器で測定可能である。また、これまでに調べていない癌におけるMK-1 の免疫組織化学的検索も進めるとともに、MK-1 発現癌細胞のMK-1 抗体による分離同定法の確立も試みた。

(2) MK-1 の免疫療法における有用性の解析

MK-1 発現癌細胞 (ヒト胃癌細胞株 MKN-45) を標的とし、ヒト抗MK-1 モノクローナル抗体とヒト補体やヒトNK-LAK細胞との組み合わせによる抗腫瘍効果を、教室で確立した簡便なMTTアッセイ法で解析する。また、抗体による癌細胞のアポトーシス誘導を、断片化流出DNAのヨウ化プロピウム (PI) 蛍光染色法や断片化DNAのTdT/ビオチン化dUTP/アビジン-フィコエリトリン (PE) 蛍光染色法によるFACS解析で確認する。

(3) MK-1 の免疫遺伝子療法における有用性の解析

MK-1 特異的な抗体を産生するハイブリド

ーマより、ヒト抗体のH鎖およびL鎖のV領域を挟むプライマーを用いて、ヒト抗体V領域遺伝子を単離する。単離したH鎖およびL鎖のV領域遺伝子をリンカーで挟んで結合し、単鎖抗体遺伝子を作製し、マウスのSp2/0ミエローマ細胞に発現させて精製する。作製したヒト抗MK-1モノクローナル単鎖抗体 (ヒト抗MK-1scFv) の精製MK-1との反応性およびMK-1産生癌細胞との反応性を解析し、MK-1との反応が十分保たれている単鎖抗体およびその遺伝子を選択する。つづいて、ヒト抗MK-1scFv遺伝子をT細胞レセプター複合体の一部で細胞内情報伝達に重要な働きを有するCD3の $\zeta$ 鎖遺伝子と結合させることで膜結合型とし (ヒト抗MK-1scFv/CD3 $\zeta$ )、レトロベクターを利用してリンパ球に導入する。ヒトのMK-1発現癌細胞を標的とし、ヒト抗MK-1scFv/CD3 $\zeta$ 遺伝子導入したヒトLAK細胞の抗腫瘍活性をMTTアッセイ法で解析する。

## 4. 研究成果

(1) MK-1 の癌の診断における意義

まず、MK-1 に対して本研究室で作製したマウスモノクローナル抗体M1-8とM6-35の*in vitro*での大量調製法を検討した。その結果、CELLLine<sup>TM</sup>フラスコを用いた培養法により100 mgスケールの抗体を調製する方法を開発した。つづいて、マウス抗MK-1抗体による癌細胞の分離同定法の確立を試みた。MK-1は、それに対する抗体を利用することにより、磁性粒子を用いた血中および便中の剥離がん細胞分離に利用可能であることが明らかになった。

次に、これまでの胃癌や大腸癌になどにおける解析結果に加え、胆嚢癌におけるMK-1発現の意義を検討した。胆嚢癌標本を対象にしたマウス抗MK-1抗体 (FU-MK-1) による免疫染色の結果、MK-1発現が胆嚢癌の分化度、壁深達度、TNM stage と相関し、MK-1発現陰性例が有意に予後不良であることが明らかになった。また、肝転移、腹膜播種、静脈侵襲、神経・傍神経浸潤などの進行が胆嚢癌の予後不良因子であることも明らかになった。

さらに、確立したMK-1測定用のELISAを利用し、癌患者と正常人血清中のMK-1を測定した。正常人30例ではすべて検出感度(2 ng/ml)未満であった。種々の癌患者血清では100例中10例が陽性(2 ng/ml以上)で、最高例は75 ng/mlであった。主な内訳は、膵臓癌10例中1例(10%)、子宮頸癌7例中1例(14%)、大腸癌23例中2例(8%)、乳癌17例中2例(11%)が陽性を示した。本研究では健常者のMK-1血清濃度は非常に低いことと、癌患者での血清MK-1陽性率は他のマーカーに比べ低い結果が得られた。しかし血清

中に高値を示す例があり、MK-1 を標的とする画像診断や免疫療法時に留意する必要が示唆された。

### (2) MK-1 の免疫療法における意義

本研究室で作製したヒト抗MK-1モノクローナル抗体 M13-13 と M13-57 および M11-29 の *ex vivo* での抗腫瘍効果を、MK-1 発現癌細胞であるヒト胃癌細胞株 MKN-45 を標的として検討した。その結果、抗体とヒト補体やヒト NK-LAK 細胞との組み合わせによる抗腫瘍効果を示した。

つづいて、M13-57 を産生するハイブリドーマ細胞よりヒト抗体の H 鎖および L 鎖の V 領域を挟むプライマーを用いて H 鎖および L 鎖の V 領域遺伝子を単離した。単離した H 鎖および L 鎖の V 領域遺伝子をリンカーで挟んで結合し、単鎖抗体 (scFv) 遺伝子を作製するとともに、IL-2 との融合タンパクの作製を試みた。これを酵母発現ベクターである pPICZ $\alpha$  に組み込み、酵母の一種であるピキア・パストリスに発現させたところ、従来の大腸菌に比べて容易に精製できた。この融合タンパクは腫瘍細胞に対する NK-LAK 細胞活性をインビボでもインビトロでも MK-1 特異的に集積した。この低免疫原性でより優れた組織透過性を持つ融合タンパクを用いることにより、NK-LAK 細胞を MK-1 産生腫瘍特異的に作用させることが期待された。

### (3) MK-1 の免疫遺伝子療法における意義

ヒト抗MK-1モノクローナル抗体の免疫遺伝子療法における有用性も検討した。抗体 M13-13 ないし M11-29 のハイブリドーマより、ヒト抗体の H 鎖および L 鎖の V 領域を挟むプライマーを用いて、ヒト抗体 V 領域遺伝子を単離した。単離した H 鎖および L 鎖の V 領域遺伝子をリンカーで挟んで結合し、単鎖抗体遺伝子 (ヒト抗 MK-1scFv) を作製して、マウスの Sp2/0 ミエローマ細胞に発現させ精製した。作製した単鎖抗体の MK-1 産生癌細胞との反応性を解析し、その遺伝子が MK-1 産生癌に特異的な遺伝子治療に有用であることを示唆した。

つづいて、ヒト抗MK-1scFvをヒトのCD8やCD28およびCD3 $\zeta$  遺伝子と連続して結合させることによりキメラ型]のT細胞レセプター (chimeric T cell antigen receptor: CAR) 遺伝子を作製した。作製したCAR遺伝子をヒトのT細胞株であるJurkat細胞に発現させて、そのT細胞としての機能を解析した。その結果、CAR発現Jurkat T細胞は、MK-1 発現癌細胞に反応して活性化されることが証明された。以上の結果より、ヒト型抗MK-1 抗体の免疫遺伝子療法における有用性が示

唆された。

## 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 12 件)

①白須直人, 芝口浩智, 黒木求, 山田博美, 黒木政秀: CEA 特異的なヒト単鎖型抗体遺伝子のクローニングとキメラT細胞受容体の作製. 日本分子腫瘍マーカー研究会誌, 査読無, 26: 26-27, 2011.

②Yotsumoto, F., Fukami, T., Yagi, H., Funakosi, A., Yoshizato, T., Kuroki, Ma. and Miyamoto, S.: Amphiregulin regulates the activation of ERK and Akt through EGFR and HER3 signals involved in the progression of pancreatic cancer. *Cancer Sci.*, 査読有, 101 (11): 2351-2360, 2010.

③Yotsumoto, F., Oki, E., Tokunaga, E., Maehara, Y., Kuroki, Ma., Hiroto Mizushima, H., Mekada, E., Miyamoto, S.: HB-EGF orchestrates the signals involved in triple-negative and trastuzumab-resistant breast cancer. *Int. J. Cancer*, 査読有, 127 (11): 2707-2717, 2010.

④Shirasu, N., Shibaguchi, H., Kuroki, Mo., Yamada, H. and Kuroki, Ma.: Construction and molecular characterization of human chimeric T cell antigen receptors specific for carcinoembryonic antigen. *Anticancer Res.*, 査読有, 30 (7): 2731-2738 2010.

⑤Tanaka, T., Shibaguchi, H., Maekawa, S., Shimura, H., Tamura, K. and Kuroki, Ma.: Recent developments in cancer gene therapy with adenovirus vectors. *Trends Cancer Res.*, 査読無, 5 (1): 63-69, 2009.

⑥Shibaguchi, H., Tanaka, T., Luo, N. and Kuroki, Ma.: Engineering T cells in cancer immunotherapy: strategy for gene construction and antitumor activity. *Trends Cancer Res.*, 査読無, 5 (1): 21-27, 2009.

⑦Ikeda, T., Nakayama, Y., Hamada, Y., Takeshita, M., Iwasaki, H., Maeshiro, K., Yamashita, Y., Kuroki, Ma. and Ikeda, S.: FU-MK-1 expression in human gallbladder carcinoma: An antigenic prediction marker for a better postsurgical prognosis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 査読有, 132 (1): 111-117, 2009.

⑧Fukami T, Yoshizato T, Miyamoto S, Yagi H, Yotsumoto F, Nabeshima K, Hachisuga T, Kuroki Ma. and Kawarabayashi T.: Amphiregulin regulates the production of human chorionic gonadotropin in trophoblasts. *Life Sci.*, 査読有, 84

(23-24): 796-804, 2009.

⑨Huo, Q., Kinugasa, T., Wang, L., Huang, J., Shibaguchi, H., Kuroki, Mo., Tanaka, T., Yamashita, Y., Nabeshima, K., Iwasaki, H and Kuroki, Ma.: Claudin-1 protein is a major factor involved in the tumorigenesis of colorectal cancer. *Anticancer Res.*, 査読有, 29 (3), 851-857, 2009.

⑩Yagi, H., Yotsumoto, F., Sonoda, K., Kuroki, Ma., Mekada, E. and Miyamoto, S.: Synergistic anti-tumor effect of paclitaxel with CRM197, an inhibitor of HB-EGF, in ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, 査読有, 124 (6): 1429-1439, 2009.

⑪Zhao, J., Kuroki, Mo., Shibaguchi, H., Wang, L., Huo, Q., Takami, N., Tanaka, T., Kinugasa, T. and Kuroki, Ma.: Recombinant human monoclonal IgA antibody against CEA to recruit neutrophils to CEA-expressing cells. *Oncol. Res.*, 査読有, 17: 217-222, 2008.

⑫Uchino, J., Takayama, K., Harada, A., Sone, T., Harada, T., Curiel, D. T., Kuroki, Ma. and Nakanishi, Y.: Tumor targeting carboxylesterase fused with anti CEA scFv improve the anticancer effect with a less toxic dose of irinotecan. *Cancer Gene Ther.*, 査読有, 15: 94-100, 2008.

[学会発表] (計 15 件)

①Chanprateep, S., Kongchanasombat, M., Pohthisoong, N., Kuroki, Mo. and Kuroki, Ma.: Production of bifunctional sc-Fv antibody-based fusion proteins of IL-2/FU-MK-1(VH-Vκ) and IL-2/FU-MK-1(Vκ-VH) in *Escherichia coli*, *Nano in Cancer: Linking Chemistry, Biology, and Clinical Applications In Vivo*, Miami, Florida, January 12-15, 2011.

②Anuleechan, S., Palaga, T., Kuroki, Mo., Kuroki, Ma. and Chanprateep, S.: Secreted production of bifunctional sc-Fv antibody-based fusion protein of IL-2 and FU-MK-1(VH-Vκ) in *Pichia pastoris*, *Nano in Cancer: Linking Chemistry, Biology, and Clinical Applications In Vivo*, Miami, Florida, January 12-15, 2011.

③Yotsumoto, F., Kuroki, Ma. and Miyamoto, S.: Identification of genes regulating of HB-EGF as a target for breast cancer therapy. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 9月22-24日, 2010.

④Shirasu, N., Shibaguchi, H., Kuroki, Mo., Yamada, H. and Kuroki, Ma.: Construction and functional analysis of human chimeric T cell antigen receptors specific for carcinoembryonic antigen. 第69回日本癌学

会学術総会, 大阪, 9月22-24日, 2010.

⑤Miyamoto, S., Yotsumoto, F. and Kuroki, Ma.: Development of molecularly targeted against HB-EGF for proteins with ovarian cancer. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 9月22-24日, 2010.

⑥Shibaguchi, H., Tsuru, H., Kuroki, Mo. and Kuroki, Ma.: Enhancement of antitumor activity in the combination therapy of anticancer drug and a fully human antibody specific for CEA is involved in CDC and ADCC, but not anoikis. The 14th International Congress of Immunology, Kobe(Japan), Aug 23-27, 2010.

⑦Uchida, H., Chan, J., Nakano, K., Kwon, H., Goins, W. F., Kumagai, I., Kuroki, Ma., Grandi, P., Cohen, J. B. and Glorioso, J. C.: Hyperactive glycoprotein B mutations augment fully retargeted HSV infection. The 35th International Herpesvirus Workshop, Salt Lake City, Utah, USA July 24-29, 2010.

⑧Yotsumoto, F., Oki, E., Tokunaga, E., Maehara, Y., Sanui, A., Fukami, T., Kuroki, Ma., Mizushima, H., Mekada, E. and Miyamoto, S.: HB-EGF as a target molecule for triple negative breast cancer therapy. 第68回日本癌学会学術総会, 横浜, 10月1-3日, 2009.

⑨Yotsumoto, F., Oki, E., Tokunaga, E., Maehara, Y., Sanui, A., Fukami, T., Kuroki, Ma., Mizushima, H., Mekada, E. and Miyamoto, S.: Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a target molecule for triple negative breast cancer therapy. 37th Meeting of the International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM), Amsterdam (The Netherlands), September 27-30, 2009. (Oral)

⑩Shibaguchi, H., Tsuru, H., Kuroki, Mo., Tanaka, T. and Kuroki, Ma.: Combination therapy of gastric cancer using a human antibody to CEA and anticancer drugs. 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10月28-30日, 2008.

⑪Yotsumoto, F., Oki, E., Tokunaga, E., Maehara, Y., Kuroki, Ma., Mizushima, H., Mekada, E. and Miyamoto, S.: The validation of CRM197, a specific inhibitor for HB-EGF, for molecularly targeted in breast cancer patients. 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10月28-30日, 2008.

⑫Yotsumoto, F., Oki, E., Tokunaga, E., Maehara, Y., Kuroki, Ma., Mizushima, H., Mekada, E. and Miyamoto, S.: Efficacy of cross-reacting material 197 (CRM197), a specific inhibitor for heparin-binding

epidermal growth factor-like growth factor (HB), in breast cancer patients. 36th Meeting of the International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM), Tokyo (Japan), October 5-9, 2008.

⑬ Miyamoto, S., Yotsumoto, F., Fukami, T., Sanui, A., Kuroki, Ma. and Mekada, E.: Phase I study of BK-UK (CRM197) in patients with ovarian cancer. 36th Meeting of the International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM), Tokyo (Japan), October 5-9, 2008.

⑭ Yotsumoto, F., Yagi, H., Fukami, T., Kuroki, Ma., Mizushima, H., Mekada, E. and Miyamoto, S.: Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB) regulates mammary tumorigenesis through EGFR as well as Her2 signal. 99th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR), San Diego (USA), Apr. 12-16, 2008.

⑮ Fukami, T., Yagi, H., Yotsumoto, F., Funakoshi, A., Kuroki, Ma., Mekada, E. and Miyamoto, S.: Synergistic anti-tumor effects in combination of Gemcitabine with inhibitors for amphiregulin. 99th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR), San Diego (USA), Apr. 12-16, 2008.

[図書] (計3件)

① Mizoe, Y., Shioi, N., Terada, S., Uchida, Y., Kuroki, Ma. and Lee, S.: Characteristic difference of biological activity between Arg-containing and Lys-containing peptide. In: Peptide Science 2009. (K. Okamoto, ed.), The Japanese Peptide Society (Fukuoka), pp. 213-216, 2010.

② Kuroki, Ma.: A solid-phase mutual inhibition assay with labeled antigen. In: Methods in Molecular Biology, Vol. 524, Epitope Mapping Protocols (U. Reineke and M. Schutkowski, eds.), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 59-66, 2009.

③ Kuroki, Ma., Wang, L., Huo, Q., Shibaguchi, H., Yanagisawa, J., Fukami, T., Yotsumoto, F., Tanaka, T. and Miyamoto, S.: Fusion therapy of cellular and humoral immunity for cancer using antibodies or their genes against carcinoembryonic antigen. In: Recent Developments in Immunology (J. Xiang, ed.), Transworld Research Network, Kerala (India), pp. 233-245, 2008.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/biochem1/index-j.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒木 政秀 (KUROKI MASAHIDE)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号: 40122692

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

芝口 浩智 (SHIBAGUCHI HIROTOMO)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号: 60295061

田中 俊裕 (TANAKA TOSHIHIRO)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号: 00398314