

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：15201

研究種目：奨励研究

研究期間：2020～2020

課題番号：20H01007

研究課題名 膵癌の治療戦略をめざしたハイブリッドハイブリドーマの開発と臨床応用への展開

研究代表者

成相 裕子 (Yuko, Nariai)

島根大学・医学部・国立大学技術専門職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000円

研究成果の概要：膵癌細胞株(MIA PaCa-2 あるいは PANC-1)を Scid マウスの膵臓に局注することにより、局所浸潤および肝転移を引き起こすマウスモデル実験系を作成した。このマウスモデル系を用いて、樹立した抗体の機能評価を行った。膵癌の標準治療薬であるゲムシタピン存在下、あるいは非存在下で抗体の有効性を評価した。樹立したハイブリドーマから、一本鎖抗体(scFv)を構築後、標的分子との結合を確認することができた。そして我々が樹立した新規タグ抗体とのハイブリッドハイブリドーマを樹立し、膵癌細胞表面へドラッグデリバリーできる膵癌の治療戦略の基盤を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は生物学的悪性度の極めて高い疾患である。近年、分子標的薬が脚光を浴び様々な癌種で有用性が認められているが、膵癌においては未だ十分な効果が得られていない。膵癌治療において、新しい治療標的の発見を視野にいたした研究は非常に重要であり、かつ切望されている。抗体は低分子化合物と異なり、元来生体で産生されるため、副作用が少ないことなどから医薬品開発のハードルが低く、開発成功率が高い。膵癌撲滅に向けたバイオ医薬品開発の足がかりになると考える。

研究分野：病態生化学

キーワード：モノクローナル抗体 ハイブリッドハイブリドーマ

1. 研究の目的

膵癌は生物学的悪性度の極めて高い疾患である。近年、分子標的薬が脚光を浴び様々な癌種で有用性が認められているが、膵癌においては未だ十分な効果が得られていない。膵癌治療において、新しい治療標的の発見を視野にいたした研究は非常に重要であり、かつ切望されている。

抗体は低分子化合物と異なり、元来生体で産生されるため、副作用が少ないことなどから医薬品開発のハードルが低く、開発成功率が高い。膵癌撲滅に向けたバイオ医薬品開発を最終目標として、一昨年度採択された奨励研究において、膵癌細胞株をマウスに免疫し、膵癌細胞の浸潤能を抑制する機能を指標としたスクリーニングを行い、膵癌の局所浸潤を抑制する抗体を作成した。さらに本年度は我々が樹立した新規タグ抗体 (Tatumi K, *et al*, *Sci Rep* 7: 43480, 2017) とのハイブリッドハイブリドーマを樹立し、的確に膵癌細胞表面へドラッグデリバリーできる新規抗体により、膵癌の治療戦略の基盤を確立し、その応用を目指した。

2. 研究成果

膵癌細胞株の浸潤を抑制するモノクローナル抗体の作成

浸潤能を有する膵癌細胞株 MIA PaCa-2 および PANC-1 (図) を生細胞のままマウス腹腔内に注射し免疫した (マウス個体当たり 1×10^6 個)。常法に従い、細胞融合を行い、ハイブリドーマを樹立した。細胞浸潤能を直接制御する分子は細胞表面に存在すると考えられるため、1次スクリーニングには免疫原として用いた生細胞をベースとした簡易酵素結合免疫吸着検定 (細胞ベース ELISA 法) を用いることでスクリーニングの効率化を図った。2次スクリーニングでは、膵癌の標準治療薬であるゲムシタピン存在下または非存在下で、マトリジェルを用いた膵癌細胞浸潤能アッセイにより、浸潤能を阻害する特異的モノクローナル抗体を選択した。モノクローナル抗体の標的抗原については、正常膵組織に発現していないことを免疫組織学的に確認した。

膵局所浸潤および肝転移マウスモデル系を用いた抗体の評価

申請者の教室では、膵癌細胞株 (MIA PaCa-2 あるいは PANC-1) を Scid マウスの膵臓に局注することにより、局所浸潤および肝転移を引き起こすマウスモデル実験系を作成した (Shimojo Y, *et al*, *Clin Exp Metastasis* 30:2, 2013)。このマウスモデル系を用いて、樹立した抗体の機能評価を行った。膵癌の標準治療薬であるゲムシタピン存在下、あるいは非存在下で抗体の有効性を評価した。また、樹立したハイブリドーマから mRNA を抽出し、H 鎖および L 鎖の超可変領域の遺伝子をクローニングした。一本鎖抗体 (scFv) を構築後、標的分子との結合を確認した。

膵癌を標的としたハイブリッドハイブリドーマの作成

我々が樹立したペプチド配列 DLVPR を認識する抗体を産生するハイブリドーマ G196 は、1) ペプチド配列が水溶性である、2) ペプチド配列と抗体との親和性が非常に強い、さらに 3) 抗体エンジニアリングが容易である。この G196 と膵癌の局所浸潤抑制抗体とのハイブリッドハイブリドーマの作成を行った。変異導入薬 MNNG を用いてハイブリドーマに変異を導入し、薬剤により選択を行った。HGRRT (プリン “salvage” 経路酵素) の欠損株は薬剤 8-AZ により、TK (ピリミジン “salvage” 経路酵素) の欠損株は薬剤 BUdR により選択が可能となった。その後、変異導入した G196 と癌細胞表面抗原を認識する抗体を産生するハイブリドーマを常法に従い細胞融合させ、HAT 選択培地により選択し、ハイブリッドハイブリドーマを樹立した。これまでハイブリッドハイブリドーマを作成してきた経験では、HGRRT 欠損株の樹立は TK 欠損株の樹立より遥かに容易であった。すでに G196 の TK 欠損株を樹立しているため、相手となるハイブリドーマでは HGRRT 欠損株を樹立した。

二重特異性抗体の機能確認

二重特異性抗体を DEAE カラムで精製し、表面抗原を持つ細胞株と持たない細胞株を用いた 1) 膵癌細胞株レベル、および 2) 膵癌細胞株担癌マウスレベルに事前標的化後、DLVPR 配列を付加した GFP (診断目的) あるいはゲムシタピン (治療目的) を投与することで、二重特異性抗体の機能解析を行った。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshida Hisashi, Park Sam-Yong, Sakashita Gyosuke, Nariai Yuko, Kuwasako Kanako, Muto Yutaka, Urano Takeshi, Obayashi Eiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Elucidation of the aberrant 3' splice site selection by cancer-associated mutations on the U2AF1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-18559-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sugiura Tomoko, Kamino Hiroki, Nariai Yuko, Murakawa Yohko, Kondo Masahiro, Kawakami Makoto, Ikeda Noboru, Uchio Yuji, Urano Takeshi	4. 巻 205
2. 論文標題 Screening of a Panel of Low Molecular Weight Compounds That Inhibit Synovial Fibroblast Invasion in Rheumatoid Arthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3277 ~ 3290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1901429	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Naomi, Sakashita Gyosuke, Nagata Takashi, Kobayashi Naohiro, Yoshida Hisashi, Park Sam-Yong, Nariai Yuko, Kato Hiroaki, Obayashi Eiji, Nakayama Kentaro, Kyo Satoru, Urano Takeshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Nucleus Accumbens-Associated Protein 1 Binds DNA Directly through the BEN Domain in a Sequence-Specific Manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 608 ~ 608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines8120608	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------