

令和 5 年 5 月 7 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07642

研究課題名(和文) 特異的抗体を用いた転移性がん細胞表面分子の同定と創薬応用

研究課題名(英文) Identification of metastatic cancer cell surface molecules using specific antibodies and their drug discovery applications

研究代表者

立花 太郎 (TACHIBANA, Taro)

大阪公立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80311752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではがん細胞が転移能を獲得した際に細胞表面に出現する構造を同定するため、ヒト骨転移性肺がん細胞を抗原とし、モノクローナル抗体の作製を行った。そして転移能を獲得した肺がん細胞の細胞表面を特異的に認識するモノクローナル抗体を多数樹立した。
次にそれらのモノクローナル抗体を使い、ヒト骨転移性肺がん細胞膜画分抽出液から免疫沈降を行い、抗原の候補となる膜タンパク質を同定した。また、抗体の認識に糖鎖修飾が必須であることを明らかにし、その糖鎖構造を同定した。以上のように各抗体の抗原解析から、転移性がんの診断と治療法に貢献する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療において、転移の早期発見および治療は非常に重要である。がんの転移メカニズムの解明や転移マーカーの探索は古くから行われており、一定の成果をあげてきたが、転移性がんを克服できるまでには至っていない。

そこで本研究でがん細胞が転移能を獲得した際に細胞表面に出現する構造を同定するため、ヒト骨転移性肺がん細胞を抗原とし、モノクローナル抗体を作製した。この抗体は転移性がんを特異的に認識し、がん転移の早期発見や治療に大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, monoclonal antibodies were generated using human bone metastatic lung cancer cells as antigens in order to identify the structures that appear on the cell surface when cancer cells acquire metastatic potential. I then established a number of monoclonal antibodies that specifically recognize the cell surface of lung cancer cells that have acquired metastatic potential.

Next, I identified candidate membrane proteins as antigens of the antibody using immunoprecipitation method. I also clarified that glycosylation is essential for antibody recognition and identified the glycan structures. As described above, these analysis of each antigens provided knowledge that contributes to the diagnosis and treatment of metastatic cancer.

研究分野：創薬生命工学

キーワード：転移性がん モノクローナル抗体 がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん治療において、転移の早期発見および治療は非常に重要である。がんの転移メカニズムの解明や転移マーカーの探索は古くから行われており、一定の成果をあげてきたが、転移性がんを克服できるまでには至っていない。近年の研究でがん細胞はその細胞表面に正常細胞とは異なった糖鎖構造を有すること、さらにはがんの進行に伴って、その糖鎖構造がさらに変化していくことが明らかとなってきた。しかし、その詳しい構造や分子メカニズムは明らかとなっていない。そこで本研究ではがん細胞が転移能を獲得した際に細胞表面に出現する構造を同定するため、ヒト骨転移性肺がん細胞（ヒト肺がん細胞をマウスに移植し、マウス体内で骨転移した細胞株）を抗原とし、モノクローナル抗体の作製を行った。そして転移能を獲得した肺がん細胞の細胞表面を特異的に認識する抗体を樹立することに成功した。

樹立した抗体の多くが、正常ヒト細胞並びに肺がん細胞株には結合せず、転移能を獲得した肺がん細胞のみを染色した。また生きた転移性肺がん細胞を用いても染色できることから、抗体が認識する抗原は細胞表面に局在することが示された。つまり、これらの抗体は転移性肺がん細胞のみに出現する分子（例えば特殊な糖鎖構造）を認識していると考えられる。またこれらの抗体のいくつかは、他の臓器由来がん細胞でも転移依存的にがん細胞を認識することを明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究では、これら転移性肺がん細胞表面構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を用い、転移能を獲得した肺がん細胞に出現する分子構造を同定することを目的とする。また、その分子ががん転移にどのように関与するかを調べ、がん転移メカニズムの一端を明らかにする。また、転移性がん細胞特異的モノクローナル抗体の治療薬としての有用性を検討する。

これまで遺伝子発現解析でがん転移に関与する因子の探索は数多く行われてきた。しかしこの方法ではがん細胞表面の特殊な糖鎖構造などわずかな構造の違いを同定することは大変難しい。本研究は申請者自らが樹立した転移性がん細胞特異的抗体を用いた独自のアプローチで、遺伝子発現解析では同定が困難な転移がん特異的の表面構造を明らかにしようとしている。

3. 研究の方法

複数の転移性肺がん細胞特異的モノクローナル抗体を用い、免疫染色により特異性を解析するとともに、転移性肺がん細胞の膜画分抽出液より免疫沈降法で抗原分子を単離、質量分析により抗原分子を同定する。同時に各種糖鎖切断酵素を用いた解析を行う。抗原分子が糖鎖を含むことが明らかになった場合、詳細な糖鎖構造を同定するために、糖鎖アレイを用い、モノクローナル抗体がどのような糖鎖を認識するか解析する。また各種がん細胞の転移能との相関も詳しく調べる。

4. 研究成果

<抗体①の解析結果>

免疫染色より、転移性がん細胞株 HARA-B 陽性、親株である HARA や正常細胞株は陰性であることを確認した（図 1）。さらに、各種細胞株での反応性を調べたところ、HeLa 細胞など特定のがん細胞株でのみ陽性であった。ウエスタンブロッティングならびに免疫沈降物の MS 解析により、

抗原タンパク質が CD98hc であることを同定した。CD98 はがん細胞の悪化に伴って発現量が増大することが知られているアミノ酸トランスポーターである。本抗体は CD98 に結合した後、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることを明らかにし、抗体薬品シーズとして有用である可能性を示した。

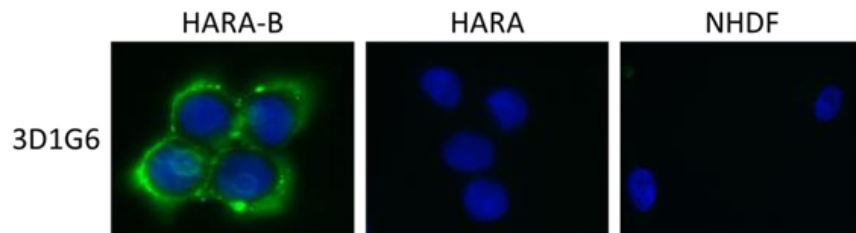


図 1 ヒト骨転移性肺がん細胞特異的抗体①を用いた免疫染色（緑：抗体、青：核 DNA）
（HARA-B：骨転移性肺がん細胞、HARA：肺がん細胞、NHDF：正常線維芽細胞）

<抗体②の解析結果>

免疫染色より、転移性がん細胞株 HARA-B2 陽性、親株である HARA や正常細胞株は陰性であることを確認した。さらに、各種細胞株での反応性を調べたところ、HARA-B2 細胞株の他には転移性前立腺がん細胞株 LNCaP のみで陽性であり、この抗体は転移性がんを特異的に認識することが示唆された（表 1）。そこで、ウエスタンブロッティングによりこの抗体の抗原タンパク質は糖鎖修飾されていることを示し、さらに糖鎖消化酵素を用いた解析により抗体のエピトープに N 結合型糖鎖が含まれることを明らかにした（図 2）。さらに糖鎖アレイ解析により、エピトープとなる糖鎖を同定した（図 3）。この糖鎖は動物細胞において報告のない構造であり、その特異的抗体は転移性がんの診断と治療法開発に大きく貢献すると考えられる。

細胞株	由来	シグナル
HARA	肺がん	—
HARA-B2	肺がん(転移性)	+
MCF-7	乳がん	—
MDA-MB-231	乳がん(転移性)	—
BxPC-3	膵臓がん	—
LNCaP	前立腺がん(転移性)	+
HepG2	肝臓がん	—
NHDF	正常皮膚繊維芽	—

表 1 抗体②の各種細胞株免疫染色結果まとめ

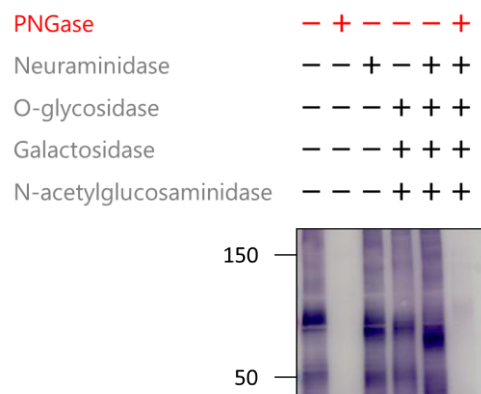


図 2 各酵素処理した細胞抽出液を用いた抗体②のウエスタンブロッティング

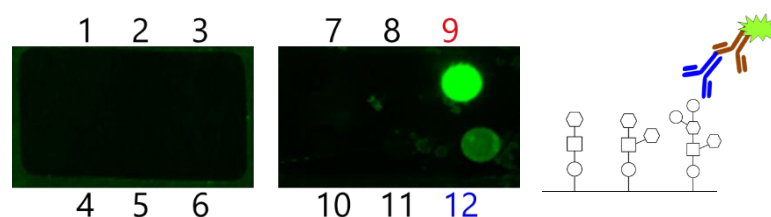


図 3 12 種類の糖鎖をスポットした糖鎖アレイを用いた抗体②のブロッティング

<抗体③の解析結果>

免疫染色より、転移性がん細胞株 HARA-B2 陽性、親株である HARA や正常細胞株は陰性であることを確認した。さらに、各種細胞株での反応性を調べたところ、HARA-B2 細胞株の他には転移性前立腺がん細胞株 LNCaP のみで陽性であり、この抗体は転移性がんを特異的に認識することが示唆された (表 2)。そこでウエスタンブロッティングならびに免疫沈降物の MS 解析 (図 4) を行ったところ、抗原タンパク質として PIGR を同定した。PIGR は免疫系からの回避に関与するタンパク質であり、この抗体③を用いて解析を進めることで自己の免疫系を回避してがん細胞が転移するメカニズムの一端が明らかになり、新しい創薬への道筋が大きく拓かれることが期待できる。

細胞種	由来	シグナル
HARA	肺がん	—
HARA-B2	肺がん (骨転移)	+
MCF7	乳がん	—
MDA-MB-231	乳がん (転移性)	—
KP-3	膵臓がん	—
KP-3L	膵臓がん (リンパ節転移)	—
HepG2	肝臓がん	—
LNCaP	前立腺がん (リンパ節転移)	+++
PC3	前立腺がん (脳転移)	—
NHDF	正常皮膚繊維芽細胞	—

表 2 抗体③の各種細胞株免疫染色結果まとめ

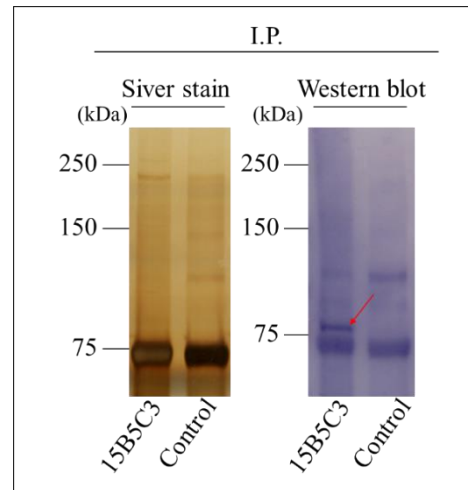


図 4 抗体③を用いた免疫沈降

<まとめ>

以上のように本研究では転移がん細胞の細胞膜表面特異的モノクローナル抗体を多数樹立し、特異性などの性状解析を行うとともに各抗体の抗原同定に成功した。それぞれの抗体の抗原は既知のタンパク質から未知の糖鎖構造までバラエティーに富んでいた。転移性がんの診断と治療法開発に非常に貢献できると考えられ、さらに精力的に研究を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kakehashi Anna, Suzuki Shugo, Shiota Masayuki, Raymo Nina, Gi Min, Tachibana Taro, Stefanov Vasily, Wanibuchi Hideki	4. 巻 13
2. 論文標題 Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3613 ~ 3613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13143613	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuzmi Mira, Castro Linares Gerard, Leischner Fialov Jindika, Iv Franois, Salan Danile, Llewellyn Alex, Gomes Maxime, Belhabib Mayssa, Liu Yuxiang, Asano Keisuke, Rodrigues Magda, Isnardon Daniel, Tachibana Taro, Koenderink Gijsje H., Badache Ali, Mavrakis Manos, Verdier-Pinard Pascal	4. 巻 135
2. 論文標題 Septin-microtubule association via a motif unique to isoform 1 of septin 9 tunes stress fibers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.258850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokoyama Chikako, Kobayashi Sho, Harada Yumi, Nishino Yuki, Fujii Junichi, Tachibana Taro	4. 巻 41
2. 論文標題 Generation of Rat Monoclonal Antibody for Mouse Nucleolin by Immunization of Ferroptosis-Induced Hepa 1-6 Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 255 ~ 259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2022.0005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Honoka, Nakanishi Takeshi, Ihara Kan-ichiro, Tachibana Taro, Yokoyama Chikako	4. 巻 42
2. 論文標題 Generation of Rat Monoclonal Antibodies Against Human Epidermal Growth Factor Receptor 2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 59 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2022.0042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 膵臓がん幹細胞に対する抗体	発明者 立花太郎、伊原寛一 郎、堀裕一、清水一 也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-064090	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------