

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791532

研究課題名(和文) 差別的樹状細胞免疫法による前立腺癌幹細胞特異的モノクローナル抗体の網羅的作製

研究課題名(英文) production of monoclonal antibodies against prostate cancer stem cells using differential dendritic cell immunization

研究代表者

田村 隆彦 (TAMURA TAKAHIKO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00434035

研究成果の概要(和文): HA を発現する制御性樹状細胞をマウスに免疫すると HA に対する抗体産生は成熟活性型樹状細胞を用いた場合と比較すると強く抑制された。しかし、OVA タンパク質をその後免疫すると、OVA に対する抗体産生は抑制されなかった。これらのことから差別的樹状細胞免疫法の基盤が確立された。培養細胞から抽出された膜タンパク質は樹状細胞に貪食されることが確認された。貪食樹状細胞を免疫することで細胞表面タンパク質に対する抗体産生が誘導された。制御性樹状細胞を用いた場合は抗体産生が有意に抑制された。

研究成果の概要(英文): The regulatory dendritic cells expressing HA antigen were immunized into mice. The anti-HA antibody was less induced compared with normal dendritic cells. However, OVA protein immunization after HA immunization demonstrated anti-OVA antibody was similarly induced, suggesting differential dendritic cell immunization protocol worked properly. Dendritic cells were shown to phagocytose the membrane proteins extracted from cultured cells. These dendritic cells were immunized into mice. Anti-cell surface proteins of culture cells were produced, but it was less in the case of regulatory dendritic cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 泌尿器科学

キーワード：腫瘍学 抗体作製

1. 研究開始当初の背景

ヒト癌幹細胞が様々な癌において具体的

に同定されたことにより癌幹細胞特異的に発現する細胞表面抗原に対する抗体作製は癌に対する抗体医薬開発等、基礎／臨床医学両面の観点から極めて要望の高いものと考えられる。しかし、そのような抗体の効率的な作製の手法は必ずしも確立されていないのが現状である。近年では、cDNA microarray法によって同定された癌幹細胞特異的な発現を示す遺伝子産物の報告があり、その産物を抗原として抗体を作製する方法が挙げられる。しかし現時点での microarray 法の不完全さ（再現性、細胞膜タンパク質など発現レベルの低い遺伝子は発現変動が見逃されやすいなど）や、mRNA レベルとタンパク質レベルでの発現が必ずしも一致しないなどの欠点が存在する。他には phage display 法が挙げられる。phage display 法ではマウス等免疫動物を使用せず、ライブラリーサイズが極めて大きいなど魅力的な点が多く存在する。しかし phage 自体が非特異的に標的細胞に結合しやすいことなど panning 条件の設定が多くの場合困難である。また抗原を発現する細胞を免疫原とする免疫法も存在するが、細胞ごと免疫するため特異的抗原に対する抗体誘導が困難で（例えば前立腺上皮細胞において CD133 陽性細胞で発現が高い遺伝子は全体の 1% 程度と見られる）、非特異的抗原に対する免疫寛容を誘導することが重要課題であると考えられるが、いまだ十分に解決されていない。申請者はこれまでに最も強力な抗原提示細胞として知られる樹状細胞を用いて細胞膜タンパク質に対する免疫法を構築してきた。ヒト前立腺癌細胞に発現する複数回膜貫通型タンパク質で、抗体作製が困難とされていた抗原を複数個取り上げ、マウス樹状細胞を利用した免疫により特異的抗体の作製に既に成功しており、樹状細胞が抗体作製において有用なツールであること

を示している。その一方で免疫応答を負に抑制する制御性樹状細胞も近年報告されている。制御性樹状細胞は制御性 T 細胞の誘導等のメカニズムにより自己抗原に対する寛容や癌の免疫逃避に関与する。申請者は制御性樹状細胞の特性に着目し、抗原を発現する制御性樹状細胞をあらかじめ移植しておくことで、抗原に対する抗体産生誘導が顕著に抑制される結果を既に得ている。

そこで本研究計画では、従来の抗体作製法の欠点を克服することを目指し、差別的樹状細胞免疫法を用いたヒト癌幹細胞表面抗原特異的に反応する抗体の網羅的な作製法を考案した。非癌幹細胞より精製した細胞膜タンパク質画分を貪食させた制御性樹状細胞をマウスに投与することで非癌幹細胞由来の膜タンパク質には寛容を成立させた後、癌幹細胞由来の膜タンパク質画分を貪食させた成熟活性型樹状細胞を免疫することで効率的に癌幹細胞特異的な表面抗原に対する抗体産生を誘導し、網羅的なモノクローナル抗体作製を行うことができると計画した。

2. 研究の目的

差別的樹状細胞免疫法を用いて、ヒト前立腺癌幹細胞に特異的に発現する細胞表面膜タンパク質に対する抗体産生を誘導し、マウスモノクローナル抗体を網羅的に作製する。作製した抗体を用いて、癌幹細胞を標的とした抗癌治療の有効性や、癌幹細胞の生体内での挙動など癌幹細胞の基本的特性を解析する。最終的には前立腺癌にとどまらず多くの難治性癌（膵臓癌、卵巣癌など）に対する抗体医薬を含む治療、診断用医薬創製に貢献する。強力な抗原提示能力と、状態により寛容と免疫という正反対の応答を誘導できる樹状細胞の非常にオリジナルな免疫学的特性を利用した過去に報告のない画期的な抗体

作製法の確立が期待され、従来の免疫法では作製が困難であった有用な抗体が簡便に作製できる。差別的樹状細胞免疫法は他の目的（例えば高転移性癌細胞に特異的に発現する抗原に対する抗体作製など）にも活用できるため、幅広い分野での応用が期待できる。樹状細胞免疫法の基盤技術を確立し、製薬企業等に translate することで、癌に対する商業ベースな抗体医薬創製に貢献できる。

前立腺癌の癌幹細胞に反応する抗体を作製することで、癌幹細胞に関する研究が飛躍的に進展することが予想される。前立腺癌における癌幹細胞のさらなる phenotyping や characterization に活用できる。癌幹細胞に標的を置いた癌治療戦略に有力なツールを提供できる。

3. 研究の方法

(1) 樹状細胞の誘導

成熟活性型樹状細胞の誘導は、BALB/C マウスより骨髓を採取し、mouse GM-CSF (20ng/ml) で8日間培養した。制御性樹状細胞の誘導は、BALB/C マウスより骨髓を採取し、mouse GM-CSF (20ng/ml)、mouse IL-10 (20ng/ml)、human TGF- β 1 (20ng/ml) で8日間培養した。CD86 陽性細胞を MACS で除去し制御性樹状細胞を精製した。LPS 等により樹状細胞を刺激した。

(2) 抗原遺伝子の導入や抗原の貪食

HA 遺伝子を発現する ecotropic レトロウイルスベクターはスタンダードな方法に依った。作製したウイルスベクターを培養樹状細胞に感染させた。ヒト 293T 細胞ないし CD4-GFP 遺伝子を発現するプラスミドをトランスフェクションした 293T 細胞よりキットを用いて膜タンパク質を精製した。膜タンパク質を PD10 カラムでバッファー交換後、樹状細胞に添加し貪食させた。

(3) マウスの免疫

成熟活性型ないし制御性樹状細胞 ($\sim 10^6$ 個/匹) を BALB/C マウスに腹腔内に投与し免疫した。血清を採取し、フローサイトメトリー法により抗体産生を調べた。

4. 研究成果

(1) モデル抗原を用いた差別的樹状細胞免疫法の確立 (図1)

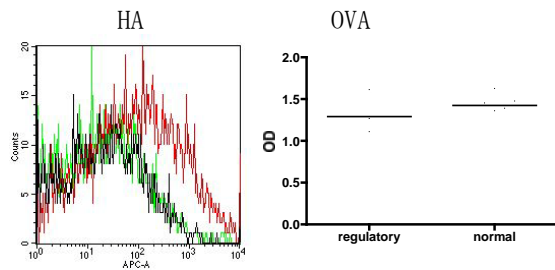
差別的な免疫法が実際に機能するかどうかモデル抗原で検討した。HA 遺伝子を発現するレトロウイルスベクターを通常樹状細胞、ならびに制御性樹状細胞に感染、発現させ、マウスに免疫した。2週間後 HA 遺伝子発現プラスミドを DNA 免疫ブーストとした。免疫後の血清をフローサイトメトリーで検討したところ、通常樹状細胞を免疫した場合は HA に対する抗体が検出されたが、制御性樹状細胞を免疫した場合は抗体が明らかに少なく、HA に対する抗体産生が抑制されていることが明らかになった。これらの免疫マウスに OVA タンパクを免疫すると、OVA に対する抗体産生は両者の間で大きな差が見られなかった。これらのことから、制御性樹状細胞を用いた免疫原に対しては抗体産生が抑制されるが、そうでない免疫原に対しては通常に抗体産生が上昇することが明らかとなり、差別的な免疫法が可能であることが証明された。

(2) 膜タンパク質の貪食と免疫 (図2)

樹状細胞が実際に膜タンパク質を貪食するかどうか検討するため、CD4 と GFP を融合したコンストラクト (CD4-GFP) を作製した。このプラスミドをヒト 293T 細胞にトランスフェクションし発現させると、CD4-GFP タンパク質は細胞表面に発現していることが確認され、膜タンパク質の貪食標識になると考え

た。CD4-GFP を発現させた 293T 細胞より市販のキットを用いて膜タンパク質を精製し、樹状細胞が貪食するかどうか検討した。その結果、樹状細胞に GFP の発現が認められるようになり、またこれらの GFP 陽性細胞では有意に CD4 の発現が認められ、膜タンパク質が通常でも制御性でも樹状細胞に取り込まれていることが確認された。これらの貪食樹状細胞をマウスに免疫し、293T 細胞自体をブースト免疫したのち、血清中の 293T 細胞表面に対する抗体をフローサイトメトリーで測定した。その結果、通常の成熟活性型樹状細胞を用いた場合はブーストのみより強い抗体染色が認められ、樹状細胞免疫による抗体産生促進の有効性が認められた。一方、制御性樹状細胞を用いた場合はブーストのみとほぼ変わらず、樹状細胞免疫に依る抗体産生を誘導していないことが明らかになった。しかしブーストによる抗体産生は抑制しておらず、これはブーストまで2ヶ月程度空いてしまい、それほど長期間抗体産生抑制が見られていないことが示唆された。ヒト前立腺癌細胞 DU145 に含まれる CD44 陽性 CD24 陰性の細胞集団は癌幹細胞様の細胞であると考えられている。これらの細胞を FACS で精製することに成功したので、現在これらの細胞に対する免疫を試みている。

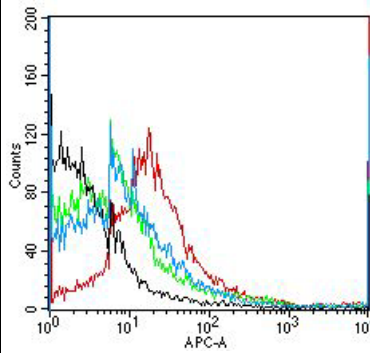
図 1



Red:normal,
black:preimmune

green:regulatory,

図 2



Red:normal, green:regulatory, blue:boost only, black:preimmune

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 2 件)

1、Takahiko Tamura and Joe Chiba.

Production of antibodies against multi-pass membrane proteins expressed in human tumor cells using dendritic cell immunization. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009, 673098, (2009). 査読あり

2、Takahiko Tamura and Joe Chiba

STEAP4 regulates focal adhesion kinase activation and CpG motifs within STEAP4 promoter region are frequently methylated in DU145, human androgen-independent prostate cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 24(5), 599-604, (2009). 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

田村隆彦

STEAP4 regulates focal adhesion kinase activation and CpG motifs within STEAP4 promoter region are frequently methylated in DU145, human androgen-independent prostate cancer cells. 日本分子生物学学

会、横浜、2009年12月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 隆彦 (TAMURA TAKAHIKO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 00434035

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号: