

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650271

研究課題名（和文）がん診断のためのイメージング抗体の作製技術の開発

研究課題名（英文）Development of antibody recognition imaging method for cancer diagnosis

研究代表者

柳川 弘志（YANAGAWA HIROSHI）

慶應義塾大学・理工学部・訪問教授

研究者番号：40327672

研究成果の概要（和文）：

CD44は接着分子としてがん幹細胞の自己複製能を維持するために必要な因子の一つと考えられていることから人工がん幹細胞が細胞プレートへの接着を阻害する一本鎖抗体のセレクションをIVV法により行った。全部で7ラウンドの選択実験後、得られた2つのクローンAXT7-30とAXT7-12はAXT細胞の細胞プレートへの接着を阻害した。CytoTox-Glo Cytotoxicity Assayの結果、強い殺細胞活性を有し(IC₅₀=3nM)、AXT7-30の方が3倍強い活性を有していた。そこでこの一本鎖抗体AXT7-30を使って蛍光ラベル化抗体を作成した。tdTomatoは非常に明るい赤色蛍光タンパク質であり、tdTomato蛍光ラベル化されたAXT7-30を用いて免疫染色したところAXT細胞を明瞭に蛍光観察することができた。現在この蛍光ラベル化一本鎖抗体の担がんマウス投与を実施中であり、二光子励起蛍光顕微鏡を用いた体内動態の画像化によりがん細胞への集積を解析中である。

研究成果の概要（英文）：

Since CD44 is considered to be one of the factors required in order to maintain the autonomous replication ability of cancer stem cells as adhesion molecules, we performed to select single strand antibodies which prevent the induced cancer stem cells (iCSCs) from adhering on the cell plate by the IVV method. The selected two clones AXT7-30 and AXT7-12 inhibited adhesion of iCSCs on the cell plate and bound to the cell surface of iPSCs. As a result of CytoTox-Glo cytotoxicity assay, they had strong a cell-killing activity (IC₅₀=3nM), and AXT7-30 had 3 times higher activity than AXT7-12. Then, we made the fluorescence-labeled AXT7-30. The tdTomato is a very bright red fluorescence protein, and the constructed tdTomato fusion AXT7-30 strongly bound to the surface of iPSCs. The *in vivo* imaging of the dynamic state using the tdTomato fusion AXT7-30 in a living body with a two-photon excitation fluorescence microscope is under analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医用生体工学・生体材料学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学、生体材料学

キーワード：iPS細胞 がん幹細胞 *in vitro* virus法 CD44 *in vivo* imaging

1. 研究開始当初の背景

我が国では、がんによる死亡者数は戦後一貫して増加している。現在、国民のおよそ2人に1人ががんにより死亡している。がん治療を困難にしている最大の原因は、薬物治療が増殖相にある細胞の死滅を狙った細胞傷害性抗癌剤か、あるいは増殖シグナルを特異的に遮断する分子標的薬剤の使用が主流であり、それらは一時的に増殖能が高く最終的には増殖を停止する非癌幹細胞 (progeny) には有効であるが、増殖が遅く自己複製能を持つ癌幹細胞に対する効果は低い。がんの薬物治療や外科手術による除去後、癌幹細胞が完全に除かれず残存することが癌再発の原因であり、腫瘍形成の根本となる癌幹細胞を標的とした新たな診断と治療の出現が望まれている。

ヒトゲノムの解読により、それらの遺伝情報に基づく医薬品のデザインや、遺伝子の関与する病気の診断を行う、ゲノム創薬・ゲノム医療への期待・関心が高まっている。中でも標的分子に対する高い親和性と特異性を有する抗体は、従来の低分子医薬と比べて副作用の恐れが少ない究極の分子標的薬として注目されていると同時に診断薬としても注目されている。

これまで申請者らは、無細胞翻訳系を利用してタンパク質相互作用解析を行うための独自技術として、*in vitro virus*(IVV)法 (FEBS Lett. 1997; Nucleic Acids Res., 2003) と C 末端ラベル化法 (FEBS Lett., 1999; Nucleic Acids Res. 2000; Genome Res., 2002) の開発を行ってきた。IVV 法では mRNA の 3' 末端にスパーサーを介して抗生物質の一種のピューロマイシンを結合し、それを鋳型として無細胞翻訳反応を行うことにより、タンパク質と mRNA がピューロ

マイシンを介して共有結合した単純な mRNA-タンパク質連結分子 IVV が構築される。この IVV ライブラリーの中からペイトタンパク質と結合するタンパク質を含む IVV を試験管内で釣り上げた後、そこに連結している遺伝子(mRNA)を逆転写・PCR で増幅し、塩基配列を解読することによって、相互作用するタンパク質群を容易に同定することができる。これまで IVV 法がタンパク質-タンパク質相互作用解析(Genome Res., 2005; Nucleic Acids Res., 2004)、DNA-タンパク質相互作用解析(Nucleic Acids Res., 2006)、抗体や機能性ペプチドのスクリーニング (Nucleic Acids Res., 2006)に応用できることを報告してきた。また、IVV 法の構築過程で低濃度のピューロマイシン誘導体は無細胞翻訳系に投入すると、合成されたタンパク質の C 末端に特異的に結合することを見出した。この原理を応用して、蛍光色素をピューロマイシンに連結させた化合物を用いることで、タンパク質の C 末端を蛍光色素でラベルすることが可能になった。

この過程で申請者らは、IVV 法とマイクロ流体チップの技術を組み合わせることにより、従来のビーズを使う方法よりも、はるかに高効率に一本鎖抗体をスクリーニングできるという良好な結果を得た。そこで本研究では、このアイデアを用いて、がん幹細胞に特異的な表面抗原に対する高親和性、高特異性一本鎖抗体を従来よりもはるかに高効率にスクリーニングし、抗体を蛍光ラベル化して動物に投与して二光子励起蛍光顕微鏡で観察したり、抗体を短寿命の放射性同位元素でラベル可能な配位子でラベル化し、動物に投与して PET で画像診断を行うことのできる手法の確立を目指す。従来法よりもすぐれた本手法の開発に成功すれば、がんの診断・

治療の分野への多大な貢献ができる。

ファージディスプレイは、抗体の試験管内選択技術として長い実績があり、方法論の改良も進んでいる優れた手法であるが、常に望む抗体が取得できる万能な方法ではなく、いくつかの欠点もある。まず、ファージ1粒子当たり多数の抗体が提示される多価効果により親和性の低い抗体でも選択されるため最初の抗体取得には有効だが、高親和性抗体の試験管内進化には必ずしも適していない。また、一般に、分子ライブラリーのサイズが大きく多様であるほど、目的の分子を選択しやすくなることが知られているが、ファージディスプレイでは宿主である大腸菌を経由するため、宿主の生育に影響する配列のバイアスがかかり、宿主の細胞数によりライブラリーサイズも制限される。IVV法では、1分子当たり提示される抗体数は1分子であり、また、無細胞系を用いるので細胞による制限を回避でき、100倍以上大きく多様なライブラリーが調製できる。

IVV法ではピューロマイシンを介した安定な共有結合であるため、選択効率が高く、また、熱などの選択圧により高い安定性をもつ抗体を得ることも可能である。さらに、従来技術では1回の選択操作でライブラリー中に含まれる目的の抗体分子の割合はせいぜい100倍程度しか濃縮されないため何度も選択操作を繰り返す必要があり、コストと時間がかかる欠点があった。我々はIVV法とマイクロ流体チップを組み合わせることにより、1回の選択操作で目的の抗体分子を100万倍以上濃縮できる超高効率な選択系を実現している (Nucleic Acids Res. 37, e64, 2009)。

従来の診断や治療に用いる抗体を放射性同位元素でラベル化する場合は、化学ラベル化法が用いられてきた。しかし、この手法で

は、タンパク質の活性残基が修飾されたり、ラベル化前の抗体の精製が必要である。C末端ラベル化法では、ラベル化前の高度な精製が不要でC末端のみがラベル化されるので、機能が保持されるなどの利点がある。

このように従来法のパフォーマンスを凌駕する独自技術を利用する本申請の新規な点の1つは、従来のscFvばかりでなく、二重特異性抗体を効率よく取得するために、ScFvやDiabodyなど他の抗体フォーマットに本技術を適用しようとする点にある。特に全長の抗体のIgG(150kDa)は、がん組織への取り込みと血中の滞留量が多く、時間も長い。その結果、全長抗体のがん組織/血中の量比は非常に小さい。逆に、scFv(28kDa)やDiabody(55kDa)やMinibody(80kDa)のように分子サイズの小さい抗体の方が血中からwashoutされ易く、その結果がん組織/血中の量比は大きくなり、その結果、バックグラウンドの値が低くなり、抗体の組織中への蓄積がより明確に観察出来るようになる。

このように、従来法と比べて多くの利点を有する本手法の開発に成功すれば、がん細胞やがん幹細胞の特異抗原を標的とした抗親和性、高特異性を高効率に選択することができ、さらに得られた抗体を蛍光ラベル化して動物に投与して二光子励起蛍光顕微鏡で観察したり、抗体を短寿命の放射性同位元素でラベル可能な配位子でラベル化し、動物に投与してPETで画像診断を行うことが可能になり、がんの診断や治療に役立つ。よって、scFvのような分子サイズの小さな抗体の迅速な選択と、その効率的なラベル化手法を組み合わせるという萌芽的なアイデアを汎用的な手法に発展させようとする本研究は、波及効果のきわめて大きい挑戦的な課題といえる。

2. 研究の目的

本研究では、これら申請者独自の抗体作製および標識技術を用いて、がんやがん幹細胞特異的な表面抗原に対する高い親和性と特異性を有する scFv を作製し、得られた scFv を蛍光ラベル化して動物に投与して二光子励起蛍光顕微鏡で観察したり、抗体を短寿命の放射性同位元素でラベル可能な配位子でラベル化し、最終的に ^{64}Cu や ^{90}Y のような放射性同位元素でラベル化できる手法の確立を目指す。本手法の開発に成功すれば、二光子励起蛍光顕微鏡や PET (Positron Emission Tomography; ポジトロン断層撮像装置) で画像診断を行う抗体プローブや、放射線治療用抗体を簡便に作製することが可能となり、がんの診断・治療の分野への多大な貢献が期待できる。

3. 研究の方法

IVV 法による一本鎖抗体(scFv)の超高効率な選択と得られた抗体を蛍光色素や短寿命の放射同位元素でラベル化、それを担癌マウスに投与して二光子励起蛍光顕微鏡や PET で局在を観察する方法は以下の(1)~(3)の手順で行う。

- (1) いくつかのがん細胞とがん幹細胞のマーカーを抗原として IVV 法で scFv を選択する。
- (2) 得られた scFv を蛍光色素でラベル化したり、放射性同位元素を導入するためのラベル化剤を合成し、C 末端ラベル化法により、抗体の C 末端を放射性同位元素でラベル化する。
- (3) 蛍光色素や短寿命の放射性同位元素でラベル化された scFv を担癌マウスに投与し、二光子励起蛍光顕微鏡や PET 撮影で体内動態を画像化する。

4. 研究成果

CD44 は肺がん、脳腫瘍、乳がん、膵臓が

ん、骨髄腫などのがん細胞や、肺がん、大腸がん、白血病、前立腺がんなどの幹細胞の特異的な表面抗原として知られている。CD44 は接着分子としてがん幹細胞の自己複製能を維持するために必要な因子の一つと考えられていることから人工がん幹細胞が細胞プレートへの接着を阻害する一本鎖抗体のセレクションを IVV 法により行った。一本鎖抗体の IVV が結合することで細胞プレートへ接着できない人工がん幹細胞 (AXT 細胞) を回収する方法でスクリーニングを行い、全部で7ラウンドの選択実験後、得られた2つのクローン AXT7-30 と AXT7-12 は AXT 細胞の細胞プレートへの接着を阻害し、免疫染色実験では AXT 細胞に結合していることが確認された。さらに WST-1 アッセイによる増殖阻害実験では濃度依存的に AXT 細胞の増殖を抑えた。CytoTox-Glo Cytotoxicity Assay により評価した結果、強い殺細胞活性を有し ($\text{IC}_{50}=3\text{nM}$)、AXT7-30 の方が3倍強い活性を有していた。両一本鎖抗体の抗原を探索する目的でまず CD44 に対する結合をビアコアにより調べるところ両者とも CD44 に対して強い親和性を示した。CD44 に対する親和性と各種生物活性の強さは相関していた。そこでこの一本鎖抗体 AXT7-30 を使って蛍光ラベル化抗体を作成した。tdTomato は非常に明るい赤色蛍光タンパク質であり、EGFP の 2.5 倍の蛍光強度を示す。tdTomato は、dTomato (dimeric Tomato) 遺伝子 2 つをタンデムにつなぎ合わせ、タンデム 2 量体を形成するよう設計されている。これにより非常に明るい蛍光シグナルが得られ、しかも凝集性は極めて低く抑えられている。tdTomato 蛍光ラベル化された AXT7-30 を用いて免疫染色したところ AXT 細胞を明瞭に蛍光観察することができた。一方正常細胞である WT 細胞を蛍光標識することはなく高い

特異性が認められた。現在この蛍光ラベル化一本鎖抗体の担がんマウス投与を実施中であり、二光子励起蛍光顕微鏡を用いた体内動態の画像化によりがん細胞への集積を解析中である。

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 3 件)

1. Doi, N., Yamakawa, N., Matsumoto, H., Yamamoto, Y., Nagano, T., Matsumura, N., Horisawa, K., Yanagawa, H. DNA display selection of peptide ligands for a full-length human G protein-coupled receptor on CHO-K1 cells, PLoS ONE, 7, 2012, e30084, 査読有, DOI:10.1371/journal.pone.0030084
2. Shiheido, H., Terada, F., Tabata, N., Hayakawa, I., Matsumura, N., Takashima, H., Ogawa, Y., Du, W., Yamada, T., Shoji, M., Sugai, T., Doi, N., Iijima, S., Hattori, Y., Yanagawa, H. A phthalimide derivative that inhibits centrosomal clustering is effective on multiple myeloma, PLoS ONE, 7, 2012, e38878, 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0038878
3. Sumida, T., Yanagawa, H., Doi, N. In vitro selection of Fab fragments by mRNA display and gene-linking emulsion PCR, J. Nucleic Acids, 2012, 2012, 371379, 査読有, DOI: 10.1155/2012/371379

[学会発表] (計 4 件)

1. Sato, R., Doi, N., Misumi, S., Shoji,

S., Matsushima, S., Yokochi, S., Yanagawa, H. *In vitro* evolution of high-affinity anti-CCR5 single chain Fv via neutral drift libraries, 34th MBSJ 2011, Dec. 13, 2011, Yokohama

2. Umezawa, H., Tabata, N., Sakuma, Y., Takenaka, Y., Matsumoto, Y., Doi, N., Nagano, O., Saya, H., Yanagawa, H. *In vitro* selection of anti-CD44v scFv inhibiting CD44v-xCT interaction, 34th MBSJ 2011, Dec. 13, 2011, Yokohama
3. Mihara, M., Sumida, T., Sakuma, Y., Tabata, N., Horisawa, K., Yanagawa, H., Doi, N. *In vitro* selection of Fc receptor-binding peptides using in vitro virus method, 34th MBSJ 2011, Dec. 11, 2011, Yokohama
4. Tabata, N., Sakuma, Y., Shimizu, T., Saya, H., Doi, N., Yanagawa, H. Selection of scFv inhibiting adhesion of induced cancer stem cells by *in vitro* virus (IVV) method, 34th MBSJ 2011, Dec. 13, 2011, Yokohama

[図書] (計 2 件)

1. Doi, N., Kakukawa, K., Oishi, Y., Yanagawa, H. John Wiley & Sons Ltd., High solubility of random-sequence proteins consisting of five kinds of primitive amino acids, IN: Chemical Synthetic Biology, 2011, pp.121-138
2. Horisawa, K., Yanagawa, H. InTech, The Musashi proteins in neural stem

cell/progenitor cells, IN: Neural Stem
Cells and Therapy, 2011, pp. 205-222

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳川 弘志 (YANAGAWA HIROSHI)

慶應義塾大学・理工学部・訪問教授

研究者番号 : 40327672

(2) 研究分担者

田島 典子 (TABATA NORIKO)

慶應義塾大学・理工学研究科・特任准教授

研究者番号 : 60260080