

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5月28日現在

機関番号：32413

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659304

研究課題名（和文） 血液悪性腫瘍のリン酸化蛋白質発現プロファイルシステムの構築

研究課題名（英文） Classification of hematologic malignancy by relationship between cancer and expression of human cellular phosphoprotein.

研究代表者

元藤 陽子 (MOTOFUJI YOKO)

文京学院大学・保健医療技術学部・助手

研究者番号：00458556

研究成果の概要（和文）：

抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体群とヒト白血病細胞株との反応を基板として血液悪性腫瘍患者組織・細胞と抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体群との反応性を検討した。(1)約600種の抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体のうち110種の抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体がホルマリン固定細胞および組織に反応することが確認できた。これら抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体の中から腫瘍特異性が認められたものについてその抗原特異性の同定を試み、一部の抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体についてはその同定を完了した。(2)抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体の認識抗原と同分子の機能との関連性をヒト白血病細胞株を用いて検討した。抗がん剤の奏効と血液学的特殊染色性から、T細胞系については抗がん剤の奏効に関連した分子である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

On the basis of the reaction of the human leukemia cell lines with anti-phosphoprotein monoclonal antibodies, the reactivity of anti-phosphoprotein monoclonal antibodies was investigated using cells of hematologic malignancy. The 110 anti-phosphoprotein monoclonal antibodies reacted with reactivity to formalin-fixed tissues and cells. A part of them had tumor specificity by immunohistochemical staining; the specificity of anti-phosphoprotein monoclonal antibody was identified by proteomics. To investigate the relationship between antigen molecule and leukemia classification, the effect of staining in hematology and of anticancer agents towards leukemia cell lines were examined. As the results, the antigen molecules anti-phosphoprotein monoclonal antibodies recognized related to the response of the anticancer agents towards T cell leukemia.

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 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：輸血学、免疫学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：モノクローナル抗体、リン酸化蛋白質、腫瘍検査、プロテオーム、血液悪性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

細胞内情報伝達には蛋白質リン酸

化・脱リン酸化反応が重要な役割を果たしている。また、種々の外界環

境からの入力センシングと細胞応答にも不可欠な機能を果たしており、その異常は様々な病態と関連している (Cancer Res, 2004 64:4749. Oncogene, 2006 25:1216-24.)。

申請者は、血液悪性腫瘍細胞中のリン酸化蛋白質の発現にも腫瘍毎に特徴があり、それを検討することにより腫瘍の同定、浸潤、抗がん剤の奏功や予後の推定について情報が得られる可能性があると考えた。そこで腫瘍細胞内の出来るだけ多くのリン酸化蛋白質を網羅的に検出するシステム構築のために、ヒト白血病細胞株から精製したリン酸化蛋白質画分に対する単クローン抗体 600 種を製作し、各抗体の反応性を多変量解析によって分析した。その結果、51 種類の抗体で 3 種 12 株 (T 細胞系腫瘍 8 種、B 細胞系腫瘍 2 種、骨髄細胞系腫瘍 2 種) の血液腫瘍細胞株を腫瘍種毎に明確に分類することに成功した。

紙面の都合上、51 種の全反応を示すことはできないが、その一部を抜

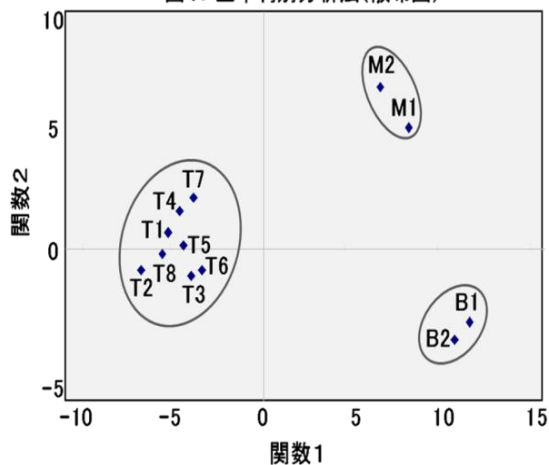
表1. 抗リン酸化蛋白質単クローン抗体の血液腫瘍細胞株との反応性

| 細胞株 | No | 179 | 173 | 9 | 273 | 503 | 219 | 86 | 342 | 73 | 160 |
|----------|----|-----|-----|---|-----|-----|-----|----|-----|----|-----|
| Tall-1 | T1 | 0 | 2 | 0 | 2 | 3 | 0 | 4 | 0 | 0 | 2 |
| Jurkat | T2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 4 | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| HPB-ALL | T3 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 | 0 | 4 | 2 | 0 | 3 |
| CCRF-CEM | T4 | 3 | 1 | 0 | 3 | 2 | 0 | 3 | 0 | 3 | 2 |
| HPB-MLT | T5 | 0 | 3 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 |
| H9 | T6 | 0 | 1 | 0 | 1 | 3 | 2 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| HUT-78 | T7 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 2 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| HUT102 | T8 | 0 | 2 | 3 | 2 | 3 | 0 | 4 | 0 | 0 | 1 |
| Raji | B1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 | 3 |
| Daudi | B2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 | 0 | 3 | 0 | 4 | 2 |
| HL-60 | M1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 | 2 | 3 | 1 |
| K-562 | M2 | 0 | 1 | 0 | 2 | 4 | 2 | 4 | 0 | 0 | 2 |

T1~T8: T細胞系, B1~B2: B細胞系, M1~M2: 骨髄球系

XXX: 単クローン抗体番号, 0: 陰性, 1~4: 最弱陽性~強陽性

図1. 正準判別分析法(散布図)



粋して表 1 に示す。表 1 の抗体の反応性 (反応の強さ、1~4: 最弱陽性から強陽性) と腫瘍種 (No.: T1~8, B1~2 および M1~2) との相関性を多変量解析の一種である正準判別分析法を用いて解析し、最も判別率が高くなる抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体の組合せ (51 種) を選び出し、散布図として示したものが図 1 である。図 1 では 3 種 12 株が腫瘍種毎に集まってグループ化された (同じ腫瘍種の細胞株が同一円内にプロットされた)。

これらの結果は『各々は腫瘍種特異性が低い抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体でも、それらの反応性を多変量解析処理することにより「腫瘍」を明確に区別できる』ことを示唆している。更に『腫瘍の個性 (抗がん剤の奏功、予後、再発、浸潤) のデータをリン酸化蛋白質発現プロファイルとリンクさせデータベース化することにより、「個々の腫瘍の個性」をも予測できるシステム構築の可能性』を示唆している。

2. 研究の目的

ヒト白血病細胞株から精製したリン酸化蛋白質をマウスに免疫し、網羅的に作出した 600 種余りの抗ヒトリン酸化蛋白質単クローン抗体を用いて、血液悪性腫瘍 (白血病、悪性リンパ腫、骨髄腫) 患者の腫瘍細胞のリン酸化蛋白質発現プロファイルを作成する。これに患者個々の腫瘍の個性 (抗がん剤の奏功、予後、再発、浸潤) データを加え多変量解析処理の後データベース化し、「個々の腫瘍の個性」を予測できるシステムの構築を本研究の目的とする。そのための基礎的な検討として以下の 3 点を先行して実施する。

(1) 血液悪性腫瘍患者組織・細胞の抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体との反応性の検討について

600 種の抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体はメタノール固定細胞との反応性を基に選別されたものであるため、ホルマリン固定組織・細胞との反応性を検討した。

(2) 抗体の特異性の同定について

600 種の抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体の特異性を同定することにより、腫瘍をグループ分

けできた抗原分子を確認する。また、その中には腫瘍特異性を有する可能性もあることから、新規の腫瘍マーカーとしての意義を明らかにすることを目的に抗原同定を実施する。

(3) ヒト白血病細胞株を用いた抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体の認識抗原関連性状の検討について

予備的な実験として抗原分子の持つ機能について血液学的特殊染色性と抗がん剤の奏効について検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞と標本作成

血液腫瘍細胞株である Tall-1、Jurkat、HPB-ALL、CCRF-CEM、HPB-MLT、H9、HUT-78、HUT-102、Raji、Daudi、HL-60、K-562 の 12 種の各細胞株を 10% 牛胎児血清を含む RPMI-1640 培地により 6% CO₂、湿度 100% 下で培養した。標本は遠心 (3,000rpm、3 分) により集めた細胞に適量の血漿 (AB 型血漿) を加え細胞浮遊液を作製した。血液塗抹標本同様、適量スポイトでスライドガラスの端に塗布し引きガラスで塗抹した後、1 時間以上乾燥させた。

(2) 染色法

メイギムザ染色は常法に従って染色を行った。ペルオキシダーゼ (POD) 染色は、武藤化学・PO 染色キットを用いた。基質には 2,7-フローレンジアミンを使用し染色を行った。更にエステラーゼ (EST) 染色では、特異的 EST (S-EST) に武藤化学・エステラーゼ AS-D 染色キットを用い、基質には naphthol AS-D chloroacetate (NASDCA) を使用した。一方、非特異的 EST (N-EST) および NaF 阻害 N-EST については、武藤化学 エステラーゼ 染色キットを用い、 α -Naphthyl butyrate (α -NB) を基質として使用した。

(3) 間接蛍光抗体法

間接蛍光抗体法用 MOLT-4 細胞を塗布したスライドガラスに一次抗体としてハイブリドーマ培養上清を室温で 1 時間、遮光できる湿潤箱中で反応させた。次に、PBS で 10 分間洗浄後、二次抗体として fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウ

ス IgG (H+L) 抗体を室温で 1 時間、湿潤箱中で反応させた。再び PBS で 10 分間洗浄後、50% 無蛍光グリセリン-PBS とカバーガラスで封入した後、蛍光顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(4) ウェスタンブロット法

抗原として RIPA Buffer (50 mM Tris/150 mM NaCl/0.5% Sodium deoxycholate/0.1% SDS/1% NP-40/, pH 8.0) により可溶化した MOLT-4 細胞可溶画分 (2x10⁷ 個/ml) を用いた。可溶化に使用した RIPA buffer には蛋白分解酵素を添加して使用した (Complete Mini EDTA-Free, Roche Applied Science)。得られた可溶画分に SDS-PAGE 用サンプルバッファーを等量加え 3 分間煮沸後、Laemmli の方法により 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った (定電流 30mA)。分画した蛋白質をセミドライ法により PVDF 膜へ転写した後、1% ウシ血清アルブミン (BSA) で 4°C、一晩ブロッキングした。PBS で洗浄後、抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体を含むハイブリドーマ培養上清と同膜を室温で 1 時間振盪させた後、4°C、一晩反応させた。洗浄緩衝液 (0.01% Tween20-PBS) で 5 分間、3 回洗浄後、ペルオキシダーゼ (POD) 標識抗マウス IgM 抗体と室温で 45 分間反応させた。膜を洗浄緩衝液及び PBS でそれぞれ 5 分間、計 3 回洗浄し、化学発光キット (GE ヘルスケア・ジャパン、東京) で処理し、暗室で X 線フィルムに感光後現像した。

(5) 免疫沈降法

1 ml の抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体に RIPA buffer で平衡化したプロテイン-L・アガロースビーズ (25% 溶液) を 20 μ l 添加し、ロータリーシェーカーで 4°C、2 時間反応させた。反応後、5 回遠心洗浄し (2500rpm, 5 min)、プレクリーニングした細胞可溶画分を 200 μ l 添加し、ロータリーシェーカーで 4°C、一晩反応させた。反応後、ビーズについて 5 回の遠心洗浄を行った。得られたビーズに SDS-PAGE 用サンプルバッファーを 25 μ l 加え 3 分間煮沸し、泳動用サンプルとした。その後、常法に従ってウェスタンブロット法で検討した。

(6) 組織・細胞染色

① HE 染色

常法に従って行った。概略を以下に示す。組織標本スライドを脱パラフィン化、流水水洗後、純水に通しマイヤーのヘマトキシリンで3分間染色した。流水水洗3分後、純水を通しエオジンで7分間染色した後、80%エタノール1分間、90%エタノール1分間、純エタノール3分間3回で脱水処理を行った。最後にキシロール3分間3回で透徹処理を行い封入した。

② 免疫組織染色

アビジン-ビオチン標識酵素複合体(ABC)法

脱パラフィン化、次いで流水水洗後、抗原賦活化処理液(クエン酸緩衝液)中に浸した組織標本を電子レンジで抗原賦活化処理した。その後、内因性ペルオキシダーゼを不活化するために3%過酸化水素-メタノール溶液で10分間処理を行った。水洗後、抗体の非特異的な結合を防ぐため、ブロッキング試薬溶液(正常ウマ血清)を滴下し、湿潤箱中で30分間反応後、トリス-PBS (TPBS)でブロッキング液を洗浄した。その後、希釈した抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体を滴下し、室温で一晩反応させた。TPBSで3回洗浄後、ビオチン化抗マウス IgG(H+L)抗体を30分間反応させ、更にTPBSで同様に洗浄してからアビジン標識 POD 複合体試薬を30分間反応させた後、同様に洗浄した。次にジアミノベンチジン(DAB)溶液を滴下して10分間反応させた後、流水水洗してマイヤーのヘマトキシリンで核染色(対比染色)した。脱水、透徹、封入はHE染色と同様に行った。

(7) 統計解析

統計解析ソフト SPSS Ver. 19 (IBM. 東京) を用いて行った。多変量解析法の1つである正準判別分析を用いて解析し、血液悪性腫瘍診断に有用と考えられる抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体の組合せを検討した。

4. 研究成果

(1) 血液悪性腫瘍患者組織・細胞の抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体との反応性の検討

免疫組織染色を前提にホルマリン固定細胞についての抗リン酸化

蛋白質モノクローナル抗体の反応性を検討し、約110種の抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体においてホルマリン固定細胞および組織に対応が可能であった。また、これらの中に腫瘍特異性を有するものもみられた。

(2) 抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体の特異性の同定

(1)の腫瘍特異性を有する抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体と白血病細胞株との反応をウェスタンブロット法、免疫沈降法およびプロテオミクス解析法を用いて抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体が認識する抗原を同定した(分子量、その他の情報は現時点では非公開とする)。

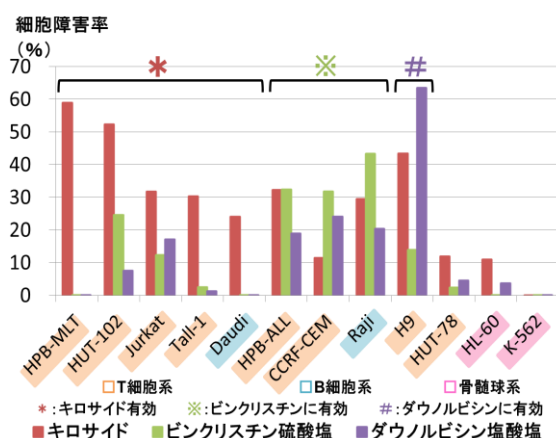
(3) ヒト白血病細胞株を用いた抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体の認識抗原関連性状の検討

全ての抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体の抗原特異性を同定することは長時間を有することから予備的な実験として抗原分子の

表2. 各種細胞の血液学的染色性

| 細胞 | メイギムザ染色 | POD染色 | N-EST染色 | | S-EST染色 | |
|------|----------|---------------------|---------|-------|---------|----|
| | | | 阻害(-) | NaF阻害 | | |
| T細胞系 | Tall-1 | N/C比 高 クロマチン構造が網 | 0% | 10% | - | 0% |
| | Jarkat | 核周明瞭あり N/C比 高 | 0% | 0% | - | 0% |
| | HPB-ALL | 細胞質が好塩基性 | 0% | 33% | - | 0% |
| | HPB-MLT | N/C比 高 | 0% | 27% | - | 0% |
| | CCRF-CEM | 核小体あり 細胞質が好塩基性 | 0% | 17% | - | 0% |
| | H9 | 核周明瞭あり 細胞質が好塩基性 | 0% | 21% | - | 0% |
| | Hut-78 | 核周明瞭あり 細胞質が好塩基性 | 0% | 26% | - | 0% |
| | Hut-102 | 核小体あり 細胞質が好塩基性 | 0% | 11% | - | 0% |
| B細胞系 | Raji | 核小体あり | 0% | 0% | - | 0% |
| | Daudi | N/C比 高 | 0% | 0% | - | 0% |
| 骨髄系 | HL-60 | 核小体あり アズール顆粒多数 | 96% | 12% | + | 9% |
| | K-562 | 核小体あり | 0% | 51% | - | 0% |

図2. 抗がん剤による細胞障害性テスト



持つ機能について血液学的特殊染色性と抗がん剤の奏効について検討した(表2、図2)。抗がん剤の奏効性については、T細胞系のH9細胞で唯一、ダウノルビシンだけが有効であったことを除けば、他のT細胞系の細胞はキロサイドの奏効が認められた。また、B細胞系や骨髄系の細胞における抗がん剤の奏効については共通性を見いだせなかった。一方、血液学的染色性はリンパ系細胞の染色性はほぼ妥当であるものの、骨髄系の細胞株の2種については典型的な染色性を示してはいなかった。これらの結果からT細胞系について抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体の認識抗原は、抗がん剤の奏効に関連した分子であるかも知れない。

(4) 血液悪性腫瘍患者と抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体との反応性の検討

現在に至っても抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体と血液悪性腫瘍患者の組織等との反応性の本格的な検討に至っていない。この点においては今後も引き続き継続し患者リン酸化蛋白質プロファイルの完成を急ぎたい。

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4件)

(1) 小松博義、小寺義男、元藤陽子、抗リン酸化蛋白質抗体が認識する新たな腫瘍特異抗原の探索と同定(Ⅱ)、文京学院大学総合研究所紀要、査読無、第13号、2012、229-238.

(2) Motofuji Y, Saito A, Koike M, Kodera Y, Maeda T, Komatsu H. Potential of classification of cancer by multiple discriminant analysis for relationship between cancer and expression of human cellular phosphoprotein, 査読有, Biomedical Research, Vol. 33, 2012, 139-143.

(3) 元藤陽子、新規がんプロテオミクスの開発「抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体群による新規疾患診断法」、北里大学大学院理学研究科、査読有、博士論文、2012.

(4) 元藤陽子、小寺義男、小松博義、抗リン酸化蛋白質抗体が認識する新たな腫瘍特異抗原の探索と同定(Ⅰ)、文京学院大学総合研究所紀要、査読無、第12号、2012、245-252.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

元藤 陽子 (MOTOFUJI YOKO)

文京学院大学・保健医療技術学部・助手
研究者番号：00458556

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小松 博義 (KOMATSU HIROYOSHI)

文京学院大学・大学院保健医療科学研究科・教授

研究者番号：30170377

小池 盛雄 (KOIKE MORIO)

文京学院大学・大学院保健医療科学研究科・教授

研究者番号：00089989

小寺 義男 (KODERA YOSHIO)

北里大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：60265733