

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640077

研究課題名(和文) 膵癌、肝癌特異的分子マーカーの同定とその抗体

研究課題名(英文) Identification of novel biomarkers for pancreatic and liver cancer

研究代表者

長谷川 光一 (Hasegawa, Kouichi)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・講師

研究者番号：50378890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌は自覚症状が乏しく早期発見が困難で、5年後の生存率は約5%と最下位である。膵癌における診断マーカーにCA19-9等が使用されているが、特異性が低く早期の検出も困難なため、新規マーカーが求められている。

我々は、ヒト多能性細胞(iPS細胞やES細胞)から分化させた膵前駆体細胞が膵癌細胞と似ていることを利用し、新規の細胞表面マーカーGCTM-5を発見した。しかし、GCTM-5は一部の肝癌細胞も検出してしまうため、GCTM-5抗原複合体に含まれる分子群の解析によるより特異的な分子の同定と新たなマーカー抗体の産生に挑戦した。その結果、膵癌・肝癌に特異的な分子群の同定と新規抗体を作製出来た。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer has almost no symptoms and is difficult to diagnose in early phase. Therefore, the survival rate after 5 years of diagnosis is approximately 5% and worst among cancers. Although several pancreatic cancer markers, such as CA19-9, are used for diagnosis, the markers are less specific and difficult to use for early phase of the cancer. In previous study, we have developed novel pancreatic cancer marker GCTM-5 by utilizing similarity between pancreatic cancer and pancreatic progenitors differentiated from human pluripotent stem cells. However GCTM-5 also marks some of liver cancer. Therefore we challenged identification of components of GCTM-5 antigen complex in pancreatic and liver cancers, and development of more specific marker antibodies. Through this project, we have identified molecules specifically expressed in GCTM-5-positive pancreatic or liver cancer, and developed new antibodies recognize pancreatic cancer.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：腫瘍診断 腫瘍マーカー 抗体 膵癌 胆管癌

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は沈黙の癌と呼ばれ、自覚症状が乏しく、早期発見が困難で5年後の生存率は約5%にすぎず最下位である。膵癌における診断マーカーにCA19-9等があるが、特異性が低く、早期の癌の診断は難しい。このことは、診断や治療、研究の大きな妨げとなっている。このため、診断や標的医療を可能とする新規マーカーが求められている。特に細胞表面マーカーは、標的医療や癌細胞の単離にも利用でき、癌の治療や癌細胞の研究への貢献も大きいいため、強く求められている。

近年、ヒト多能性幹細胞(ES細胞やiPS細胞)が発見され、ヒトの発生を生体内で一部模倣することが可能となった。申請者は、癌幹細胞と発生段階の組織前駆細胞に類似点が多いことに着目し、ヒト多能性幹細胞から分化途中の細胞に対するマーカーを得られれば、癌幹細胞を特異的に認識することが可能ではないかと考えた。この仮説に基づいて前駆細胞をマウスに免疫し、抗体作製を行い、膵癌の早期の癌細胞表面を認識する新規の抗体GCTM-5を得た(引用文献①)。

しかしGCTM-5は、一部の肝癌(胆管癌)も認識し(図1)、CAC19-9同様、抗原の一部が細胞外に解離するため、診断や標的医療には限界があった。申請者は、GCTM-5抗原を含む複合体が、膵癌と肝癌で異なることを見出したため、GCTM-5複合体を解析し、癌の種類に特異的な分子が得られれば、診断や標的医療に応用可能な新規マーカーを同定できると考えた。

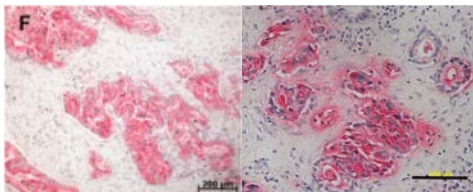


図1. 膵管癌(左)と胆管癌(右)の病理切片のGCTM-5免疫染色。赤く染色された部分がGCTM-5陽性。引用文献①より抜粋

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌および肝癌(胆管癌)の早期診断や標的治療に応用可能なバイオマーカーの同定である。具体的には(1)膵癌と肝癌におけるGCTM-5抗原複合体に含まれる分子群の解明、(2)その分子に対するモノクローナル抗体の作製、(3)膵癌や肝癌における抗体の特異性の検定を行うこととした。また、(1)で解明した分子に既存の良い抗体がある場合は、これも(3)に含めることとした。これらにより、膵癌や肝癌の診断や標的治療に応用可能な新規バイオマーカーの同定に挑戦した。

### 3. 研究の方法

(1)膵癌、肝癌GCTM-5抗原複合体分子群の同定

#### ① GCTM-5アフィニティーカラムの作製

ハイブリドーマからGCTM-5抗体を精製し、アフィニティーカラムを作製し、以下の研究に用いる。

#### ② 膵癌GCTM-5抗原複合体分子群の同定

膵癌の約90%は膵管癌である。申請者は、ヒト膵管癌由来CFPAC-1細胞株にGCTM-5陽性細胞が含まれることを見出している。膵癌におけるGCTM-5抗原複合体分子群を同定するために、他の膵癌細胞株も同定し、これらの細胞からGCTM-5陽性と細胞をソートし、細胞膜分画を可溶化、粗精製したのち、①のカラムでGCTM-5抗原複合体を精製する。これらの複合体に含まれる分子をLC-MSで同定する。

#### ③ 肝癌GCTM-5抗原複合体分子群の同定

肝癌におけるGCTM-5抗原複合体の精製には、肝細胞と胆管細胞への分化能を維持したヒト肝癌由来HepaRG細胞株を用いる。分子群の同定方法は、膵癌の場合と同様に行う。

#### ④ GCTM-5抗原複合体に含まれる各分子の解析と精製

②と③で得られた分子群について、既知の抗体が入手可能な場合は、免疫染色とウエスタンブロットによりGCTM-5陽性癌細胞への特異性を検討する。特異性が見られたものはさらに解析を進める。残った分子群は、「膵癌特異的分子」「肝癌特異的分子」「特異性不明な分子」「修飾がない限り特異性の低い(無い)分子」に分類する。これらの分子に対して抗体を作製するために、各分子の精製法を検討し、大量精製を行う。(精製が困難な場合は粗精製でも大量精製する)

#### (2)GCTM-5抗原複合体各分子に対するモノクローナル抗体の作製(研究協力者Pera教授)

##### ① GCTM-5抗原複合体の各分子に対するハイブリドーマライブラリの作製

(1)で同定した各分子に対する抗体を得るために、精製した分子(群)を研究協力者であるPera教授に送付し、マウスに免疫し、ハイブリドーマライブラリを作製する(修飾された分子の可能性があるためファージディスプレイは用いない)。申請者は、精製分子が不足する場合は再精製し、送付する。

##### ② 精製分子を用いたライブラリのスクリーニング(1次スクリーニング)(Pera教授)

作製したハイブリドーマライブラリにおいて、免疫した分子(群)を認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別するために、ELISAベースのハイスループットスクリーニングを行う。このスクリーニングで陽性だったハイブリドーマの培養上清(抗体を含む)

は順次、申請者に送付される。

### (3) 膵癌、肝癌に対する抗体の特異性の検討

#### ① 細胞株を用いたスクリーニング(2次スクリーニング)

(2)で選別したハイブリドーマをさらに癌細胞特異的な抗体を産生するものに絞り込むため、CFPAC-1およびHepaRG細胞に対して、ハイブリドーマ上清と GCTM-5 抗体との共染色を行い、陽性のものを選別する。

#### ② 癌細胞組織アレイによる特異性の検討(3次スクリーニング)(研究協力者 Sarkar 研究員)

①で選別したハイブリドーマの上清を用いて、各種正常組織と各種臓器由来癌組織が含まれる組織アレイにて、組織および癌細胞特異性を簡便に検討する。特異性が見られたものについては、さらに癌組織の種類や、癌の進行過程のサンプルを増やし、他のマーカーとも発現パターンを比較し、詳しく解析する。

#### (4) バイオマーカーの同定(研究協力者との共同研究)

得られた抗体を用いてその抗原分子を精製し、分子の同定や特異的な修飾の有無等を解析する。また、抗体を用いて患者組織から陽性細胞を単離し、網羅的遺伝子発現解析や増殖、分化等を解析し、バイオマーカー発現細胞の特徴を調べる。

## 4. 研究成果

### (1) 膵癌、肝癌 GCTM-5 抗原複合体分子群の同定

#### ① GCTM-5 アフィニティーカラムの作製

ハイブリドーマを培養し、GCTM-5 抗体を精製後、アフィニティーカラムを作製した。

#### ② 膵癌 GCTM-5 抗原複合体分子群の同定

数株の膵癌細胞株を入手し、CFPAC-1 以外に SW1990 細胞株も用いることとした。GCTM-5 陽性細胞をソートし、膜分画を粗精製しアフィニティーカラムでの GCTM-5 抗原複合体の精製を試みた。その結果 GCTM-5 複合体はネ可溶化が極めて困難であり、アフィニティーカラムからの溶出効率も低く、大量の細胞が必要となることがわかった。また、その分子量は 800kD と極めて大きく、粘性も高く、非常に扱い難い分子であることが分かった。大量の細胞を用意し、精製した抗原複合体を LC-MS で解析可能となったものの、プロテオミクス解析では MUC3 や FcGBP 等の広く発現し特異性の低いタンパク質しか検出できなかった。このことから糖鎖が主な成分と考えられたため、糖鎖アレイを用いて糖鎖成分の解析を試みた。しかし、sialyl Lewis A に僅かのシグナルが得られたものの、優位で特異的なシグナルは得られなかった。

### ③ 肝癌 GCTM-5 抗原複合体分子群の同定

肝細胞と胆管細胞への分化能を維持したヒト肝癌由来 HepaRG 細胞株を入手し、未分化状態と肝と胆管に分化させ、GCTM-5 の発現を調べたが、いずれの細胞も陰性であった。そこで、様々な胆管癌細胞を入手し、GCTM-5 の発現を検討したところ、HuCCT や YSCCC、KKU-156 等のいくつかの細胞株では GCTM-5 陽性細胞が含まれることが分かった。これらの細胞から GCTM-5 陽性細胞をソートし、膵癌の場合と同様にプロテオミクス解析、糖鎖アレイ解析を行ったが、膵癌の場合と結果に違いは見られなかった。

#### ④ GCTM-5 抗原複合体に含まれる各分子の解析と精製

②と③で得られた結果から、可溶化の段階でそれぞれの複合体に特異的な分子を失っていることが推測された。このため、生化学的手法から分子生物学的手法に変更して膵癌・胆管癌に特異的な分子群の同定を試みた。CFPAC-1 と SW1990 膵癌細胞株と KKU-156 と KKU-214 胆管癌細胞株について、GCTM-5 陽性細胞と陰性細胞をそれぞれソートし、RNAseq による遺伝子発現解析を行った。GCTM-5 陽性細胞に特異的に発現している遺伝子群について、膜タンパク及び細胞外タンパク質をコードしている遺伝子に絞り込み、「GCTM-5 陽性癌細胞に共通」、「GCTM-5 陽性膵癌特異的」、「GCTM-5 陽性胆管癌特異的」な細胞表面タンパク質をコードする遺伝子群を同定した(図2)。しかし、これらの遺伝子数はそれぞれ数十と多いことと、タンパク質成分以外の特異的な分子はこの方法では得られないことから、これ以上の解析は難しかった。

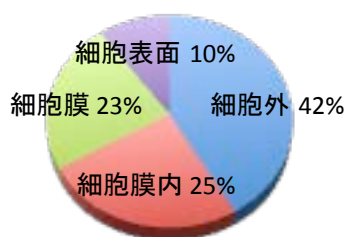


図2.抽出したGCTM-5陽性癌細胞特異的な細胞表面タンパク質をコードする遺伝子の産物局在内訳

### (2) GCTM-5 抗原複合体各分子に対するモノクローナル抗体の作製(研究協力者 Pera 教授)

#### ① GCTM-5 抗原複合体の各分子に対するハイブリドーマライブラリの作製

(1)の可溶化、溶出条件の検討に長い時間がかかり、かつ有意なものが得られない可能性が高かったため、当初の予定を変更し、膵癌と胆管癌の細胞株からアフィニティーカラムで直接粗精製した GCTM-5 抗原複合体を直接マウスに免疫し、ハイブリドーマのスクリーニングでそれぞれに特異的なバイオマーカーを得ることにした。精製した抗原複合体

を研究協力者である Pera 教授に送付し、ハイブリドーマライブラリの作製をお願いした。

② 精製分子を用いたライブラリのスクリーニング(1次スクリーニング)(Pera 教授)

作製したハイブリドーマライブラリにおいて、免疫した分子(群)を認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別するために、ELISA ベースのハイスループットスクリーニングを行った。このスクリーニングによって少なくとも数十の陽性だったハイブリドーマクローンが得られた(現在さらに解析中)。

(3) 膵癌、肝癌に対する抗体の特異性の検討

① 細胞株を用いたスクリーニング(2次スクリーニング)

(2)で選別したハイブリドーマをさらに癌細胞特異的な抗体を産生するものに絞り込むため、CFPAC-1 および HuCCT-1 細胞に対して、ハイブリドーマ上清と GCTM-5 抗体との共染色を行い、陽性のものを選別した(図3)。その結果、現在までそれぞれ特異的な2クローンを得ている(現在も解析中)。

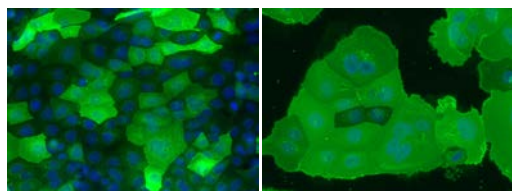


図3. 膵癌細胞株CFPAC-1(左)と胆管癌細胞株HuCCT-1(右)による新規抗体の免疫染色スクリーニングの例。緑蛍光染色された部分がGCTM-5陽性、青は核染色。

② 癌細胞組織アレイによる特異性の検討(3次スクリーニング)(研究協力者 Sarkar 研究員)

Pera 教授に①で選別したハイブリドーマの上清を Sarkar 研究員に送付を依頼した。Sarkar 研究員はこれが届き次第、組織アレイにて、組織および癌細胞特異性を簡便に検討する。特異性が見られたものについては、さらに癌組織の種類や、癌の進行過程のサンプルを増やし、他のマーカーとも発現パターンを比較し、詳しく解析する。

(4) バイオマーカーの同定(研究協力者との共同研究)

得られた抗体を用いてその抗原分子の同定に着手した。今後詳しい解析を行う。

<引用文献>

- ① Lincon A. Stamp, David R. Braxton, Jun Wu, Veronika Akopian, Kouichi Hasegawa, Parakrama T. Chandrasoma, Susan M. Hawes, Catriona McLean, Lydia M. Petrovic, Kasper Wangand and Martin F. Pera “The GCTM-5 epitope associated with the Mucin-like glycoprotein FCGBP

marks progenitor cells in tissues of endodermal origin” Stem Cells, 2012, 30(9) 1999-2009

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1件)

- ① Subhanwita Sarkar (Dey), Noriko Yoshida and Kouichi Hasegawa “Overview of pancreatic replacement of  $\beta$ -cells from various cell sources” Stem Cell Therapy for Organ Failures, Editor S. Indumathi, Springer press, 査読有、2014, 181-194

[学会発表] (計 件)

- ① Kouichi Hasegawa “Technical Innovation of Human Pluripotent Stem Cell Biology Towards Regenerative Medicine” University System Taiwan (UST) - Kyoto University, iCeMS International Symposium, National Chia Tung University, Hsinchu, Taiwan, November 17-19, 2013

- ② Subhanwita Sarkar, Noriko Yoshida, Alison Farley, Martin F Pera and Kouichi Hasegawa “Novel Cell Surface Marker for Pancreatic and Cholangio carcinoma” NCBS Annual Talks, National Centre for Biological Sciences, Bangalore, India, January 5-8, 2015

- ③ Kouichi Hasegawa “An Institutional Collaboration between iCeMS, Kyoto University, Japan and inStem-NCBS, India” India-Japan Science Seminar, Commemoration of the 30<sup>th</sup> Anniversary of India-Japan Science & Technology Cooperation, Indian Institute of Technology, New Delhi, India, February 26, 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 光一 (HASEGAWA, Kouichi)  
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・講師  
研究者番号：50378890

(2) 研究協力者

Martin F Pera (PERA, Martin F)  
メルボルン大学・教授  
Stem Cell Australia・リーダー

Subhanwita Sarkar (SARKAR, Subhanwita)  
インド国立幹細胞生物学再生医学研究センター(inStem)・研究員