

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07776

研究課題名(和文)1細胞ラビット組換え抗体作製技術を用いた新規がん幹細胞表面マーカー分子の探索

研究課題名(英文)Identification of novel cell surface antigens for cancer stem cells using single-cell technology

研究代表者

今野 大治郎 (Konno, Daijiro)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：00362715

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、我々がこれまで培ってきた、ラット腸骨リンパ節法を用いたモノクローナル抗体作製技術および1細胞ラビットモノクローナル組換え抗体作製技術を応用・発展させ、グリオーマ幹細胞および膵臓がん幹細胞をモデルとして、新規がん幹細胞表面マーカー分子の同定を試みた。その結果、これらの幹細胞の細胞表面抗原を特異的に認識する新規ラットモノクローナル抗体を複数単離することに成功し、新規の抗体医薬品およびがん免疫療法の開発シーズとなり得る抗体を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの多くの研究から、がん細胞およびがん幹細胞に発現する複数の細胞特異的の表面マーカー分子が同定されてきた。しかしながら、それらの多くは特異性の問題や、研究者間でデータに矛盾があったりするなどの理由から、医薬品開発までたどりついたものは非常に少数であるのが実情であった。我々が開発した新しいモノクローナル抗体作製プラットフォームは、高選択的な識別を可能とする新規モノクローナル抗体の樹立を可能とする技術であり、またさまざまな疾患細胞への適用が可能であることから、抗体による細胞表面抗原分子の認識を軸とした新しい医工学技術開発のブレイクスルーとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to identify novel cancer stem cell surface marker molecules using glioma stem cells and pancreatic cancer stem cells as models by applying and developing the monoclonal antibody production technology using the rat iliac lymph node method and one-cell rabbit monoclonal recombinant antibody production technology we have developed so far. As a result, we succeeded in isolating several novel rat monoclonal antibodies that specifically recognize the cell surface antigens of these stem cells, and obtained antibodies that could serve as seeds for the development of novel antibody drugs and cancer immunotherapy.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：抗体医薬品 モノクローナル抗体 組換え抗体 細胞表面抗原

## 1. 研究開始当初の背景

がん治療における大きな問題点の1つに、治療抵抗性細胞の出現によるがんの再発・転移が挙げられる。これら再発・転移現象には、腫瘍組織中に存在する“がん幹細胞”の関与が指摘されており、その性状を理解することは、がん幹細胞をターゲットとした新しい治療法の開発においても非常に重要な意味を持つ (Visvader and Lindeman, *Nat Rev Cancer*, 2008)。しかしながら、腫瘍組織中のがん幹細胞の数は非常に少ないことに加え、各種がん幹細胞を特異的に認識できる表面抗原認識抗体の少なさなどの理由から、これらの細胞を高精度で分離し、その性状を解析することは困難であった。よって、各種がん幹細胞およびその分化成熟段階を高精度に識別できる手法の開発は、がん治療法開発の基盤技術として正に待ち望まれている技術と言える。

細胞表面に発現する分子 (表面抗原) に対するモノクローナル抗体を用いた細胞識別法は、正常細胞に加えて老化細胞やがん細胞など異常が生じた細胞の分化状態なども高精度に検出することが可能な手法である。それらモノクローナル抗体の作製法として最もシンプルな方法は、標的とする細胞を“まるごと”免疫し、目的細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体をスクリーニングするといったものである。このシンプルかつ直接的なアプローチはカドヘリンの発見 (Shirayoshi et al, *Cell*, 1983) など、古くから多くの革新的な発見を導いている、高いポテンシャルを有する手法である。さらに近年では、がん細胞が放出するエクソソームなどに代表される細胞外小胞の検出や (Samanta et al, *Acta Pharmacologica Sinica*, 2018)、抗体の持つ抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC 活性) や抗体-薬剤複合対 (ADC) など利用した分子標的薬の開発など (Diamantis and Banerji, *British Journal of Cancer*, 2016)、単に細胞を識別する目的だけでなく、がん細胞など異常が生じた細胞の除去といった医学的応用など、モノクローナル抗体の重要性および必要性は年々高まっている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、新規がん幹細胞表面マーカー分子の探索により、難治がんの代表格である膵臓がんやグリオブラストーマなど、悪性固形がんの性状解析、早期発見、治療法の開発につながる新たな分子ツールを見出すことである。それを実現するための手段として、我々がこれまで培ってきた、ラット腸骨リンパ節法を用いたモノクローナル抗体作製技術および1細胞ラビットモノクローナル組換え抗体作製技術を本研究で応用・発展させ、新規がん幹細胞表面マーカー分子の同定を試みた。

本研究構想のポイントの1つは、異なる目的で開発されてきた最新の抗体作製技術を融合させ、既存の技術では見いだせていない新規マーカー分子の単離を試みるところにある。細胞をまるごと免疫し、その細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を単離する方法は、数十年も前から用いられてきた重要な細胞工学的手法である。しかしながら、モノクローナル抗体の作製に用いるミエロマ細胞がマウス由来であることから、抗体作製に用いる宿主動物はマ

ウスやラットもしくはその近縁種に限られてきた。そのため、細胞をまるごと免疫する手法においても、得られる抗体のバリエーションは多くなく、新規な表面抗原分子を得る方法としては限界があった。本研究では1細胞ラビット組換え抗体作製技術という、従来の細胞融合法を用いた方法とは全く異なる方法の開発・応用を基盤とし、従来のモノクローナル抗体作製法では困難であった組換え抗体の作製などにも応用可能な新技術である。

### 3. 研究の方法

本研究では以下に示した2つの実験計画を中心に進めた。

#### (1) ラット免疫ショットガン法を用いたウス人工グリオーマ幹細胞 (GIC) 特異的認識モノクローナル抗体の作製

本実験では免疫試験の抗原として用いるマウス人工グリオーマ幹細胞 (GIC : NSC61L) (Hide et al, *Stem cells*, 2011)を抗原とし、これまでにモノクローナル抗体の作製に多くの実績がある自己免疫疾患モデルラット(WKY)へ免疫し、細胞特異的抗体の産生を惹起させた。それら免疫動物から腸骨リンパ節法を用いてモノクローナル抗体を樹立し、生細胞蛍光免疫染色法およびFACS解析により、NSC61Lに特異的に反応するハイブリドーマクローンの取得を目指した。また先行研究から、NSC61細胞は腫瘍形成の有無を特徴とした複数のサブラインが単離・樹立されており、腫瘍形成能を持ち致死性の腫瘍を形成するサブライン6Bに反応し、かつ腫瘍形成の低いサブライン9Gに反応しないクローンを前述と同様に生細胞蛍光免疫染色法およびFACS解析により選抜した。加えて、得られた抗体を用いたウェスタンブロッティングによる分子量の推定、さらには免疫沈降による抗原の単離・精製による抗原分子の同定を試みた。

#### (2) ラビット免疫ショットガン法による膵臓がん幹細胞認識モノクローナル抗体の作製

本実験では免疫試験の抗原として用いるヒト膵臓がん幹細胞 (KMC細胞) (Shimizu et al, *PLoS One*, 2013)を抗原とし、げっ歯類と比較してより親和性の高い抗体を産生することが知られているラビットへ免疫し、我々がこれまでに確立した1細胞ピッキングシステムによるリンパ球の単離および抗体遺伝子クローニング法を用いて候補リンパ球のスクリーニングを行った。また、本実験で標的とする抗原分子は細胞膜表面に局在する分子のため、抗原をどのように多孔チャンバーに固相化するかが課題であった。抗原細胞そのものを多孔チャンバーに固相化することは不可能なため、抗原細胞から分泌されるエクソソームを抗原として利用するアイデアを検証した。またエクソソームを固相化するための最適な条件を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) ラット免疫ショットガン法を用いたウス人工グリオーマ幹細胞 (GIC) 特異的認識モノクローナル抗体の作製

脳腫瘍形成能の有無により選択された NSC 由来 GIC 細胞および non-GIC 細胞 (6B および 8B : GIC、9G および 10A : non-GIC、北海道大学・近藤亨博士より分与) を抗原としたモノクローナル抗体の作製により、GIC 細胞を用いた生細胞染色において強い反応を示す 2 クローンを得た (clone 5A10 および 5E4)。これらの抗体を用いた GIC 細胞の免疫染色では、どちらの抗体においても全細胞の細胞膜表面に染色シグナルが認められた (図 1) (data not shown)。興味深いことに、これらの染色は全細胞において均一ではなく、一部の細胞で非常に強いシグナルが認められた。さらに 5E4 抗体はヒトグリオーマ由来細胞株においても GIC に顕著な反応性を示す一方、non-GIC への反応性は認められなかった (data not shown)。これらの結果は、5E4 抗体がグリオーマ幹細胞をターゲットとした抗体医薬品シーズとしての高いポテンシャルを有していることを示唆している。

ウェスタンブロッティングによる解析から 5A10 抗体および 5E4 抗体はそれぞれ 80kDa および 70kDa の分子を認識することが明らかとなった (図 2) (data not shown)。また免疫沈降法による抗原分子の単離・精製にも成功したが、LC-MS/MS 質量分析法による解析では抗原分子の同定には至らなかった。これらの実験については期間終了後も引き続き継続して実施する計画である。

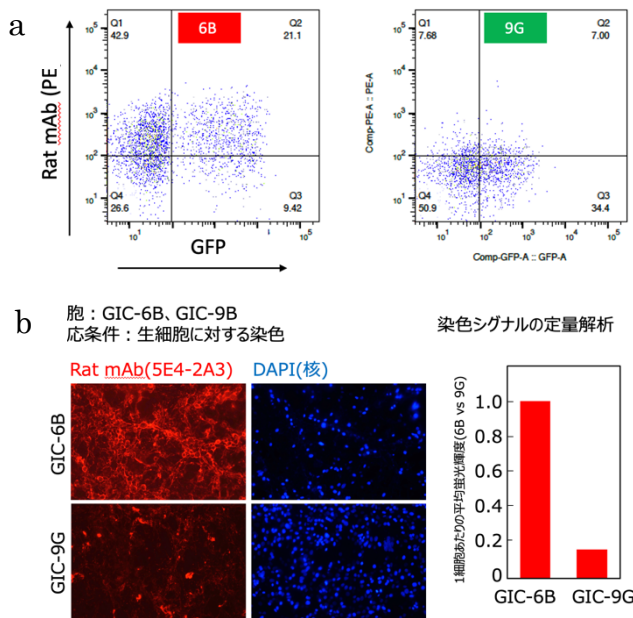


図 1. 人エグリオーマ幹細胞 (GIC) の免疫ショットガン法によるハイブリドーマクローン 5E4 の樹立

(a) クローン 5E4 産生抗体による FCM 解析。腫瘍形成能の高い GIC 細胞である GIC-6B への高い反応性が確認された。

(b) クローン 5E4 産生抗体を用いた生細胞蛍光免疫染色解析。抗体を未固定細胞で反応させたのち、蛍光標識二次抗体で可視化した。抗体が細胞表面に存在する抗原に反応していることが確認された。

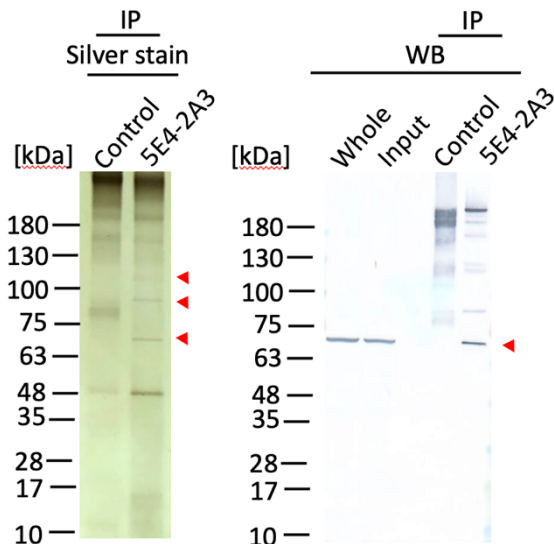


図 2. ウェスタンブロッティングによる 5E4 抗体認識抗原の同定と免疫沈降による抗原の単離・精製

(左) 免疫沈降産物の SDS-PAGE 電気泳動解析 (銀染色) では複数の特異的バンド (矢頭) が確認された

(右) 免疫沈降産物の Western blotting による解析により、約 70kDa の分子が抗原であることを確認した。

## (2) ラビット免疫ショットガン法による膵臓がん幹細胞認識モノクローナル抗体の作製

培養したヒト膵臓がん幹細胞 (KMC 細胞) をラビットへ免疫し、免疫動物の腸骨もしくは膝窩リンパ節からリンパ球を採取し、1細胞ピッキングシステム (図3) によるリンパ球を単離した。これらのリンパ球を用い、KMC 細胞より単離・精製したエクソソームを ① 直接固相化、② CD63 抗体固相化による捕捉、③ NHS を利用した捕捉、の各条件下で固相化することで抗原として提示させ、陽性細胞の出現頻度を検証した。その結果、条件①および②では陽性細胞が認められず、条件③のみでシグナルは弱いながらも複数の陽性細胞が認められた (図4)。これらの陽性リンパ球から得られた組換えモノクローナル抗体は KMC 細胞に対する生細胞免疫染色により細胞膜表面に局在する抗原を認識することが確認された (data not shown)。それと同時に、これらの抗体は KMC 細胞由来のエクソソームを認識することもドットプロット法により確認された (data not shown)。

これらの結果は、本研究で確立した免疫ショットガンアプローチとエクソソーム固相化を軸とした1細胞ピッキングシステムへの応用が、新規な細胞膜表面抗原を認識するモノクローナル抗体の単離に非常に強力なツールになることを示している。よって本手法は抗体医薬品や悪性腫瘍の早期発見を可能とする新規抗体開発の新しい道筋を提案する。

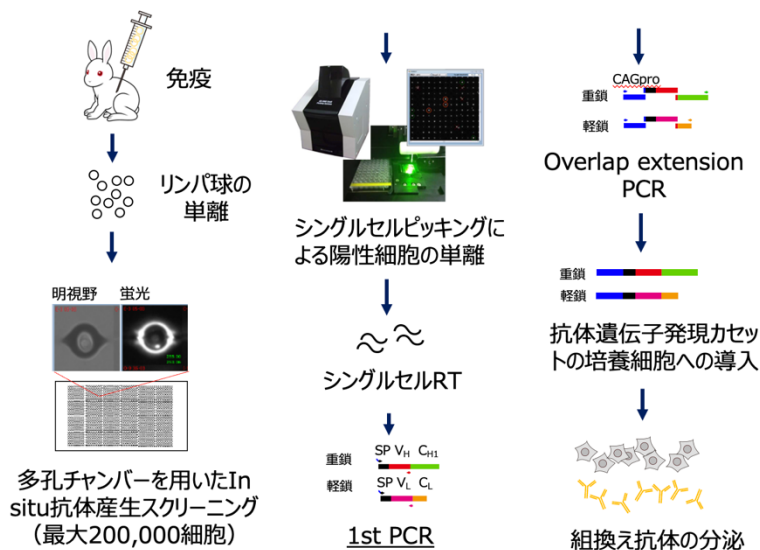


図3. シングルセルピッキングシステムによる目的抗体産生リンパ球の単離と抗体遺伝子単離の流れ

免疫動物より得られたリンパ球をあらかじめ抗原分子を固相化しておいた多孔チャンバーに入れ、陽性細胞を検出・単離する。単離した細胞から1細胞PCRにより抗体遺伝子を単離し発現ベクターへの挿入することにより、培養細胞で組換えモノクローナル抗体を産生させることが可能となる。

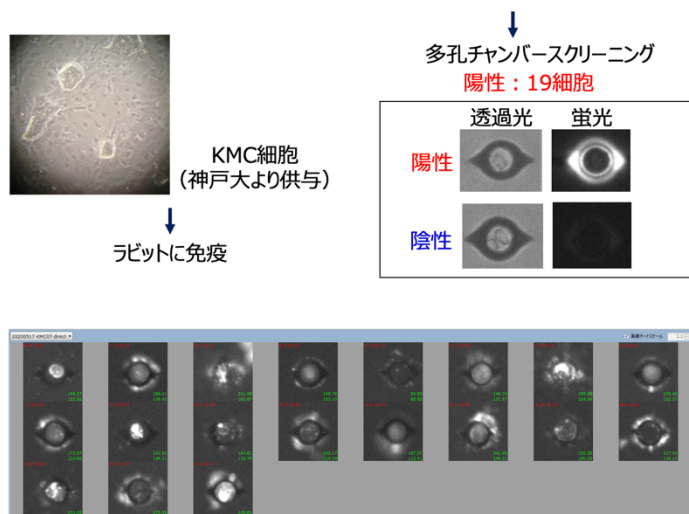


図4. 膵臓がん幹細胞エクソソームを抗原とした陽性リンパ球のスクリーニング

膵臓がん幹細胞 (KMC 細胞) を免疫したラビットから得たリンパ球を、KMC 細胞より調整したエクソソームを固相化した多孔チャンバーに入れ、陽性細胞をスクリーニング・単離した。この手法により、抗原細胞から分泌されるエクソソーム表面に局在する分子を認識する抗体を単離することが可能となった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Xu Liu, Ihara Kan-ichiro, Yoshimura Saori, Konno Daijiro, Tachibana Akira, Nakanishi Takeshi, Tachibana Taro	4. 巻 -
2. 論文標題 Generation of the Rat Monoclonal Antibody Against the Extracellular Domain of Human CD63 by DNA Immunization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	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） 10.1089/mab.2020.0007	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 Higashi Kiyoshi, Maeda Keiko, Miyata Kaori, Yoshimura Saori, Yamada Keita, Konno Daijiro, Tachibana Taro, Saito Koichi	4. 巻 42
2. 論文標題 Carbohydrate 3 -sialyllactose as a novel target for theranostics in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tumor Biology	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） 10.1177/1010428320965279	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 Yoshizaki Shingo, Tamaru Tetsuya, Hara Masamitsu, Kijima Ken, Tanaka Masatake, Konno Dai-jiro, Matsumoto Yoshihiro, Nakashima Yasuharu, Okada Seiji	4. 巻 18
2. 論文標題 Microglial inflammation after chronic spinal cord injury is enhanced by reactive astrocytes via the fibronectin/ $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	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） 10.1186/s12974-020-02059-x	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 Haruta Yohei, Kobayakawa Kazu, Saiwai Hirokazu, Hata Kazuhiro, Tamaru Tetsuya, Iura Hiroataka, Ono Gentaro, Kitade Kazuki, Kijima Ken, Iida Keiichiro, Kawaguchi Kenichi, Matsumoto Yoshihiro, Kubota Kensuke, Maeda Takeshi, Konno Dai-Jiro, Okada Seiji, Nakashima Yasuharu	4. 巻 12
2. 論文標題 Zinc chelator treatment in crush syndrome model mice attenuates ischemia/reperfusion-induced muscle injury due to suppressing of neutrophil infiltration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-022-19903-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tamaru Tetsuya, Kobayakawa Kazu, Saiwai Hirokazu, Konno Daijiro, Kijima Ken, Yoshizaki Shingo, Hata Kazuhiro, Iura Hirotaka, Ono Gentaro, Haruta Yohei, Kitade Kazuki, Iida Kei-Ichiro, Kawaguchi Ken-Ichi, Matsumoto Yoshihiro, Kubota Kensuke, Maeda Takeshi, Okada Seiji, Nakashima Yasuharu	4. 巻 359
2. 論文標題 Glial scar survives until the chronic phase by recruiting scar-forming astrocytes after spinal cord injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 114264 ~ 114264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2022.114264	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 Iura Hirotaka, Kobayakawa Kazu, Saiwai Hirokazu, Konno Daijiro, et, al.	4. 巻 37
2. 論文標題 Bone marrow derived fibroblast migration via periostin causes irreversible arthrogenic contracture after joint immobilization	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	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) 10.1096/fj.202201598R	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

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	立花 太郎 (Tachibana Taro) (80311752)	大阪公立大学・大学院工学研究科・教授  (24405)	

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