

2015 年度「プロジェクト未来」研究報告書

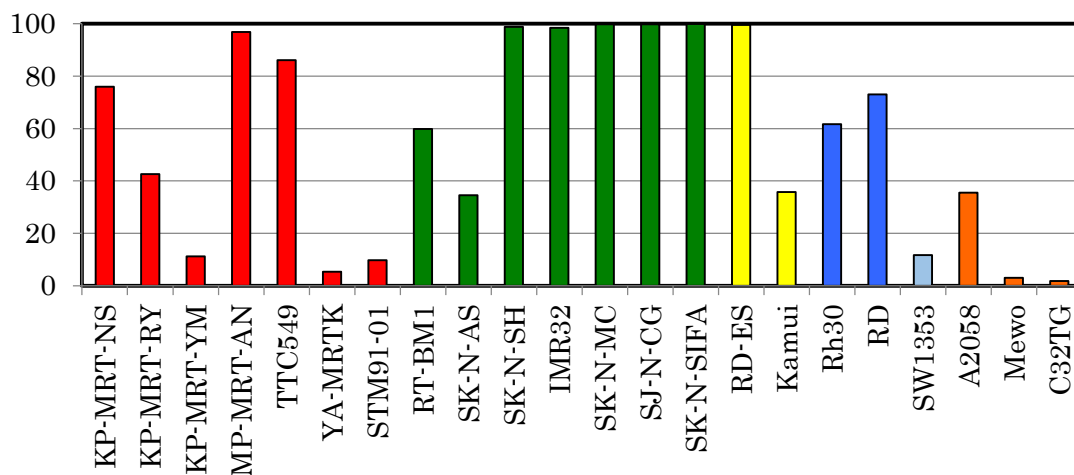
研究課題名：小児固形腫瘍共通の細胞表面抗原をターゲットとした新規抗体治療の開発

研究者：梅田雄嗣

所属：京都大学大学院医学研究科

小児悪性腫瘍の約 30%を占める小児固形腫瘍の予後は依然として不良である。特に神経堤細胞やその分化細胞を起源とする神経芽腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、骨肉腫、悪性ラブドイド腫瘍などの生存率は特に低く、新規治療の開発が望まれている。急性白血病、悪性リンパ腫では腫瘍細胞に発現している細胞表面抗原をターゲットとした抗体療法の有用性が報告されているが、小児固形腫瘍ではほとんど検討されていない。

申請者らは、ヒト ES 細胞から発生初期を模倣して小児固形がんの発生起源である神経堤細胞・間葉系細胞を選択的に発生・分化する培養システムを開発し、その分化過程において発現する様々な細胞表面抗原を同定した。次にこれら細胞表面抗原の発現についてフローサイトメトリーを用いて網羅的に検討した結果、悪性ラブドイド腫瘍、神経芽腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫など様々な小児固形腫瘍細胞株で CD146 が発現していた (図 1)。



【図 1】 様々な小児固形腫瘍細胞株における CD146 陽性細胞の占める割合。赤

は悪性ラブドイド腫瘍細胞株、緑は神経芽腫細胞株、黄はユーイング肉腫細胞

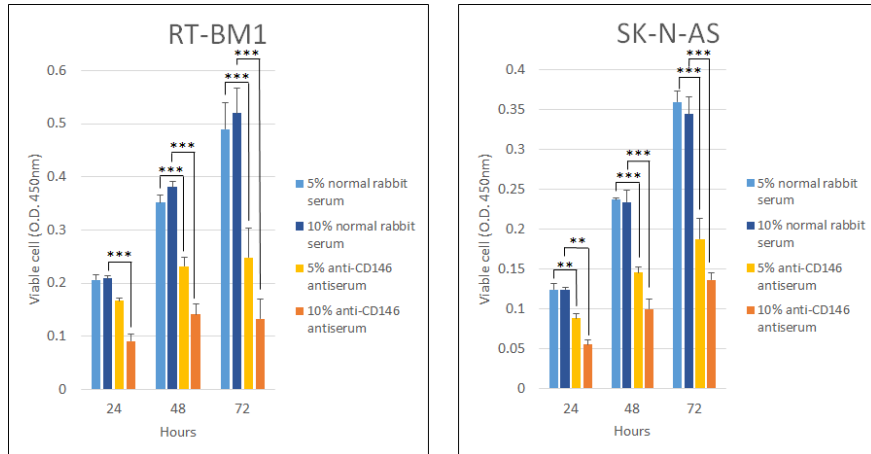
株、青は横紋筋肉腫細胞株、水色は軟骨肉腫細胞株、オレンジはメラノーマ細胞株を示す。

CD146 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞膜蛋白で、神経堤細胞および間葉系細胞に共通して発現する表面抗原である。CD146 は発生期における形態形成だけでなく、細胞間および細胞・組織間結合や細胞移動、シグナル伝達など多様な生理学的役割を担っている。また、CD146 はメラノーマを初めとする悪性腫瘍でも発現し、腫瘍増殖や腫瘍血管新生、転移に関与している。近年、申請者らは CD146 を発現している悪性ラズドイド腫瘍に対して抗ヒト CD146 ポリクローナル中和抗体が著明な *in vitro*・*in vivo* 抗腫瘍効果を示すことを明らかにした (Nodomi S, et al., 2016)。本研究では、種々の小児固形腫瘍に共通した新規抗体療法の確立を目的として、(1)抗ヒト CD146 ポリクローナル抗体による小児固形腫瘍（特に神経芽細胞腫）の増殖抑制効果、(2) 抗ヒト CD146 モノクローナル抗体の開発について検討した。

(1)抗ヒト CD146 ポリクローナル抗体による小児固形腫瘍（特に神経芽細胞腫）の増殖抑制効果

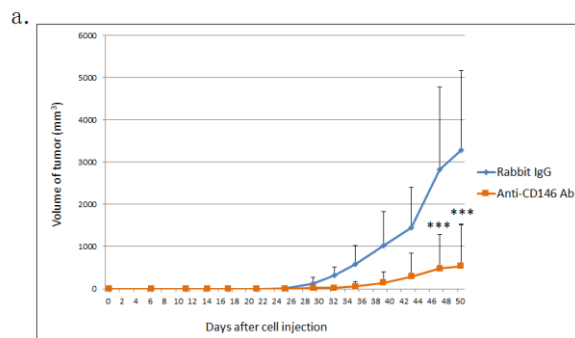
WST-8 アッセイを用いて *in vitro* 細胞増殖能を検討すると、抗ヒト CD146

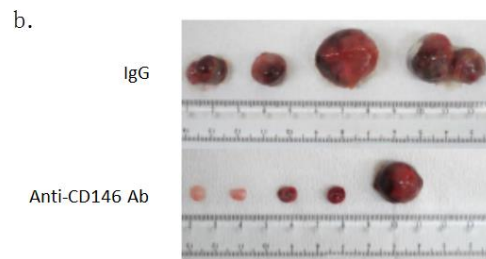
ウサギポリクローナル抗体は神経芽細胞腫細胞株（RT-BM1、SK-N-AS）に対して濃度依存的に腫瘍増殖抑制効果を示した（図2）。



【図2】 抗ヒト CD146 ポリクローナル抗体の神経芽腫瘍細胞株（RT-BM1、SK-N-AS）に対する *in vitro* 細胞増殖能の検討。*** : $p < 0.001$

次に、免疫不全マウスに神経芽細胞腫細胞株（RT-BM1）を皮下移植すると同時に抗ヒト CD146 ポリクローナル抗体を腹腔内投与すると、著明な *in vivo* 腫瘍形成抑制効果を示した（図3）。





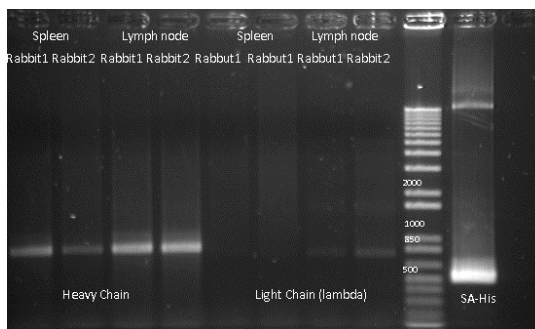
【図 3】抗ヒト CD146 ポリクローナル抗体による神経芽細胞種細胞株 (RT-BM1)

の *in vivo* 腫瘍抑制効果の検討。a. 腫瘍細胞移植時からの腫瘍体積の経時的変

化 (n=5)。b. 摘出腫瘍サイズの比較。*** : p<0.001

(2)CD146 ウサギモノクローナル抗体の作成

CD146 を抗原として免疫したウサギリンパ節および脾臓リンパ球から抽出した mRNA を用いて SMATERer RACE キットで可変領域を増幅した。さらに特異的プライマーを用いた PCR では免疫グロブリン (Ig) 重鎖、Ig 軽鎖 (κ 鎖と λ 鎖) がいずれも検出された (図 4)。そのため、mRNA から PCR で二次増幅して Ig 重鎖、Ig 軽鎖 κ 、Ig 軽鎖 λ の全長ライブラリーを作製した。



【図 4】特異的プライマーを用いた PCR によるウサギ脾臓およびリンパ節由来

cDNA からの免疫グロブリン重鎖、免疫グロブリン軽鎖 (κ 鎖と λ 鎖) の確認。

現在、様々な組み合わせの (Ig) 重鎖、Ig 軽鎖を組み込んだベクターを 293

細胞に導入し、CD146 を抗原として添加後に高親和性抗体が導入された細胞をフローサイトメトリーにて純化する実験を準備中である。

今後は以下の実験を予定している。(1)純化された高親和性抗体含有細胞から DNA を回収して 293 細胞への導入・フローサイトメトリーによる純化を繰り返して CD146 と高い親和性で結合する抗体を濃縮する。(2)濃縮された抗体から得られたモノクローナル抗体候補に対して悪性ラブドイド腫瘍細胞株に対する *in vitro* 腫瘍増殖抑制効果を指標として二次スクリーニングを実施し、中和活性の高いモノクローナル抗体を得る。