

島根大学研究機構戦略的研究推進センター 『萌芽研究部門』	平成25年度	年度報告書	提出日 平成26年2月14日
① プロジェクト名	島根県に多い膵がんに対する抗体医薬開発		
② プロジェクトリーダー	浦野 健	所属	医学部病態生化学
		電子メール	turano@med.shimane-u.ac.jp
③ プロジェクトの概要 (プロジェクトの最終年度における到達目標を簡潔に記入してください。)			
<p>がんは死亡原因の30%以上(第一位)を占め、一年間に35万人以上が亡くなる国民病であり、さらに増加傾向にある。平成21・22年度「萌芽研究部門」研究プロジェクト「島根県に多い膵臓癌の撲滅をめざして」(プロジェクトリーダー本間良夫教授)の成果の一つとして、島根県のがん死亡率に関してがん全体では全国平均を下回るものの膵臓癌は全国平均より統計的有意差を持って高いこと、特に高齢者の膵がん患者が年齢補正後においても特徴的に多いことが明らかになった。膵がんは難治性がんの代表であり、画期的な新規治療法の開発が喫緊の課題である。</p> <p>プロジェクトの最終年度までに、申請者が島根大学で樹立したハイブリドーマ G196(アミノ酸配列 DLVPR を認識するモノクローナル抗体を産生)と今回のプロジェクトにより樹立する膵がん表面抗原を認識する抗体を産生するハイブリドーマとのハイブリッドハイブリドーマを作製し、治療薬を低濃度で効率良く(すなわち副作用の出現頻度を押さえることが可能である)がんへ標的化する画期的な治療システムを確立する。</p>			
④ プロジェクトのメンバー及び役割			
氏名	所属(職)	本年度の役割分担	
(プロジェクトリーダー) 浦野 健	医学部(病態生化学)・教授	研究プロジェクト全般および総括、 研究計画①②:膵がんに対する新規治療法の開発	
田島 義証	医学部(総合・消化器外科)・教授	研究計画③:膵がん患者に対する新しい治療戦略の開発	
竹永 啓三	医学部(腫瘍生物学)・准教授	研究計画④:膵がん細胞の特性と治療標的の解明	
⑤ (1) 本年度の研究計画目標の達成状況及び自己評価			
(本年度当初の計画書に書かれた内容に沿って、計画と達成目標を箇条書きにしてください。また、その達成目標の項目ごとにその達成状況を記入し、以下の基準に従って自己評価して下さい。 A: 目標以上に成果をあげた。 B: ほぼ目標通りの達成度で予定した成果をあげている。 C: 計画より遅れ気味であるが年度末には目標達成が可能である。 D: 年度末までに目標達成は不可能である。 自己評価が B 以外の場合には、その原因についても記載して下さい。2~3月に行う計画のため未執行の場合には評価を空欄にして下さい。)			
計画と達成目標		達成状況と自己評価	
研究項目①:ハイブリドーマ G196 と膵がん細胞表面を認識する H24 年度に作製した新規モノクローナル抗体を産生す		(自己評価) B ・①: H24 年度本プロジェクトにおいて作製した、膵がん細胞株 MIA PaCa-2 細胞表面を認識する	

<p>るハイブリドーマとのハイブリッドハイブリドーマを作製する。</p> <p>達成目標 ①: 1種類以上のハイブリッドハイブリドーマを作製する。</p>	<p>新規モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ 12-13.8 を用いてハイブリドーマ G196 とのハイブリッドハイブリドーマの作成に成功した。→ 現在、G196 エピトープを付加した抗腫瘍薬を発注中で、効率よくがん細胞にデリバリーできるかどうかを今後検討する。</p>
<p>研究項目 ②: 研究項目 ④で同定する新規表面抗原に対するモノクローナル抗体を作製する。</p> <p>達成目標 ②-1: 研究項目 ④において同定する新規表面抗原に対するモノクローナル抗体を2種類以上作製する。</p> <p>達成目標 ②-2: 治療標的として有望なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマについて1つ以上の特許を出願する。</p>	<p>(自己評価) A</p> <ul style="list-style-type: none"> ・②-1: ④-1 で同定した、膵がんで発現しているがん幹細胞の表面タンパク質である YYYa および YYYb に対する新規モノクローナルをそれぞれ2種類、合計4種類作製した。 ・②-2: 作製したハイブリドーマ4種類すべての抗体遺伝子(超可変領域)を解析した。YYYa に対する2種類の抗体を産生するハイブリドーマについては特許申請のための明細書を作成中である。YYYb に対する2種類の抗体を産生するハイブリドーマについても特許申請する。→ 現在、バイオ医薬品開発に向け、CHO細胞を用いたキメラ抗体作製のため、発現ベクターを作製中である。
<p>研究項目 ③: H24年度本プロジェクトにおいて作製した、膵がん細胞株 MIA PaCa-2 細胞表面を認識する新規モノクローナル抗体4種類の機能解析を行なう。</p> <p>達成目標 ③-1: モノクローナル抗体が認識する表面抗原を2種類以上同定する。</p> <p>達成目標 ③-2: 膵がん患者10例において、2種類以上のモノクローナル抗体を用いた組織免疫染色を行い、発現を確認する。</p> <p>達成目標 ③-3: 治療標的として有望なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマについて1つ以上の特許を出願する。</p>	<p>(自己評価) A</p> <p>H24年度および平成25年度で膵がん細胞株 MIA PaCa-2 細胞表面を認識する新規モノクローナル抗体合計5種類作製した。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・③-1: モノクローナル抗体 12-13.8 および 4-6.8 が認識するそれぞれの表面抗原を抗体を用いた免疫沈降後の質量解析により同定した。 ・③-2: 2種類のモノクローナル抗体 12-13.8 および 4-6.8 を用いて膵がんおよび肺がん患者各10例において組織免疫染色を行い、がん組織での発現を確認した。→ 現在、膵がんおよび肺がん患者各40例の組織免疫染色を行っており、発現と予後との関連を検討予定である。 ・③-3: 2種類のモノクローナル抗体 12-13.8 および 4-6.8 を含む5種類すべての抗体遺伝子(超可変領域)を解析した。→ 特許申請の準備はほぼ整った。12-13.8 が認識するタンパク質 XXX (特許申請予定のため、標的となるタンパク質名はXXXとし、伏せてある)はすでにその発現とがんの悪性度に相関が報告されているため、集中的に解析を進めている。
<p>研究項目 ④: 膵がんの治療標的となるがん関連転写制御因子 NAC-1 の下流遺伝子産物、特に細胞表面タンパク質を同定する。</p>	<p>(自己評価) A</p> <ul style="list-style-type: none"> ・④-1: マイクロアレイ解析を用いて、NAC-1 遺伝子に状上方あるいは下方制御されている遺伝子群をそれぞれ10種類解析した。

達成目標 ④-1： 膵がん細胞株 MIA PaCa-2 を用いて、NAC-1 遺伝子の発現を siRNA で抑制した場合とコントロール siRNA を用いた場合の比較マイクロアレイ解析を行い、NAC-1 の下流遺伝子産物を 10 種類以上同定する。

達成目標 ④-2： がん細胞浸潤能試験と siRNA を用いて、治療標的として有望な NAC-1 の下流遺伝子産物、特に細胞表面タンパク質を 2 種類以上同定する。

・④-2： がん細胞浸潤能試験と上記の候補遺伝子 10 種類の siRNA を用いて、治療標的として有望な NAC-1 の下流遺伝子産物の同定を試みたが、明らかにがん細胞浸潤能に影響する遺伝子は同定できなかった。しかし、その候補遺伝子群のなかにがん幹細胞の表面タンパク質 YYY をコードする遺伝子があったので、②-1 で記載したようにそのモノクローナル抗体を 2 種類作製した。

(2) プロジェクト全体の自己評価 (プロジェクト全体としての達成目標から、今年度の研究成果がこれまでの経過・成果にもとづいてどの段階にあるのかを明示して下さい。また、各グループ間での連携状況についても記入して下さい。)

●プロジェクト全体評価(自己評価) プロジェクト全体としての達成目標に対する今年度の研究成果の達成状況について(自己評価) A

申請者が島根大学で樹立したハイブリドーマ G196 を応用した、膵がんの治療を目的とした抗体医薬開発が本プロジェクトの最終年度の達成目標である。目的遂行に向け当初の計画を柔軟に変更し対応し、当初の目的以上の成果を得た。

- 1)膵がん細胞株 MIA PaCa-2 の細胞表面を認識するモノクローナル抗体を 5 種類樹立した。G196 のハイブリッドハイブリドーマ作製のパートナーとなる可能性が高い。
- 2) 特にモノクローナル抗体 12-13.8 が認識するタンパク質 XXX はすでにその発現とがんの悪性度に相関が報告されているため、がん細胞表面の特殊な翻訳後修飾を認識する抗体であるため、さらに遺伝子欠損マウスがすでに報告されており遺伝子を欠失してもほぼ正常に発育することが知られている。バイオ医薬品としては、かなり有望である。

●各グループ間またはメンバーとの連携状況

3名のメンバーはほぼ毎日顔を合わせ、研究進捗状況を確認し、研究結果について議論をおこなった。また、メンバー3名をコアメンバーとして、さらに免疫学・腫瘍センターおよび病理部を加え、今年度から開始された島根大学特別経費プロジェクト「がん撲滅に向けての集学的研究の推進」と共同で、プロジェクトの進捗状況を報告するプロジェクト会議(毎月2名、各研究者1時間程度発表)を毎月開催でき、緊密な連携が取れた。

⑥ 公表論文、学会発表など (当該研究に関連した本年度の公表論文、学会発表、特許申請の件数を一覧表に記入して下さい。発明等に関しては、差し支えない範囲で記載して下さい。)

論文掲載 (総件数)	17
学会発表 (総件数)	23
特許出願 (総件数)	0

(現在、特許申請のための明細書1件作成中)

【内訳】

●論文 (年度末までに発行される学術雑誌等(紀要も含む)に掲載が確定しているものも含め、代表的なものを10件程度選んで記入して下さい。)

1. Nakashima K, Arai S, Suzuki A, Nariyai Y, **Urano T**, Nakayama M, Ohara O, Yamamura K, Yamamoto K and Miyazaki T.: PAD4 regulates proliferation of hematopoietic multipotent cells by controlling c-myc expression. **Nature Commun.**, 2013;4:1836. doi: 10.1038/ncomms2862
2. Kato H, Okazaki K, Iida T, Nakayama J-I, Murakami Y and **Urano T**.: Spt6 prevents transcription-coupled loss of posttranslationally modified histone H3. **Sci Rep**, 3 : 2186, 2013. doi 10.1038/srep02186
3. Matsumoto Y, Zhang Q, Akita K, Nakada H, Hamamura K, Tsuchida A, Okajima T, Furukawa K, **Urano T** and Furukawa K.: Trimeric Tn antigen on Syndecan-1 produced by ppGalNac-T13 enhances cancer

metastasis via a complex formation with integrin $\alpha 5 \beta 1$ and matrix metalloproteinase 9.

J. Biol. Chem., 288: 24264-24276, 2013

- Kamata K, Goswami G, Kashio S, **Urano T**, Nakagawa R, Uchida H and Oki M.: The N-terminus and Tudor domains of Sgf29 are important for its heterochromatin boundary formation function. **J Biochem.**, 2014 Jan 13. [Epub ahead of print]
- Kato H, Okazaki K and **Urano T**: Spt6: Two fundamentally distinct functions in the regulation of histone modification. **Epigenetics**, 8: 1249-1253, 2013.
- Kamata K, Hatanaka A, Goswami G, Shinmyozu K, Nakayama J-I, **Urano T**, Hatashita M, Uchida H and Oki M.: C-terminus of the Sgf73 subunit of SAGA and SLIK is important for retention in the larger complex and for heterochromatin boundary function. **Genes Cells**, 18: 823-837, 2013
- Kimura Y, Goi T, Hirano Y, Katayama K, **Urano T** and Yamaguchi.: CD44variant exon 9 plays an important role in colon cancer initiating cells. **Oncotarget** 4: 785-791, 2013
- Akimoto M, Nagasawa H, Hori H, Uto Y, Honma Y, and **Takenaga K**. An inhibitor of HIF- α subunit expression suppresses hypoxia-induced dedifferentiation of human NSCLC into cancer stem cell-like cells. **World J Med Genet.** 3: 41-54, 2013
- Shimizu A, Mito T, Hayashi C, Ogasawara E, Koba R, Negishi I, **Takenaga K**, Nakada K, Hayashi J. Transmitochondrial mice as models for primary prevention of diseases caused by mutation in the tRNALys gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 2014 Feb 7. [Epub ahead of print]
- Hirahara N, Edamatsu T, Fujieda A, Fujioka M, Wada T, **Tajima Y**. : Protein-bound polysaccharide-K induces apoptosis via mitochondria and p38 mitogen- activated protein kinase- dependent pathways in HL- 60 promyelomonocytic leukemia cells. **Oncol Rep.** 30: 99-104, 2013.

●**学会発表** (代表的なものを数件記入して下さい。)

- Nakayama N, Sakashita G, Kato H, Nakayama K, **Urano T**.: Biological and domain analysis of transcription factor NAC-1 (English Oral Sessions). 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Yokohama 10/3/2012
- Akimoto M, Honma Y, **Takenaga K**. Soluble ST2 inhibits tumor growth and metastasis of colon carcinoma cells by modulating inflammatory microenvironment (English Oral Sessions). 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Yokohama 10/3/2012
- 西 健, 川畑康成, 門馬浩行, 矢野誠司, 田島義証 : 浸潤性膵癌における転写制御因子 NAC-1 の低発現は予後不良の指標となる。第 44 回日本膵臓学会大会, 仙台, 2013 年 7 月
- 門馬浩行, 原嶋奈々江, 木谷昭彦, 西 健, 川畑康成, 矢野誠司, 田島義証 : 膵癌細胞に対する TRAIL と HSP70 阻害剤 pifithrin- μ の併用効果と作用。第 44 回日本膵臓学会大会, 仙台, 2013 年 7 月
その他、19 件。

●**特許出願**

- 「CCCa に対するモノクローナル抗体」(発明者: **浦野 健**、坂下暁介、成相裕子)(大学継承決定、現在明細書作成中)(明細書作成中のため、標的となるタンパク質名は CCCa とし、伏せてある)

⑦ **外部資金獲得状況** (当該プロジェクトに関連した外部資金について一覧の各項目に総件数、金額を記入して下さい。)

■外部資金獲得状況一覧		件数	金額(千円)
(1) 科研費 (配分額は間接経費を含む)		3	配分額 5,810
(2) 科研費以外の外部資金	受託研究	2	33,603
	共同研究	1	300
	寄附金・助成金	12	9,200
	合計	18	48,913

【**一覧内訳**】

(1) **科研費**(科目ごとに、テーマ、研究者、金額をそれぞれ列挙してください。)

- 基盤 (C)「胆汁耐性ヘリコバクター胆道感染の診断・治療システムの構築と胆道発癌予防法の確立」(代表研究者: **田島義証**、分担研究者: **浦野 健**) 2,990 千円
- 基盤 (C)「病因性 mtDNA 変異を有するがん細胞による寄生性代謝の解析とその制御」(代表研究者: **竹**

永啓三) 1,820 千円

3. 基盤 (B) 「インフルエンザ RNA ポリメラーゼのウイルス増殖における分子制御」(分担研究者: 浦野 健)
1,000 千円

(2) その他外部資金(一覧の項目別に、テーマ、研究者、金額を列挙してください。)

1. 島根大学特別経費プロジェクト(平成25~29年度)「がん撲滅に向けての集学的研究の推進-膵がんを中心とした難治性がんに対する低侵襲的ながん治療法の確立-(研究者代表: 浦野 健、分担研究者: 田島義証、竹永啓三、他5名)平成25年度: 33,600 千円
 2. 財団法人がん集学的治療研究財団「stageⅢ(Dukes' C)結腸癌治療切除例に対する術後補助化学療法としてのカペシタビンの至適投与期間に関するランダム化第Ⅲ相比較臨床試験」(代表研究者: 田島義証)
3,846 円
 3. (株)コスミック コーポレーション「抗グルカゴンモノクローナル抗体の作製」(代表研究者: 浦野 健)
300 千円
 4. 動脈硬化研究奨励会「血管新生の S100A4 による制御機構の解明」(代表研究者: 竹永啓三) 1,000 千円
- その他、寄附金 11 件(代表研究者: 田島義証) 8,200 千円

⑧ その他特筆すべき成果(受賞、シンポジウムの開催、産学連携・地域連携に関する各種見本市、展示会への出展等も含む。)

【大高連携】

島根県下の高校生を対象に、島根大学の研究紹介とがん・抗体医薬開発を含めた先端医学および科学技術の啓発のため講演および実験を行った。

1. 益田高校スーパーサイエンスハイスクール大高連携事業の一環として、益田高校2年生3名および浜田高校2年生3名の計6名を受入れ、2泊3日で講義と実験を行った。(右写真)

浦野 健、平成25年8月21日~23日

2. 出雲高校理数科1年生40名を対象に講義を行った。

浦野 健(その他2講座と共同)、
平成25年2月1日

3. 出雲高校理数科2年生8名を病態生化学および腫瘍生物学で継続して受入れ、平成25年9月から月曜日の午後を利用して、講義および実験を平成25年2月まで行った。出雲高校成果発表会でその成果はそれぞれ一位・二位を獲得し、県の理数科課題研究発表会に参加することになった。

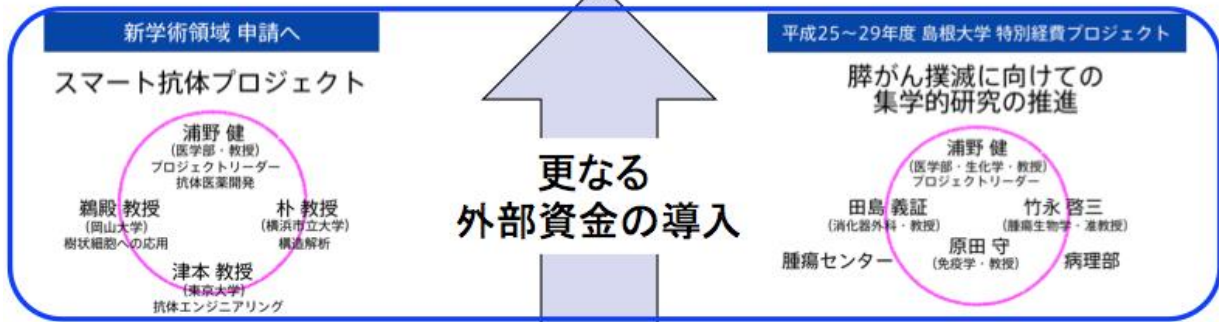
浦野 健、竹永啓三(その他1講座でも4名受入れ)、平成24年9月~平成26年2月



【島根大学 特別経費プロジェクト】

本萌芽研究のメンバー3名をコアメンバーとして、さらに免疫学・腫瘍センターおよび病理部を加え、本萌芽研究を基盤としてさらに発展・展開させた研究プロジェクト「がん撲滅に向けての集学的研究の推進」(平成25年度~29年度)が文部科学省により採択され、始動した。

島根大学発！ 抗体医薬を中心とした 新しい膵がんの治療法の確立

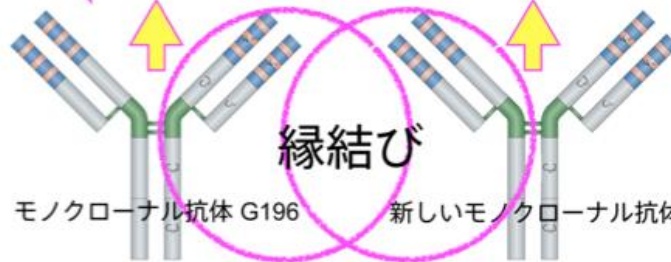


膵がんに対する抗体医薬の開発

抗がん剤、RI
蛍光物質など



膵がん
細胞表面

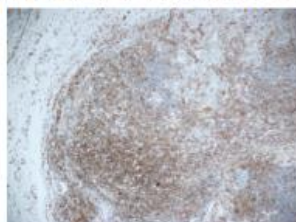


本プロジェクト

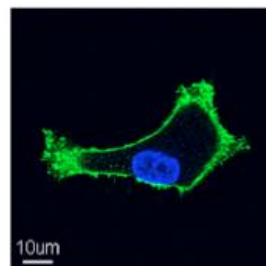
3) ハイブリドーマ G196
とのハイブリッドハイ
ブリドーマを1種類
作成した！

1) 膵がん細胞株 MIA PaCa-2
の細胞表面を認識する
モノクローナル抗体を
合計5種類樹立！

膵がん患者標本における
抗体を用いた発現解析



2) 膵がんが発現しているがん
幹細胞表面タンパク質であ
る YYYa および YYYb に対
するモノクローナル抗体を
各2種類樹立！



特許申請
明細書
作成中1件

抗体は膵がん細胞の
表面を認識している

⑩若手研究者育成プランについて

(計画書の内容を踏まえて、今年度取り組んだ内容を記入してください。)

平成25年度から開始された島根大学特別経費プロジェクト「がん撲滅に向けての集学的研究の推進」と共同で、プロジェクトの進捗状況を報告するプロジェクト会議（毎月2名、各研究者1時間程度発表）を毎月開催している。このプロジェクト会議に学内若手研究者を参加させることで、がん教育に対しては、本プロジェクトと連携して文部科学省「がんプロフェッショナル養成基盤推進プラン」事業で順天堂大学及び鳥取大学等とともに協働し、次代のがん医療を担う優秀な医師の育成を推進した。また、本プロジェクトでは、島根大学大学院医学系研究科に開設された腫瘍専門医育成コースに入学した大学院生に研究の場を提供し、大学院生のがんの先進医療に対する腫瘍専門医としての意識を向上させた。

⑪研究終了後の展開（科研費などへの申請等） 図などでわかりやすく示してください。

本萌芽研究を基盤としてさらに発展・展開させた研究プロジェクト「がん撲滅に向けての集学的研究の推進」（事業実施主体：医学部・附属病院）が文部科学省により採択された（平成25年度～29年度）（下図参照）。今後一層膵がん撲滅を目指し、地域における明日のがん医療を担う若い臨床医に魅力あるがん研究の場を提供するとともに、高齢化が進む日本の将来のがんに対する治療モデルを島根の地から提唱できるように発展・展開を加速させていく。

また、これまでの抗体作製の実績を踏まえ、東京大学・岡山大学などの先生がたと一緒に抗体エンジニアリングを含めた新しい抗体の時代を切り開く「スマート抗体プロジェクト」として科研費（新学術領域）に申請する。

