

令和 4 年 4 月 20 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07732

研究課題名(和文) 癌幹細胞におけるGlypican-1の機能解析と抗体療法への応用

研究課題名(英文) Functional analysis of Glypican-1 in cancer stem-like cells and development of antibody-based therapy

研究代表者

世良田 聡 (Serada, Satoshi)

岩手医科大学・医歯薬総合研究所・准教授

研究者番号：50463302

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)：癌幹細胞は癌の治療抵抗性の原因の1つと考えられている。そのため、癌の根絶には癌幹細胞をも標的とした治療が有効と考えられる。本研究では食道癌細胞株を用いて、癌幹細胞を濃縮した細胞集団中にGlypican-1(GPC1)が発現していることを確認した。さらに、癌幹細胞を濃縮した細胞集団の3次元培養中条件下において、GPC1を標的とした抗体薬物複合体(GPC1-ADC)が強い細胞増殖阻害活性を示すことをin vitroでの実験により明らかにした。GPC1-ADCは癌幹細胞にも薬効を示す可能性が考えられ、難治性癌の根絶につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌幹細胞は癌の再発の原因の1つと考えられている。食道癌由来TE8細胞から癌幹細胞の活性が高い集団を濃縮した。この細胞集団に癌抗原であるGlypican-1(GPC1)が高発現することを明らかにした。さらに、GPC1を標的とした抗体薬物複合体が癌幹細胞を濃縮した細胞に強い細胞増殖阻害活性を示すことを明らかにした。GPC1を標的とした抗体医薬は将来、癌に対する新規治療薬になり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cell is thought to be involved in the cause of chemoresistance in cancer. Therefore, targeting cancer stem cell might be an effective therapy for eradication of cancer. In this study, we confirmed that enhanced expression of Glypican-1 (GPC1) in the enriched fraction of cancer stem cells from esophageal squamous cell carcinoma cell line. Under the 3D-culture condition, GPC1 targeted antibody-drug conjugate (ADC) exhibited potent growth inhibitory effect against cancer stem cell enriched cells in vitro. GPC1-ADC potentially represent antitumor effect against cancer stem cells and would be a promising approach for the treatment of cancer.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：癌 抗体医薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食道癌など進行期の難治性癌においては従来の抗癌剤に対して治療抵抗性を示すことなどから予後不良であるが、癌幹細胞の存在が癌の再発の原因の1つとして考えられている(Dean M et al., 2005, Nat Rev Cancer)。癌の根治を目指した治療法を確立するためには、分化した癌細胞のみならず癌幹細胞をも死滅させることが重要と考えられる。そのためには癌幹細胞に発現する表面抗原を同定し、そのタンパク質に対するモノクローナル抗体のような特異性の高い分子を用いた治療法の開発が有望であると考えられる。

最新の抗体医薬のモダリティの1つとして、リンカーを介して抗癌剤を抗体に結合させた抗体薬物複合体(Antibody-drug conjugates: ADC)の開発が進んでいる。ADCは抗原を発現する癌細胞の内部に薬剤を送達するシステムであり、正常組織への副作用を軽減しつつ殺細胞性の高い薬剤が利用可能である。難治癌特異的な表面抗原を見出し、それを標的に細胞内へと侵入する抗体を作製すれば、本システムにより従来薬を凌ぐ大きな薬効が期待できる。研究代表者らは新規癌抗原を独自に探索し、食道癌に高発現する新規癌抗原としてGPC1を同定した(Hara H, Serada S et al., 2016 Br J Cancer)。GPC1は原発部位のみならず転移部位の癌でも高発現するのに対し、正常組織での発現は低く精巣等の一部組織に限定されるため、抗体医薬による癌の治療標的として有用性が高いことを報告している(Harada E, Serada S et al., 2017 Oncotarget)。実際に、研究代表者はGPC1に対するモノクローナル抗体を複数開発し、細胞内侵入活性の高いクローンを単離することに成功している。この抗GPC1モノクローナル抗体にチューブリン重合阻害剤であるMMAFをコンジュゲートさせたGPC1-ADCを開発し、その薬効をin vitro, in vivoで証明済みである(Matsuzaki S, Serada S et al., 2018 Int J Cancer, 2016年度-2018年度、基盤研究(C))。本抗体がマウスGPC1にも交叉反応性を示すことから、マウスを用いた安全性試験も実施し、安全性に問題が無いことも確認済みである。研究代表者らはGPC1-ADCが発揮する強力な薬効の作用機序としてGPC1が癌幹細胞にも高発現するのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

GPC1が癌幹細胞のマーカーとなり得ることと、独自に作成した抗GPC1モノクローナル抗体による新規癌治療法の開発を目的とした。本研究が達成されると難治性腫瘍に対する抗体医薬による画期的な新規治療法の開発にも結びつくことが期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞株

食道癌細胞株(TE8細胞)はRIKEN BRCより入手した。TE8細胞はRPMI1640 + 10% FBS + 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycinを用いて37℃, 5% CO₂で培養した。

(2) FACSによるALDEFLUORアッセイ

細胞はPBS(-) (Nacalai Tesque)で2回洗浄し、0.02% EDTA 溶液(Nacalai Tesque)でディッシュからはがした。ALDEFLUORアッセイはSTEMCELL Technologies社のALDEFLUOR Kitを用いてALDHの阻害剤であるDEAB添加の有無の2通りの条件でサンプル調製を行い、ALDH活性を蛍光基質で検出した。細胞はFACS Canto II cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)で測定し、FlowJo software (Tree Star, Stanford, CA, USA)を用いてデータ解析した。

(3) セルソーターによるaldehyde dehydrogenase (ALDH)活性の高い細胞集団の濃縮

TE8細胞に対してALDEFLUORアッセイを行い、TE8-ALDH(low)とTE8-ALDH(high)をFACS AriaII cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)でセルソーティングを実施した。

(4) リアルタイムPCR法によるmRNA発現解析

セルソーターで分離したTE8-ALDH(low)とTE8-ALDH(high)細胞からRNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN)を用いてtotal RNAを精製した。QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN)を用いてcDNAを調製し、SOX2およびGPC1のmRNAの発現を7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems)を用いてリアルタイムPCR法により定量した。内部標準としてβ-actinを用いた。

(5) In vivo tumorigenicityアッセイ

セルソーターで分離したTE8-ALDH(low)とTE8-ALDH(high)をPBS:マトリゲルが1:1の溶液を用いてICRnu/nuマウス、メス、4週の皮下に100 cells, 500 cells, 1,000 cellsずつ皮下移植した。マウス背部の左側にTE8-ALDH(low)と、右側にTE8-ALDH(high)で、同じ細胞数をそれぞれ移植した後、ノギスで腫瘍の長径と短径を計測し、長径×短径×短径×0.5を腫瘍体積とした。

(6) sphere formation アッセイ

セルソーターで分離した TE8-ALDH(low)と TE8-ALDH(high)を 6well ultra-low-attachment culture dish (Nunc)を用いて 200 cells /well で sphere formation assay を実施した。培地は DMEM/F12 + 1% N2 supplement+20 ng/ml EGF + 10 ng/ml bFGF + 20 μ M Y27632 + 4 μ g/ml Heparin + 4 mg/ml BSA + 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycinを用いて 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ で 14 日間培養した。

(7) GPC1-ADC の作成

マウス抗ヒト GPC1 モノクローナル抗体(01a033)を樹立した(Matsuzaki S, Serada S et al., 2018 Int J Cancer)。抗 GPC1 抗体(clone 01a033)およびアイソタイプコントロール抗体(mouse IgG2a, clone MOPC-173, BioLegend)を用いて ADC の作成を行った。還元剤として TCEP を用いて抗体を部分的に還元し、チューブリン重合阻害剤(MMAF)をリンカーを介して抗体にコンジュゲートし、GPC1-ADC および control-ADC を製造した。薬物抗体比 (DAR) は GPC1-ADC は 3.4、control-ADC は 3.5 であった。

(8) *in vitro* ADC アッセイ

セルソーターで分離した TE8-ALDH(low)と TE8-ALDH(high)を用いて、96well ultra-low-attachment culture dish に 200 cells ずつ、90 μ l/well で加えた。培地は DMEM/F12 + 1% N2 supplement+20 ng/ml EGF + 10 ng/ml bFGF + 20 μ M Y27632 + 4 μ g/ml Heparin + 4 mg/ml BSA + 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycinを用いた。翌日、ADC を 10 μ l 添加し、144 時間、37 度、5% CO₂ インキュベーターで培養し、CellTiter-Glo[®] 3D Cell Viability Assay 試薬(promega)を用いて細胞増殖阻害活性を評価した。

4. 研究成果

(1) ALDEFLUOR アッセイによる TE8 細胞の解析

食道癌細胞株 TE8 における ALDH 活性を評価するために ALDEFLUOR アッセイを FACS により解析した。その結果、TE8 においては約 9.8%が ALDH high であった(図 1)。

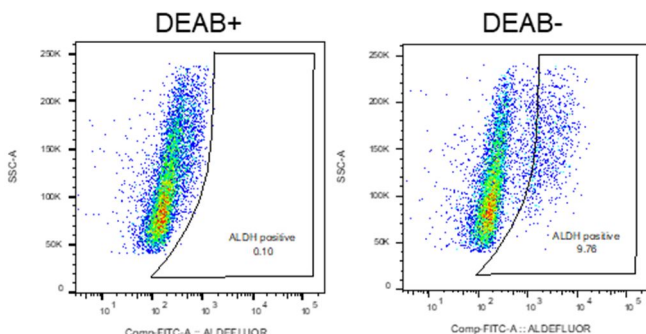


図.1 FACS による TE8(食道癌)細胞株における ALDEFLUOR アッセイ

(2) リアルタイム PCR 法による SOX2 と GPC1 の発現解析

セルソーターで分離した TE8-ALDH(low)と TE8-ALDH(high)細胞における SOX2 と GPC1 の発現をリアルタイム PCR 法で測定した。その結果、いずれも TE8-ALDH(low)と比べて TE8-ALDH(high)において発現上昇を認めた(図 2)。

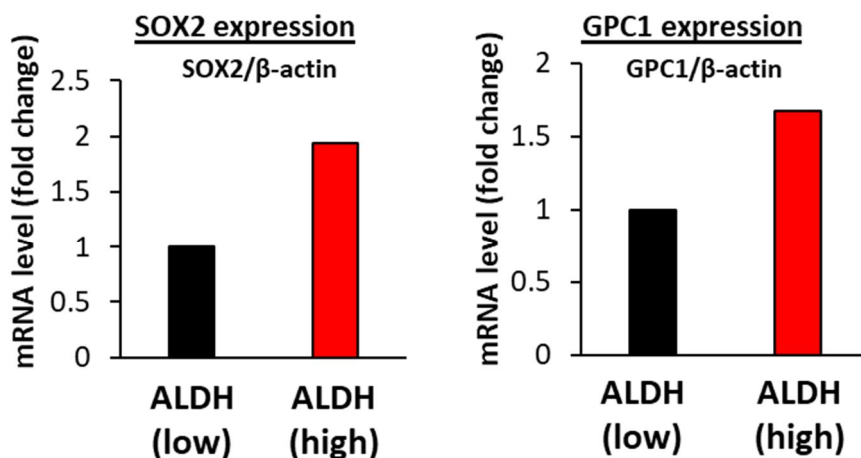


図.2 リアルタイム PCR 法による SOX2 および GPC1 の発現解析

(3) *in vivo* tumorigenicity アッセイ

セルソーターで分離した TE8-ALDH(low)と TE8-ALDH(high)を用いて *in vivo* tumorigenicity アッセイを実施した。その結果、500 cells および 1,000 cells を移植した条件においては、TE8-ALDH(low)における 0/5 と比べて TE8-ALDH(high)においては 3/5 であり、高い腫瘍形成能が確認された。

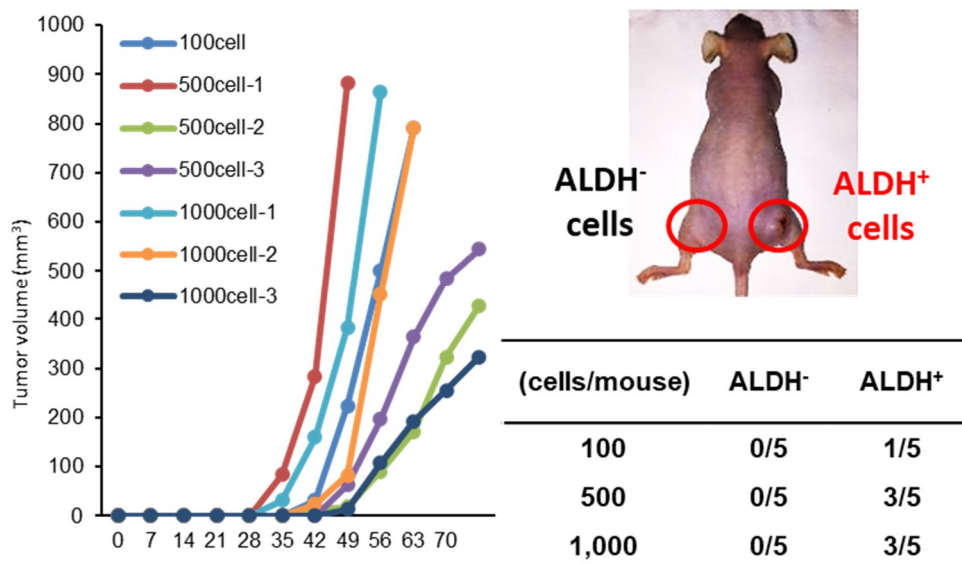


図.3 *in vivo* tumorigenicity アッセイ

(4) sphere formation アッセイ

セルソーターで分離した TE8-ALDH(low)と TE8-ALDH(high)を用いて sphere formation assay を行った。14 日間の培養の結果、TE8-ALDH(low)では sphere 形成が乏しい結果であったが、TE8-ALDH(high)では多数の sphere 形成が認められた。

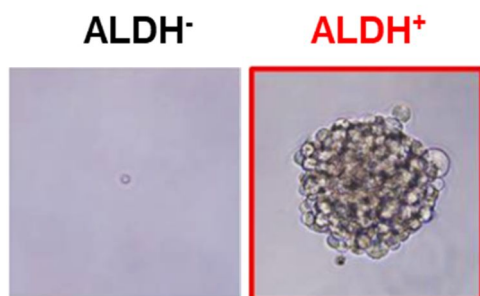


図.4 sphere formation アッセイ

(5) *in vitro* ADC アッセイ

セルソーターで分離した TE8-ALDH(high)を用いて、96well ultra-low-attachment culture dish (Nunc)中で、3次元培養条件下で control-ADC および GPC1-ADC を用いた *in vitro* ADC アッセイを行った。その結果、control-ADC と比較して GPC1-ADC により強力な細胞増殖阻害活性が認められた。

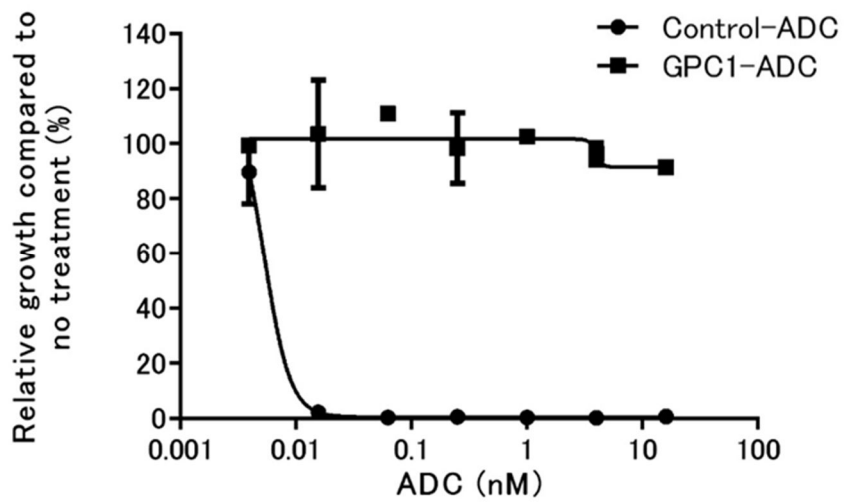


図.5 *in vitro* ADC アッセイ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kato D, Yaguchi T, Iwata T, Katoh Y, Morii K, Tsubota K, Takise Y, Tamiya M, Kamada H, Akiba H, Tsumoto K, Serada S, Naka T, Nishimura R, Nakagawa T, Kawakami Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 GPC1 specific CAR-T cells eradicate established solid tumor without adverse effects and synergize with anti-PD-1 Ab.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 e49392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.49392.	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 Nishigaki T, Takahashi T, Serada S, Fujimoto M, Ohkawara T, Hara H, Sugase T, Otsuru T, Saito Y, Tsujii S, Nomura T, Tanaka K, Miyazaki Y, Makino T, Kurokawa Y, Nakajima K, Eguchi H, Yamasaki M, Mori M, Doki Y, Naka T.	4. 巻 122
2. 論文標題 Anti-glypican-1 antibody-drug conjugate is a potential therapy against pancreatic cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Cancer	6. 最初と最後の頁 1333-1341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-020-0781-2.	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 Yokota K, Serada S, Tsujii S, Toya K, Takahashi T, Matsunaga T, Fujimoto M, Uemura S, Namikawa T, Murakami I, Kobayashi S, Eguchi H, Doki Y, Hanazaki K, Naka T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Anti-Glypican-1 Antibody-drug Conjugate as Potential Therapy Against Tumor Cells and Tumor Vasculature for Glypican-1-Positive Cholangiocarcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Cancer Ther	6. 最初と最後の頁 1713-1722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-21-0015.	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 Munekage E, Serada S, Tsujii S, Yokota K, Kiuchi K, Tominaga K, Fujimoto M, Kanda M, Uemura S, Namikawa T, Nomura T, Murakami I, Hanazaki K, Naka T.	4. 巻 23
2. 論文標題 A glypican-1-targeted antibody-drug conjugate exhibits potent tumor growth inhibition in glypican-1-positive pancreatic cancer and esophageal squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neoplasia	6. 最初と最後の頁 939-950
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neo.2021.07.006.	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 Tsujii S, Serada S, Fujimoto M, Uemura S, Namikawa T, Nomura T, Murakami I, Hanazaki K, Naka T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Glypican-1 Is a Novel Target for Stroma and Tumor Cell Dual-Targeting Antibody-Drug Conjugates in Pancreatic Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Cancer Ther	6. 最初と最後の頁 2495-2505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-21-0335.	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yokota Y, Serada S, Tsujii S, Murakami I, Hanazaki K, Naka T.
2. 発表標題 Antibody-drug conjugate targeting glypican-1 inhibits tumor growth and tumor angiogenesis for glypican-1 positive cholangiocarcinoma
3. 学会等名 AACR2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横田啓一郎、世良田聡、辻井茂宏、藤本穰、並川努、村上一郎、花崎和弘、仲哲治
2. 発表標題 Glypican-1を標的とした抗体薬物複合体(ADC: Antibody-drug conjugate)による胆管癌の新規治療開発
3. 学会等名 第38回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横田啓一郎、世良田聡、辻井茂宏、平松宏祐、藤本穰、並川努、村上一郎、花崎和弘、仲哲治
2. 発表標題 Glypican-1を標的とした抗体薬物複合体 (ADC) による胆管癌の新規治療開発
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yokota K, Serada S, Tsujii S, Hiramatsu K, Namikawa T, Murakami I, Hanazaki K, Naka T.
2. 発表標題 Antibody-drug conjugate targeting glypican-1 shows tumor growth inhibition in cholangiocarcinoma
3. 学会等名 AACR2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ヒト化抗GPC-1抗体	発明者 仲哲治、世良田聡、 藤本穰	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/022085	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 CAFを有するがんを処置するための組成物	発明者 仲哲治、世良田聡、 藤本穰	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/022086	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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