

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 「がん幹細胞を標的とした根治療法の開発」
(グリオーマ幹細胞特異的因子群を標的とした新規治療法の開発)
2. 研究開発代表者： 国立大学法人北海道大学 遺伝子病制御研究所 教授 近藤 亨
3. 研究開発の成果

①抗ヒト Glim ヒト化抗体・ヒト抗体

エピトープの異なる3種類の抗ヒト Glim ヒト化抗体を作製し、そのうちの2種類（ヒト化抗体1と2）がヒト Glim に対して高い親和性（KD: $\sim 10^{-9}$ ）を保持していること、ヒト Glim 強制発現細胞に対して細胞傷害活性（ADCC 活性）を有していることを確認した。しかし、これらヒト化抗体は、内発的に Glim を発現しているヒトがん細胞株（Glim 陽性ヒトがん細胞株）に対して ADCC 活性を示さなかった。この理由は、本ヒト化抗体の ADCC 活性が標的細胞の Glim 発現量に依存している可能性を示唆している。標的抗原の発現量が低いがん細胞に対しては抗体-薬物複合体（ADC）が有効であると報告されていることから、Glim への親和性が強いヒト化抗体2に細胞傷害性因子 monomethyl auristatin E (MMAE) を結合させた ADC を作製した。本 ADC を2種類の Glim 陽性ヒトがん細胞株に反応させた結果、抗体濃度に依存した傷害活性を確認した。また、本ヒト化抗体と ADC の抗がん効果を検討する前実験として、免疫不全マウスにヒト化抗体（ $100 \mu\text{g}/\text{マウス}$ ）又は ADC（ $50 \mu\text{g}/\text{マウス}$ ）を複数回投与したが、個体への毒性は観察されなかった。このように、Glim 陽性ヒトがん細胞株を移植した担がんマウスに対するヒト化抗体と ADC の抗がん効果を検討する実験基盤を整えた。

担がんマウスモデル（B16 メラノーマ細胞肺転移モデルと Glim 陽性ヒトがん細胞株移植モデル）を用いた本ヒト化抗体の抗がん効果を検討するために必要となる多量の抗体の調整方法を確立した。加えて、ヒト化抗体を用いて複数の同一患者由来のメラノーマ組織（原発巣と肺転移巣）を免疫染色し、原発巣と肺転移巣内に Glim 陽性細胞の存在を確認した。更に、分化マーカーの1つメラニンと Glim に対する2重染色を行い、Glim 陽性細胞がメラニン陰性/弱陽性の未分化メラノーマ細胞であることを発見した。他腫瘍での Glim 発現細胞の有無を検討するため、ヒト腫瘍組織の収集を開始した。

ヒト型抗体を作製する過程で、上記の実験で使用したヒト化抗体の設計に用いた公開データベースに誤りを発見した。このため、上記ヒト化抗体はキメラ抗体と呼ぶべきものであることが判明し、正しい情報に基づいた真正のヒト化抗体を作製した。更に、Glim 抗体のマウス CDR アミノ酸配列と類似した配列をヒトゲノム抗体遺伝子領域から抽出し、真正ヒト化抗体の CDR 配列に導入することによりヒト型抗体の作製に成功した。

②Glim シグナルと発現制御機構

Glim が活性化する非古典的 NF- κ B シグナルを特異的に阻害する化合物を同定する目的として、定常状態で NF- κ B シグナルの活性化が検出されず、細胞増殖・生存に同シグナルを必要としない複数の細胞株を決定した。次に、これら候補細胞株にヒト Glim を強制発現し、Glim 依存的に非古典的 NF- κ B シグナルを活性化する細胞 X を同定した。更に、NF- κ B シグナル阻害剤が Glim 強制発現細胞 X の細胞増殖・生存に影響しないことも確認した。このように、Glim 強制発現細胞 X を用いた非古典的 NF- κ B シグナル伝達系を阻害する化合物を同定するスクリーニング実験系を樹立した。

血行性肺転移した B16 メラノーマ細胞がどのように Glim 発現を獲得するのか、その分子機構を解明するために、肺転移した B16 細胞と培養 B16 細胞に発現されている遺伝子について網羅的な発現解析を行った。その結果、肺転移した B16 細胞は培養 B16 細胞に発現されている遺伝子群に加えて Y 関連遺伝子群の発現を獲得していた。Glim と Y 関連遺伝子群の発現制御機構を基に、B16 細胞の肺転移に働く分子機構を研究する新たな手がかりを得た。