

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) 新規マーカーによる悪性中皮腫の精密・早期診断の開発
(英語) Development of early and correct diagnosis with a new mesothelioma marker.
- 研究開発担当者 (日本語) 地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター
臨床研究所・顧問・今井 浩三
- 所属 役職 氏名： (英語) Research Institute, Kanagawa Cancer Center,
Kanagawa Prefectural Hospital Organization, Adviser, Kohzoh Imai
- 実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 中皮腫検体の収集と産学連携交渉
開発課題名： (英語) Collection of mesothelioma specimens and negotiation of
collaboration with industry
- 研究開発分担者 (日本語) 地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター
臨床研究所・顧問・今井 浩三
- 所属 役職 氏名： (英語) Research Institute, Kanagawa Cancer Center,
Kanagawa Prefectural Hospital Organization, Adviser, Kohzoh Imai
- 分担研究 (日本語) 新規マーカーHEG1 の解析と抗体作製
開発課題名： (英語) Analyses of a new mesothelioma marker, HEG1, and anti-HEG1 antibody
- 研究開発分担者 (日本語) 地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター
臨床研究所・主任研究員・辻 祥太郎
- 所属 役職 氏名： (英語) Research Institute, Kanagawa Cancer Center, Kanagawa Prefectural
Hospital Organization, Senior Researcher, Shoutaro Tsuji

II. 成果の概要（総括研究報告）

悪性中皮腫に対して高い特異性を示すマーカーがないために、中皮腫の診断と分子標的治療の開発は困難であった。我々は、新規中皮腫マーカー抗体としてモノクローナル抗体 SKM9-2 を樹立し、その抗原がシアル化 HEG1 であることを見出した。平成 28 年度の研究では、SKM9-2 の中皮腫検体に対する反応性の評価、SKM9-2 の全配列の決定、SKM9-2 のエピトープ領域の同定、新規の抗 HEG1 モノクローナル抗体の作製を行った。また、本研究の過程で HEG1 が中皮腫細胞の生存と増殖に関与している可能性を見いだした。

- 1) 中皮腫患者の病理検体 40 症例を新たに収集し、SKM9-2 を用いて免疫組織染色を行い、過去に染色していた症例と合わせ計 130 症例の悪性胸膜中皮腫について検出感度の解析を行った。SKM9-2 による中皮腫の検出感度は 92% となり、対照として用いた既存の中皮腫マーカー（カルレチニン（80%）、サイトケラチン 5/6（78%）、ポドプラニン（82%）、WT-1（87%）、メソテリン（79%））よりも優れていた。また、特異性も 99% と既存の中皮腫マーカー（72–96%）よりも高く、シアル化 HEG1 が中皮腫の病理診断マーカーとして既存の中皮腫マーカーよりも優れていることが示された。また、SKM9-2 を中皮腫の診断用抗体として用いることが可能であると考えられた。
- 2) SKM9-2 抗体の全配列を決定した。SKM9-2 の可変領域 V_H および V_L をヒト Ig γ 1 の C_H 領域、およびヒト Ig κ の C_L 領域にそれぞれ接続したキメラ抗体遺伝子を作製し、ヒト IgG1 キメラ抗体を得た。このキメラ抗体を用いて中皮腫細胞株への反応性の確認を行い、SKM9-2 と同等の結合性を持つことを確認した。
- 3) 部分長の HEG1 リコンビナント体を用いて SKM9-2 との反応を解析し、SKM9-2 が結合するエピトープ領域を同定した。エピトープは HEG1 中に存在する糖鎖修飾された配列であった。また、エピトープ領域のアミノ酸の Ala 置換体を作製し、糖鎖付加部位の推定を行った。さらに、エピトープ領域内の 1 アミノ酸が Ala に置換されたリコンビナント HEG1 では、SKM9-2 の反応性が失われることを見いだした。糖鎖を含むエピトープを認識する抗体では、抗原分子内にエピトープが複数存在する場合があることが知られている。しかし今回の解析から、SKM9-2 のエピトープは HEG1 内の 1 カ所に限定されており、SKM9-2 が高い抗原特異性を持つことが明らかとなった。
- 4) 部分長のリコンビナント HEG1 の安定発現細胞株を作製し、大量培養を行って、部分長 HEG1 のリコンビナント体を精製した。この精製品を用いてマウスに免疫を行い、抗 HEG1 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製した。ELISA、および中皮腫細胞株を用いたフローサイトメトリーによりスクリーニングを行い、中皮腫細胞株上に発現している native の HEG1 に対して反応する抗体クローンを得ることができた。現在、得られたクローンを用いて、体液中 HEG1 の検出が可能な sandwich ELISA の系の開発を進めている。
- 5) SKM9-2 ハイブリドーマの無血清培養系と抗体の大量精製系を確立し、エピトープペプチドを用いた抗体の活性測定系を開発した。これらの精製抗体と活性測定系を用いて、技術支援班の支援のもと、in vivo imaging による診断法の開発を開始した。
- 6) 本研究の過程で、中皮腫細胞株の HEG1 の発現を siRNA で抑制すると、細胞の増殖が阻害されることを見いだした。阻害効果は時間依存的で、複数の HEG1 siRNA と複数の細胞株で観察された。HEG1 の発現のない細胞株では阻害効果は認められなかった。これらの結果から、HEG1 が中皮腫細胞の増殖に関与していることが示唆された。

Summary of research findings

The absence of highly specific markers for malignant mesothelioma has served an obstacle for its diagnosis and development of molecular-targeting therapy against mesothelioma. In a preceding work, we established a monoclonal antibody, SKM9-2, against a mesothelioma specific antigen and identified its antigen as sialylated HEG1. We, here, show that the sialylated HEG1 is a highly specific marker for malignant mesothelioma.

- 1) We investigated expression of SKM9-2 antigen in 130 cases of mesothelioma, including 40 cases collected in the current year, by immunohistochemistry. SKM9-2 antigen was detected in 92% of MPMs, and the positive rate exceeded those for other mesothelioma diagnostic markers, *viz.* calretinin (80%), cytokeratin 5/6 (CK5/6) (78%), podoplanin (82%), nucleus Wilms' tumor gene product 1 (WT-1) (87%), and mesothelin (79%). The mesothelioma specificity of SKM9-2 antigen reached 99%, which was the highest specificity that we measured among mesothelioma markers (72–96%). The mAb SKM9-2, which recognizes sialylated HEG1, may be a good mesothelioma-specific marker for pathological diagnosis.
- 2) We decided nucleotide sequences of mAb SKM9-2. Chimeric antibody of SKM9-2, which the V_H or the V_L region of SKM9-2 was followed with C_H region of human Igγ1 or C_L region of human Igκ respectively, was produced with mammalian cell lines and the reactivity of this chimeric antibody was examined on mesothelioma cell lines. The chimeric antibody bound to mesothelioma cells as well as the original mAb SKM9-2.
- 3) Epitope region of SKM9-2 was determined by using a partial length of recombinant HEG1. The epitope was the glycosylated sequences in HEG1. The glycosylation sites were deduced by alanine scanning in the epitope. A HEG1 mutant substituted Ala for the glycosylation site was not recognized with SKM9-2. This result suggested that HEG1 has a single epitope for SKM9-2.
- 4) A partial length of recombinant HEG1 was purified from culture supernatant of stably transfected cells and it was immunized in mice. Anti-HEG1 hybridoma clones were established by screenings using ELISA and flowcytometry. Two mAb clones that can recognize native HEG1 on mesothelioma cells were obtained. In the further study, we are developing a sandwich ELISA for soluble HEG1 using these mAbs.
- 5) We established a production system of mAb SKM9-2 that was purified from culture supernatant of animal origin-free and protein-free medium. In addition, we made a measurement system of SKM9-2 reactivity using an epitope peptide. By using the measurement system, the reactivity of antibody can be checked on a labeling of the purified mAb. We have started a project for *in vivo* imaging with SKM9-2 by using these systems.
- 6) In this research, we found that proliferation of mesothelioma cells was suppressed by HEG1 siRNA in a time-dependent manner. The suppression was observed by several HEG1 siRNA and on several mesothelioma cell lines. HEG1 siRNA did not affect the cells without HEG1 expression. These results suggested that mesothelioma cell proliferation partly depends on HEG1 expression.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

1. **Tsuji S**, Washimi K, Kageyama T, Yamashita M, Yoshihara M, Matsuura R, Yokose T, Kameda Y, Hayashi H, Morohoshi T, Tsuura Y, Yusa T, Sato T, Togayachi A, Narimatsu H, Nagasaki T, Nakamoto K, Moriwaki Y, Misawa H, Hiroshima K, Miyagi Y, **Imai K**. HEG1 is a novel mucin-like membrane protein that serves as a diagnostic and therapeutic target for malignant mesothelioma. **Scientific Reports**. 2017, 7, 45768.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 新規中皮腫マーカー分子の同定, 口頭, **辻祥太郎**, 松浦利絵子, **今井浩三**, 第 7 回 Japan Mesothelioma Interest Group 研究会, 2016/9/3, 国内.
2. 極めて優れた特異度と感度をしめす新規中皮腫マーカー分子の同定, 口頭, **辻祥太郎**, **今井浩三**, 第 36 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2016/10/5, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願

PCT/JP2017/1250