慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	トリプルネガティブ乳がんを標的とした次世代型抗体医薬品の開発
Sub Title	Development of antibody drugs targeting triple-negative breast cancer
Author	森脇, 康博(Moriwaki, Yasuhiro)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2024
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	トリプルネガティブ乳がん（TNBC）は、転移浸潤能が高く、悪性度が高い一方で、特異的な治療法は乏しい。近年、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤がTNBCの治療薬として承認を受けているが、その効果は限局的であり、TNBCに対して高い殺細胞効果を示す薬物治療の開発が必要である。我々は、TNBC細胞株の一つであるBT549細胞の分子Xが、細胞株特異的な糖鎖修飾パターンを示すことを見出した。この研究成果は、一部のTNBC細胞では、特異的な糖鎖修飾を受けるタンパク質が存在することを示しており、TNBC細胞に特異的に結合する抗体の作製可能性を示唆している。そこで本研究では、BT549細胞をマウスに免疫することで、TNBC特異的なモノクローナル抗体（mAb）を創出することを目指した。Balb/cマウスにBT549細胞を免疫し、免疫後、BT549細胞と反応する抗血清が含まれることを確認した。抗血清が含まれるマウスから脾臓を摘出し、Sp2/O-Ag14細胞と細胞融合装置ECFG21を用いて電気融合を行なった。一次スクリーニングには、BT549細胞あるいはエストロゲン受容体陽性の乳がん由来のMCF7細胞を用いたIn-Cell Western法により行なった。その後、BT549細胞およびMCF-7細胞を用いたFACSによる解析において、BT549細胞への強い結合が確認された、クローンを選別した。選別したクローンのセルクローニングを行い、単一クローンにした後、Balb/c nu/nuマウスに腹腔内投与することで、腹水を回収した。BT549細胞は間葉系細胞の特徴を示すため、今回樹立した抗体が間葉系細胞に対する抗体でないことを皮膚由来間葉系細胞であるDetroit 551細胞を用いたFACSで確認を行った結果、BT549細胞にのみ反応する3種類のハイブリドーマ細胞を得ることに成功した。 Triple negative breast cancer (TNBC) have a higher invasive potential and is highly malignant, yet specific treatment options are scarce. In recent years, molecular target drugs and immune checkpoint inhibitors have been approved for the treatment of TNBC, but their efficacy is limited, and the development of drug therapies with high cell-killing efficacy against TNBC is needed. We found that Molecule X in BT549 cells, one of the TNBC cell lines, exhibits a cell line-specific pattern of glycosylation. Our results indicate that some TNBC cells have proteins that undergo specific glycosylation, suggesting the possibility of producing antibodies that bind specifically to TNBC cells. Therefore, in this study, we aimed to generate a TNBC-specific monoclonal antibody (mAb) by immunizing mice with BT549 cells. Balb/c mice were immunized with BT549 cells, and after immunization, we confirmed that they contained antiserum that reacted with BT549 cells. Spleens from mice containing antiserum were removed and electrofused with Sp2/O-Ag14 cells using the ECFG21 cell fusion device. Primary screening was performed by the In-Cell Western method using BT549 cells or estrogen receptor-positive breast cancer-derived MCF7 cells. Subsequently, clones that showed strong binding to BT549 cells were selected by FACS analysis using BT549 cells and MCF-7 cells. The selected clones were cell-cloned to produce a single clone, which was then intraperitoneally administered to Balb/c nu/nu mice to collect ascites. Since BT549 cells show characteristics of mesenchymal cells, we confirmed that the antibodies established in this study are not antibodies against mesenchymal cells by using skin-derived mesenchymal cells, Detroit 551 cells, and FACS. As a result of confirmation by FACS using Detroit 551 cells, we succeeded in obtaining three types of hybridoma cells that reacted only with BT549 cells.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2023000010-20230082

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2024年3月25日

2023年度　学事振興資金（個人研究）研究成果実績報告書

研究代表者	所属	薬学部	職名	専任講師	補助額	500千円 （特Ｂ）
	氏名	森脇 康博	氏名（英語）	Yasuhiro Moriwaki		

研究課題（日本語）

トリプルネガティブ乳がんを標的とした次世代型抗体医薬品の開発

研究課題（英訳）

Development of antibody drugs targeting triple-negative breast cancer

１．研究成果実績の概要

トリプルネガティブ乳がん（TNBC）は、転移浸潤能が高く、悪性度が高い一方で、特異的な治療法は乏しい。近年、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤がTNBCの治療薬として承認を受けているが、その効果は限局的であり、TNBCに対して高い殺細胞効果を示す薬物治療の開発が必要である。我々は、TNBC細胞株の一つであるBT549細胞の分子Xが、細胞株特異的な糖鎖修飾パターンを示すことを見出した。この研究成果は、一部のTNBC細胞では、特異的な糖鎖修飾を受けるタンパク質が存在することを示しており、TNBC細胞に特異的に結合する抗体の作製可能性を示唆している。そこで本研究では、BT549細胞をマウスに免疫することで、TNBC特異的なモノクローナル抗体（mAb）を創出することを目指した。Balb/cマウスにBT549細胞を免疫し、免疫後、BT549細胞と反応する抗血清が含まれることを確認した。抗血清が含まれるマウスから脾臓を摘出し、Sp2/O-Ag14細胞と細胞融合装置ECFG21を用いて電気融合を行なった。一次スクリーニングには、BT549細胞あるいはエストロゲン受容体陽性の乳がん由来のMCF7細胞を用いたIn-Cell Western法により行なった。その後、BT549細胞およびMCF-7細胞を用いたFACSによる解析において、BT549細胞への強い結合が確認された、クローンを選別した。選別したクローンのセルクローニングを行い、単一クローンにした後、Balb/c nu/nuマウスに腹腔内投与することで、腹水を回収した。BT549細胞は間葉系細胞の特徴を示すため、今回樹立した抗体が間葉系細胞に対する抗体でないことを皮膚由来間葉系細胞であるDetroit 551細胞を用いたFACSで確認を行った結果、BT549細胞にのみ反応する3種類のハイブリドーマ細胞を得ることに成功した。

２．研究成果実績の概要（英訳）

Triple negative breast cancer (TNBC) have a higher invasive potential and is highly malignant, yet specific treatment options are scarce. In recent years, molecular target drugs and immune checkpoint inhibitors have been approved for the treatment of TNBC, but their efficacy is limited, and the development of drug therapies with high cell-killing efficacy against TNBC is needed. We found that Molecule X in BT549 cells, one of the TNBC cell lines, exhibits a cell line-specific pattern of glycosylation. Our results indicate that some TNBC cells have proteins that undergo specific glycosylation, suggesting the possibility of producing antibodies that bind specifically to TNBC cells. Therefore, in this study, we aimed to generate a TNBC-specific monoclonal antibody (mAb) by immunizing mice with BT549 cells. Balb/c mice were immunized with BT549 cells, and after immunization, we confirmed that they contained antiserum that reacted with BT549 cells. Spleens from mice containing antiserum were removed and electrofused with Sp2/O-Ag14 cells using the ECFG21 cell fusion device. Primary screening was performed by the In-Cell Western method using BT549 cells or estrogen receptor-positive breast cancer-derived MCF7 cells. Subsequently, clones that showed strong binding to BT549 cells were selected by FACS analysis using BT549 cells and MCF-7 cells. The selected clones were cell-cloned to produce a single clone, which was then intraperitoneally administered to Balb/c nu/nu mice to collect ascites. Since BT549 cells show characteristics of mesenchymal cells, we confirmed that the antibodies established in this study are not antibodies against mesenchymal cells by using skin-derived mesenchymal cells, Detroit 551 cells, and FACS. As a result of confirmation by FACS using Detroit 551 cells, we succeeded in obtaining three types of hybridoma cells that reacted only with BT549 cells.

３．本研究課題に関する発表

発表者氏名 （著者・講演者）	発表課題名 （著書名・演題）	発表学術誌名 （著書発行所・講演学会）	学術誌発行年月 （著書発行年月・講演年月）