

受入大学名	岡山大学		
Host University	Okayama University		
外国人研究者	アラム ムハマド ジャハングール		
Foreign Researcher	ALAM MD JAHANGIR		
受入研究者	妹尾昌治	職名	教授
Research Advisor	Masaharu Seno	Position	Professor
受入学部/研究科	学術研究院ヘルスシステム統合科学学域		
Faculty/Department	Interdisciplinary Science and Engineering in Health Systems		

<外国人研究者プロフィール/Profile>

国籍	バングラデシュ
Nationality	Bangladesh
所属機関	シャジャイ科学技術大学
Affiliation	Shahjalal University of Science and Technology
現在の職名	教授
Position	Professor
研究期間	2023年7月1日～2023年9月28日（90日間）
Period of Stay	90 days ( July 1, 2023 - September 28, 2023)
専攻分野	生物医工学
Major Field	Medical Bioengineering



細胞サンプルの調製 / Preparation of cell samples

<外国人研究者からの報告/Foreign Researcher Report>

<p><b>①研究課題 / Theme of Research</b></p> <p>Cancer remains one of the most formidable challenges to global public health, impacting millions of lives each year. Cripto-1, an onco-fetal protein, is significantly upregulated in a number of human cancer types, such as colon, breast, lung, ovarian, and pancreatic cancers. Previously, we succeeded in producing recombinant human Cripto-1 in soluble form and also a noble humanized monoclonal anti-Cripto-1 antibody. Our target is to establish the anti-Cripto-1 antibody as a promising therapeutic candidate with broad applications across various cancer types.</p>
<p><b>②研究概要 / Outline of Research</b></p> <p>In order to achieve the goal, we are looking for cancer cell lines that express high levels of Cripto-1. On DMEM/RPMI-1640 media supplemented with 10% FBS for adherent cultures, cancer cell lines were grown. Serum-free DMEM medium with 1% ITS-x were employed for sphere formation and ELDA analysis. Immunostaining of Cripto-1 has been conducted, and ImageJ software was used to densitometrically analyze the intensity of western blot bands and beta-actin was used as a normalization control. qPCR experiments were carried out, and the amount of gene expression was compared to that of mRNA for the enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).</p>
<p><b>③研究成果 / Results of Research</b></p> <p>We have previously observed the growth suppressing effects of anti-Cripto-1 antibodies in GEO cells. We are investigating this time to find out which cells over-express Cripto-1. By applying a variety of techniques, including western blotting, sphere formation assay, immunocytochemistry, rt-qPCR etc., we found that NCCIT, Ntera-2, MiaPaCa2, and MDA-MB-231 expressed Cripto-1. More over, I have participated in the 34th symposium of Japanese retinoid society on retinoid research (Sep 09-09, 2023) at the medical school of Okayama University, Okayama, Japan and also in the 82nd annual meeting of the Japanese cancer association (Sep 21-23, 2023) at Yokohama, Japan.</p>
<p><b>④今後の計画 / Further Research Plan</b></p> <p>The therapeutic effects of an anti-Cripto-1 antibody will be examined in vitro and in vivo after obtaining the most prominent Cripto-1 expressing cell lines. The final results will be submitted for patenting and published in reputable international journals. Research on the commercial feasibility of the project will also be done concurrently.</p>

## < 受入研究者からの報告/Research Advisor Report >

### ①研究課題 / Theme of Research

がんは、日本国内はもとより世界でも死亡率の高い疾患であり、毎年数百万人ががんにより死亡していることから、がんの診断治療は人類にとって大きな課題となっている。未分化な細胞の表面上に発現するタンパク質Cripto-1は、結腸がん、乳がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がんなど多くのヒトがん種で顕著な発現が観察されており、がんマーカーの一つとして注目されている。我々はこれまでに、組換ヒトCripto-1の可溶性を大腸菌での発現に成功しており、これを抗原としてヒト化抗Cripto-1モノクローナル抗体の生産を試みている。この研究の目標は、この抗Cripto-1抗体を、さまざまながん種に広く応用できる有望な候補治療薬として確立することである。

### ②研究指導概要 / Outline of Research

抗体の評価系を確立するためにはCripto-1を高発現するがん細胞株が必要であるため、この目的に適合する細胞株の探索を始めた。Cripto-1は細胞が未分化な状態で発現するタンパク質であることから、未分化性を維持できる培養方法としてスフィア形成の方法を指導し、さらにスフィア形成能を評価するExtreme Limiting Dilution Analysis (ELDA)による分析方法を指導した。同時に、抗ヒトCripto-1抗体による細胞染色とCripto-1の発現強度を、ウェスタンブロットにより検出されるバンドのデンストメトリー解析についてImageJソフトウェアを利用する方法を指導して、 $\beta$ -アクチンを標準対照として相対的な発現量の比較する方法を指導した。また、遺伝子発現量をRT-qPCRにより評価するために酵素グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を標準対照として相対的な発現量を評価する方法も指導した。

### ③研究指導成果 / Results of Research

すでに、Cripto-1を高発現する大腸がん由来細胞株に対して抗Cripto-1抗体の増殖抑制効果を観察していたが、今回は、効果の一般性を調べるためにできるだけ多くのCripto-1高発現細胞株に対して、抗Cripto-1抗体の効果を知る必要があった。ウェスタンブロットング、スフィア形成アッセイ、免疫細胞化学、RT-qPCRなど様々な技術を応用し、肺がん、乳がん、膵臓がんなどの細胞株でCripto-1を発現している細胞を見出した。これらの結果をもとに、研究会、シンポジウム及び学会で意見交換を行って、今後の指針として検討すべき点を討議することもできた。

### ④留学生交流事業の活動状況 / Activities of International Student Exchange Program

当初は、東北大学や理化学研究所へ訪問する予定であったが、先方の研究者がコロナ禍の中で活動方針を研究から臨床へ転換したため、研究テーマに関連した討論は不可能となり訪問は断念した。そこで、岡山大学キャンパスで開催された岡山バイオアクティブ研究会および第34回日本レチノイド学会レチノイド研究シンポジウム（2023年9月9日～9日）に参加して、分子生物学、細胞生物学、生化学分野および有機化学分野などの研究者と交流した。さらに、横浜で開催された第82回日本癌学会学術集会（2023年9月21日～23日）にも参加し、がん関連分野の研究者とも交流を深めることができた。

### ⑤今後の計画 / Further Research Plan

今回の解析で、顕著なCripto-1発現細胞株を得る可能性が認められたことから、これらの細胞に対して、抗Cripto-1抗体による細胞への影響評価を継続して行っていく。特に、増殖への影響のみならず、分化能や遊走能についての評価を加えて癌細胞におけるCripto-1の機能への影響について総合的に評価する予定である。これらの結果を踏まえ、in vivoでの検討も行って抗Cripto-1抗体のがん治療への応用の可能性について明らかにしていく予定である。



クリーンベンチでの無菌操作 / Cell handling in a laminar-flow bench



細胞の顕微鏡観察 / Observation of cells under microscope