

令和元年6月17日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07184

研究課題名(和文)がん微小環境のSecretome解析にもとづく革新的抗体治療

研究課題名(英文)Secretome analysis of tumor microenvironment for developing immunotherapeutics

研究代表者

福原 武志 (Fukuhara, Takeshi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20359673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん微小環境を標的としたバイオマーカーやそれに対応する標的化抗体を探索することを目的としている。メラノーマの新たなバイオマーカーとして同定したIL13Ra2について、がん組織のSecretome解析によりIL13Ra2に依存して発現の増減を示す因子を複数同定した。IL13Ra2過剰発現やsiRNAによるIL13Ra2の機能喪失実験に呼応した転写発現動態を示すAREGを発現するSK-MEL28を用いてXenograftを作成すると、Controlに比べ強い血管新生を伴う病理像を得た。メラノーマに発現するIL13Ra2はAREGを発現調節して造腫瘍性に寄与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は難治疾患に該当する悪性黒色腫について、がんを標的とした抗癌剤治療に制限が生じている現状を鑑みて、がん微小環境を構成する他の種類である間質細胞に着目した新しい抗体治療の基礎的知見を得ようとするものである。IL13Ra2を悪性黒色腫の新しいバイオマーカーに同定していたが、この悪性化に至る分子メカニズムを同定して、当該分子AREGに対する治療抗体を探索しようと試みた。特にIL13Ra2とAREGの発現協調性について解析も行い、学会発表および論文として発表を行った。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to reveal the molecular mechanism underlying melanoma tumorigenesis. As melanoma biomarker, IL13Ra2 was identified by our functional antibody screening method. To reveal the function of gain or loss of IL13Ra2 expression, in vitro and in vivo experiments including Secretome analysis. Then, it has been discovered that over expression of AREG in the Xenografted tissue with IL13Ra2-positive melanoma cells. Histopathological analysis identified extended growth of CD31-positive endothelial cells in Xenograft mice, suggesting IL13Ra2-AREG axis enhance tumor angiogenesis (Okamoto et al., Sci. Report 2019). Our approach to generate antibody therapeutics was targeted on IL13Ra2 and AREG, so that several hybridoma producing anti-human or mouse AREG proteins were screened. Neutralization activity as well as immunoreactivity of antigenic peptides were on-going.

研究分野：抗体治療

キーワード：抗体 メラノーマ 血管新生 Secretome

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、がん治療の標的としてがん細胞のみならず、がん微小環境を構成する様々な細胞種の機能に着目が集まっており、新しい治療法の作用点を明らかにすることが期待されている。例えば新たな治療の作用点として、血管新生を阻害する bevacizumab (ヒト化モノクローナル抗 VEGF-A 抗体) が臨床的に使われている。特に難治性腫瘍においては、がん微小環境を構成する様々な細胞種の相互作用が治療奏効率を制御していると考えられていることから、このメカニズムを明らかにして分子標的を同定し、抗体治療への基礎的知見を得る必要がある。我々は、難治がん細胞株または血管内皮細胞を免疫原とした機能性抗体の探索を進めており、がん微小環境を標的とした機能性抗体を利用した抗体治療法の研究開発を推進している。本研究では、特にがん細胞と血管内皮細胞の相互作用に着目してがん微小環境の分泌因子ならびにその制御メカニズムを明らかにすることを計画した。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでの研究で、改変型ジフテリア毒素を用いて薬物送達能を有する抗体の探索を進めてきており (Yamaguchi et al., 2015)、IL13Ra2 をメラノーマの新たなバイオマーカーに同定した (投稿準備中)。過去に IL13Ra2 は、膵癌や脳腫瘍でもバイオマーカーとして報告されており、転移を制御することが示唆されていたことから、がん微小環境の分泌する因子や IL13Ra2 と相互作用すると見られる血管制御因子に着目して同定することを目的とした。

3. 研究の方法

がん微小環境の Secretome を解析して、なおかつ悪性黒色腫のバイオマーカーとして同定した IL13Ra2 の機能との関連を明らかにする目的で、分泌因子群の解析と IL13Ra2 の機能を安定に亢進または喪失するメラノーマ細胞株 (A375, SKMEL28 等) を樹立して活用した。実験の進捗により Amphiregulin も標的分泌因子として同定されたので、同様に安定発現株を作成した。In vitro での細胞増殖やシグナル応答能および in vivo (ヌードマウス Xenograft モデル) での腫瘍形成能を検討した。また分泌因子群の解析には、サイトカインレポーター細胞を用いてがん細胞に加え血管内皮細胞株やがん関連線維芽細胞株に対しても行った。

4. 研究成果

悪性黒色腫における IL13Ra2 発現

IL13Ra2 の発現について悪性黒色腫細胞株について検索したところ、先行研究および本研究から、転写レベルだけでなくタンパク質レベルでも A375 に高発現を認めた (Fig.1)。また先行研究において KSN/Slc ヌードマウスへの Xenograft 移植によっても、A375 は強い造腫瘍性を示すことを明らかにしていた。また SKMEL28 細胞株は IL13Ra2 陰性であると同時に造腫瘍性をほぼ示さなかった。

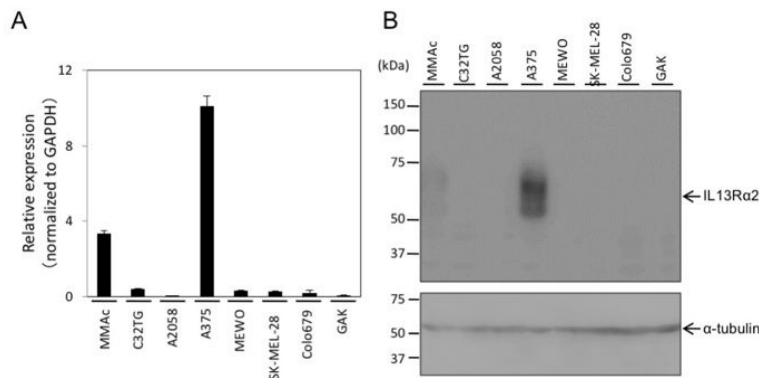


Fig.1 悪性黒色腫細胞株における IL13Ra2 の発現

IL13Ra2 発現状態による細胞増殖への効果

Lentivirus を用いて IL13Ra2 を安定的に発現する細胞株を複数種類樹立した。SK-IL13Ra2 における発現強度は転写サンプルレベルで A375 と同等であった。この細胞を用いて、*in vitro* の細胞増殖速度を WST1 試薬によって経時的に検討したところ、コントロールの SK-MEL-28 に対して IL13Ra2 安定発現株では増殖速度が有意に遅延していることが明らかとなった (Fig.2)。

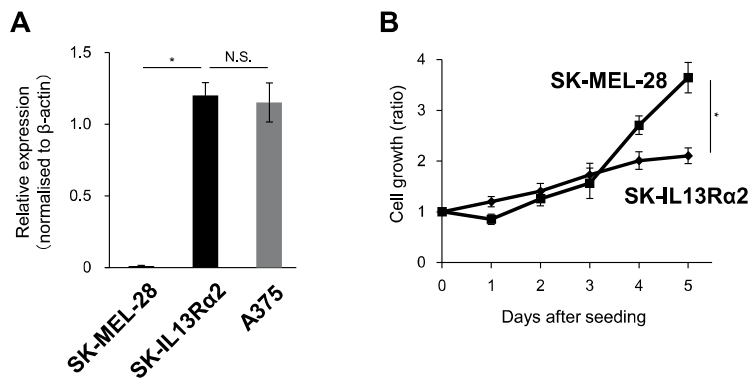


Fig.2 IL13Ra2 発現による *in vitro* 細胞増殖

IL13Ra2 発現による造腫瘍性の昂進

悪性黒色腫の患者検体病理像や組織アレイ、およびトランスクリプトームデータベースから IL13Ra2 強陽性となる知見を得たことから IL13Ra2 発現による造腫瘍性を検討した。6 週齢メスのヌードマウスの 6 頭ずつに SK-MEL-28 細胞と SK-IL13Ra2 細胞のそれぞれを皮下移植し、経時的に腫瘍径を測定して腫瘍体積を算出した。その結果 SK-IL13Ra2 細胞を移植した 100 日後には、有意な腫瘍形成が認められた (Fig.3A)。肉眼初見から血管の昂進が想定され (Fig.3B) 免疫組織化学染色により CD31 陽性の血管内皮細胞とみられる集団が有意に増殖している結果を得た。

腫瘍塊を用いた Secretome 解析

IL13Ra2 の発現により細胞が造腫瘍性を獲得することが明らかになったので、SK-MEL-28 と SK-IL13Ra2 を皮下移植して得られた腫瘍組織から血管新生関連因子タンパク質の発現を Angiogenesis array を用いて検討した。10 種類の因子が SK-IL13Ra2 で

相対的に上昇していた。統計的に有意であり、なおかつ後続の qPCR 解析などを用いた解析により、IL13Ra2 の発現状態に呼応して発現の変化を認めた Amphiregulin(AREG)を候補として同定した。

IL13Ra2 と AREG の造腫瘍性制御

後続解析により IL13Ra2 と AREG の造腫瘍性におけるメカニズムを明らかにしたいと考えた。AREG を安定発現する SK-AREG をヌードマウスに皮下移植すると SK-MEL-28 では造腫瘍性を示さないのに対して腫瘍形成能が獲得されたことから AREG が悪性黒色腫の造腫瘍性に関与していることが明らかとなった。

IL13Ra2 は細胞内シグナル伝達ドメインを欠失しており、デコイ受容体として作用することが想定されていた。実際に IL13 を添加しただけでは SK-IL13Ra2 または A375 の細胞増殖に有意な変化を与えなかったことから、デコイ受容体として作用していると考えられる。以上の結果について学会ポスター発表、ならびに論文発表した(Okamoto et al., 2019)。

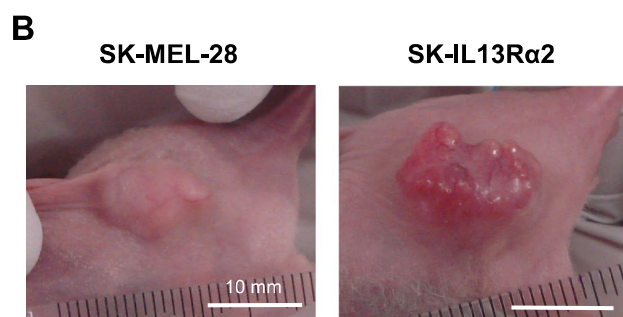
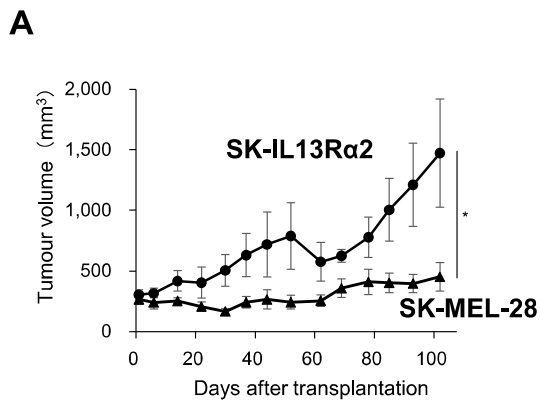


Fig.3 IL13Ra2 は造腫瘍性を獲得する

機能性抗体の探索

A375 を免疫原として IL13Ra2 に対する機能性抗体が樹立され、先行研究において DT3C イムノトキシンを用いた抗体治療を進めていたが十分な効果が見られなかった。本研究では、血管内皮細胞を免疫原とした機能性抗体スクリーニングにより DT3C を用いた機能性抗体のスクリーニングにより複数の樹立したハイブリドーマの産生する抗体についても併せて解析を行った。中でも、がん微小環境における特徴的な環境変化（炎症や低酸素）に

より局在の変化する分子標的 CD321 抗体(90G4)について論文発表した(Fukuhara et al., 2017)。また、AREG を標的とした中和抗体を作成する目的で安定発現株の樹立を行ったが、p815 および CHO のいずれの場合でも一過的な発現は見られたものの薬剤選抜後の安定発現株は得られなかった。そこでヒトおよびマウスの AREG タンパク質配列に由来する合成ペプチドを設計して、ラットに免疫してハイブリドーマを作成した。現在までにペプチドに抗体反応性を示す複数のハイブリドーマ培養上清を得ており、今後中和抗体活性を検索して機能解析を行う予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Fukuhara T, Kim J, Hokaiwado S, Nawa M, Okamoto H, Kogiso T, Watabe T, Hattori N. A novel immunotoxin reveals a new role for CD321 in endothelial cells. ***PLoS One***. 12:e0181502 (2017)
2. Okamoto H, Yoshimatsu Y, Tomizawa T, Kunita A, Takayama R, Morikawa T, Komuro D, Takahashi K, Oshima T, Sato M, Komai M, Podyma-Inoue KA, Uchida H, Hamada H, Fujiu K, Ishikawa S, Fukayama M, Fukuhara T, Watabe T. Interleukin-13 receptor $\alpha 2$ is a novel marker and potential therapeutic target for human melanoma. ***Scientific Reports*** 9: 1281 (2019)

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 福原武志 がんの抗体治療を志向した機能性抗体の探索技術開発, 日本がん分子標的治療学会 2016
2. 福原武志、金垠志、外岩戸慎太郎、渡部徹郎 血管内皮細胞を標的化するモノクローナル抗体の機能解析, 日本生化学会 2016
3. 金垠志、福原武志、渡部徹郎 低酸素環境に曝露された内皮細胞を検出する抗体の検索, 日本分子生物学会 2016
4. 富澤泰志、岡本勇人、佐藤萌希、駒井真央、吉松康裕、福原武志、原田浩徳、渡部徹郎 悪性黒色腫の進展に伴う腫瘍血管新生におけるインターロイキン 13 受容体の役割 日本分子生物学会 2016
5. 福原武志 感染症診断・治療・予防における多次元探索研究のすすめ 日本感染症学会 東日本地方会学術集会 2016
6. Takeshi Fukuhara and Nobutaka Hattori Functional antibody screening for developing therapeutics of neurodegenerative diseases 日本神経科学会 2017
7. 福原武志 血管内皮細胞を標的化する CD321 イムノトキシンによる新たな機能の解析 日本血管生物医学会 2017
8. Takeshi Fukuhara and Nobutaka Hattori Screening technology for potent antibodies modulating endothelial cell functions 日本神経科学会 2018
9. 福原武志、竹田亮太、濱道修生、金井仁美、服部信孝 内皮細胞を標的とした機能性抗体の探索とイムノリポソームによる動態解析 日本生化学会 2018
10. 福原武志、竹田亮太、金井仁美、服部信孝 炎症やストレス応答性に形成される脳脈管系の CD146 亜集団 日本血管生物医学会 2018
11. 福原武志、濱道修生、服部信孝 薬物送達能を示す機能性抗体の探索技術とイムノリポ

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。