

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09140

研究課題名（和文）食道癌に対する新たな抗体医薬とコンパニオン診断技術の開発研究

研究課題名（英文）Development of therapeutic antibody and companion diagnostic technology for esophageal cancer

研究代表者

小池 聖彦（KOIKE, Masahiko）

名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授

研究者番号：10378094

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：食道癌は予後不良であり、新規関連分子の同定が望まれる。本研究では食道扁平上皮癌で高頻度に発現亢進するレセプター分子NPTXRに着目した。shRNAによる安定的ノックダウン食道扁平上皮癌細胞株を用いたNPTXRの機能解析により、NPTXRは食道癌細胞のアポトーシスを介した増殖能、浸潤能、5-FU耐性を調節することが明らかとなった。この性質は主としてAkt-mTORシグナルを介していることが示された。抗NPTXR抗体はin vitroで食道扁平上皮癌細胞株の増殖抑制効果を示した。食道癌組織中NPTXR発現は、免疫組織化学染色法で明瞭に判別可能であるとともに、術後の転移再発と相関していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌は多様な進展経路を持つ予後不良な疾患であるが、本邦において男女ともに癌死亡者数が増加しており、その克服は重要な課題である。本研究では、悪性腫瘍を関連付けた報告は皆無であったNPTXRの食道癌における発現と機能を明らかにした。さらに、抗体医薬の開発という明確な出口設定に基づいてレセプター分子に焦点をあてて候補分子を検索した。本研究の成果は、NPTXRを標的とした全く新しい作用機序での特異的中和抗体医薬開発と、個別化医療を推進するために治療の奏効度を予測するコンパニオン診断法開発の基盤となる。

研究成果の概要（英文）： Since patients with esophageal cancer have a poor prognosis, identification of novel esophageal cancer-related molecules is desirable. In this study, we focused on NPTXR, a receptor that is frequently upregulated in esophageal squamous cell carcinoma. shRNA-mediated functional analysis of NPTXR revealed that NPTXR regulates the proliferative potential, invasive potential, and 5-FU resistance of esophageal cancer cells. It was demonstrated that NPTXR mediated malignant phenotypes of esophageal cancer cells primarily through Akt-mTOR signaling. Anti-NPTXR antibody inhibited the growth of esophageal squamous cell carcinoma cell lines in vitro. NPTXR expression levels in esophageal cancer tissues was clearly distinguishable by immunohistochemical staining and correlated with postoperative recurrences and metastasis.

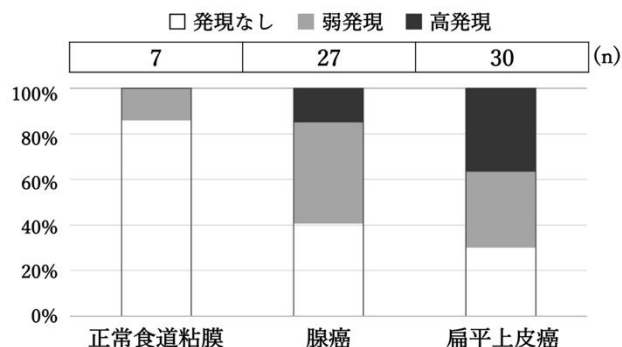
研究分野：消化器外科学

キーワード：食道癌 抗体医薬 コンパニオン診断

1. 研究開始当初の背景

食道癌は多様な進展経路を持つ予後不良な疾患であるが、本邦において男女ともに癌死亡者数が増加しており、その克服は重要な課題である。切除不能・再発食道癌は言うに及ばず、根治切除後も高頻度に再発をきたし不良な転帰をたどることが臨床上的大きな問題となっており、治療成績の改善には抗腫瘍薬の開発が不可欠である。食道癌に対して保険承認された分子標的治療薬はなく、有害事象が強くコンプライアンスも不十分な従来の殺細胞性抗腫瘍薬のみが使用されているのが実情であり、個別化治療時代の到来とは言い難い状況にある。

我々は、抗体医薬の創製が新たな分子標的治療薬の開発を目指すにあたり最も確度が高いと考え、食道扁平上皮癌で高発現するレセプター分子を検索した結果、neuronal pentraxin receptor (NPTXR) を標的分子候補として有望と判断した。NPTXR の食道組織中発現を Tissue microarray (Provitro 社) で調べたところ右図のごとく食道癌で高頻度に発現していることが確認された。



NPTXR はレセプター分子であるため、抗体医薬による阻害が最も効率的であると考え、構造・抗原性・親水性から算出するエピトープ予測に基づいて抗 NPTXR ポリクローナル抗体を合成した。

少数例の内視鏡的生検 FFPE 検体を対象に、抗 NPTXR ポリクローナル抗体と標識 2 次抗体を結合させることで NPTXR 陰性例と陽性例に分類することができた。これらの予備データをもとに、NPTXR が食道癌の新規治療標的、バイオマーカーとして有望であることが示され、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、食道癌における NPTXR の機能を明らかにし、これを標的とした全く新しい作用機序での特異的中和抗体医薬を開発し、創薬に繋げることである。さらに、個別化医療を推進するために治療の奏効度を予測するコンパニオン診断法の開発の基盤となるデータも並行して得ていくことも目的とした。

本研究の独創的な点として、以下の点が挙げられる。

- (1) NPTXR と悪性腫瘍を関連付けた報告は皆無であり、新規性の高い標的分子である。よって、本研究で得られる知見は食道癌の分子生物学的病態を明らかにするために重要なデータとなる。
- (2) 新規分子標的治療薬創製をゴールに設定し、レセプター分子に焦点をあてて候補分子を検索した。そのため、抗体医薬の開発という明確な出口設定が可能となる。
- (3) NPTXR の発現や in vitro での機能解析のみでなく、in vivo 実験で、その発現調節もしくは阻害薬投与の腫瘍形成抑制効果を検証する。これにより、NPTXR 阻害の意義について強固なデータが得られる。
- (4) 腫瘍内 NPTXR 発現の臨床的意義を調べることで、抗 NPTXR 治療対象患者を選別するコンパニオン診断法としての可能性を追求する。個別化医療の実現において重要な観点である。

3. 研究の方法

食道癌における NPTXR の詳細な機能・発現を調べるとともに、NPTXR 特異的抗体が食道癌の進展を阻害するかを明らかにすべく、以下の実験を行った。

NPTXR の機能解析

- (1) **shRNA による安定的ノックダウン株を用いた癌細胞機能の変化**: 13 種の食道扁平上皮癌細胞株を対象に定量的 PCR 法では、KYSE1460 が NPTXR を高発現していた。そこで、KYSE1460 に対して MISSION® shRNA Lentiviral Transduction Particles を導入し、安定的 NPTXR ノックダウン細胞株を確立した。
- (2) **in vitro 実験**: 親株と安定的 NPTXR ノックダウン株の間で、細胞増殖能、アポトーシス細胞比、Caspase 活性、細胞周期の変化を調べるとともに、癌の転移進展に重要な浸潤能、遊走能、接着能を順次評価した。
- (3) **in vivo 実験**: マウス皮下腫瘍モデルを用い、NUDE マウスの皮下に親株と安定的 NPTXR ノックダウン株を移植し、造腫瘍能を比較した。
- (4) **NPTXR 強制発現による細胞増殖能の変化**: NPTXR 低発現食道扁平上皮癌細胞株である

wssc に pCMV6-entry NPTXR expression vector を electroporation 法で導入し、NPTXR を強制発現させ、経時的な細胞形態と細胞増殖能についてコントロール株と比較した。

- (5) 抗腫瘍剤感受性への影響：親株と安定的 NPTXR ノックダウン株の間で食道癌の key drug である 5-FU の感受性を WST-8 法で比較した。
- (6) 癌関連主要 pathway への干渉：NPTXR の悪性腫瘍における役割には未知の部分が多く、どのような signaling pathway との干渉を有するのかを知ることは、その特性を理解するために重要である。親株と安定的 NPTXR ノックダウン株における MAPK/Erk、Stat1/Stat3、Akt、mTOR、p53 のリン酸化について網羅的リン酸化解析、Western blotting 法で評価した。

抗 NPTXR 抗体の食道癌進展抑制効果

- (7) 抗 NPTXR 抗体尾静注投与の治療効果の検証：構造・抗原性・親水性予測に基づいて抗 NPTXR ポリクローナル抗体を合成した。in vitro での増殖能試験で確認ののち、NUDE マウス皮下腫瘍モデルに対する抗体腹腔内投与（週 2 回、4 週間）の腫瘍抑制効果を調べた。

コンパニオン診断薬開発のための臨床検体中 NPTXR 発現解析

- (8) 食道癌原発巣組織中発現と臨床データの相関解析：ヒト食道組織検体を対象に免疫組織学的染色法で NPTXR 発現を評価した。明瞭に NPTXR 発現症例が選別可能かどうかを調べるとともに、NPTXR 発現度と、再発形式や予後を含めた各種臨床病理学的因子との相関を解析した。

4. 研究成果

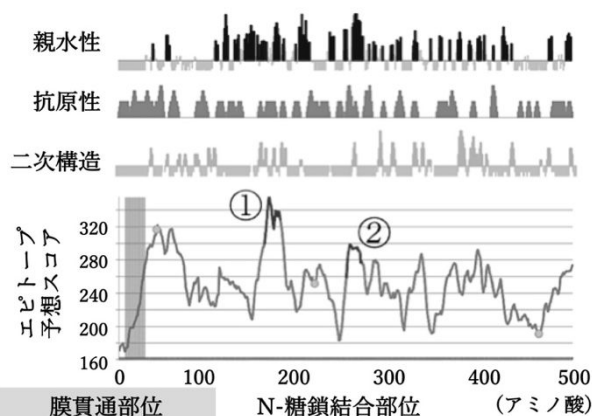
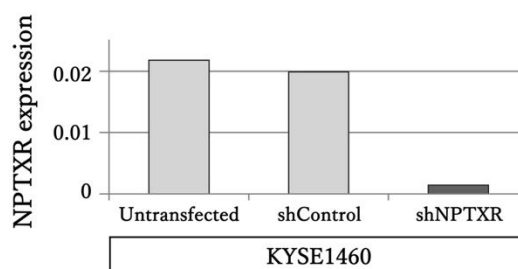
切除不能・再発食道癌は言うに及ばず、根治切除後も高頻度に再発をきたし不良な転帰をたどることが臨床の大きな問題となっており、治療成績の改善には転移再発を制御しうる新しい作用機序の抗腫瘍薬の開発が不可欠である。既存の分子標的治療薬とは全く異なる標的として同定した NPTXR の食道癌における機能を調べることで、メカニズムを明らかとするデータを得つつ、特異的抗体医薬開発の糸口をつかむことを目指した。同時に、個別化治療の実現に向けて重要な、奏効度を事前に予測しうるコンパニオン診断法開発に向けたデータを構築した。

まず、shRNA を用いた安定的 NPTXR ノックダウン食道扁平上皮癌細胞株を樹立した。右上図のごとく、KYSE1460 で 10%未滿の安定的ノックダウンが確認された。これを用いて細胞機能解析を行ったところ、癌進展に重要な細胞増殖能、浸潤能が親株と比較して有意に低下することが明らかになった。NPTXR ノックダウンにより Caspase 9 主体の活性化を介したアポトーシス誘導が起こっており、これが細胞増殖能の低下する機序と考えられた。また、NPTXR ノックダウンにより食道癌の key drug である 5-FU の感受性が改善することも発見した。一方で、細胞遊走能、細胞接着能については、NPTXR ノックダウンによる顕著な変化を認めなかった。

抗原性・親水性予測（右下図）に基づいて、抗 NPTXR ポリクローナル抗体を二種取得した。抗 NPTXR モノクローナル抗体を添加することにより、食道扁平上皮癌細胞株の in vitro での細胞増殖能が抑制された。同一の抗体を、マウス皮下腫瘍モデルに対して反復腹腔内投与（週 2 回、4 週間）を行い、経時的に皮下腫瘍サイズを測定したが、コントロール群と抗体投与群の間に有意な腫瘍径の差を認めなかった。

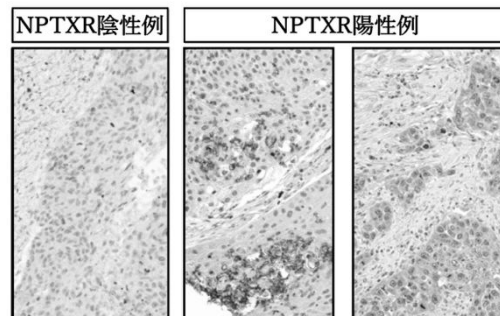
作用機序という観点においては、NPTXR が悪性腫瘍においてどのような signaling pathway に干渉するのかを知ることが重要である。Antibody array を用いて親株と安定的 NPTXR ノックダウン株における細胞内 signaling pathway のリン酸化について網羅的に比較したところ、Akt-mTOR のシグナルのリン酸化が NPTXR により抑制されていた。この結果は、Western blotting でも再現された。

まず、200 例の食道扁平上皮癌切除症例の組織中 NPTXR mRNA 発現レベルを定量的 PCR 法で調べ、臨床病理学的因子との相関解析を実施したところ、癌部 NPTXR 高発現群では有意に無再発生存率が短縮していた。ついで、良好な状態の FFPE 切片が入手可能であった 80 例を対



象に、免疫組織化学染色法で癌部組織中 NPTXR タンパク発現を評価した。右図のごとく明瞭に陰性群と陽性群を判別可能であった。mRNA 発現解析の結果と一致して、癌部 NPTXR タンパク陽性群では、術後無再発生存期間が短縮していた。

本研究の成果により、NPTXR は食道扁平上皮癌の治療および診断の両面において新しい標的となりうることを示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 千恵 (TANAKA Chie) (50589786)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	
研究分担者	小林 大介 (KOBAYASHI Daisuke) (30635595)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	
研究分担者	神田 光郎 (KANDA Mitsuro) (00644668)	名古屋大学・医学系研究科・講師 (13901)	
研究分担者	澤木 康一 (SAWAKI Koichi) (60815033)	名古屋大学・医学部附属病院・医員 (13901)	
研究分担者	小寺 泰弘 (KODERA Yasuhiro) (10345879)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------