

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790947  
 研究課題名 (和文) 食道扁平上皮癌に対する Herceptin 抗体療法の開発と耐性機序の解明  
 研究課題名 (英文) Mechanisms of escape from trastuzumab-mediated ADCC in esophageal squamous cell carcinoma.  
 研究代表者  
 河口 賀彦 (KAWAGUCHI YOSHIHIKO)  
 山梨大学・医学部附属病院・診療助教  
 研究者番号：80402048

## 研究成果の概要 (和文)：

抗 HER-2 モノクローナル抗体である trastuzumab (Herceptin™) に対する食道扁平上皮癌細胞の耐性の機序、すなわち、癌の抗体依存性細胞傷害 (ADCC) からの逃避のメカニズムを検討した。その結果、NK 細胞を分離し行った ADCC で有意な差を認め、Herceptin 耐性の機序としては NK 細胞が重要な役割を果たすことが推察された。さらに、clone に直接 perforin や granzyme を反応させ検討を行ったところ、感受性の違いを認め、これが癌の ADCC からの逃避のメカニズムのひとつに関与すると考えられた。

## 研究成果の概要 (英文)：

We elucidated the mechanisms of escape from trastuzumab-mediated ADCC using esophageal squamous cell carcinoma cell clones. The ADCC assay with purified NK cells showed significantly susceptibility to trastuzumab-mediated ADCC in tumor cell clones. These results indicated that the sensitivity to trastuzumab-mediated ADCC was mainly due to the difference in susceptibility to NK cell-mediated ADCC. Furthermore, the degree of permeabilization induced by PFN and apoptosis induced by the combination of PFN with GrB in tumor cell clones was analyzed. As a result, lower sensitivity for PFN/GrB on tumor clones was related to the reduced trastuzumab-mediated ADCC. In conclusion, lower susceptibility to the perforin-granzyme system is one of the important mechanisms explaining escape from trastuzumab-mediated ADCC.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道扁平上皮癌、抗体療法、trastuzumab、Herceptin、抗体依存性細胞傷害

## 1. 研究開始当初の背景

HER-2 は、ヒト上皮増殖因子受容体 (human epidermal growth factor) family に属する膜貫通型受容体であり細胞増殖に関与する。それ自体のリガンドは同定されていないが、HER-2 は、他の HER family (HER1, HER3, HER4) とヘテロダイマーを形成し、おもに、HER-2 の細胞内ドメインの tyrosine kinase がリン酸化され、その後の下流のシグナル伝達が活性化され、細胞増殖に働くとされ、HER-2 の過剰発現は乳癌の 20-30% に認められる。我々は胃癌、食道癌の HER-2 の発現につき検討し、胃癌の 15% に認められ (Kono K, International Journal of Cancer, 2002)、食道扁平上皮癌においても、30% に HER-2 の過剰発現が認められる (Mimura K, British Journal of Cancer, 2005) ことを報告してきた。

抗 HER-2 抗体 (Herceptin) は、すでに乳癌において臨床応用されており、約 2-3 割の臨床効果が証明されている。その作用機序としては、(1) 腫瘍細胞における活性化シグナル伝達のブロック、(2) HER-2 発現の down regulation、(3) 腫瘍細胞のアポトーシスシグナルの活性化、(4) 抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) による免疫機序などが報告されている。さらに我々は、抗 HER-2 抗体 (Herceptin) の食道癌への臨床応用を目指した基礎的検討を行い、食道扁平上皮癌細胞において、抗 HER-2 抗体 (Herceptin) の抗腫瘍効果の 1 つに ADCC が重要な役割を果たすことを報告してきた (Mimura K, Clinical Cancer Research, 2005)。すなわち、抗 HER-2 抗体 (Herceptin) の食道癌への臨床応用が可能であることが示唆された。さらに我々は、HER family のひとつである HER1 (EGFR) にも注目し、食道癌における EGFR の発現状況、および、抗 EGFR 抗体 (Erbix™) の臨床応用の可能性について検討した。その結果、食道扁平上皮癌の約 35% に EGFR が発現し (Kawaguchi Y, British Journal of Cancer, 2007)、さらに、抗 EGFR 抗体 (Erbix™) は食道扁平上皮癌に対して、ADCC および増殖抑制作用により抗腫瘍効果を発揮することを報告した (Kawaguchi Y, International Journal of Cancer, 2007)。すなわち、食道扁平上皮癌は、EGFR, HER2 ともに比較的高頻度に発現し、また、抗 HER-2 抗体 (Herceptin)、抗 EGFR 抗体 (Erbix™) ともに、抗腫瘍効果が認められることから、食道扁平上皮癌に対

する抗体療法の導入が期待されるものである。

しかしながら、乳癌治療における検討から、抗 HER-2 抗体 (Herceptin) の治療を受けた患者のほとんどが 1 年以内に耐性を生じるといった抗体療法の問題点が存在する。その耐性のメカニズムとして、(1) p27kip1 levels の減少、(2) PTEN の欠損、(3) insulin-like growth factor-I receptor signaling の関与などが報告されている。しかし、これらの報告は、抗 HER-2 抗体 (Herceptin) の腫瘍に対する直接作用に関する耐性機序であり、抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) に注目した抗 HER-2 抗体 (Herceptin) の耐性の機序を報告したものは皆無である。前述のごとく、食道扁平上皮癌に対する抗 HER-2 抗体 (Herceptin) の作用機序は、ADCC が主体であり、食道癌における抗 HER-2 抗体療法の導入においては、ADCC に対する耐性機序の解明は、極めて重要な問題であり、なおかつ耐性機序に対する対策が、食道癌における抗 HER-2 抗体療法の成功につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

以上のような過去の我々の基礎的検討、理論的背景のもと、本研究は、HER-2 を過剰発現した食道扁平上皮癌株から、ADCC に対する種々の反応性を有するクローンを樹立し、抗 HER-2 抗体 (Herceptin) による抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) に対する耐性の機序、すなわち、癌の免疫逃避のメカニズムを解明することを目的とする。

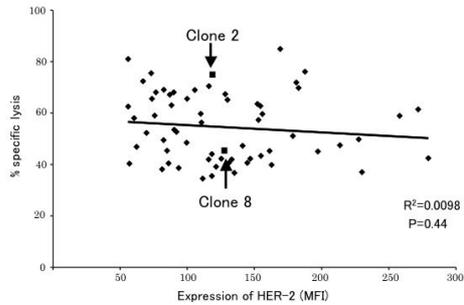
## 3. 研究の方法

HER-2 を過剰発現した食道扁平上皮癌株 TE4 から、限界希釈法にて ADCC に対する種々の反応性を有するクローンを樹立し、その clone の中で、HER-2 の発現が同程度で、ADCC 活性が異なる clone を選択し、ADCC に関与する因子を検討した。さらに、ADCC の反応の違いが perforin や granzyme の感受性によるものかどうかを clone に直接 perforin や granzyme を反応させ、検討を行った。

## 4. 研究成果

食道扁平上皮癌細胞株 TE4 より限界希釈法

にて ADCC に対する種々の反応性を有する clone を樹立し、それぞれの clone の HER-2 発現と ADCC を測定した。その clone の中で、HER-2 の発現が同程度で、ADCC 活性が異なる clone を選択し、ADCC に関与する因子を検討した。その結果、63 個の clone が樹立でき、その中で、HER-2 の発現が同程度の clone 2 と 8 を選択し、検討を行った (図 1)。

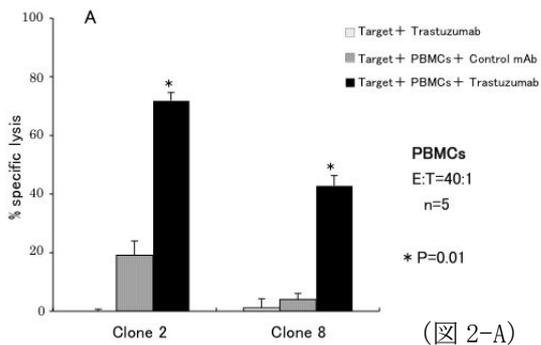


(図 1)

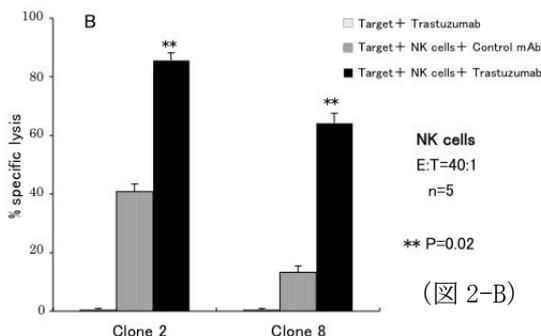
これらの clone の細胞増殖速度や、Herceptin に対する細胞増殖抑制効果、アポトーシス誘導能に差は認められなかった。

また、細胞形態も同じであり、DNA typing の結果はどちらも HLA-A\*0207/110101, HLA-B\*4601/5401, HLA-C\*010201/010201 であった。TGF- $\beta$  の産生量は同程度であり、IL-10 の産生は認められなかった。

clone 2 と 8 において、それぞれ 72%、43% と ADCC の有意な差を認め (図 2-A)、NK 細胞を分離したうえでの ADCC もそれぞれ 86%、64% と有意な差を認めた (図 2-B)。なお、単球を分離したうえでの ADCC には差を認めず、clone 2 と 8 の ADCC の違い、すなわち Herceptin 耐性の機序としては NK 細胞が重要な役割を果たすことが推察された。

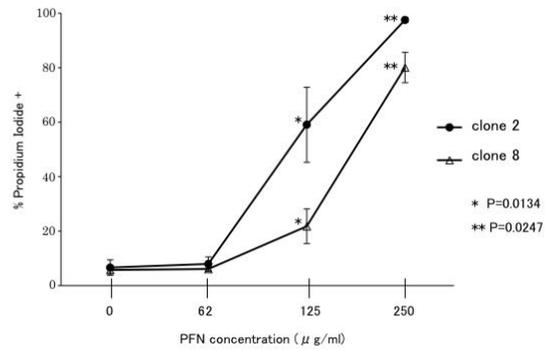


(図 2-A)

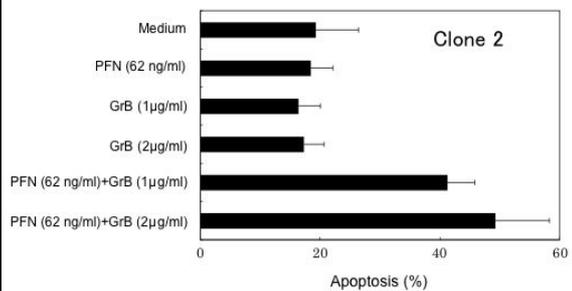


(図 2-B)

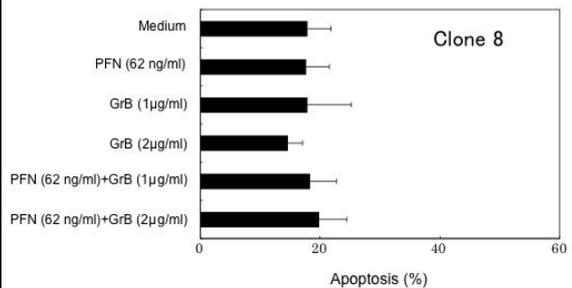
NK 細胞は細胞傷害を起こす際、perforin や granzyme を分泌することが知られている。そこで、ADCC の反応の違いがこれらの感受性によるものかどうかを clone に直接 perforin や granzyme を反応させ、検討を行った。その結果、clone における感受性の違いを認めた (図 3、図 4-A, B)。つまり、癌の ADCC からの逃避のメカニズムのひとつに perforin や granzyme の感受性の低下が関与すると考えられた。



(図 3)



(図 4-A)



(図 4-B)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Kawaguchi Y, Kono K, Mizukami Y, Mimura K, and Fujii H: Mechanisms of escape from Trastuzumab-mediated ADCC in esophageal squamous cell carcinoma: Relation to susceptibility to perforin-granzyme. *Anticancer Res.* 2009, 29: 2137-46 (査読有り)
- ② Kono K, Mizukami Y, Daigo Y, Takano A, Masuda K, Yoshida K, Tsunoda T, Kawaguchi Y, Nakamura Y, Fujii H. Vaccination with multiple peptides derived from novel cancer-testis antigens can induce specific T-cell responses and clinical responses in advanced esophageal cancer. *Cancer Sci* 2009 Aug; 100(8): 1502-9(査読有り)
- ③ Mizukami Y, Kono K, Maruyama T, Watanabe M, Kawaguchi Y, Kamimura K, Fujii H. Downregulation of HLA Class I molecules in the tumor is associated with a poor prognosis in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2008 Nov 4; 99(9): 1462-7(査読有り)
- ④ Kono K, Kawaguchi Y, Mizukami Y, Mimura K, Sugai H, Akaike H, Fujii H. Protein-bound polysaccharide K partially prevents apoptosis of circulating T cells induced by anti-cancer drug S-1 in patients with gastric cancer. *Oncology* 2008; 74(3-4): 143-9(査読有り)
- ⑤ Mizukami Y, Kono K, Daigo Y, Takano A, Tsunoda T, Kawaguchi Y, Nakamura Y, Fujii H. Detection of novel cancer-testis antigen-specific T-cell responses in TIL, regional lymph nodes, and PBL in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2008 Jul; 99(7): 1448-54(査読有り)
- ⑥ Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, Fujii H. Localisation pattern of Foxp3+ regulatory T cell is associated with clinical behaviour in gastric cancer. *Br J Cancer* 2008 Jun 15; 98(1): 148-53(査読有り)
- ⑦ Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, Fujii H. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T

cell in gastric cancer. *Int J Cancer* 2008 May 15; 122(10): 2286-93(査読有り)

[学会発表] (計1件)

- ① 河口賀彦、河野浩二、水上佳樹、三村耕作、渡邊光章、丸山孝教、藤井秀樹: 食道癌の Trastuzumab 耐性のメカニズムに関する検討, 第29回癌免疫外科研究会, 2008.6.19, 東京

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

河口 賀彦 (KAWAGUCHI YOSHIHIKO)  
山梨大学・医学部附属病院・診療助教  
研究者番号: 80402048

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし