

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590994

研究課題名（和文）セツキシマブの肺癌治療における新しいバイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Development of novel biomarker for cetuximab therapy in lung cancer

研究代表者

千酌 浩樹 (CHIKUMI HIROKI)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：90283994

研究成果の概要（和文）：

新しい分子標的治療薬抗 EGFR 抗体セツキシマブの肺癌における有効性が期待されている。本研究ではセツキシマブの効果が期待できる肺癌患者を選択するためのバイオマーカーの開発を行った。我々は肺癌においてもっとも重要な NK 細胞活性化因子が ULBP2 であること、この遊離型である可溶性 ULBP2 が NK 細胞機能とセツキシマブ ADCC 活性を減弱させることを見いだした。本研究により可溶性 ULBP2 が定値の肺癌患者や、肺癌手術後、化学療法後の末梢血可溶性 ULBP2 低下時にセツキシマブ投与を行うのが最適であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

An anti-EGFR monoclonal antibody, cetuximab, has been developed as a novel molecular targeting therapy in lung cancer. In this study, we developed a novel biomarker for cetuximab to select the subset of patients who will show a meaningful clinical response, by using our original finding that the main anti-cancer mechanism of cetuximab is immunological antitumor activity such as antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). As a result, we revealed that ULBP2 is the most significant NKG2D ligands, which are known as the activating ligands of NK cells, and that soluble form of ULBP2 (sULBP2) directly suppresses both the cytolytic activity and cetuximab induced ADCC activity of host NK cells. Therefore, administration of cetuximab to the patients with low levels of sULBP, or the patients after surgery or chemotherapy with lowest sULBP2 levels is the best strategy for cetuximab treatment for lung cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌、薬剤反応性

1. 研究開始当初の背景

現在、肺癌はがん死因の 1 位を占める重要

疾患であり、非小細胞肺癌はその約 80% を占める。これまでの研究で非小細胞肺癌の増

殖が上皮細胞成長因子 (EGFR) 経路によりよることが明らかにされた。

セツキシマブは非小細胞肺癌に過剰発現している EGFR に対するモノクローナル抗体である。2009年6月、ASCOにおいて非小細胞肺癌に対する抗癌剤との併用による大規模第 III 相(FLEX)試験で全生存期間延長の上乗せ効果があったことが発表され、注目を集めた。これは EGFR に対する分子標的療法薬が非小細胞肺癌治療で survival benefit を示した初めての例であり、肺癌領域における本剤への期待はきわめて高い。ただ、本剤が時に示す重篤な皮膚障害や、その治療コスト (初期1ヶ月で16000ドル) を考えると、本剤が奏功する患者を選択するためのバイオマーカーの開発が急務となっている。

セツキシマブの作用機序に関する従来の知見では、セツキシマブは高い親和性で EGFR に結合し、①EGFR 活性化刺激を遮断②receptor internalization 促進による EGFR の down-regulation をまねく③抗体依存性細胞障害(ADCC)機序により抗腫瘍活性を示すと考えられているが、我々は本剤による肺癌治療においては③の ADCC 機序が最も重要であり、この ADCC 活性を予測できるマーカーが新たなセツキシマブのバイオマーカーとなりうると考えるに至った。(Clin Cancer Res. 13, 1552-61. 2007)

ADCC 活性を担うのはナチュラル・キラー(NK)細胞であるが、NK 細胞はその表面上のレセプターNKG2D により活性化される。そこで今回、肺癌細胞上、あるいは血中の遊離 NKG2D リガンドの測定を行うことで、セツキシマブの治療効果を予測できるかどうかを検討する本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は、セツキシマブの肺癌における新しい効果予測因子(バイオマーカー)を開発するために以下の各項目を検討することを目的とする。

(1) 肺癌におけるもっとも重要な NKG2D リガンドを決定する。

(2) 肺癌細胞表面上の NKG2D リガンド量と末梢血中可溶性リガンド量の関係を、マウス移植モデルならびにヒト癌患者において明らかにする。

(3) 腫瘍表面 NKG2D リガンドと可溶化した遊離 NKG2D リガンドのそれぞれが NK 細胞機能、セツキシマブ ADCC 活性に与える影響を明らかにする。

(4) 上記で明らかにした関係から、末梢血中可溶性リガンド量をサロゲートマーカーとしてセツキシマブ ADCC 活性が最大となる投与タイミング、患者選択を予測する。

3. 研究の方法

まず腫瘍表面上の NKG2D リガンドと末梢血中の可溶性リガンドの相関と、それぞれが ADCC 活性に与える影響を *in vitro* で明らかにする。次にこれをマウス肺癌移植モデル、ならびに肺癌患者で検討し、ADCC 活性のサロゲートマーカーとしての利用を試みる。

(1) NKG2D リガンド発現ベクターを構築と、強発現細胞の樹立。

(a)MICA, MICB, ULBP1, 2, 3 などの NKG2D リガンド遺伝子を発現ベクター-pcDNA3.1 にクローニングする。

(b)肺癌細胞株数株に上記ベクターをリポフェクション法により導入し、G418 にて導入細胞を選択し、安定発現細胞株を樹立する。

(2) 可溶性 NKG2D リガンド測定のための ELISA 系の構築。

MICA, MICB については市販のものが利用可能で、ULBP-1, 3 について以下の手順で行う。

(a)抗体は現在数種類のもので入手可能である。これらをテストし、捕捉抗体、検出抗体として最適な 2 種類を選別し、sandwich ELISA を構築する。

(b)ELISA 検出系は通常の発色系の他に、化学発光系を検討し高感度を追求する。

(3) 腫瘍細胞表面上リガンド量と可溶性リガンド量の相関の検討を以下の2段階で行う。

(a)強発現細胞の表面リガンド量(フローサイトメトリーで測定)と培養液中リガンド量(ELISA で測定)の相関を検討する。

(b)ヌードマウスに NKG2D リガンド強制発現細胞を移植し、腫瘍表面リガンド量(免疫組織染色で測定)と末梢血中リガンド量(ELISA で測定)の相関を検討する。

(4) NKG2D リガンド量と、NK 細胞活性、ならびにセツキシマブ ADCC 活性の相関の検討。

(a)強発現細胞に対する、NK 細胞活性とセツキシマブ ADCC 活性を健常者、癌患者で測定し腫瘍細胞上の NKG2D リガンド発現量とそれに対する NK 細胞活性、ADCC 活性の相関を検討する。

(b)各種濃度の可溶性 NKG2D リガンド(Fc 融合蛋白として購入、または強制発現細胞上清より濃縮)がセツキシマブ ADCC 活性に与える影響を検討し、可溶性リガンドと NK 細胞活性、セツキシマブ ADCC 活性の相関を検討する。

(5) 手術切除を受ける肺癌患者において、切除腫瘍上のリガンド量(免疫組織染色で測定)と、術前、術後の末梢血リガンド量(ELISA)にて測定する。

この結果、臨床経過のどの時点でNK細胞活性、セツキシマブ ADCC 活性が最大となるかを予測する。特に臨床上でサロゲートマーカーとして利用される、末梢血中リガンド量とNK細胞活性の相関に注目して解析する。

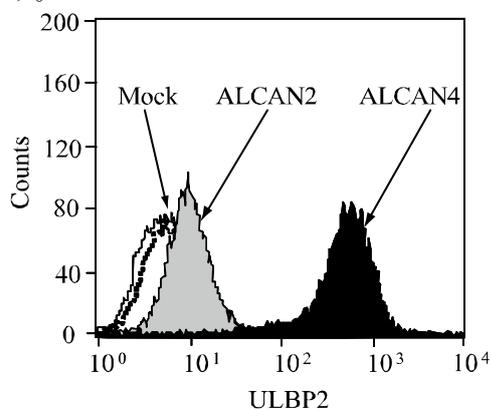
(6) 化学療法を受ける肺癌患者において、末梢血中リガンド量を経時的に測定する。

化学療法前と1クール終了後の測定を各種化学療法レジメンごとに行う。この結果から、末梢血中可溶性リガンド量を測定することで、セツキシマブ ADCC が最大となる投与時期が、患者ごとに決定できることが期待される。

4. 研究成果

(1) NKG2D リガンド発現ベクターを構築と、強発現細胞の樹立。

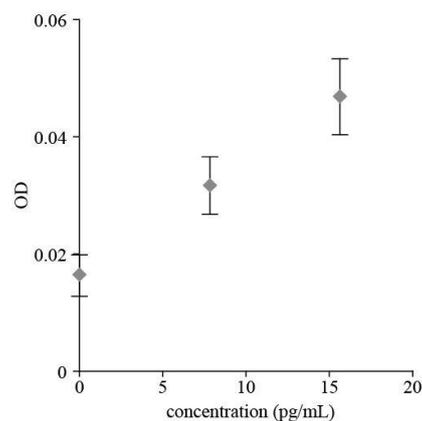
本研究で最も使用頻度の高かった ULBP2 発現ベクターとその強制発現細胞の例を下に示す。ULBP2 発現ベクターは押村光雄教授(鳥取大学)より、哺乳類細胞発現ベクター p-CEFLは Silvio Gutind博士(NIH)より供与された。遺伝子組み換えにより ULBP2 発現ベクター p-CEFL-ULBP2 を作成し、これを A549 細胞に遺伝子導入を行った。その後 G418(和光純薬)にて薬剤耐性クローンの選択を行い ULBP2 安定強制発現細胞株を樹立した。得られた強制発現細胞の例を下図に示す。



(2) 可溶性 NKG2D リガンド測定のための ELISA 系の構築。

可溶性 NKG2D リガンドを測定するための ELISA 系を以下の手順で構築し、その感度を決定した。例えば soluble ULBP2 の測定のための ELISA では、2種類の抗 ULBP2 モノクローナル抗体を用いた。96 穴プレートに抗 ULBP2 抗体(BUM01) 2 μg/mL を入れ 4°C で 24 時間静置後、ブロッキング液(Applied Biosystems, 東京)にて 4°C、18 時間ブロッキングを行ったものを ELISA プレートとした。本プレートに検体あるいは標準直線作成用の ULBP2/Fc を加え室温 1 時間静置した。検体が ULBP2/Fc の場合は 25%のウマ血清加

ブロッキング液、検体がヒト血清、細胞培養上清の場合にはブロッキング液で 1 : 3 に希釈して測定に供した。検体添加後、検出抗体である抗 ULBP2(clone 165903)を 0.5 μg/mL の濃度で加え室温 1 時間静置の後、抗マウス IgG2a-HRP をブロッキング液で 1:10,000 希釈したもので 37°C、1 時間インキュベートした。検出は Peroxidase Emission Kit with orthophenyldiamine(SUMILON, 東京)を用い吸光度 490nm で検出した。その結果構築できた ELISA の感度は 7.8 pg/mL、intra-assay CV は 2.7-5.0%、inter-assay CV は 4.0-4.6%であった。

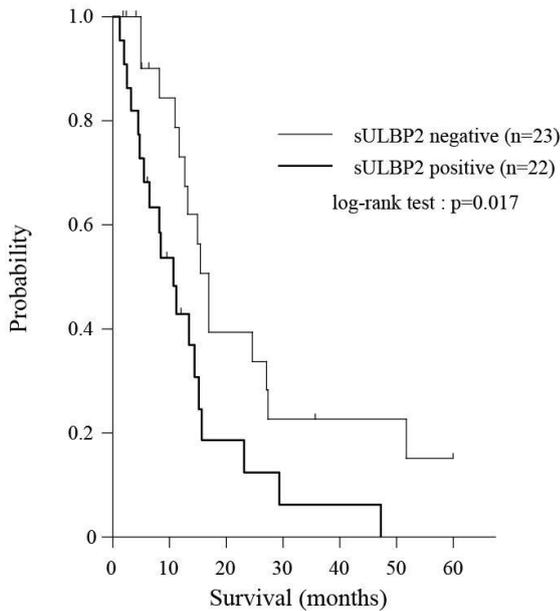


		sULBP2 (pg/mL)		
	n	mean	SD	CV (%)
Intra-assay	8	19.2	0.96	5.0
	8	20.3	0.55	2.7
	8	13.7	0.58	4.2
Inter-assay	4	19.1	0.77	4.0
	4	14.7	0.68	4.6

(3) 腫瘍細胞表面上リガンド量と可溶性リガンド量の相関。

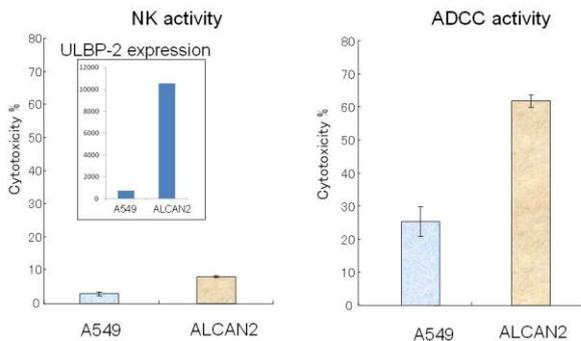
各種肺癌細胞株 20 株において、各 NKG2D リガンドの発現状況を検討した。その結果肺癌細胞株において最も広範に発現していた NKG2D リガンドは ULBP2 であった。また、これら発現細胞のうち、非小細胞肺癌株においては培養時間の経過とともにその培養上清中に可溶性 ULBP2 が増加してくることが明らかになった。すなわち、非小細胞肺癌株においては細胞表面 ULBP2 はその発現量に応じて可溶性 ULBP2 として細胞表面から遊離されることが明らかになった。そしてこの関係は ULBP2 強制発現細胞を移植したヌードマウスモデルによっても確かめられた。さらにこれらのことが、実際の患者組織(第 49 回日本呼吸器学会学術講演会 International Symposium で発表)や患者末梢血(Cancer Science, 2012、下図)で認め

られることを報告した。さらに末梢血可溶性 ULBP2 の上昇が肺癌患者の予後の悪化と関係している可能性が明らかになった。



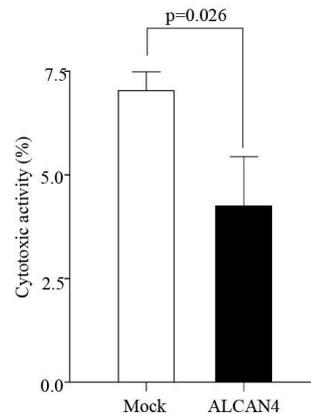
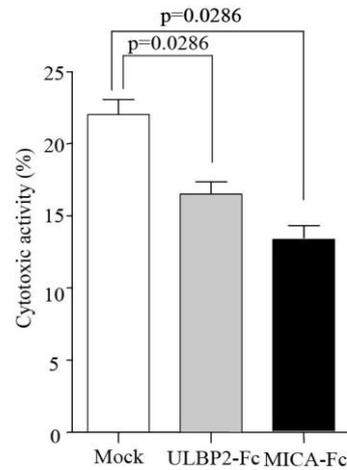
(4) NKG2D リガンド量と、NK 細胞活性、ならびにセツキシマブ ADCC 活性の相関の検討。

次に、細胞表面に発現する ULBP2 と、そこから遊離された可溶性 ULBP2 のそれぞれがヒト NK 細胞機能、ならびにセツキシマブ ADCC 活性に与える影響について検討を行った。まず、細胞表面の ULBP2 が PBMC に与える影響を検討した。本検討では ULBP2 を強制発現した細胞と、健常人から分離した NK 細胞を混合培養し、細胞表面 ULBP2 による刺激を 22 時間与えたのち(共培養刺激)、NK 細胞を回収し、その A549 細胞に対する細胞障害活性を ⁵¹Cr release assay で評価した。その結果 A549 で共培養刺激を与えた NK 細胞より、ULBP2 強制発現細胞株で共培養刺激を与えた NK 細胞の方が肺癌細胞に対する細胞障害活性は明らかに増強されていた。さらにセツキシマブ ADCC を検討したところ、同条件で ULBP2 強制発現細胞との共培養された NK 細胞では明らかな ADCC 活性の増強が見られた。



次に培養上清中 sULBP2 が PBMC の細胞障害活性に与える影響を検討した。各種濃度の sULBP2 と健常人 PBMC を 22 時間インキュベートし刺激を与えた後、PBMC を回収し、その A549 細胞に対する細胞障害活性を ⁵¹Cr release assay で評価した。まず可溶性の NKG2D リガンドとして、遺伝子組み換えによって得られた融合蛋白 MICA/Fc と ULBP2/Fc を用いた検討を行った。その結果可溶性 NKG2D リガンドである MICA/Fc も ULBP2/Fc も共に PBMC の細胞障害活性を低下させることが明らかになった。

次に、ULBP2 強制発現細胞株の培養上清を用いて同様の検討を行った。ALCAN4 細胞の培養上清はその親細胞のそれに比べて 4550 倍濃度の sULBP2 を含んでいる。その結果高濃度の sULBP2 を含む A549 ALCAN4 の培養上清では明らかな細胞障害活性の低下を認めた。これらのことから細胞表面上の ULBP2 はヒト NK 活性やセツキシマブ ADCC 活性を増強するが、可溶性 ULBP2 は逆にこれら活性を減弱することが明らかになった。

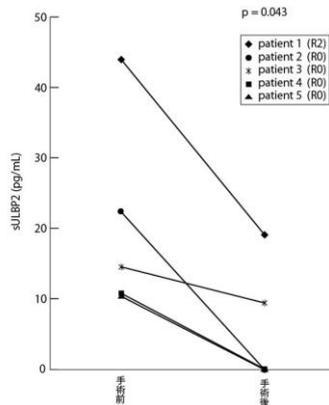


	Mock	ALCAN 4
sULBP2 (ng/mL)	1.22 ± 0.03	1165.73 ± 24.26

(5) 手術切除を受ける肺癌患者において、切除腫瘍上のリガンド量(免疫組織染色で測定)と、術前、術後の末梢血リガンド量(ELISA)にて測定する。

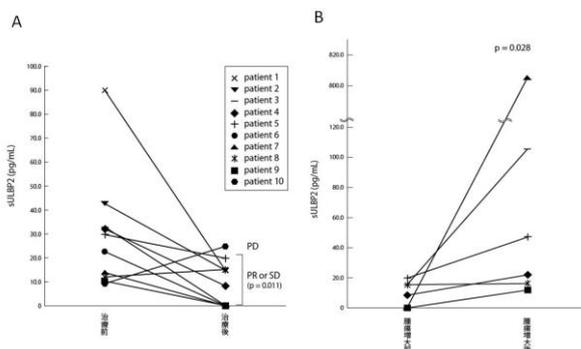
上記研究結果から、最大のセツキシマブ ADCC 効果を得るためには、可溶性 ULBP2 が最も定値の時点でのセツキシマブ投与が望ましい殊が明らかになった。そこで肺癌患者の治療過程でどのタイミングで可溶性 ULBP2 が低下するかを肺癌手術、化学療法を施行した患者で検討した。

まず肺癌に対して外科的治療を施行された患者で術前術後の血清中 sULBP2 濃度を ELISA 法で測定し比較した。術前に血清中 sULBP2 濃度が基準値以上であったものを選択し図示する。いずれの患者においても術後血清中 sULBP2 濃度は低下し有意差を認めた ($p = 0.043$)。術前血清中 sULBP2 濃度が基準値以下であった患者で術後1週間後の血清中 sULBP2 濃度が基準値以上となる患者は1例も認めなかった。



(6) 化学療法を受ける肺癌患者において、末梢血中リガンド量を経時的に測定する。

次に肺癌化学療法を施行した患者で治療前後の血清中 sULBP2 濃度を ELISA 法で測定し比較した。RECIST 基準で PR 判定または SD 判定となり病勢コントロールが可能であった患者では1例 (patient 8) を除き治療導入後に血清中 sULBP2 濃度は低下した ($p = 0.011$)。これら患者のうち、その後腫瘍が増大し PD 判定となった患者で腫瘍増大前後の血清中 sULBP2 濃度を比較した。いずれの患者でも腫瘍増大後に血清中 sULBP2 濃度は有意に上昇した ($p = 0.028$)。



(7) 結論

NK 細胞機能を調節する分子である NKG2D リガンドのうち、肺癌においては ULBP2 が最も重要な分子であった。さらに肺癌患者の NK 細胞機能と、NK 細胞によるセツキシマブ ADCC 活性は、肺癌細胞表面上の ULBP2 により増強され、細胞表面から切り出され可溶性 ULBP2 により減弱されることが明らかになった。臨床検体による検討で組織の ULBP2 発現が多いほど、末梢血可溶性 ULBP2 が高いほど患者予後が悪いことから、実際の臨床では前者によるホスト NK 細胞機能の増強を、後者による抑制が上回ると考えられた。したがって患者末梢血中の可溶性 ULBP2 は患者 NK 細胞によるセツキシマブ ADCC 活性を予測するよい使用になると考えられた。肺癌治療の過程で、肺癌術後、化学療法後腫瘍の増大前に末梢血中可溶性 ULBP2 が最低となることが明らかになったことから、この時期がセツキシマブ投与の最適時期であると考えられた。

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 9 件)

1. Yamaguchi K, Chikumi H, Shimizu A, Takata M, Kinoshita N, Hashimoto K, Nakamoto M, Matsunaga S, Kurai J, Miyake N, Matsumoto S, Watanabe M, Yamasaki A, Igishi T, Burioka N, Shimizu E:

Diagnostic and Prognostic Impact of Serum Soluble UL16-Binding Protein 2 in Lung Cancer Patients.

Cancer Science, 2012 (in press). 査読有 DOI:10.1111/j.1349-7006.2012.02330.x

2. Takata M, Chikumi H, Miyake N, Adachi K, Kanamori Y, Yamasaki A, Igishi T, Burioka N, Nanba E, Shimizu E:

Lack of AKT activation in lung cancer cells with EGFR mutation is a novel marker of cetuximab sensitivity.

Cancer Biol Ther, 13: 369-378, 2012. 査読有 <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.19238>

3. Miyake N, Chikumi H, Takata M, Nakamoto M, Igishi T, Shimizu E:

Rapamycin induces p53-independent apoptosis through the mitochondrial pathway in non-small cell lung cancer cells

Oncology reports (in press) 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22313637>

〔学会発表〕（計 3 件）

1. Yamaguchi K, **Chikumi H**, Kinoshita N, Shimizu A, Hashimoto K, Kurai J, Yamasaki A, Nakamoto M, Matsumoto S, Takata M, Igishi T, Burioka N, **Shimizu E**: Soluble UL16 binding protein 2 is elevated in the sera of lung cancer patients. American Association for Cancer Research 101st Annual Meeting 2010. Washington DC, USA, 2010 年 4 月 20 日.

2. **Chikumi H**, Kurai J, Kinoshita N, Nakamoto M, Matsumoto S, Igishi T, Hamada H, Yano S, **Shimizu E**: Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against mesothelioma cells. The 10th international conference of the international mesothelioma interest group (Workshop: Immunotherapy: bench to bedside-II). Kyoto, Japan, September, 2010 年 9 月 2 日

3. **Chikumi, H., Shimizu, E**: Biomarkers of immunological therapy of lung cancer. 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会【International Symposium 3: Genetic and molecular pathogenesis of tumor and host interactions: towards cancer biomarker and target discovery】. 東京, 2009 年 6 月 13 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千酌 浩樹 (CHIKUMI HIROKI)
鳥取大学・医学部・講師
研究者番号：90283994

(2) 研究分担者

清水 英治 (SHIMIZU EIJI)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：50187449