

## 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5月15日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592185

研究課題名（和文）高分子黒色腫抗原を標的とした頭頸部扁平上皮癌に対する抗体療法の研究

研究課題名（英文） Investigations on High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen as a target of the immunotherapy.

## 研究代表者

片山 昭公（KATAYAMA AKIHIRO）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：40374805

研究成果の概要（和文）：頭頸部扁平上皮癌におけるHigh Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen（CSPG4）発現検討の結果、検討した20種類の頭頸部扁平上皮癌細胞株のうち70%にCSPG4の過剰発現を確認したのみならず、患者検体においてもその発現を認めた。さらにHigh Molecular Weight-Melanoma Associated Antigenに対する単鎖抗体を遺伝子工学的な手技を用い合成することに成功した。In vivoにおいてHigh Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen発現している黒色腫、悪性中皮腫、肉腫、骨髄性白血病、頭頸部扁平上皮癌細胞株のSCIDマウスXenograftモデルを用いて、CSPG4特異的二量体プローブの腫瘍増殖抑制効果、転移抑制効果を認めた。

研究成果の概要（英文）： We have investigated the expression of High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen in human head and neck squamous cell carcinoma cells, and found CSPG4 expression not only on the cell surface of HNSCC cells but also clinical samples. Moreover, we have established the scFv specific for High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen utilizing genetic engineering techniques. In Vivo study utilizing SCID mice xenograft model inoculated with various human malignant cell lines, our scFv specific for High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen clearly inhibited proliferation and metastasis of the tumor cells.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部外科学

## 1. 研究開始当初の背景

近年の各種癌抗原の同定を機にした癌免疫研究の進歩は、癌診断のみならず癌特異的ワクチン療法、細胞障害性T細胞（CTL）を用

いた養子免疫療法さらには癌抗体療法などに研究応用され、癌治療の新しい方法として目覚ましい発展を遂げてきている。一方、頭頸部領域には、扁平上皮癌を中心とした多様

な悪性腫瘍が発生するが、現在のところ頭頸部悪性腫瘍の治療法は外科的治療、化学療法、放射線療法の単独あるいは併用が一般的である。しかしながら、上記治療法を用いても治療成績が向上しない難治症例や癌の再発、転移例に対しては現在のところ有効な治療法が確立されていないと言っても過言ではない。そのため、頭頸部領域の悪性腫瘍に高発現している分子（癌抗原）を解析し、さらにそれらを抗体療法の開発は有効な治療法のひとつになると思われる。また、既に欧米をはじめ本邦においても癌抗体療法は悪性リンパ腫、肺癌などの疾患において広く臨床応用されており、一定の効果が認められ標準療法の一選択肢としてなっている。

High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen は悪性黒色腫の約 90%において細胞表面上に発現を認めるメラノーマ関連抗原であり、280 kDa の糖蛋白と 440 kDa のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンから構成される分子である。その機能として細胞の拡散や細胞接着、細胞浸潤などに関与していると報告されている。正常組織において High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen の発現はほとんど認められないことから、HMW-MAA をターゲットとした悪性黒色腫に対する免疫療法開発を目的とした研究が行われてきている。High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen は悪性黒色腫もちろん、白血病、基底膜細胞癌、神経芽細胞腫、乳癌および前立腺癌での過剰発現が確認されており、進行期や予後などとの関連も報告されている。しかし頭頸部扁平上皮癌における発現は明らかではなく、それらに関する報告はこれまでに皆無である。本研究の代表研究者は、悪性黒色腫における腫瘍免疫の分野で世界的権威である Dr. Ferrone の研究室にて High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen 研究に従事した経験を有している。頭頸部扁平上皮癌における HMW-MAA 発現と機能を詳細に検討することは、新たな治療法を開発する上で非常に有益であると考え、最終的な目標である High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen を標的とし抗体療法の確立は頭頸部悪性腫瘍の新たな治療法の確立に十分寄与することが期待される。High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen は悪性黒色腫の約 90%において細胞表面上に発現を認めるメラノーマ関連抗原であり、280 kDa の糖蛋白と 440 kDa のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンから構

成される分子である。その機能として細胞の拡散や細胞接着、細胞浸潤などに関与していると報告されている。正常組織において High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen の発現はほとんど認められないことから、CSPG4 をターゲットとした悪性黒色腫に対する免疫療法開発を目的とした研究が行われてきている。High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen は悪性黒色腫もちろん、白血病、基底膜細胞癌、神経芽細胞腫、乳癌および前立腺癌での過剰発現が確認されており、進行期や予後などとの関連も報告されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は頭頸部扁平上皮癌における High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen とその他関連抗原の発現とその機能を明らかにし、最終的には High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen とその関連抗原蛋白を標的分子とした頭頸部扁平上皮癌に対する免疫療法、特に抗体療法への応用への基礎的エビデンスを確率することである。剰発現が確認されており、進行期や予後などとの関連も報告されている。

## 3. 研究の方法

1) 頭頸部扁平上皮癌細胞株における High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen とその他関連抗原の発現を検討する。上顎癌、歯肉癌、口腔癌細胞株はすでに当教室で保有しており、まずそれらを用いて検討を行う。その他の頭頸部扁平上皮癌細胞株は海外研究協力者より供与されるものを使用するのに加え、各種細胞バンクより購入する。発現の検討法としては RT-PCR 法やウエスタンブロット法またはフローサイトメトリーを用いる。また、micro RNA の包括的発現解析や real time PCR 法による解析も行い、micro RNA と高分子黒色腫抗原またはその他関連抗原との関連も検討する。

2) 頭頸部扁平上皮癌患者組織における High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen とその他関連抗原の発現を検討する。具体的には頭頸部扁平上皮癌の手術材料よりホルマリン固定・パラフィン包埋切片を作製し、高分子黒色腫抗原とその他関連抗原に特異的な抗体を用いて免疫染色により発現を検討する。本研究に使用する CSPG4 特異的抗体群の一部は、海外研究協力者よりすでに確立され、提供されている。まず、これらの抗体群を用いたホルマリン固定・パラフィン包埋切片を免疫染色し、最終的には免疫染色の程度をスコア化し、種々の臨床像、予後と

の相関を検討する。

3) High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen 特異的短鎖抗体によるマウス High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen 発現悪性腫瘍細胞 Xenograft モデルにおける抗腫瘍効果の検討。これまでに研究開発した High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen 特異的短鎖抗体: scFv-C21 に遺伝子工学の手技を用い、Human イムノグロブリン普遍領域: Fc 付加することにより、より affinity の高い High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen 特異的短鎖抗体二量体プローブ scFv-FcC21 合成する。さらに、scFv-FcC21 を大量生産、精製する。最後に High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen 発現している黒色腫、悪性中皮腫、肉腫、骨髄性白血病、頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いた、SCID マウス Xenograft モデルにおける、High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen 特異的短鎖抗体二量体プローブ scFv-FcC21 の腫瘍増殖抑制効果、転移抑制効果を測定する。

#### 4. 研究成果

1) 頭頸部扁平上皮癌における HMW-MAA 発現検討の結果、検討した 20 種類の頭頸部扁平上皮癌細胞株のうち 70% に HMW-MAA の過剰発現を確認したのみならず、患者検体においてもその 30% 発現を確認した。

2) エストロゲン、プロゲステロン、Her2 の発現がしていない triple negative breast cancer (TNBC) は予後が悪いことで知られている。breast cancer stem cell に特徴的な CD44+, CD24-/lo phenotype に富み、また高率に High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen を発現していることを発見した。マウスモデルを用い CSPG4 特異的抗体を用いることにより TNBC を抑制されることを論文にまとめ、Journal of National Cancer Institute 誌に投稿し掲載された。このジャーナルに採択された事は本基礎研究成果の重要性と将来的な臨床への応用、とりわけ高分子黒色腫抗原を用いた抗体療法への発展が期待される。

3) また、各種癌幹細胞様細胞において CSPG4 と共発現をしていると言われている副刺激分子 B7-H3 の発現解析を頭頸部扁平上皮癌細胞と下咽頭扁平上皮患者由来組織を用いて行った。結果、は検討した頭頸部扁平上皮癌細胞全てにおいて B7-H3 細胞表面蛋白発現が認められた。また患者由来組織においても遠隔転移を生じた症例は統計学的有意に B7-H3 高発現していた。B7-H3 発現強陽性の

患者群は、その他の患者群に比べ有意に遠隔制御率と疾患特異的生存率は有意に低値であり、多変量解析においては B7-H3 強陽性は N 因子と共に疾患特異的生存率に対する独立した予後不良因子であった以上のことを論文にまとめ、International Journal of Oncology 誌に投稿し掲載された。

4) High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen 特異的二量体プローブ scFv-FcC21 合成することに成功した。In vivo の実験に用いるべく、scFv-FcC21 を大量生産、精製した。High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen 発現している黒色腫、悪性中皮腫、肉腫、骨髄性白血病、頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いた、SCID マウス Xenograft モデルを用いて、scFv-FcC21 の腫瘍増殖抑制効果、転移抑制効果を示し、Cancer Research 誌に結果をまとめ報告している。

#### 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 3 件)

1: Wang X, Osada T, Wang Y, Yu L, Sakakura K, Katayama A, McCarthy JB, Brufsky A, Chivukula M, Khoury T, Hsu DS, Barry WT, Lyerly HK, Clay TM, Ferrone S. CSPG4 protein as a new target for the antibody-based immunotherapy of triple-negative breast cancer. J Natl Cancer Inst. 2010 Oct 6;102(19):1496-512. doi: 10.1093/jnci/djq343

2: Katayama A, Takahara M, Kishibe K, Nagato T, Kunibe I, Katada A, Hayashi T, Harabuchi Y. Expression of B7-H3 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma as a predictive indicator for tumor metastasis and prognosis. Int J Oncol. 2011 May;38(5):1219-26. doi: 10.3892/ijo.2011.949.

3: Wang X, Katayama A, Wang Y, Yu L, Favoino E, Sakakura K, Favole A, Tsuchikawa T, Silver S, Watkins SC, Kageshita T, Ferrone S. Functional characterization of an scFv-Fc antibody that immunotherapeutically targets the common cancer cell surface proteoglycan CSPG4. Cancer Res. 2011 Dec 15;71(24):7410-22. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1134

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/oto/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片山昭公 (KATAYAMA AKIHIRO)  
旭川医大耳鼻科・医学部・助教  
研究者番号：40374805

### (2) 研究分担者

吉野和美 (YOSHINO KAZUMI)  
旭川医大耳鼻科・医学部・医員  
研究者番号：60516722

東谷敏孝 (TOTANI TOSHITAKA)  
旭川医大耳鼻科・医学部・医員  
研究者番号：40516720

### (3) 連携研究者

なし