

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 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659324

研究課題名（和文） 膵癌幹細胞を標的とした新たな BiTE 抗体の開発

研究課題名（英文） Development of BiTE antibody against pancreatic cancer stem cell

研究代表者 中島 祥介 (NAKAJIMA YOSHIYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00142381

研究成果の概要（和文）：

Bispecific T Cell Engagers (BiTE) 抗体は、通常の癌治療抗体とは異なり、2つの抗原結合部位を有するユニークな抗体である。一方は、T細胞の CD3 抗原と結合し、他方は癌抗原を認識することで、直接的かつ効率的に T細胞が癌細胞に殺細胞効果を発揮することが期待されている。一方、癌幹細胞は近年提唱された概念であり、その研究はより根本的な癌治療開発に発展する可能性があり、注目されている。今回の研究では、膵癌幹細胞に作用し得る BiTE 抗体を新たに創出し、従来とは根本的に異なる新規膵癌治療法の開発を目的とした。新規抗体の作成が実現すれば、膵癌幹細胞に直接 T細胞を作用させ、特異的殺細胞効果を発揮し得ることが可能と想定される。しかしながら、膵癌幹細胞に対する治療標的候補マーカーとして PSCA, HVEM, CD133, CD24, CD44, CD90, CD166, ESA, SHH, BMI-1 を選択し、当科にて切除を行い、患者の同意が得られた通常型膵癌および膵管内腫瘍 (IPMN) の標本を用いて、免疫染色にて、それらの分子の発現の検討をすすめた。しかし、いずれの分子も発現が乏しく、また恒常的な結果が得られていないため、さらに免疫染色の条件を設定し直し、至適条件を模索している段階である。

研究成果の概要(英文)：

Bi-specific T-cell engagers (BiTEs) are artificial bispecific monoclonal antibodies that are investigated for the use as anti-cancer reagents. They direct a host's immune system, more specifically the T cells' cytotoxic activity, against cancer cells. BiTEs form a link between T cells and tumor cells. This causes T cells to exert cytotoxic activity on tumor cells by producing proteins like perforin and granzymes, independently of the presence of MHC I or co-stimulatory molecules. These proteins enter tumor cells and initiate the cell's apoptosis. This action mimics physiological processes observed during T cell attacks against tumor cells. In this study, we tried to generate BiTEs that could recognize pancreatic cancer stem cells. To this end, we extensively investigate several markers for pancreatic cancer stem cells including PSCA, HVEM, CD133, CD24, CD44, CD90, CD166, ESA, SHH, BMI-1 using immunohistochemical analysis. However, the expressions of those molecular markers were relatively low in human pancreatic cancer tissues. In addition, the

reproducibilities of those results were not confirmed. Therefore, further investigations will be required.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	0	1,200,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	240,000	3,140,000

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：膵臓外科学

1. 研究開始当初の背景

難治性悪性腫瘍の代表である膵癌は、現在癌死の第五位であり、患者数も年々増加している。今でも外科的切除が唯一の根治を望める治療法であるが、手術成績は未だ不良である。最近新たに導入されている化学療法や放射線療法の進歩は、従来とは異なる一定の治療効果を認めるものの、根治は困難であり、それらの治療限界が存在することは明らかである。従って、膵癌患者の予後改善のためには、従来の概念にとらわれない新たな観点からの治療法の開発が必須である。応募者は、これまでに膵癌の予後向上に向けて、転移抑制遺伝子、血管新生、シグナル伝達因子等の多くの基礎および臨床研究を行ってきた (Clin Cancer Res. 2008, in press., Am J Roentgenol. 2008, in press., Oncol Report. 2004:277., Clin Cancer Res. 2003:1503., Cancer. 2001:488., Br J Cancer. 1999:1553., Int J Cancer. 1998:509., World J Surg. 1998:874). これらの研究を通じて、膵癌における前癌病変、前駆病変の存在を想定すると同時に、膵癌克服のためには、根本的な着眼点転換の必要性を感じていた。新たな発想として、最近の癌幹細胞理論は興味深いものであるが、膵癌においても適用し得るかどうかは明らかとはなっていない (Nature. 2001:105., Nat Rev Cancer. 2005:311., J Clin Oncol. 2008:2806). 一方、リツキサン、アバスチン等の分子標的治療薬は、癌治療における一つのブレイクスルーをもたらした。また最近、T細胞を特異的に腫瘍細胞の標的分子に直接結合させる新たな抗体 (Bispecific T Cell Engagers: BiTE) が創

造され、臨床導入が試みられ、既存治療抵抗性腫瘍に対して、優れた治療効果が一部に示されている (Science. 2008:974). 理論的には、BiTE抗体は、腫瘍細胞上の標的分子と Effector細胞との直接的な結合の上で殺細胞効果を発揮するために、通常分子標的薬に比べて、1000~100000倍少ない量で抗腫瘍効果をもたらす、副作用も少なく、医療経済的にも優れているものと考えられる。また我々が独自に進めてきた免疫抗体治療に関する研究成果 (Clin Cancer Res 2007: 2151, Clin Cancer Res 2005: 2947) を背景として、これらの新しい免疫学的知見に鑑みて、膵癌幹細胞特異的治療法の可能性に関する着想に至った。

本研究の特色は、新規分子標的治療薬として一部実現している BiTE抗体を、最近注目されている癌幹細胞理論を応用して、新たに作成する点にある。本研究目標が達成されれば、世界で初めての治療抗体作製に至る。さらに臨床導入に成功すれば、革新的な治療効果が得られる可能性がある。膵癌の予後向上においては、既存の治療法には限界があることが明らかであり、本研究がもたらす意義は極めて大きいものであると思われる。医療経済的にも優れる本抗体による治療は、まさに理想的な特異性の高い癌治療を実現する可能性がある。本研究の斬新性は、悪性度の極めて高い膵癌において、癌幹細胞理論の実証と新たな特異的 BiTE抗体による治療法の開発を試みる点にある。癌幹細胞理論は、古くより提唱されていたが、膵癌幹細胞の存在は未だに明確には証明されてはおらず、その臨床的意義は十分には解明されていない。癌幹細胞と

は、自己複製能、増殖能、さらには分化能を有し、現在広く研究および臨床応用されている幹細胞と同様の性質をもつものである。また、幹細胞が通常の細胞に比し、抗癌剤に対して抵抗性をもつことが報告されており、癌幹細胞自体もそういった性格、特性を持つ事が考えられる。実際の臨床においても、抗癌剤に耐性をもつ癌幹細胞が化学療法後の腫瘍の再発、再燃に深く関与していることが予想される。したがって癌幹細胞を標的とする特異的な治療法が開発できれば、より効果的かつ根治的な癌治療が可能となると想定される。本研究は、最新の知見に基づくものではあるが、同様の研究は、国内外において全く報告されていない。特に予後不良である膵癌に、本研究の概念が適用し得るのかどうかは、全く未知数である。しかし、本研究目的が達成されれば、今後の膵癌治療に革新的ともいえる成果をもたらす可能性は十分にあると思われる。本研究には未知数の部分が多く、まさにチャレンジングではあるが、同時に、増え続ける多くの膵癌患者にとって福音となるべき期待も極めて大きいものと思われる。

本研究の重要性は、以下に集約される。

- 膵癌幹細胞理論の実証とその臨床的意義を体系的に明らかとし得る可能性。
- 膵癌幹細胞特異的 BiTE 抗体は、極めて特異性の高い革新的治療効果をもたらす可能性。
- BiTE 抗体は生体内で極めて低容量で作用し得るため、副作用を最小限に抑制し得る可能性。
- 低容量であるがために、従来の分子標的薬と比較して、高い医療経済効果をもたらす可能性。

いずれもこれまでに報告の全くないものであり、斬新な着想に基づくが、その期待される成果は甚大であると考えられる。他癌腫での応用も考慮すれば、その波及効果は計り知れない。

2. 研究の目的

本研究では、膵癌幹細胞を標的として、既存治療とは全く異なる新たな抗体創出による新規治療法の開発を目標とした。期間中にこれまでに一部報告されている膵癌幹細胞としてのマーカーに対する BiTE 抗体を創出し、その特異性、殺腫瘍細胞効果について、*in vitro* および *in vivo* において機能評価を行い、臨床応用のための有用性を検証する。最終的には、本研究終了後の臨床導入を目標とした。

本研究の特色は、新規分子標的治療薬とし

て一部実現している BiTE 抗体を、最近注目されている癌幹細胞理論を応用して、新たに作成する点にある。本研究目標が達成されれば、世界で初めての治療抗体作製に至る。さらに臨床導入に成功すれば、革新的な治療効果が得られる可能性がある。膵癌の予後向上においては、既存の治療法には限界があることが明らかであり、本研究がもたらす意義は極めて大きいものであると思われた。医療経済的にも優れる本抗体による治療は、まさに理想的な特異性の高い癌治療を実現する可能性が想定された。

3. 研究の方法

膵腫瘍における癌幹細胞候補分子の発現および臨床的意義の体系的解析

最新の文献および学会報告から、膵癌幹細胞に対する治療標的候補マーカーとして CD133, CD24, CD44, CD90, CD166, ESA, SHH, BMI-1 を選択し、当科にて切除を行い、患者の同意が得られた通常型膵癌 (約 120 例) および膵管内腫瘍 (IPMN) (約 40 例) の標本を用いて、FACS, 免疫染色, Real-time PCR にて、それらの分子の発現を検討する。FACS 解析においては、摘出標本からコラゲナーゼ消化法にて腫瘍細胞を抽出し、フローサイトメトリーにて検討する。また、対照として、乳頭癌や下部胆管癌の際に得られた非癌部正常膵および慢性膵炎の標本についても検討し、膵腫瘍における特異性を明らかとする。さらに、染色率あるいは染色性により、臨床病理学的検討あるいは再発、転移等の臨床経過との関連について検討する。また、浸潤性膵管癌と IPMN との発現の相違についても検討し、それらの臨床的意義を包括的に明らかとする。

膵癌幹細胞治療標的候補分子陽性細胞の機能解析

上記の検討結果から、治療標的候補となる分子を選別し、コラゲナーゼ消化法により、切除直後の膵腫瘍あるいは NOD/SCID マウスに移植した後のヒト膵癌 xenograft より single cell を準備する。これを MACS system を用いて、標的細胞を単離する。*in vitro* の細胞培養にて、Crystal Violet 法による腫瘍細胞数の個数の測定を行う。また、Colony forming efficiency (CFE) や serial culture assay の方法を用いて、標的マーカー陽性および陰性細胞の増殖能、自己複製能を比較する予定とした。

膵癌幹細胞の *in vivo* における機能解析

上記で得られた標的マーカー陽性細胞の *in vivo*での機能を解析するために、標的マーカー陽性細胞および陰性細胞をNOD/SCIDマウスの皮下に接種し、*in vivo*での生着、増殖能について検討する。移植個数を 10^2 , 10^4 , 10^6 と変えて、各々の細胞の増殖のpotentialについて検討する。マウスに移植生着した腫瘍については、PCRにより膵特異的遺伝子 (insulin, glucagon, PDX-1, IAPP, amylase等) さらには免疫染色にてinsulin染色やintestinal fatty acid-binding protein (Ifabp)について検討する。また、K-rasやp53発現についても発現を確認する。また、脾臓に接種した後に、経時的に犠牲死させ、肝転移個数をカウントする。これらの検討により、標的マーカー陽性細胞のphenotype, 増殖能, 分化能, 転移能等の特性が明らかとなりえるものと予想される。

4. 研究成果

当科で膵切除を行い、文書での同意を得た症例の中から予後の確定し得た膵癌症例および膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) を対象とした。PSCA, HVEM, CD133, CD24, CD44, CD90, CD166, ESA, SHH, BMI-1などのこれまで報告されている膵癌幹細胞の表面マーカーを候補として、各分子に対する特異的免疫抗体を用いて、主に免疫組織染色法により、蛋白レベルでの発現の検討した。しかし、全体にいずれの分子もその発現レベルが低く、膵癌組織中の分布もかなり疎であったため、十分な臨床病理学的検討を行うことが困難であった。一部はRNAを抽出し、Realtime-PCR法により mRNA レベルでの検討も行ったが、やはり臨床的に意義のあるもの、予後との明らかな相関のあるものは、見いだすことができなかった。幹細胞という非常に少数の細胞集団であることも想定されたが、予想以上に困難であった。今後の研究展開のための打開策としては、*in-situ*での検討や膵癌組織から癌細胞を単離してのFACSを用いた検討など、さらに工夫を要するものと思われた。同時に、免疫染色の至適条件や最近の研究報告からの結果も鑑みて、より有効な方策を練る必要があるものと思われた。実際に、最近示された他癌種でのBiTE抗体の臨床試験の結果からは、当初想定されたような抗腫瘍効果や予後の延長効果が得られておらず、非常に残念な結果が報告されていることも事実である。したがって、実際の臨床応用が可能となった場合においても、この抗体がさらに治療効果を発揮できるような使用法等についても検討を要するものと考えられた。例えば、Bulkyな臨床腫瘍に対して、化学療法や放射線治療を併用し、多くの成熟した癌細胞を消滅させた上で、それらの治療に抵抗性を示すと考

えられる膵癌幹細胞に対する抗体治療を導入できれば、より効率的な治療効果を得る可能性もあると考えられる。さらに手術前の免疫治療が効果を上げやすい状態での導入、さらには術後の微小転移抑制、再発制御のための治療としても期待できるものと思われた。本研究で明らかとなったことは膵癌幹細胞が当初想定した以上に少数の細胞集団であり、それらを免疫染色で同定するにはかなりの困難であることである。

しかし一方では、本研究成果の発展は、今なお最難治癌と言われる膵癌に対するブレイクスルーとなる可能性は十分にあると期待できる。化学療法やワクチンなどの免疫治療など最新の治療結果も膵癌患者の延命、根治のためには、不十分であることは明らかであり、本研究の当初の目的は、未だに解決されていないままである。化学療法の進歩は目覚ましく、一筋の光明は見えつつあるが、さらなる基礎研究ならびに臨床研究、集学的治療戦略の確立は、今なお増え続ける膵癌治療においては、極めて重要な課題であることは間違いないと思われる。

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0件)

〔学会発表〕 (計0件)

〔図書〕 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 祥介 (NAKAJIMA YOSHIYUKI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：00142381