

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 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501026

研究課題名（和文） 難治性中皮腫に対する新抗体医薬の開発

研究課題名（英文） Development of the new therapeutic antibodies for mesothelioma

研究代表者

阿部 雅明（ABE MASAOKI）

順天堂大学・医学部・研究技師

研究者番号：30398656

研究成果の概要（和文）：我々が開発した抗ヒト膜型(C-)ERC/Mesothelinモノクローナル抗体22A31は、マウス皮下および腹腔内に移植したヒト上皮型中皮腫細胞株に対してそれぞれ腫瘍内投与、腹腔内投与で腫瘍の増殖抑制効果を有することが判った。また、ヒト中皮腫細胞株を移植したマウスの血中ヒト分泌型(N-)ERC/Mesothelin濃度を測定（モニタリング）することで、腫瘍の増殖・進展の度合いをある程度把握できることが分かり、治療効果の予測をする上で意義が大きく重要なことであると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We previously developed anti-human membranous C-ERC/Mesothelin monoclonal antibody 22A31. In this study, we proved 22A31 to have anti-proliferative activity for human mesothelioma cell lines transplanted subcutaneously or intraperitoneally in mice. 22A31 was injected to mice via intratumoral or intraperitoneal routes, and it showed the inhibitory effect for the proliferation of mesothelioma cells in all experiments. Serum concentration of the secretory N-ERC/Mesothelin reflected the extent of the tumor-proliferation, and seemed to be significant in the prediction of the effect of treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：腫瘍病理学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：中皮腫、抗体療法、ERC/Mesothelin、ADCC

1. 研究開始当初の背景

(1) 社会的背景：2005年6月の、いわゆる「クボタショック」以来、アスベストを原因とする中皮腫の発症は大きな社会問題となっている。有効な治療法も確立されていないところにも病気としての悲劇性がある。中皮腫は、肺がんに比べ頻度は低いが、その死亡者数は年々増加傾向にある。アスベスト暴露から数

十年して発症するため、過去のアスベストの使用状況を考えれば、暴露者数は極めて大きく、今後中皮腫患者の発生増加が懸念されており、リスクの高いグループの検診体制の確立は急務である。現在一般に用いられている診断法は、断層撮影（CTスキャン）あるいは生検材料による診断で、検出された時には既に進行していることが多い。その一つの理

由として、画像による早期診断の困難さに起因するところが大きい。現時点ではいかなる治療をしても、MST（中間生存期間）が8から18ヶ月と極めて予後不良の疾患である。このように中皮腫は、今後確実に増加が予想されているが、一旦発症したら治療が難しいため早期発見・早期治療は極めて重要であり、高暴露（ハイリスク）グループに対する検診体制の確立と併せて中皮腫特異的新規治療法の開発も急務である。

(2) 学術的背景：申請者らは、中皮腫の早期発見・早期診断を目的として中皮・中皮腫に特異的に発現する ERC 遺伝子産物に対する抗体を独自に作製し、ELISA 測定系を開発した (Segawa T, Hino O. MESOMARK kit detects C-ERC/mesothelin, but not SMRP with C-terminus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 May 9;369(3):915-8.)。2005年8月に順天堂医院に開設した「アスベスト・中皮腫外来」を受診した患者のうち同意の得られた受診者約800人において血液中の ERC 遺伝子産物の有無を上記 ELISA 測定系にて検討した。中皮腫は上皮型と肉腫型、それらの混合型があるが、測定の結果全体の60%を占める上皮型で精度、感度とも90%を超える成果が出た (Shiomi K, Hino O. Sensitive and specific new enzyme-linked immunosorbent assay for N-ERC/mesothelin increases its potential as a useful serum tumor marker for mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2008 Mar 1;14(5):1431-7.)。簡便に使用できる ELISA 測定系を開発したことで、中皮腫の早期発見、発症前診断に有効であることが示された。

2. 研究の目的

中皮腫の早期発見、発症前診断に有効な ELISA 測定系を開発した申請者らは、次に中皮腫の治療を目的とした研究を開始した。

新規に作製したヒト膜型 (C-)ERC 遺伝子産物に対する抗体は、免疫組織・細胞染色に使用できるだけでなく未固定の中皮腫細胞株の細胞膜上の ERC/Mesothelin 分子も認識可能なことがフローサイトメトリー (FCM) 解析によって分かった (Ishikawa K, Segawa T, Hagiwara Y, Maeda M, Abe M, Hino O.; Establishment of novel mAb to human ERC/mesothelin useful for study and diagnosis of ERC/mesothelin-expressing cancers.; *Pathol Int.* 2009 Mar;59(3):161-6.)。そこで中皮腫に対し抗体医薬としての有用性があるかを動物試験レベルで検討を行った結果、本抗体が中皮腫治療に有用性があることを示唆する結果が得られた。本研究では、この抗 C-ERC 抗体 22A31 による中皮腫治療実験をさらに進めて、ヒト化抗体医薬を視野に入れたヒト中皮腫に対する

有効な治療法の開発を目的に研究を始めた。

3. 研究の方法

概略としては、申請者らの作製した抗体 22A31 のヒト中皮腫に対する抗腫瘍作用の検討であり、これは主に実験動物を用いた実験系である。そして次により強い抗腫瘍作用を持つ抗体の作製とヒト化抗体の開発作業である。

(1) 担がん動物を用いた実験：ヒト中皮腫細胞株をヌードマウスの皮下あるいは腹腔内に移植したヒト中皮腫モデルを使用して、22A31 の抗腫瘍効果を判定する。

【治療薬】マウス抗ヒト C-ERC/Mesothelin モノクローナル抗体 (22A31)、アリムタ、アンサー。コントロール (対照) は、Vehicle (PBS) あるいはアイソタイプマッチコントロール抗体。

【ヒト中皮腫細胞株】ACC-MES04 (上皮型由来)、NCI-H226 (上皮型由来)

【マウス】: BALB/c-nu/nu (ヌード), ♀, 7 週齢

① 皮下移植中皮腫に対する治療実験

【実験系】ヌードマウスの右脇腹皮下にヒト上皮型中皮腫細胞株を 2×10^6 個移植する。治療実験は、カリパス (caliper) を用いた目視計測にて腫瘍長径が 5 mm に生育したら各薬剤の投与を開始する。生着 (転移) 抑制実験は、中皮腫細胞株の移植前に 22A31 の投与を行う。

【投与部位・量・回数】22A31: 腫瘍内注射投与は 0.1mg/回/匹、腹腔内注射投与は 0.2mg/回/匹、静脈内注射投与は 0.1mg/回/匹。アリムタ: 300mg/kg/回を腹腔内注射投与。対照群は治療薬と同容量。各投与は週2回を4~6.5週連続投与。

【解析】薬剤投与開始前日および毎投与時に移植したヒト中皮腫の腫瘍の長径、短径、可能ならば高さもカリパス (caliper) を用いて測定し腫瘍容積を算出し比較検討する。最終投与1週間後に担がんマウスを屠殺し腫瘍および各臓器を採取して組織標本を作製して病理組織学的に解析する。

② 腹腔内移植中皮腫に対する治療実験

【実験系】ヌードマウスの腹腔内にヒト上皮型中皮腫細胞株を 2×10^6 個移植する。治療実験は、移植2~3週後 (腫瘍形成後) から 22A31 を腹腔内投与して抗腫瘍効果を検討する。生着 (転移) 抑制実験は、中皮腫

細胞株移植前に 22A31 の投与を行う。

【投与部位・量・回数】22A31：0.2mg/回/匹を腹腔内注射投与、対照群も同様の溶液量。アンサー：0.5~1mL/回/匹を皮下注射。各投与は週 2 回を 4 週連続(計 8 回)。

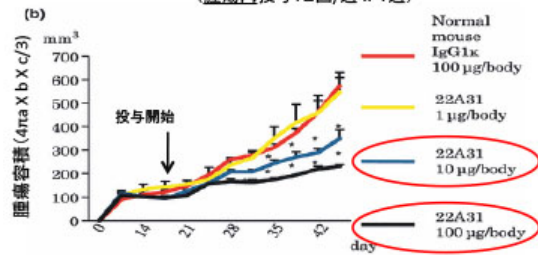
【解析】中皮腫細胞株移植前、治療前、治療後(剖検時)に採血して、我々の開発した主に中皮腫細胞より分泌されるヒト N-ERC/Mesothelin の濃度を測定する ELISA kit で血中の N-ERC/Mesothelin 濃度を測定する。最終投与 3 日後に麻酔死させて、腹腔内の写真撮影をし、その後解剖を行い腫瘍の大きさや個数の計測、進展度の観察を行った後に腫瘍と各臓器を採取して組織標本を作製する。血中の N-ERC/Mesothelin 濃度および肉眼的所見と顕微鏡所見で 22A31 の抗腫瘍効果の判定を行う。

(2) 新規治療抗体の作製：22A31 はマウスにヒト C-ERC/Mesothelin のペプチドを免疫して作製したモノクローナル抗体であるが、新規抗体は上皮型と肉腫型のヒト中皮腫細胞株をマウスに免疫してハイブリドーマを作製し、スクリーニングも中皮腫細胞株に対して細胞障害活性を持つ抗体を産生するクローンを選択する手法で行う。

4. 研究成果

これまでに、我々の作製したマウス抗ヒト膜型(C-)ERC/Mesothelinモノクローナル抗体 22A31 は、ヒト上皮型中皮腫細胞株をヌードマウス皮下に移植したヒト中皮腫モデルを用いた治療実験において、腫瘍内投与では明確な腫瘍の増殖抑制効果を示した(図-1)。

図-1 皮下移植ヒト中皮腫細胞株ACC-MESO4に対する Mab. 22A31の抗腫瘍効果 (腫瘍内投与：2回/週 x 4週)

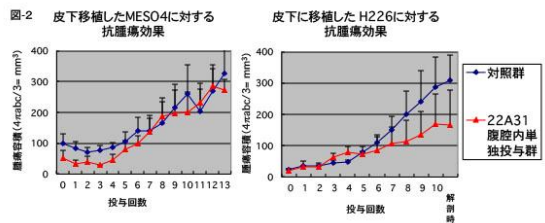


ところが本抗体 22A31 投与前にマウス体内の NK 細胞を死滅させる効果のある抗 ASGM-1 抗体の投与やあるいは F(ab')₂ 化した 22A31 投与で抗体依存性細胞傷害 (ADCC: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) を不成立にした場合は、腫瘍の増殖抑制が認められなかった。また試験管内実験においても ADCC 作用が認められることより、22A31 は、ヒト中皮腫細胞株に対して主に effector cell (NK cell) 存在下で増殖抑制効果を示すことを報告してきた (Inami

K., Abe M., Takeda K., Hagiwara Y., Maeda M., Segawa T., Suyama M., Watanabe S. and Hino O.: Antitumor activity of anti-C-ERC/mesothelin monoclonal antibody in vivo. *Cancer Sci.* 101: 969-974, 2010)。そこで本研究では、ヒト化抗体医薬を視野に入れたヒト中皮腫に対する有効な治療法の開発を目的に、さらに治療効果を高めるために 22A31 の投与方法や中皮腫細胞株の移植部位についての検討を行った。

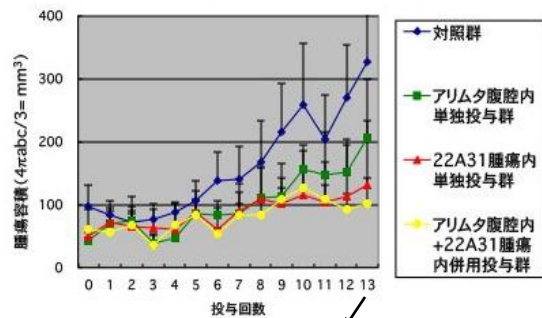
(1) ヌードマウス皮下に移植したヒト中皮腫に対する投与方法の検討

① 皮下移植中皮腫に対して 22A31 の腹腔内投与は、中皮腫細胞株によって増殖抑制効果に差があった(図-2)。

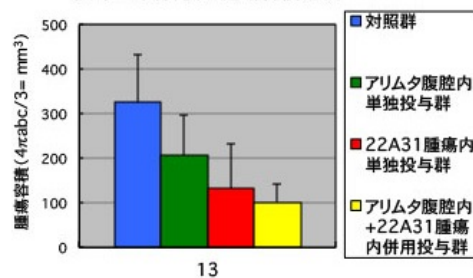


② 抗腫瘍薬アリムタと 22A31 の併用投与についての検討では、アリムタ単独投与で増殖抑制効果が認められたが、アリムタと 22A31 の腫瘍内併用投与ではアリムタあるいは 22A31 の単独投与と同程度の抑制効果であり腫瘍を完全に消失せしめるまでの相乗的な効果を得ることが出来なかった(図-3)。

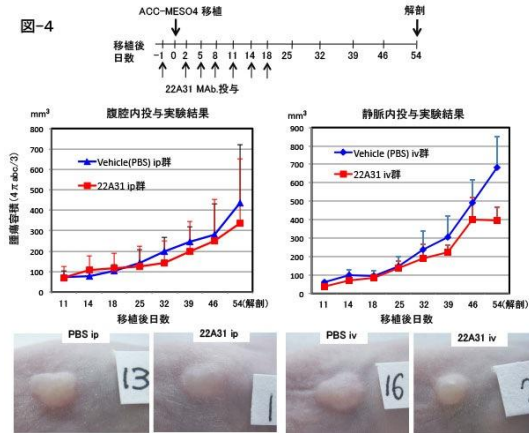
図-3 皮下移植したMESO4に対する抗腫瘍効果



皮下移植したMESO4に対する抗腫瘍効果 投与13回目後の腫瘍容積比較

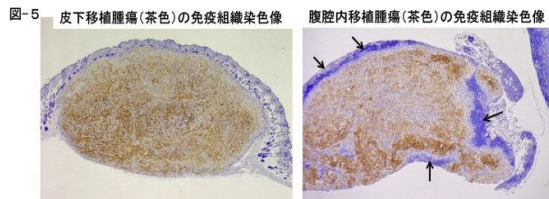


- ③ 腫瘍の皮下移植前より 22A31 を腹腔内あるいは静脈内に投与して腫瘍の生着・増殖を抑制する（転移予防）実験を行ったが、明らかな生着抑制効果は得られなかった（図-4）。



(2) 腹腔内に移植したヒト中皮腫に対する検討

- ① 腹腔内にヒト中皮腫細胞株を移植して腫瘍形成後に、病理組織学的に解析したところ、皮下移植腫瘍と比較して腹腔内の腫瘍周辺には多数の単核球が浸潤（矢印）していることが分かり、移植部位の微少環境によって治療効果に差が出る可能性が示唆された（図-5）。



- ② 腹腔内にヒト中皮腫細胞株を移植して2週間後より 22A31 を腹腔内に投与し、生着した腫瘍の増殖を抑制（治療）する実験を行った結果、対照（抗体を投与しない）と比較して剖検時および固定後の所見で腫瘍の大きさ、個数において差があり 22A31 による腫瘍の増殖抑制効果がみられた（図-6 a, b）。

図-6a 腹腔内に移植したtNCI-H226に対する22A31抗体の抗腫瘍効果

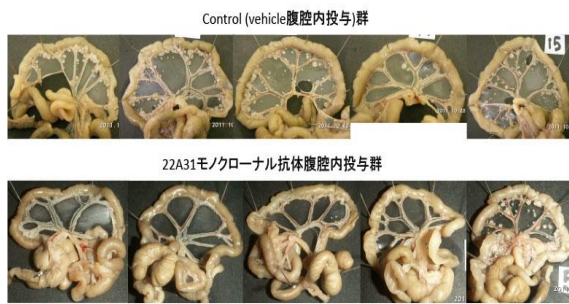
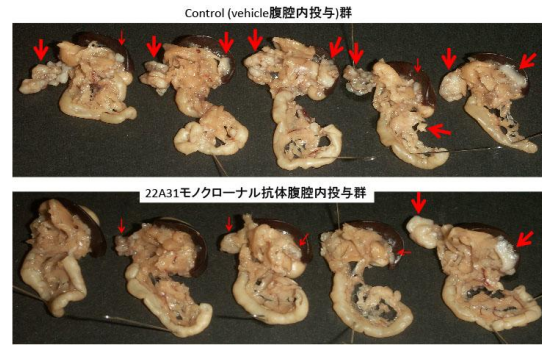


図-6b 腹腔内に移植したtNCI-H226に対する22A31抗体の抗腫瘍効果



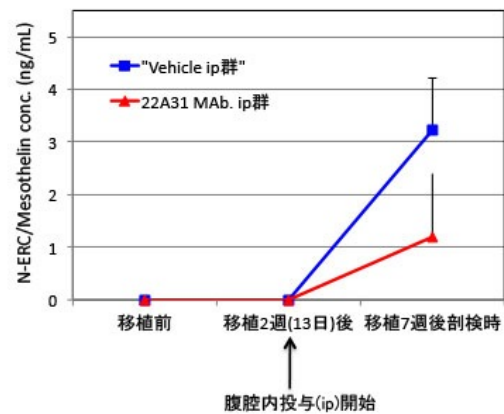
- ③ 腹腔内移植中皮腫に対してさらなる抑制（ADCC 増強）効果を狙って、22A31 腹腔内投与に加え結核菌熱水抽出物溶液（アンサー）の皮下注射を併用した治療実験を行ったが、22A31 単独以上の抑制効果はみられなかった。この実験に関しては今後、薬剤を替えてさらなる検討を行う必要がある。

- ④ 移植前に 22A31 を予め腹腔内投与し、腫瘍細胞の生着を抑制する転移予防実験を行ったが、腫瘍細胞の生着を完全に抑制することは出来なかった。

(3) 増殖度のモニタリング

腹腔内移植中皮腫に対する治療実験を行ったマウスの血中ヒト N-ERC/Mesothelin 濃度を我々の開発した ELISA Kit を用いて測定したところ、対照群と比較して 22A31 腹腔内投与群では低値であり、剖検時の腫瘍の所見（大きさ、個数）と相関することが判った（図-7）。ヒト中皮腫細胞株を移植したマウスの血中ヒト N-ERC/Mesothelin 濃度を測定（モニタリング）することは、屠殺解剖を行わなくても腫瘍の増殖・進展の度合いをある程度把握でき、治療効果の予測をする上で意義は大きく、非常に重要なことであると考えられた。

図-7 NCI-H226腹腔内移植マウスの血中ヒトN-ERC/Mesothelin濃度



(4) 新規治療抗体の作製

ヒト中皮腫細胞株に対してより強い抗腫瘍作用を持つ新規抗体の作製に着手しており、現在少なくとも2クローン以上の細胞障害・増殖抑制活性を有する抗体が得られており、今後も引き続き治療抗体としての有用性の解析を進めていく。

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2件)

- ① Ito M., Kajino K., Abe M., Fujimura T., Mineki R., Ikegami T., Ishikawa T. and Hino O.: NP-1250, an ABCG2 inhibitor, induces apoptotic cell death in breast carcinoma MCF7/mitoxantrone-resistant cells via a caspase-independent pathway. *Int. J. Oncol Rep*, 29(4):1492-1500, doi:10.3892, 2013. 査読有
- ② Kanamori-Katayama M., Kaiho A., Ishizu Y., Okamura-Oho Y., Hino O., Abe M., Kishimoto T., Sekihara H., Nakamura Y., Suzuki H., Forrest A. R. R. and Hayashizaki Y.: LRR4 and UPK3B are markers of primary mesothelial cells. *PLoS One*, 6: e25391-25399, doi:10.1371, 2011. 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① 阿部 雅明、他、難治性中皮腫に対する新抗体医薬の開発、第101回 日本病理学会総会、2012年4月26日～2012年04月28日、東京・新宿 京王プラザホテル
- ② 阿部 雅明、他、モノクローナル抗体 22A31 の C-ERC/mesothelin 発現腫瘍に対する抗腫瘍効果、第 99 回 日本病理学会総会、2010 年 4 月 27 日、京王プラザホテル (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 雅明 (ABE MASAOKI)
順天堂大学・医学部・研究技師
研究者番号: 30398656