

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6日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791268

研究課題名（和文） 食道癌に対する Herceptin 抗体療法と perforin 耐性の関与

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・大学院医学工学総合研究部・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。まず HER-2 を過剰発現した食道扁平上皮癌細胞株 TE4 に、Herceptin による ADCC を繰り返し暴露させ、ADCC 耐性の細胞集団を 68 個作製した。それらに直接 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. Esophageal SCC cell line TE4, which is highly susceptible to Trastuzumab-mediated ADCC, were repeatedly treated with Trastuzumab-mediated ADCC, and the surviving tumor cells are cloned by limited dilution and selected as 68 escaped tumor clones. 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
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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、細胞障害活性

1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌は、消化器癌の中でも特に予後不良な難治癌として知られている。近年、新たな癌治療の選択肢として、癌細胞における特定分子を標的とした分子標的治療薬（モノクローナル抗体、tyrosine kinase 阻害剤など）が開発され、その臨床効果が期待されている。実際、抗 HER-2 モノクローナル抗体である trastuzumab (Herceptin™) は、乳癌において予後延長効果が証明され、すでに標準治療に組み込まれている。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™) 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プロック、(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。我々は、抗 HER-2 抗体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)。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、抗 EGFR 抗体ともに、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う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) p27^{kip1} 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 抗体の耐性の機序を報告

したものは皆無である。そこで我々は、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癌細胞株クローンを樹立し、抗 HER-2 抗体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した。その結果、perforin、granzyme の感受性が ADCC の違いに關与することを報告してきた (Kawaguchi Y Anticancer Res, 2009)。

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、本研究では、さらなる ADCC 耐性機序の解明のため、(1) ADCC 耐性食道癌細胞クローンを複数株樹立、(2) perforin、granzyme 以外の耐性因子の検討を目的とする。本研究の結果により、食道扁平上皮癌に対する抗 HER-2 抗体療法の導入において、その耐性機序が判明し、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。

3. 研究の方法

HER-2 を過剰発現した食道扁平上皮癌細胞株 TE4 に、Herceptin による ADCC を繰り返し暴露させ、ADCC 耐性の細胞集団を作製した。それらを限界希釈法にて 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 に關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。また、clone 間における Bcl-2 や proteinase 9 の発現を検討した。

4. 研究成果

食道扁平上皮癌細胞株 TE4 に、Herceptin による ADCC を繰り返し暴露させ、ADCC 耐性の細胞集団を作製した。そして耐性集団と親株の clone を限界希釈法にて樹立したところ、耐性集団と親株からそれぞれ 34 個の clone が樹立された (図 1, 2)。

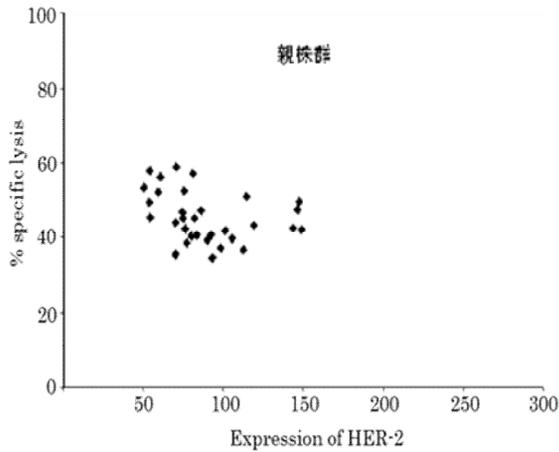


図 1. 新株群における HER-2 発現と ADCC 活性

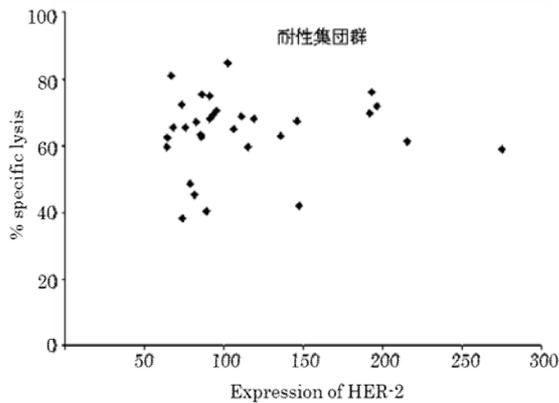


図 2. 耐性集団群における HER-2 発現と ADCC 活性

次にそれらの clone の HER-2 発現と ADCC を測定し、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、HER-2 の発現は約 120 (MFI) で、ADCC が 72%、43% と有意な差を認める組と、HER-2 の発現が約 100 (MFI) で ADCC が 85%、47% と差を認める組が存在した。それぞれの 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の測定を行ったが、差は認められなかった。また、DNA typing の結果はどれも HLA-A*0207/110101, HLA-B*4601/5401, HLA-C*010201/010201 であった。TGF- β 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。

この clone における perforin と granzyme の感受性の違いについてさらに検討した結果、HER-2 の発現は約 120 (MFI) の clone には perforin、granzyme による感受性の違いを認めた (図 3)。しかし、HER-2 の発現は約

100 (MFI) の clone には perforin による感受性の違いを認めなかった (図 4)。

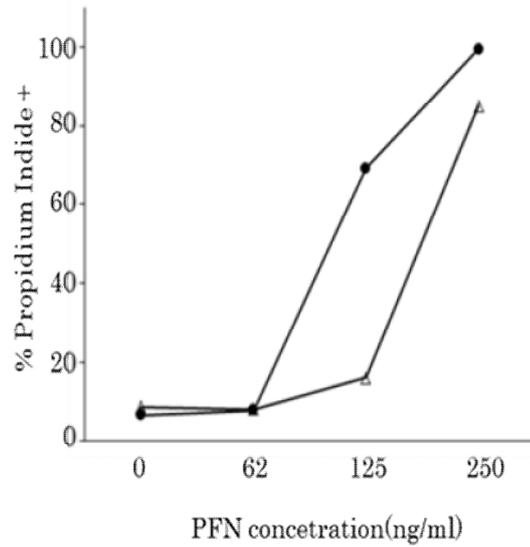


図 3. HER-2 発現が 120 (MFI) の clone 間における perforin (PFN) の感受性

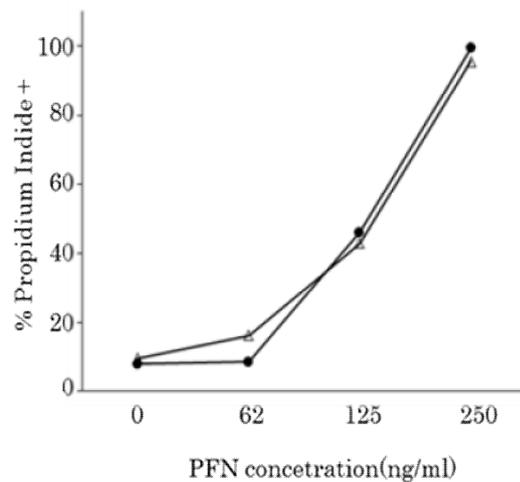


図 4. HER-2 発現が 100 (MFI) の clone 間における perforin (PFN) の感受性

次に Bcl-2 や proteinase 9 の発現を検討したが、clone 間に有意差を認めなかった。これらの結果から、perforin の感受性が Herceptin 耐性の機序に関与することが予想された。

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4件)

- ① Maruyama T, Mimura K, Izawa S, Inoue A, Shiba S, Watanabe M, Kawaguchi Y, Inoue M, Nogata H, Inoue S, Fujii H, and Kono K. Lapatinib enhances Herceptin-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity by up-regulation of cell surface HER2 expression. *Anticancer Res* 2011; 31(9): 2999-3005 (査読有)
- ② Mimura K, Kono K, Maruyama T, Watanabe M, Izawa S, Shiba S, Mizukami Y, Kawaguchi Y, Inoue M, Kono T, Choudhury A, Kiessking R, and Fujii H. Lapatinib inhibits receptor phosphorylation and cell growth and enhances antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of EGFR and HER2 over-expressing esophageal cancer cell lines. *Int J Cancer* 2011; 29(10):2408-2416 (査読有)
- ③ Maruyama T, Mimura K, Sato E, Watanabe M, Mizukami Y, Kawaguchi Y, Ando T, Kinouchi H, Fujii H, and Kono K. Inverse correlation of HER2 with MHC class I expression on oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 103 巻, 2010 : 552-9 (査読有)
- ④ Watanabe M, Kono K, Kawaguchi Y, Mizukami Y, Mimura K, Maruyama T, Fujii H. Interleukin-21 can efficiently restore impaired antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 102 巻, 2010 : 520-9 (査読有)

[学会発表] (計4件)

- ① 三村耕作 他, 食道扁平上皮癌における HER2 を標的とした分子標的治療と免疫治療について, 第 32 回癌免疫外科研究会, 2011. 5. 19, 和歌山県
- ② 三村耕作 他, 食道癌に対する免疫療法の新規開発-HER family 分子標的治療とペプチドワクチン, 第 36 回日本外科系連合学会学術集会, 2011. 6. 16, 千葉県
- ③ 三村耕作 他, 食道扁平上皮癌患者における NK 細胞機能不全とその回避方法について, 第 66 回日本消化器外科学会総会, 2011. 7. 13, 愛知県

- ④ 河野浩二 他, HER-1 (EGFR), HER-2 を分子標的とした食道扁平上皮癌に対する新規治療-外科治療に対する有効な補助療法-, 第 66 回日本消化器外科学会総会, 2011. 7. 13, 愛知県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河口 賀彦 (KAWAGUCHI YOSHIHIKO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部
・助教
研究者番号 : 80402048

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし