

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659433

研究課題名(和文) 抗KL-6抗体は分子標的薬の作用を増強しうるか

研究課題名(英文) Anti KL-6 antibody enhances the effects of molecular targeted drug

研究代表者

河野 修興 (Kohno, Nobuoki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授

研究者番号：80215194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞株を用いて抗KL-6抗体が分子標的治療薬によるADCC活性を増強し得るかを検証した。4つの癌細胞株(SK-BR-3, ZR75-1, PC3, YMB-S)のHER2, KL-6抗原の発現状況をFACSを用いて検討したところYMB-Sでは両抗原ともに高い発現を認めた。抗KL-6抗体によるTrastuzumabのADCC活性の増強効果についてCr-51 release assayにより検討したところ、YMB-Sでは抗KL-6抗体投与により細胞傷害作用が作用細胞：標的細胞比に依存して増強した。これらの結果から抗KL-6抗体は分子標的治療薬のADCC活性を増強し得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to investigate the additive effect of anti-KL-6 antibody on the therapeutic antibody-induced ADCC (Antibody-Dependent Cellular-Cytotoxicity) activity. The expression of HER2 and KL-6 were measured using FACS analysis in 4 cancer cell lines (SK-BR-3, ZR75-1, PC3, YMB-S), and both HER2 and KL-6 were highly expressed in YMB-S cells. Accordingly, the effects of anti KL-6 antibody on the ADCC activity of PBMCs evoked by Trastuzumab were examined using Cr-51 release assay. Enhanced cytotoxicity was observed in an effector-to-target ratio manner when YMB-S cells were treated with anti-KL-6 antibody. These findings indicate that anti KL-6 antibody can enhance the therapeutic antibody-induced ADCC activity mediated by mononuclear cells.

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：KL-6 分子標的治療薬 肺癌

1. 研究開始当初の背景

KL-6(Krebs von den Lungen-6)抗原は、MUC1 ムチンの亜分子であるが、優れた間質性肺炎の血清マーカーとして広く臨床応用されている。

一方で KL-6 抗原は肺癌細胞の関連抗原分子としての性格も有しており、KL-6 抗原高発現癌細胞は臨床的に転移や予後の悪化因子であることが明らかにされている。さらに、癌細胞株を用いた検討では抗 KL-6 抗体が、MUC1 の capping により細胞表面の E-cadherin を露出させ、E-cadherin を介した細胞凝集、増殖抑制が起こること、LAK 感受性を増強させること(Doi M, *Cancer Science* 2006)を報告してきた。

このように、抗 KL-6 抗体によって癌細胞表面における MUC1 の立体構造を修飾することにより、細胞表面に結合する既存の分子標的治療薬(特にモノクローナル抗体薬)の治療効果を増強できる可能性は極めて高いと仮説を立てている。

またTrastuzumabは細胞表面のHER2蛋白に特異的に結合した後、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)、単球を作用細胞とした抗体依存性細胞障害作用(Antibody-Dependent Cellular-Cytotoxicity: ADCC)により抗腫瘍効果を発揮することが知られている。

2. 研究の目的

本研究は癌細胞株を用いて抗 KL-6 抗体が分子標的治療薬による ADCC 活性を増強し得るのか、さらに抗 KL-6 抗体によりADCC活性が増強する癌細胞の特徴はどのようなものかを明らかにすることを目的として検討をおこなった。

3. 研究の方法

本研究のために抗 KL-6 抗体の大量精製が必要になるが、ハイブリードマより抗体精製キットを用いて、抗 KL-6 抗体を大量精製した。

癌細胞株におけるKL-6抗原、HER2抗原の発現を、抗KL-6抗体、抗erbB2抗体によりfluorescence activated cell sorting(FACS)解析を用いて検討する。

癌細胞株において抗KL-6抗体が分子標的薬であるTrastuzumabのADCC活性を増強するかについて、Cr-51 release assayを用いて検討を行った。

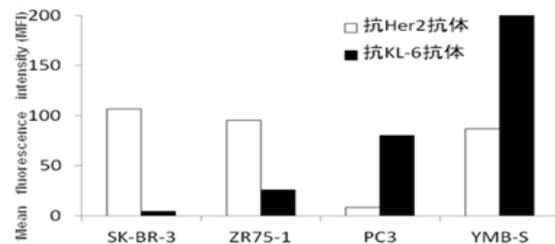
4. 研究成果

癌細胞株における KL-6 抗原、HER2 抗原の発現を、一次抗体に抗 KL-6 抗体(100 μ g

/ml)、抗 erbB2 抗体(1 μ g/ml)を用いて FACS 解析を行った。

結果は、ヒト肺癌細胞 SK-BR-3 株(HER2 MFI:106.4, KL-6 MFI:4.3)、ヒト肺癌細胞 ZR75-1 株(HER2 MFI:95.4, KL-6 MFI:26.0)において HER2 抗原の高発現、ヒト肺癌細胞 PC3株(HER2 MFI:8.0, KL-6 MFI:80.0)ではKL-6抗原の高発現が認められた。またヒト乳癌細胞YMB-S株(HER2 MFI:86.7, KL-6 MFI:200.0)ではHER2抗原、KL-6抗原共に高発現であった。

Figure 1: 癌細胞株における KL-6 抗原、Her2 抗原の発現



Cr-51 で予めラベルした上記 4 種のがん細胞株についてヒト末梢血単核球を作用細胞(effector)として、作用細胞:標的細胞=50:1, 25:1, 12.5:1の比率で混合し、

effectorのみ添加

effector, Trastuzumab(20 μ g/ml)を添加

effector, Trastuzumab(20 μ g/ml), 抗 KL-6 抗体(1mg/ml)を添加

の計 3 群に分け Cr-51 release assay により ADCC 活性を測定した。

SK-BR-3細胞, ZR75-1細胞, PC3細胞では抗KL-6抗体によるTrastuzumabのADCC活性の増強効果は見られなかった。KL-6抗原, Her2抗原強発現株であるYMB-S細胞において抗KL-6抗体は作用細胞:標的細胞比に依存してTrastuzumabのADCC活性を増強した。

Figure 2: 癌細胞株における trastuzumab の ADCC 活性に対する抗 KL-6 抗体の増強作用

今回の結果から抗 KL-6 抗体投与により特に KL-6 高発現の癌細胞において ADCC 活性による分子標的治療薬の効果が増強できる可能性が示された。今後は癌細胞株を用いて Cetuximab, Trastuzumab, Bevacizumab などの分子標的薬と同時に抗 KL-6 抗体を添加することで ADCC 活性, CDC 活性, LAK 活性を増強しうるかなどについて検討する。

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)

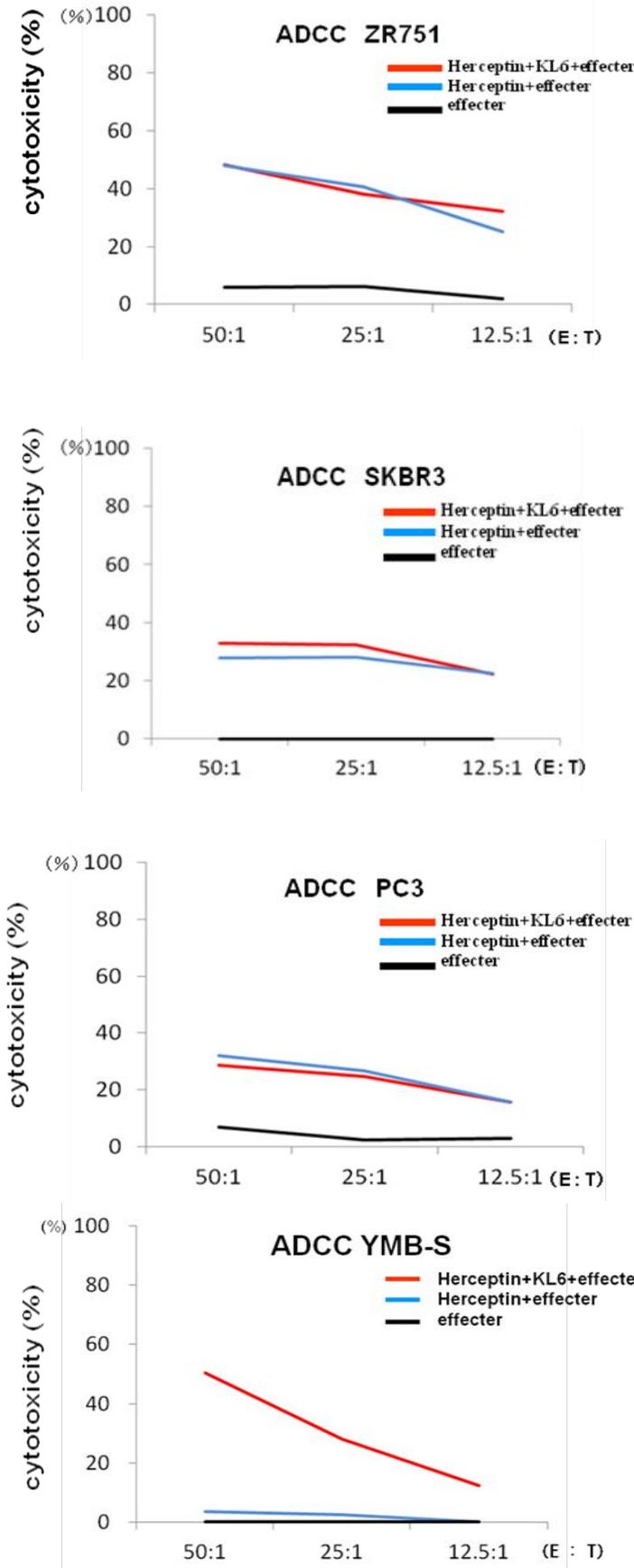
1. Tanaka S, Hattori N, Ishikawa N, Shoda H, Takano A, Nishino R, Okada M, Arihiro K, Inai K, Hamada H, Yokoyama A, Kohno N. Krebs von den Lungen-6 (KL-6) is a prognostic biomarker in patients with surgically resected nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2012 Jan 15;130:377-87. doi: 10.1002/ijc.26007. (査読有)

2. Tanaka S, Hattori N, Ishikawa N, Horimasu Y, Deguchi N, Takano A, Tomoda Y, Yoshioka K, Fujitaka K, Arihiro K, Okada M, Yokoyama A, Kohno N. Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2 is a prognostic biomarker for lung cancer. *Pathobiology*. 2012;79:24-33. doi: 10.1159/000331230. (査読有)

3. Masuda T, Hattori N, Senoo T, Akita S, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Kohno N. SK-216, an inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1, limits tumor progression and angiogenesis. *Mol Cancer Ther*. 2013 Nov;12:2378-88. doi: 10.1158/1535-7163. (査読有)

[学会発表](計 3 件)

1. Tanaka S, Ishikawa N, Hattori N, Hamada H, Yokoyama A, Kohno N. Krebs von den Lungen-6 (KL-6) is a prognostic biomarker in patients with surgically resected nonsmall cell lung cancer. 2011 European Respiratory Society Annual Congress 2011 年 9 月 24 日 Amsterdam, Netherlands



2. Kohno N. Discovery and clinical application of KL-6, a circulating biomarker for interstitial lung diseases. 2013 European Respiratory Society Annual Congress 2013年9月7日 Barcelona Spain

3. Akita S, Hattori N, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Kohno N. Antitumor effect of a humanized antibody against aminopeptidase N in mouse tumor models 18th congress of the Asian Pacific Society of Respirology 2013年11月11日横浜

〔図書〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河野 修興 (Kohno, Nobuoki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授
研究者番号：80215194

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

服部 登(Hattori, Noboru)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・准教授

研究者番号：00283169

石川 暢久(Ishikawa, Nobuhisa)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・講師
研究者番号：90423368