

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591936

研究課題名(和文)食道扁平上皮癌に対する抗HER3抗体療法の開発

研究課題名(英文)Development of the anti-HER3 antibody therapy for esophageal squamous cell carcinoma.

研究代表者

河口 賀彦 (KAWAGUCHI, Yoshihiko)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：80402048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌におけるHER family (HER1, HER2, HER3) の関連を調べ、抗HER3抗体の食道扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果を検討した。その結果、HER3発現の異なる細胞株で検討を行ったが、細胞増殖抑制効果、ADCC活性、apoptosis誘導能においてHER3発現量とこれらに相関を認めなかった。また、HER1、HER2とHER3発現における関連を検討したが有意な相関は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Relations on expressions among HER family (HER1, HER2, HER3) and antitumor effect of anti-HER3 antibody against different HER3-expressed cell clones of esophageal squamous cell carcinoma were investigated. We found HER3 expressions did not correlated with powers of antiproliferative activity, ADCC or proapoptotic activity induced by anti-HER3 antibody in any cell clones. In addition, correlation between HER1/HER2 and HER3 expressions was not found.

研究分野：癌免疫学

キーワード：食道扁平上皮癌 抗体療法 HER3

## 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。手術、放射線化学療法などの集学的治療が行われ、治療成績の向上が認められつつあるものの、進行例においてはいまだ満足いく結果は得られていない。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。また、切除不能な進行・再発胃癌に対しても trastuzumab の有効性が示され、2011年3月より臨床応用されている。このように抗体療法は消化器癌へも適応は拡大されており、予後不良な食道扁平上皮癌においても、抗体治療の導入が期待されるものである。

HER-2 は、ヒト上皮増殖因子受容体 (human epidermal growth factor) family に属する膜貫通型受容体であり細胞増殖に関与する。それ自体のリガンドは同定されていないが、他の HER family (HER1, HER3, HER4) とヘテロダイマーを形成する。HER-2 の細胞内ドメインの tyrosine kinase がリン酸化されると、その後の下流のシグナル伝達が活性化され、細胞増殖に働くこととされ、HER-2 の過剰発現は乳癌の 20-30% に認められる。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ことを報告してきた (Mimura K, British Journal of Cancer, 2005)。

抗 HER-2 抗体 (Herceptin) はすでに乳癌において臨床応用されており、約 2-3 割の臨床効果が証明されている。その作用機序として

は、(1)腫瘍細胞における活性化シグナル伝達のブロック、(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 (Herceptin) 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 (Herceptin) 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)。すなわち、抗 HER-2 抗体 (Herceptin) の食道癌への臨床応用が可能であることが示唆された。

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 (Erbix) 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 とともに比較的高頻度に発現し、また、抗 HER-2 抗体 (Herceptin)、抗 EGFR 抗体 (Erbix) とともに、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。

近年、HER3 に対する解明もされており、HER2 とのヘテロダイマーを形成することにより強い活性をもち、HER2 による発癌には HER3 の存在が欠かせないと考えられている。このように HER family は互いにヘテロダイマーを形成し、細胞増殖活性の増強、細胞運動の増強、apoptosis 抑制に関与しているが、食道癌の抗体療法を成功させるには、食道癌における HER1, HER2, HER3 の関連を調べるのが重要で

あると考える。さらに現在注目されている HER3 の役割を解明することが、食道癌における HER3 を標的とした抗体療法の導入につながると思う。

## 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、本申請研究は、食道扁平上皮癌における HER family (HER1, HER2, HER3) の関連を調べ、抗 HER3 抗体の食道扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果、特にリンパ球を介した抗体依存性細胞障害機構 (ADCC) を *in vitro* で検討し、食道癌の新たな治療体系の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

食道扁平上皮癌細胞株の HER1、HER2、HER3 発現を測定し食道癌細胞株に対する抗 HER1 抗体、HER2 抗体、HER3 抗体の効果を、(1)細胞増殖抑制効果(MTT 法)、(2)apoptosis 誘導能 (Annexin/PI 法)、(3)ADCC 活性の項目につき、以下の方法により検討する。さらに HER1、HER2 と HER3 発現との相関に関して考察する。

## 4. 研究成果

食道扁平上皮癌細胞株である TE-1, TE-2, TE-3, TE-4, TE-5, KYSE30, KYSE50, KYSE70, KYSE110 の HER3 発現を、抗 HER3 抗体を用いてフローサイトメトリーにて測定した。その結果、KYSE30 が MFI 45.97 と最も高発現であった (図 1)。

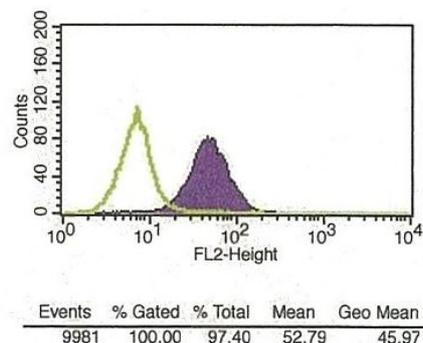
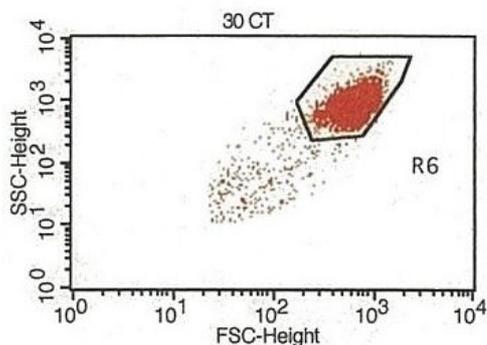


図 1. KYSE30 における HER3 発現

また KYSE50, TE-4 がそれに次いで高発現株であった。HER3 の中発現株は TE-3, TE-5, TE-2 であり、低発現株としては TE-1, KYSE110 であった。なお、KYSE70 はほとんど HER3 の発現を認めなかった (図 2)。

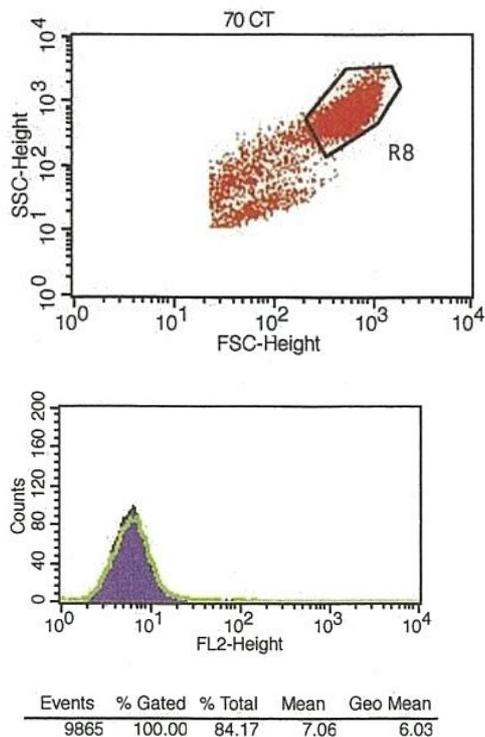


図 2. KYSE70 における HER3 発現

そこでこれらの食道扁平上皮癌細胞株に対する抗 HER3 抗体の効果を検討すべく MTT 法を用いて細胞増殖抑制効果を、Annexin/PI 法を用いて apoptosis 誘導能を測定したが抗 HER3 抗体による変化は認められず、抗 HER3 抗体の食道扁平上皮癌に対する ADCC 効果も有意な差を認めなかった。

さらに胃癌細胞株であるMKN7、NCI-N87、KATOIII、OE19、NUGC3のHER3発現を、抗HER3抗体を用いてフローサイトメトリーにて測定した。その結果、OE19がMFI 85.4と最も高発現であった。またKATOIII、NCI-N87がそれに次いで高発現株であった。低発現株としてはNUGC3、MKN7であった(図3)。

cell lines	HER3 expression
MKN7	23.2
NCI-N87	30.8
KATOIII	51.7
OE19	85.4
NUGC3	24.5

図3. 胃癌細胞株におけるHER3発現

また、食道癌細胞株と胃癌細胞株のHER1やHER2の発現を同時に測定し、これらとHER3発現との間に相関を認めるか検討を行ったが、特に統計学的相関は認めなかった(図4)。

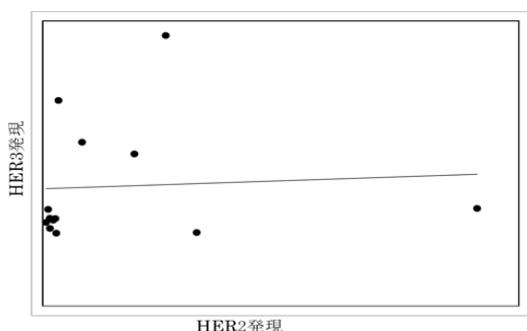


図4. 食道癌細胞株と胃癌細胞株におけるHER2とHER3発現の散布図

#### 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)

Izawa S, Mimura K, Watanabe M, Maruyama T, Kawaguchi Y, Fujii H,

Kono K. Increased prevalence of tumor-infiltrating regulatory T cells is closely related to their lower sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in gastric and esophageal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2013; 62(1): 161-70 (査読有り)

Shiraishi K, Mimura K, Izawa S, Inoue A, Shiba S, Maruyama T, Watanabe M, Kawaguchi Y, Inoue M, Fujii H, and Kono K. Lapatinib acts on gastric cancer through both antiproliferative function and augmentation of trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Gastric Cancer* 2013; 16(4): 571-80 (査読有り)

Inoue M, Mimura K, Izawa S, Shiraishi K, Inoue A, Shiba S, Watanabe M, Maruyama T, Kawaguchi Y, Inoue S, Kawasaki T, Choudhury A, Katoh R, Fujii H, Kiessling R, Kono K. Expression of MHC class I on breast cancer cells correlates inversely with HER2 expression. *Oncoimmunology* 2012; 1(7): 1104-10 (査読有り)

〔学会発表〕(計4件)

白石謙介 胃癌におけるHER2を標的とした分子標的治療の可能性について  
第20回日本消化器関連学会週間  
2012.10.10 神戸国際会議場(神戸市)

丸山孝教 乳癌におけるHER2発現と癌抗原特異的T細胞の効果について  
第20回日本乳癌学会学術総会 2012.6.28  
熊本市市民会館(熊本市)

井澤伸一郎 胃癌・食道癌微小環境におけるReactive Oxygen Speciesとregulatory T cell(T-reg)の関係  
第33回癌免疫外科研究会 2012.5.17  
新横浜プリンスホテル(横浜市)

白石謙介 胃癌における HER2 を標的とした分子標的治療の可能性について  
第 33 回癌免疫外科研究会 2012.5.17  
新横浜プリンスホテル（横浜市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河口 賀彦 (KAWAGUCHI, Yoshihiko)

山梨大学 総合研究部・助教

研究者番号：80402048