

令和元年6月17日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08372

研究課題名(和文) ADCCを介した腫瘍特異的抗体療法における制御因子の解明と抗がん作用増強への応用

研究課題名(英文) Investigation of control factors in tumor specific antibody therapy mediated by ADCC

研究代表者

阿部 真治 (ABE, Shinji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・准教授

研究者番号：00403717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍特異的抗体療法の主たる作用機序は抗体依存性細胞障害(ADCC)活性であり、様々な因子によってその活性誘導が制御されていると考えられているが、その詳細な機序はいまだ不明である。本研究において、抗体投与時に発現上昇が認められたS100A8/A9について検討を行ったところ、このS100A8/A9が抗体医薬の抗腫瘍効果に影響を与える可能性が認められた。また、抗がん剤であるペメトレキセドの処置によりポドプラニン発現への影響が認められたが、in vivoにおける検討では抗体医薬との併用で抗腫瘍効果の増強が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性悪性腫瘍では既存療法で十分な治療効果を与える事が非常に困難であり、腫瘍特異的抗体療法についてもさらなる改良が必要である。本研究により、抗体医薬の作用機序に関わる因子が同定され、in vitro および in vivo において抗体医薬により誘導される抗腫瘍効果への影響が認められた。この結果は学術的にも意義あるものであり、今後の腫瘍特異的抗体療法の作用機序の更なる解明につながると考えられる。また、抗体医薬の治療効果改善につながる成果であり、社会的に意義ある成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is critical mechanisms by which therapeutic antibodies provide their antitumor effects. However, detailed mechanisms of ADCC are still unknown. In this study, we demonstrated that S100A8/A9 is involved in antitumor effect of anti-podoplanin antibody. Furthermore, Expression of podoplanin in malignant mesothelioma cell was changed with pemetrexed. Therefore, we evaluated the antitumor effects of combined treatment using anti-podoplanin antibody based immunotherapy, and pemetrexed. However, administration of anti-podoplanin antibody and pemetrexed significantly reduced the tumor growth, compared with the antibody therapy or pemetrexed alone.

研究分野：臨床薬学

キーワード：抗体療法 ADCC 腫瘍免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床現場では悪性腫瘍に対して外科的切除、化学療法、放射線療法などが標準治療として行われている。一方で進行性の難治性悪性腫瘍ではこれらの既存療法で十分な治療効果をあげる事が非常に困難であり、腫瘍特異的免疫療法の開発が盛んに行われている。

抗体療法をはじめとする腫瘍特異的免疫療法では、個々の患者で標的とする癌抗原の発現が異なるため、治療標的の選択が治療法開発の上で最も重要である。ポドプラニン¹は型膜貫通糖蛋白質で、悪性胸膜中皮腫や神経膠芽腫、扁平上皮癌などの悪性腫瘍で特異的に高発現する。そして、血小板凝集を引き起こすことで、腫瘍の転移・浸潤に深く関与していることが知られている。これまでに我々はこのポドプラニンを標的とした特異的抗体である NZ-1 を樹立し、ラット NK 細胞を介した抗体依存性細胞障害 (antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC) 活性によって強い抗腫瘍効果を誘導すること、NZ-1 をもとに樹立したヒトキメラ型抗ポドプラニン抗体 NZ-8 はヒト NK 細胞を介した ADCC 活性を誘導し、ポドプラニン陽性ヒト悪性胸膜中皮腫に対して高い抗腫瘍効果を発現することを明らかにしている (*J Immunol.* 190:6239-6249, 2013.)。

ADCC 活性は癌細胞表面の癌抗原に結合した特異的抗体を免疫細胞が認識することによって起こる選択的な細胞障害活性である。臨床現場で用いられる抗体医薬は機能的観点から 3 クラスに分類されており、特に悪性腫瘍に対して用いられる抗体の中で ADCC 活性や補体依存性細胞障害活性 (CDC; complement dependent cytotoxicity) 活性を有する抗体は最も有望なクラスに分類されている (*Nat Drug Discov.* 10, 101-110, 2011)。²しかし、進行性悪性腫瘍に対してはその効果も限定的であり治療法の改善をさらに進めていく必要がある。

2. 研究の目的

抗体医薬の効果増強の手法として、フコース除去を行うなど抗体自体を改良することにより抗腫瘍効果の増強を図る試みが様々な研究グループによって積極的に研究されている。一方で、ADCC 活性誘導の過程には癌細胞、抗体、免疫細胞が密接に関連しており、様々な生体内因子がその制御に関わっていると考えられている。しかしその制御系の詳細については未だ明らかとなっていない。したがって ADCC 活性誘導に関連する因子を同定し、それらを制御することによって抗体医薬の治療効果はさらに増強できると考えられる。

本研究では我々が樹立した特異的抗ポドプラニン抗体を用いた実験系を活用し、ADCC 活性誘導に関連する各種因子を明らかにすることを目的として行った。

3. 研究の方法

本研究では、まずマイクロアレイ解析やフローサイトメトリーを用い、ADCC 活性誘導に関連する可能性がある候補因子の発現について検出を行った。次に検出された因子が ADCC 活性や免疫細胞の遊走に対してどのような影響をおよぼすか検討を行った。特異的抗ポドプラニン抗体を用いた ADCC 活性誘導に対する影響は ⁵¹Cr 遊離アッセイ³等により検討を行った。細胞遊走実験はトランスウェルアッセイにて検討を行った。さらにその制御因子に関連する各種試薬を用い、*in vivo* 実験系で ADCC 活性を介した抗腫瘍効果に対する影響について検討を行った。

本研究は、研究代表者と胸部悪性腫瘍の治療を専門とする呼吸器内科医師である研究分担者が協力して実施した。本研究において ADCC 活性の評価に使用する特異的抗ポドプラニン抗体は我々の研究グループの一員で研究協力者の加藤幸成教授 (東北大学大学院医学系研究科) が既に作成した抗体を使用した。本研究で行った実験の基本的な手技については既報の通りである (*Cancer Immunol Immunother.* 58, 967-976, 2009; *Lung Cancer.* 63, 23-31, 2009; *J Immunol.* 190:6239-6249, 2013)。

4. 研究成果

(1) ADCC に関連する因子の同定

抗体医薬による抗腫瘍効果誘導に関連する生体内因子を同定するために、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株を移植した SCID マウスモデルに抗ポドプラニン抗体 NZ-1 を投与し、摘出した腫瘍を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、抗体投与により 31 の遺伝子の高度発現上昇が認められた。これらのうち、免疫細胞遊走に関連する S100A8/A9 に関して、*in vitro* および *in vivo* の検討を行った。

また、がん抗原の発現量は抗体医薬の抗腫瘍効果に大きな影響を与える可能性があるため、悪性胸膜中皮腫に対して臨床で適応を持つペメトレキセドを処置し、ポドプラニン発現への影響について検討を行った。その結果、細胞障害を引き起こさない濃度においてもペメトレキセドの処置により、ポドプラニン発現が低下する傾向が認められた。さらに、免疫チェックポイント分子である PD-L1 の発現についてヒト悪性胸膜中皮腫細胞株を用いてフローサイトメトリーにて検討したところ、11 株中 3 株で PD-L1 の発現が認められた。

以上の結果より同定された免疫細胞の遊走、癌抗原発現、免疫制御系に関連する因子が ADCC 活性誘導に影響を与える可能性が考えられた。この中で、免疫細胞の治療標的部位への遊走は治療効果に大きな影響を与えることが予想できること、臨床では抗体医薬と抗癌剤の併用投与が行われる可能性は高く、併用により抗腫瘍効果の減弱が引き起こされることは難治性

悪性腫瘍の治療において大きな問題となることが考えられることから、本研究では以降、免疫細胞の遊走、癌抗原発現に関連する因子について *in vitro* および *in vivo* の検討を行った。

(2) *In vitro* 実験系における ADCC 活性および免疫細胞遊走への影響

抗体医薬による ADCC 活性誘導に影響を与えることが示唆された因子のうち、免疫細胞の遊走に影響を与える可能性がある S100A8/A9 について *in vitro* の検討を行った。⁵¹Cr 遊離アッセイにより検討を行った結果、S100A8/A9 の処置によっても悪性胸膜中皮腫に対する抗ポドプラニン抗体の ADCC 活性は変化しなかった。一方で、S100A8/A9 により ADCC 活性に関与する免疫細胞の遊走を亢進する傾向が認められた。

ポドプラニン発現を減弱させたペメトレキセドについても ADCC 活性への影響について *in vitro* で検討を行った。ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株にペメトレキセドを処置し、抗ポドプラニン抗体による ADCC 活性への影響について測定を行った。その結果、ポドプラニン発現に影響を与える濃度のペメトレキセド処置によっても、抗ポドプラニン抗体による ADCC 活性にはほとんど変化が認められなかった。

(3) *In vivo* 実験系における抗体医薬により誘導された抗腫瘍効果への影響

In vitro において、S100A8/A9 が免疫細胞の遊走に影響を与える可能性が示唆されたため、悪性胸膜中皮腫移植 SCID マウスモデルに対して S100A8/A9 と抗ポドプラニン抗体 LpMab-21 の併用投与を行い、その抗腫瘍効果について検討を行った。その結果、有意差は無かったものの、S100A8/A9 と抗ポドプラニン抗体の併用投与により抗腫瘍効果が増強される傾向が認められた。(図1)

ポドプラニンの発現に影響を与える可能性が示唆されたペメトレキセドについても、悪性胸膜中皮腫移植 SCID マウスモデルを用い、抗ポドプラニン抗体との併用効果について検討を行った。その結果、ペメトレキセド併用投与によって抗体医薬の抗腫瘍効果の減弱は認められず、それぞれの単独投与と比較して抗腫瘍効果の増強が認められた。

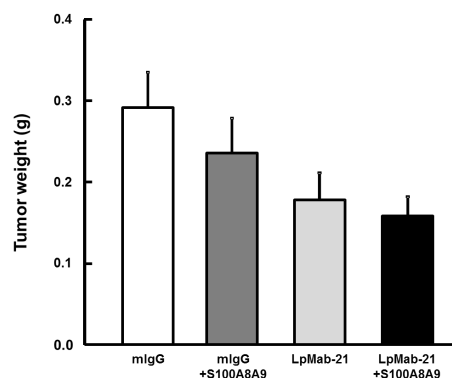


図1 S100A8/A9 と抗ポドプラニン抗体の併用効果

以上の結果より、今回検討を行った各種因子は ADCC 活性誘導を介した抗体医薬の抗腫瘍効果増強に大きく寄与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Itai S, Ohishi T, Kaneko MK, Yamada S, Abe S, Nakamura T, Yanaka M, Chang YW, Ohba SI, Nishioka Y, Kawada M, Harada H, Kato Y. Anti-podocalyxin antibody exerts antitumor effects via antibody-dependent cellular cytotoxicity in mouse xenograft models of oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 9:22480-22497, 2018. DOI: 10.18632/oncotarget.25132 (査読あり)

Kaneko MK, Yamada S, Nakamura T, Abe S, Nishioka Y, Kunita A, Fukayama M, Fujii Y, Ogasawara S, Kato Y. Antitumor activity of chLpMab-2, a human-mouse chimeric cancer-specific antihuman podoplanin antibody, via antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Med*. 6:768-777, 2017. DOI: 10.1002/cam4.1049 (査読あり)

Kaneko MK, Nakamura T, Honma R, Ogasawara S, Fujii Y, Abe S, Takagi M, Harada H, Suzuki H, Nishioka Y, Kato Y. Development and characterization of anti-glycopeptide monoclonal antibodies against human podoplanin, using glycan-deficient cell lines generated by CRISPR/Cas9 and TALEN. *Cancer Med*. 6:382-396, 2017. DOI: 10.1002/cam4.954 (査読あり)

[学会発表](計 8 件)

和泉俊尋, 阿部真治, 縣寛昌, 後河内美紗, 佐藤智恵美, 田中朋子, 久米哲也, 加藤幸成, 西岡安彦: 悪性胸膜中皮腫に対する抗ポドカリキシン抗体の ADCC 活性の検討 日本薬学会第 139 年会 (千葉), 2019 年 3 月.

縣寛昌, 阿部真治, 和泉俊尋, 栗木富美, 松井朋, 佐藤智恵美, 田中朋子, 久米哲也, 加藤幸

成, 西岡安彦: マウス抗マウスポドプラニン抗体による 悪性胸膜中皮腫に対する ADCC 活性および CDC 活性の検討 日本薬学会第 139 年会 (千葉), 2019 年 3 月.

山田慎二, 金子美華, 国田朱子, 阿部真治, 板井俊介, 深山正久, 西岡安彦, 加藤幸成: がん特異的 podoplanin を認識するヒトキメラ改変モノクローナル抗体 (chLpMab-23) の抗腫瘍効果および安全性 第 77 回日本癌学会総会 (大阪), 2018 年 9 月.

板井俊介, 大石智一, 金子美華, 山田慎二, 阿部真治, 西岡安彦, 川田学, 原田浩之, 加藤幸成: 口腔扁平上皮癌における抗ポドカリキシン抗体の ADCC による抗腫瘍効果 第 77 回日本癌学会総会 (大阪), 2018 年 9 月.

張耀文, 国田朱子, 金子美華, 板井俊介, 山田慎二, 大石智一, 阿部真治, 西岡安彦, 川田学, 深山正久, 加藤幸成: ポドカリキシンを標的としたヒトキメラ型抗体 chPcMab-47 によるヒト大腸がん移植片モデルでの抗腫瘍効果の検討 第 76 回日本癌学会総会 (横浜), 2017 年 9 月.

山田慎二, 金子美華, 国田朱子, 大石智一, 阿部真治, 張耀文, 板井俊介, 川田学, 深山正久, 西岡安彦, 加藤幸成: がん特異的 podocalyxin を認識するヒトキメラ改変モノクローナル抗体 (chPcMab-6) の抗腫瘍効果および安全性 第 76 回日本癌学会総会 (横浜), 2017 年 9 月.

和泉俊尋, 阿部真治, 荻野広和, 後東久嗣, 埴淵昌毅, 加藤幸成, 西岡安彦: 悪性胸膜中皮腫同所移植マウスモデルに対する新規マウス抗ポドプラニン抗体 LpMab-21 による抗腫瘍効果の検討 第 21 回日本がん分子標的治療学会 (福岡), 2017 年 6 月.

恒益知宏, 阿部真治, 和泉俊尋, 佐藤智恵美, 岡田直人, 加藤幸成, 西岡安彦, 川添和義: 新規マウス抗 PDPN 抗体の in vitro における ADCC 活性の検討 第 55 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (岡山), 2016 年 11 月.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 西岡 安彦

ローマ字氏名: (NISHIOKA, Yasuhiko)

所属研究機関名: 徳島大学

部局名: 大学院医歯薬学研究部 (医学域)

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 70274199

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 加藤 幸成

ローマ字氏名: (KATO, Yukinari)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。