

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590170
 研究課題名（和文） ライブイメージングを用いた各種抗体医薬の効果予測系の確立と予後因子の探索
 研究課題名（英文） The establishment of the method for prediction of therapeutic antibody and the search of the prognostic factors
 研究代表者：
 三嶋 雄二（MISHIMA YUJI）
 財団法人 癌研究会・癌化学療法センター・臨床部・研究員
 研究者番号：10442550

研究成果の概要：

抗体医薬は、副作用が少なくがんの治療効果を高める反面、治療費が高額になる傾向があり、医療経済学の観点から、効果の期待のできない患者に対する投与は避けることが重要である。そのためには治療効果を正確に予測する技術が必要とされている。本課題では、各種抗体医薬の効果予測技術を確立することを目的とし、顕微鏡下で生きたがん細胞の抗体医薬に対する感受性を評価する方法を確立することで、迅速かつ被験者への負担の少ない診断法を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
平成 20 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：抗体医薬、感受性予測、生細胞イメージング、共焦点顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗体療法は、分子標的治療の分野において最も臨床への応用が進んだ治療ストラテジーであり、国内においても腫瘍に対する抗体療法として、rituximab、trastuzumab の 2 抗体医薬が承認され、それぞれ非ホジキンリンパ腫、乳がんの治療に使用が開始された。また、転移性大腸がんに対する治療薬である Bevacizumab が承認される見通しであった。

(2) 米国では当時 15 以上のモノクローナル抗体ががん治療などに使われ、少なくとも 100 を超えるモノクローナル抗体の Phase I・II・III の臨床試験が行われていたことから、我

が国においても、がん治療への抗体医薬の応用が加速することが予測されていた。

(3) 一般的に腫瘍抗体療法は、ターゲットに対する高い特異性により、従来の抗がん剤に比べて副作用が少なく、化学療法の用量を減ずることなく併用が可能であることから、高い薬効を得ることが期待される。しかしながらモノクローナル抗体製剤の製造には細胞培養を必要とするため、化学合成医薬品と比較すると製造コストが著しく高額であり、高い薬価が設定されていることから、医療費の増大が懸念されていた。

(4) さらに、抗体医薬に対する耐性の問題も

指摘され、対費用効果が著しく低い症例も存在した。しかしながら抗体治療耐性の機序は完全には解明されておらず、また明確な予後予測マーカーの報告はほとんどなかった。

2. 研究の目的

(1) 抗体医薬の各作用機序に対し、低侵襲(できるだけ生体を傷つけないこと)で、迅速に評価する方法を確立する。そのためには極めて少ない検体量での評価法が必須であり、本課題ではこれを確立することを目的とする。

(2) (1)で確立した評価法が、抗体医薬治療や抗体医薬併用化学療法に対する治療反応や、予後を予測する可能性について検証する。

(3) さらに各作用機序と治療経過の解析を様々なパラメータを用いて評価することで、耐性機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) 本研究を推進するための中核技術であるごく微量の臨床標本で抗体医薬への感受性を評価する方法を、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた生細胞イメージング法を用いることで確立する。

(2) 生細胞イメージング法により確立めざす抗体医薬の作用機序は

① 補体依存性細胞傷害活性 complement dependent cytotoxicity (CDC, 対象の抗体医薬; rituximab)、

② 抗体依存性細胞傷害活性 antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC, 対象の抗体医薬; rituximab, trastuzumab, cetuximab)

③ 血管様チューブ形成活性 capillary tube formation (対象の抗体医薬; bevacizumab) とする。

(3) (1)~(2)で確立した評価法を使用して、抗体治療開始前、あるいは治療中の患者由来腫瘍細胞や血清検体を評価し、治療に対する反応および予後との相関を解析することで、効果予測マーカー、耐性機序の探索を実施する。具体的には

① rituximab の適応症例であるB細胞性悪性リンパ腫が疑われる症例で、書面による同意を得られた被験者の、確定診断のために採取したリンパ組織や血清検体の一部を使用し、蛍光標識 rituximab、細胞死識別蛍光色素等を用いて CDC 感受性の評価、定量化を実施する。

② 常に安定した ADCC 活性を示すナチュラルキラー細胞株を樹立し、①の方法に準じて採取した臨床検体を用いて、ADCC に対する感受性、影響因子を探索する。

③ ①-②で取得したデータと臨床経過を相互的に評価し、両者の相関性と、予後因子あるいは治療効果予測因子の洗い出しを実施する。

4. 研究成果

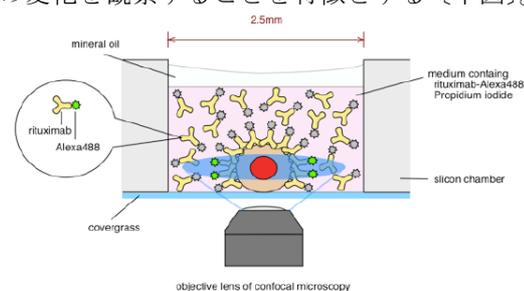
(1) 本研究において、研究代表者が所属する施設がすでに所持していた共焦点レーザー走査型顕微鏡を有効に利用して、抗体医薬の様々な作用機序を極めて少ない検体量で解析する方法を実現した。確立した定量法は

① rituximab に対する CDC 感受性評価法

② rituximab, trastuzumab, cetuximab に対する ADCC 活性評価法

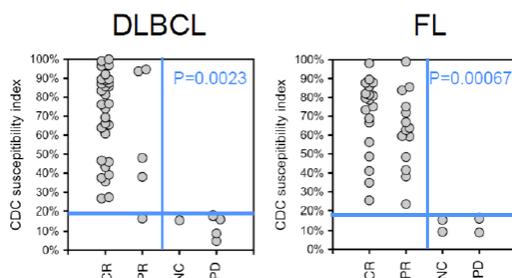
③ bevacizumab に対する血管様チューブ形成活性の評価法

である。これらの評価法に共通する特徴として、温度(場合によっては湿度、二酸化炭素濃度)を調整した顕微鏡ステージにおいて、微量の腫瘍生細胞と蛍光標識抗体医薬を添加し、タイムラプス法(一定時間おきに画像を取得する手法)で、細胞の機能や生死などの変化を観察することを特徴とする〔下図〕。



これにより、従来の感受性評価法において必要とされる細胞数を1/100以下に減ずることが可能となった。本解析手法は抗体医薬に限らず、臨床検体を用いた多くの感受性評価への応用も可能であり、低侵襲臨床評価に有用な解析技術であると考えられる。

(2) rituximab 併用化学療法における、治療開始前患者由来腫瘍細胞の CDC 感受性と治療反応の相関を解析した。総症例数 357 例について CDC 感受性を評価し、リンパ腫サブタイプごとの CDC 感受性プロファイルを解析し、さらに実際に rituximab 併用化学療法を受けたびまん性大細胞リンパ腫 51 例、ろ胞性リンパ腫 45 例について、CDC 感受性と治療反応の相関を解析した結果、両者の間には統計的に有意な相関関係を認めた。ROC 曲線解により算出した CDC 感受性カットオフ値(18%)を用いることで、治療反応群と治療不応群を極めて正確に予測し得ることを見いだした〔下図〕。



この解析結果は治療開始前に rituximab 併用化学療法が無効例を迅速に選別できる可能性を示す世界で最初の発見であり、また CDC が臨床での抗腫瘍作用に大きく寄与していることを示す最初の報告である。

(3) (2)の解析症例について、CDC 感受性、治療反応に影響を与える因子の洗い出しを実施し、rituximab 耐性機序の探索を行った。多変量ロジスティック解析を実施した結果、CDC 感受性と治療反応に影響を与える因子として rituximab の標的分子 CD20 の細胞膜での発現量が選択された。さらに、CD20 抗原の発現量が低下させ、それに伴う rituximab 治療に対する耐性獲得機序として、CD20 遺伝子の C 末端欠失型突然変異が存在することを見いだした。本遺伝子変異はリンパ腫患者の 8.0%に存在し、他群と比較して有意に無病生存期間が短いことが判明した。

(4) ADCC アッセイは末梢血由来の単核球あるいはそれから精製した細胞をエフェクター細胞に供するのが定法であるが、エフェクター細胞に由来する細胞傷害活性のばらつきが大きく、異なるエフェクター細胞を使用したアッセイ間におけるデータの比較が難しい。本研究においてこのデメリットを克服するアッセイ方法を確立したことにより、様々な条件下における ADCC 活性を評価することが可能になり、ADCC は生体内では、補体系と競合し、強い CDC が惹起される条件では ADCC は著明に抑制されていることを見いだした。

(5) (4)の発見を検証すべく、リンパ腫患者血清の CDC 誘導能と ADCC 阻害活性を評価したところ、びまん性大細胞リンパ腫、ろ胞性リンパ腫の患者血清で両者間に有意な相関関係が認められた。これは、ADCC 活性を強化した抗体医薬の創薬において重要な知見を提供するものであると考えられる。

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 8 件)

Mishima Y, Sugimura N, et al An

Imaging-Based Rapid Evaluation Method for Complement-Dependent Cytotoxicity Discriminated Clinical Response to Rituximab-Containing Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*; 15(10) 3624, 2009, 査読有り

Terui Y, Mishima Y, et.al Identification of CD20 C-terminal deletion mutations associated with loss of CD20 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Clinical Cancer Research*; 15(7) 2523, 2009, 査読有り

Ennishi D, Mishima Y, et.al. CD5 expression is potentially predictive of poor outcome among biomarkers in patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP therapy. *Annals oncology*; 19(10), 2008, 査読有り

三嶋雄二、嶋清彦 「がんトランスレショナルリサーチにおけるバイオイメージングの役割」 *がん分子標的治療*; 6(2) 92, 2008, 査読無し

三嶋雄二、松阪諭、嶋清彦 「予後と Circulating Endothelial cells」 *Cancer Frontier*; 10, 2008, 査読無し

三嶋雄二、嶋清彦 「in vivo 光イメージング」 *病理と臨床*; 25(6), 526, 2007, 査読無し

三嶋雄二 「がんトランスレショナルリサーチにおけるバイオイメージングの役割」 *がん分子標的治療* 6(2) 2008, 査読無し

三嶋雄二 「抗体医薬の補体依存性、抗体依存性殺細胞効果」 *Pharma Medica*; 25(3), 9 2007, 査読無し

[学会発表] (計 8 件)

Yuji Mishima, Establishment of reproducible ADCC assay system, Mabthera Expert investigator Forum, 2007/4/20-22, Lisbon, Portugal

三嶋雄二、Establishment of reproducible ADCC assay system、第 66 回日本癌学会総会、2007/10/4-6

Yuji Mishima, Establishment of reproducible ADCC assay system, Molecular Targetand Cancer Therapeutics, 2007/10/22-26, San Francisco, USA

三嶋雄二、ライブセルイメージングを用いた抗体医薬の予後予測システムの開発、ダイアローグイメージングセミナー、2007/7/11-12、東京

なし

三嶋雄二、ADCC アッセイシステムの確立とADCC 抵抗性因子の探索、がん分子標的治療研究会総会、2008/6/26-27、東京

(3) 連携研究者
なし

三嶋雄二、治療前 CDC 感受性評価法の確立と rituximab 治療効果予測における有用性、第 70 回日本血液学会、2008/10/10-12、京都

Yuji Mishima, Prediction of clinical response of rituximab containing chemotherapy using newly established live-cell-imaging procedure for estimating CDC susceptibility. Molecular Targeted Cancer Therapeutics, 2008/10/21-24, Geneva, Switzerland

三嶋雄二 Establishment of an assay system for ADCC activity and search for factors that affect ADCC activity, 第 67 回日本癌学会総会、2008 年 10 月 28-30 日、名古屋

〔図書〕(計 2 件)

三嶋雄二 畠清彦 がん分子標的治療研究実践マニュアル 金芳堂 「CDC, ADCC のアッセイ」 250-, 2009

三嶋雄二 がんの分子標的治療, 南山堂 「光イメージング」 248-, 2008

〔産業財産権〕○出願状況(計 2 件)

特願 2006-333331, PCT/JP2007/68723, 【抗体医薬感受性検査方法】

特願 2006-333331, PCT/JP2007/68723, 【Fc 受容体遺伝子導入 NK 細胞株、その製造方法、及び抗体依存性細胞傷害のアッセイ方法】

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三嶋 雄二

財団法人 癌研究会・癌化学療法センター・臨床部・研究員

研究者番号：10442550

(2) 研究分担者