

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670195

研究課題名(和文) ヒト化モノクローナル抗体の核内移行による新規分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Development of molecular targeting therapy using nuclear-transported humanized monoclonal antibody

研究代表者

山田 健人 (YAMADA, TAKETO)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：60230463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：CD26は広汎なヒトがんを発現している。ヒト化抗CD26抗体(Ab)でがん細胞を処理するとがん細胞の増殖抑制と共にCD26とAbは細胞質内から核内に移行した。クロマチン免疫沈降法にてCD26とPOLR2Aの転写調節領域が特異的に会合することを同定した。Abに抗がん分子Xを結合させたところ、X結合Abが、Abのみよりも極めて高効率にCD26依存性ながん細胞の増殖能の極度の低下を誘導した。一方、CD26を発現する正常ヒト内皮細胞やTリンパ球では、Ab核内移行はなく増殖抑制は認められなかった。X結合Ab-Xをマウスへ投与したところ、異種移植したヒトがんの増殖抑制能は、Abよりも強い効果が得られた。

研究成果の概要(英文)：CD26 is on cell surface of various types of cancers. It was shown humanized anti-CD26 monoclonal antibody(Ab) inhibited cancer cell growth and the Ab treatment induced nuclear translocation of both CD26 and YS110. In response to Ab treatment, it was revealed nuclear CD26 interacted with a genomic flanking region of POLR2A gene, a subunit of RNA polymerase II, using a chromatin immunoprecipitation assay. This interaction with nuclear CD26 and POLR2A gene consequently led to transcriptional repression of the POLR2A gene, resulting in retarded cell proliferation of cancer cells. Anti-cancer reagent X was conjugated with Ab, as a result X-Ab inhibited severely cancer cell growth as compared with Ab only. It was revealed that Ab or X-Ab did not impair cell growth of normal human endothelial cell and T lymphocyte with CD26 expression. Xenografted human carcinomas were reduced significantly by X-Ab treatment as compared with Ab treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：癌 トランスレーショナルリサーチ 病理学 分子標的療法

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、これまでに広汎なヒトがんにおいて、CD26 が細胞表面に発現していることを見出し、報告してきた(Clin Cancer Res 13:4191,2007, Oncol Rep.26:1369,2011, Clin Cancer Res 18:1447, 2012, Pathol Int, submitted)。特に肺腺癌、中皮腫、前立腺癌、肝癌、腎癌では、それぞれ 80, 91, 95, 88, 65% の症例で CD26 が陽性であった。CD26 は、正常組織では T リンパ球の一部や血管内皮細胞、メラノサイトなどで発現が見られるが、がんの場合、より広汎ながん種において高い発現が認められる。そこで、これまでに独自にヒト化抗 CD26 モノクローナル抗体(以下 Ab)を開発し、この Ab が CD26 陽性がん細胞に対して、抗がん作用を発揮すること、さらにこの抗がん作用は、直接的効果としては、p21/CIP1 や p27/KIP1 発現を抑制し細胞周期を停止させることを明らかにしてきた(Clin Cancer Res 13:4191,2007, Keio J Med 60:37,2011)。また、この CD26 が、がん細胞の核内に存在することを見出した(Cancer Cell Int.,2009)。

2. 研究の目的

がんの分子標的療法は有望な治療法であるが、さらにその効率と安全性を高めるために、がん細胞の核内に特異的に移行する Ab を用いた、独自の新規分子標的療法の確立を目指す。ヒトがんにおいては、広範囲のがん種において、その細胞膜表面に CD26 が発現しているが、研究代表者らは、この CD26 が核内に存在することを見出した(Cancer Cell Int.,2009)。そこで、本 Ab が、細胞表面 CD26 に反応した後、CD26 と Ab がどのように核内に移行するかを明らかにし、さらに Ab に抗がん作用を有する低分子量化合物を結合させることで、これらの分子をがん細胞の核内へ誘導し、副作用を抑えつつ、効率の良い新たながんの分子標的療法の開発を試みた。

本研究では、核内で核酸合成・代謝を阻害あるいは核酸と結合することで抗がん作用を発揮する低分子量化合物を Ab へ結合させ、これらの結合分子を Ab により核内に移入し、抗がん分子を核内で効率よく作用させるといったユニークな新規分子標的薬の開発を目指すものである。抗がん剤としては、アルキル化薬、白金化合物、代謝拮抗薬、トポイソメラーゼ阻害薬、微小管阻害薬、抗腫瘍性抗生物質を、Ab へ化学結合させ、その精製した Ab-化合物結合分子について、in vitro および in vivo での抗がん作用と毒性を検証する。

3. 研究の方法

(1) CD26 および Ab の核移行の解析

GFP タグの付いた野生型(GFP-CD26_{wt})並びに細胞外領域欠損体(GFP-CD26₁₋₆₂₉)発現ベクターを作成し、CD26 陰性株 HeLa 細胞に遺伝子導入したのち、これら GFP 融合体の局在を共

焦点顕微鏡で観察した。CD26 陽性悪性中皮腫細胞株 JMN を免疫不全マウスの皮下に移植した後、移植マウスの形成した腫瘍に Ab を投与し、Ab 並びに CD26 の核内での局在について共焦点顕微鏡を用いた蛍光染色法により観察した。対照としてヒト IgG1 を投与したマウスの腫瘍を用いた。さらに Ab 処理した JMN 細胞を用いてクロマチン免疫沈降(ChIP)クローニングを行い、CD26 結合 DNA 配列を探索した。

(2) 抗がん作用を有する低分子量化合物の Ab への結合とその効果

アルキル化薬(cyclophosphamide, procarbazine)、白金化合物(carboplatin)、代謝拮抗薬(新規化合物X, alpha-amanitin)、トポイソメラーゼ阻害薬(etoposide)、微小管阻害薬(maytansinoid, vindesine)、抗腫瘍性抗生物質(calicheamicin)について、薬剤がアミノ基をもつ場合は、GMB 試薬と反応させ、マレイミド基を導入、あるいはSPDP 試薬と反応させ、ジチオピリジニル基を導入し、これにAbのアミノ基にTraut's 試薬を反応させてチオール化させた抗体を反応させ、チオール基のマレイミド基への高効率な求核反応や、ジチオピリジニル基とのジスルフィド交換反応を利用して結合分子を得た。あるいは薬剤のアミノ基を予めサクシニル化しておき、これをN-succinimideで活性化させ、縮合剤を用いてAbのアミノ基とアミド結合で連結させる。薬剤が水酸基をもっている場合は、薬剤の水酸基に

N-methyl-N-(methyl di thiopropanoyl)-L-alanine を反応させた後、ジチオスレイトールで還元してチオール基をもった化合物にし、マレイミド基やジチオピリジニル基をもった Ab と反応させ結合分子を得た。得られた結合分子は、アフィニティカラムにて IgG1 として精製した。精製した結合分子について、血中のエステラーゼ等で分解されるか、その安定性を試験管内およびマウス体内で検討した。また細胞内での抗体と薬剤の分離能について細胞分画法により検証し、分離が悪い場合には、水酸基にスペーサーを介して Ab を結合させた。

Ab と抗がん剤を結合させた分子の抗がん作用について試験管内で検討した。使用した培養細胞は、ヒトがん細胞としては、肝癌細胞株 Li-7(CD26 陰性)とそのヒト CD26 発現ベクター導入 Li-7(CD26 陽性)、中皮腫細胞株 JMN(CD26 陽性)、中皮腫細胞株 MSTO(CD26 陰性)とそのヒト CD26 発現ベクター導入 MSTO(CD26 陽性)(順天堂大学・森本幾夫博士より供与)、T 細胞白血病細胞株 Jurkat(CD26 陰性)とそのヒト CD26 発現ベクター導入 Jurkat(CD26 陽性)を用い、正常ヒト細胞としては、市販のヒト臍帯静脈内皮細胞(CD26 陽性)、線維芽細胞(CD26

陰性)および申請者の末梢血Tリンパ球(CD26一部陽性、一部陰性)を用いた。これらの培養細胞に、Abと抗がん剤を結合させた分子、抗がん剤のみ、Abのみ、陰性対照(市販ヒトIgG1)を各種の濃度で添加し、48時間後の細胞増殖能および細胞死について、各種キットおよびフローサイトメーターにより定量解析した。また同様の実験を行い、抗体添加0-24時間での各種細胞分画(細胞膜、細胞質、核)でのAbの細胞内分布を生化学的に定量解析した。試験管内での毒性については、上記の正常細胞での細胞増殖能および細胞死で検討した。

動物モデルを用いることで、Abと抗がん剤を結合させた分子の抗がん作用について生体内で検討した。使用する培養細胞は、ヒトがん細胞としては、肝癌細胞株Li-7(CD26陰性)とそのヒトCD26発現ベクター導入Li-7(CD26陽性)、中皮腫細胞株JMN(CD26陽性)、中皮腫細胞株MST0(CD26陰性)とそのヒトCD26発現ベクター導入MST0(CD26陽性)(順天堂大学・森本幾夫博士より供与)、T細胞白血病細胞株Jurkat(CD26陰性)とそのヒトCD26発現ベクター導入Jurkat(CD26陽性)を用いた。これらの培養細胞を、免疫不全マウス(NOD/Shi-scid, IL-2 receptor gamma null (NOG))へ皮下、胸腔内あるいは静注移植し、一定期間観察後、Abと抗がん剤を結合させた分子、抗がん剤のみ、Abのみ、陰性対照(市販ヒトIgG1)を一定の濃度で計8回経静脈的に投与し、投与終了後、14-21日で腫瘍あるいは臓器を摘出し、その腫瘍重量、径について計測し、病理組織学的解析によりMIB-1 indexやTUNEL法により、細胞増殖能や細胞死について定量解析した。また摘出した腫瘍において各種細胞分画(細胞膜、細胞質、核)での抗体の細胞内分布を生化学的に定量解析した。毒性については、上記のマウスの全身を解剖し、病理学的に検索した。

4. 研究成果

(1) CD26 および Ab の核移行の解析

GFP-CD26_{wt}を導入した細胞ではAbとの共局在がAb刺激後30分以内に核内で検出されたが、GFP-CD26₁₋₆₂₉を導入した細胞においては結合体、Abいずれの核局在も確認できなかった。また同様の結果がJMN細胞を用いた実験においても得られたことから、Abは積極的に核内に移行するのではなく、CD26と会合し、CD26の核移行を調節することで結果的に核内に移行している可能性が示唆された。CD26陽性悪性中皮腫細胞株JMNを免疫不全マウスの皮下に移植した後、移植マウスの形成した腫瘍にAbを投与したところ、Ab並びにCD26の核内での共局在が共焦点顕微鏡を用いた蛍光染色法により観察された。一方で、コントロールIgG1を投与した腫瘍ではCD26の核誘導が見られなかったことから、AbとCD26の核

局在が生体内においても動的に起こることが示された。Ab処理したJMN細胞を用いてChIPクロニングを行い、CD26結合DNA配列を探索したところ、RNA polymerase IIサブユニットであるPOLR2Aのエンハンサー領域CAS162が同定され、ゲルシフトアッセイの結果から、CD26とこの領域との結合がAbにより増強されることが明らかとなった。さらにCAS162制御下のルシフェラーゼ活性がAb処理によって影響を受けるかどうかを検討したところ、CAS162-reporter遺伝子を導入したJMN細胞のルシフェラーゼ活性はAb処理によってIgG処理細胞と比較して有意に減少した。この結果と関連して、中皮腫モデルマウス腫瘍細胞のPOLR2A発現はAb投与によって減少することが明らかになった(図1)。

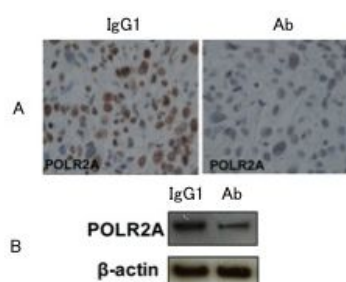


図1 異種移植されたヒト中皮腫腫瘍組織におけるPOLR2A発現。Ab投与群では核内POLR2Aの低下が見られる(A:免疫染色、上段、B:ウエスタンブロット、下段)

(2) 抗がん作用を有する低分子量化合物の Ab への結合とその効果

アルキル化薬、白金化合物、代謝拮抗薬、トポイソメラーゼ阻害薬、微小管阻害薬、抗腫瘍性抗生物質とAbの化学的結合を行った。この中で効率よく結合、精製が可能であり、化学修飾後も抗がん作用に低下が見られなかった代謝拮抗剤Xを結合させたAbについて研究を進めた。X-Abを精製後にCD26陽性がん細胞(ヒトCD26発現ベクター導入肝癌細胞株Li-7、中皮腫細胞株JMN、ヒトCD26発現ベクター導入MST0、ヒトCD26発現ベクター導入Jurkat)を用いて細胞増殖能および細胞死について、各種キットおよびフローサイトメーターにより定量解析した。対照として、肝癌細胞株Li-7(CD26陰性)、中皮腫細胞株MST0(CD26陰性)、T細胞白血病細胞株Jurkat(CD26陰性)を用いた。その結果、新規代謝拮抗剤Xを結合させたAb(X-Ab)が、Abのみよりも極めて高効率にCD26依存性にヒト中皮腫細胞JMNの細胞死を誘導し、増殖能の極度の低下を示した(図2A)。一方、CD26を発現する正常ヒト内皮細胞やTリンパ球では、同じAb-X濃度での増殖抑制や細胞死誘導は認められなかった。またこれらの効果は、X処理を単独で行う場合の約1/5000~1/10000の濃度で示された。さらに、Ab-X結合分子がAb同様に、がん細胞核へ移行する

ことが免疫電子顕微鏡的観察および共焦点レーザー顕微鏡観察で明らかとなった。またAb-X結合分子をマウスへ投与したところ、体内でのAb-X結合分子の半減期はAbとほぼ同様であり、異種移植したヒトがん(中皮腫、腎癌、リンパ腫)の増殖抑制能は、Abよりも強い効果が得られた(図2B)。

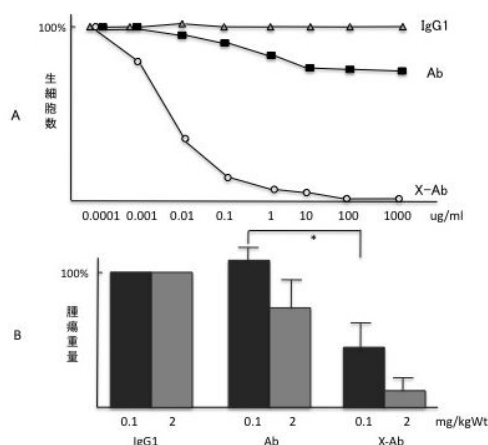


図2 X-Abのヒト中皮腫細胞への効果
A X-AbはAb単独よりも試験管内での強い増殖抑制能が見られる
B ヒト中皮腫細胞の異種移植において、X-Abは低用量(0.1mg/kg体重)で腫瘍抑制効果が得られる(* p<0.01)

本研究課題で用いたAbは、がん細胞表面に反応してから速やかに1時間以内で核内へ移行することから、がん細胞の外部から核へ物質を輸送するために用いることが期待される。また、ヒト内皮細胞やTリンパ球のような正常細胞では、この抗体の核内移行がほとんど見られないことから、がん細胞特異的に抗がん剤の核内への輸送が行える可能性があることも利点である。さらに本Abは、その抗原であるCD26がヒトがんでは広範囲のがんで発現していることから、治療対象となりうるがん種が多く、汎用性に優れている。抗体療法は、分子標的療法の中でも発展が期待されているが、本研究課題で用いるヒト化抗CD26抗体は、核内移行だけでなく、細胞周期を抑制することでがん細胞の増殖を直接抑制する効果とともに、抗体依存性細胞傷害および補体依存性細胞傷害機構を介した免疫学的な抗がん作用もあることから、これらの様々な効果が相乗・相加作用となることが期待される。

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4件)

Hatano R, Yamada T, Matsuoka S, Iwata S, Yamazaki H, Komiya E, Okamoto T, Dang NH, Ohnuma K, Morimoto C Establishment of monoclonal anti-human CD26 antibodies

suitable for immunostaining of formalin-fixed tissue. Diagnostic Pathology 査読有(in press) 2014 9:30. doi: 10.1186/1746-1596-9-30.

Hattori Y, Du W, Yamada T, Ichikawa D, Matsunami S, Matsushita M A Myeloma Cell Line Established from a Patient Refractory to Thalidomide Therapy Revealed High-Risk Cytogenetic Abnormalities and Produced Vascular Endothelial Growth Factor. Blood Cancer J. 査読有 2013 3:e115.

doi: 10.1038/bcj.2013.13.

Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Yamada T, Morimoto C Prevention of acute graft-versus-host disease by humanized anti-CD26 monoclonal antibody. Br J Haematol. 査読有 2013 162:263-77.

doi: 10.1111/bjh.12378.

④Yamada K, Hayashi M, Madokoro H, Nishida H, Du W, Ohnuma K, Sakamoto M, Morimoto C, Yamada T Nuclear Localization of CD26

Induced by a Humanized Monoclonal Antibody Inhibits Tumor Cell Growth by Modulating of POLR2A Transcription. PLoS One. 査読有 2013 8:e62304.

doi:10.1371/journal.pone.0062304.

[学会発表](計2件)

Yamada T, Nishida H, Madokoro H CD26 Signaling Involves Human Functional Osteoclast Development 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月3-4日 神戸

山田健人、山田幸司、林 睦、西田浩子、間所裕子、坂元亨宇 ヒト化CD26モノクローナル抗体によるがん抗体療法とその分子機構 第102回日本病理学会総会 2013年6月6-8日 札幌

[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]

ホームページ等

http://www.keio-pathology.net/Yamada_gr.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 健人(YAMADA Taketo)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 60230463

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者

(4)研究協力者

林 睦 (HAYASHI Mutsumi)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：60327575