

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11276

研究課題名(和文) 癌をNK細胞へ抗原提示する抗体型分子標的治療薬セツキシマブの新たな治療戦略

研究課題名(英文) The new cancer therapy of cetuximab through ADCC activity by NK cells

研究代表者

小澤 重幸(OZAWA, SHIGEYUKI)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：40434394

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)：セツキシマブの抗腫瘍効果にNK細胞が関与するかどうか検討するため抗アシアロGM1抗体を用いて、マウスの体内のNK細胞を除去し検討した。セツキシマブはNK細胞を除いた群で効果が減弱する傾向はみられたものの、明らかな有意差を得ることはできなかった。ADCC測定キットを使用しセツキシマブとADCC活性の関連性を検討したがセツキシマブによるADCC活性は使用した細胞株では検出できなかった。おそらく使用した癌細胞はEGFRの発現量が少なかったため十分なADCC活性を検出できなかったと考えられた。以上のことから今後はADCC活性の研究にEGFRの発現量が多い癌細胞を使用し検討を行う必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To examine whether NK cells are involved in cetuximab's antitumor effect, we removed NK cells from mice using anti-asialo GM1 antibody (antibody that recognizes the glycolipid asialo GM1 expressed on the cell membrane of NK cells) and investigated the results. Although cetuximab tended to have a weaker effect in the group without NK cells, there was no clear significant difference. We investigated the correlation between cetuximab and ADCC activity using an ADCC measurement kit, but we were unable to detect cetuximab-induced ADCC activity in the cell lines we used. We think that perhaps the cancer cells we used had low levels of EGFR expression, which meant we were unable to detect sufficient levels of ADCC activity. Based on the above information, we feel it is essential to use cancer cells with high levels of EGFR expression for future research on ADCC activity.

研究分野：口腔外科

キーワード：CXCL14 ADCC 頭頸部扁平上皮癌 セツキシマブ

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の発達に伴い開発された分子標的治療薬は、現在、ほとんどの悪性腫瘍を網羅しており、薬剤によっては第一選択薬となっているものまで存在する。2012年3月19日にはセツキシマブ (EGFR を阻害する分子標的治療薬) が口腔外科領域にも適応拡大され、放射線治療や従来の抗癌剤と併用することで患者の生存期間の延長に成功を収めている。現在、口腔外科領域も含め、各分野でセツキシマブの研究は進められており、最も脚光を浴びている研究の1つとして、セツキシマブ投与前の評価判定となる分子の検索が挙げられる。現在、セツキシマブの抗腫瘍効果に影響する要因として、EGFR の下流に存在する遺伝子 (KRAS、BRAF、PI3KCA など) に変異があるかどうか最も有力視されており、セツキシマブの添付文書においても投与前に KRAS の遺伝子変異の有無を確認する重要性が記載されている。しかしながら必ずしも KRAS の遺伝子変異はセツキシマブの効果を反映しておらず、多くの研究者はジェネティクスな異常に焦点を絞り、未知なる遺伝子変異の検索を行っている。近年、決定的な遺伝子変異が見つからないこともあり、セツキシマブに抗体依存性細胞障害 (ADCC / antibody - dependent cell - mediated cytotoxicity (ウイルス感染した細胞などを消滅させる免疫機構で、抗体の Fc 部位を NK 細胞等が認識し、細胞障害を示す機構である。)) 活性が存在することについて報告されはじめた。

2. 研究の目的

これまでに我々は、癌細胞において EGFR シグナルがケモカインである CXCL14 の発現を抑制すること、CXCL14 の遺伝子発現を強制発現ベクターを用いて癌細胞に回復させると強力な抗腫瘍効果を示すこと、さらにはセツキシマブの抗腫瘍効果に関与することを見出した。我々がターゲットとする CXCL14 は NK 細胞活性を有することが報告されており、ADCC 活性をもつセツキシマブの抗腫瘍効果に関与する可能性が考えられた。そこで今回は、新たに見出されたセツキシマブの抗体依存性細胞障害作用 (NK 細胞への提示) と、EGFR シグナル遮断によって生じる CXCL14 の発現上昇 (NK 細胞の活性化) という、セツキシマブが有する2つの NK 細胞活性化作用に着目し、セツキシマブの抗腫瘍効果メカニズムの解明を目的とする。セツキシマブの抗腫瘍効果に関与する要因としては前述したように KRAS、BRAF、PIK3CA 等の遺伝子変異の有無が最も有力な説である。しかしながら、必ずしも変異の有無のみでは説明がつかず、既知の遺伝子変異が無くとも、セツキシマブに反応を示さない症例に出会う機会は多い。遺伝子変異の検出される症例が少ない頭頸部

癌において、セツキシマブ単剤では効果を示さず、放射線治療や従来の抗がん剤との併用を推奨されていることもその事象を意味する。このことから、遺伝子変異のみならず、いまだ解明されていないセツキシマブの抗腫瘍効果に関与する機構を明らかにすることは、新たなセツキシマブ投与前の評価因子の解明につながり、より良いテーラーメイド医療を患者に提供が可能となる。

3. 研究の方法

抗アジアロ GM1 抗体は NK 細胞の細胞膜上に発現している糖脂質のアシアロ GM1 を認識する抗体であり、マウスに投与することで、体内の NK 細胞を除去することができるため、NK 細胞の関与について検討することができる。この抗体を使用することで NK 細胞とセツキシマブによる抗腫瘍効果との関連性を調査できると考えを行った。

実験モデル例1：ヌードマウスにヒト由来癌細胞を移植し、抗アジアロ GM1 抗体投与後、セツキシマブの抗腫瘍効果を検討。セツキシマブの効果が、抗アジアロ GM1 抗体未処理群 > 抗アジアロ GM1 抗体投与群の場合、セツキシマブの抗腫瘍効果に NK 細胞が関与することが証明できる。また、ADCC 活性検出キットを用いてセツキシマブが頭頸部扁平上皮癌に対して ADCC 活性を有するかどうか検討を行った。CXCL14 が癌細胞に及ぼす影響について検討をするため、CXCL14 ノックアウト細胞を作成しマイクロアレイ解析を用いて網羅的に発現制御を及ぼす遺伝子の解析を行った。

4. 研究成果

アジアロ GM1 抗体を使用し NK 細胞を除いたことによって、移植した腫瘍の定着が顕著に良くなってしまった。結果としてセツキシマブ投与時の腫瘍サイズが異なってしまうセツキシマブによる抗腫瘍効果に NK 細胞が関与する傾向はみられるものの、明確な有意差を得ることはできなかった。セツキシマブによる ADCC 活性においても ADCC 活性測定キットを使用し検討したが、セツキシマブによる ADCC 活性は検出できなかった。検出できなかった原因として考えられたことは、使用した癌細胞の細胞膜上の EGFR の量が少なく、十分な ADCC 活性を検出できなかったことによると思われる。CXCL14 の癌細胞に及ぼす影響を検討するために行ったマイクロアレイ結果は、糖代謝、細胞の分化、神経疾患、腎機能などに関わる遺伝子が多く発現変動を示しており、今後、それらの疾患と CXCL14 の発現についての関連性を検討する必要があると考えられた。

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)

- Hata R, Yang X, Miyamoto C, Maehata Y, Ozawa S. Production and characterization of cancer resistant mouse: Toward development of molecular preventive medicine of cancer. *Seikagaku*. 査読有り 2015 Oct;87(5):591-6. Review.
- Kondo T, Ozawa S, Ikoma T, Yang XY, Kanamori K, Suzuki K, Iwabuchi H, Maehata Y, Miyamoto C, Taguchi T, Kiyono T, Kubota E, Hata R. Expression of the chemokine CXCL14 and cetuximab-dependent tumour suppression in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogenesis*. 査読有り 2016 Jul 11;5(7):e240. doi: 10.1038/oncsis.2016.43.
- Maeda T, Suzuki A, Koga K, Miyamoto C, Maehata Y, Ozawa S, Hata R, Nagashima Y, Nabeshima K, Miyazaki K, Kato Y. TRPM5 mediates acidic extracellular pH signaling and TRPM5 inhibition reduces spontaneous metastasis in mouse B16-BL6 melanoma cells. *Oncotarget*. 査読有り 2017 Sep 11;8(45):78312-78326. doi: 10.18632/oncotarget.20826. eCollection 2017 Oct 3.

〔学会発表〕(計 4 件)

- 生駒丈晴, 陽 暁艶, 小澤重幸, 鈴木健司, 岩淵博史, 前畑洋次郎, 畑隆一郎: Expression of the chemokine CXCL14 is a predictive biomarker for Cetuximab-dependent tumour suppression. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 新潟市, 2015.
- Hata R, Kondo T, Ozawa S, Ikoma T, Suzuki K, Iwabuchi H, Maehata Y, Miyamoto C, Yang X, Kubota E:

EXPRESSION OF THE CHEMOKINE CXCL14 IS A PREDICTIVE BIOMARKER FOR CETUXIMAB-DEPENDENT TUMOUR SUPPRESSION: 1st Nature Immunology - Cellular & Molecular Immunology Joint Conference: Inflammation, Stress and Immune Homeostasis, China, 2015.

Yang X, Ozawa S, Ikoma T, Suzuki K, Kanamori K, Kiyono T, Kubota E, Hata R. Expression of the chemokine CXCL14 is predictive biomarker for cetuximab-dependent tumour suppression. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016.

Kanamori K, Ozawa S, Ikoma T, Suzuki K, Iwabuchi H, Kobayashi M. Hypermethylation disturbed cetuximab-dependent tumour suppression in head and neck squamous cell carcinoma. 第 62 回(公社)日本口腔外科学会総会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 重幸 (OZAWA, Shigeyuki)
神奈川県立大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：40434394

(2) 研究分担者

近藤 忠稚 (KONDO, Tadanori)
神奈川県立大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：00587727

(3) 研究分担者

前畑 洋次郎 (MAEHATA, Yojiro)
神奈川県立大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：80410009

(4) 連携研究者

()

研究者番号：

(5) 研究協力者

()