

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10597

研究課題名（和文）がん患者エフェクター細胞を用いた脱フコシル化抗体のADCC活性解析

研究課題名（英文）Antibody-dependent cellular cytotoxicity with defucosylated monoclonal antibodies in patients with GI-tract cancer

研究代表者

中島 隆宏（Nakajima, Takahiro）

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：90567447

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ハーセプチンやリツキシマブなどの抗体製剤は、乳癌、胃癌、リンパ腫の治療体系の標準治療に組み込まれ、癌患者の予後向上に寄与してきた。しかし、その効果は依然として限局的であり、さらなる改善が急務である。

本研究では、消化管癌において、既存の抗体医薬に比し脱フコシル化抗体の有効性を示すことを目標とし、胃癌患者20名から末梢血リンパ球を分離し、脱フコシル化ハーセプチンと、脱フコシル化セツキシマブを用いたADCCを検討し、脱フコシル化抗体が、有意にADCCを増強させることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、消化管癌において、既存の抗体医薬に比し脱フコシル化抗体の有効性を示すことを目標とし、消化器癌患者20名から末梢血リンパ球を分離し、脱フコシル化ハーセプチンと、脱フコシル化セツキシマブを用いたADCCを検討し、脱フコシル化抗体が、有意にADCCを増強させることを突き止めた。この成果は、消化器癌領域において、抗体医薬の治療効果増強に大きく寄与し、癌治療の向上に役立つ。

研究成果の概要（英文）：Although herceptin and rituximab are a standard treatment for breast and gastric cancer and lymphoma, their efficacy is still limited. In this study, trastuzumab- and cetuximab-mediated ADCC by comparing defucosylated mAbs with conventional mAbs using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were performed. When the defucosylated mAbs were used instead of the conventional mAbs, the ADCC activities in the advanced cancer cases were almost comparable with those in early disease or healthy individuals. In conclusion, defucosylated therapeutic mAbs can enhance ADCC activities in patients with cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：ADCC 抗体治療 免疫治療

## 1. 研究開始当初の背景

ハーセプチンやリツキシマブなどの抗体製剤は、乳癌、胃癌、リンパ腫の治療体系の標準治療に組み込まれ、癌患者の予後向上に寄与してきた。しかし、その効果は依然として限局的であり、癌細胞が耐性を獲得するなど、さらなる改善が急務である。近年、抗体医薬において、抗体糖鎖からフコースを除去(脱フコシル化)すると、抗体依存性細胞障害活性(antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC)が大幅に増強することが示された。しかし、現在までに、消化管癌を対象とした臨床検体での細胞株と消化管癌患者末梢血単核球細胞を用いた検証はなされていない。本研究では、消化管癌において、既存の抗体医薬に比し脱フコシル化抗体の有効性を示すことを目標としている。さらに、癌患者におけるマクロファージやNK細胞といった免疫担当細胞の抑制状態を解明し、脱フコシル化抗体を用いることでその抑制状態を克服し得るかを研究する。

## 2. 研究の目的

消化管細胞株に対し、健常者NK細胞および消化管癌患者NK細胞を用いて通常抗体と脱フコシル化抗体でのADCCを検証する。さらに、癌患者症例では、ADCC活性の抑制が存在するのか、また、脱フコシル化抗体を用いることでその克服が可能かを検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) PBMCの収集

健常者および未治療消化管癌患者症例より血液サンプルを採取する。20-80歳の健常者および未治療消化管癌患者(食道癌、胃癌、結腸癌)に十分なインフォームドコンセントを行い、本研究への参加の同意を得る。末梢血採血を行い、Ficoll分離法にてPBMCを分離する。PBMCをエフェクター細胞としてADCC assayを行う。(Figure 2)

Figure. 2 全体の流れ



### (2) ADCCの測定・解析

ターゲットとなる癌細胞は、EGFR陽性株としてMKN28(胃癌細胞株)を、HER2陽性株としてMKN7(胃癌細胞株)を用いる。また、採取したPBMCのコントロールとしてK562(慢性骨髄性白血病細胞株)を使用する。培養した細胞を $5 \times 10^4$ 個/mlへ調整しU字底96wellプレートへ $50 \mu\text{l}$ ずつ分注する。抗体については、協和発酵キリン株式会社との共同研究協定締結に基づき、抗HER2抗体、抗EGFR抗体それぞれの脱フコシル型、通常型の無償供与を受ける。各抗体をターゲット細胞に添加し共培養する。採取調整

した PBMC をエフェクター細胞として各 well へ加え、37°C7 時間培養を行う。その後、LDH 法にて細胞障害度を測定し定量化する。

まず、ターゲット細胞とエフェクター細胞を固定して、至適抗体濃度を検証する。投与する抗体濃度を 0.1ng/ml から段階的に増加させ、細胞障害を比較する。

次いで、至適抗体濃度を決定し、健常者 PBMC を用いて各ターゲット細胞に対する ADCC の検証を行う。同様に患者検体を用いて、ADCC の評価を行う。

#### 4. 研究成果

消化器癌患者20名から末梢血リンパ球を分離し、脱フコシル化ハーセプチンと、脱フコシル化セツキシマブを用いたADCCを検討し、脱フコシル化抗体が、有意にADCCを増強させることを突き止めた

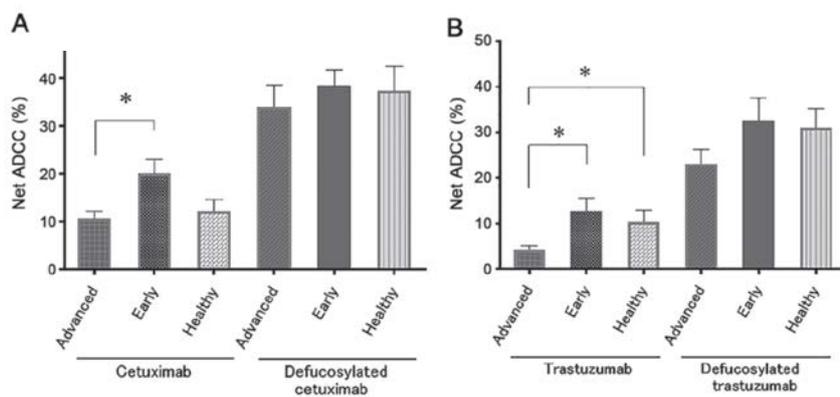


Figure 4. Defucosylated cetuximab- and trastuzumab-mediated ADCC in advanced cancer cases. Net ADCC in advanced disease (n=10), early disease (n=10) and healthy individuals (n=10) were evaluated in (A) cetuximab-mediated and (B) trastuzumab-mediated ADCCs. Net ADCC (%)=ADCC activities (%)=antibody-dependent cellular cytotoxicity (%). Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation. \*P<0.05, as indicated. ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakajima Takahiro, Okayama Hirokazu, Ashizawa Mai, Noda Masaru, Aoto Keita, Saito Motonobu, Momma Tomoyuki, Ohki Shinji, Shibata Masahiko, Takenoshita Seiichi, Kono Koji	4. 巻 15
2. 論文標題 Augmentation of antibody-dependent cellular cytotoxicity with defucosylated monoclonal antibodies in patients with GI-tract cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 2604-2610
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2017.7556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aoto Keita, Mimura Kousaku, Okayama Hirokazu, Saito Motonobu, Chida Shun, Noda Masaru, Nakajima Takahiro, Saito Katsuharu, Abe Noriko, Ohki Shinji, Ohtake Tohru, Takenoshita Seiichi, Kono Koji	4. 巻 39
2. 論文標題 Immunogenic tumor cell death induced by chemotherapy in patients with breast cancer and esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 151-159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2017.6097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kikuchi Tomohiro, Mimura Kosaku, Ashizawa Mai, Okayama Hirokazu, Endo Eisei, Saito Katsuharu, Sakamoto Wataru, Fujita Shotaro, Endo Hisahito, Saito Motonobu, Momma Tomoyuki, Saze Zenichiro, Ohki Shinji, Shimada Kazunori, Yoshimura Kiyoshi, Tsunoda Takuya, Kono Koji	4. 巻 69
2. 論文標題 Characterization of tumor-infiltrating immune cells in relation to microbiota in colorectal cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 23~32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-019-02433-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ujiie Daisuke, Okayama Hirokazu, Saito Katsuharu, Ashizawa Mai, Thar Min Aung Kyi, Endo Eisei, Kase Koji, Yamada Leo, Kikuchi Tomohiro, Hanayama Hiroyuki, Fujita Shotaro, Sakamoto Wataru, Endo Hisahito, Saito Motonobu, Mimura Kosaku, Saze Zenichiro, Momma Tomoyuki, Ohki Shinji, Kono Koji	4. 巻 192
2. 論文標題 KRT17 as a prognostic biomarker for stage II colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 1093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgz192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi Tomohiro, Mimura Kosaku, Okayama Hirokazu, Nakayama Yuko, Saito Katsuharu, Yamada Leo, Endo Eisei, Sakamoto Wataru, Fujita Shotaro, Endo Hisahito, Saito Motonobu, Momma Tomoyuki, Saze Zenichiro, Ohki Shinji, Kono Koji	4. 巻 18
2. 論文標題 A subset of patients with MSS/MSI?low?colorectal cancer showed increased CD8(+) TILs together with up?regulated IFN?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 5977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2019.10953	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島 隆宏,河野 浩二,芦澤 舞,千田 峻,野田 勝,青砥 慶太,立花 和之進,岡山 洋和,早瀬 傑,坂本 渉,石亀 輝英,齋藤 元伸,志村 龍男,大竹 徹,竹之下 誠一
2. 発表標題 脱フコシル化抗体を用いたADCCの検討
3. 学会等名 第117回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	河野 浩二  (Kono Koji)  (40283204)	福島県立医科大学・医学部・教授    (21601)	