

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08588

研究課題名(和文) 遺伝子改変前脂肪細胞を用いた乳癌抗体療法の開発

研究課題名(英文) Antibody therapy using gene-transduced adipocytes for breast cancer

## 研究代表者

藤本 浩司 (Fujimoto, Hiroshi)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60456027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は患者から採取した前駆脂肪細胞に体外で遺伝子導入することにより、長期的・持続的な乳癌抗体治療を可能とする治療プラットフォームを確立することである。副作用が少なく、実際に長期投与が数多く行われている抗HER2治療をモデルプランとして選び、動物実験を含めた基礎検討を行った。

レンチウイルスベクターを用いて、抗HER2抗体遺伝子のヒト前駆脂肪細胞への導入を行い、細胞実験では培養液中、動物実験においては血清中に抗HER2抗体が産生され、抗腫瘍効果が発揮されることが分かった。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌は全身療法の効果が高く、分子標的治療の発展は目覚ましいが、その反面、長期投与による、経済的・時間的損失が問題となっている。その解決策の一つとして、患者から採取した脂肪細胞にex vivoで遺伝子導入することで、長期的・持続的な乳癌抗体治療を行う手法の確立を目指した。

本システムは将来的に安全性が確立されれば術後再発予防を目的とした補助療法としても応用が可能である。さらには、乳癌術後欠損部再建に行われる脂肪移植時に遺伝子改変脂肪細胞を混在させることで単なる組織充填による形態改善だけでなく、再発抑制効果も期待し得る。

研究成果の概要(英文)：We constructed gene-transduced human adipocyte producing anti-HER2 antibody and evaluated their ability of secretion and anti-tumor effect in vitro. As a result, we identified that the gene-transduced ccdPAs secreted the anti-HER2 antibodies and the production increased with the process of differentiation into mature adipocyte. Furthermore, we observed that the antibodies bound to the HER2 positive cancer cells and demonstrated anti-tumor effect in vivo.

研究分野：乳癌治療

キーワード：乳癌 抗体療法 遺伝子治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国における乳癌の罹患率は 1990 年代に入り女性のがんの中で第 1 位となり現在も、かつ現在も増加している。乳癌は全身療法の効果が高く、近年は抗 HER2 療法、抗 VEGF 療法、骨転移に対する抗 RANKL 療法などの分子標的治療が目覚ましく発展している。なかでも抗 HER2 療法は術後補助療法及び再発治療における予後の改善効果が大きく、副作用も限定的であるため、非常に多くの症例に用いられている。しかし、その一方で、抗体療法は周期的な頻回の投与を継続的に行う必要があり、その経済的、身体的負担が非常に大きい。また、ボース投与により治療域を確保しなければならないため、必然的にボース直後の血中濃度上昇があり、副作用発現のリスクも生じる。これに対し、遺伝子導入の手法を用いて目的とする抗体の産生を自身の細胞に行わせることが出来れば、経済的、身体的負担を大幅に軽減出来る可能性がある。また、その手法は様々な抗体療法に応用可能なプラットフォームとなり得る。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は患者から採取した前駆脂肪細胞に ex vivo で遺伝子導入することにより、長期的・持続的な乳癌抗体治療を可能とする治療プラットフォームを確立することである。

まずは、副作用が少なく、実際に長期投与が数多く行われている抗 HER2 治療をモデルプランとして選び、ヒトでの臨床応用を目指して動物実験を含めた基礎検討を行う。

### 3. 研究の方法

(1) レンチウイルスを用いて抗 HER2 抗体遺伝子をヒト天井細胞由来前脂肪細胞 (ceiling culture-derived proliferative adipocyte: ccdPA) へ導入した。抗 HER2 抗体の産生能および HER2 への結合特異性を In vitro および In vivo において確認した。遺伝子導入 ccdPA から産生された抗体の直接的、間接的な抗腫瘍効果について、乳癌細胞株を用いて評価した。また、成熟脂肪細胞の分化過程が抗体産生能に与える影響を、経時的に採取した上清により評価した。

(2) 動物実験において、HER2-ccdPA の至適移植条件について検討した。そして、HER2-ccdPA の治療効果を、HER2 陽性乳癌担癌マウスモデルを用いて評価すると同時に、抗体の血中への産生及び腫瘍部位への到達も検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) リコンビナントレンチウイルスベクターの作成

レンチウイルスプラスミドを HEK293T 細胞に transfection させ、抗 HER2 抗体遺伝子を導入したレンチウイルスベクターを作製した。そのウイルスベクターを ccdPA に累計 3 回、遺伝子導入を行い、抗 HER2 抗体遺伝子を導入した細胞 (HER2-ccdPA) を作成した。そして HER2-ccdPA 培養上清中の抗体濃度を ELISA で測定した。

#### <結果>

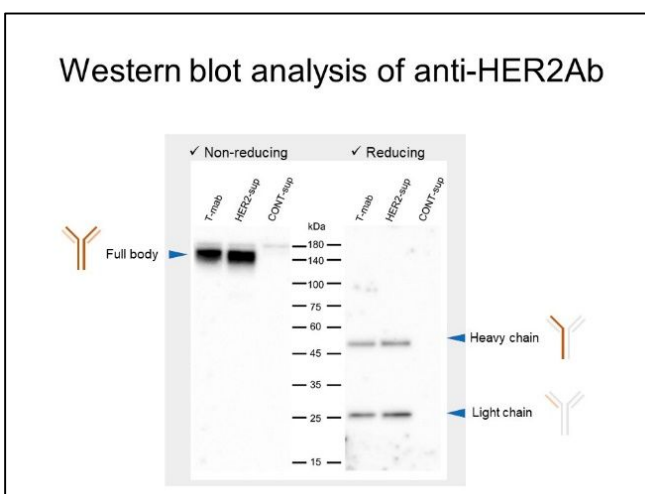
HER2-ccdPA の培養上清中の抗体濃度は遺伝子導入回数が増えるにつれて上昇し、遺伝子導入回数と抗体産生能が有意に相関していた。

#### (2) ウェスタンブロットによる産生された抗体の分子量推定

還元条件、非還元条件での抗体を解析するこび産生された抗体が H 鎖 2 本と L 鎖 2 本の IgG の構造をとっているかを確認した。

#### <結果>

非還元条件下では、HER2-ccdPA の培養上清は Full body である約 150kDa を示し、還元条件下では H 鎖の約 50kDa、L 鎖の約 25kDa の位置にバンドを認め、トラスツズマブと同等の位置が確認された。(図)

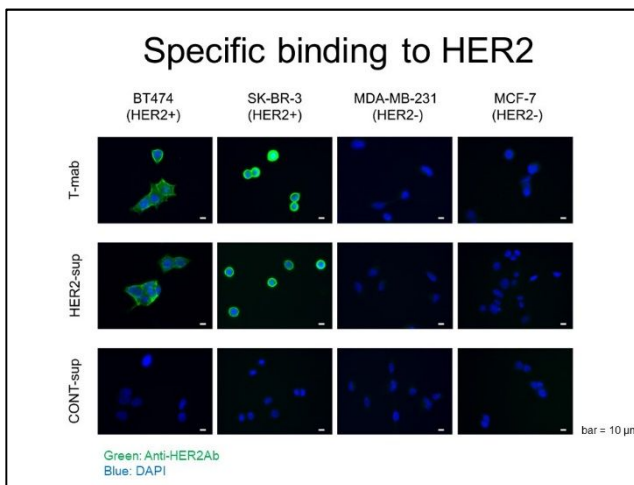


#### (3) 産生された抗 HER2 抗体の結合特異性の確認

HER2 陽性乳癌細胞と HER2 陰性乳癌細胞を対象とし、培養上清およびトラスツズマブを一次抗体として用いて蛍光免疫染色を施行した。

< 結果 >

HER2 陽性細胞では細胞膜に蛍光を認め、HER2 陰性細胞では認めなかった。HER2-ccdPA の培養上清でもトラスツズマブと同様に HER2 陽性細胞においてのみ蛍光が認められたが、control-ccdPA の培養上清では HER2 陽性、陰性にかかわらず、蛍光は認められず。HER2 陽性乳癌細胞に特異的に抗体が結合することが示された。(図)



(4) 脂肪分化と抗体産生能についての検討

ccdPA に脂肪分化刺激を与え、成熟脂肪細胞への分化過程で培養上清を回収し、抗体濃度を経時的に測定し、さらに Oil red O 染色で脂肪滴を染色し成熟脂肪細胞への分化の程度を評価した。

< 結果 >

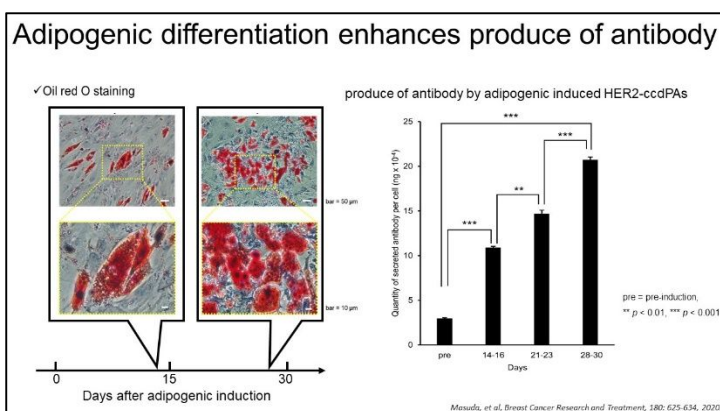
分化刺激の期間が長くなるにつれて、脂肪滴を含む成熟脂肪細胞へと分化した範囲が拡大し、ccdPA から成熟脂肪細胞への分化がみられ、それにつれて抗体産生能が上昇することが確認された。(図)

(5) HER2 シグナルが関与する PI3K/Akt pathway への HER2-ccdPA の培養上清の抑制効果

HER2-ccdPA の培養上清およびコントロール ccdPA の培養上清で乳癌細胞株を incubate し、得られた cell lysate を用いてウェスタンブロットを行った。

< 結果 >

HER2 陽性乳癌細胞においては HER2-ccdPA の培養上清でリン酸化 AKT が減少し、PI3K/AKT pathway が抑制されていることが示されたが、HER2 陰性乳癌細胞では認められなかった。



(6) In vitro における細胞増殖抑制効果の確認

産生された抗体の抗腫瘍効果を確認した。トラスツズマブの抗腫瘍効果には HER2 への結合による直接的抗腫瘍効果と ADCC を介した間接的抗腫瘍効果の二つが知られており、その両者に対して、検討を行った。直接的増殖抑制効果は HER2 陽性乳癌細胞、HER2 陰性乳癌細胞を HER2-ccdPA、コントロール ccdPA の培養上清下で incubate し、細胞数を測定した。間接的抗腫瘍効果は、HER2 陽性乳癌細胞と IL-2 で活性化させた末梢血単核細胞 PBMC を HER2-ccdPA の培養上清もしくはコントロール-ccdPA の培養上清中で 4 時間 incubate し、死細胞から放出される上清中の LDH を測定し、乳癌細胞における死細胞の割合を計算した (ADCC 活性)。

< 結果 >

HER2 陽性乳癌細胞では HER2-ccdPA の培養上清群で有意に増殖抑制効果が認められたが、HER2 陰性乳癌細胞では培養上清のちがいによる有意差は認められず、HER2 陽性細胞特異的に増殖抑制効果 (直接的増殖抑制効果) が確認された。

(7) ccdPA に最適な移植方法の検討

6 週齢の雌のヌードマウスを用い、ccdPA の分化誘導刺激の有無、そして移植部位をマウスの乳腺と大腿筋の 2 群に分けて、HER2-ccdPA を移植した。そして、それぞれのマウスの血清を経時的に採取し、定量的な ELISA で評価した。

< 結果 >

移植後 7 日目の血清中の抗体濃度を比較すると、移植部位毎の差は認められなかったが、分化誘導刺激を与えると、血清中の抗体濃度が優位に上昇することがわかった。

(8) 腫瘍ゼノグラフトに対する治療実験

HER2 陽性乳癌マウスモデルを作成し、HER2-ccdPA の抗腫瘍効果を in vivo で検討した。

週齢6の雌のヌードマウスに、HER2陽性乳癌細胞株BT474を右背部に移植し、HER2-ccdPA単回移植群、trastuzumabの定期投与群、生理食塩水(control)の定期投与群の3群に分けて、経時的に腫瘍径を計測した。

<結果>

control群では腫瘍が増大したのに対して、HER2-ccdPA単回移植群と、trastuzumab定期投与群では腫瘍が縮小し、以降腫瘍形成は確認されなかった。(図)

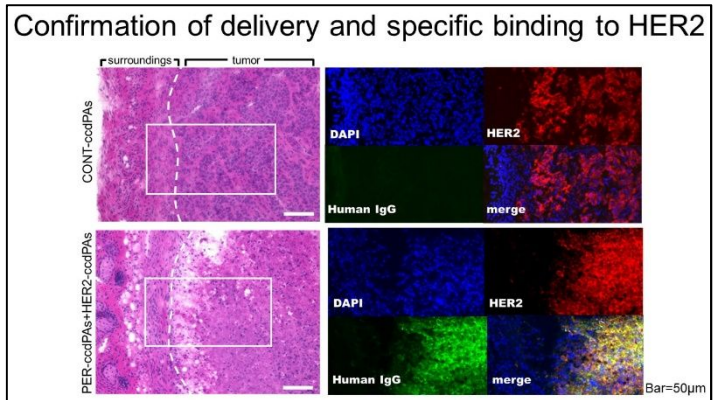
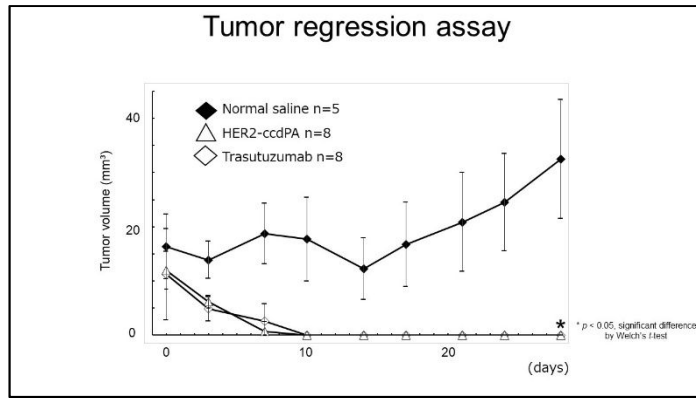
(9) In vivoにおける抗体発現の評価

産生された抗体が腫瘍に届いているかを評価するため、HER2-ccdPA移植群と、control群の中

から、移植後7日目の時点での腫瘍を採取し凍結切片を作成し、免疫染色を施行した。

<結果>

蛍光免疫染色では、HER2-ccdPAとPER-ccdPAの併用移植群において、HER2陽性部位に、特異的にヒトのIgG抗体が検出された。そして同部位のHE染色では、核の破碎や細胞質の好酸性化といった癌の壊死像がみられ、血清中に産生された抗HER2抗体が、HER2陽性乳癌に特異的に運ばれ、抗腫瘍効果を示していると思われた。(図)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Takahito Masuda, Hiroshi Fujimoto, Ryotaro Teranaka, Masayuki Kuroda, Yasuyuki, Aoyagi, Takeshi Nagashima, Takafumi Sangai, Mamoru Takada, Ayako, Nakagawa, Yoshitaka Kubota, Koutaro Yokote, Masayuki Ohtsuka	4. 巻 180
2. 論文標題 Anti-HER2 antibody therapy using gene-transduced adipocytes for HER2-positive breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breast Cancer Research and Treatment	6. 最初と最後の頁 625-634
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10549-020-05581-x	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 寺中亮太郎、藤本浩司、長嶋健、高田護、榊原淳太、山田英幸、山本寛人、大塚将之
2. 発表標題 Ex vivo gene therapy using human adipocytes secreting anti-HER2 antibody on HER2 positive xenograft tumor models
3. 学会等名 第29回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2021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	黒田 正幸 (Kuroda Masayuki)  (00253005)	千葉大学・医学部附属病院・特任准教授  (12501)	
研究分担者	三階 貴史 (Sangai Takafumi)  (00375685)	北里大学・医学部・教授  (32607)	

6. 研究組織（つづき）

	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	窪田 吉孝  (Kubota Yoshitaka)  (10375735)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授    (12501)	
研究分担者	長嶋 健  (Nagashima Takeshi)  (60292710)	千葉大学・医学部附属病院・准教授    (12501)	
研究分担者	大塚 将之  (Ohtsuka Masayuki)  (90334185)	千葉大学・大学院医学研究院・教授    (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関