

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19500430
 研究課題名 (和文) 音響化学療法と抗体療法を組み合わせた新しい癌治療法の研究
 研究課題名 (英文) A novel cancer therapy using sonodynamics and antibody
 研究代表者 黒木 求 (KUROKI MOTOMU)
 所属：福岡大学・医学部・教授
 研究者番号：10131822

研究成果の概要：癌の治療を目的として、癌抗原 CEA に対するヒト IgA 抗体の組換え遺伝子を作製し、この遺伝子をカイコ幼虫に導入して抗癌 IgA 抗体をつくらせた。この抗体とヒト白血球を癌細胞に加えると癌細胞の細胞死が見られた。次に光感受性をもたない新しいポルフィリン誘導体 DEG-Mn-DP-H は超音波照射により強力な細胞傷害活性を示した。これらの結果から、超音波と音響化学物質とを用いた音響化学療法と、IgA 抗体を使った抗体療法との併用が癌治療に有用である可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野： 総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：超音波医科学 音響化学療法 抗体療法 癌 IgA ADCC

1. 研究開始当初の背景

癌の光化学療法は、ポルフィリン誘導体に代表される光感受性物質をレーザー光で励起させて癌細胞を傷害する治療法である。近年このような光感受性物質は超音波によっても励起され細胞傷害活性を発揮することがわかり、音響化学療法と呼ばれている。この治療法は光化学療法よりも副作用が少なく組織内深達度が高いとして注目され、著者らも ATX-70 や DCPH-P

-Na(I)などの感受性物質を用いて、音響化学療法がマウスモデルで癌の治療に有効であることを示した(1)。

光化学療法は癌細胞に対する直接的傷害効果の他に、癌に対する免疫応答を惹起あるいは促進させることが知られている。これは炎症によるサイトカインの放出、それに伴う好中球の遊走、HSP70等の熱ショックタンパク質の発現の誘導等によるも

のであるが、結果として自然免疫と獲得免疫の両方の活性化が促進される (2)。従って音響化学療法によっても抗腫瘍免疫応答を誘導されると予想される。

一方、著者らはこれまでヒト抗体遺伝子を移入したマウス(KM マウス)を用いて抗CEA (癌胎児性抗原) ヒトモノクローナル抗体(MAb)など、癌抗原に対する MAb を作製し、癌の抗体療法への応用を検討してきた (3)。抗体療法には IgG 抗体と NK 細胞をエフェクターとする ADCC(抗体依存性細胞媒介性細胞傷害) や、抗体と補体による CDC (補体依存性細胞傷害) 等を作用機序するものがあるが、最近癌組織周辺に豊富に存在する好中球と、癌抗原に対する IgA 抗体を用いた ADCC が癌治療に効果があることが報告されている (4)。

1. Abe H, Kuroki M. et al. Anticancer Res 22: 1575-1580, 2002
2. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. PNature Rev Cancer 6:535-545, 2006.
3. Imakiire T, Kuroki M, et al. Int J Cancer 108:564-570, 2004.
4. Otten MA, Rudolph E, et al. J Immunol 174:5472-5480, 2005.

2. 研究の目的

これまでの知見から、音響化学療法と抗体療法を組み合わせることで、より強力に副作用の少ない癌の治療効果が得られることが期待された。著者らは多くの癌で抗発現する癌関連抗原CEAに対するマウスやヒトの IgG MAb を作製し、その遺伝子を利用して癌の抗体療法の研究に応用してきた。また同時に抗 CEA IgG MAb を用いた音響化学療法の研究も行ってきた。本研究はそれらの成果をもとに音響化学療法と IgA 抗体と好中球による ADCC を組み合わせることにより、より安全で効果の高い癌治療法を確立しようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 抗CEA 組換えIgA抗体(rIgA)の作製と精製

ヒト IgA 発現細胞株より単離した IgA H 鎖定常部遺伝子より、PCR によりヒト IgA H 鎖定常部遺伝子をクローニングした。一方ヒト抗 CEA MAb クローン C2-74 の H 鎖および L 鎖の可変部遺伝子と、上記 IgA H 鎖定常部遺伝子を結合させ、抗 CEA ヒト rIgA 抗体組換え遺伝子を作製した。この抗 CEA rIgA 組換え遺伝子を昆虫細胞発現用ウイルスベクター-pBK283 に組み込み、培養昆虫細胞株 BmN4 に発現させ、さらにカイコ幼虫に感染させ大量発現を行った。カイコ体液より硫酸塩析と Ni カラムを用いて抗体タンパクを精製した。抗体の性状は SDS-PAGE と Western blot、抗体活性は ELISA により調べた。

(2) 細胞傷害活性の検討

CEA 発現 CHO 細胞を⁵¹Cr で標識し、抗 CEA ヒト rIgA とインターフェロン- γ で刺激した好中球を加えて in vitro 4 時間の ADCC 細胞傷害アッセイを行った。同時に Nikon Eclipse TE300 を用いてリアルタイムビデオアッセイを行った。

(3) 音響化学療法

超音波感受性剤として ATX-70、DCPH-P-Na(I)あるいは DEG-Mn-DP-H (以下 DEG) を含む PBS 溶液にヒト胃癌細胞 MKN-74 を浮遊させ、48-well プレート中で超音波を照射した。超音波照射は超音波発生装置 (Sonitron 1000; Richmar 社) の照射用プローブを細胞浮遊液に直接浸し、1.0 MHz、1.0 W/cm² output intensity、10% duty cycle の条件下で行った。細胞生存率は MTT アッセイによった。光感受性は細胞溶液に 60k Lux ハロゲン光 10 分間照射により調べた。

4. 研究成果

(1) 抗CEA 組換えヒトIgA抗体(rIgA)の作

製

ヒト抗CEA MAbを産生するハイブリドーマクローンC2-45よりクローニングした抗体H鎖およびL鎖の変部遺伝子と、ヒトミエローマ細胞よりクローニングしたヒトIgA抗体H鎖定常部遺伝子を結合させ、ヒト抗CEA IgA抗体の組換え遺伝子を作製した。この組換え遺伝子を哺乳動物分泌タンパク発現用ベクターpSecTagに組み込み、CHO細胞にトランスフェクトし、クローニング後IgA抗体の発現量を調べたが、培養液中に数十ngオーダーの分泌しか見られなかった。そこで組換えIgA遺伝子を昆虫細胞発現用ベクターに組み込み、培養昆虫細胞株BmN4に発現させ、さらにカイコ幼虫での発現を試みた。その結果カイコ体液中に約20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度で目的のrIgA (分子量約78K) が分泌された (図1)。体液より塩析とaffinity chromatographyにより約500 μg のrIgAを精製した。このrIgA (45scFvLCHalpha)はCEAとの結合性を保持していることをELISAにより確認した。

(2) 抗CEAヒトrIgAによるin vitroでの抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)の検討

健常人抹消血より単離した好中球を、細胞表面にIgAレセプター(Fc α RI)を増加させるためインターフェロン- γ で刺激した。次に標的としてCEA発現CHO細胞を ^{51}Cr で標識し、抗CEAヒトrIgAと上記刺激好中球を加えてin vitroの細胞傷害アッセイを行った。その結果抗CEA rIgAの濃度に依存的に標的細胞が傷害された (図2)。このrIgAの代わりに抗CEAヒトIgG抗体を用いた場合には好中球による細胞傷害はみられず、IgAとFc α RIの結合によるADCCが働いたことが推察された。この細胞傷害はリアルタイムビデオアッセイでも細胞の画像として確認された。以上のように抗CEA rIgAはADCCによりCEA発現癌細胞を強く傷害することがわかり、癌の治療法の1つとして有用であることが

示唆された。

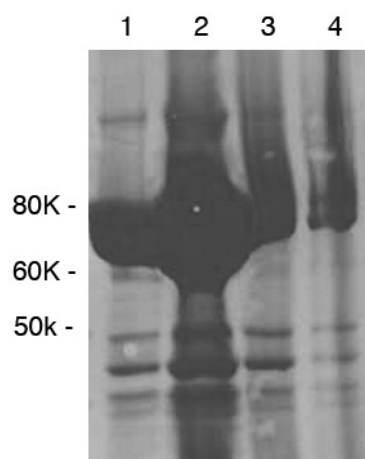


図1 カイコ体液に発現されたrIgAタンパクのSDS-PAGE 1. 体液0.2 μl 、2. 体液1 μl 、3, 4 コントロール体液

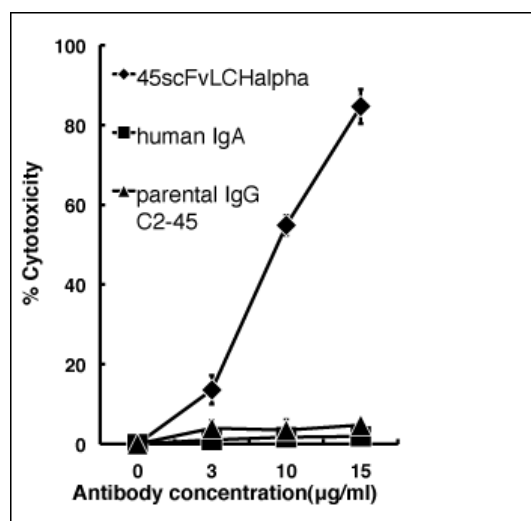


図2 抗CEA IgA抗体と好中球によるADCC

(3) 音響化学療法による抗腫瘍免疫応答惹起作用の検討

in vitroで超音波感受性剤の共存下に、ヒト胃癌細胞に超音波を照射し、免疫応答の惹起に重要なHSP70の発現レベルの増加をRT-PCRにより比較することを当初の目的とした。初めに超音波感受性剤としてDCPH-P-Na(I)を使用した。水溶性に問題あるためか、超音波共存下での安定した細胞傷害活性が見られなかった。そこで新しい水溶性ポリフィリン誘導体DEG-Mn-DP-H (以下DEG)について超音波および光感受性と抗腫

瘍効果を検討した。ヒト胃癌細胞株を標的として調べた結果、DEG は光照射によってはまったく細胞傷害性を示さないことがわかった。次に DEG 存在下に超音波照射を行うと、用量依存的に ATX-70 よりも強力な細胞傷害性を示した (図 3)。この細胞傷害活性はヒスチジン共存下や N-アセチルシステイン共存下では抑制されることから、超音波により励起された DEG がヒドロキシラジカルを発生して細胞傷害性を発揮することが示唆された。これらの結果から DEG は ATX-70 や DCPH-P よりも優れた超音波感受性剤であり、本研究に有用であることが示され、今後 HSP70 の発現の実験系に使用する予定である。

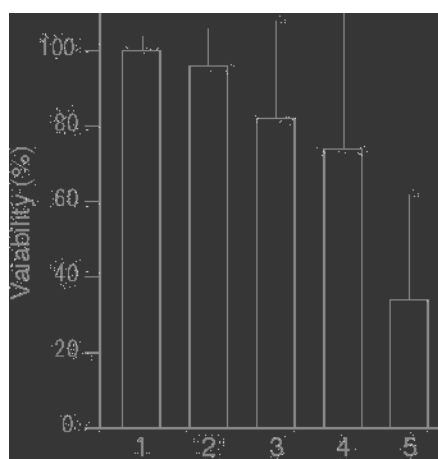


図3 DEG と超音波による細胞傷害

1. 無処理、2. DEG 5 µg/ml、3. 超音波のみ
4. DEG 0.5 µg/ml + 超音波、5. DEG 5 µg/ml + 超音波

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)

- ① Zhao J, Kuroki M et al. (8名、2番目) Recombinant human monoclonal IgA antibody against CEA to recruit neutrophils to CEA-expressing cells. *Oncology Research*, 17, 217-222, 2008 (査読有り)
- ② Hachimine K, Kuroki, M et al. (11名、3番目) Sonodynamic therapy of cancer using a novel porphyrin derivative, DCPH-P-Na(I), which is devoid of photosensitivity. *Cancer Science* 98,

916-920, 2007 (査読あり)

- ③ Kuroki M, Kuroki M et al. (10名、5番目) Sonodynamic therapy of cancer using novel sonosensitizers. *Anticancer Research*, 27, 3673-3678, 2007 (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Shibaguchi H, Kuroki M et al. (5名、3番目) Combination therapy of gastric cancer using a human antibody to CEA and anticancer drugs. 第67回日本癌学会学術総会、2008年10月28日、名古屋
- ② Tanaka T, Kuroki M et al. (6名、3番目) Evaluation of Adv-FZ33 mediated genetransduction among anti-CEA Abs with different subclasses of mouse and human IgGs. 第66回日本癌学会学術総会、2007年10月3日、横浜
- ③ Kuroki M, Kuroki M et al. (6名、3番目) Sonodynamic therapy of cancer using a novel porphyrin derivative, DCPH-P-Na(1), which is devoid of photosensitivity. 35th Annual Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, Sept 15, 2007, Prague, Czech Republic
- ④ Kuroki M, Kuroki M et al. (5名、2番目) Immune defense against cancer and application of antibodies in cancer therapy. China National Teaching and Research Exchange Research Meeting on Medical Biology, 2007, July 10, 2007, Guilin, China

[図書] (計 1 件)

- ① Tanaka T, Kuroki M et al. (7名、3番目) Transworld Research Network, Kerala (India), Recent Developments in Gene Therapy, 2007, 319-326

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒木 求 (KUROKI MOTOMU)
 福岡大学・医学部・教授
 研究者番号: 10131822