

平成21年5月11日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791387
 研究課題名（和文）口腔癌特異的なエンドセリン阻害剤を用いた口腔癌の分子標的療法の開発
 研究課題名（英文）New target therapy with OSCC-specific Endothelin inhibitor
 研究代表者
 今井 優樹（IMAI MASAKI）
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：30440936

研究成果の概要：

エンドセリン受容体阻害ペプチドは乳ガン細胞 SKBR3, MCF7 細胞において60-70%の増殖抑制がみられたが、口腔癌では増殖阻害活性を示さなかった。これらの結果より、口腔癌の増殖においてエンドセリンA受容体の機能は重要でない可能性が示唆された。また、口腔癌特異的な抗原（MUC1）に対する特異抗体 C595 の単独での作用を調べた。C595 は補体依存性細胞障害反応、抗体依存性細胞障害反応をわずかに誘導したが、抗体単独では細胞増殖抑制には影響がなかった。従って、MUC1 特異的モノクローナル抗体は口腔癌の標的化には有効だが、抗体単独での抗体免疫療法では有効性が見られないことが明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：口腔癌、エンドセリン

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は、我が国における死亡原因の約3割を占め、増加の一途を辿っており、さらに高齢化社会の進展に伴い、癌好発年齢の人口が著しい増加を示していた。このような将来予測の中、副作用が非常に少なく、強力な抗癌剤の開発は急務であり、国民の健康の維持増進を図る上で重要な課題であった。特に、口腔領域の癌治療では形態及び機能の温存が、患者にとっての精神的及び身体的負担を

大きく軽減するので、ことさら重要であった。近年、癌細胞の増殖や悪性度に重要な役割を果たす癌細胞特異的な分子の機能や発現を制御する分子標的治療薬の臨床応用が検討され、口腔領域の癌治療においてもシグナル伝達や細胞周期などを分子標的とした新しいアプローチが報告されていた。

2. 研究の目的

(1) エンドセリン及びエンドセリン受容体は

あらゆるガンにおいて強く発現していること明らかになり、ガン細胞の増殖、アポトーシスの抑制、ガンの進行及び転移に重要な役割を果たしていることが解明されてきた。前立腺癌ではエンドセリン A 受容体拮抗薬 **Atrasentan** がマウスの実験で有効性を示し、現在アメリカでフェーズ III レベルの臨床試験が実施されている。そこで、口腔癌において副作用の少ない新規エンドセリン受容体拮抗薬でエンドセリンネットワークの機能阻害を引き起こすと口腔癌細胞の増殖が阻害されるどうかを確かめる。

(2) MUC1 は、大腸癌、前立腺癌、膵臓癌、乳癌、胆嚢癌などにおいてその過剰発現が高頻度にみられ、MUC1 発現が腫瘍の増殖性及び転移性に寄与し、悪性度と強く相関していることが明らかにされてきた。口腔癌においても、他の癌と同様に腫瘍の増殖性及び転移性に関与していることが報告され、口腔癌の新たな分子標的治療薬の候補として注目を浴びている。そこで、MUC1 特異抗体が口腔癌治療の標的物質として機能するかどうかと共に、免疫活性を上昇させるかどうかを確認する。

(3) 上記 2 点を確認した後、口腔癌の癌細胞上のエンドセリン受容体のみを阻害することが出来れば、口腔癌細胞の増殖を強力に抑制し、且つ、副作用が著しく減弱することが可能ではないかと考え、口腔癌特異的に発現する抗原 MUC1 に対する抗体の変領域とペプチド性のエンドセリン拮抗剤を融合した新規組み換え医薬品を作製することをこの研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) エンドセリン阻害剤 (ETR-P1/f1) の培養細胞レベルでの活性測定

エンドセリン阻害剤 ETR-P1/f1 が口腔癌細胞の増殖を抑制するかどうかを確かめるため、口腔癌細胞 HSC4 に ETR-P1/f1 を加え、24, 48, 72 時間後の細胞数をカウントすると共に、MTS assay を行った。

(2) 口腔癌細胞株レベルでの抗 MUC1 抗体の活性測定

まず、口腔癌細胞株レベルでの MUC1 の発現を調べるため、抗 MUC1 抗体を用いた蛍光抗体法を行った。口腔癌細胞株は H0-1-u-1、SAS、HSC3 及び HSC4 を、抗 MUC1 抗体は C595 (サブクラス: マウス IgG3) を用いた。蛍光抗体法の検出にはフローサイトメーターを用いる。次に口腔癌細胞に対する抗 MUC1 抗体の補体活性化能を検討するため、補体成分 C3 の口腔癌細胞表面への沈着で調べ、検出には

FITC 標識した抗ヒト C3 抗体を用いたフローサイトメーターを行った。抗 MUC1 抗体により活性化された補体による細胞障害反応は Cell counting kit 8 で行った。また、抗 MUC1 抗体の抗体依存性細胞障害能は、口腔癌細胞株に抗 MUC1 抗体と健常人末梢血リンパ球を加え、4 時間培養した後、CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay で測定を行った。さらに、口腔癌細胞株レベルでの補体膜制御因子の発現を調べるため、各種抗体を用いた蛍光抗体法を行った。抗 CD46 (MCP) 抗体は E4.3、抗 CD55 (DAF) 抗体は IA10、抗 CD59 (HRF20) 抗体は p282 をそれぞれ用い、蛍光抗体法の検出にはフローサイトメーターを用いた。

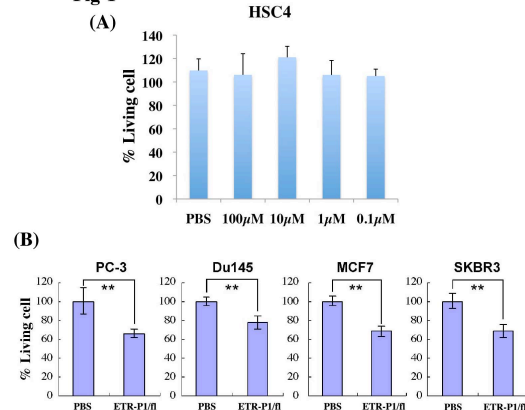
(3) 遺伝子組み換え MUC1 特異的エンドセリン阻害剤の作製

抗 MUC1 抗体産生ハイブリドーマ BCP8 (サブクラス: マウス IgG2a) から mRNA を単離し、cDNA を合成後、マウス IgG2a の定常領域のプライマーを用いた 5' RACE 法によって、BCP8 の可変領域の遺伝子配列を決定した。

4. 研究成果

(1) エンドセリン受容体阻害ペプチドの口腔癌に対する効果を調べるため、まず、in vitro の系でエンドセリン阻害ペプチドの口腔癌細胞の増殖阻害能を調べた。口腔癌細胞 HSC4 にエンドセリン A 受容体の阻害ペプチド ETR-P1/f1 を加え、HSC4 細胞の増殖を抑制することが出来るかどうかを cell counting kit 8 で測定したところ阻害活性を示さなかった (Fig 1-A)。同様に乳ガン細胞 SKBR3、MCF7 細胞にエンドセリン A 受容体の阻害ペプチド ETA-P1/f1 を加えたところ、60-70% の増殖抑制がみられた (Fig 1-B)。このことより、口腔癌の増殖においてエンドセリン A 受容体の機能は重要でない可能性が示唆された。

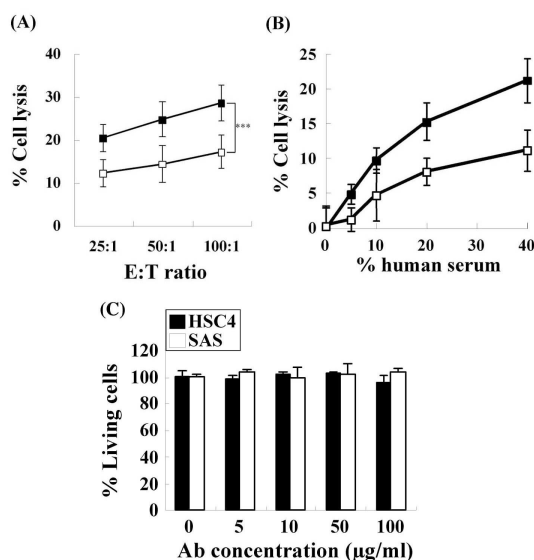
Fig-1



エンドセリンB受容体に対する阻害ペプチドはまだ報告されていないので、新たにエンドセリンB受容体の阻害ペプチドの作成が必要となった。そのための新たな阻害ペプチド検索プログラム「MIMETIC」を作成した。

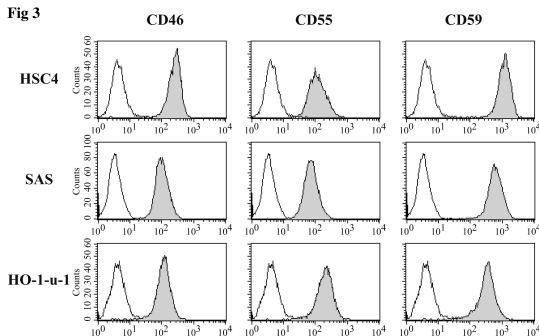
(2) 口腔癌特異的な抗原 (MUC1) に対する特異抗体 C595 の単独での作用を調べるため、補体依存性細胞障害反応、抗体依存性細胞障害反応および細胞増殖抑制能の測定を行った。C595 は抗体依存性細胞障害反応と補体依存性細胞障害反応を口腔癌細胞上の MUC1 発現量依存的に誘導し、MUC1 高発現口腔癌細胞 HSC4 において C595 による抗体依存性細胞障害は約 30% (Fig 2-A)、補体依存性細胞障害は約 20% (Fig 2-B) であった。C595 抗体単独では細胞増殖抑制には影響がなかった (Fig 2-C)。

Fig 2



補体依存性細胞障害が予想された数値より低かったことから補体膜制御因子の発現を調べたところ、CD46、CD55、CD59 のすべての補体膜制御因子の発現が確認され、特に CD59 の発現は高かった (Fig 3)。従って、MUC1 特異的モノクローナル抗体は口腔癌の標的化には有効だが、抗体単独での抗体免疫療法では有効性が見られないことが明らかになった。

Fig 3



(3) 抗 MUC1 抗体産生ハイブリドーマ BCP から mRNA を単離し、cDNA を合成後、マウス IgG2a の定常領域のプライマーを用いた 5' RACE 法によって、BCP8 の軽鎖及び重鎖の可変領域の遺伝子配列を決定した。

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 7 件)

1. Shimizu M, Imai M, Effect of the antibody immunotherapy by the anti-MUC1 monoclonal antibody to the oral squamous cell carcinoma in vitro. *Biol Pharm Bull.*, 31: 2288-2293 (2008) 査読有

2. Varela JC, Imai M, Atkinson C, Ohta R, Rapisardo M, Tomlinson S, Modulation of protective T cell immunity by complement inhibitor expression on tumor cells. *Cancer Res.*, 68: 6734-6742 (2008) 査読有

3. Knoepp SM, Chahal MS, Xie Y, Zhang Z, Brauner DJ, Hallman MA, Robinson SA, Han S, Imai M, Tomlinson S, Meier KE. Effects of active and inactive phospholipase D2 on signal transduction, adhesion, migration, invasion, and metastasis in EL4 lymphoma cells. *Mol Pharmacol.*, 74: 574-584 (2008) 査読有

4. Hau L, Campbell W, Okada H, Del Carpio CA, Imai M, Okada N. Designing complementary peptides with a genetic algorithm to a 10 amino acid peptide of the C-terminal of C5a anaphylatoxin. *Nagoya Med. J.*, 49: 219-233 (2008) 査読有

5. Imai M, Ohta R, Varela JC, Song H, Tomlinson S. Enhancement of Antibody-Dependent Mechanisms of Tumor Cell Lysis by a Targeted Activator of Complement. *Cancer Res.*, 67: 9535-9541 (2007) 査読有

6. Imai M, Baranyi L, Okada N, Okada H. Inhibition of HIV-1 infection by synthetic peptides derived CCR5 fragments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 353: 851-856 (2007) 査読有

7. 今井優樹, 岡田則子. 相補性ペプチドによる炎症の制御. *臨床検査*, 52: 917-920 (2008) 査読なし

〔学会発表〕（計 9 件）

1. Imai M, Ohta R, He C, Okada N, Ross T, Tomlinson S. Immune enhancement in MUC1 transgenic mice immunized with MUC1-C3d fusion protein. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会要旨集, 2008 年 12 月 1-3 日, 京都

2. Okada N, Tobisawa S, Imai M, Okada H. ヒト抗 Nef-IgM 抗体は HIV-1 感染拡大を阻止する. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008 年 12 月 1-3 日, 京都

3. Imai M. Effect of the antibody immunotherapy by the anti-MUC1 monoclonal antibody to the oral squamous cell carcinoma. XXII International Complement Workshop, Basel, Switzerland, Sep. 28th-Oct2nd 2008

4. Shimizu M, Imai M, Iseki T, Morita S. Antibody immunotherapy against OSCC. XIX Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, Bologna, Italy, Sep. 9th-12th 2008

5. 太田里永子, Chun He, Ted Ross, 岡田則子, Stephen Tomlinson, 今井優樹. MUC1-C3d ワクチンによる免疫増強効果、自然免疫の最前線（第 73 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会・第 19 回日本生体防御学会学術総会・第 45 回補体シンポジウム合同大会）, 2008 年 7 月 10-12 日, 札幌

6. 清水ももこ, 今井優樹, 井関富雄, 森田章介. 腫瘍特異抗原 MUC1 を標的とする口腔癌の抗体免疫療法の基礎的研究—補体膜制御因子との関連性について—, 第 32 回日本頭頸部癌学会, 2008 年 6 月 11-13 日, 東京

7. 清水ももこ, 今井優樹, 井関富雄, 森田章介. 腫瘍特異抗原 MUC1 を標的とする口腔癌の抗体免疫療法の研究, 第 62 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2008 年 4 月 17-18 日, 福岡

8. 今井優樹. 口腔癌に対する抗 MUC1 モノクローナル抗体の抗腫瘍活性の解析, 第 128 回日本薬学会, 2008 年 3 月 26-28 日, 横浜

9. 清水ももこ, 今井優樹, 井関富雄, 森田章介. 腫瘍特異抗原 MUC1 を標的とした口腔癌の新規抗体免疫療法の開発, 第 26 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2008 年 1 月 24, 25 日, 大分

〔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

今井 優樹 (IMAI MASAKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30440936

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者