

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591934

研究課題名(和文) 胃癌抗体療法における ADCC 活性増強の試み Fc 受容体遺伝子多型の検討も含めて

研究課題名(英文) Augmentation of ADCC activity according to FcR polymorphisms in patients with gastric cancer who receive monoclonal antibody therapy

研究代表者

吉野 茂文 (YOSHINO, Shigefumi)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60294633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000 円、(間接経費) 1,140,000 円

研究成果の概要(和文)：近年、胃がんや大腸がんに対して抗癌剤のみならず抗体と呼ばれる薬が使われており、この抗体は直接がん細胞を殺すだけでなく、免疫細胞をがんのところに引き寄せてがん細胞を殺させる作用も持っている。この研究では、抗体に明らかに免疫細胞介してがん細胞を殺させる作用があることが確認された。この作用をさらに増強させるために免疫を高める薬を用いて実験してみたが、残念ながら増強効果は認められなかった。しかしこの研究で新たに、抗体が効く人と効かない人に遺伝的な違いがあることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Monoclonal antibodies are widely used for patients with gastric or colorectal cancer. These drugs have direct effect on the tumor cells, however modulation of the immune response could be another important mechanism. Antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mediated through the receptor (FcR) of the antibodies carried by immune cells plays an important role in the antitumor effect of the antibody. In this study, we confirmed that both monoclonal antibodies of trastuzumab and cetuximab had ADCC activity, however immunomodulator lentinan showed no augmentation of ADCC. Genetic features of FcR polymorphisms may be associated with the outcome of cancer patients treated with monoclonal antibodies.

研究分野：消化器・腫瘍外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃癌 大腸癌 ADCC活性 抗体医薬 Fc受容体 遺伝子多型 レンチナン

1. 研究開始当初の背景

癌治療において様々な抗体医薬が開発され臨床応用されており、乳癌、大腸癌、血液腫瘍といった多くのヒト悪性腫瘍において延命効果が見られ、抗体医薬の優れた臨床効果が明確になってきた。抗体医薬は、癌細胞に対する細胞増殖のシグナル伝達を阻害するために開発されたものであるが、最近の研究結果からその主たる効果発現機序には、Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) が関与していることが明らかとなってきた。ADCC は癌細胞に結合した抗体がNK細胞や単球のFc受容体結合することによって惹起される免疫反応であり、抗体の中でも特にIgG1タイプのもが最も強くADCC活性を誘導することが知られている。

2. 研究の目的

HER2陽性胃癌に対するtrastuzumab (Herceptin™) の有効性が示され、2011年からは本邦においても使用可能となった。trastuzumabはIgG1タイプの抗体であり、その効果発現にはADCCが強く関与していることが明らかとなっており、今後はtrastuzumabの治療において、いかにしてADCC活性を増強させるかが課題となってくる。胃癌に対して保険適用である免疫賦活剤レンチナン(LNT、-1,3グルカン)にはADCC活性増強作用が認められており、LNTとtrastuzumabのADCC活性増強相互作用につき検討する。

また大腸癌においてもcetuximabによる抗体療法が盛んに行われている。cetuximabもIgG1タイプの抗体であり、その効果発現にはADCCが関与している可能性が高く大腸癌においても同様の検討を行う。

ADCCは免疫細胞のFc受容体を介して惹起されるが、本研究ではFc受容体の遺伝子多型とADCC活性の関係についても明らかにする。

さらには、胃癌組織におけるHER2陽性率は乳癌に比べると低く20%程度と報告されているが、ホルマリン固定時間により影響を受けている可能性があり、これについても検討する。

3. 研究の方法

(1) 健常ボランティアの末梢血単核球を用いてIL-2によりLAK細胞を誘導し、trastuzumabを10µg/mlの濃度で添加しSolution Cell Proliferation assayでtrastuzumabのADCC活性を検討した。細胞株は、HER2陽性の胃癌細胞株MKN-7を用いた。また、in vitroでのLNT添加によるADCC活性の増強効果を検討した。

(2) 胃癌細胞株同様に大腸癌細胞株を用いて、cetuximabのADCC活性を検討した。健常

ボランティアの末梢血単核球をIL-2を用いてLAK細胞を誘導し、cetuximabを0.05-500µg/mlの濃度で添加しSolution Cell Proliferation assayでcetuximabのADCC活性を測定した。細胞株は、KRAS(Wt)、BRAF(Mt)のWiDr、KRAS(Mt)、BRAF(Wt)のHCC、KRAS(Wt)、BRAF(Wt)のOMUS、KRAS(Wt)、BRAF(Mt)のOMUS Mtを用いた。また、胃癌細胞株同様にin vitroでのLNT添加によるADCC活性の増強効果を検討した。

(3) 進行・再発胃癌患者に治療としてTS-1+LNT療法を行い、LNT投与前後の末梢血単核球を用いてin vitroの実験同様にSolution Cell Proliferation assayでLNTのADCC活性の増強効果を検討した。LNTは週1回2mgの投与で、投与前と4回投与後にADCC活性を測定した。

(4) Cetuximabで治療した56例の進行・再発大腸癌患者において、FcRの遺伝子多型と治療効果の関係を検討した。遺伝子多型は、FcRIIa(H131R)とFcRIIIa(V158F)をTaqMan SNP Genotyping Assaysにより測定した。

(5) 胃癌におけるHER2の陽性率を免疫組織化学的検査で検討した。また、胃癌組織のホルマリン固定時間によるHER2陽性率への影響も検討した。

4. 研究成果

(1) trastuzumabによるADCC活性およびLNTのADCC活性増強効果

健常ボランティアの末梢血単核球を用いてIL-2 500U/mlで4日間培養しLAK細胞を誘導、胃癌細胞株MKN-7とLAK細胞 0.3×10^4 、 1×10^4 、 0.3×10^5 、 1×10^5 /wellにtrastuzumabを10µg/ml添加し24時間混合培養した。Trastuzumab添加によりLAK活性が7~25%増強し、trastuzumabによる明確なADCC活性が認められた。またLAK細胞誘導時にLNTを3µg/ml添加しLNTで刺激を受けたLAK細胞を誘導し、同様に24時間のLAK活性を測定した。LNT刺激LAK細胞によるADCCも10~21%であり、LNT非刺激LAK細胞とほぼ同等のADCCで、LNTによるADCC活性の増強効果は認められなかった。

(2) cetuximabによるADCC活性およびLNTのADCC活性増強効果

Trastuzumab同様に大腸癌細胞株を用いてcetuximabのADCC活性およびLNTのADCC活性増強効果を検討した。WiDr、HCC、OMUS、OMUS Mt全ての細胞株においてcetuximabのADCC活性が認められた。LNTのin vitroでのADCC活性増強効果はWiDr細胞株(図1)、OMUS細胞株(図2)において認められず、その他の細胞株についても同様の結果であった。

図 1

WiDR 細胞株に対する LNT の ADCC 活性増強効果

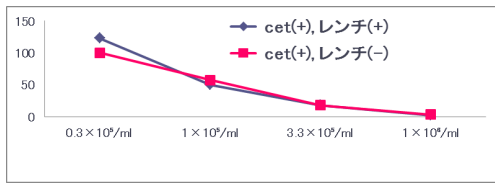
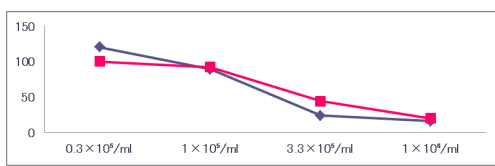


図 2

OMUS 細胞株に対する LNT の ADCC 活性増強効果



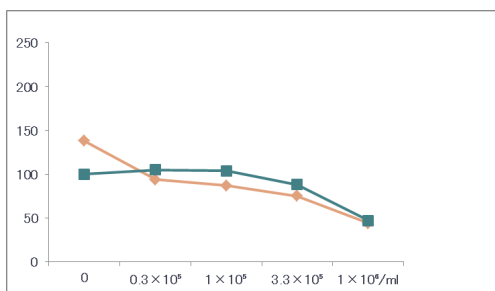
WiDR、OMUS ともに LNT の in vitro での ADCC 活性増強効果は認められなかった。他の細胞株も同様の結果であった。

(3) LNT を投与した進行・再発胃癌患者の ADCC 活性

TS-1+LNT 療法を施行した 3 名の進行・再発胃癌患者において LNT 投与前後の ADCC 活性を測定した。3 名の患者とも LNT 投与前後の ADCC 活性に変化は見られず、LNT の in vivo 投与における ADCC 活性の増強効果は見られなかった (図 3)。

図 3

WiDR 細胞株に対する LNT 投与前後の ADCC 活性



LNT 投与前 (緑) 投与後 (黄) で明らかな ADCC 活性の変化は見られなかった。

他の細胞株 (HCC、OMUS、OMUS Mt) でも同様の結果であり、3 名とも同じ傾向であった。

(4) 進行・再発大腸癌患者における cetuximab の治療効果と Fc R の遺伝子多型の関係

56 例の進行・再発大腸癌患者の Fc R IIa(H131R)と Fc R IIIa(V158F)のハプロタイプの組み合わせ (ディプロタイプ) において HV/HV は、治療効果 CR +PR が 0、SD +PD が 4 例であり、HV/non-HV は CR +PR が 2、SD +PD が 9 例、Non-HV/non-HV は CR +PR が 17、SD +PD が 24 例であり、HV/HV の症例は HV/non-HV、Non-HV/non-HV より抗腫瘍効果が不良であった。

(5) 胃癌組織のホルマリン固定時間による HER2 陽性率への影響

胃癌切除が施行された 47 例において 摘出直後に腫瘍の 1 部を採取して 10%中性緩衝ホルマリン液に 6~48 時間の固定標本と手術終了後に 10%中性緩衝ホルマリン液に固定し、7~10 日後に病理検査に提出した標本で IHC 法 (ペンタナ I-VIEW パスウェー HER2 キット) を用い HER2 発現を比較検討した。における HER2 陽性率は 13/47 = 27.6%であった。との判定一致率は 74%(35/47)で、ホルマリン過固定標本においても判定に影響するほどの HER2 発現の減弱は認めなかった。

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 1 件)

FcR and EGFR polymorphisms as predictive markers of cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer. Yuka Inoue(1 番目), Shigefumi Yoshino(11 番目), 他 12 名, Mol Diagn Ther

DOI 10.1007/s40291-014-0103-6

Published online: 15 May 2014, 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

井上由佳、吉村 清、吉野茂文

Cetuximab の免疫的作用機序の検討 大腸癌肝転移症例に対する病理組織学的検討

第 17 回日本がん免疫学会総会、2013 年 7 月 5 日、ANA クラウンプラザホテル宇部 (宇部)

井上由佳、吉野茂文

消化器癌治療における分子標的薬の位置づけ Cetuximab の有効性の評価と新たなバイオマーカーの探索、第 20 回日本消化器関連学会週間、2012 年 10 月 13 日、神戸国際会議場 (神戸)

井上由佳、吉野茂文

KRAS、BRAF 変異型転移性大腸癌に対する免疫細胞療法の可能性、日本癌学会、2011 年 10 月 5 日、名古屋国際会議場 (名古屋)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野 茂文 (YOSHINO, Shigefumi)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60294633

(2) 研究分担者

吉村 清 (YOSHIMURA, Kiyoshi)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30346564