

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790185

研究課題名（和文） 悪性胸膜中皮腫に対する腫瘍特異的抗体療法の開発

研究課題名（英文） Establishment of novel immunotherapy against malignant mesothelioma

研究代表者

阿部 真治 (ABE SHINJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：00403717

研究成果の概要（和文）：悪性胸膜中皮腫はアスベスト由来の難治癌であり、新規治療法の確立が求められている。本研究では悪性胸膜中皮腫に対する特異的癌抗原を標的とした腫瘍特異的免疫療法の開発を目的として検討を行った。その結果、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株およびヒト悪性胸膜中皮腫組織において HM1.24 が高発現すること、抗 HM1.24 抗体が悪性胸膜中皮腫細胞株に対して有意な抗体依存性細胞障害（ADCC）および補体依存性細胞障害（CDC）を誘導することを明らかにした。本結果より、特異的癌抗原を標的とした腫瘍特異的免疫療法が悪性胸膜中皮腫に対する有効な新規治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an aggressive malignancy. Therefore, novel therapeutic strategies for MPM are urgently necessary for improving the prognosis. In this study, I investigated whether anti-HM1.24 antibody can induce antitumor effects against MPM. Immunostaining showed the expression of HM1.24 of MPM cell lines and malignant mesothelioma tissues. Furthermore, anti-HM1.24 antibody could induce potent ADCC and CDC against HM1.24-positive MPM cells. These results strongly suggest that targeting therapy with therapeutic antibodies might be useful as a novel immunotherapy against MPM.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：オーダーメイド医療

## 1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫はアスベストの暴露により誘発されることが知られており、今後我が国において症例数ならびに死亡者数が急激に増加すると予想されている。現在、悪性胸膜中皮腫の治療法としては外科的切除、化学療法、放射線療法などが行われているが、難治性の悪性腫瘍であるため、既存の治療法で十分な治療効果をあげる事は非常に困難である。そのため、腫瘍特異的免疫療法を代表とする新規機序の治療法開発が必須である。

研究代表者が所属する徳島大学では難治性悪性腫瘍に対する新規治療法の確立を目的としたトランスレーショナルリサーチとして、難治性固形癌に対する樹状細胞を用いた腫瘍特異的免疫療法の臨床研究が実施されていた。腫瘍特異的免疫療法では有効な治療効果を得るうえで、標的とする癌抗原の選択が最も重要であり、さらなる研究が進められている。HM1.24 (CD317) は種々の悪性腫瘍に特異的に発現する抗原性タンパク質であり、腫瘍特異的免疫療法への応用の可能性

が報告されている (Anticancer Res 1999; 19: 5535-5542, Blood 2003; 102: 4416-4423)。これまでに我々の研究グループでも HM1.24 がヒト肺癌細胞株およびヒト肺癌臨床組織において高発現すること、特異的抗 HM1.24 抗体が有意な抗体依存性細胞障害 (antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC) および補体依存性細胞障害 (complement-dependent cytotoxicity; CDC) を誘導することを報告している (Cancer Immunol Immunother 2009; 58(6): 967-76, Lung Cancer 2009; 63(1): 23-31)。しかし、これまでに悪性胸膜中皮腫における HM1.24 抗原発現と腫瘍特異的免疫療法への応用については検討されていなかった。

## 2. 研究の目的

悪性胸膜中皮腫は治療抵抗性の難治癌であり、既存療法には抵抗性を有するため、今後の治療成績向上のためには新規治療法の確立が必須である。近年臨床現場では様々な癌に対して腫瘍特異的抗体療法が行われており、既存の治療法では治療困難であった症例に対しても著明な効果をあげている。これまでに研究代表者の所属する研究グループは肺癌に対する腫瘍特異的抗体療法について検討を行い、その有用性について報告している (Cancer Immunol Immunother 2009; 58(6): 967-76, Lung Cancer 2009; 63(1): 23-31)。そこで本研究では、悪性胸膜中皮腫に対する腫瘍特異的抗体療法の開発を目的として、HM1.24 (CD317) をはじめとする特異的癌抗原の腫瘍組織における発現を確認するとともに、特異的癌抗原に対する各種抗体医薬の抗腫瘍効果について ADCC 誘導および CDC 誘導の観点から検討を行った。

## 3. 研究の方法

HM1.24 特異的抗体を用い、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株 (15 株) における HM1.24 の発現をフローサイトメトリーにおいて確認した。またヒト臨床組織における HM1.24 の発現はヒト悪性胸膜中皮腫組織アレイを用い、免疫組織染色法により検出した。HM1.24 特異的抗体は以前に申請者が肺癌に対する検討で使用した抗体を用いた (Cancer Immunol Immunother 2009; 58(6): 967-7)。抗 HM1.24 抗体の ADCC 活性はマウス脾細胞、もしくは健康成人の末梢血より単離した単核球をエフェクター細胞として用い、測定した。採取されたエフェクター細胞と抗 HM1.24 抗体を <sup>51</sup>Cr にて標識した HM1.24 抗原を発現するヒト悪性胸膜中皮腫細胞と一定時間共培養し、上清中に放出された <sup>51</sup>Cr を測定した。また、CDC 活性はラビット血清由来補体と抗 HM1.24 抗体を <sup>51</sup>Cr にて標識した HM1.24 陽性ヒト悪性胸膜中皮腫細胞と共培養し、

ADCC 活性と同様の測定を行った。

## 4. 研究成果

ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株における HM1.24 の発現をフローサイトメトリーで検討した結果、15 株中 10 株 (67%) において HM1.24 が発現し、そのうち 5 株は高発現であることが認められた (図 1)。

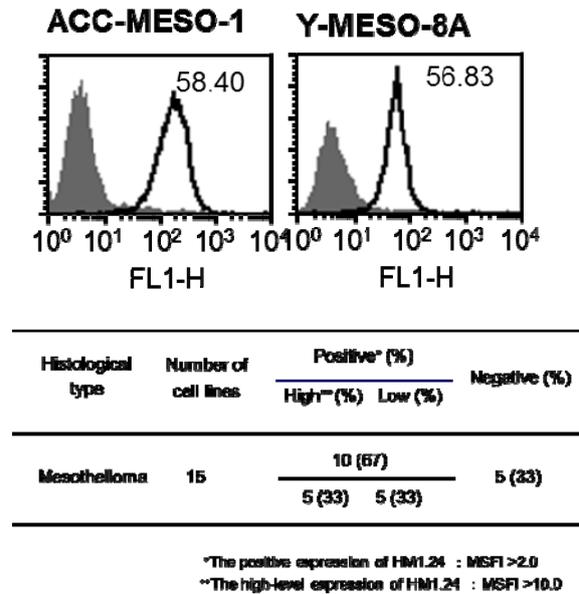


図 1) ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株における HM1.24 発現

次にヒト悪性胸膜中皮腫組織アレイを用い、ヒト臨床組織における HM1.24 の発現を免疫組織染色法により検討した。その結果、HM1.24 は悪性胸膜中皮腫ヒト臨床組織においても高頻度に発現することが明らかとなった。

HM1.24 がヒト悪性胸膜中皮腫に高発現することが明らかとなったため、次に抗 HM1.24 抗体の CDC 活性について検討を行った。ラビット血清由来補体と抗 HM1.24 抗体を <sup>51</sup>Cr にて標識したヒト悪性胸膜中皮腫細胞に処置し、インキュベーション後、上清中に放出された <sup>51</sup>Cr を測定した。その結果、HM1.24 陽性の悪性胸膜中皮腫細胞株である ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、EHMES-1、Y-MESO-8A、Y-MESO-9、NCI-H2452 をターゲット細胞とした際に抗 HM1.24 抗体処置による有意な CDC の誘導が認められた (図 2)。一方で HM1.24 陰性の悪性胸膜中皮腫細胞株である MST0-211H をターゲット細胞として用いた際には、抗 HM1.24 抗体による CDC の誘導は認められなかった。これらの結果より抗 HM1.24 抗体は HM1.24 発現依存的に CDC

を誘導することが明らかとなった。また、抗 HM1.24 抗体により誘導される CDC は補体濃度依存的であった。

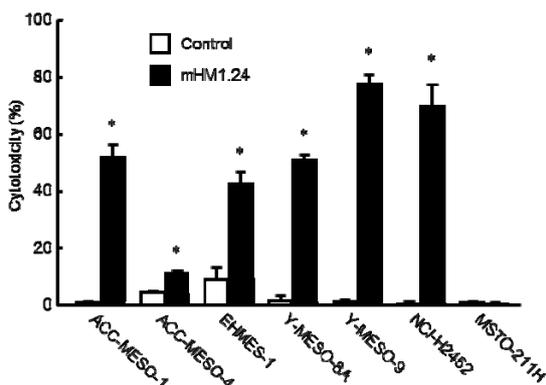


図 2) ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株に対する抗 HM1.24 抗体の CDC 活性

今回用いた抗 HM1.24 抗体はマウス IgG 由来の抗体であるため、まず SCID マウスの脾細胞をエフェクター細胞として用い、ADCC の誘導について検討を行った。その結果、抗 HM1.24 抗体は HM1.24 陽性の悪性胸膜中皮腫細胞株である ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、Y-MESO-8A をターゲット細胞とした際に有意な ADCC を誘導した。一方で CDC と同様に HM1.24 陰性の悪性胸膜中皮腫細胞株である MSTO-211H をターゲット細胞として用いた際には、抗 HM1.24 抗体による ADCC の誘導は認められなかった。以上の結果より抗 HM1.24 抗体は ADCC 活性を有することが明らかとなった。しかし、抗体医薬としてヒトへの臨床応用を考えるうえで、ヒト免疫細胞をエフェクター細胞とした際に ADCC 活性を有することは必須の条件である。そこで、キメラ型抗 HM1.24 抗体を用い、健常成人の末梢血より単離した単核球をエフェクター細胞とした際の ADCC 活性について検討を行った。その結果、HM1.24 陽性の悪性胸膜中皮腫細胞株である ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、EHMES-1、Y-MESO-8A、Y-MESO-9、NCI-H2452 をターゲット細胞とした際にキメラ型抗 HM1.24 抗体処置による有意な ADCC の誘導が認められた (図 3)。一方で HM1.24 陰性の悪性胸膜中皮腫細胞株である MSTO-211H をターゲット細胞として用いた際には、キメラ型抗 HM1.24 抗体による ADCC の誘導は認められなかった。またキメラ型抗 HM1.24 抗体により誘導される ADCC 活性は抗体濃度、エフェクター細胞/ターゲット細胞比率、時間依存的であった。これらの結果よりキメラ型抗 HM1.24 抗体はヒト免疫細胞をエフェクター細胞として用いた際に HM1.24 陽性悪性胸膜中皮腫細胞

に対して ADCC 活性を有することが明らかとなった。

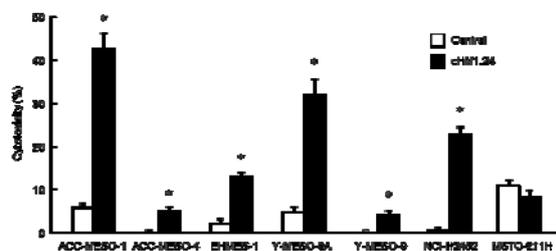


図 3) ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株に対する抗 HM1.24 抗体の ADCC 活性

以上の結果より抗 HM1.24 抗体は CDC 活性および ADCC 活性を有しており、悪性胸膜中皮腫に対して有効な新規治療法となり得ることが示唆された。悪性胸膜中皮腫は今後の症例増加が予想されているが、本研究結果を基に更なる検討を重ねることで、本疾患の治療向上に寄与するとともに本疾患で苦しむ患者に新たな薬物治療の選択肢を提示することが可能になると考える。

#### 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)

- ① Abe S, Morita Y, Kaneko MK, Hanibuchi M, Tsujimoto Y, Goto H, Kakiuchi S, Aono Y, Huang J, Sato S, Kishuku M, Taniguchi Y, Azuma M, Kawazoe K, Sekido Y, Yano S, Akiyama SI, Sone S, Minakuchi K, Kato Y, Nishioka Y. A novel targeting therapy of malignant mesothelioma using anti-podoplanin antibody. *J Immunol.* 2013. In press. DOI: 10.4049/jimmunol.1300448 (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 阿部真治, 谷口友紀, 木宿昌俊, 中瀬真理, 柴田洋文, 川添和義, 東満美, 西岡安彦, 水口和生 新規ヒト・キメラ型抗ポドプランリン抗体の悪性胸膜中皮腫に対する選択性の検討 第 133 回日本薬学会年会, 2013. 3. 28, パシフィコ横浜 (横浜市)
- ② 阿部真治, 加藤幸成, 金子美華, 黄俊, 埴淵昌毅, 曾根三郎, 西岡安彦 悪性胸膜中皮腫に対するヒトキメラ型抗ポドプランリン抗体療法を検討 第 25 回日本バイオセラピー学会, 2012. 12. 14, 倉敷市芸文館 (倉敷市)

- ③谷口友紀, 阿部真治, 木宿昌俊, 東満美, 川添和義, 西岡安彦, 水口和生: ADCC を介したヒトキメラ型抗ポドプラニン抗体の悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果の検討 第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2012. 11. 10, 島根県民会館・サンラポーむらくも (島根市)
- ④加藤幸成, 西岡安彦, 阿部真治, 水口和生, 曾根三郎: ヒトキメラ型抗ポドプラニン抗体による転移抑制機序の解明 第 16 回日本がん分子標的治療学会, 2012. 6. 28, 北九州市西日本総合展示場 (北九州市)
- ⑤西岡安彦, 阿部真治, 加藤幸成, 木宿昌俊, 川添和義, 黄俊, 埴淵昌毅, 水口和生, 曾根三郎: 悪性胸膜中皮腫に対するヒトキメラ型抗ポドプラニン抗体 NZ-8 の抗腫瘍効果 第 16 回日本がん分子標的治療学会, 2012. 6. 28, 北九州市西日本総合展示場 (北九州市)
- ⑥阿部真治, 加藤幸成, 金子美華, 木宿昌俊, 川添和義, 東満美, 水口和生, 曾根三郎, 西岡安彦: 悪性胸膜中皮腫に対する抗ポドプラニン抗体 NZ-1 の抗腫瘍効果に関する検討 第 52 回日本呼吸器学会, 2012. 4. 20, 神戸コンベンションセンター (神戸市)
- ⑦阿部真治, 谷口友紀, 木宿昌俊, 里吉良子, 川添和義, 東満美, 西岡安彦, 水口和生: 肺癌における新規癌抗原 OFA-iLRP 発現の検討 第 132 回日本薬学会年会, 2012. 3. 29, 北海道大学 (札幌市)
- ⑧阿部真治, 加藤幸成, 金子美華, 黄俊, 埴淵昌毅, 曾根三郎, 西岡安彦: 悪性胸膜中皮腫に対する抗ポドプラニン抗体療法 of 検討 第 24 回日本バイオセラピー学会, 2011. 12. 1, ダイワロイネットホテル和歌山 (和歌山市)
- ⑨阿部真治, 谷口友紀, 木宿昌俊, 里吉良子, 加藤幸成, 川添和義, 東満美, 西岡安彦, 水口和生: ポドプラニンを標的とした悪性胸膜中皮腫に対する新規抗体療法 of 検討 第 50 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2011. 11. 13, サンポートホール高松・かがわ国際会議場 (高松市)
- ⑩西岡安彦, 阿部真治, 加藤幸成, 木宿昌俊, 川添和義, 黄俊, 埴淵昌毅, 水口和生, 曾根三郎: 抗ポドプラニン抗体 NZ-1 の悪性胸膜中皮腫に対する抗体依存性細胞障害活性と抗腫瘍効果 第 15 回日本がん分子標的治療学会, 2011. 6. 24, ホテル日航東京 (東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿部 真治 (ABE SHINJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号: 00403717

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし