

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792148

研究課題名(和文) セツキシマブを用いた口腔癌に対する免疫学的治療法の開発

研究課題名(英文) Complement-mediated immunotherapy to the Oral Squamous Cell Carcinoma with Cetuximab

研究代表者

今井 優樹 (IMAI, MASAKI)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30440936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌細胞株に対するセツキシマブの補体活性化能を検討したところ、わずかではあるが、補体活性化を誘導した。次に、抗腫瘍免疫応答を増強することができると考えられる新規遺伝子組み換え抗体CR2-Fcを作製した。CR2-Fcはセツキシマブを血清存在下において口腔癌細胞に結合することができるかどうか調べたところ、ヒトCR2-Fcは補体成分C3が沈着した口腔癌細胞に結合することができた。また、CR2-Fcはセツキシマブによる補体活性化を増強した。これらの結果により、セツキシマブが補体活性を誘導でき、CR2-Fcは抗体による補体活性化能を増強することが可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To conserve both form and function in the oral area, effective and selective drugs against oral cancer will be required. We focused on Cetuximab, that is indicated for the treatment of patients with epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing cancer. Complement deposition (C3) on HSC4 (human oral squamous cell carcinomas cell line) by incubation with Cetuximab and human serum was slightly enhanced. On the other hands, complement inhibitors expressed on tumor cells provide a hindrance to the therapeutic efficacy of some monoclonal antibodies. We investigated a strategy to amplify complement activation on tumor cells and overwhelm complement inhibitor function. Complement deposition and lysis of HSC4 cells by incubation with Cetuximab and human serum was enhanced in the presence of CR2-Fc. CR2-Fc enhances the therapeutic efficacy of antibody therapy and may provide particular benefits under conditions of limiting antibody concentration or low tumor antigen density.

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 抗体

1. 研究開始当初の背景

日本国内において口腔癌治療に使用できる抗体医薬品は今のところ1つもないが、アメリカでは上皮増殖因子受容体 (EGFR) を標的とするヒト型モノクローナル抗体セツキシマブが進行性の頭頸部扁平上皮癌の治療薬として承認されており、日本においても現在、治験が行われている。

EGFR はさまざまな悪性腫瘍で過剰発現がみられ、腎癌の 50-90%、大腸癌の 25-77% 等で過剰発現がみられる。特に頭頸部癌では 80-100% と非常に高いことから EGFR をターゲットとした分子標的療法が臨床治験で良好な効果を示している。また、日本人の口腔癌患者においても 92.3% に EGFR の発現が見られ、EGFR への EGF の結合を阻害する抗体医薬品セツキシマブや、EGFR のチロシンキナーゼを特異的に阻害し細胞増殖シグナルを抑制する、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤エルロチニブ等の口腔癌治療への適応が待たれるところである。

2. 研究の目的

口腔癌において 90% 以上を発現している EGFR をターゲットとしながらも、EGFR のシグナル伝達制御に対する耐性メカニズムに影響を受けない、抗 EGFR 抗体の口腔癌に対する免疫療法の確立をめざす。まず第 1 に、各種口腔癌細胞株に対するセツキシマブの CDC 活性を検討する。また、補体制御因子により分解された iC3b と C3d を認識する補体レセプター CR2 の C3d 認識部位と、ヒト IgG1 抗体の Fc 部分を融合した新規遺伝子組み換え抗体 CR2-Fc を作製し、CR2-Fc がセツキシマブの ADCC 及び CDC の活性化を増強させるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) in vitro におけるセツキシマブの CDC 活性による抗腫瘍効果の検討

口腔癌細胞株は HSC3、HSC2、HSC4、HSQ-89、HO-1-u-1 の 5 種類を使用した。これらの細胞株は各研究機関より取得し、当研究室で使用している。セツキシマブはメルクセローノ社より購入した。

口腔癌細胞株レベルでのセツキシマブの反応性を調べるため、5 種類の細胞を用いたフローサイトメトリーを行った。各口腔癌細胞株にセツキシマブを添加後、4 で 30 分反応させる。PBS で洗浄後、FITC 抗ヒト IgG 抗体を反応させ、FACScalibur で測定した。

セツキシマブの口腔癌細胞に対する CDC 活性を C3 沈着試験で検討した。この実験はヒト血清存在下でセツキシマブを各口腔癌細胞株に加え、各口腔癌細胞株にセツキシマブを添加後、37 で 30 分反応させ、PBS で洗浄後、FITC 抗ヒト C3 抗体を反応させ、FACScalibur で測定した。

(2) 遺伝子組み換えヒト型 CR2-Fc の作製及び精製

遺伝子工学技術により、不活性型の補体成分 iC3b 及び C3d と結合するヒト CR2 と、ヒト IgG1 抗体の Fc 部分を融合した新規遺伝子組み換え抗体 CR2-Fc を発現するベクターを構築した。

ヒト CR2 の N 末端側の 4 つの SCR とヒト IgG1 の定常領域配列を人工的につなぐため、ヒト IgG1 定常領域発現ベクターへ組み込むための酵素部位を含んだプライマーを設定した後、pBM-CR2 をテンプレートとして PCR を行う。PCR 産物をクローニングベクターに組み込み、配列を確認した後、ヒト CR2 を酵素により切り出し、ヒト IgG1 定常領域発現ベクターと共にライゲーションを行うことにより、ヒト CR2-Fc 発現ベクターを構築した。

ヒト CR2-Fc 発現ベクターが転写・翻訳されてタンパク質を発現するかどうかを確認するため、リポフェクトアミン 2000 を用いて COS7 細胞に遺伝子導入した後、培養上清と細胞を回収し、ウエスタンブロットにより予想される分子量を示すかどうかを確認した後、ヒト CR2-Fc 発現ベクターを恒常発現系の CHO 細胞へと遺伝子導入を行う。G418 でスクリーニングを行った後、高発現クローンを採取した。

ヒト CR2-Fc 高産生 CHO 細胞を大量培養し、培養上清を回収後、プロテイン A カラムにてヒト CR2-Fc を精製し、精製純度を SDS-PAGE 及びウエスタンブロット法で確認した。

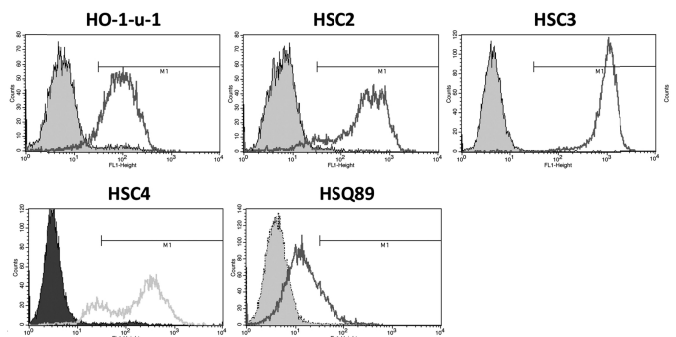
4. 研究成果

(1) in vitro におけるセツキシマブの CDC 活性による抗腫瘍効果の検討

口腔癌細胞株の EGFR の発現

口腔癌細胞株の EGFR 発現レベルを調べ、セツキシマブの反応性を調べるため、5 種類の口腔癌細胞株を用いた。フローサイトメトリーでセツキシマブの反応性を解析したところ、使用した 5 種類すべての口腔癌細胞株において EGFR の発現が認められた。しかしながら、発現レベルの差があり、HSC2、HSC3 及び HSC4 において高発現だった (図 1)。

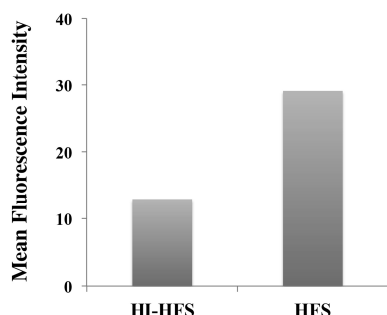
Figure 1



セツキシマブの口腔癌細胞に対する CDC 活性の検討

セツキシマブの口腔癌細胞に対する CDC 活性を C3 沈着試験で検討した結果、セツキシマブ存在下で 20% のヒト新鮮血清(HFS)と非動化により補体活性をなくしたヒト新鮮血清(HI-HFS)を比べたところ、HFS においてより強い C3 の沈着が見られ、補体活性を増強していることが明らかになった(図 2)。

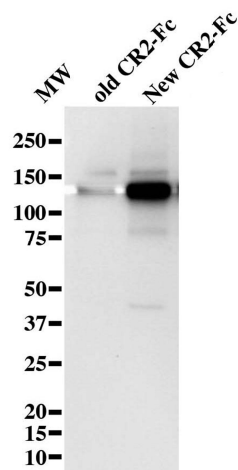
Figure 2. C3 deposition assay with Cetuximab



(2) 遺伝子組み換えヒト型 CR2-Fc の作製及び精製

遺伝子工学技術により、不活性型の補体成分 iC3b 及び C3d と結合するヒト CR2 と、ヒト IgG1 抗体の Fc 部分を融合した新規遺伝子組み換え抗体 CR2-Fc を発現するベクターを構築した。ヒト CR2-Fc 発現ベクターを CHO 細胞に遺伝子導入し、ヒト CR2-Fc 発現 CHO 細胞を作製した。培養上清中のヒト CR2-Fc の発現ウエスタンブロットにより確認したところ、抗 CR2 抗体、抗ヒト IgG 抗体共に予想される分子量を示した(図 3、old CR2-Fc)。ヒト CR2-Fc 産生 CHO 細胞を培養し、培養上清を回収後、プロテイン A カラムにてヒト CR2-Fc を精製した。しかしながら、培養上清中のヒト CR2-Fc 量はそれほど多くなく、in vivo の実験に使用する量を得るためにはさらなる改良が必要であった。そこで、十分量のヒト CR2-Fc を得るためにはより発現量の高い発現システムを構築した方が良いと考え、より強い発現が予想され、薬剤選択の異なる 2 種の環状ベクタークローンを組み込んだ高発現ベクターに組み換え

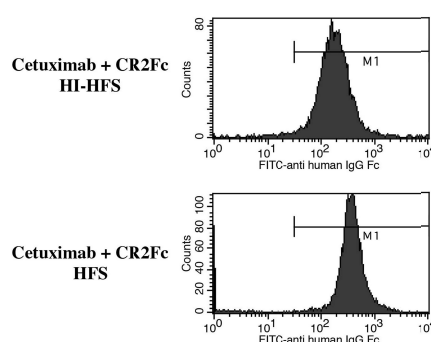
Figure 3



の発現ベクターがヒト CR2-Fc を発現できるかどうかを、CHO 細胞に遺伝子導入し、3 日後の培養上清を回収し、培養上清を Western Blot で確認した。新たに作製した高発現ベクターを導入したものは目的の分子量にバンドが確認できた上、発現量も有意に高くなった(図 3、New CR2-Fc)。

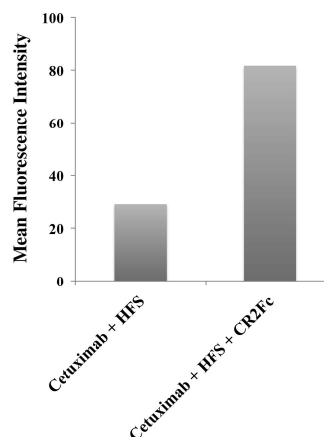
次に作製したヒト CR2-Fc がセツキシマブによる補体活性化を増強するかどうかを検討した。まず、精製したヒト CR2-Fc が、セツキシマブを血清存在下において口腔癌細胞に結合することができるかどうか、口腔癌細胞株 HSC4 細胞を用いて調べたところ、ヒト CR2-Fc は補体成分 C3 が沈着した HSC4 細胞に結合することができた(図 4)。

Figure 4. CR2Fc binding assay under the C activation



次に、ヒト CR2-Fc がセツキシマブの補体活性可能を増強するかどうかを補体成分 C3 の沈着で確認したところ、ヒト CR2-Fc を感作させたサンプルの方がコントロールと比較して、HSC4 細胞上の C3 沈着量が多く、補体活性の増強が見られた(図 5)。

Figure 5. C3 deposition assay with Cetuximab+CR2Fc



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 9 件)

Ercecs D, Nógrády M, Nagy E, Varga G, Vass A, Süveges G, Imai M, Okada N, Okada H, Boros M, Kaszaki J. Complement C5A Antagonist Treatment Improves the Acute

Circulatory and Inflammatory Consequences of Experimental Cardiac Tamponade. Crit. Care Med., 査読有 41: e344-e351 (2013) DOI: 10.1097/CCM.0b013e31828a6768

Mizuno T, Mizuno M, Imai M, Suzuki Y, Kushida M, Noda Y, Maruyama S, Okada H, Okada N, Matsuo S, Ito Y. Anti-C5a complementary peptide ameliorates acute peritoneal injuries induced by neutralization of Crry and CD59. Am J Physiol Renal Physiol. 査読有 305: F1603-1616 (2013) DOI: 10.1152/ajprenal.00681.2012

Vass A, Süveges G, Erces D, Nógrády M, Varga G, Földesi I, Futakuchi M, Imai M, Okada N, Okada H, Boros M, Kaszaki J. Inflammatory Activation after Experimental Cardiac Tamponade. Eur Surg Res. 査読有 51: 1-13 (2013) DOI: 10.1159/000352089

Ohta R, Imai M, Kawada J, Kimura H, Ito Y, Interleukin-17A-Producing T Lymphocytes in Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. Microbiol. Immunol. 査読有 57: 139-144 (2013) DOI: 10.1111/1348-0421.12010

Goto T, Hussein MH, Kato S, Daoud GA, Kato T, Sugiura T, Kakita H, Nobata M, Kamei M, Mizuno H, Imai M, Ito T, Kato I, Suzuki S, Okada N, Togari H, Okada H, Endothelin Receptor Antagonist Attenuates Oxidative Stress in Neonatal Sepsis Model. Pediatric Research, 査読有 72: 600-605 (2012) DOI: 10.1038/pr.2012.134

Ito Y, Torii Y, Ohta R, Imai M, Hara S, Kawano Y, Matsubayashi T, Inui A, Yoshikawa T, Nishimura N, Ozaki T, Morishima T, Kimura H, Increased levels of cytokines and high-mobility group box 1 are associated with the development of severe pneumonia, but not acute encephalopathy, in 2009 H1N1 influenza-infected children. Cytokine, 査読有 56:180-187 (2011) DOI: 10.1016/j.cyto.2011.07.016

Okada H, Imai M, Ono F, Okada A, Tada T, Mizue Y, Terao K, Okada N, Novel Complementary Peptides to Target Molecules. Anticancer Res., 査読有 31:2511-2516 (2011) <http://ar.iijournals.org/content/31/7/2511.long>

Ohta R, Torii Y, Imai M, Kimura H, Okada N, Ito Y, Serum concentrations of complement anaphylatoxins and proinflammatory mediators in patients with 2009 H1N1 influenza. Microbiol. Immunol., 査読有 55(3):191-198 (2011) DOI:10.1111/j.1348-0421.2011.00309.x.

今井優樹, 岡田則子, 腫瘍の補体制御膜因子による免疫回避, 臨床免疫・アレルギー科, 査読無 56:31-37 (2011) <http://ci.nii.ac.jp/naid/40018938406>

[学会発表](計 9件)

Imai M, Ohta R, Enhancement of anti-tumor immunity by MUC1-C3d fusion protein. 2013年12月11-13日、第42回日本免疫学会総会・学術集会、幕張メッセ(千葉市)

太田里永子, 神田輝, 安藤史代, 今井優樹, ヒトにおける MUC1-C3d ワクチンのアジュバント効果の解析、第50回補体シンポジウム、2013年7月4-6日、旭川医科大学(旭川)

Imai M, Ohta R, Okada N, Enhancing antibody immunotherapy by orally administered herbal medicine Juzen-taiho-to. 第41回日本免疫学会総会・学術集会、2012年12月5-7日、神戸国際会議場(神戸)

Mizuno T, Mizuno M, Imai M, Suzuki Y, Kushida M, Yamada K, Noda Y, Maruyama S, Okada H, Okada N, Matsuo S, Ito Y, C5a is a target to prevent peritoneal tissue damage in acute peritoneal injury in rats. XXIV International Complement Workshop, October 10th-15th, 2012, Crete, Greece

今井優樹, 太田里永子, 岡田則子, 口腔癌に対する抗 MUC1 モノクローナル抗体の抗腫瘍活性と補体膜制御因子の影響、第49回補体シンポジウム、2012年8月24-25日、大阪成人病センター(大阪)

水野智博, 水野正司, 榎田真由, 野田幸裕, 山田清文, 今井優樹, 岡田秀親, 岡田則子, 丸山彰一, 松尾清一, 伊藤恭彦, 急性腹膜炎生涯に対するアンチセンス C5a ペプチドの治療効果、第49回補体シンポジウム、2012年8月24-25日、大阪成人病センター(大阪)

Imai M, Ohta R, Okada N, Serum concentrations of complement anaphylatoxins and proinflammatory mediators in patients with 2009 H1N1

influenza. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会, 2011 年 11 月 27-29 日, 幕張メッセ(千葉県)

Okada N, Imai M, Goto T, Hamed M, Okada A, Ono F, Okada H, Inactivation of C5a anaphylatoxin is an effective treatment of sepsis. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会, 2011 年 11 月 27-29 日, 幕張メッセ(千葉県)

太田里永子, 伊藤嘉規, 鳥居ゆか, 木村宏, 岡田 則子, 今井優樹, H1N1 インフルエンザの重症化における補体アナフィラトキシン及び HMGB1 の関与. 第 48 回補体シンポジウム, 2011 年 9 月 2-3 日, 名古屋市立大学(愛知県)

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