

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390210

研究課題名(和文) ADCC活性に基づく肺癌・中皮腫の抗体療法開発と免疫学的バイオマーカー探索

研究課題名(英文) Development of a novel antibody therapy based on antibody-dependent cellular cytotoxicity activity against lung cancer and mesothelioma and identification of the immunological biomarkers

研究代表者

西岡 安彦(NISHIOKA, Yasuhiko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：70274199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺扁平上皮癌および悪性胸膜中皮腫に高発現する膜蛋白ポドプランインを標的に抗腫瘍活性を有する新規抗体の開発を進めた。本研究において新たに作成したヒト・ラットキメラ抗体であるNZ-8はラット抗体であるNZ-1に比較して抗体依存性および補体依存性細胞障害活性に基づく高い抗腫瘍効果を示した。NZ-8は正常組織より腫瘍細胞に発現するポドプランイン分子に高い結合活性を示し臨床応用に向けた利点と考えられた。最終年度にNZ-8より抗腫瘍活性の高いキメラ抗体NZ-12を作成し臨床応用に向けて検討中である。抗体治療前後のマウス移植腫瘍組織の遺伝子発現解析から抗体療法の有効性に関連すると考えられる候補遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：We developed novel antibodies against podoplanin expressing in lung squamous cell carcinoma and mesothelioma. We generated a human-rat chimeric anti-podoplanin antibody NZ-8 which showed higher anti-tumor activity in mouse xenograft model based on antibody-dependent cellular and complement-dependent cytotoxicity as compared to those of the rat antibody NZ-1. The binding activity of NZ-8 seemed to be higher against podoplanin expressing in tumor cells rather than normal cells such as alveolar cells or podocytes, indicating the advantage for clinical use of NZ-8. We finally developed the chimeric antibody NZ-12 showing the higher anti-tumor activity than NZ-8. Furthermore, gene expression analyses in xenograft tumors treated with NZ-1 identified the candidate genes related with the biological activity of NZ-1/NZ-8.

研究分野：医歯薬学

キーワード：抗体療法 ADCC ポドプランイン 肺癌 悪性胸膜中皮腫 免疫療法 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

我々は、肺癌および悪性胸膜中皮腫を対象に、抗腫瘍効果を有する新規抗体の開発研究に取り組んできた。その中で、両腫瘍細胞に高発現する分子である HM1.24 抗原およびポドプラニン分子に対する抗体のスクリーニングから抗体依存性細胞障害活性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC) や補体依存性細胞障害活性 (complement dependent cytotoxicity: CDC) を有するマウスおよびラットの機能性抗体を有していた。

2. 研究の目的

本研究では、抗 HM1.24 抗体あるいは抗ポドプラニン抗体のヒトキメラ抗体あるいはヒト化抗体を作製し、臨床応用に向けた検討を進めること、さらに抗体療法の有効性に関連する免疫学的バイオマーカーの探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

ポドプラニン抗体についてはラット抗体であることから、ラット・マウスおよびラット・ヒトキメラ抗体の作成が必要であった。そこで、NZ-1 の VH 領域と CH1 領域をコードする DNA を PCR で増幅し、マウス IgG2a のヒンジ領域、CH2 及び CH3 領域をコードする DNA を保持した pFUSE-mIgG2A-Fc1 ベクターに組み込み、ラット・マウスキメラ抗体の、ヒト IgG1 の CH1、ヒンジ領域、CH2、CH3 領域をコードする DNA を保持した pcDNA3.3 ベクターに組み込むことでラット・ヒトキメラ抗体のプラスミドベクターを作成し、CHO 細胞へ遺伝子導入することによりその培養上清からキメラ抗体を精製した。HM1.24 抗体については供与を受けた。これらの抗体を用いて、⁵¹Cr 遊離試験により ADCC 活性および CDC 活性を検討した結果、抗ポドプラニン抗体に高い活性と腫瘍特異的な結合活性を見出したことから、抗ポドプラニン抗体を中心に検討を進めた。

マウスモデルにおける抗腫瘍効果の評価は、ヒト肺癌および悪性胸膜中皮腫細胞を SCID マウスの皮下に移植、あるいは胸腔内への同所移植を行うことにより作製したモデルを使用した。

腫瘍細胞および腫瘍組織におけるポドプラニンの発現は、腫瘍細胞株を用いたフローサイトメトリー法と、組織アレイを使用した免疫組織染色により行った。

4. 研究成果

悪性胸膜中皮腫細胞株におけるポドプラニン発現は、73% (11/15 株) に認められた。また悪性胸膜中皮腫組織における発現は、92% (33/36 組織) であった。

抗ポドプラニン抗体 NZ-1 による ADCC 活性を検討したところ、エフェクター細胞として、

ラットの脾細胞を用いた場合のみ、高い ADCC 活性を認め (図 1)、ヒト NK 細胞あるいはマウス脾細胞では ADCC 活性を検出できなかった。脾細胞のアシアロ GM1 抗体処理による NK 細胞の除去実験および脾細胞からの抗 CD161a 抗体ビーズによる NK 細胞の純化による実験から、NZ-1 のエフェクター細胞はラット NK 細胞であることが明らかとなった。

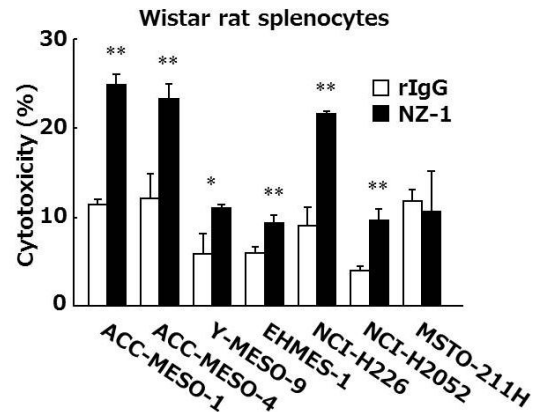


図1 NZ-1による悪性胸膜中皮腫細胞株に対する抗体依存性細胞障害活性. 各種ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株に対して、ラット脾細胞をエフェクター細胞として、NZ-1 (1 µg/ml)による6時間の⁵¹Cr遊離試験を行い、細胞障害活性を検討した。E/T比は、100であった。コントロールとしてラットIgGを使用した。*p<0.05 vs control. **p<0.01 vs control.

次に、ACC-MESO-4 細胞を SCID マウス皮下に移植した xenograft モデルを作製し、in vivo における NZ-1 の抗腫瘍効果を検討した。その結果、NZ-1 (腹腔内) とラット NK 細胞を用いて治療を行った群のみ、腫瘍増殖抑制効果を認めた (図 2)。

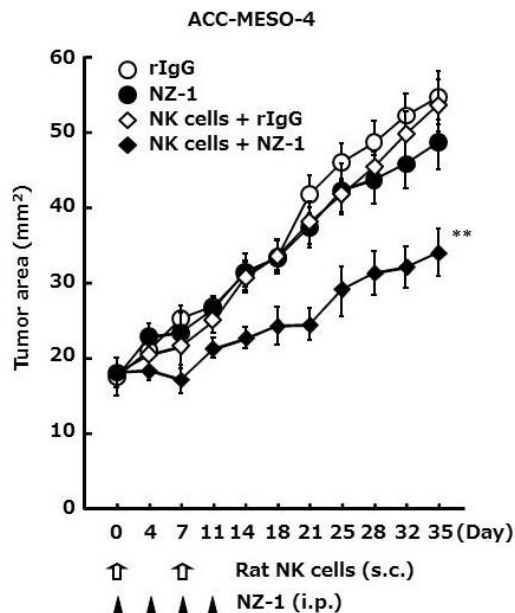


図2 SCIDマウス皮下移植モデルによるNZ-1の抗腫瘍効果. SCIDマウス皮下にACC-MESO-4(4x10⁶細胞)を移植し14日目からNZ-1による抗体治療を開始した (100µg/回)。治療開始日をday 0とし、day 0, 4, 7, 11日にNZ-1を腹腔内投与した。また、day 0と7に、ラットNK細胞を1x10⁵細胞を皮下腫瘍周囲に投与した。

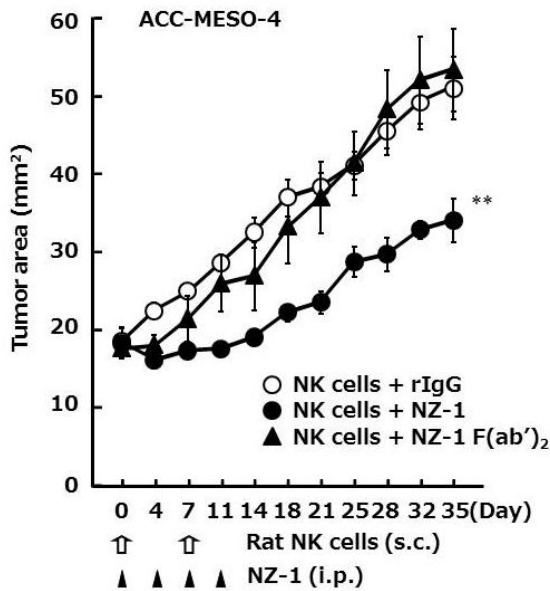


図3 NZ-1抗体による抗腫瘍効果にはFc部分が重要である。NZ-1抗体のFc部分を除去したF(ab')₂を作製し、図2と同様に治療実験を行った。その結果、F(ab')₂には抗腫瘍効果を認めなかった。

NZ-1 による抗腫瘍効果が、ADCC を介した作用である事を確認するため、NZ-1 のFc部分を除去した F(ab')₂ を作製した。図2と同様に SCID マウスモデルにおける抗腫瘍効果を検討した結果、F(ab')₂ には抗腫瘍効果を認めなかった (図3)。以上の結果は、NZ-1 が ADCC を介して抗腫瘍効果を発揮していることを示唆している。

また SCID マウス移植モデルにおいて、蛍光標識した NZ-1 を投与し、腫瘍集積性を検討したところ、3 週間にわたって高い腫瘍集積性を示した (図4)。

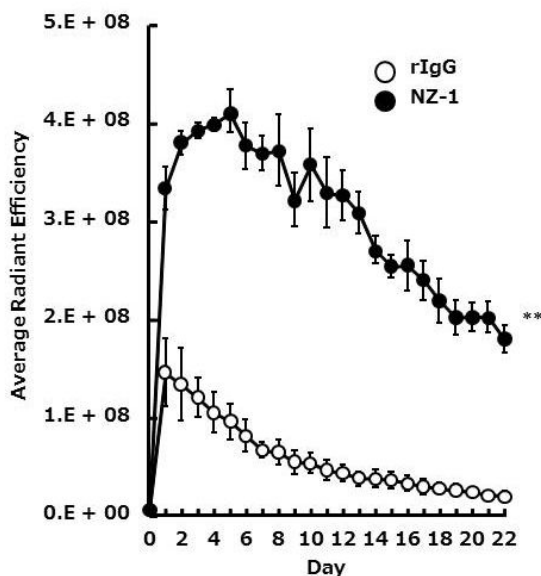


図4 SCIDマウス皮下移植ACC-MESO-4に対する蛍光標識NZ-1の集積性。蛍光標識NZ-1抗体およびコントロール抗体をマウス尾静脈より投与し、IVIS spectrumにて腫瘍集積を解析した。***p*<0.01 vs control.

臨床応用可能な抗体作製のため、ヒトキメラ抗体 NZ-8 を作製した。NZ-8 を用いて、正常組織でポドプラニンを発現する肺 (肺胞上皮細胞) と腎 (ポドサイト) に対する親和性を免疫染色にて比較検討した。対象に市販の抗ポドプラニン抗体 D2-40 を使用した。その結果、D2-40 は肺組織におけるリンパ管を染色するものの、NZ-8 では染色性が極めて弱く、また肺胞上皮やポドサイトは染色されなかった (図5)。

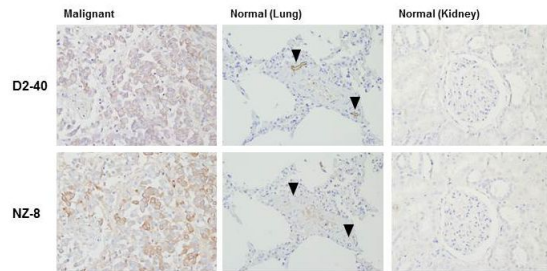


図5 悪性胸膜中皮腫、正常肺、正常腎組織におけるD2-40とNZ-8の染色性。各組織に対してD2-40 (1:500) とNZ-8 (0.1 μg/ml)を用いて、免疫染色を行った。D2-40では正常リンパ管を強く染色したが、ADCC活性を誘導し得る濃度のNZ-8はリンパ管を染色しなかった。

NZ-8 と NZ-1 の抗腫瘍効果に関する比較検討を行ったところ、NZ-8 は NZ-1 に比較して有意に高いヒトNK細胞によるADCC活性誘導能を示した。さらに、SCID マウス xenograft モデルにおける検討においても、NZ-8 は NZ-1 に比較して高い抗腫瘍効果を示した (図6)。

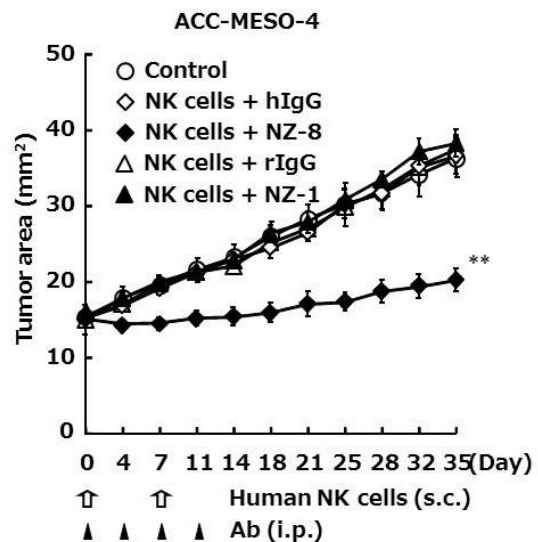


図6 NZ-8とNZ-1の抗腫瘍効果の比較。図2と同様にACC-MESO-4を用いてSCIDマウスモデルを作製した。NZ-8はNZ-1に比較して有意に高い抗腫瘍効果を示した。

さらに、NZ-8 より高い抗腫瘍効果を示す NZ-12 を作製した。

一方、抗体療法の抗腫瘍効果に関連する免疫学的バイオマーカーの探索のため、NZ-1 抗体で治療前後の SCID マウス皮下移植腫瘍組織における遺伝子発現解析から、S100A8 や

S100A9 を始めとするいくつかの候補遺伝子を同定した。

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 16 件)

Hanibuchi M, Kim SJ, Fidler IJ, Nishioka Y. The molecular biology of lung cancer brain metastasis: an overview of current comprehensions and future perspectives. *J Med Invest*, 査読有、61 巻、2014、241-253、Nishioka Y. New wave of immunotherapy against lung cancer rolls in to clinic. *Transl Lung Cancer Res*, 査読無、3 巻、2014、1、doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2013.12.02. Matsuo T, Dat LT, Komatsu M, Yoshimaru T, Daizumoto K, Sone S, Nishioka Y, Katagiri T. Early Growth Response 4 Is Involved in Cell Proliferation of Small Cell Lung Cancer through Transcriptional Activation of Its Downstream Genes. *PLoS ONE*, 査読有、9 巻、2014、e113606、doi: 10.1371/journal.pone.0113606.

Huang J, Tabata S, Kakiuchi S, Goto H, Hanibuchi M, Nishioka Y. Identification of pregnancy-associated plasma protein A as a migration-promoting gene in malignant pleural mesothelioma cells: a potential therapeutic target. *Oncotarget*, 査読有、4 巻、2013、1172-1184、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*, 査読有、190 巻、2013、6239-6249、doi: 10.4049/jimmunol.1300448.

Mitsuhashi A, Goto H, Kuramoto T, Tabata S, Yukishige S, Abe S, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Saijo A, Aono Y, Uehara H, Yano S, Ledford JG, Sone S, Nishioka Y. Surfactant protein A suppresses lung cancer progression by regulating the polarization of tumor-associated macrophages. *Am J Pathol*, 査読有、182 巻、2013、1843-1853、doi: 10.1016/j.ajpath.2013.01.030.

Yamada T, Takeuchi S, Fujita N, Nakamura A, Wang W, Li Q, Oda M, Mitsudomi T, Yatabe Y, Sekido Y, Yoshida J, Higashiyama M, Noguchi M, Uehara H, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Akt kinase-interacting protein1, a novel therapeutic target for lung cancer with EGFR-activating and gatekeeper mutations. *Oncogene*, 査読有、32 巻、2013、4427-4435、doi: 10.1038/onc.2012.446.

Sato S, Hanibuchi M, Kuramoto T,

Yamamori N, Goto H, Ogawa H, Mitsuhashi A, Van TT, Kakiuchi S, Akiyama SI, Nishioka Y, Sone S. Macrophage stimulating protein promotes liver metastases of small cell lung cancer cells by affecting the organ microenvironment. *Clin Exp Metastasis*, 査読有、30 巻、2013、333-344、doi: 10.1007/s10585-012-9540-y.

Nishioka Y. Malignant pleural effusion: further translational research is crucial. *Transl Lung Cancer Res*, 査読無、1 巻、2012、167-169、doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2012.09.06.

Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yamada T, Koizumi H, Nakamura T, Matsumoto K, Mukaida N, Nishioka Y, Sone S, Nakagawa T, Uenaka T, Yano S. Met kinase inhibitor E7050 reverses three different mechanisms of hepatocyte growth factor-induced tyrosine kinase inhibitor resistance in EGFR mutant lung cancer. *Clin Cancer Res*, 査読有、18 巻、2012、1663-1671、doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1171.

Gabr AG, Goto H, Hanibuchi M, Ogawa H, Kuramoto T, Suzuki M, Saijo A, Kakiuchi S, Trung VT, Sakaguchi S, Moriya Y, Sone S, Nishioka Y. Erlotinib prevents experimental metastases of human small cell lung cancer cells with no epidermal growth factor receptor expression. *Clin Exp Metastasis*, 査読有、29 巻、2012、207-216、doi: 10.1007/s10585-011-9443-3.

Van TT, Hanibuchi M, Goto H, Kuramoto T, Yukishige S, Kakiuchi S, Sato S, Sakaguchi S, Dat le T, Nishioka Y, Akiyama S, Sone S. SU6668, a multiple tyrosine kinase inhibitor, inhibits progression of human malignant pleural mesothelioma in an orthotopic model. *Respirology*, 査読有、17 巻、2012、984-990、doi: 10.1111/j.1440-1843.2012.02193.x.

Tabata S, Ikeda R, Yamamoto M, Furukawa T, Kuramoto T, Takeda Y, Yamada K, Haraguchi M, Nishioka Y, Sone S, Akiyama S. Thymidine phosphorylase enhances reactive oxygen species generation and interleukin-8 expression in human cancer cells. *Oncol Rep*, 査読有、28 巻、2012、895-902、doi: 10.3892/or.2012.1887.

Takeuchi S, Wang W, Li Q, Yamada T, Kita K, Donev IS, Nakamura T, Matsumoto K, Shimizu E, Nishioka Y, Sone S, Nakagawa T, Uenaka T, Yano S. Dual inhibition of Met kinase and angiogenesis to overcome HGF-induced EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer. *Am J Pathol*, 査読有、181 巻、2012、1034-1043、doi: 10.1016/j.ajpath.2012.05.023.

Kaneko MK, Kunita A, Abe S, Tsujimoto Y, Fukayama M, Goto K, Sawa Y, Nishioka Y, Kato Y. Chimeric anti-podoplanin antibody

suppresses tumor metastasis through neutralization and antibody-dependent cellular cytotoxicity. Cancer Sci, 査読有、103 巻、2012、1913-1919、doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02385.x.
Kuramoto T, Goto H, Mitsuhashi A, Tabata S, Ogawa H, Uehara H, Saijo A, Kakiuchi S, Maekawa Y, Yasutomo K, Hanibuchi M, Akiyama SI, Sone S, Nishioka Y. Dll4-Fc, an inhibitor of Dll4-Notch signaling, suppresses liver metastasis of small cell lung cancer cells through the downregulation of the NF-kappa-B activity. Mol Cancer Ther, 査読有、11 巻、2012、2578-2587, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0640.

〔学会発表〕(計 68 件)

西岡安彦、がん免疫療法の過去と未来：エビデンスが示した新たな可能性、第 62 回日本口腔学会中国・四国地方部会(特別講演)、2014 年 10 月 25 日、徳島大学歯学部(徳島県・徳島市)

加藤幸成、西岡安彦他、がん特異的抗ポドプラニン抗体の樹立、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

加藤幸成、西岡安彦、血小板凝集因子 Podoplanin に対するがん特異的抗体の開発、第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会、2014 年 7 月 11 日、金沢市文化ホール(石川県・金沢市)

西岡安彦、がん分子標的治療の基礎と臨床、平成 25 年度徳島臨床細胞学会総会および学術集会(特別講演)、2014 年 3 月 6 日、徳島県総合健診センター(徳島県・徳島市)

西岡安彦、Translational Research、第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会(教育講演)、2013 年 8 月 30 日、仙台国際センター(茨城県・仙台市)

西岡安彦、がん分子標的治療の基礎と臨床、日本放射線腫瘍学会第 15 回放射線腫瘍学夏季セミナー(教育講演)、2013 年 8 月 3 日、あわぎんホール・徳島県郷土文化会館(徳島県・徳島市)

阿部真治、加藤幸成、西岡安彦他、ヒト NK 細胞を介した抗ポドプラニン抗体 NZ-8 の悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果、第 53 回日本呼吸器学会学術講演会、2013 年 4 月 21 日、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

西岡安彦、加藤幸成他、悪性胸膜中皮腫に対するラット ヒトキメラ型抗ポドプラニン抗体 NZ-8 の抗腫瘍効果、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日、ロイトン札幌(北海道・札幌市)

加藤幸成、西岡安彦他、抗ポドプラニン抗体による転移抑制効果の検討、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日、ロイトン札幌(北海道・札幌市)

Yasuhiko Nishioka、Hisatsugu Goto、Soji Kakiuchi、Yukinari Kato 他、Antitumor effects of anti-podoplanin antibody NZ-1 against malignant mesothelioma、14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society、2012 年 9 月 3 日、Brisbane, Australia

西岡安彦、加藤幸成他、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学術集会、2012 年 6 月 28 日、西日本総合展示場(福岡県・北九州市)

加藤幸成、西岡安彦他、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学術集会、2012 年 6 月 28 日、西日本総合展示場(福岡県・北九州市)

Yasuhiko Nishioka、Hisatsugu Goto、Yukinari Kato 他、Antitumor effects of anti-podoplanin antibody NZ-1 against malignant mesothelioma via ADCC、ATS 2012 International Conference、2012 年 5 月 23 日、San Francisco, CA

〔図書〕(計 2 件)

柿内聡司、医歯薬出版、肺がん・禁煙指導・禁煙支援、2014、pp224(pp65-67)

西岡安彦、日経メディカル開発、肺癌、今日の診療のために ガイドライン外来診療 2015、2015、pp694(pp570-572)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西岡 安彦(NISHIOKA, Yasuhiko)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：70274199

(2) 研究分担者

加藤 幸成(KATO, Yukinari)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00571811

柿内 聡司(KAKIUCHI, Soji)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：50380100

後東 久嗣(GOTO, Hisatsugu)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：00437641