

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460189

研究課題名(和文)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の開発

研究課題名(英文) Development of a novel targeting therapy using anti-podoplanin antibody against malignant pleural mesothelioma

研究代表者

阿部 真治 (ABE, Shinji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：00403717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アスベストの暴露により発生する悪性胸膜中皮腫は治療が困難な悪性腫瘍の一つであり、新しい治療法の開発が望まれています。今回、悪性胸膜中皮腫に特異的に発現しているポドプラニンと呼ばれる蛋白質を標的とした新しい抗体医薬の開発を目的として検討を行いました。その結果、我々が開発した特異的抗ポドプラニン抗体は免疫細胞の働きを介して癌細胞に障害を与えることが認められました。今回検討した抗ポドプラニン抗体を基盤とした新しい抗体医薬を開発することにより、悪性胸膜中皮腫の治療成績改善に大きく寄与する可能性があると考えられます。

研究成果の概要(英文)：Malignant pleural mesothelioma (MPM) is mainly caused by exposure to asbestos, develops in the pleural cavity with a high likelihood of malignancy. Development of novel therapies for MPM is warranted in order to improve very poor prognosis. In this study, we investigated whether anti-human podoplanin antibodies can induce antitumor effects in MPM. Using podoplanin positive human MPM cell lines, anti-human podoplanin antibodies with NK cells induced significant antitumor effect. Our results strongly suggest that anti-human podoplanin antibodies might provide an efficacious therapeutic strategy for the treatment of MPM.

研究分野：臨床薬学

キーワード：トランスレーショナルリサーチ 抗体医薬 ADCC ポドプラニン 個別医療 悪性胸膜中皮腫

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫はアスベスト暴露により誘発される難治性の悪性腫瘍であり、今後我が国における症例数ならびに死亡者数の急激な増加が予想されている。現在は外科的切除、化学療法、放射線療法などが標準治療として行われているが、治療抵抗性の悪性腫瘍であるため、既存療法で十分な治療効果をあげる事は非常に困難である。そのため臨床現場では腫瘍特異的免疫療法を代表とする新規治療法の早期確立が求められている。

腫瘍特異的免疫療法には樹状細胞療法や抗体療法などが含まれるが、いずれにおいても標的がん抗原の選択が治療法開発の上で最も重要であり、腫瘍特異的に高発現で増殖・進展に關与するがん抗原が臨床上的有用性が高いと考えられている。ポドプラニン¹は血小板凝集に關与する型膜貫通糖蛋白質であり、悪性胸膜中皮腫や神経膠芽腫など様々な悪性腫瘍で特異的に高発現し、腫瘍の転移・浸潤に關与している。本研究開始までにポドプラニンを標的とした特異的免疫療法についての報告はほとんどなかったが、我々の研究グループでは新規に開発した特異的抗ポドプラニン抗体が神経膠芽腫に対して抗腫瘍効果を誘導することを報告していた (Cancer Sci. 103, 1913-1919, 2012)。したがって、この特異的抗ポドプラニン抗体を悪性胸膜中皮腫に対して応用することで、新たな抗体療法の開発につながると考えられた。

2. 研究の目的

悪性胸膜中皮腫は今後の症例数増加が予想される難治性の悪性腫瘍であるため、早期に新規治療法を確立することが求められている。したがって本研究課題では、我々が作成した特異的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について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) の観点から詳細に検討し、ポドプラニン陽性の悪性胸膜中皮腫患者に対する新規抗体医薬の開発および新たな個別医療の提供につなげていくことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は臨床応用を目指したトランスレーショナルリサーチの前臨床試験段階の研究として、研究代表者と胸部悪性腫瘍の治療を専門とする呼吸器内科医師である研究分担者が協力して実施した。特異的抗ポドプラニン抗体として我々の研究グループの一員である研究協力者が開発したラット抗ポドプラニン抗体 NZ-1、および NZ-1 を基に作成したヒトキメラ型抗ポドプラニン抗体 NZ-8 を使用した。

(1) 悪性胸膜中皮腫におけるポドプラニン発現の検出

ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株におけるポドプラニン発現をフローサイトメトリーにて検出した。また、ヒト悪性胸膜中皮腫組織アレイを用い、免疫染色法によって臨床組織におけるポドプラニンの発現頻度及び発現レベルを検出した。いずれの検討においてもポドプラニンの検出抗体として、他の悪性腫瘍におけるポドプラニン発現の検出に既に用いられている NZ-1 を用いた。

(2) 悪性胸膜中皮腫細胞に対する抗ポドプラニン抗体の ADCC 活性および CDC 活性の測定

特異的抗ポドプラニン抗体の抗腫瘍効果を明らかにするために *in vitro* で ADCC 活性ならびに CDC 活性を測定した。ADCC 活性はマウス脾細胞、ラット脾細胞および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て用いた。健常成人からの採血は医師である研究分担者が行った。採取されたエフェクター細胞と特異的抗ポドプラニン抗体を ⁵¹Cr にて標識したヒト悪性胸膜中皮腫細胞と一定時間共培養し、腫瘍細胞の障害により上清中に放出された ⁵¹Cr をカウンターにて測定した。また、CDC 活性の測定では補体としてラビット血清由来補体を用いた。

(3) 悪性胸膜中皮腫移植マウスモデルにおける抗ポドプラニン抗体の抗腫瘍効果の検討

抗ポドプラニン抗体の *in vivo* における抗腫瘍効果を検討するため、悪性胸膜中皮腫皮下移植マウスモデルと悪性胸膜中皮腫胸腔内移植マウスモデルを作製し、実験に用いた。皮下移植マウスモデルを用いた検討では悪性胸膜中皮腫細胞株を皮下に移植した後、ある一定の大きさに腫瘍が成長した時点から抗ポドプラニン抗体を腹腔内に、ADCC 活性誘導に必要なエフェクター細胞を腫瘍近傍の皮下に投与し、皮下腫瘍のサイズ変化を測定した。さらに蛍光標識した特異的抗ポドプラニン抗体を投与し、*in vivo* イメージングシステムにより腫瘍組織への抗体の集積について検討した。また、同所移植マウスモデルを用いた検討では、胸腔内に悪性胸膜中皮腫細胞株を移植した後に抗ポドプラニン抗体とエフェクター細胞を投与し、一定期間経過後の胸腔内腫瘍重量と胸水産生量を測定した。

4. 研究成果

(1) 悪性胸膜中皮腫におけるポドプラニンの発現

ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株におけるポドプラニン発現を検討したところ、15 株中 11 株 (73%) でポドプラニン発現が認められた。また、5 株 (33%) が強発現株であった。さら

にヒト悪性胸膜中皮腫組織アレイを用いて臨床検体における発現率を検討したところ、33例中36例(92%)でポドプラニンの発現が認められた。今回の結果は他の研究グループの報告とほぼ同等であり、ヒト臨床組織でも高発現することよりポドプラニンは悪性胸膜中皮腫における治療標的として有望であることが明らかとなった。

(2) 悪性胸膜中皮腫細胞に対する抗ポドプラニン抗体の ADCC 活性および CDC 活性の測定

ラット抗ポドプラニン抗体 NZ-1 の ADCC 活性について、一般的な ADCC 活性スクリーニングに用いられるヒト MNC (末梢血単核球) およびマウス脾細胞をエフェクター細胞として検討したところ、ADCC 活性は全く検出できなかった。しかし、この抗体がラット IgG 由来であるため、ラット脾細胞をエフェクター細胞として用いたところ、強い ADCC 活性の誘導が認められた (図 1)。

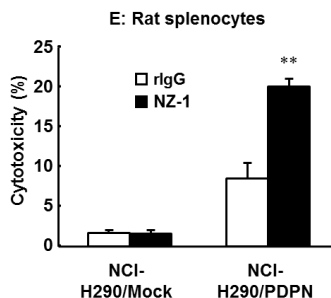


図1 NZ-1によるADCC 活性

誘導される ADCC 活性の強さは標的となる細胞株のポドプラニン発現量に相関しており、ポドプラニン強発現悪性胸膜中皮腫細胞株において強い ADCC 活性の誘導が認められた。NZ-1 による ADCC 活性は抗体濃度、エフェクター細胞とターゲット細胞の存在比 (E/T)、時間依存的に誘導された。NZ-1 による CDC 活性は一部の細胞株でのみ検出できた。

続いて、この NZ-1 を基に作成したヒトキメラ型抗ポドプラニン抗体である NZ-8 について検討した。その結果、ヒト MNC をエフェクター細胞として用いたところ、ポドプラニン陽性悪性胸膜中皮腫細胞株に対する強い ADCC 活性の誘導が認められた (図 2)。

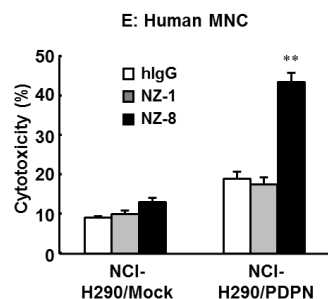


図2 NZ-8によるADCC 活性

マグネットマイクロビーズでヒト MNC から NK

細胞を分離して検討したところ。この NZ-8 による ADCC 活性はヒト MNC 中の NK 細胞によって誘導されることが明らかとなった。また、CDC 活性は NZ-8 の処置により多くのポドプラニン陽性悪性胸膜中皮腫細胞株において誘導された。通常、抗体医薬のシーズとなる特異的抗体のスクリーニングでは将来のヒトへの臨床応用やマウスを用いた前臨床試験への応用に直結するようにヒトとマウスのエフェクター細胞を用いて行われる。このスクリーニングで抗腫瘍活性が検出されない場合、通常その抗体は有望なシーズとはならないと判断されるが、今回の検討ではラット由来の抗体であったことを考慮し、ラットのエフェクター細胞を用いた検討を追加したところ強い ADCC 活性を検出することができた。抗体開発技術の著しい発展により、ADCC 活性が認められた抗体を改変し、効果増強を図ることは容易であり、本研究においても NZ-1 で ADCC 活性誘導が認められたため、ヒトへの応用が可能な NZ-8 を開発することができた。

(3) 悪性胸膜中皮腫移植モデルにおける抗ポドプラニン抗体の抗腫瘍効果の検討

悪性胸膜中皮腫皮下移植マウスモデルを作成し、NZ-1 の抗腫瘍効果を検討したところラット NK 細胞との併用投与で有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。この効果は NZ-1 もしくはラット NK 細胞の単独投与では認められなかった。また、蛍光標識した NZ-1 を皮下移植マウスモデルに投与し、in vivo イメージングシステムで検出したところ、腫瘍組織周辺へ抗体が長期間蓄積することが明らかとなった。さらに悪性胸膜中皮腫皮下移植モデルを用いて NZ-8 の抗腫瘍効果を検討したところ、ヒト NK 細胞との併用により有意な抗腫瘍効果が認められた。以上の結果より皮下移植モデルにおける抗ポドプラニン抗体の抗腫瘍効果誘導が明らかとなったため、悪性胸膜中皮腫の実際の臨床像により近い悪性胸膜中皮腫胸腔内移植マウスモデルを作成して検討を行った。その結果、NZ-1 とラット NK 細胞の併用投与によって胸腔内移植マウスモデルにおいても腫瘍増殖や胸水産生の抑制が認められた (図 3)。

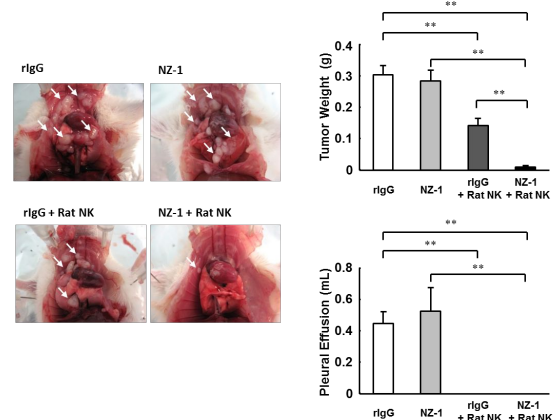


図3 胸腔内移植マウスモデルにおけるNZ-1の抗腫瘍効果

また、NZ-8 とヒト NK 細胞の併用投与によっても同様に胸腔内移植モデルにおいて抗腫瘍効果が認められた。皮下移植マウスモデルおよび胸腔内移植マウスモデルのいずれにおいても抗ポドプラニン抗体とエフェクター細胞の併用投与が抗腫瘍効果の誘導に必要であったことより、*in vivo* においても抗ポドプラニン抗体は ADCC 活性を介して抗腫瘍効果を誘導していることが示唆された。

以上の結果より、我々は抗ポドプラニン抗体が ADCC 活性を介してポドプラニン陽性悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果を誘導することを明らかにした。悪性胸膜中皮腫は今後の症例数増加が予想される悪性腫瘍で、既存の治療法には抵抗性を有しているため、今回開発した抗ポドプラニン抗体を基盤とした新規抗体医薬の開発は悪性胸膜中皮腫の治療成績改善に大きく寄与する可能性があると考えられる。

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)

Kato Y, Kunita A, Abe S, Ogasawara S, Fujii Y, Oki H, Fukayama M, Nishioka Y, Kaneko MK. The chimeric antibody chLpMab-7 targeting human podoplanin suppresses pulmonary metastasis via ADCC and CDC rather than via its neutralizing activity. *Oncotarget*. 6: 36003-36018, 2015. DOI: 10.18632/oncotarget.5339 (査読有り)

[学会発表](計 5 件)

和泉俊尋, 阿部真治, 佐藤智恵美, 岡田直人, 加藤幸成, 西岡安彦, 川添和義: 悪性胸膜中皮腫同所移植マウスに対する抗ポドプラニン抗体 NZ-12 とペメトレキセドの併用効果の検討 第 136 回日本薬学会年会, 2016 年 3 月 28 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)。

阿部真治, 加藤幸成, 金子美華, 大塚憲司, 後東久嗣, 埴淵昌毅, 西岡安彦: 新規ヒトキメラ型抗ポドプラニン抗体 NZ-12 の悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果 第 74 回日本癌学会総会, 2015 年 10 月 9 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)。

阿部真治, 土橋有希, 佐藤智恵美, 山本香織, 宮本理人, 土屋浩一郎, 東満美, 西岡安彦: 悪性胸膜中皮腫胸腔内移植マウスに対するヒト・キメラ型抗ポドプラニン抗体 NZ-8 の効果 第 135 回日本薬学会年会, 2015 年 3 月 27 日, 神戸学院大学 (兵庫県神戸市)。

阿部真治, 加藤幸成, 金子美華, 東満美,

後東久嗣, 埴淵昌毅, 西岡安彦: 悪性胸膜中皮腫同所移植モデルにおける抗ポドプラニン抗体の抗腫瘍効果 第 54 回日本呼吸器学会, 2014 年 4 月 25 日, リーガロイヤルホテル (大阪府大阪市)。

阿部真治, 木宿昌俊, 中瀬真理, 佐藤智恵美, 柴田洋文, 川添和義, 東満美, 西岡安彦, 水口和生: 悪性胸膜中皮腫移植マウスに対する NZ-1 およびラット NK 細胞併用投与の抗腫瘍効果 第 134 回日本薬学会年会, 2014 年 3 月 29 日, 熊本大学 (熊本県熊本市)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 真治 (ABE, Shinji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 00403717

(2) 研究分担者

西岡 安彦 (NISHIOKA, Yasuhiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 70274199