

対象研究テーマ：中皮腫の同所移植モデルを用いた進展機構解明と標的分子の探索

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：悪性胸膜中皮腫に対する特異的免疫療法の開発

研究代表者：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授 西岡安彦

#### 研究成果の概要：

悪性胸膜中皮腫（malignant pleural mesothelioma: MPM）に高発現するポドプラニン分子に注目し、ラット抗ヒトポドプラニン抗体NZ-1およびそのヒト・キメラ抗体NZ-8のMPMに対する特異的免疫療法の可能性を検討した。MPM細胞株および腫瘍組織におけるポドプラニン抗原は、細胞株では73% (11/15)、腫瘍組織では92% (33/36)に発現を認めた。NZ-1およびNZ-8はポドプラニン発現MPM細胞に対して、高い抗体依存性細胞傷害活性（antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC）を示した。エフェクター細胞の解析では、NK細胞にADCC活性を認めたが、単球はADCC活性を示さなかった。以上からNZ-1およびNZ-8のADCCにはNK細胞が重要であることが明らかとなった。NZ-8はヒト単核球をエフェクター細胞とした場合、NZ-1に比較して有意に高いADCC活性を示した。補体依存性細胞傷害活性（complement-dependent cytotoxicity: CDC）についても、NZ-8はNZ-1に比較して高い活性を示した。ACC-MESO-4細胞のSCIDマウス皮下移植系を用いた検討では、ヒトNK細胞とNZ-8を投与した群に有意に腫瘍増殖抑制効果が確認された。また、NZ-8は他の抗ポドプラニン抗体D2-40とは認識エピトープが異なっており、正常細胞よりMPMに発現するポドプラニン分子を認識しやすい特徴を有していた。以上から、ヒト・キメラ抗ポドプラニン抗体NZ-8を用いた臨床応用の可能性が示唆された。

#### 研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：悪性胸膜中皮腫、ポドプラニン、抗体、ADCC

##### 1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫（malignant pleural mesothelioma: MPM）は化学療法や放射線療法に抵抗性で、診断後の平均生存期間が1年と予後不良の疾患であることから新規治療法の開発が望まれている。我々はMPMに対する特異的免疫療法の開発の視点から、抗体療法に注目し検討を進めてきた。これまでにMPMに高発現する細胞膜蛋白であるポドプラニンに対する抗体を作製し、その抗体がADCC活性を有することから臨床応用を視野に検討を進めている。一方、連携研究者の矢野聖二教授らは前臨床研究に有用なMPMの同所移植モデルを開発し、MPMに対する治療研究を進めている。

##### 2. 研究の目的

本研究では、臨床応用の視点からヒト・キメラ抗体およびヒト化抗体を用いてMPM治療のための前臨床研究を行うことを目的とする。特に、抗ポドプラニン抗体NZ-1のヒト・キメラ抗体を作製し、MPMに対する抗腫瘍

活性を検討することを目的とした。

##### 3. 研究の方法

ヒトIgG1のFc部分を融合させたラット・ヒトキメラ抗体NZ-8を共同研究（山形大学、加藤幸成博士）にて作製し、ヒト末梢血単核球を用いて<sup>51</sup>Cr遊離試験にてADCC活性を検討した。同時にウサギ補体を用いてCDC活性を検討した。また、SCIDマウスの皮下に移植したMPM細胞株ACC-MESO-4に対して、NZ-8とNK細胞を投与し抗腫瘍効果を検討した。一方、MPMにおけるポドプラニン分子の発現について、細胞株を用いたフローサイトメトリー法と腫瘍組織の免疫染色法にて検討した。正常組織に発現するポドプラニン分子に対する認識を、市販の抗ポドプラニン抗体D2-40と比較検討した。

##### 4. 研究成果

(1) MPM細胞株および腫瘍組織におけるポドプラニン抗原発現は、細胞株では73% (11/15)、腫瘍組織では92% (33/36)に発現を認めた。

(2) NZ-8 はヒト末梢血単核球をエフェクター細胞として高いADCC活性を示した。このADCC活性は NZ-1 に比較して有意に高かった。また、エフェクター細胞の解析では、NK細胞が重要であることが明らかとなった。

(3) NZ-8 は NZ-1 に比較して有意に高い CDC 活性を示した。

(4) SCID マウスモデルでは、NZ-8 はヒト NK 細胞と同時に投与された場合に、腫瘍増殖抑制効果を示した。その抗腫瘍効果は NZ-1 に比較して有意に高かった。

(5) NZ-8 は、D2-40 と比較して正常組織より MPM に発現するポドプラニン分子を認識しやすい傾向を認めた。

#### 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 7 件)

1. Van TT, Hanibuchi M, Goto H, Kuramoto T, Yukishige S, Kakiuchi S, Sato S, Sakaguchi S, Dat LT, Nishioka Y, Akiyama SI, Sone S. SU6668, a multiple tyrosine kinase inhibitor, inhibits progression of human malignant pleural mesothelioma in an orthotopic model. **Respirology** 17(6):984-990, 2012.
2. Nishioka Y. Malignant pleural effusion: further translational research is crucial. **Transl Lung Cancer Res** 1(3):167-169, 2012.
3. 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** 181(3): 1034- 1043, 2012.
4. 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** 103(11):1913-1919, 2012.
5. 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** 18(6):1663-1671, 2012.
6. 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 S, Sone S, Minakuchi K, Kato Y, Nishioka Y. A novel targeting therapy of malignant mesothelioma using anti-podoplanin antibody. **J Immunol**. 2013 (in press)

7. 西岡安彦. がん分子標的治療における一体化開発の現状と展望. がん分子標的治療 10(4):267-275, 2012.

[学会発表] (計 5 件)

1. Nishioka Y, Abe S, Kaneko MK, Aono Y, Huang J, Goto H, Kishuku M, Hanibuchi M, Sone S, Minakuchi K, Kato Y. Antitumor effects of anti-podoplanin antibody NZ-1 against malignant mesothelioma via ADCC. **American Thoracic Society 2012 International Conference**, San Francisco, U.S.A., 2012.5.23
2. Nishioka Y, Abe S, Morita Y, Kaneko MK, Hanibuchi M, Goto H, Kakiuchi S, Aono Y, Huang J, Mitsuhashi A, Sato S, Minakuchi K, Kato Y. Antitumor effects of anti-podoplanin antibody NZ-1 against malignant mesothelioma. **14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society, Brisbane, Australia**, 2012. 9.3
3. Nishioka Y, Abe S, Kishuku M, Kawazoe K, Huang J, Hanibuchi M, Minakuchi K, Sone S, Kato Y. Antitumor effects of anti-podoplanin rat-human chimeric antibody NZ-8 against malignant mesothelioma. **第71回日本癌学会学術総会、札幌**、2012.9.19
4. 埴淵昌毅、阿部真治、加藤幸成、金子美華、川添和義、黄俊、三橋惇志、水口和生、西岡安彦. 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53回日本肺癌学会総会、岡山**、2012.11.9
5. 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ニン抗体療法 of の検討. **第25回日本バイオセラピー学会学術集会総会、倉敷**、2012.12.14

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授 西岡安彦

(2) 研究分担者

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・准教授 埴淵昌毅  
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・講師 柿内聡司  
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・講師 後東久嗣

(3) 本研究所担当者

腫瘍内科・教授 矢野聖二