

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

「抗癌薬の有害事象・効果関連分子の解明と臨床応用を目指した研究」に関する研究
（抗体治療の感受性研究）

分担研究者 小泉 史明 国立がん研究センター研究所 ユニット長

研究要旨

乳癌をはじめとするHER2蛋白の発現を伴う悪性腫瘍では、HER2を標的としたTrastuzumabなどの抗体療法が広く用いられている。我々は、その抗腫瘍効果が抗体依存性細胞障害（Antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC）が主たる役割を果たしていることを示してきた。しかしながら、個々人における抗体療法の治療効果を予測する、明らかなバイオマーカーは現在までに見つかっていない。Fcγ receptorの一遺伝子多型が最も報告が多いものの、以前その有用性に関しては議論が分かれるところである。

このため、我々は個々人でADCC活性が異なるという仮説の元、健常人におけるADCC活性の個人差が、日間格差や測定系に依存せず再現されることを示した。さらに、日立化成株式会社との共同研究により、末梢血をIgG刺激した際のサイトカイン・ケモカイン変化を測定する系を確立した。この系を用い、Trastuzumabを含む乳癌術前化学療法患者において、特定のサイトカイン変化が治療効果と相関することを見いだした（米国特許出願）。

現在測定系の自動化、定量化を目指し、検体の自動加温冷却装置を開発中である。

A．研究目的

悪性腫瘍における抗体薬の作用機序には、直接作用、抗体依存性細胞障害（ADCC）、補体依存性細胞障害（CDC）の3つがあると考えられている。抗体療法は乳癌におけるTrastuzumab療法をはじめとして、様々な癌種において導入されており、近年ではADCC活性を高めた抗体製剤が開発されるなど、ADCCは非常に注目されている。しかしながら、ADCC活性を中心とした抗体療法の治療効果予測因子は現在までに同定されていない。このため、本研究ではADCC活性が個々人の白血球の能力に寄与するとの仮説のもと、ADCC活性の効果予測因子の同定を目的とした。

B．研究方法

・対象

健常人およびTrastuzumabを含む乳癌術前化学療法を受ける患者

・抗体薬

ハーセプチン（Trastuzumab, 抗HER2抗体, IgG1）

・ターゲット細胞

MCF-7（HER2陽性乳癌細胞株）

・エフェクター細胞

エフェクター細胞はCD16a（FcγR α）を強制発現させたNK細胞株であるNK92/CD16、または健常人ボランティアから得た末梢血単核球（PBMC）を用いた。

・ADCC活性

ADCC活性の測定はCalceinアッセイで行った。Calceinアッセイでは、抗体とエフェクター細胞の接触は4時間で評価された。

・治療効果

Trastuzumabを含む乳癌術前化学療法の治療効果として、病理学的寛解（pathological CR）の有無をprimary endpointとした。

（倫理面への配慮）

本研究は、健常人および乳癌患者の末梢血を用いるため、匿名化を行った上で実験者は患者の匿名化番号以外の臨床情報は得ることが出来ないこととした。血液検体の取り扱いには細心の注意を払い、実験終了後は直ちに廃棄した。匿名化番号と臨床データとの連結は、施錠されたロッカー内のPCで行われ、個人情報管理者以外の人間は関与できないものとした。

C．研究結果

【前年度までの成果】

昨年度までに大腸がんにおけるcetuximabのADCC活性が主たる治療効果をもたらすこと、また転移性乳癌においてTrastuzumabのADCC活性の重要性を報告してきた。これらの結果を受け、ADCC活性の効果予測因子の同定を目指し、以下の検討を行っている。

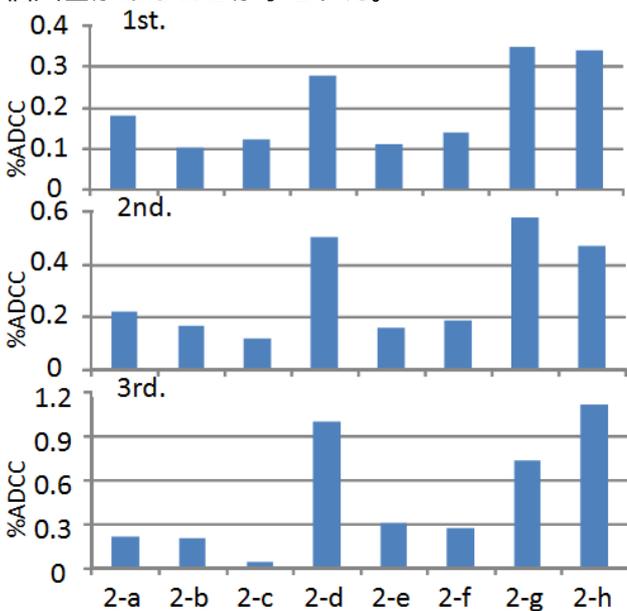
【本年度の成果】

・健常人におけるADCC活性の差

書面で同意を得た健常人より末梢血を採取、末梢血単核球（PBMC）を分離し、ADCC活性を見るためにMCF7をターゲット細胞としたcalcein assayを行った。計8名の健常人から、assay間で1ヶ月以上期間をあけ、3回検討を行った。またADCC活性に影響を及ぼす因子としてFcγRの一遺伝子多型の測定も行った。

図1に示すように、各時点でADCC活性が高い個体は経時的に見ても強く、また低い個体は常に低いことが

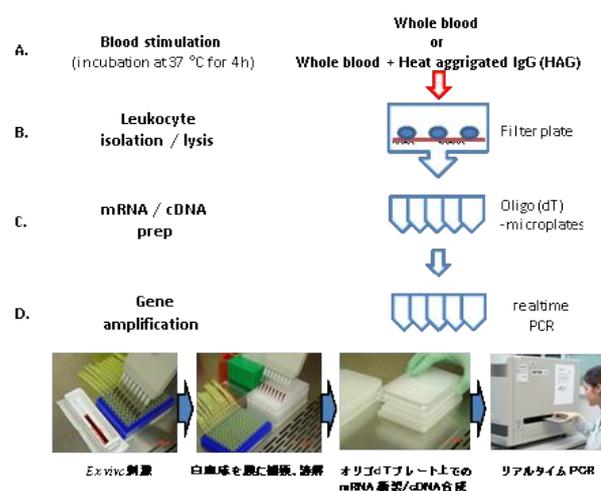
見て取れる。この個体差はFcγRの一遺伝子多型を考慮した上でも明らかな差として認められ、ADCC活性に個人差があることが示された。



(図1) 健常人におけるADCC活性

・ADCC活性の予測因子の同定

ADCC活性の個人差を予測する因子として、ADCCに関与するサイトカイン、ケモカインが存在するとの仮説の元、日立化成株式会社との共同研究により、同社の開発したHemA(+)システムを用いた定量的自動サイトカイン・ケモカインmRNA測定システムを確立した。同システムを用い、健常人のADCC活性とADCCと関連が疑われる14の遺伝子群の変化との相関を検討した。この結果、IL-6, CXCL3, TNFSF15の3遺伝子がADCC活性と相関を示し、ADCC活性の効果予測因子となり得ると考えられた。



(図2) HemA(+)システム

・乳癌術前化学療法での検討

同様に、trastuzumabを含む乳癌術前化学療法を受ける患者より、書面で同意を取得のうえ末梢血を採取、

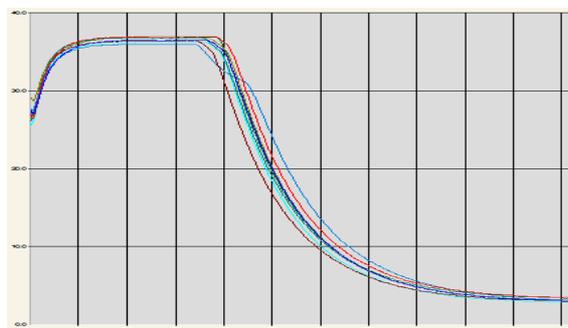
HemA(+)システムと臨床的治療効果(pCR)との相関を検討した。その結果、健常人での検討の結果と同様、4つの遺伝子群が臨床効果と相関を示した。本研究結果は現在論文投稿中である。

・安定した測定系の確立

上記検討を行う中で、末梢血のIgG刺激による測定誤差が生じる可能性、また操作が入ることによる誤差が生じる可能性が判明した。このため、刺激を全自動で行うシステムの開発を行った。本システムでは一度に4例分の採血管を一度に刺激することが可能であり、37度4時間、その後4度へ低下する。本システムを用いることにより多施設での採取、測定が可能であり、今後の臨床応用の可能性がある。



(図3) 自動加温冷却装置



(図4) 温度変化

D . 考察

抗体療法の抗腫瘍活性はADCCが重要であることを、様々な癌腫、様々な抗体製剤を用い、一貫して示してきた。ADCC活性の重要性は非常に注目されてきているものの、その作用機序や耐性機序、効果予測因子など不明な点は多い。我々が開発したシステムを用いることで効果予測が出来る可能性があるほか、検討から浮かび上がったサイトカイン、ケモカインから作用機序、耐性機序の解明に結びつく可能性があると考えられる。

E . 結論

抗体製剤のADCC活性は個人により異なり、時間によらず再現性があることが示された。乳癌の術前化学療法モデルにおいて、治療効果と相関のあるサイトカインを4つ見いだした。これらの結果を基に、ADCCの作用機序、耐性機序の解明などさらなる検討を行って

いく。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

1. Murakami, A., Takahashi, F., Nurwidya, F., Kobayashi, I., Minakata, K., Hashimoto, M., Nara, T., Kato, M., Tajima, K., Shimada, N., Iwakami, S., Moriyama, M., Moriyama, H., Koizumi, F., Takahashi, K. Hypoxia Increases Gefitinib-Resistant Lung Cancer Stem Cells through the Activation of Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor. PLoS One. 28;9(1):e86459, 2014.
2. Taniyama, TK., Nokihara, H., Tsuta, K., Horinouchi, H., Kanda, S., Fujiwara, Y., Yamamoto, N., Koizumi, E., Yunokawa, M., Tamura, T. Clinicopathological Features in Young Patients Treated for Small-Cell Lung Cancer: Significance of Immunohistological and Molecular Analyses. Clin Lung Cancer. 14. pii: S1525-7304(13)00257-X, 2013.
3. Watanabe, M., Uehara, Y., Yamashita, N., Fujimura, Y., Nishio, K., Sawada, T., Takeda, K., Koizumi, F., Koh, Y. Multicolor detection of rare tumor cells in blood using a novel flow cytometry-based system. Cytometry A. 85(3):206-13, 2013.
4. Nakadate, Y., Kodera, Y., Kitamura, Y., Tachibana, T., Tamura, T., Koizumi, F. Silencing of poly(A DP-ribose) glycohydrolase sensitizes lung cancer cells to radiation through the abrogation of DNA damage checkpoint. Biochem Biophys Res Commun. 29;441(4):793-8, 2013.
5. Nakadate, Y., Kodera, Y., Kitamura, Y., Shirasawa, S., Tachibana, T., Tamura, T., Koizumi, F. KRA S Mutation Confers Resistance to Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity of Cetuximab against Human Colorectal Cancer Cells. Int J Cancer. Epub ahead of print, 2013.
6. Murakami, H., Yamamoto, N., Koizumi, F., Nishio, K., Yusa, W., Koyama, N., Tamura, T. Phase 1 study of lenvatinib combined with carboplatin and paclitaxel in patients with non-small-cell lung cancer. Br J Cancer. 6;109(3):538-44, 2013.
7. Kondo, S., Ueno, H., Hosoi, H., Hashimoto, J., Morizane, C., Koizumi, F., Tamura, K., Okusaka, T. Clinical impact of pentraxin family expression on prognosis of pancreatic carcinoma. Br J Cancer. 6;109(3):739-46, 2013.

8. Katanasaka, Y., Kodera, Y., Kitamura, Y., Morimoto, T., Tamura, T., Koizumi, F. Epidermal growth factor receptor variant type III markedly accelerates angiogenesis and tumor growth via inducing c-myc mediated angiopoietin-like 4 expression in malignant glioma. Mol Cancer. 25;12:31, 2013.

H . 知的財産等の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし

