

難治性がんを標的とした新規免疫療法の開発

愛知県がんセンター研究所

腫瘍免疫学部 室長 桑原 一彦

愛知県がんセンター研究所

腫瘍免疫学部 部長 葛島 清隆

近年、がん治療の分野で分子標的薬の開発は目覚ましいものがあり、CD19 や PD-1 を標的とした抗体療法も着実な成果をあげている。本研究では、5年生存率の低い難治性がんに着目し、特に申請者らが開発した新規テクノロジー（GANP マウス）を用いた膵がん特異的モノクローナル抗体の樹立により、治療標的として有望なエピトープを同定することが第一の目標である。その後、ハイブリドーマから抗体遺伝子を単離し、一本鎖可変部領域（single-chain variable fragment, scFv）構造を発現するプラスミドを構築後、キメラ抗原受容体（chimeric antigen receptor, CAR）導入T細胞の作製を行う。最終的な目標は、モノクローナル抗体と CAR 導入 T 細胞による膵がん細胞傷害活性の確認である。

申請者らは、「GANP マウスを用いた、膵・胆管がんに対するモノクローナル抗体の作製と免疫診断・治療への応用」の課題名で愛知県がんセンター倫理審査委員会に倫理申請し、平成 26 年 8 月 21 日に申請許可を得た。当初、膵がんの手術検体（最低 5 例）から組織抽出物をプールして免疫原にする予定であった。しかし、膵がんの手術適応は限られ、検体の入手に問題が起こる可能性があり、免疫原の量を十分に確保できないことが危惧された。そこで免疫原に腹水穿刺を受ける膵がん患者さんの腹水中膵がん細胞を使用することとした。腹水中の EpCAM 陽性膵がん細胞は MACS 磁気細胞分離により調整することにし、胃がん細胞株 MKN45（EpCAM 陽性）と線維芽細胞株（EpCAM 陰性）を用いた予備実験により、膵がん細胞を分離するための条件を決定した。予備実験後、愛知県がんセンター中央病院消化器内科部の膵がん患者さんにインフォームドコンセントを実施し、同意の得られた患者さんの腹水穿刺時に腹水の提供を受けた。目標の 5 例には達せず、また腹水中のがん細胞数が予想よりも少なかったため、平成 26 年度中に免疫するために十分な細胞数が確保できなかった。引き続き、膵がん患者さん由来の腹水の提供をお願いしている段階である。

申請者らは、もう一つの難治性がんとして肺がんに着目し、肺がん組織抽出物を GANP マウスに免疫し、肺がん細胞株の表面抗原を認識する二種類のモノクローナル抗体（365、

419) を樹立した。まず、多種類のヒト細胞株を用いて二種類のモノクローナル抗体の反応性に関して、詳細に FACS 解析した。結果は以下の表の通りである。

細胞株	種類	365	419
H1437	lung ca.	++	++
PC-9	lung ca.	-	+
PC-14	lung ca.	-	+
RERF	lung ca.	+/-	+
VMRC	lung ca.	-	-
H1975	lung ca.	-	+/-
HepG2	hepatoma	+	-
293	embryonic kidney	-	-
MCF7	breast ca.	-	-
MDA-MB-231	breast ca.	-	+
T47D	breast ca.	-	-
HeLa	cervical ca.	-	+
U87	glioma	-	-
PC3	prostate ca.	-	+
MKN45	gastric ca.	+	++
MKN28	gastric ca.	-	-
GCIY	gastric ca.	-	+
KATOIII	gastric ca.	+/-	+/-
U2OS	osteosarcoma	++	+
MMNK1	cholangiocyte	-	-
MRC-5	fibroblast	-	-
NuLi-1	bronchial epithelium	-	-

これらの結果から、365 と 419 は肺がん細胞を特異的に認識する抗体ではなく、認識する抗原の発現も細胞種によってかなりばらつきがある。しかし、正常細胞株には全く反応しないことからがん細胞に発現するエピトープの可能性があり、細胞の過ヨウ素酸ナトリウム処理で抗体の反応性が低下することから糖鎖抗原を認識している可能性があり、今後糖鎖アレイでエピトープを解析する予定である。さらにこれらの抗体は IgM クラスで精製が困難であり、ハイブリドーマから RNA を抽出し、現在抗体遺伝子の単離を行っている。

本研究助成で得られた成果の一部は以下の投稿中の論文で発表予定である。

Kazuhiko Kuwahara*, Mutsuko Yamamoto-Ibusuki*, Zhenhuan Zhang*, Suchada Phimsen, Hiroko Yamashita, Naomi Gondo, Toru Takeo, Naomi Nakagata, Daisuke Yamashita, Yoshimi Fukushima, Yutaka Yamamoto, Hiroji Iwata, Hideyuki Saya, Eisaku Kondo, Keitaro Matsuo, Motohiro Takeya, Hirotaka Iwase and Nobuo Sakaguchi (*equal contribution)

GANP protein encoded on human chromosome 21/mouse chromosome 10 is necessary for resistance to development of mammary gland tumors
(submitted)