

臨床応用を目的とした腫瘍免疫系を用いた抗腫瘍効果に関する検討

2013

木宿 昌俊

緒言.....	4
第1部 ヒト単球由来成熟樹状細胞における可溶性血管内皮成長因子受容体-1の発現と血管新生抑制効果の検討	7
序論	7
実験試薬と実験方法.....	12
1-1 実験試薬	12
1-2 実験方法	13
1-2-1 単球分離.....	13
1-2-2 DC分化および成熟化.....	13
1-2-3 フローサイトメトリー解析	14
1-2-4 RT-PCR 解析	14
1-2-5 ELISA を用いた VEGF、sVEGFR-1 および sVEGFR-2 の検出	15
1-2-6 <i>In vitro</i> HUVEC 管腔形成試験.....	16
1-2-7 動物実験.....	17
1-2-8 免疫組織化学染色	17
統計解析	18
第2章 結果	19
2-1 ヒト単球由来樹状細胞における sVEGFR-1 の産生.....	19
2-2 FACS を用いた mDC 表面マーカーの検討	23
2-3 mDC 培養上清の血管新生に対する影響.....	31
2-4 <i>In vivo</i> における TNF-DC の抗腫瘍効果	36
第3章 考察	41
小括	46
参考文献	47
第2部 抗 podoplanin 特異的抗体を用いた悪性胸膜中皮腫に対する抗体医療に関する検討.....	53

序論	53
実験材料および実験方法.....	57
1. 細胞.....	57
2. 動物.....	57
3. 抗体.....	57
4. Flow cytometry 解析	58
5. 免疫組織染色.....	59
6. エフェクター細胞の調整.....	59
7. 補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性の測定.....	60
8. 抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性の測定	60
9. Anti-asialo GM1 による NK 細胞の depletion	61
10. 抗 CD161a 抗体による rat splenocyte の separation.....	61
11. Human MNC の separation.....	61
12. SCID mouse 悪性胸膜中皮腫皮下移植モデルを用いた抗腫瘍効果の検討.....	62
13. 統計解析.....	63
実験結果	64
1. 悪性胸膜中皮腫における podoplanin の発現解析.....	64
1-1) ヒト悪性胸膜中皮腫細胞における podoplanin の発現.....	64
1-2) ヒト悪性胸膜中皮腫臨床組織における podoplanin の発現.....	69
2. NZ-1 によるヒト悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果の検討	73
2-1) NZ-1 による補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性.....	73
2-2) NZ-1 による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性	75
2-2-1) SCID mouse splenocyte および Human MNC を用いた検討.....	75
2-2-2) Rat splenocyte を用いた検討.....	77
2-2-3) ADCC 活性における NK 細胞の関与	81

3. NZ-8 によるヒト悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果の検討	84
3-1) NZ-8 による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性	84
3-2) NZ-8 によるヒト悪性胸膜中皮腫に対する ADCC 活性の検討	87
3-3) NZ-8 の ADCC 活性における NK 細胞の寄与	90
4. SCIDmouse 悪性胸膜中皮腫皮下移植モデルにおける NZ-8 の抗腫瘍効果	92
考察	94
小括	102
略語一覧	102
参考文献	104
結論	108
謝辞	109

緒言

免疫細胞は骨髄と同じ前駆細胞である多能性造血幹細胞に由来する。多能性幹細胞は赤血球系共通前駆細胞、骨髄系共通前駆細胞、リンパ球系共通前駆細胞に分化することが知られている。赤血球系共通前駆細胞からは赤血球、巨核球および血小板が、骨髄系共通前駆細胞からは樹状細胞、単球/マクロファージが、リンパ球系共通前駆細胞からは B 細胞、T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞、樹状細胞、好中球、好塩基球、好酸球が分化する。免疫細胞の主体は白血球であり、リンパ球、単球、顆粒球から構成されている。

我々の体内には、感染微生物などに対する生体防御機能として、免疫機能が備わっており、自然免疫と適応免疫という 2 つのシステムにより成立している。自然免疫系は病原体と宿主を区別するための分子と細胞（単球、マクロファージ、樹状細胞など）から構成されており、微生物に保存された成分を認識することによっても起動する。一方、適応免疫は、抗原特異的なリンパ球（T リンパ球、B リンパ球、NK 細胞など）による一連の免疫反応をいう。これらの免疫システムは、外界からの侵入に限らず、がん細胞のような異常をきたした細胞に対しても、これを排除する機能をもつ（免疫監視機構）。しかしながら、がん細胞はもともと宿主由来であり以下のような特徴を持つ。すなわち、1) 自らの増殖を刺激する、2) 他の細胞からの増殖性シグナルを無視する、3) アポトーシスによる死を免れる、4) 血液の供給を増大させる（血管新生）、5) 原発巣から他の組織へと浸潤する（転移）、6) 繰り返し複製して増殖する、7) 免疫系から逃れる。そのため、一部の腫瘍

は免疫系に打ち勝つことで増殖を続けることになる。

がんの治療では、従来の方法である外科手術、放射線療法、化学療法が行われてきた。

こうした治療法により、がんが退縮したり完治することがないわけではないが、多くの場合、がん細胞の除去が不完全であったり、有害な副作用が生じるため、これらの治療法には限界があると考えられている。最近では前述した治療法に加え、第4番目の治療法として免疫細胞を用いた免疫療法が注目されている。

免疫療法の種類として、1) 細胞免疫療法、2) ワクチン療法、3) サイトカイン療法、4) BRM (Biological Response Modifiers) 療法、5) 抗体療法などが知られている。

細胞免疫療法の1つに樹状細胞療法がある。樹状細胞 (Dendritic cell; DC) は免疫細胞の中でも最も重要な抗原提示細胞として知られており、生体内での免疫反応において中心的役割を果たすことが知られている。樹状細胞療法には自己がん組織樹状細胞療法 (ライセート DC 療法)、人工抗原樹状細胞療法 (ペプチド DC 療法) や他人のがん細胞を用いた樹状細胞療法などの、がん抗原パルス樹状細胞療法あるいは体外で大量に作成した患者の未熟な樹状細胞をがん組織中に注入し、成熟化させてがん細胞を攻撃させる局所樹状細胞療法がある。また、近年では遺伝子導入した樹状細胞療法も行われるなど、その方法は多岐に渡る。徳島大学病院でも MAGE-3 ペプチドパルス樹状細胞を用いた腫瘍特異的免疫療法の検討がなされていた。また、近年では多くのヒト化モノクローナル抗体や完全ヒト型モノクローナル抗体が、がん治療に用いられ成功をおさめている。抗体が免疫防御に寄与

する方法の 1 つに、細胞の受容体を介する方法がある。これらの受容体は抗体のクラスによって異なり、それぞれ Fc 領域に結合することで抗体を認識するため、Fc 受容体 (FcR) と呼ばれる。多くの Fc 受容体が免疫系細胞を活性化し、貪食、炎症性メディエーターの放出、細胞の障害を促進する。Fc 受容体活性化の生物学的効果は、それらを発現する細胞に大きく依存する。マクロファージや好中球ではサイトカイン産生も誘導されるが、主要な効果は貪食と活性酸素の産生である。マスト細胞、好塩基球、好酸球では Fc 受容体により脱顆粒が誘導され、ナチュラルキラー細胞ではパーフォリンやグランザイムが分泌されて標的細胞のアポトーシスを誘導する。この過程を抗体依存性細胞性細胞障害 (antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC) という。

そこで今回、我々は樹状細胞および腫瘍抗原に着目し検討を行った。まず第 1 部では樹状細胞療法の観点から、単球から可溶性血管新生因子受容体-1 が産生され抗腫瘍効果を示したとの報告より、単球由来樹状細胞を用いて同様の検討を行った。また、第 2 部では抗体療法の観点から抗ポドプラニン抗体 (NZ-1) が ADCC 活性を誘導するか否かについて検討を行った。

第1部

ヒト単球由来成熟樹状細胞における可溶性血管内皮成長因子受容体-1の発現と 血管新生抑制効果の検討

序論

血管新生は種々の生理学的、病態生理学的現象に関与しており特に腫瘍の増殖・転移に重要な役割を果たしている[1,2]。近年、血管新生を調節している内皮細胞・免疫細胞間クロストークに多くの関心が集まっている[3-6]。がん血管新生におけるマクロファージ（以下MΦ）の役割は証明されており、現在、腫瘍関連MΦ（TAM）は血管新生促進性を示すM2型として報告されており[7-9]、血管内皮成長因子（Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF）等の血管新生因子を産生することが知られている[3,8]。好中球やナチュラルキラー細胞もまたVEGFを産生することで血管新生促進作用を有することが知られている[3]。一方でM1型のMΦはインターロイキン-12（Interleukin-12, IL-12）やインターフェロン-γ（Interferon-γ; IFN-γ）関連ケモカインであるCXCL9、CXCL10やCXCL11を産生することで血管新生を抑制することが明らかにされている。以上のように血管新生系に関連する可溶性因子は免疫細胞による血管新生の調節において重要な役割を担っていると考えられている。

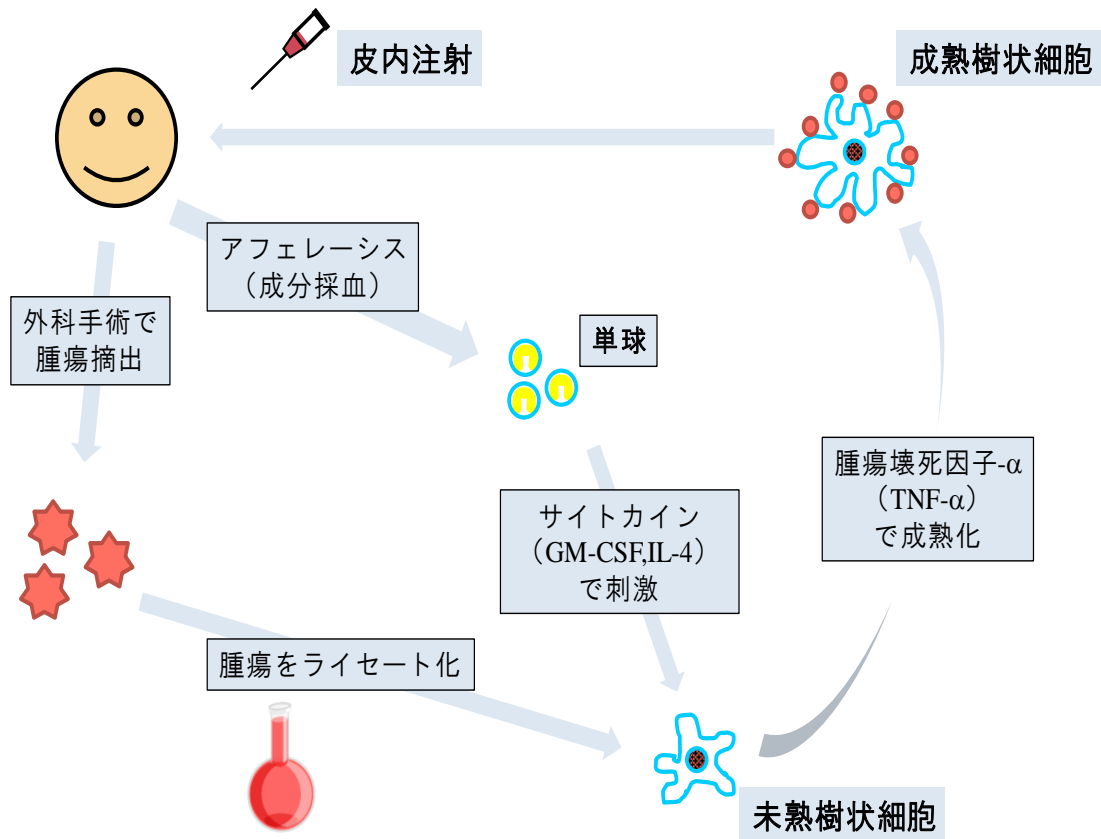
血管新生関連因子の中でも VEGF は強い血管内皮細胞増殖作用および遊走活性作用を有し、腫瘍の増殖、転移に中心的役割を担っている[10]。VEGF は通常の組織においても発現しているが、肺がん、乳がんまたは胃がん等大多数の腫瘍において発現が高まっていることや、がん患者において血中 VEGF 量が腫瘍の悪性度や予後と相関することが報告されている[11]。VEGF は 2 つのチロシンキナーゼ受容体である VEGFR1 (FLT-1) と VEGFR2 (KDR/Flk-1) に結合し生理反応を引き起こすことが知られており[12-15]、前者は単球、腎メサンギウム細胞、血管平滑筋細胞、内皮細胞に発現し、後者は膀胱細胞、網膜前駆細胞、造血細胞に発現している[10,16]。一方、可溶性血管内皮成長因子受容体-1 (sVEGFR-1) は VEGFR-1 mRNA の選択的スプライシングで胎盤や血管内皮細胞から産生されるが、細胞内チロシンキナーゼドメインを欠損しているため VEGF の機能を阻害することが知られている[17-19]。sVEGFR-1 による VEGF 阻害メカニズムは血中 VEGF の捕捉および膜貫通型 VEGFR-1 や VEGFR-2 とのヘテロ 2 量体形成による機能阻害であり、sVEGFR-1 の過剰発現による腫瘍の増殖抑制が報告されている。しかし sVEGFR-1 は VEGF に対し直接的かつ特異的阻害作用を有するにもかかわらず、抗血管新生に関わる免疫細胞において、その関与はほとんど検討されていなかった。

免疫細胞の中でも樹状細胞 (Dendritic cell; DC) は最も重要な抗原提示細胞として知られており、生体内での免疫反応において中心的役割を果たすことが知られている。樹状細胞は末梢非リンパ組織やリンパ組織に広く分布しており、各組織には分布、細胞表面抗原、

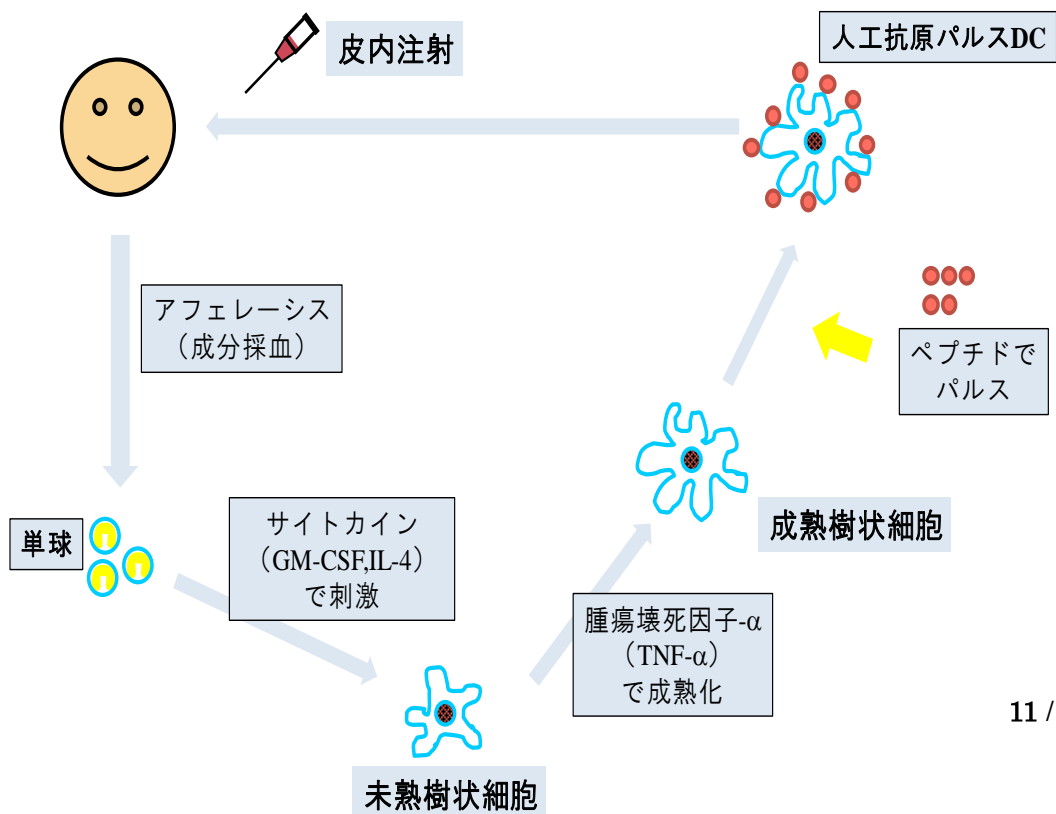
その機能の違いから様々なサブセットが存在することが報告されている[20]。例えば表皮にはランゲルハンス細胞、真皮中には真皮内樹状細胞、あるいは心臓、肺、腎臓および腸には間質樹状細胞が存在する[21]。これらの細胞はいずれも末梢組織において抗原を捕捉した後、所属リンパ節へ遊走、成熟化して抗原を T 細胞に提示することで免疫反応を惹起させる。1996 年、赤川らにより単球から樹状細胞を分化・誘導する手法が報告されて以来[22]、臨床応用へ向けた樹状細胞の研究は進められ、最近ではがん患者を対象とした臨床試験において樹状細胞を用いたがん免疫療法がいくつかの施設で試みられている。樹状細胞療法には自己がん組織樹状細胞療法（ライセート DC 療法）、人工抗原樹状細胞療法（ペプチド DC 療法）や他人のがん細胞を用いた樹状細胞療法などの、がん抗原パルス樹状細胞療法(図)あるいは体外で大量に作成した患者の未熟な樹状細胞をがん組織中に注入し、成熟化させてがん細胞を攻撃させる局所樹状細胞療法がある。また、近年では遺伝子導入した樹状細胞療法も行われるなど、その方法は多岐に渡る。徳島大学病院においても 2002 年 12 月より「難治性固形がんに対する MAGE-3 由来 HLA-A24 結合ペプチドパルス樹状細胞を用いた腫瘍特異的ワクチン療法」としてがん抗原パルス樹状細胞療法のトランスレーショナルリサーチが実施されていた。このように樹状細胞を用いたがん治療は多くの注目を集めている。一方、最近の報告では樹状細胞 (DCs) が血管新生において直接および間接的に関与することも示されている[23,24]。Riboldi らは IL-10、カルシトリアールおよびプロスタグランジン E2 (PGE2) を処置しヒト単球から分化、選択的に活性化させた DC が VEGF

を産生することを報告した[25]。Curiel らはヒト卵巣がんにおける形質細胞様樹状細胞が腫瘍壊死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α ; TNF- α)、IL-8 を産生し血管新生を促進することを見出した[26]。対照的に、CD14 陽性細胞から分化した骨髄樹状細胞は IL-12 を産生することにより血管新生を阻害する[10]。また、がん患者において腫瘍に浸潤した成熟樹状細胞数が多いほど予後が良好であるという報告や、腫瘍浸潤樹状細胞数と予後の関係における報告もされている。しかし、樹状細胞が血管新生の促進または抑制のどちらに主として関係しているのかについては明確な結論が未だ出ていない。近年ヒト単球が GM-CSF 刺激により sVEGFR-1 を産生することが報告された[27]。樹状細胞は前述の通り単球から分化、誘導される細胞であるため、樹状細胞も sVEGFR を産生する可能性が考えられる。そこで本研究ではより有効ながん免疫療法の実現を目的として樹状細胞の抗血管新生作用について検討を行った。まず、樹状細胞における sVEGFR-1 産生を ELISA 法、RT-PCR により検討した。また、成熟樹状細胞誘導刺激の違いにより sVEGFR-1 産生能に変化があるかを検討した。さらに管腔形成試験並びに SCID マウスを用いた *in vivo* 試験を行い、樹状細胞の血管新生抑制効果および抗腫瘍増殖効果について検討した。

自己がん組織樹状細胞療法（ライセートDC療法）



人工抗原樹状細胞療法（ペプチドDC療法）



第 1 章 実験試薬と実験方法

1-1 実験試薬

組み換え型ヒト (rh) GM-CSF、rhIL-4、sCD40L、rhVEGF、rhsVEGFR-1、抗ヒト sVEGFR-1、IL-12 モノクローナル中和抗体、ELISA kit (IL-12p40、IL-12p70、VEGF、sVEGFR-1 と sVEGFR-2) は R&D systems (Minneapolis, MN) から購入し、rhIL-6 と IL-1 β は Peprotech EC (Rocky Hill, NJ) から、rhTNF- α は BD Pharmingen (San Diego, CA) から購入した。マトリゲル (growth factor reduced) 基質 (BD Bioscience, San Jose, CA)、プレートキット EBM-2 (Combrex, Walkersville, MD) は HUVEC (KURABO, 大阪, 日本) の管腔形性試験に使用した。OK-432 (ピシバニール) は中外製薬株式会社 (東京, 日本) より購入した。LPS、IFN- γ と PGE2 はシグマ (St. Louis, MO) から購入した。以下のモノクローナル抗体はフローサイトメトリー解析に用いた。すなわち CD14、HLA-DR、CD80、CD83 あるいは CD86、CD123、コントロール IgG に対する FITC-標識モノクローナル抗体 (BD pharmingen)、FITC 標識ヤギ抗マウスイムノグロブリン (BD pharmingen)、FITC 標識抗ヒト CCR7、FITC あるいは PE 標識 VEGFR-1、VEGFR-2 抗体 (R&D systems)、CXCL9 と CXCL10 抗体 (R&D systems)、そして抗ヒト CD209 (樹状細胞特異的 ICAM-3 結合ノンインテグリン ; DC - specific ICAM-3-grabbing nonintegrin ; DC-SIGN) 抗体 (Beckman Coulter) である。

1-2 実験方法

1-2-1 単球分離

バフィーコートは日本赤十字社から供与された。白血球分離液 (Litton Bionetics, Kensington, MD) を用いて健康人由来白血球濃縮液を比重遠心法により分離した (28)。

さらにベックマン JE-5.0 溶出システムを用い、遠心分離によりリンパ球と単球を単核球細胞から分離した (28)。トリパンブルー色素排除試験で 97%以上の細胞が生存していると判断した。形態より判断したところ、単球の純度は 95%以上である。

1-2-2 DC 分化および成熟化

ヒト単球 (細胞濃度 1×10^6 cells/ml) を GM-CSF (50ng/ml) と IL-4 (50ng/ml) を含む培地に懸濁、6 穴組織培養プレート (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) を用いて培養し 37°C、5%インキュベーター内で DC に分化させた (28)。6 日目に非接着細胞と接着の弱い細胞を回収し、未熟樹状細胞 (Immature DC, iDC) として実験に使用した。これらの細胞は HLA-ABC、-DR、CD1a、CD54、CD80 そして CD86 において 85-95%陽性かつ CD83 に対し 20%陽性であり、iDC の表現型に適合することを確認した。次に、回収した iDC (細胞濃度 1×10^6 cells/ml) を GM-CSF (50ng/ml)、IL-4 (50ng/ml) に加え、TNF- α (50ng/ml) (TNF-DC)、TNF- α +PGE2 1 μ g/ml (PGE2-DC)、sCD40L 1 μ g/ml (sCD40L-DC)、sCD40L+IFN- γ 100ng/ml (IFN-DC)、LPS 1 μ g/ml (LPS-DC)、OK432 0.1KE/ml (OK-DC) あるいは炎症促進性サイトカインカクテル (TNF- α 50ng/ml、PGE2

1 μ g/ml、IL-1 β 10ng/ml、IL-6 100ng/ml ; Co-DC) を含む培地中で 24 時間から 48 時間培養し成熟化させた。

1-2-3 フローサイトメトリー解析

単球、iDC、成熟樹状細胞 (Mature DC, mDC) のフローサイトメトリー解析は FACS キャリバー (BD Biosciences) で CD14、CD80、CD83、CD86、CD123、CD209 (DC-SIGN)、HLA-DR、CCR7、VEGFR-1、VEGFR-2 に対する蛍光標識マウス mAbs を用いて行った (29)。FITC 標識あるいは PE 標識イムノグロブリンをコントロールとして使用した (29)。

また、データは平均蛍光強度 (MFI) として示した。

1-2-4 RT-PCR 解析

ヒト単球、iDC (1 \times 10⁶ cells) を 6 穴組織培養プレートに播種し 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。単球は無処置のまま 2 時間あるいは 24 時間静置し、iDC は無処置あるいは GM-CSF (50ng/ml)、IL-4 (50ng/ml) と TNF- α (50ng/ml) を処置し 24 時間あるいは 48 時間培養した。培養後全細胞を採取、PBS (一) で洗浄した。RNA を抽出するため 1ml のアイソジェン (株式会社ニッポンジーン) を用いて溶解を行った (30)。サーマルサイクラー Dice[®] (株式会社タカラ) を用いた逆転写 (RT) に RNA (1 μ g) を使用した。RT 産物を PCR 増幅用の鋳型として使用した (31)。PCR は以下の設定で行った。

まず 94°C で 5 分初期変性させ、続いて 94°C 1 分、58°C 2 分、72°C 4 分のサイクルを 30 サイクル繰り返したのち 50 μ l の最終反応物を得た。使用したプライマーは以下である (17)。

flt-1 (5'-GCACCTTGGTTGTGGCTGAC-3')

flt-2 (5'-TGGAATTCGTGCTGCTTCCTGGTCC-3')

sflt-3 (5'-GCACCTTGGTTGTGGCTGAC-3')

sflt-4 (5'-CAACAAACACAGAGAAGG-3')

sflt-5 (5'-GCACTGCAACAAAAAGGC-3')

二つのプライマーの組み合わせ、flt-15 と flt-2 (587bp) は FLT-1 の検出に使用した。

sFLT-1 を分析するため、flt-1 と sflt-3 (747bp)、sflt-4 と sflt-2 (332bp)、flt-5 と sflt-3 (393bp) の三つの組み合わせを用いた (17)。RT-PCR 産物は 1.5%アガロースゲルで電気泳動させ、エチジウムブロマイドで染色し紫外線トランスイルミネーターで可視化した。

1-2-5 ELISA を用いた VEGF、sVEGFR-1 および sVEGFR-2 の検出

細胞 (単球、iDC、mDC) を PBS (―) で洗浄し、細胞濃度 5×10^5 cells/ml で 10%FBS を含む RPMI1640 中で 48 時間培養した。ELISA キット (R&D systems) を用いて培養上清中の VEGF、sVEGFR-1、sVEGFR-2 の検出を行った。VEGF に対する ELISA は sVEGFR-1 に結合していない VEGF 分子のみを認識するが、sVEGFR-1 に対する ELISA は遊離型および VEGF 結合型の両方を定量することが確認されている (32)。sVEGFR-1

と VEGF 産生の経時変化については、細胞濃度 1×10^6 cells/ml として DC 成熟化を誘導後 24、48、72、96 時間後に上清を回収し測定した。

1-2-6 *In vitro* HUVEC 管腔形成試験

iDC を 1-2-2 と同様の刺激剤で 24 時間刺激し成熟化を誘導した。成熟化に使用したサイトカインを含まない上清を採取するため、成熟 DC を PBS で洗浄後 0.1%FBS 含有 EBM を用いて 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 72 時間培養し上清を回収した。培養上清は実験に使用するまで -80°C で凍結した。マトリゲルと無血清 EBM[EBM (-)] を 1:1 で混合したマトリゲル混合物で 24 穴組織培養プレートをコーティングし (250 μl/ml)、37°C、CO₂ インキュベーター内で 1 時間以上静置し凝固させた。HUVEC は血清の影響を除去するため EBM (-) 中で 1.5 時間インキュベートした後、培養上清に懸濁させ 24 穴プレートに播種 (2.4×10^5 cells/well) した。管腔形成は 37°C で 20 時間培養した後、内皮細胞間で形成された管腔から枝分かれした部位数を計測しエクセルシートでグラフ化した。管腔形成抑制効果はポジティブコントロール (3ng/ml rhVEGF) と比較した。中和抗体を用いた実験では sVEGFR-1 もしくは IL-12 を中和するため、中和抗体 (10 μl/ml) を DC 培養上清に添加し 4°C で 1 時間静置した。

1-2-7 動物実験

8 週齢雄性 SCID マウスは日本クレア株式会社から購入した。腫瘍移植前に全マウスを少なくとも 1 週間順応させた。マウスは大学のガイドラインに従い特別な無菌条件下で徳島大学の動物舎で飼育した。

ヒト肺腺がん細胞株 PC-14 は西条先生（国立がん研究所）よりご提供いただいた（30）。細胞株を 10%FBS とペニシリン/ストレプトマイシンを添加した RPMI1640（CRPMI1640 として設定）を用いて 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。本研究グループの以前の検討により PC-14 細胞は 10⁶cells/48h で 47.1ng の VEGF 産生能をもつことが明らかとなっている。

1 匹のマウスにつき 2×10⁶ cells の PC-14 を PBS（－）100 μl に懸濁し右側腹部に播種した。腫瘍の大きさは $ab^2/2$ （a：長径、b：短径、いずれも mm）として計測した（33）。腫瘍の大きさが約 10mm³ になった後に mDC（1×10⁶ cells）を 1 週間毎に腫瘍の周りに投与した。PBS（－）はコントロールとした。

1-2-8 免疫組織化学染色

腫瘍組織標本は最適切除温度（OCT）コンパウンドで包埋凍結させた標本を組織切除機を用いて切片化した（34）。まず、切片にラット抗マウス CD31 抗体（BD Biosciences, Cat #558736）あるいは抗ヒト DC-SIGN 抗体を 1:100 で処置したのち 4°C で一晩インキュベートした。次に 3%ヒドロペルオキシドメタノール液で 10 分間処置し内在性ペルオキシタ

ーゼを阻害した。さらに切片を PBS で洗浄しペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ラット IgG 抗体 (BD Biosciences) を処置し室温で 30 分静置した。DAB 発色基質 (抗ラット Ig 検出キット ; BD Biosciences) を用いて染色し可視化した。

統計解析

結果は平均±SD. (標準偏差) として示した。各群の有意差は Dunnett's post-hoc test で判定し、 $P<0.05$ を統計的に有意であると判定した。

第2章 結果

2-1 ヒト単球由来樹状細胞における sVEGFR-1 の産生

最初にヒト単球、iDC、TNF- α により誘導した mDC の培養上清中の VEGF、sVEGFR-1、sVEGFR-2 の濃度を ELISA で検討した。TNF- α により mDC が誘導されることは FACS により確認した (Fig.2A)。mDC の上清で単球培養上清と比較して sVEGFR-1 産生量が高いことが確認された (Fig.1A)。一方で VEGF と sVEGFR-2 の産生量は全ての上清で低いことが明らかとなった。また、mDC 由来 sVEGFR-1 産生を確認するため sVEGFR-1 に特異的なプライマーを用いた RT-PCR を行い、mRNA の検出を試みた (Fig.1B)。膜結合型の VEGFR-1 ではなく可溶型の sVEGFR-1 を検出できる 3 つのプライマーの組み合わせで mDC において sVEGFR-1 mRNA 発現を明確に検出できた。一方で、iDC では sVEGFR-1 の mRNA は検出されなかった。また、我々はヒト単球において sVEGFR-1 の mRNA 発現を検出したが、これは培養を開始して 2 時間後にのみ検出されており、24 時間後には消失した。同様に単球においてのみ膜結合型 VEGFR-1 の一過性の発現を検出した。

次に TNF- α と LPS で誘導された mDC (各 TNF-DC、LPS-DC) における sVEGFR-1 産生量を経時的に評価した。Fig.1C で示すように TNF-DC における sVEGFR-1 産生は iDC と比較して有意に高く、経時的に産生が増加した。しかしながら LPS-DC において sVEGFR-1 産生の経時的増加は見られなかった。対照的に LPS-DC において iDC と比較して VEGF 産生の増加が確認された (Fig.1D)。

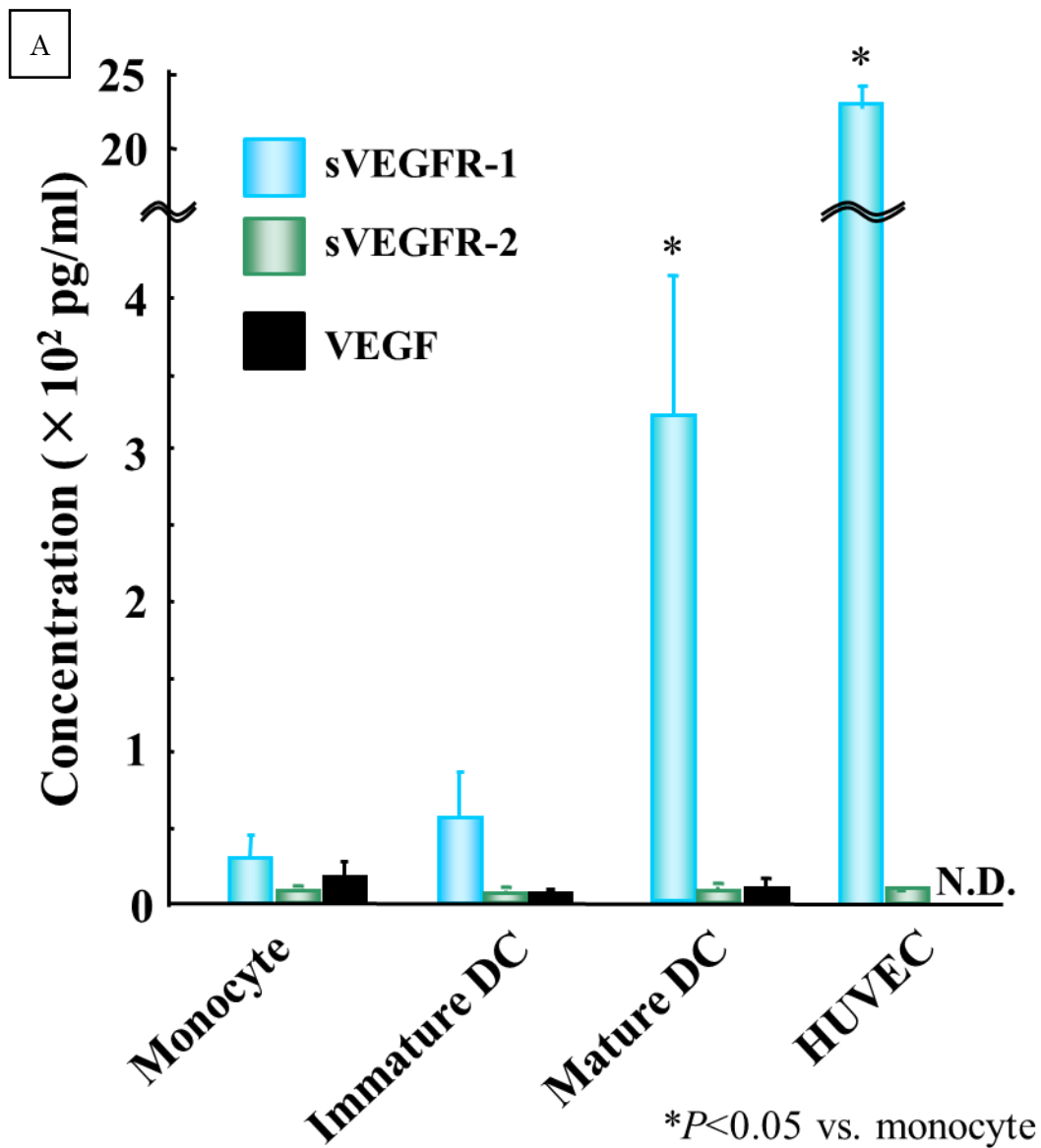


Fig.1A ヒト単球由来樹状細胞における sVEGFR-1 の産生

無刺激細胞 (5×10⁵ cells/ml) を RPMI1640 中 24 時間 96 穴平底組織培養プレートで培養し、sVEGFR-1、可溶型 sVEGFR-2、VEGF に対する ELISA で上清を分析した。この実験では TNF-α (50ng/ml) を処置し樹状細胞の成熟化を行った。N.D.は検出できなかったことを示す。

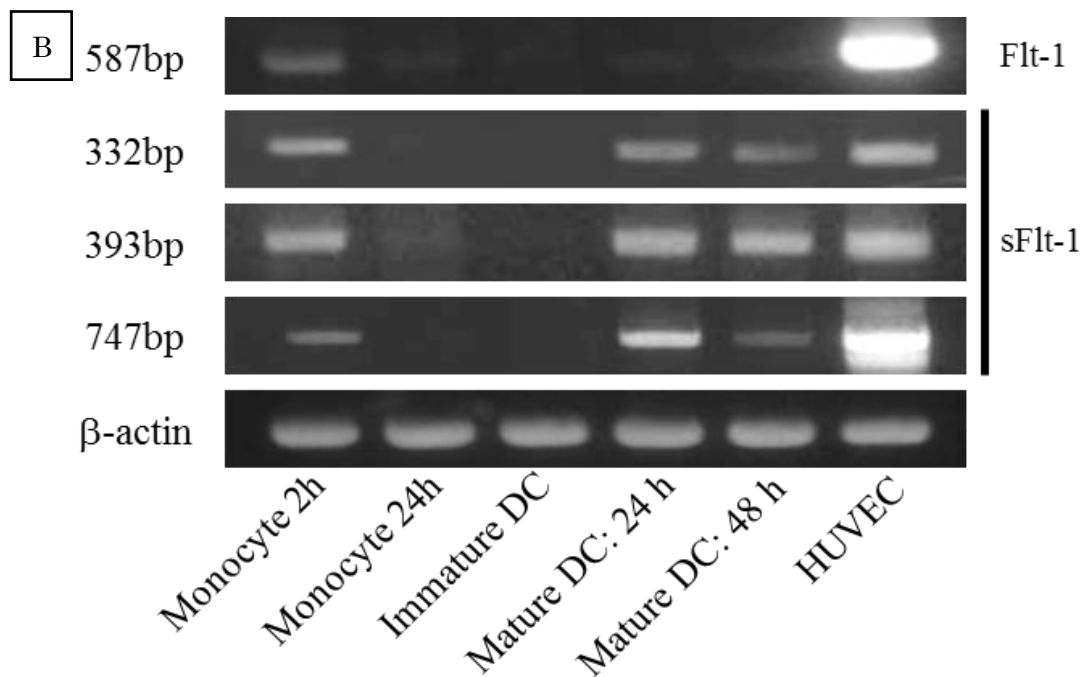
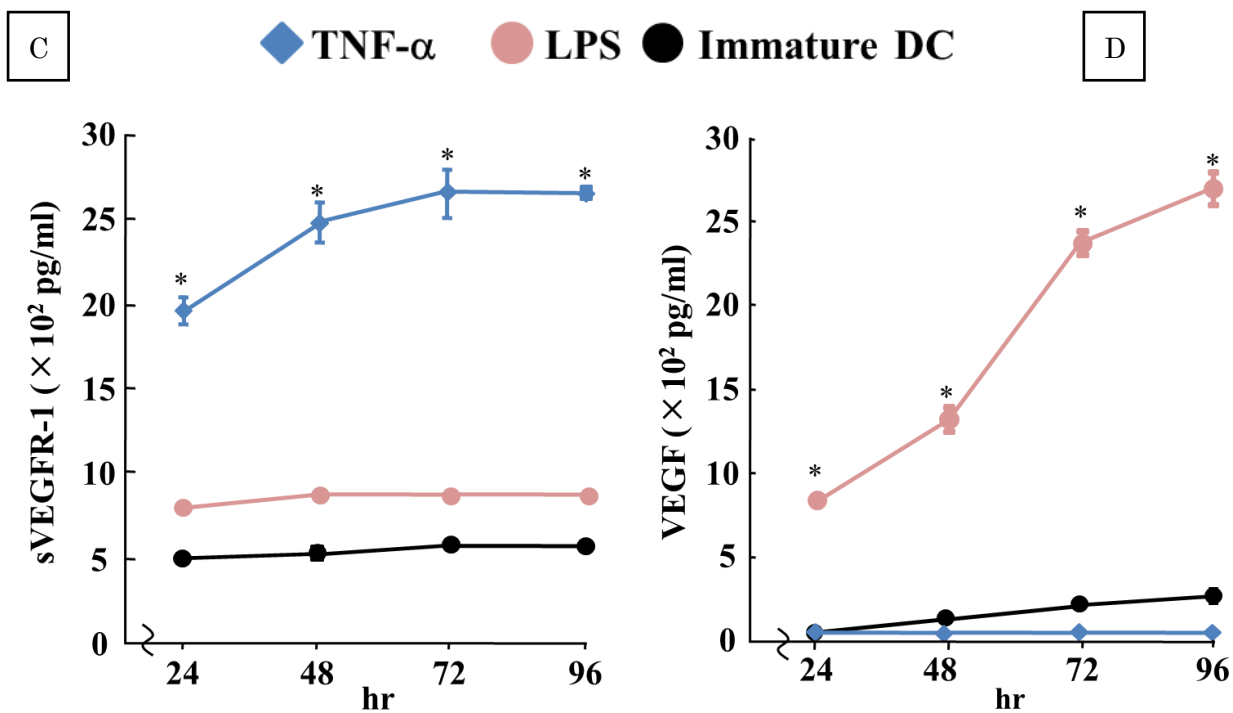


Fig.1B ヒト単球由来樹状細胞における sVEGFR-1 mRNA の発現

単球、iDC、mDC における膜結合型 VEGFR-1 と sVEGFR-1 mRNA 発現を解析した。mDC は TNF- α (50ng/ml) で成熟化させた。587bp は膜結合型 VEGFR-1 mRNA を、332bp、393bp、747bp は sVEGFR-1 mRNA を示す。



*P<0.05 vs. Immature DC

Fig.1C,D ヒト単球由来未熟樹状細胞に sVEGFR-1 の産生

DCにおける sVEGFR-1 産生の経時的変化について検討した。TNF-αあるいは LPS で刺激した樹状細胞を培養し、上清を ELISA で分析した。また、VEGF についても同様に検討を行った。同様の結果は 3 回の独立した試験で得られた。

2-2 FACS を用いた mDC 表面マーカーの検討

TNF-DC や LPS-DC において sVEGFR-1 および VEGF 産生能が異なる傾向が認められたため、フローサイトメトリー解析により DC の成熟化を示す種々の細胞表面マーカー (HLA-DR、CD80、CD83、CD86 と CCR7) の発現を検討した。iDC に 1-2-2 で示した成熟化刺激剤を処理し 48 時間培養した。その結果、全ての群で DC の成熟化を確認した (Fig.2A,2B)。iDC と同様 mDC でも膜結合型 VEGFR-1、VEGFR-2 発現は検出されなかった。また、樹状細胞には異なるサブセット、骨髄系樹状細胞の myeloid DC (DC1) とリンパ球系樹状細胞の plasmacytoid (DC2) が存在する。DC1 の表面マーカーは、CD11c⁺、CD123^{dim} であり、DC2 の表面マーカーは CD11c⁻、CD123^{bright} である。そこで、今回実験に用いた樹状細胞がどちらのサブセットに属するかを抗 CD11c 抗体および抗 CD123 抗体を用いて検討した (Fig.2C)。TNF- α 、CD40L と IFN- γ あるいは LPS により成熟化させた樹状細胞は CD11c を高発現させていたのに対し、CD123 は極めて低い結果が得られた。このことより、これらの樹状細胞のサブセットは DC1 であることが示唆された。

A

Mature DC

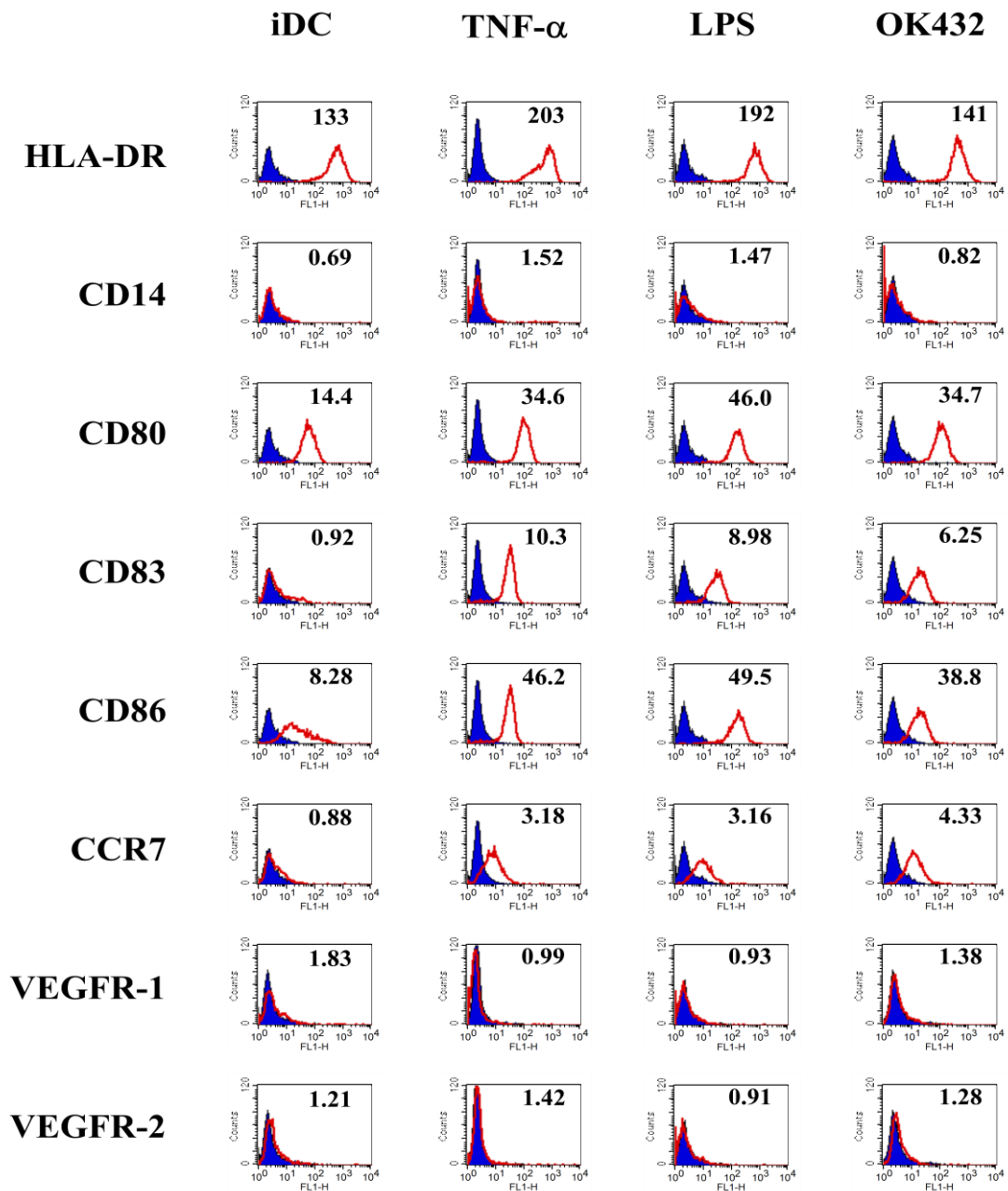
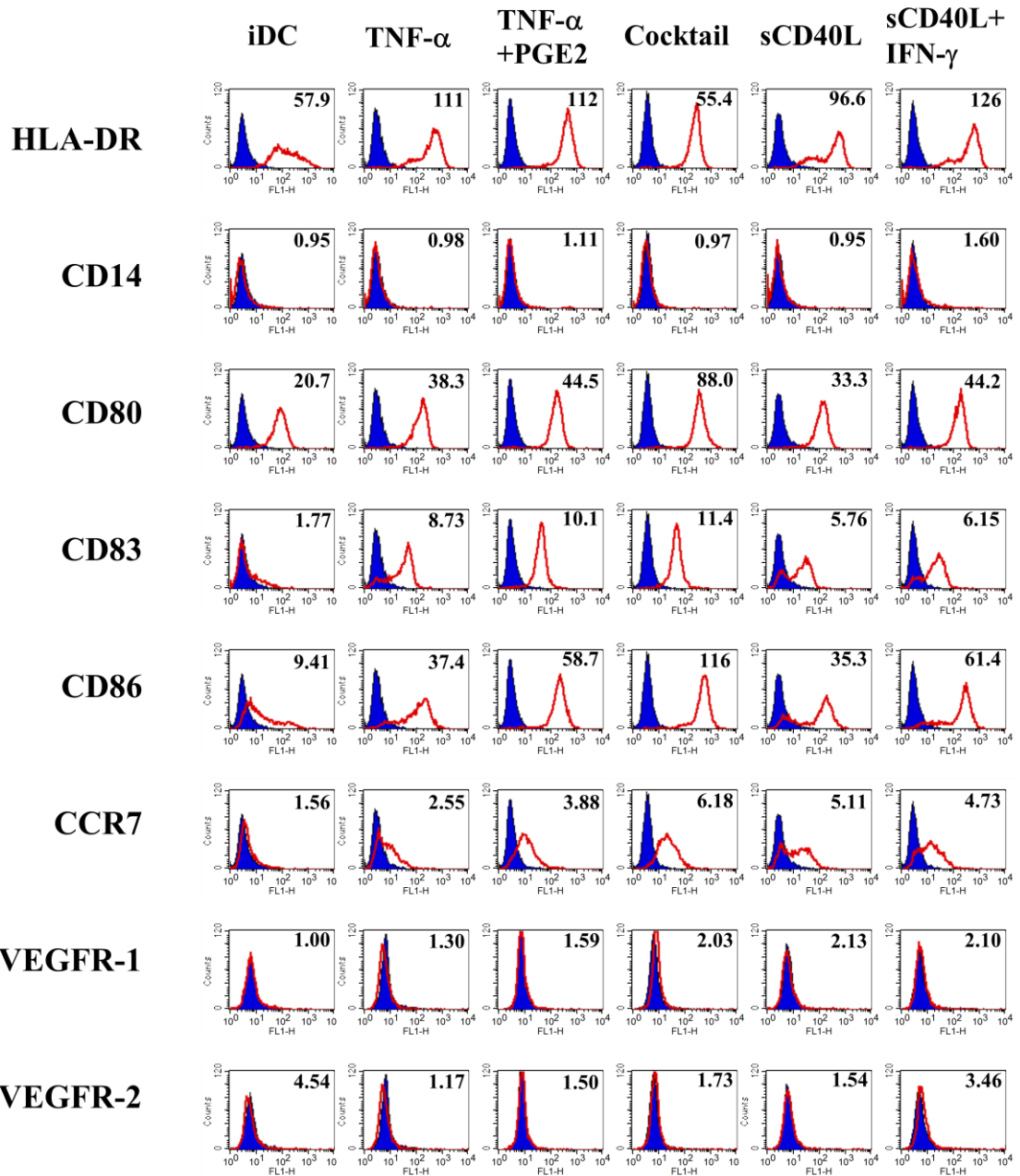


Fig.2A,B 未熟樹状細胞と種々の刺激により誘導された成熟樹状細胞の免疫表現型

GM-CSF と IL-4 存在下单球を 6 日培養し iDC に分化させた。続いて iDC を成熟刺激剤存在下、非存在下で 48 時間培養した。A では iDC を TNF- α 、LPS あるいは OK432 で刺激した。B では iDC を各刺激剤の組み合わせ、TNF- α 、TNF- α +PGE2 併用、カクテル、sCD40L あるいは sCD40L+IFN- γ 併用を処置し刺激した。DC を種々の抗体(赤太線)とコントロール IgG(青線影領域)で染色した。右上隅の数字はコントロールに対する比を示す。

B

Mature DC



C

Mature DC

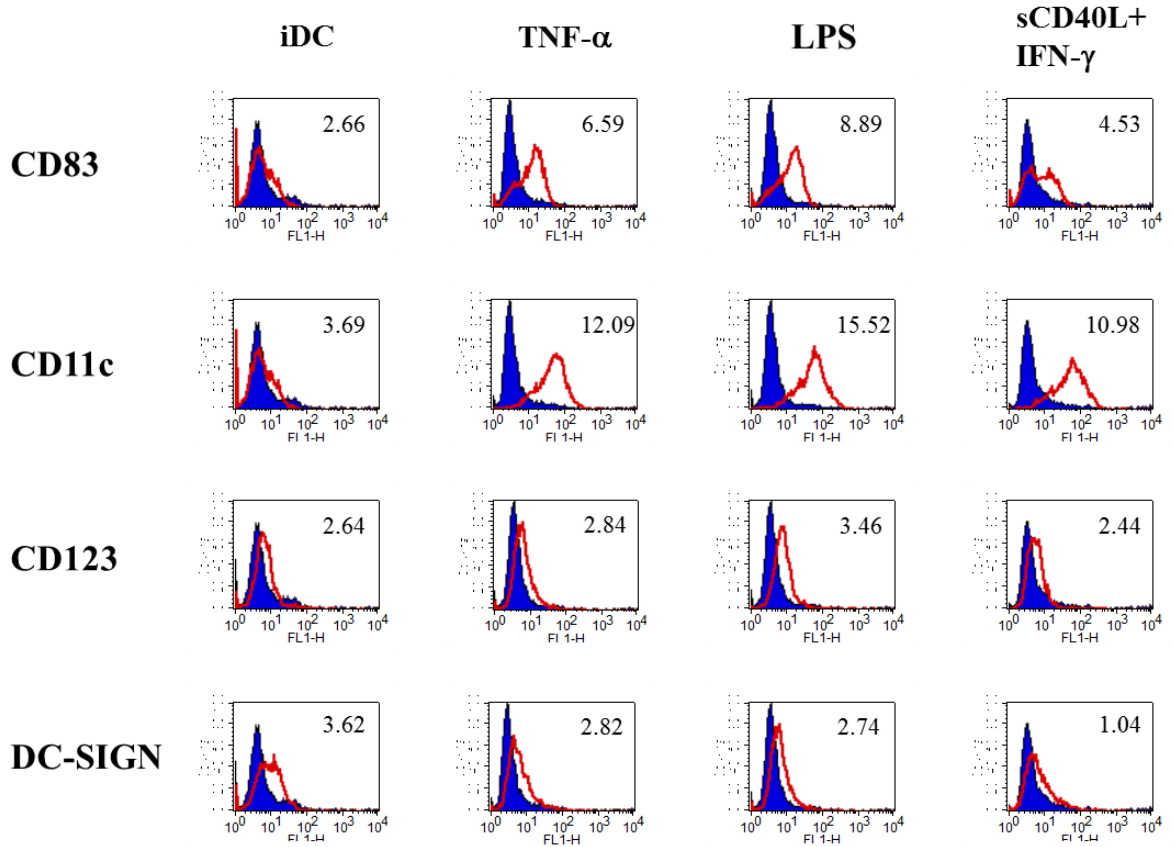
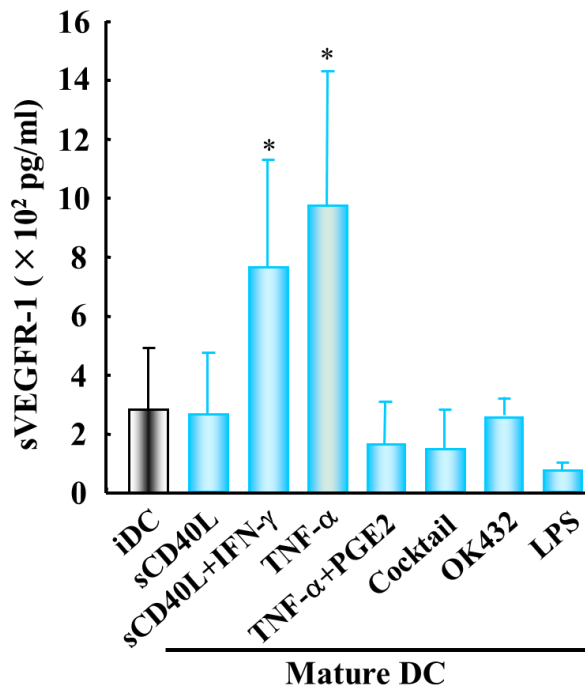


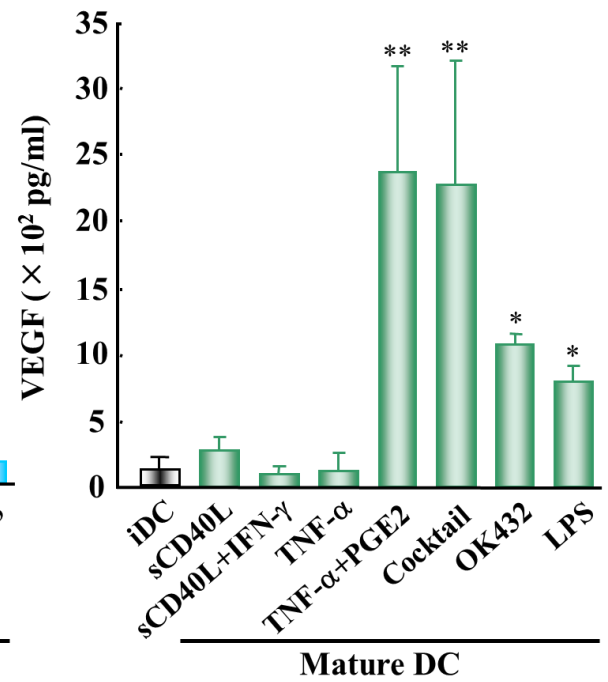
Fig.2C TNF- α 、LPS あるいは sCD40L と IFN- γ で誘導した誘導した成熟樹状細胞は DC1 表現型を示す。未熟樹状細胞は GM-CSF と IL-4 存在下单球を 6 日培養し分化させた。続いて iDC を成熟刺激剤存在下、非存在下で 48 時間培養した。DC を種々の抗体(赤太線)とコントロール IgG(青線影領域)で染色した。右上隅の数字はコントロールに対する比を示す。

次にこれらの mDC における sVEGFR-1、VEGF、IL-12p70（活性型）産生を確認した（Fig.3A-C）。成熟化刺激後 48 時間のサイトカイン産生を ELISA で測定した。Fig.1A と同様に TNF-DC は iDC に比較し sVEGFR-1 の高い産生を示したが VEGF 産生は認められなかった。また、IFN-DC も TNF-DC と同様の産生傾向を示した。一方で PGE2-DC、Co-DC、OK-DC、LPS-DC は iDC に比較し VEGF 産生が増加していたが sVEGFR-1 産生レベルは低いことが確認された。さらに OK-DC と LPS-DC は他の mDC に比較して IL-12p70 産生が増加していた（Fig.3C）。これらの結果から sVEGFR-1 濃度と VEGF 濃度の比を算出したところ、TNF-DC あるいは IFN-DC は抗血管新生能を、他の mDC は血管新生能を有する可能性が示唆された（Fig.3D）

A



B



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Immature DC (iDC)

Fig.3A,B 種々の刺激で成熟化させた DC における sVEGFR-1、VEGF 産生

GM-CSF と IL-4 存在下单球を 6 日培養し iDC に分化させた。続いて iDC を成熟刺激剤存在下、非存在下で 48 時間培養し上清中の sVEGFR-1 および VEGF を ELISA で分析した。

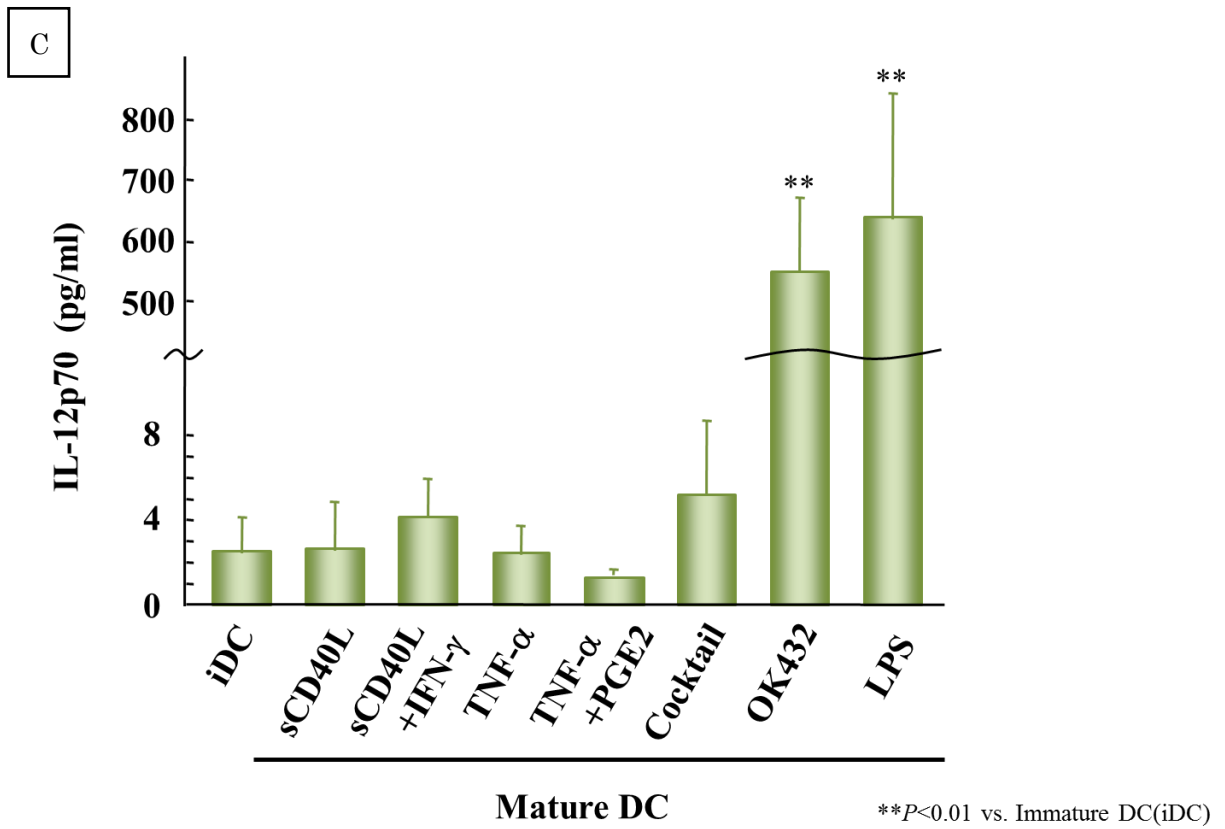


Fig.3C 種々の刺激で成熟化させた DC における IL-12 産生

GM-CSF と IL-4 存在下单球を 6 日培養し iDC に分化させた。続いて iDC を成熟刺激剤存在下、非存在下で 48 時間培養し上清中の IL-12 を ELISA で分析した。

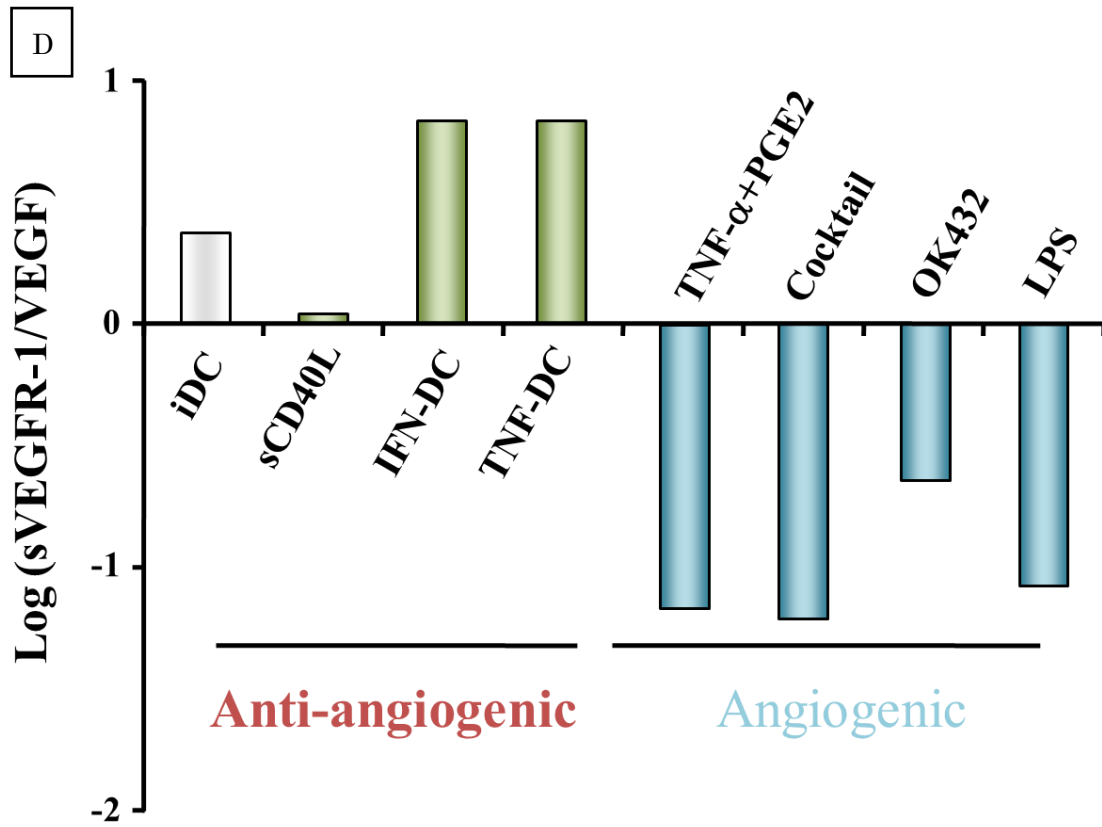


Fig.3D 種々の刺激で成熟化させた DC における sVEGFR-1、VEGF 産生比
 Fig.3A,B の結果を基に各 DC における sVEGFR-1 と VEGF の濃度比を算出した。

2-3 mDC 培養上清の血管新生に対する影響

HUVEC を用いた管腔形成試験を行い種々の成熟化刺激により成熟化した DC 培養上清の血管新生に与える影響を評価した。その結果、TNF-DC および IFN-DC 由来の培養上清において rhVEGF により誘導される管腔形成が抑制された。TNF-DC と IFN-DC の抑制率はそれぞれ 38%と 20%であった。一方で、LPS-DC では管腔形成が促進された (Fig.4A)

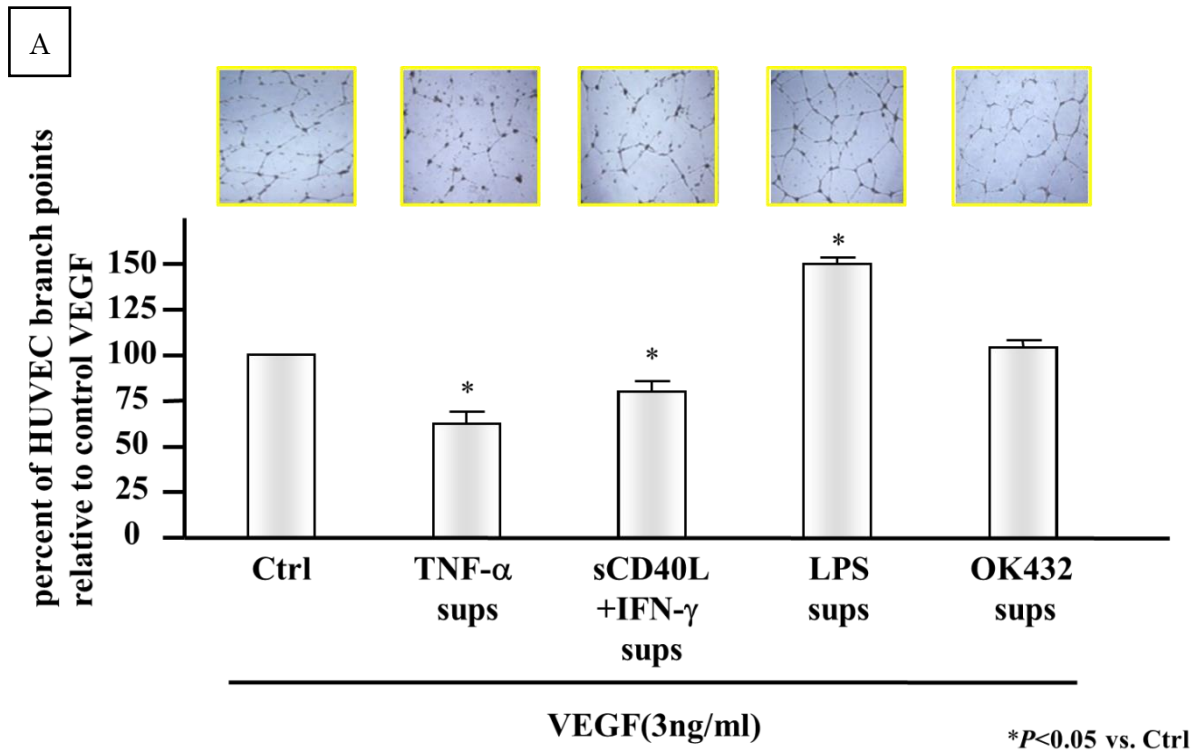


Fig.4A 種々の試薬で成熟化させた DC 培養上清の HUVEC 管腔形成に与える影響

mDC 培養上清を用い HUVEC 管腔形成阻害試験を行った。HUVEC はマトリゲル上で 20 時間培養し、rhVEGF (3.0ng/ml) のみ (Ctrl)、TNF-DC 上清と VEGF(TNF- α sup)、IFN-DC 上清と VEGF(sCD40L+IFN- γ sup)、LPS-DC 上清と VEGF(LPS sup)、OK432-DC 上清と VEGF(OK432 sup)を処置した。定視野における枝分かれ部位を血管新生定量ソフトウェアを用いて定量した。

次に TNF-DC および IFN-DC 由来上清における HUVEC の管腔形成阻害機序を明らかにするため、抗 sVEGFR-1、抗 IL-12p70、抗 CXCL9 あるいは抗 CXCL10 特異的中和抗体を上清に処置し管腔形成試験を行った (Fig.4B、4C)。DC 上清ではなく rhsVEGFR-1 (10 μ g/ml) を処置した群では VEGF による管腔形成が阻害 (55%) された。TNF-DC 上清も管腔形成を阻害したが sVEGFR-1 特異的中和抗体の前処置により管腔形成阻害効果は有意に抑制された。一方、抗 IL-12p70 抗体を前処置した群では TNF-DC 上清の管腔形成阻害に変化は無かった (Fig.4B)。

ここで IFN-DC 由来上清における抗血管新生能に CXCL9 および CXCL10 が関与しているかどうかを確認する必要がある。何故ならば IFN- γ は樹状細胞から抗血管新生作用を有する、これら両ケモカインを誘導することが知られているためである。そこで、CXCL9 および CXCL10 に対する中和抗体が IFN-DC 由来の上清の抗血管新生能を抑制するかを検討した。その結果、CXCL9 および CXCL10 ではなく、sVEGFR-1 に対する中和抗体により IFN-DC 由来上清の抗血管新生能が抑制された。以上から TNF-DC および IFN-DC により産生された sVEGFR-1 は生物学的に活性であり、HUVEC の管腔形成の減少に関与していることが示唆された (Fig.4C)。

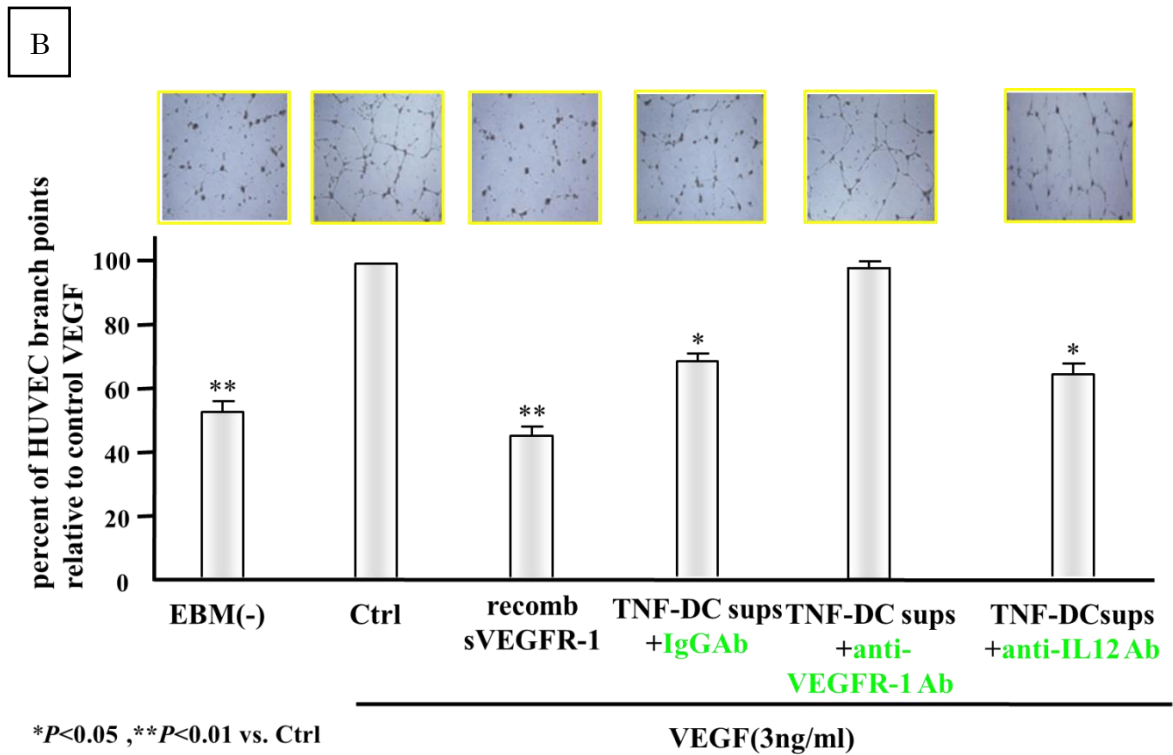


Fig.4B TNF-DC 培養上清による HUVEC の管腔形成の阻害機序

各中和抗体を用い TNF-DC 上清による HUVEC 管腔形成の阻害に対する影響を検討した。HUVEC はマトリゲル上で 20 時間培養した。TNF-DC 上清は IgG (10 μ g/ml)、anti-VEGFR-1 Ab (10 μ g/ml)、anti-IL-12 Ab (10 μ g/ml) を処置したものを実験に用いた。定視野における枝分かれ部位を血管新生定量ソフトウェアを用いて定量した。

C

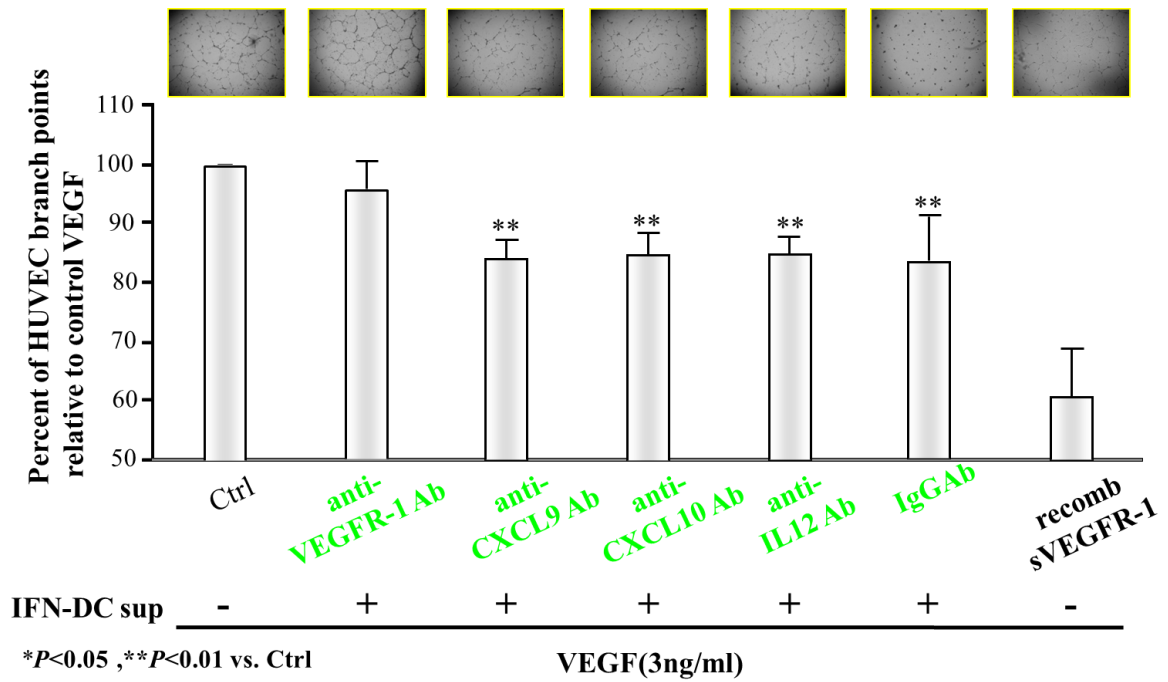


Fig.4C IFN-DC 由来上清による HUVEC 管腔形成阻害に対する抗 sVEGFR-1 抗体の中和能の検討 HUVEC は以下のようにマトリゲル中で培養した。IFN-DC 上清、VEGF と抗 sVEGFR-1 抗体 (10 μ g/ml)、IFN-DC 上清、VEGF と抗 CXCL9 抗体 (10 μ g/ml)、IFN-DC 上清、VEGF と抗 CXCL10 抗体 (10 μ g/ml)、IFN-DC 上清、VEGF と抗 IL-12 抗体 (10 μ g/ml)、IFN-DC 上清、VEGF と抗 IgG 抗体 (10 μ g/ml)、IFN-DC 上清と抗 sVEGFR-1 抗体 (10 μ g/ml)。定視野における枝分かれ部位を血管新生定量ソフトウェアを用いて定量した。

2-4 *In vivo* における TNF-DC の抗腫瘍効果

SCID マウスモデルを用い、TNF-DC による腫瘍増殖抑制効果を検討した。マウスの右側腹部皮下に PC-14 細胞を 2×10^6 cells 接種し、7 日後腫瘍が約 10mm^3 になった時点で mDC 投与を開始した。マウスに mDC (1×10^6 cells) を 1 週毎に腫瘍周辺に投与した。その結果、Fig.5A に示すように PBS 投与群と比較して TNF-DC 投与群において有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。一方、LPS-DC 群は PBS 群とほぼ同様の腫瘍増殖を示した。

また、ヒト抗 DC-SIGN 抗体を用いた免疫化学染色により、投与した樹状細胞は腫瘍周辺に投与後、少なくとも 60 時間は確認できた (Fig.5B)。

A

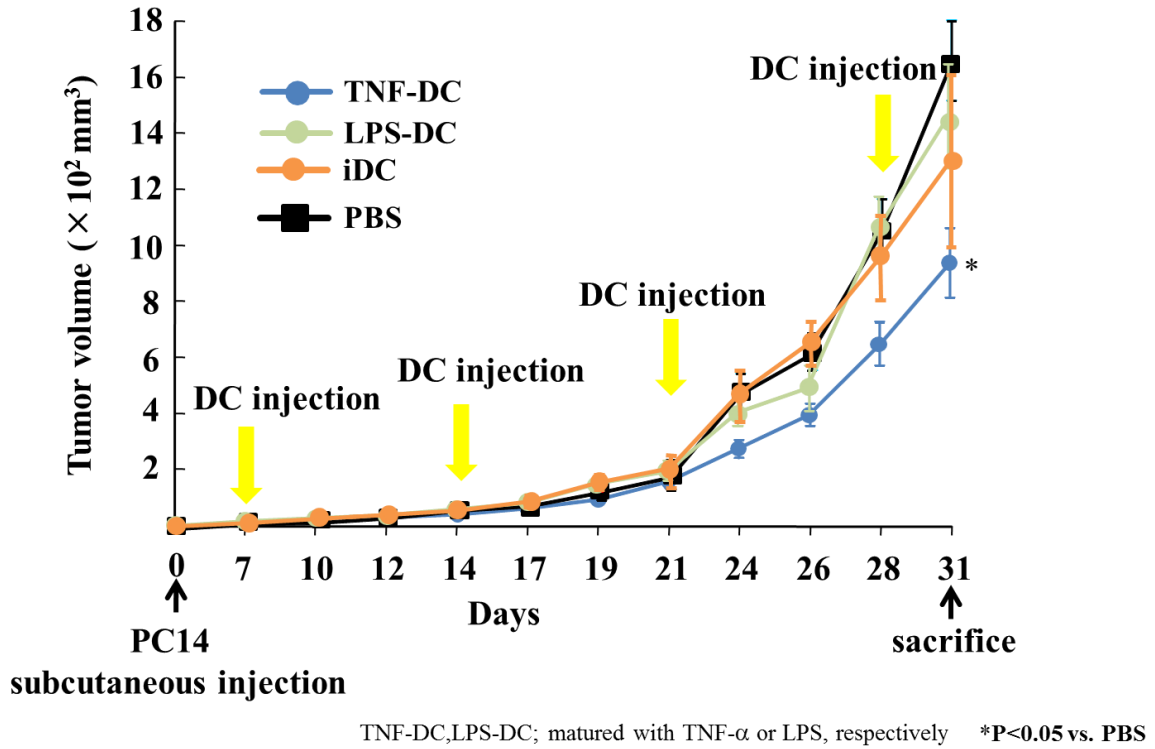
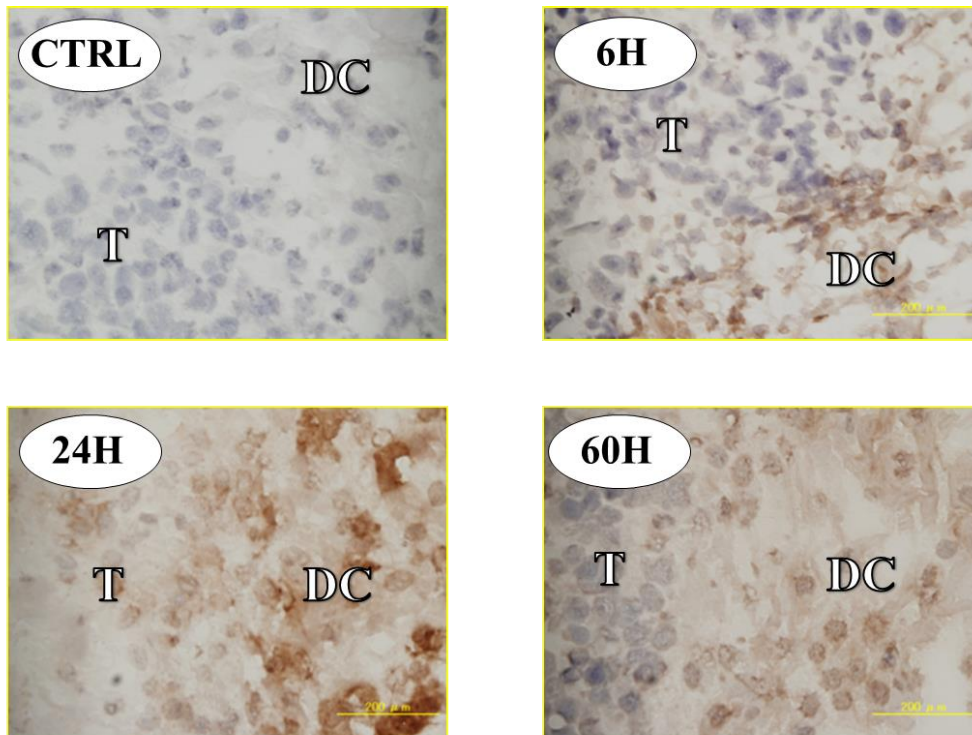


Fig.5A 腫瘍増殖に対する mDC 投与の効果

SCID マウス(5 匹/1 グループ)に PC-14 (lung adenocarcinoma cell) 2×10^6 個を皮下投与した。7 日目に腫瘍の大きさが約 10 mm^3 になった時点で mDC(1×10^6 cells)あるいは PBS(ー)を 1 週毎に腫瘍周辺に投与した。腫瘍の大きさは週に二度観察した。mDC として TNF- α により成熟化した mDC (TNF-DC) と LPS により成熟化させた mDC (LPS-DC) を用いた。

B



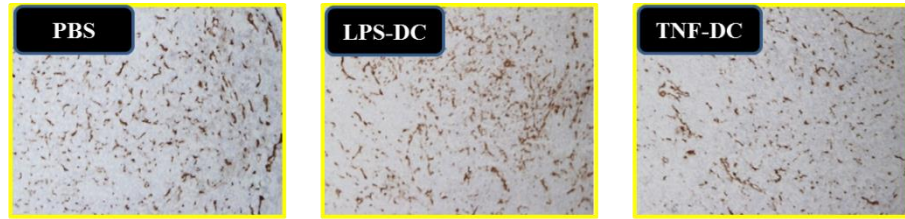
T ; tumors DC ; dendritic cells

Fig.5B 抗ヒト DC-SIGN 抗体による投与した樹状細胞の免疫化学染色

TNF-DC を投与 14 日目に PC-14 主腫瘍に投与した。腫瘍は樹状細胞投与 6、24、60 時間後回収した。樹状細胞処置した PC-14 腫瘍の凍結組織はコントロール IgG、抗ヒト DC-SIGN 抗体で染色した。

さらに PC14 腫瘍を 31 日目に摘出し、CD31 免疫組織化学染色により腫瘍組織における血管新生を評価した。その結果、PBS 群と比較して TNF-DC 処置群において腫瘍組織における血管新生が抑制されていた (Fig.5C、5D)。一方、LPS-DC の投与群では CD31 陽性血管が増加する傾向が見られたが PBS 群と比較して有意差は無かった。

C



D

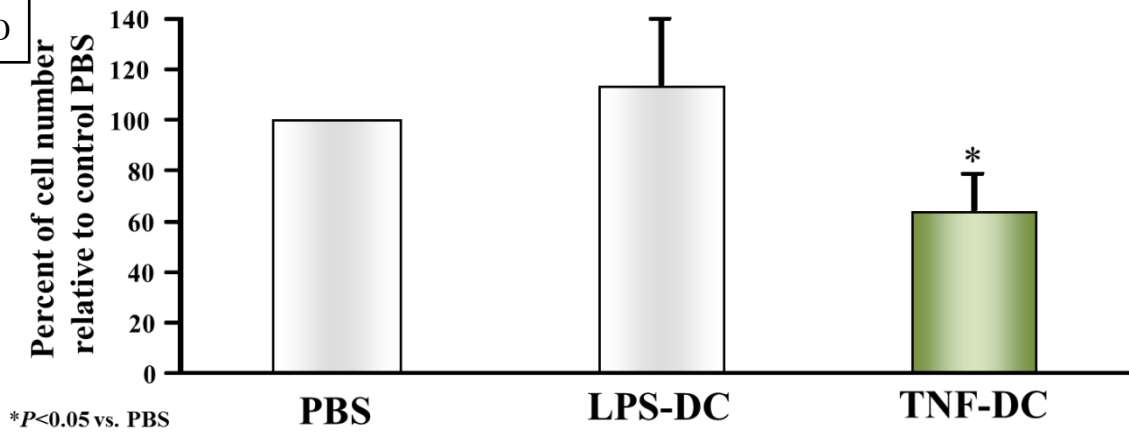


FIG.5C,D 腫瘍組織における血管新生に対する mDC 投与の影響

SCID マウスモデルより PC-14 腫瘍を 31 日目に摘出し、腫瘍組織における血管新生について検討した。血管新生は CD31 免疫組織化学染色により評価した。定視野における CD31 陽性血管数を定量化した。

第3章 考察

本研究では、単球由来樹状細胞が sVEGFR-1 産生能を有することを明らかにした。また、TNF- α あるいは sCD40L+IFN- γ で成熟化された樹状細胞は、他の刺激剤で成熟化された樹状細胞と比較して sVEGFR-1 産生能が増加していた。一方、樹状細胞の成熟化の指標となる表面マーカー（CD83、CCR7）の発現強度と sVEGFR-1 及び VEGF 産生量の間に関係は見られなかった。また、樹状細胞由来 sVEGFR-1 は生物学的に活性であり、VEGF による HUVEC 管腔形成を阻害する作用を有すること、SCID マウスモデルを用いた *in vivo* の検討でも抗腫瘍効果を有することを明らかにした。

最初に本研究では樹状細胞培養上清中の sVEGFR を測定し、樹状細胞における sVEGFR-1 産生能について検討した。その結果 TNF-DC において sVEGFR-1 産生および mRNA 発現が認められた (Fig.1A,B)。sVEGFR-1 は VEGFR1 mRNA 選択的スプライシングにより胎盤や血管内皮細胞より産生されることが知られている[17-19]。一方、ヒト単球も sVEGFR-1 産生能を有することが近年報告された[27,35]。Eubank らは、無刺激単球の sVEGFR-1 産生能は低いが、GM-CSF 刺激によりそれが向上することを示した[27]。今回の結果より、単球由来樹状細胞は VEGFR1 mRNA 選択的スプライシングにより sVEGFR-1 を産生していることが示唆された。さらに Fig.1C,D に示すように TNF-DC による sVEGFR-1 産生能は経時的に増加することが明らかとなった。一方、LPS-DC においては sVEGFR-1 産生能に変化は見られず、VEGF 産生能において経時的増加が認められた。

したがって、成熟化刺激により成熟樹状細胞の sVEGFR-1 あるいは VEGF 産生能に違いが生じる可能性が考えられた。しかし FACS を用いて成熟樹状細胞の成熟化に関連する免疫表現型を検討したところ、TNF-DC と LPS-DC において表現型に違いは見られなかった。また、他の成熟化刺激剤においても樹状細胞は同様に成熟化されていることが明らかとなった (Fig.2A、B)。一方で、樹状細胞は大きく分けて骨髄系樹状細胞 (DC1) とリンパ球系樹状細胞 (DC2) が知られている。各樹状細胞に特徴的な表面マーカーを用いた FACS の結果、今回、分化、誘導した樹状細胞は CD11c 陽性かつ CD123 陰性であった (Fig.2C)。このことから本研究で使用した樹状細胞は DC1 であることが明らかになった。

異なる成熟化刺激剤を処置しても樹状細胞の成熟化には大きな違いは見られなかったが、Fig.1 で示されたように sVEGFR-1 及び VEGF 産生能には異なる傾向を示す可能性が考えられたため、各成熟樹状細胞の培養上清中の sVEGFR-1 および VEGF 産生能を ELISA を用いて検討した。その結果、TNF- α あるいは sCD40L+IFN- γ により成熟化された樹状細胞 (TNF-DC、IFN-DC) において、未熟樹状細胞に比較し sVEGFR-1 産生能が有意に増加していることが明らかとなった。一方、他の刺激により成熟化された樹状細胞は未熟樹状細胞に比較し VEGF 産生能が有意に増加していることが明らかとなった (Fig.3A、B)。次に骨髄樹状細胞は IL-12 を産生することが知られているため[12]、ELISA により樹状細胞培養上清中の IL-12 について検討を行ったところ、これも成熟化刺激による産生能の違いが明らかとなった (Fig.3C)。また、Fig.3D に示すように各成熟樹状細胞における sVEGFR-1

と VEGF 産生量の比を計算した結果、TNF-DC および IFN-DC は血管新生抑制に、他の樹状細胞は血管新生促進に働く可能性が示唆された。このことより成熟化刺激の違いによって、同じ単球由来樹状細胞でも異なる性質を示す樹状細胞が誘導されていると考えられた。

次に HUVEC を用いて成熟樹状細胞培養上清の管腔形成に対する影響を検討した。その結果、TNF-DC および IFN-DC の培養上清が管腔形成を有意に抑制することが明らかとなった (Fig.4A)。一方で LPS-DC の培養上清では管腔形成が促進された。この結果は Fig.3D を支持するものであり、TNF-DC および IFN-DC は血管新生抑制に LPS-DC は血管新生促進に関与することが明らかとなった。さらに樹状細胞由来上清における HUVEC の管腔形成阻害機序を明らかにするため、抗 VEGFR-1 抗体あるいは抗 IL-12 抗体を上清に処置し管腔形成試験を行った。成熟樹状細胞による抗血管新生作用が管腔形成阻害に IL-12 を介するという報告はされているが[26]、抗 IL-12 抗体を処置しても管腔形成阻害に変化は見られなかった。しかし、抗 VEGFR-1 抗体の処置により管腔形成阻害作用が抑制されたことより、成熟樹状細胞由来 sVEGFR-1 が関与していることが示唆された (Fig.4B)。

また、IFN- γ は樹状細胞に作用し抗血管抑制効果のある CXCL9 および CXCL10 産生を促すことが知られている。そのため、両ケモカインの抗血管新生作用の影響を検討するため、各中和抗体を用いて管腔形成試験を行った。その結果、中和抗体を用いた場合においても IFN-DC 由来上清の抗血管新生抑制能は抑制されなかった (Fig.4C)。以上より、TNF-DC

および IFN-DC 由来上清の抗血管新生抑制作用は sVEGFR-1 に依るものであると示唆された。

最後に SCID マウスモデルを用いて TNF-DC による抗腫瘍増殖効果を検討した。Fig.5A に示すように TNF-DC 投与群では PBS 投与群に比べ有意に腫瘍増殖を抑制することが明らかとなった。さらに、Fig.5B に示すように樹状細胞投与後少なくとも 60 時間は腫瘍の周りに集積し抗血管新生抑制作用をあらわすことが明らかとなった。また、CD31 免疫組織化学染色により腫瘍組織における血管新生を評価したところ TNF-DC 投与群において血管新生が抑制されていることが明らかとなった (Fig.5C、D)。この結果から TNF-DC は腫瘍内の血管新生を抑制することで腫瘍の増殖を抑制する作用を有することが示唆された。

今回、成熟樹状細胞が成熟化刺激の違いにより血管新生抑制型の樹状細胞と血管新生促進型の樹状細胞に誘導されることが示唆された。これまでに腫瘍への樹状細胞浸潤について様々な報告がされているが[36-38]、VEGF は未熟樹状細胞の成熟化を阻害することが知られており[39,40]、VEGF の発現レベルと腫瘍内への成熟樹状細胞浸潤量の減少に相関があることも報告されている[36,37]。さらに岩本らは CD1a⁺や S100⁺DC ではなく CD83 陽性腫瘍浸潤成熟樹状細胞数が乳がん患者において無再発生存率およびリンパ節転移数の減少と相関していることを報告している[38]。これらの報告より VEGF による DC の成熟化抑制作用が腫瘍の悪化につながり、一方で樹状細胞の効率的な成熟化が免疫反応の効果的な誘導を介した抗腫瘍効果の発現につながると考えられる。したがって成熟樹状細胞によ

り産生される sVEGFR-1 は抗血管新生因子として重要であるのみならず効率的な樹状細胞の成熟化に重要な因子であるということが考えられる。今回の結果より、TNF-DC あるいは IFN-DC は、腫瘍細胞から産生される VEGF による成熟化阻害の影響を軽減することや sVEGFR-1 産生による血管新生抑制作用を介して他の樹状細胞より強い抗腫瘍効果を持つと考えられる。本研究の結果は免疫療法において成熟樹状細胞を誘導する際に sVEGFR-1 産生能を考慮すべきであることを示唆するものである。

小括

本研究では TNF- α あるいは sCD40L+IFN- γ で成熟化したヒト単球由来成熟状細胞が生物学的活性を有する sVEGFR-1 を産生することを初めて明らかにした。また、sVEGFR-1 を産生する成熟樹状細胞は、抗原提示能に加えて血管新生抑制効果をあわせ持つと考えられる。今後 sVEGFR-1 を高産生する樹状細胞を用いることで、より効果的な抗腫瘍免疫療法の実現が可能になると考えられる。

参考文献

- [1] Hanahan D, Folkman J. 1996. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 86:353-364.
- [2] Ferrara N, Kerbel RS. 2005. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438:967-974.
- [3] Noonan DM, De Lema Barbaro A, Vannini N, Mortara L, Albini A. 2008. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer Metastasis Rev* 27:31-40.
- [4] Strasly M, Cavallo F, Geuna M, Mitola S, Colombo MP, Forni G, Bussolino F. 2001. IL-12 inhibition of endothelial cell functions and angiogenesis depends on lymphocyte-endothelial cell cross-talk. *J Immunol* 166:3890-3899.
- [5] McLean K, Buckanovich RJ. 2008. Myeloid cells functioning in tumor vascularization as a novel therapeutic target. *Transl Res* 2008; 151:59-67.
- [6] Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. 2008. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 8:618-631.
- [7] Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. 1994. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 55:410-422.
- [8] Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A. 2006. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 25:315-322.
- [9] Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. 2006. Tumour-associated macrophages are a

distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42:717-727.

[10]Roskoski R Jr. 2007. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* 62:179-213.

[11]Matsuyama W, Hashiguchi T, Mizoguchi A, Iwami F, Kawabata M, Arimura K, Osame M. 2000. Serum levels of vascular endothelial growth factor dependent on the stage progression of lung cancer. 118:948-951

[12]Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. 1990. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 5:519-524.

[13]de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255:989-991.

[14]Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Böhlen P. 1992. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 1579-1586.

[15]Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Møller NP, Risau W, Ullrich A. 1993. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72:835-846.

- [16] Shibuya M. 2006. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 39: 469-478.
- [17] Kendall RL, Thomas KA. 1993. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10705-10709.
- [18] Kendall RL, Wang G, Thomas KA. 1996. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 226:324-328.
- [19] Roeckl W, Hecht D, Sztajer H, Waltenberger J, Yayon A, Weich HA. 1998. Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptors 1 and 2. *Exp Cell Res* 241:161-170.
- [20] Shortman K, Naik SH. 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. [Nat Rev Immunol.](#) 7:19-30
- [21] Steinman RM. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. [Annu Rev Immunol.](#) 9:271-296
- [22] KS Akagawa, N Takasuka, Y Nozaki, I Komuro, M Azuma, M Ueda, M Naito and K Takahashi. 1996. Generation of CD11c+RelB+ Dendritic Cells and Tartrate-Resistant Acid Phosphatase-Positive Osteoclast-Like Multinucleated Giant Cells From Human Monocytes. *Blood.* 88:4029-4039
- [23] Coukos G, Benencia F, Buckanovich RJ, Conejo-Garcia JR. 2005. The role of dendritic cell

precursors in tumour vasculogenesis. *Br J Cancer* 92:1182-1187.

[24] Sozzani S, Rusnati M, Riboldi E, Mitola S, Presta M. 2007. Dendritic cell-endothelial cell cross-talk in angiogenesis. *Trends Immunol* 28:385-392.

[25] Riboldi E, Musso T, Moroni E, Urbinati C, Bernasconi S, Rusnati M, Adorini L, Presta M, Sozzani S. 2005. Cutting edge: proangiogenic properties of alternatively activated dendritic cells. *J Immunol* 175:2788-2792.

[26] Curiel TJ, Cheng P, Mottram P, Alvarez X, Moons L, Evdemon-Hogan M, Wei S, Zou L, Kryczek I, Hoyle G, Lackner A, Carmeliet P, Zou W. 2004. Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res.* 64:5535-5538.

[27] Eubank TD, Roberts R, Galloway M, Wang Y, Cohn DE, Marsh CB. 2004. GM-CSF induces expression of soluble VEGF receptor-1 from human monocytes and inhibits angiogenesis in mice. *Immunity.* 21:831-842.

[28] Nishioka Y, Nishimura N, Suzuki Y, Sone S. 2001. Human monocyte-derived and CD83⁺ blood dendritic cells enhance NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 31: 2633-2641.

[29] Nishioka Y, Hirao M, Robbins PD, Lotze MT, Tahara H. 1999. Induction of systemic and therapeutic antitumor immunity using injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin 12. *Cancer Res.* 59: 4035-4041.

[30] Mitani K, Nishioka Y, Yamabe K, Ogawa H, Miki T, Yanagawa H, Sone S . 2003. Soluble Fas in

malignant pleural effusion and its expression in lung cancer cells. *Cancer Sci.* 94: 302-307.

[31] Nishimura N, Nishioka Y, Shinohara T and Sone S. 2001. Enhanced efficiency by centrifugal manipulation of adenovirus-mediated interleukin 12 gene transduction into human monocyte-derived dendritic cells. *Hum. Gene Ther.* 12: 333-346.

[32] Tomimoto H, Yano S, Muguruma H, Kakiuchi S, Sone S. 2007. Levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 are elevated in the exudative pleural effusion. *J Med Invest.* 54: 146-153.

[33] Nishioka Y, Yano S., Fujiki F., Mukaida N., Matsushima K., Tsuruo T. and Sone S. 1997. Combined therapy of multidrug-resistant human lung cancer with anti-p-glycoprotein antibody and monocyte chemoattractant protein-1 gene transduction: the possibility of immunological overcoming of multidrug resistance. *Int. J. Cancer.* 71:170-177.

[34] Li Q, Yano S, Ogino H, Wang W, Uehara H, Nishioka Y, Sone S. 2007. The Therapeutic Efficacy of Anti Vascular Endothelial Growth Factor Antibody, Bevacizumab, and Pemetrexed against Orthotopically Implanted Human Pleural Mesothelioma Cells in Severe Combined Immunodeficient Mice. *Clin Cancer Res.* 13:5918-5925.

[35] Barleon B, Reusch P, Totzke F, Herzog C, Keck C, Martiny-Baron G, Marmé D. 2001. Soluble VEGFR-1 secreted by endothelial cells and monocytes is present in human serum and plasma from healthy donors. *Angiogenesis.* 4:143-154.

[36]Saito H, Tsujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. 1998. Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue. *Br J Cancer*. 78:1573-1577.

[37] Inoshima N, Nakanishi Y, Minami T, Izumi M, Takayama K, Yoshino I, Hara N. 2002. The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 8:3480-3486.

[38] Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, Okuzawa M, Mabuchi H, Nohara T, Gon G, Toyoda M, Tanigawa N. 2002. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer*. 104:92-97.

[39]Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP, Gaborilovich DI. 1998. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol*. 160:1224-1232.

[40] Gaborilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med*. 2:1096-1103.

第2部

抗 podoplanin 特異的抗体を用いた悪性胸膜中皮腫に対する抗体医療に関する 検討

序論

悪性胸膜中皮腫 (Malignant Pleural Mesothelioma; MPM) は壁側胸膜の中皮細胞から発生する悪性腫瘍である[1]。その発症率はまれだと考えられていたが、近年では世界的に上昇している。様々な報告によると、症例数はヨーロッパでは2010年から2020年の間に、アジアでは2030年から2040年の間にピークに達するだろうと推定されている[2,3]。外科手術、放射線療法、さらに化学療法を含む併用療法にもかかわらず、MPMの予後は極めて不良である。診断されてからの平均生存率は4か月から12か月であり、5年生存率は5%を切っている[4-6]。それ故、予後改善のためにはMPMに対する新たな治療方法が極めて必要とされている。

こうしたMPMの現状において、がん免疫療法は新しい治療方法の1つとして考えられる。がん免疫療法とは、正常細胞とがん細胞の抗原上の違いを免疫系細胞に認識させ、直接的あるいは間接的にがん細胞を攻撃する治療法の総称である。この治療法は腫瘍に対する免疫系の多様な反応性を利用しており、その特性を生かした幅広い応用が可能である。現在、がんペプチドワクチン療法、樹状細胞療法、サイトカイン療法など様々なアプローチによりがん免疫療法の研究および応用が試みられているが、最も進歩している免疫療法の一つに抗体医薬品を用いた抗体療法があげられる。抗体療法では抗体が抗原を認識する特異性を利用しており、これまで克服が難しいとされていた転移性腫瘍や既存の治療法では対処できなかった難治性の腫瘍に対しても効果が期待できる。さらに腫瘍細胞に対する反応特異性の高さより、正常細胞への影響を最小限に抑えることができ、副作用の軽減や患者のQOLの向上に寄与できると考えられる。現在、日本だけでもTable 1. に示すように

様々な抗原を標的とした抗体医薬品が実用化されている。現在、MPM に特異的な様々な腫瘍関連抗原が報告されているが、その数は十分とは言えない[7-9]。そうした中で、特異的抗原を用いた免疫療法はもっとも有望なアプローチと考えられるが、悪性胸膜中皮腫マーカーであるメソテリン(CD26)に対する抗CD26ヒト化抗体を用いた臨床試験は現在Phase Iである[10]。

分類	一般名	主な適応疾患	承認年
ヒト化抗HER2抗体	トラスツマブ	HER2過剰発現乳がん、胃がん	2001
キメラ型抗CD20抗体	リツキシマブ	CD20陽性B細胞性非ホジキンリンパ腫	2001
カリケアマイシン結合ヒト化抗CD33抗体	ゲムツズマブ・オゾガマイシン	CD33陽性急性骨髄性白血病	2005
キメラ型EGFR抗体	セツキシマブ	EGFR陽性結腸、直腸がん	2008
ヒト化抗VEGF抗体	ベバシズマブ	結腸・直腸がん、非小細胞性肺がん、乳がん	2007
ヒト型抗EGFR抗体	パニツマブ	KRAS野生型結腸、直腸がん	2010
⁹⁰ Y標識マウス抗CD20抗体	⁹⁰ Y-イブリツモマブ・テウキセタン	CD20陽性B細胞性非ホジキンリンパ腫	2008
ヒト化CCR4抗体	モガムリズマブ	CCR4陽性成人T細胞白血病リンパ腫	2012
ヒト型抗CD20抗体	オフアツムマブ	CD20陽性慢性リンパ性白血病	2013

Table 1. 日本で承認されているがん抗体医薬

近年、podoplanin という分子が悪性胸膜中皮腫において高い陽性率を示すことが知られている。また、腫瘍細胞による血小板凝集および腫瘍の浸潤、転移機構に関与していると考えられている[11]。(文献森田 14)。Podoplanin は腫瘍組織のみならず、リンパ管やI型肺胞上皮などの正常組織における発現も報告されている[12-14]。[森田 20-22]例えば、扁平上皮がん [15]、頭蓋内細胞腫のうち germinoma や未分化 teratoma [16]、精巣腫瘍のうち seminoma [17]、脳腫瘍 [18]と、多くのヒト腫瘍において発現の亢進が確認されている。我々はこの分子に着目し、podoplanin が抗体療法の標的として有用であるか否かについて検討を行った。現在 Table 2. に示すよう多くの抗ヒト podoplanin 抗体が販売されて

いるが、中でも加藤らが作製したラット抗体 NZ-1 は 3 つの PLAG-domain のうち podoplanin の活性に重要である PLAG-2 と PLAG-3 を認識し、podoplanin 誘導性の血小板凝集において podoplanin と血小板上の podoplanin 受容体である CLEC-2 の結合を阻害することが示されている[19]。

Desination	Source	Species	Mono/Poly	Antigen
NZ-1	AngioBio	Rat	Monoclonal	Peptide (38-51 aa)
D2-40	Dako	Mouse	Monoclonal	Dysgerminoma tissue
AB3	AngioBio	Mouse	Monoclonal	Not clarified
18H5	Abcam	Mouse	Monoclonal	Recombinant protein expressed in MDCK cells

Table 2. 診断および機能解析に用いられている抗podoplanin 抗体

さらに、NZ-1 はこの結合を阻害することにより、podoplanin 誘導性の血小板凝集を濃度依存的に阻害し、血行性転移も有意に抑制する[20]。Glioblastoma 細胞株 D2159MG を用いた *in vivo* 腫瘍移植片モデルの検討によって NZ-1 は高い抗原選択性を持ち、生体内において正常組織にはほとんど滞留せず、腫瘍に効率的に集積することが明らかにされている[21]。また、この研究では NZ-1 は解離定数 1.2×10^{-10} M を示し、podoplanin に対して非常に高い親和性を示すことも報告されている[21]。このように NZ-1 の治療抗体としての有用性については、過去にいくつかの報告がなされているが、NZ-1 が抗体の代表的な抗腫瘍メカニズムである補体依存性細胞傷害 (complement-dependent cytotoxicity ; CDC) 活性および抗体依存性細胞傷害 (Antibody-dependent cellular cytotoxicity ; ADCC) 活性を誘導するか否かについてはこれまでに報告されていない。

そこで本研究では NZ-1 を用い悪性胸膜中皮腫細胞および悪性胸膜中皮腫臨床組織における podoplanin の発現を解析した後、NZ-1 が CDC 活性および ADCC 活性を誘導するか否かについて検討を行った。また、SCID mouse 悪性胸膜中皮腫皮下移植モデルを用い、*in vivo* における NZ-1 の抗腫瘍効果について評価した。さらに NZ-1 をキメラ型に改変した抗体である NZ-8 についても CDC 活性および ADCC 活性を測定し、悪性胸膜中皮腫に対

する podoplanin 特異的抗体療法の臨床応用の可能性について検討を行った。

実験材料および実験方法

1. 細胞

本研究では、16種のヒト MPM セルラインを用いた。ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、Y-MESO-8A、Y-MESO-9、Y-MESO-12、Y-MESO-14 は愛知がんセンター研究所より供与いただいた。EHMES-1 と EHMES-10 は濱田泰伸先生（愛媛大学）より、NCI-H290 と NCI-H513 は Dr Adi F.Gazder（University of Texas South-western Medical center,Dallas,TX,USA）より、Y-MESO-8A、ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、Y-MESO-9、Y-MESO-12、Y-MESO-14 は愛知がんセンター研究所より、供与いただいた。MSTO-211H、NCI-H28、NCI-H226、NCI-H2052、NCI-H2373、NCI-2452 は American Type Culture Collection より購入した。全てのヒト悪性胸膜中皮腫細胞は 10% FBS (GIBCO)、100U/mL penicillin (Meiji Seika Kaisha)、50 μ g/mL streptomycin (Meiji Seika Kaisha) を含む RPMI-1640 (GIBCO) にて 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下でインキュベートした。

2. 動物

6週齢の雄性 SCID mouse および 7週齢の雄性 rat は日本クレア株式会社から購入した。これらの動物は購入後、徳島大学動物実験指針に従い、SPF グレードの飼育環境下で少なくとも 1 週間は順応させた。

3. 抗体

本研究で使用した抗体のうち NZ-1 および NZ-8 は、加藤幸成先生（山形大学）より供与いただいた。NZ-1 はヒト podoplanin の 38-51 番目のアミノ酸からなる合成ペプチドを抗原として、ラットに免疫して作製したラット IgG2a モノクローナル抗体で、podoplanin の PLAG-domain を高感度かつ特異的に認識する。NZ-8 は NZ-1 の可変領域をヒト IgG1 の定常領域に融合して作製したラット・ヒト型キメラ IgG モノクローナル抗体である (Figure 1.)。

また、NZ-1、NZ-8 のアイソタイプコントロール抗体としてそれぞれ、rat IgG (rIgG) (Southern Biotech)、human IgG (hIgG) (BECKMAN COULTER) を用いた。また、D2-40 は Angiobio より購入した。D2-40 はヒト podoplanin に対するマウスモノクローナル抗体(IgG1)で、リンパ管内皮細胞のマーカーとして用いられている。フローサイトメトリー解析の二次抗体には goat F (ab')² anti-rat IgG –FITC (BECKMAN COULTER) を使用した。NK cell selection には FITC mouse anti-rat CD161a (BD) を使用した。

- **NZ-1 : ラット IgG2a モノクローナル抗体**
- **NZ-8 : ラット・ヒト型 キメラ モノクローナル抗体**
(NZ-1 の可変領域をヒト IgG1 の定常領域に連結)

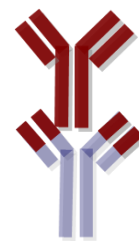


Figure1.本研究にて使用した抗 podoplanin 抗体

4. Flow cytometry 解析

各細胞における podoplanin の発現は flow cytometry によって解析した。細胞 (5×10^5 cells) を PBS に懸濁し洗浄した後、1次抗体として NZ-1、NZ-8 または rat IgG ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)、human IgG ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) を遮光条件下、氷上で 30 分間処置した。その後細胞を PBS で洗浄し、2次抗体として goat F (ab')² anti-rat IgG –FITC (BECKMAN COULTER) または goat F (ab')² anti-human IgG –FITC (BECKMAN COULTER) を遮光条件下、再び細胞を PBS で洗浄した後、再懸濁し、FACS Calibur flow cytometer (BD) に供した。解析は、CellQuest software (BD) にて行った。発現量は NZ-1 または NZ-8 の rat IgG または human IgG に対する mean fluorescence intensity (MFI) の比として mean specific fluorescence intensity (MSFI) で定量化した。

5. 免疫組織染色

免疫組織染色は組織アレイを用い、Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories) によるアビジン-ビオチン複合体免疫ペルオキシダーゼ法にて行った。組織アレイは US Biomax Inc の T391 および MS801 を用いた。キシレンにより組織アレイのホルマリン固定パラフィン包埋切片よりパラフィンを除去した後、Target Retrieval Solution (Dako) を用い加熱による抗原賦活化処理を行った。さらに、3% Hydrogen Peroxide (Wako)の 90 分間処置により内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った。その後、ブロッッキング液 (PBS 10mL + Blocking serum 200 μ L) を室温にて 60 分間処置し、1 次抗体として NZ-1 または NZ-8 または D2-40 を 4 $^{\circ}$ C で 24 時間反応させた後、PBS で 5 分間洗浄した。さらに、ビオチン標識 anti-ratIgG、anti-human IgG、anti-mouse IgG を室温にて 30 分間反応させた後、PBS で 5 分間洗浄した。その後、ABC 試薬を室温にて 30 分間反応させて PBS で 5 分間洗浄し、DAB (Vector Laboratories) で発色させた。また、対比染色として Meyer's Hematoxylin (MUTÔ PURE CHEMICALS) を用いてヘマトキシリン染色を施した。組織アレイはマリノール (MUTÔ PURE CHEMICALS) で封入後、電動システム顕微鏡 OLYMPUS BX 61 (OLYMPUS)で各スポットを撮影した。

6. エフェクター細胞の調整

エフェクター細胞として rat splenocyte、SCIDmousesplenocyte、HumanMNC を用いた。まず、splenocyte は SCID mouse および rat より調製した。摘出した脾臓を 10% FBS 含有 RPMI-1640 中でミンスし、スライドガラスのフロスト部で圧することにより分散させた。分散させた細胞は 70 μ m セルストレーナー (BD) でフィルトレーションを行った後、Red Blood Cell Lysis Buffer (Sigma) で赤血球を溶解し、洗浄したものを 10% FBS 含有 RPMI-1640 に適当な比率で懸濁した。次に、human MNC (ヒト単核球) は健康人より採取した末梢血より調製した。全血を LeucoSep システムに供し、比重遠心

分離により MNC を分離した。LeucoSep リンパ球分離管 (greiner bio-one) に LSMLymphocyteSeparation Medium(MPBiomedicals) を加え、1000 G で 1 分間遠心した。その後、採血した全血を等容量の PBS で希釈し、LSM の入ったチューブに加え、1000 G で 10 分間遠心した。得られた細胞分画は十分に洗浄した後、100 μm セルストレーナー (BD) でフィルトレーションした。

7. 補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性の測定

CDC 活性を誘導する補体分子として baby rabbit complement (CEDARLANE) を用いた。CDC 活性の測定は ^{51}Cr release assay により測定した。ターゲット細胞 (1×10^6 cells) に 37mBq の放射性クロム酸ナトリウム ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) (PerkinElmer) を 50 μL 加えて 5% CO_2 インキュベーター中 37 $^\circ\text{C}$ で 1 時間反応させた。その後、RPMI-1640 により十分に洗浄し、 2×10^5 cells/mL に調製した後、各濃度の抗体および補体をセットした u-bottom 96 well plate (BD) の各穴に 50 μL (1×10^4 cells) ずつ播種した。また、最大放射活性の測定には最終濃度が 0.5 %になるように SDS を含めた RPMI-1640 にターゲット細胞を混合したものを、最小放射活性の測定には RPMI-1640 にターゲット細胞を混合したものをを用いた。これらは適当な時間 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ でインキュベートした後、上清を採取し、ガンマカウンターにて測定した。Cytotoxicity (%) は、 $(A-C)/(B-C) \times 100$ の式より計算した。なお、A は抗体と補体を加えて得られた放射活性 (cpm)、B はターゲット細胞に SDS を処置して得られた最大放射活性 (cpm)、C は RPMI-1640 のみで遊離された最小放射活性 (cpm) である。

8. 抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性の測定

ADCC 活性は ^{51}Cr release assay により測定した。測定の手順および計算方法は〈7. 補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性の測定〉と同様で、補体の代わりにエフェクター細胞 (rat splenocyte、SCID mouse splenocyte、human MNC) を使用した。

9. Anti-asialo GM1 による NK 細胞の depletion

Rat splenocyte (5×10^7 cells) と rabbit anti-asialo GM1 (Wako) 165 μ Lを5mLの RPMI-1640中、室温で30分間反応させた。その後、baby rabbit complementを1mL加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートし、NK細胞を除去した。

10. 抗 CD161a 抗体による rat splenocyte の separation

Rat splenocyte 1×10^8 cells につき FITC mouse anti-rat CD161a (BD) 10 μ g を 30 分間処置し、FITC 標識させた。細胞は洗浄した後 90 μ L/ 10^7 cells の MACS buffer (0.5 % BSA and 2 mM EDTA in PBS (pH7.2)) 中で 10 μ L/ 10^7 cells の anti-FITC microbeads (Miltenyi Biotec) と混合し、4 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた。細胞は洗浄後、500 μ Lの MACS buffer で再懸濁した。Mini MACS (Miltenyi biotec) システムによる separation ではこれらの細胞を MACS separation column (Miltenyi biotec) にアプライし、CD161a 陽性細胞および CD161a 陰性細胞を分取した。Auto MACS (Miltenyi biotec) システムによる separation では「posselds」または「possel」プログラムを使用し、positive ポートより溶出された細胞の収量および純度を確認した後、必要に応じて mini MACS (Miltenyi biotec) システムによる positive selection を行い、CD161a 陽性細胞を分取した。

11. Human MNC の separation

Human MNC は洗浄した後 80 μ L/ 10^7 cells の MACS buffer (0.5 % BSA and 2 mM EDTA in PBS (pH7.2)) 中で 20 μ L/ 10^7 cells の anti-CD56 FITC microbeads (Miltenyi Biotec)または anti-CD14 FITC microbeads (Miltenyi Biotec)と混合し、4 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた。細胞は洗浄後、500 μ Lの MACS buffer で再懸濁した。これらの細胞を Auto MACS システムによる separation で「posselds」と「posseld2」プログラムを使用し、positive ポートより溶出された細胞を分取した。この CD14 positive 細胞を monocyte とした。また、

CD56 negative 細胞を 80 μ L/107 cells の MACS buffer (0.5 % BSA and 2 mM EDTA in PBS (pH7.2)) 中で 20 μ L/107cells の anti-CD56 FITC microbeads (Miltenyi Biotec) と混合し、4 °C で 15 分間反応させ、上と同様に Auto MACS (Miltenyi biotec) システムによる positive selection を行った。この CD14 negative CD56 positive 細胞を NK 細胞として用いた。

12. SCID mouse 悪性胸膜中皮腫皮下移植モデルを用いた抗腫瘍効果の検討

7 週齢の雄性 SCID mouse の右側腹部皮下に 1 匹につき 4 \times 10⁶cells の ACC-MESO-4 を移植した。腫瘍領域 (mm²) は計測した長径 (mm) と短径 (mm) の積として算出した。マウスは移植後の腫瘍領域の平均値が同程度となるよう各群 5 匹ずつに分けた。rat splenocyte をエフェクターとした検討では rat splenocyte (5 \times 10⁶ cells) を 100 μ L の生理食塩水 (大塚製薬) に懸濁し、週 1 回、2 週間腫瘍近傍に皮下投与した。抗体は NZ-1 (100 μ g、500 μ g) および rat IgG (100 μ g) を週 2 回、2 週間腫瘍近傍に皮下投与した。NK 細胞をエフェクターとした検討では <10. 抗 CD161a 抗体による rat splenocyte の separation> に従い、auto MACS システムを利用して rat splenocyte より separation した CD161a 陽性細胞をエフェクター細胞として用いた。CD161a 陽性細胞 (1 \times 10⁵ cells) は 100 μ L の生理食塩水 (大塚製薬) に懸濁し、週 1 回、2 週間腫瘍近傍に皮下投与した。また、NZ-1 単独投与による抗腫瘍効果の評価では、エフェクター細胞のかわりに 100 μ L の生理食塩水を投与した。抗体は NZ-1 (1 μ g、10 μ g、100 μ g) および rat IgG (100 μ g) を週 2 回、2 週間腹腔内に投与した。また、NZ-8 に関しては、抗体は NZ-8(100 μ g) および rat IgG (100 μ g) を週 2 回、2 週間腹腔内に投与した。NK 細胞 (1 \times 10⁵ cells) は 100 μ L の生理食塩水 (大塚製薬) に懸濁し、週 1 回、2 週間腫瘍近傍に皮下投与した。<11.Human MNC の separation> に従い、auto MACS システムを利用して Human MNC より separation した CD56 positive 細胞を NK 細胞として用いた。

13. 統計解析

結果は means±SD. (標準偏差) として示した。各群の有意差は Two-tailed Student's t-test で判定し、 $P<0.05$ (*) または $P<0.001$ (**) を統計的に有意であると判定した。

実験結果

1. 悪性胸膜中皮腫における podoplanin の発現解析

ラットの抗 podoplanin 抗体である NZ-1 およびラット・ヒトキメラ型抗 podoplanin 抗体である NZ-8 を用い、ヒト悪性胸膜中皮腫における podoplanin の発現解析を行った。はじめに、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞における発現を flow cytometry により解析した。次に、ヒト悪性胸膜中皮腫臨床組織における podoplanin の発現を免疫組織染色により確認した。

1-1) ヒト悪性胸膜中皮腫細胞における podoplanin の発現

ヒト悪性胸膜中皮腫細胞における podoplanin の発現を flow cytometry により解析した。Rat IgG (青)と NZ-1 (赤) で染色した結果を Figure 2. に示す。右上隅の数字は rat IgG に対する NZ-1 の mean fluorescence intensity (MFI) の比として mean specific fluorescence intensity (MSFI) を示している。MSFI が 10.00 以上の細胞株を podoplanin 強陽性株、2.00 以上かつ 10.00 未満の細胞株を podoplanin 弱陽性株、2.00 未満の細胞株を podoplanin 陰性株とした。全 16 株のヒト悪性胸膜中皮腫細胞株を解析した結果、ACC-MESO-1、Y-MESO-4、Y-MESO-9、EHMES-1、NCI-H226、NCI-H290、NCI-H2373 が podoplanin 強陽性株、Y-MESO-8A、EHMES-10、NCI-H28、NCI-H513、NCI-H2052、NCI-H2452 が podoplanin 弱陽性株、Y-MESO-12、Y-MESO-14、MSTO-211H が陰性株となった (Figure 2.)。この結果をまとめると、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞全 16 株中 81 %にあたる 13 株が podoplanin 陽性株で、そのうち全体の 44 %にあたる 7 株が強陽性、37 % にあたる 6 株は弱陽性を示した。また、全体の 19 % にあたる 3 株は陰性株であった (Table 3.)。

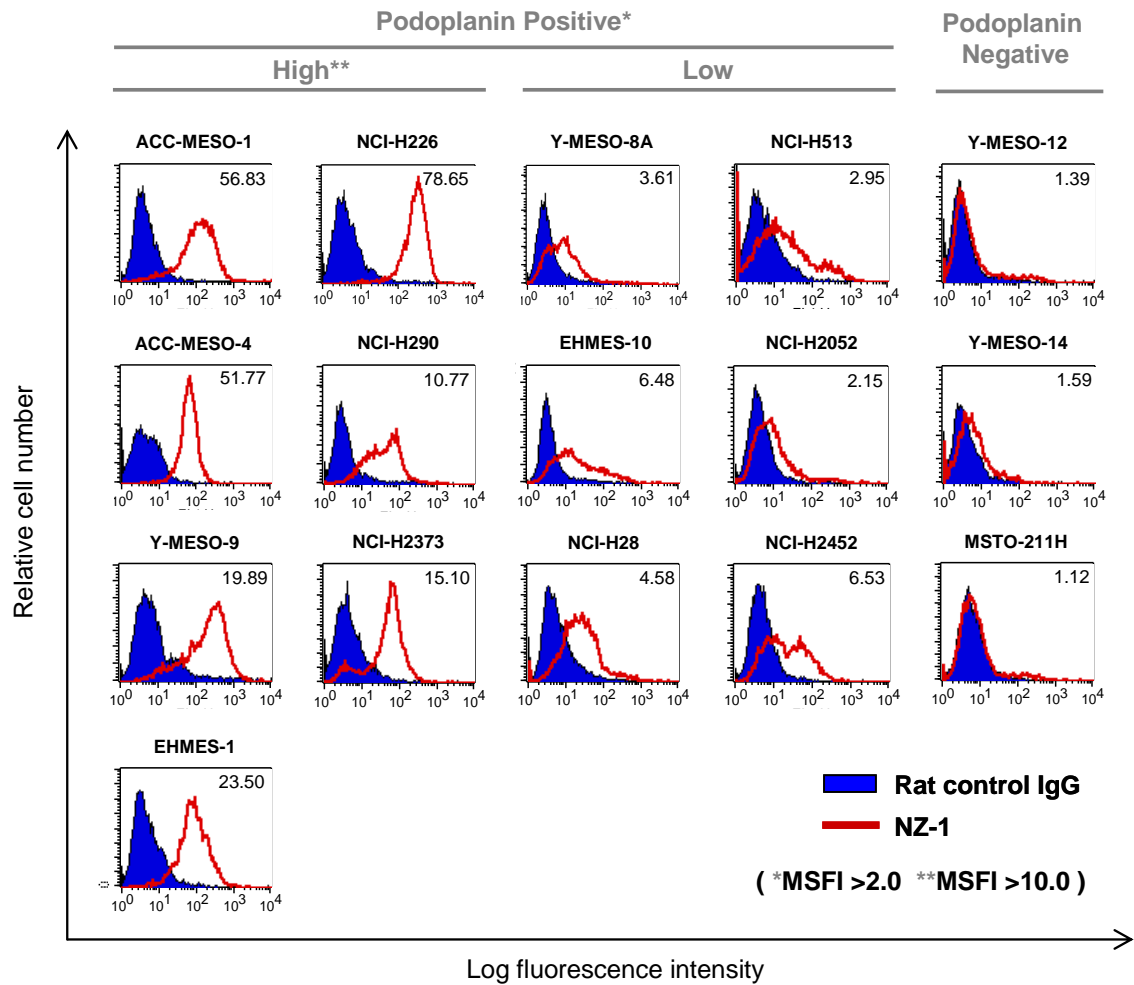


Figure 2. ヒト悪性胸膜中皮腫細胞における podoplanin の発現

16株のヒト悪性胸膜中皮腫細胞を rat IgG (青) と NZ-1(赤)で染色し、flow cytometryにより解析を行った。右上に NZ-1 の rat IgG に対する mean fluorescence intensity (MFI) の比として mean specific fluorescence intensity (MSFI)を示している。MSFI 10.0 以上を示した細胞株を podoplanin 強陽性株、MSFI 2.0 以上を示した細胞株を podoplanin 陽性株、MSFI 2.0 以下を示した細胞株を podoplanin 陰性株とした。

Histological type	Number of cell lines	*Positive (%)		Negative (%)
		**High (%)	Low (%)	
Mesothelioma	16	13 (81)		3 (19)
		7 (44)	6 (37)	

*MSFI >2.0 **MSFI >10.0

Table 3. ヒト悪性胸膜中皮腫細胞における podoplanin の発現頻度

Flow cytometry の結果得られたヒト悪性胸膜中皮腫細胞における podoplanin の発現頻度をまとめた。

次にヒト悪性胸膜中皮腫細胞における podoplanin の発現を NZ-1 と同じように NZ-8 でも検出できるかを podoplanin 陽性株 ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226 および podoplanin 陰性株 MSTO-211H を用いて検討した。Rat IgG または hIgG(青)と NZ-1 または NZ-8 (赤) で染色した結果を Figure 3. に示す。その結果、NZ-8 は、NZ-1 と同様にポドプラニンを検出することができた。(Figure 3.)

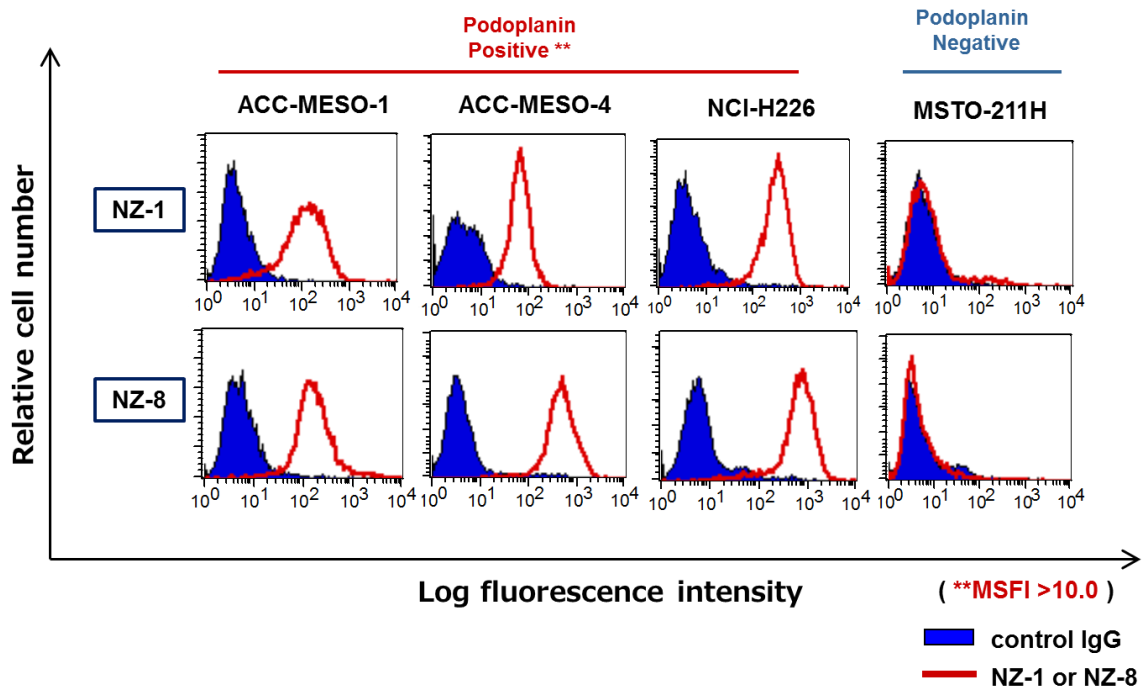


Figure 3. ヒト悪性胸膜中皮腫細胞における podoplanin の発現

ヒト悪性胸膜中皮腫細胞を rat IgG または human IgG (青) と NZ-1 または NZ-8(赤) で染色し、flow cytometry により解析を行った。

1-2) ヒト悪性胸膜中皮腫臨床組織における podoplanin の発現

ヒト悪性胸膜中皮腫臨床組織における podoplanin の発現を調べるため、組織アレイを用いて免疫組織染色を行った。一次抗体に NZ-1 を用い、アビジン-ビオチン複合体免疫ペルオキシダーゼ法により染色した結果を Figure 4. に示した。(A)-(H) は悪性胸膜中皮腫組織、(I)-(J) は良性中皮腫組織、(K)-(L) は正常組織である。結果、悪性胸膜中皮腫では全 70 スポットのうち、58 スポットにあたる 82%において podoplanin の発現が認められた。また、良性中皮腫組織および正常組織においては podoplanin の発現はほとんど認められなかった (Figure 4.)。

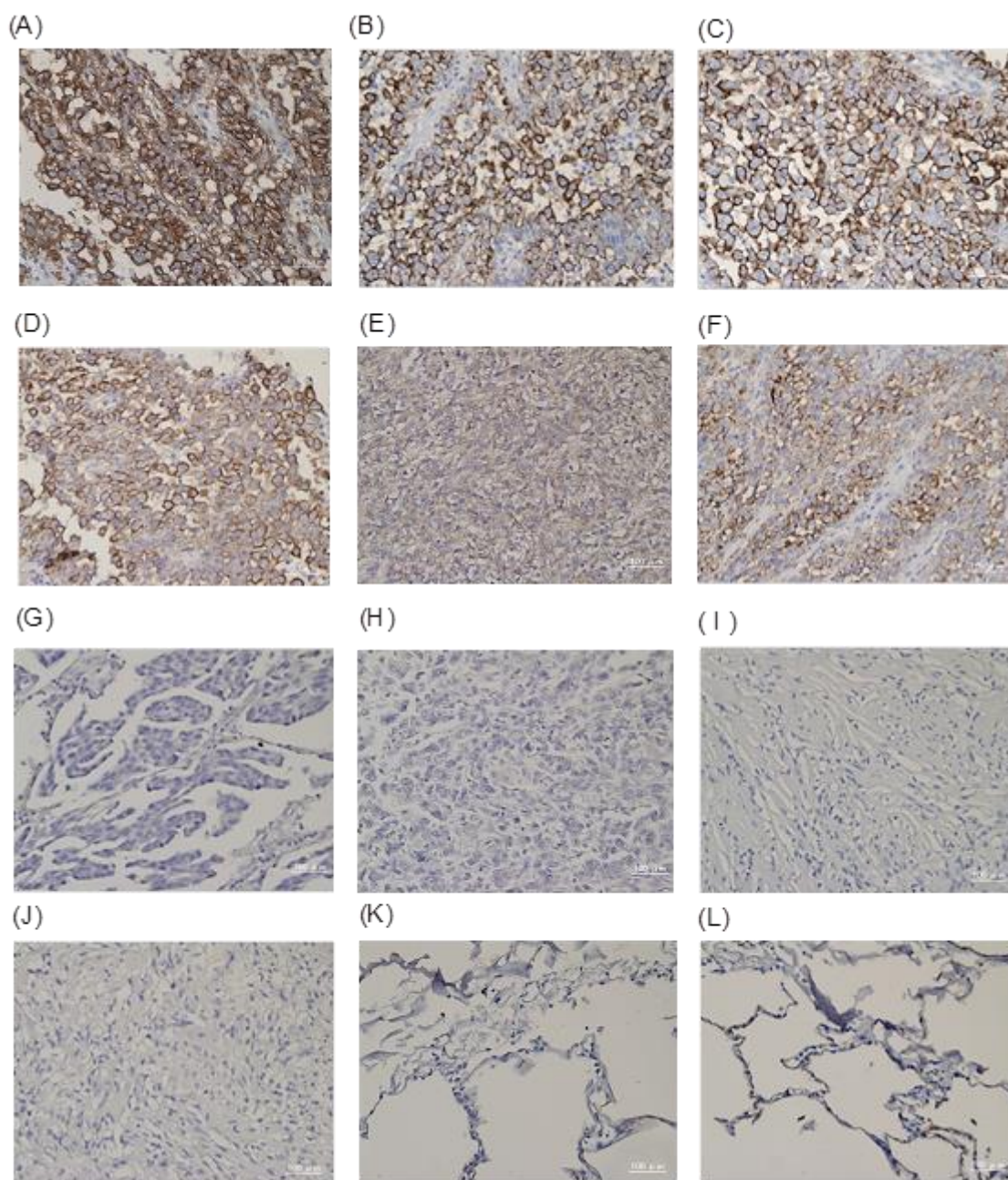


Figure 4. ヒト悪性胸膜中皮腫臨床組織における podoplanin の発現

ヒト悪性胸膜中皮腫臨床組織における podoplanin 発現を解析するため、組織アレイを用いアビジン-ビオチン複合体免疫ペルオキシダーゼ法にて免疫組織染色を行った。一次抗体には NZ-1 を使用した。(A)-(H) は悪性胸膜中皮腫組織、(I)-(J) は良性中皮腫組織、(K)-(L) 正常組織である。

同様に一次抗体に NZ-1、NZ-8、D2-40 を用いて検討を行った結果を Figure 5. に示した。

(A)では、悪性胸膜中皮腫組織における podoplanin の発現を NZ-1(1 μ g/ml)及び NZ-8(1 μ g/ml)で検出した。その結果、NZ-1 を用いた時と同様に、NZ-8 によってポドプラニンの発現を検出することができた。(B)では、悪性胸膜中皮腫組織、正常の肺胞組織、正常の腎臓組織におけるポドプラニンの発現を D2-40(1:500)及び NZ-8(0.1 μ g/ml)で検出した。その結果、悪性胸膜中皮腫組織では両抗体で podoplanin の発現が認められた。肺胞組織においては、D2-40 により、リンパ管で podoplanin の発現が見られた。一方、NZ-8 ではリンパ管は染色されなかった。また、腎臓組織においては、両抗体でポドプラニンの発現は認められなかった。(Figure 5.)

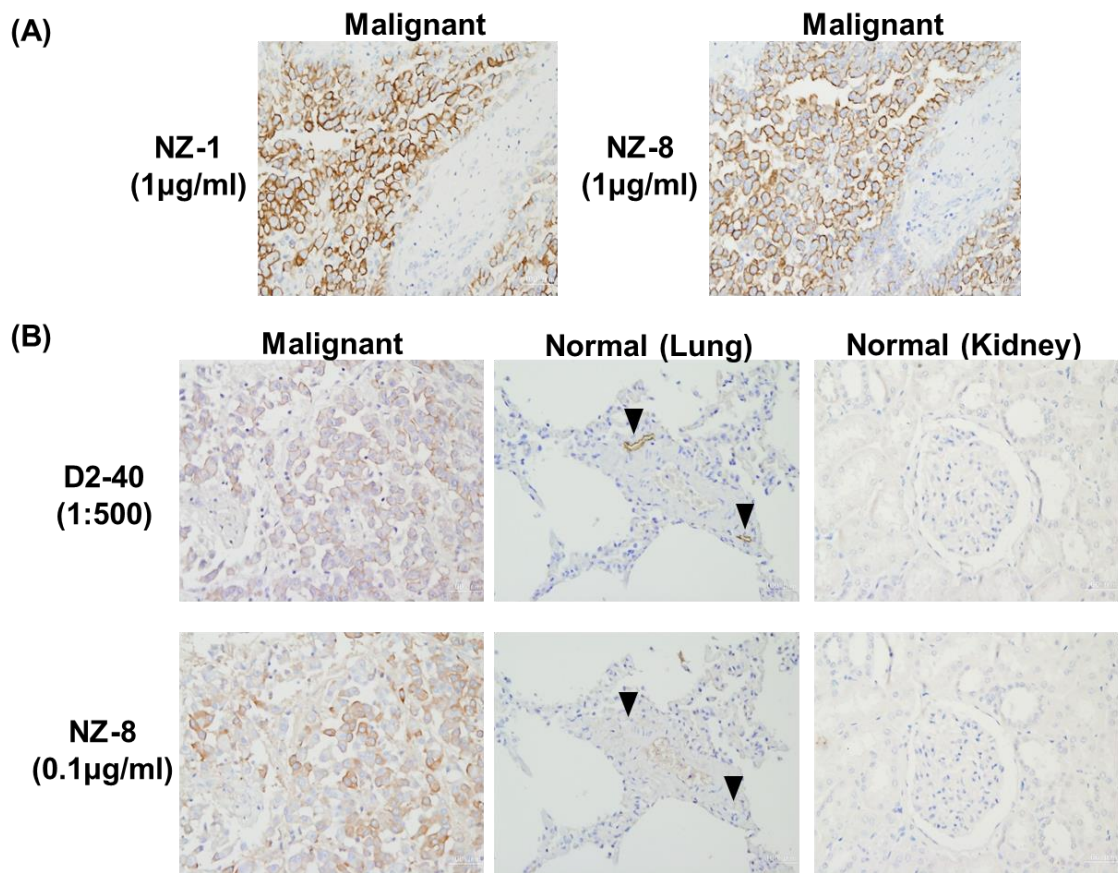


Figure 5. ヒト悪性胸膜中皮腫臨床組織における podoplanin の発現

ヒト臨床組織において、組織アレイを用いアビジン-ビオチン複合体免疫ペルオキシダーゼ法にて免疫組織染色を行った。(A)は NZ-1(1µg/ml)、NZ-8(1µg/ml)を使用して悪性胸膜中皮腫組織における podoplanin 発現を解析した。(B)は悪性胸膜中皮腫組織、正常肺胞組織、正常腎臓組織における podoplanin 発現を D2-40(1:500)、NZ-8(0.1µg/ml)によって解析した。

2. NZ-1 によるヒト悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果の検討

ヒト悪性胸膜中皮腫細胞および臨床組織における podoplanin の高発現が認められたので、次に、NZ-1 および NZ-8 による抗腫瘍効果について検討した。まず、⁵¹Cr release assay により NZ-1 による補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性について調べた。次に、同じく ⁵¹Cr release assay により、NZ-1 および NZ-8 による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性の誘導に関する検討を行った。さらに、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞を移植したマウスモデルを用い、*in vivo* における NZ-1 および NZ-8 の抗腫瘍効果について評価した。

2-1) NZ-1 による補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性

NZ-1 がヒト悪性胸膜中皮腫細胞に対し抗体の主要な抗腫瘍細胞活性の一つである CDC 活性を誘導するか否かについて検討を行った。用いた細胞株は ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226、EHMES-1、Y-MESO-9、NCI-H2052、MSTO-211H である。⁵¹Cr release assay により NZ-1 による CDC 活性を測定した結果、ACC-MESO-4 に対して CDC 活性が誘導された (Figure 6.)。

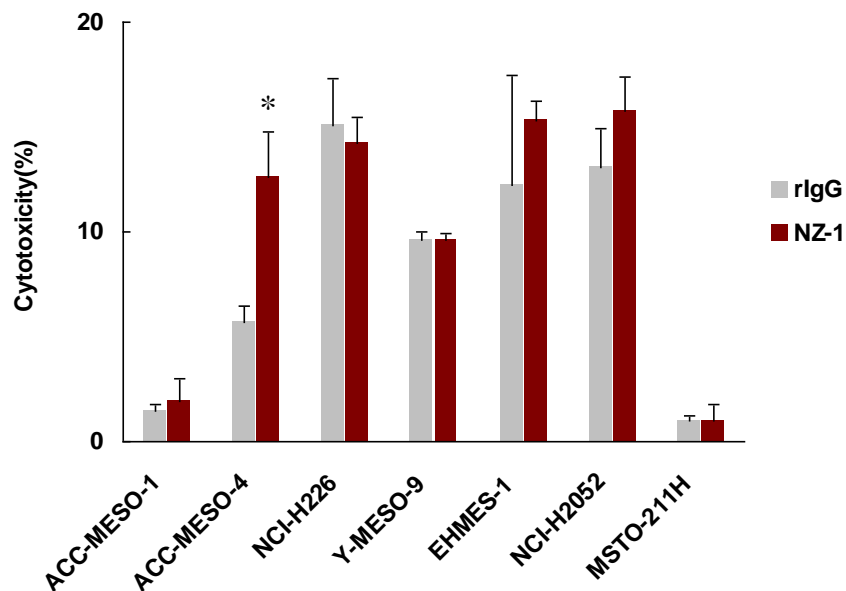


Figure 6. NZ-1 によるヒト悪性胸膜中皮腫細胞に対する CDC 活性

^{51}Cr release assay により NZ-1 のヒト悪性胸膜中皮腫細胞株 ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226、Y-MESO-9、EHMES-1、NCI-H2052、MSTO-211H に対する CDC 活性を測定した。細胞傷害活性を誘導する補体分子として baby rabbit complement を用いた。補体 (diltion rate 4)、抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を処置したターゲット細胞 (1×10^4 cells) は 6 時間反応させた。rIgG はコントロール抗体である。*Significantly different from rIgG (* $P < 0.05$)

2-2) NZ-1 による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性

Podoplanin 特異的抗体が治療抗体として効果を発揮するためには、ターゲット細胞に対して ADCC 活性のような強力な抗腫瘍細胞活性を示すことが重要となる。そこで本検討ではエフェクター細胞として SCID mouse splenocyte、human MNC および rat splenocyte を用い NZ-1 がヒト悪性胸膜中皮腫細胞に対し ADCC 活性を有するか否かについて検討を行った。ADCC 活性も、CDC 活性同様、ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226、EHMES-1、Y-MESO-9、NCI-H2052、MSTO-211H をターゲット細胞として ^{51}Cr release assay により測定した。

2-2-1) SCID mouse splenocyte および Human MNC を用いた検討

エフェクター細胞として SCID mouse splenocyte および Human MNC を用いた結果、悪性胸膜中皮腫細胞に対する ADCC 活性は認められなかった (Figure 7.)

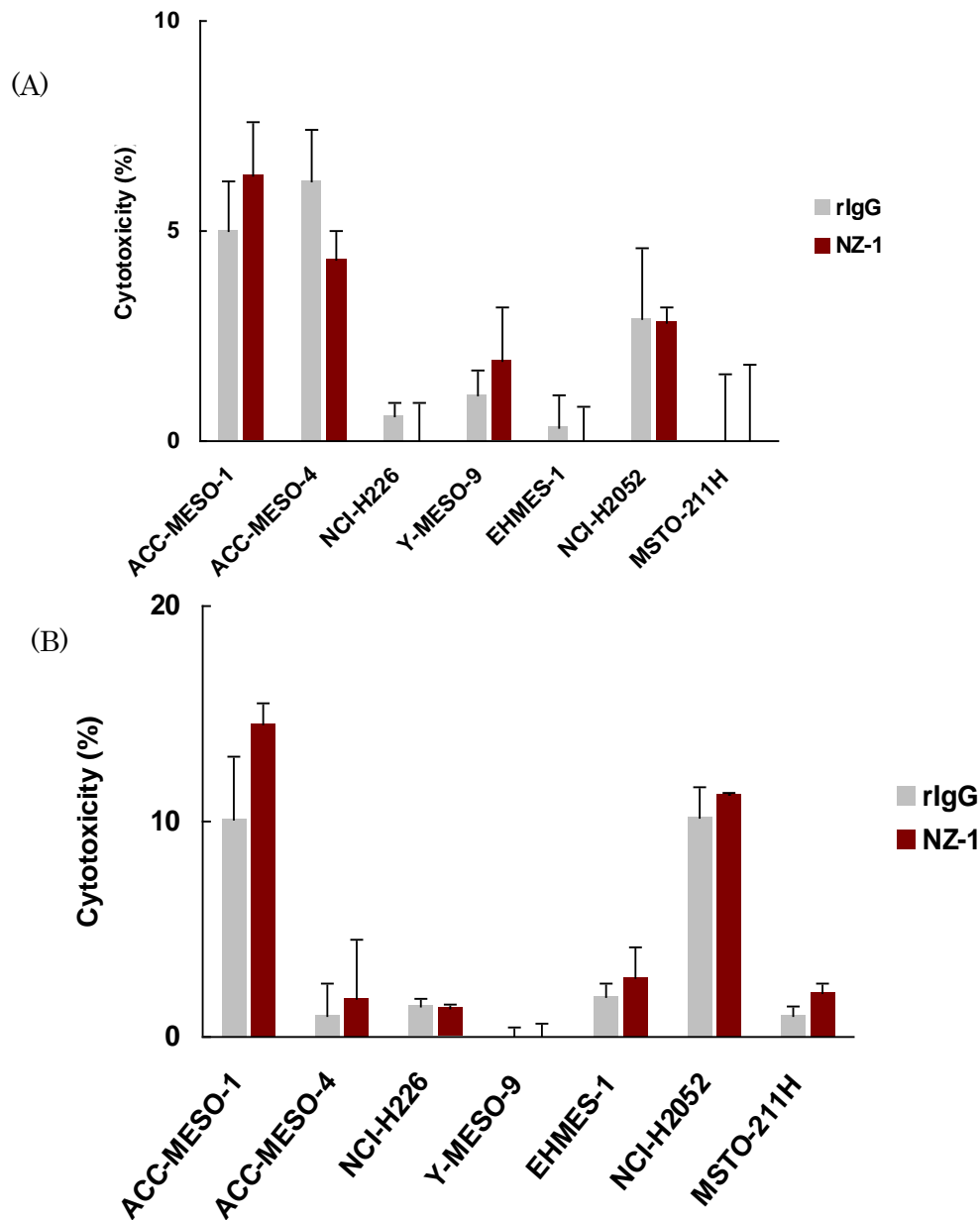


Figure 7. SCID mouse splenocyte を用いた NZ-1 による ADCC 活性

(A)エフェクター細胞として SCID mouse splenocyte を用い、NZ-1 によるヒト悪性胸膜中皮腫細胞 ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226、Y-MESO-9、EHMES-1、NCI-H2052、MSTO-211H に対する ADCC 活性を ^{51}Cr release assay により測定した。エフェクター細胞 (1×10^6 cells)、NZ-1 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) および $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を処置したターゲット細胞 (1×10^4 cells) は 6 時間反応させた。rIgG はコントロール抗体である。(B)エフェクター細胞として健常人由来の MNC を用いて検討を行った結果、NZ-1 による悪性胸膜中皮腫細胞に対する ADCC 活性は認められなかった。

2-2-2) Rat splenocyte を用いた検討

Rat splenocyte をエフェクター細胞として用いた結果、podoplanin 陽性株である ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226、Y-MESO-9、EHMES-1、NCI-H2052 に対して NZ-1 による有意な ADCC 活性の誘導が認められた。一方、podoplanin 陰性株である MSTO-211H に対しては ADCC 活性は認められなかった(Figure 8.)。

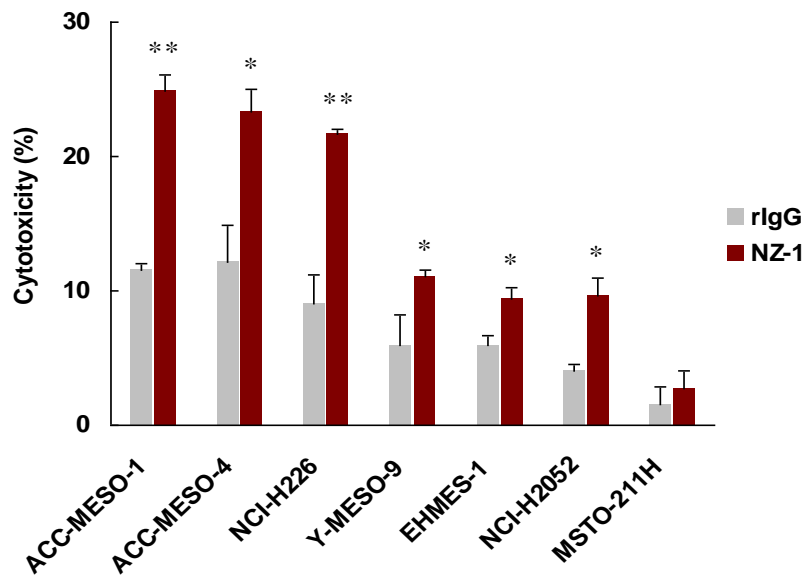


Figure 8. Rat splenocyte を用いた NZ-1 による ADCC 活性

Rat splenocyte をエフェクター細胞として NZ-1 によるヒト悪性胸膜中皮腫細胞 ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226、Y-MESO-9、EHMES-1、NCI-H2052、MSTO-211H に対する ADCC 活性を ^{51}Cr release assay により測定した。エフェクター細胞 (1×10^6 cells)、NZ-1 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) および $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を処置したターゲット細胞 (1×10^4 cells) は 6 時間反応させた。rIgG はコントロール抗体である。*、** Significantly different from rIgG (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$)

以上の結果より、NZ-1 による有意な ADCC 活性の誘導が認められたので、次にエフェクター細胞として rat splenocyte を、ターゲット細胞として高い ADCC 活性が誘導された ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226 を用いさらなる詳細な検討を行った。まず、エフェクター細胞とターゲット細胞の細胞数の比率である E/T ratio を変化させたときの NZ-1 による ADCC 活性について測定した。その結果、エフェクター細胞の割合が高くなるほど効率的に ADCC 活性が誘導され、E/T ratio 依存的な活性が認められた(Figure 9.(A))。さらに、NZ-1 の濃度を変化させたところ、濃度依存的な ADCC 活性の誘導が認められ、活性は 0.1 μ g/mL の抗体濃度で最大となることが示された(Figure 9.(B))。また、反応時間を変化させた結果、時間依存的な ADCC 活性の誘導が認められた(Figure 9.(C))。

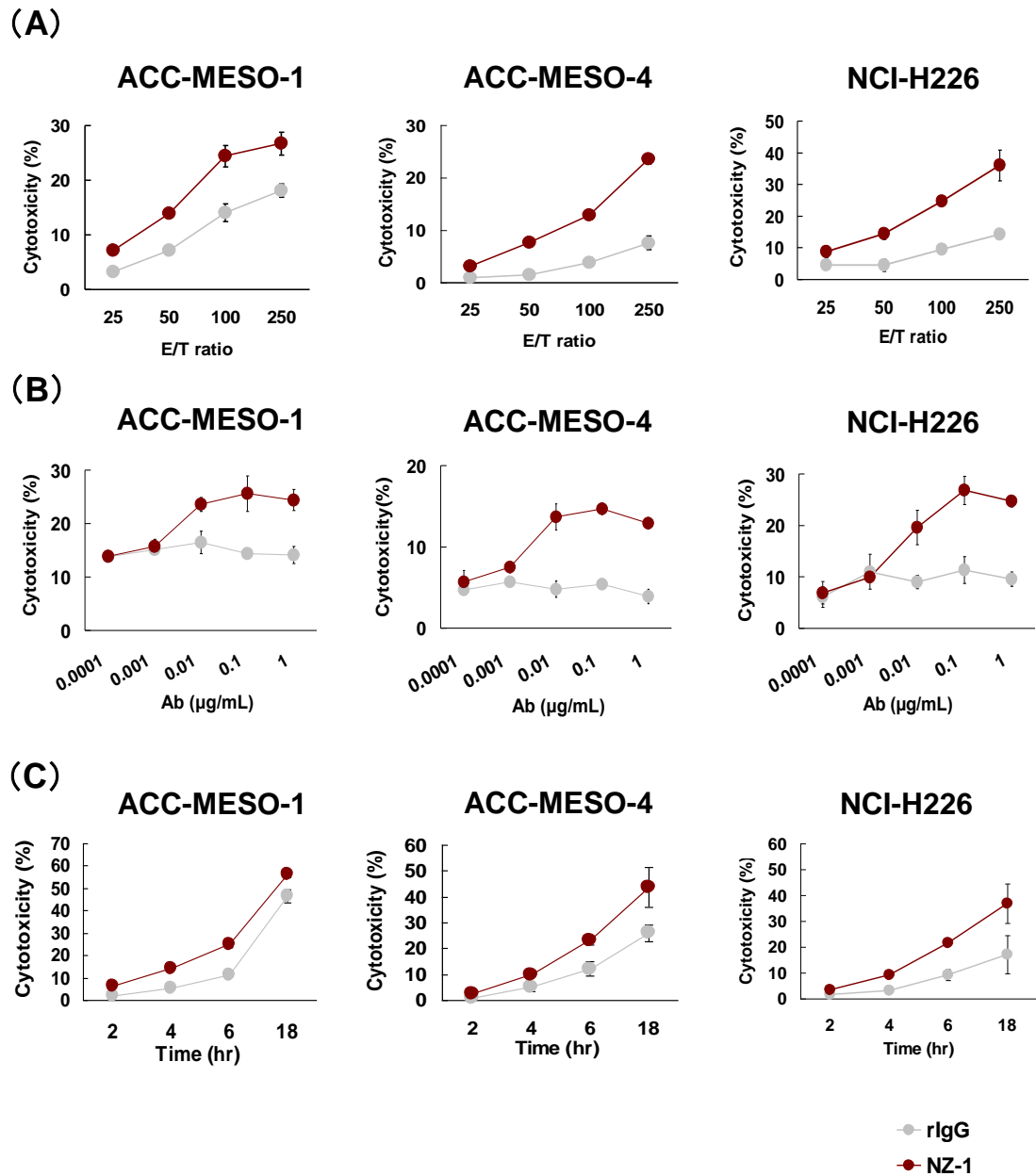


Figure 9. NZ-1 による rat splenocyte をエフェクターとした ADCC 活性の E/T ratio、抗体濃度、反応時間依存的な誘導

Rat splenocyte をエフェクター細胞として NZ-1 による ADCC 活性を ^{51}Cr release assay により測定した。ターゲット細胞には ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226 (1×10^4 cells) を使用した。(A) ADCC 活性の E/T ratio による影響。抗体濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、反応時間 6 時間の一定条件下で E/T ratio を変化させた。(B) ADCC 活性の抗体濃度による影響。E/T Ratio 100、反応時間 6 時間の一定条件下で抗体濃度を変化させた。(C) ADCC 活性の反応時間による影響。E/T ratio 100、抗体濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の一定条件下で反応時間を変化させた。rIgG はコントロール抗体である。

2-2-3) ADCC 活性における NK 細胞の関与

Rat splenocyte には NK (natural killer) 細胞、モノサイト、マクロファージ、T 細胞、B 細胞など様々な免疫細胞が含まれるが、一般に、ADCC 活性においてエフェクター細胞の役割を担うのは NK 細胞であるとされている。そこで NZ-1 による ADCC 活性に NK 細胞がどの程度関与しているかについて検討を行った。

まず、asialo GM1 に対する抗体である anti-asialo GM1 を用いて NK 細胞を除去し、NK cell depletion による ADCC 活性への影響を調べた。Asialo GM1 は NK 細胞において高発現することが知られている。そこで anti-asialo GM1 と baby rabbit complement を用い、rat splenocyte に含まれる asialo GM1 陽性細胞を除去した。こうして得られた asialo GM1 陰性細胞をエフェクター細胞として用いたところ、ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、HCI-H226 のいずれの細胞においても ADCC 活性は認められなかった (Figure 10.)。

さらにこの結果を裏付けるため、rat splenocyte の separation を行い、NK cell selection または NK cell depletion が NZ-1 による ADCC 活性に及ぼす影響について検討した (Figure 11.)。ラット NK 細胞の分子マーカーである CD161a に対する特異的抗体を用いて rat splenocyte の separation を行い、CD161a 陽性細胞、CD161a 陰性細胞をエフェクターとしたときの ADCC 活性を測定した。その結果、CD161a 陽性細胞では ACC-MESO-4 に対する ADCC 活性の誘導が認められたのに対し、CD161a 陰性細胞では認められなかった。また、CD161a 陽性細胞では rat splenocyte の約 10 分の 1 のエフェクター細胞数でほぼ同等の ADCC 活性を誘導することが示された。

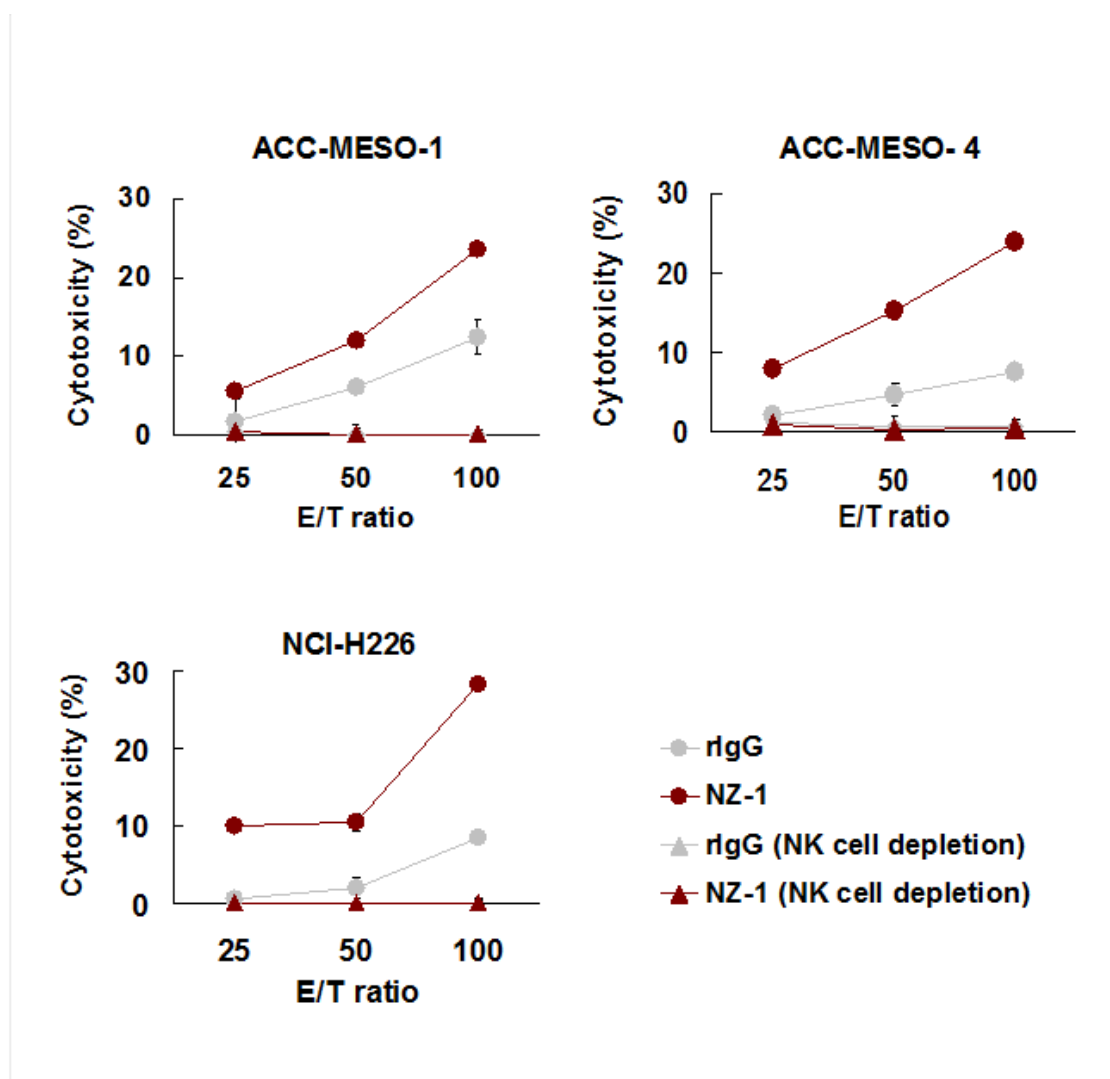


Figure 10. Anti-asialo GM1 による NK cell depletion の ADCC 活性への影響

Anti-asialo GM1 を用い rat splenocyte に含まれる NK 細胞を除去することで、NK 細胞が NZ-1 による ADCC 活性にどの程度関与しているかについて検討した。NK cell depletion は rat splenocyte に含まれる asialo GM1 陽性細胞を、anti-asialo GM1 と baby rabbit complement で除去することにより行った。反応後の anti-asialo GM1 陰性細胞をエフェクター細胞として使用した。ターゲット細胞には ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226 (1×10^4 cells) を用い、抗体濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、反応時間 6 時間の一定条件下、E/T ratio を 25、50、100 と変化させたときの ADCC 活性を ^{51}Cr release assay により測定した。また、比較のため rat splenocyte をエフェクター細胞としたときの ADCC 活性も同条件で測定した。rIgG はコントロール抗体である。

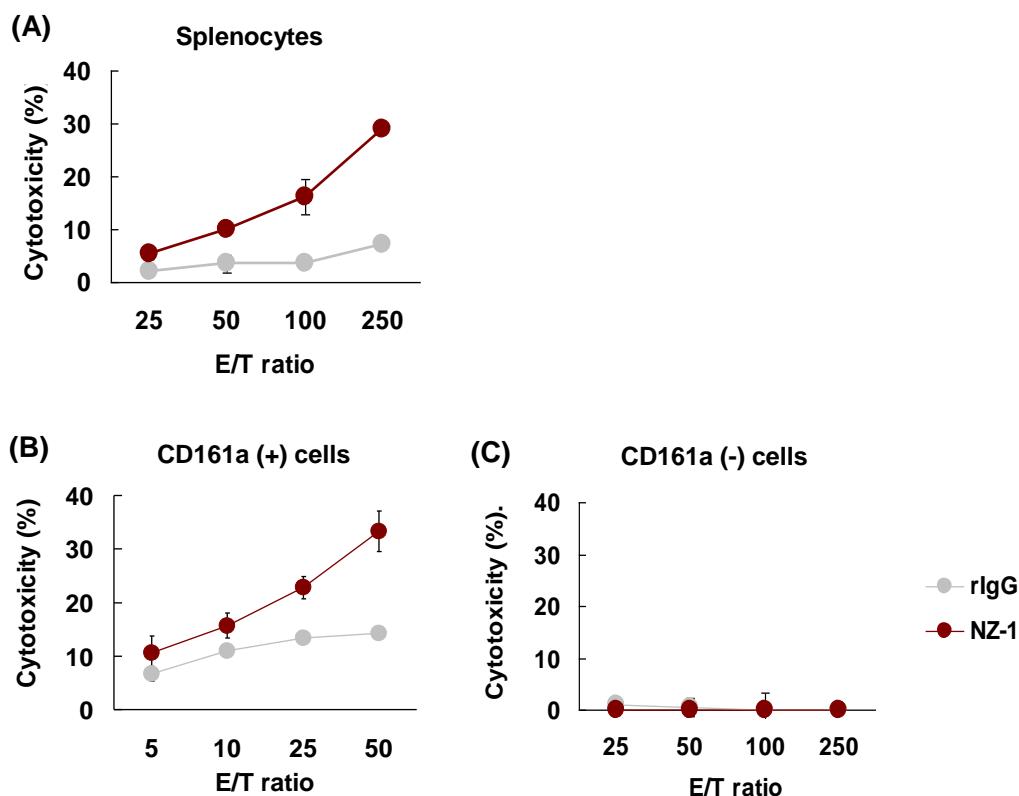


Figure 11. Rat splenocyte の separation による ADCC 活性への影響

NK cell selection および NK cell depletion による ADCC 活性への影響を確認するため、rat splenocyte の separation を行い、NZ-1 による ADCC 活性を ^{51}Cr release assay により測定した。Separation は FITC mouse anti-rat CD161a 抗体と anti-FITC microbeads を用いて mini MACS システムにより行い、エフェクター細胞として rat splenocyte (A)、rat splenocyte から separation した CD161a 陽性細胞 (B) および CD161a 陰性細胞 (C) を用いた。ターゲット細胞には ACC-MESO-4 (1×10^4 cells) を使用した。抗体濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、反応時間 6 時間の一定条件下、(A) および (C) では E/T ratio を 25、50、100、250 に、(B) では 5、10、25、50 に変化させた。rIgG はコントロール抗体である。

3. NZ-8によるヒト悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果の検討

ここまで検討により、ラット抗体であるNZ-1はマウスやヒトのエフェクター細胞を用いた場合、ラットのNK細胞を用いた実験系にのみADCC活性が誘導された。ゆえにNZ-1自体はマウスのエフェクター細胞を用いた*in vivo*での検討およびヒトを対象とした臨床への応用が期待できない。そこで我々はNZ-1のラット・ヒト型キメラ抗体であるNZ-8を用い、これらの抗体がマウスやヒトの細胞をエフェクターとしたADCC活性を誘導するかどうかについて検討を行った。さらに、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞を移植したマウスモデルを用い、*in vivo*におけるNZ-8の抗腫瘍効果について評価した。

3-1) NZ-8による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性

Podoplanin 特異的抗体が治療抗体として効果を発揮するためには、ターゲット細胞に対してADCC活性のような強力な抗腫瘍細胞活性を示すことが重要となる。そこで本検討ではエフェクター細胞として、human MNCを用いNZ-8がヒト悪性胸膜中皮腫細胞に対しADCC活性を有するか否かについて検討を行った。用いた細胞株はpodoplanin陽性株であるACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226、またpodoplanin陰性株であるMSTO-211Hをターゲット細胞として⁵¹Cr release assayにより測定した。その結果、ポドプラニン陽性株ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226に対して、NZ-8により有意なADCC活性が誘導された。一方で、podoplanin陰性株MSTO-211Hに対しては、有意なADCC活性は誘導されなかった。また、NZ-1ではいずれの細胞株に対しても有意なADCC活性の誘導は認められなかった。(Figure 12.(A))また、NZ-8により誘導されるADCC活性がpodoplaninの発現によってもたらされることを確認するために、podoplanin陰性ヒト悪性胸膜中皮腫細胞Y-MESO-14にpodoplaninをトランスフェクションした細胞を用いて検討を行った。まず、flow cytometryにより、podoplaninをトランスフェクションした細胞でpodoplaninが発現していることを確認した。そして、ADCC活性を検討したところ、wild

type、mock では有意な ADCC 活性の誘導は認められなかったが、podoplanin をトランスフェクションした細胞に対し、NZ-8 により有意な ADCC 活性の誘導が認められた。(Figure 12.(B))

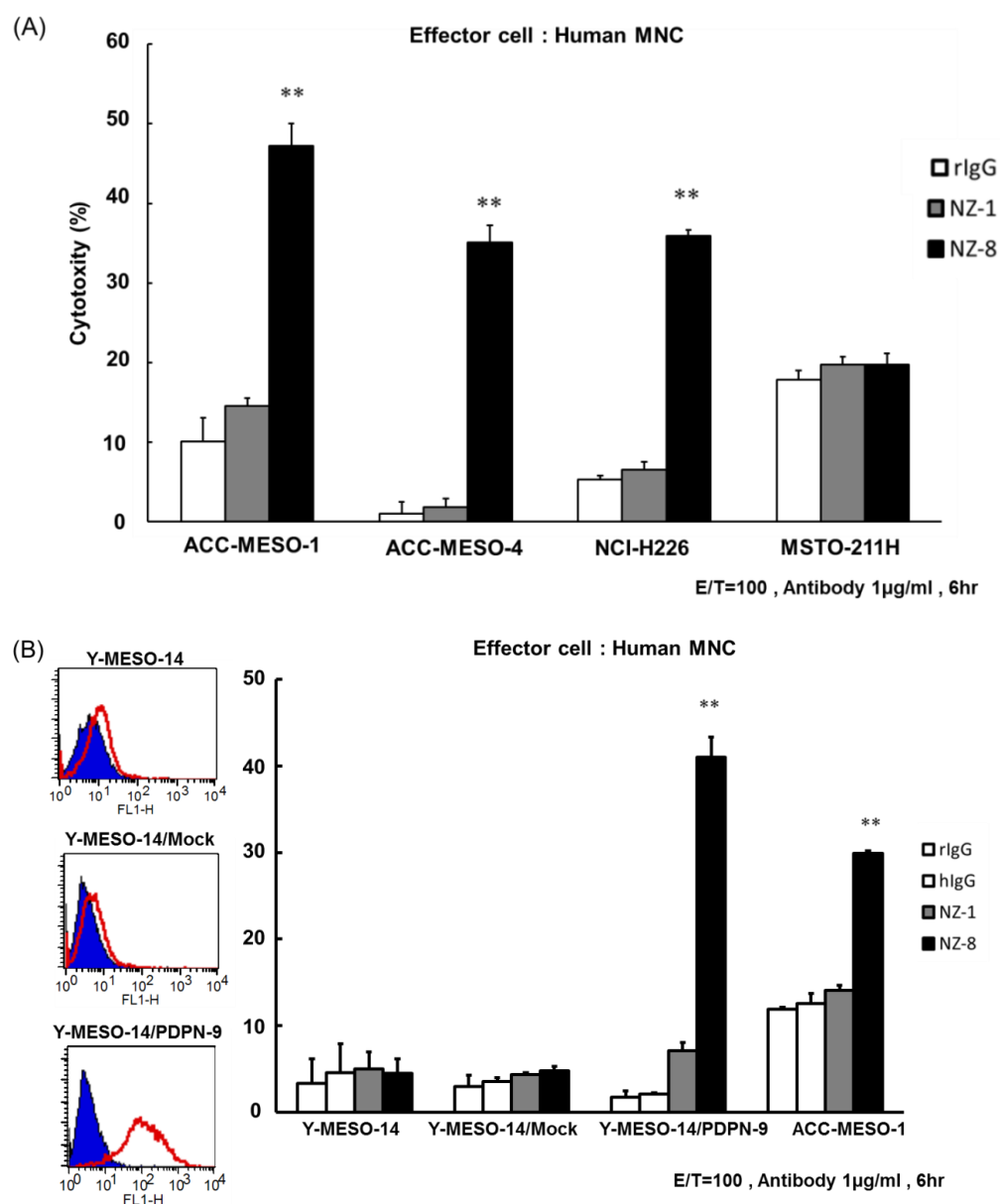


Figure 12. Human MNC を用いた NZ-8 による ADCC 活性

エフェクター細胞として Human MNC を用い、NZ-8 によるヒト悪性胸膜中皮腫細胞に対する ADCC 活性を ^{51}Cr release assay により測定した。ヒト悪性胸膜中皮腫細胞として、(A)は ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226、MSTO-211H、(B)は podoplanin 陰性ヒト悪性胸膜中皮腫細胞 Y-MESO-14 に podoplanin をトランスフェクションした細胞を用いた。エフェクター細胞 (1×10^6 cells)、NZ-1 または NZ-8 ($1 \mu\text{g/mL}$) および $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を処置したターゲット細胞 (1×10^4 cells) は 6 時間反応させた。rIgG はコントロール抗体。

3-2) NZ-8 によるヒト悪性胸膜中皮腫に対する ADCC 活性の検討

Human MNC を用いた検討の結果、抗 podoplanin 抗体のうち NZ-8 により効率的な ADCC 活性の誘導が認められたので、次に NZ-8 による ADCC 活性についてさらなる詳細な検討を行った。まず、human MNC による ADCC 活性をさらに多くの細胞株を用いて測定した。用いた細胞株は ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226、EHMES-1、Y-MESO-9、NCI-H2052、MSTO-211H である。⁵¹Cr release assay により測定を行った結果、EHMES-1 を除く podoplanin 陽性株に対する有意な活性の誘導が認められた。また、podoplanin 陰性株である MSTO-211H に対しては活性の誘導は認められなかった (Figure 13.)。

NZ-8 による有意な ADCC 活性が認められたので、高い ADCC 活性が誘導された ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226 を用いさらなる詳細な解析を行った。E/T ratio、抗体濃度、反応時間を変化させたときの NZ-8 による ADCC 活性を Figure 14. に示す。一定条件下、(A) では E/T ratio を、(B) では抗体濃度を、(C) では反応時間を変化させた。その結果、E/T ratio、抗体濃度、時間依存的な ADCC 活性が誘導された。

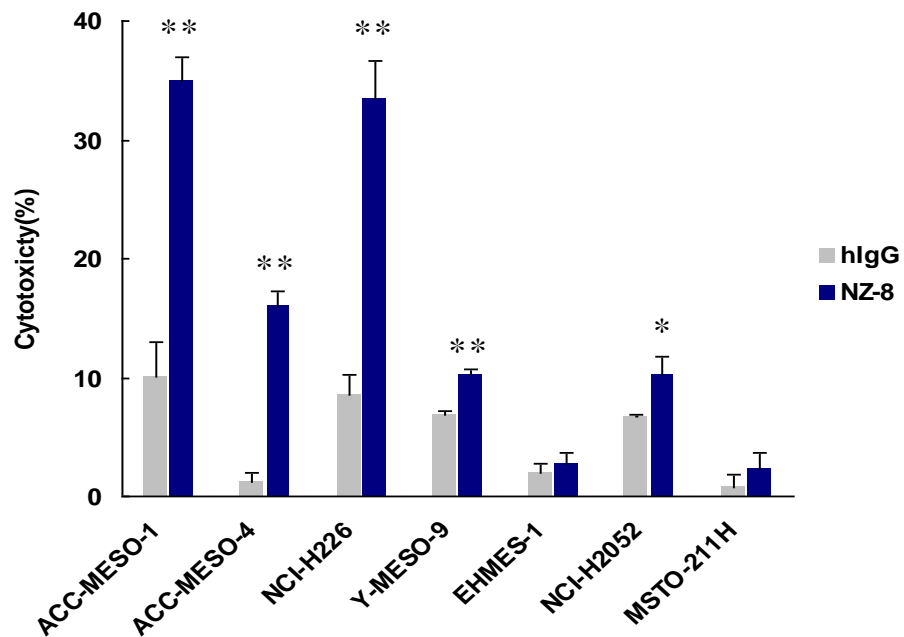


Figure 13. **Human MNC** を用いた **NZ-8** による **ADCC** 活性

エフェクター細胞として健常人由来の MNC を用い、ADCC 活性を測定した。NZ-8 によるヒト悪性胸膜中皮腫細胞 ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226、Y-MESO-9、EHMES-1、NCI-H2052、MSTO-211 に対する ADCC 活性を ^{51}Cr release assay により測定した。エフェクター細胞 (1×10^6 cells)、NZ-1 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) および $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を処置したターゲット細胞 (1×10^4 cells) は 6 時間反応させた。hIgG はコントロール抗体である。

*, **Significantly different from hIgG (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$)

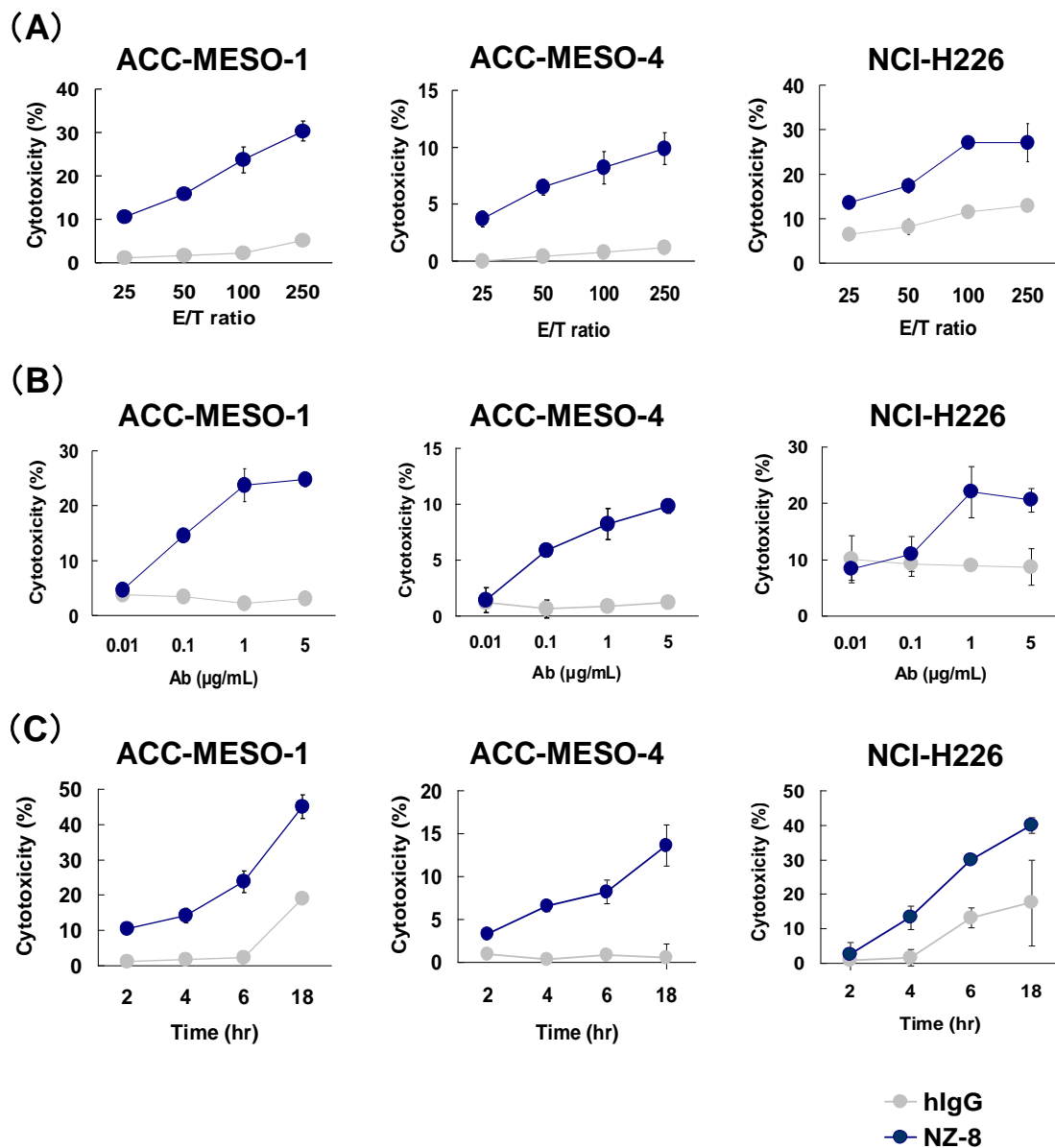


Figure 14. NZ-8 による human MNC をエフェクターとした ADCC 活性の E/T Ratio、抗体濃度、反応時間依存的な誘導

エフェクター細胞として健常人由来の MNC を用い、NZ-8 による ADCC 活性を ^{51}Cr release assay により測定した。ターゲット細胞には ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226 (1×10^4 cells) を使用した。(A) ADCC 活性の E/T ratio による影響。抗体濃度 1 µg/mL Ab、反応時間 6 時間の一定条件下で E/T ratio を変化させた。(B) ADCC 活性の抗体濃度による影響。E/T Ratio 100、反応時間 6 時間の一定条件下で抗体濃度を変化させた。(C) ADCC 活性の反応時間による影響。E/T ratio 100、抗体濃度 1 µg/mL の一定条件下で反応時間を変化させた。hIgG はコントロール抗体である。

3-3) NZ-8 の ADCC 活性における NK 細胞の寄与

NZ-8 による ADCC 活性に NK 細胞や単球がどの程度関与しているかについて検討を行った。Human MNC から NK 細胞のマーカーである CD56 および単球のマーカーである CD14 を用いて selection 行い、NK 細胞(A)および単球(B)をエフェクターとしたときの NZ-8 による ADCC 活性を測定した。その結果、NK 細胞をエフェクターとしたときに有意な ADCC 活性の誘導が認められた。また、単球をエフェクターとしたとは有意な ADCC 活性の誘導は認められなかった。これらの結果より、NZ-8 の ADCC 活性の誘導には、主に NK 細胞が関与していることが示された。(Figure 15.)

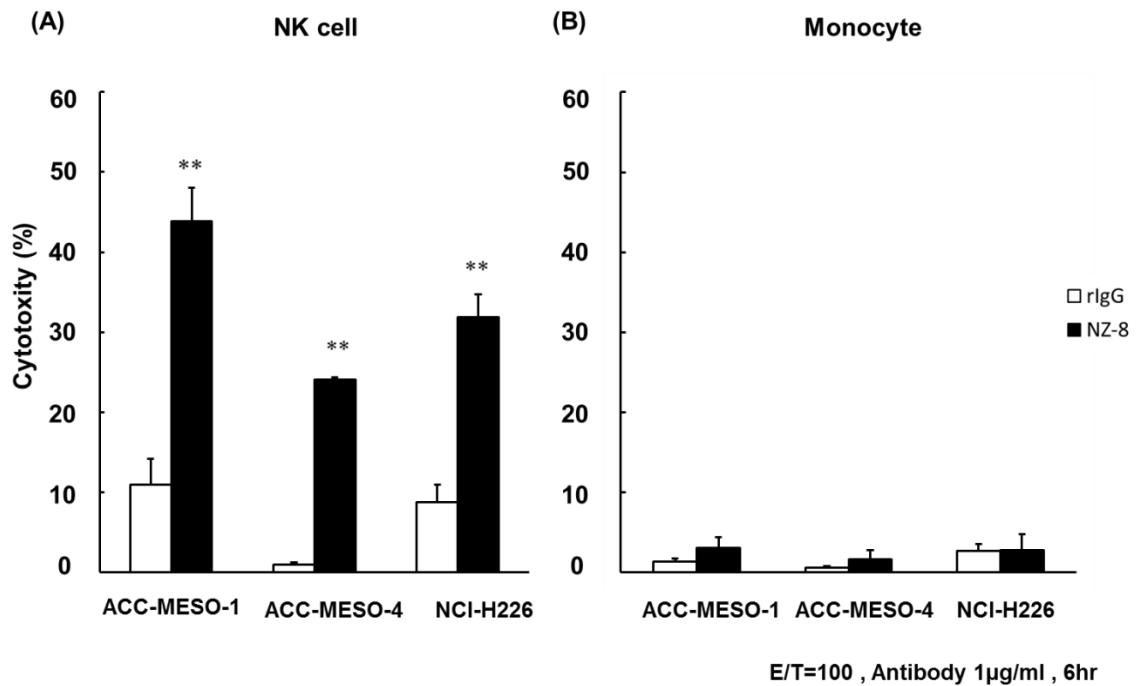


Figure 15. Human MNC の separation による ADCC 活性への影響

NK 細胞の ADCC 活性への寄与を検討するため、Human MNC の separation を行い、NZ-8 による ADCC 活性を ^{51}Cr release assay により測定した。エフェクター細胞として Human MNC から separation した CD14(-)CD56(+)細胞 (A) および CD14(+)細胞 (B) を用いた。エフェクター細胞 (1×10^6 cells)、NZ-8($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) および $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を処置したターゲット細胞 (1×10^4 cells) は 6 時間反応させた。rIgG はコントロール抗体である。

4. SCID mouse 悪性胸膜中皮腫皮下移植モデルにおける NZ-8 の抗腫瘍効果

In vitro における検討より、human NK 細胞をエフェクター細胞としたとき NZ-8 による ADCC 活性の誘導が認められたので、次に、SCID mouse 悪性胸膜中皮腫皮下移植モデルを用い *in vivo* における NZ-8 の抗腫瘍効果について検討を行った。ACC-MESO-4 を担がんさせた SCID mouse の腫瘍皮下近傍に human NK 細胞、腹腔内に NZ-8 を併用投与したところ、コントロール群および NZ-8 単独群と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。(Figure 16.)

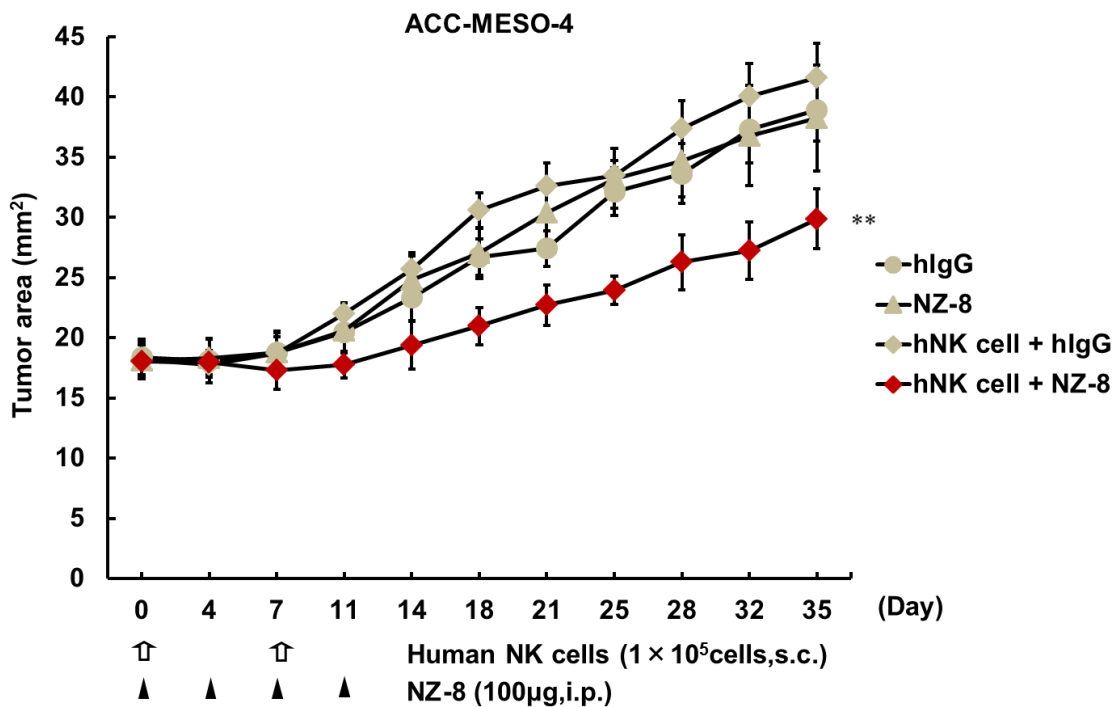


Figure 16. Human NK 細胞と NZ-8 の投与による腫瘍増殖抑制効果

Human NK 細胞と、NZ-8 による腫瘍増殖抑制効果について検討した。エフェクター細胞として、auto MACS システムにて Human MNC より separation した CD56(+)細胞を human NK 細胞として用いた。SCID mouse の右側腹部皮下に ACC-MESO-4 (4×10^6 個) を移植し担がんさせた後、NK 細胞 (1×10^5 cells) またはコントロールとして生理食塩水 (100 μ L) を週 1 回、2 週間腫瘍近傍皮下に投与した。抗体は NZ-8 (100 μ g) またはコントロールとして human IgG (100 μ g) を週 2 回、2 週間腹腔内に投与した。腫瘍領域 (mm²) は計測した長径 (mm) と短径 (mm) の積として算出し、その変動を経時的に観察した。

考察

本研究では podoplanin 特異的抗体である NZ-1 および NZ-8 を用い、ヒト悪性胸膜中皮腫において podoplanin が高発現していることを確認した。また、ラット抗 podoplanin 抗体である NZ-1 が悪性胸膜中皮腫細胞に対し CDC 活性とラット NK 細胞をエフェクターとした ADCC 活性を誘導することを明らかにした。さらに、NZ-1 を改変して作製されたラット・ヒト型キメラ抗体である NZ-8 が human MNC をエフェクターとした ADCC 活性を誘導することを示した。マウス悪性胸膜中皮腫皮下移植モデルにおいて、Human NK 細胞と NZ-8 の併用投与で抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。

現在、悪性胸膜中皮腫の鑑別診断には calretinin、cytokeratin5/6 (CK5/6)、WT-1 などの中皮腫の陽性マーカーおよび CEA、MOC-31、BerEP4、B72.3、TTF-1 などの陰性マーカーを組み合わせた免疫組織化学的解析が行われている[22-24]。近年、中皮腫の陽性マーカーとして podoplanin が有用であるとされ、実際の悪性胸膜中皮腫診断においても使用されている[25]。本研究ではまず、ラット抗 podoplanin 抗体である NZ-1 を用い、悪性胸膜中皮腫における podoplanin の発現について解析を行った。はじめにヒト悪性胸膜中皮腫細胞における podoplanin の発現を flow cytometry により解析した (Figure 2.)。その結果、16 株のヒト悪性胸膜中皮腫細胞株のうち 81 %にあたる 13 株が podoplanin 陽性であった。さらに、そのうち全体の 44 %にあたる 7 株は podoplanin 強陽性株であった (Table 3.)。これらの結果から、podoplanin はヒト悪性胸膜中皮腫細胞に高発現しており、発現頻度も高いことが示された。

また、NZ-8 を用い、悪性胸膜中皮腫における podoplanin を解析し、NZ-8 の podoplanin への親和性について検討した。その結果、NZ-8 は、NZ-1 と同様に、podoplanin に対して高い親和性を示すことが確認できた(Figure 3.)。

悪性胸膜中皮腫細胞における発現が確認されたので、次にヒト臨床組織における podoplanin の発現を NZ-1 および NZ-8 を用いて免疫組織染色により解析した。その結果、

NZ-1 を用いた検討では悪性胸膜中皮腫組織において podoplanin の発現が認められたが、良性の中皮腫組織や正常組織において podoplanin の発現はほとんど認められなかった (Figure 4.)。また、NZ-8 は NZ-1 と同様に、podoplanin の発現を検出することが確認できた (Figure 5A.)。これらの結果から、現在、上皮型中皮腫の陽性マーカーとして用いられている Thrombomodulin や N-cadherin、CD44S の陽性率が 75%程度であるため[23]、これらのマーカーに比べ podoplanin は悪性胸膜中皮腫組織に高頻度で発現していることが明らかとなり、治療標的としての有用性が示唆された。Podoplanin は腫瘍組織のみならず、リンパ管や I 型肺胞上皮などの正常組織においても発現することが知られているが[26-28]、本研究の免疫組織染色の結果では、NZ-1 による正常組織における染色はほとんど認められなかった。また、NZ-8 のこれらの組織への認識について検討したところ、低い濃度の NZ-8 を用いると、悪性胸膜中皮腫組織では発現が認められたが、D2-40 で検出された正常の肺胞組織のリンパ管が NZ-8 では染色されなかった (Figure 7B.)。この結果から NZ-8 は悪性組織を特異的に認識する可能性があると考えられる。さらに、正常組織における podoplanin の発現は、腫瘍における発現よりレベルが低いという報告[29]や脳腫瘍において podoplanin の発現は悪性度に相関していたという報告[18]、glioblastoma 細胞株を用いた *in vivo* での検討において NZ-1 は正常組織にほとんど滞留することなく腫瘍に効率的に集積するという報告[21]もあることから、NZ-8 の用量を下げることにより治療による副作用を減弱させることができるかもしれない。また免疫組織染色において見られた NZ-8 と D2-40 の認識のちがいは、抗体によって podoplanin の認識部位が異なることによると考えられる。現在、NZ-1、D2-40 を含めた数種類の抗ヒト podoplanin 抗体が販売されており、ラット抗体 NZ-1 は 3 つの PLAG-domain のうち podoplanin の活性に重要である PLAG-2 と PLAG-3 を認識する一方で、D2-40 を含む他の抗体は PLAG-1 と PLAG2 を認識することが報告されている[19,30]。また、NZ-1 のみが podoplanin 誘導性の血小板凝集において podoplanin と血小板上の podoplanin 受容体である CLEC-2 の結合を阻害する

ことが示されている[19,30]。以上の検討により、NZ-8 は NZ-1 と同様に悪性胸膜中皮腫に発現している podoplanin を特異的かつ高い親和性をもって認識することが明らかとなった。抗体医薬品にはリガンドや受容体の結合または細胞間の接着を阻害するブロッキング抗体、受容体をクロスリンクするシグナリング抗体、抗がん剤や放射線核種を結合させたターゲットング抗体など様々な機序によるものが存在するが、抗体のエフェクター活性による補体依存性細胞傷害（CDC）活性や抗体依存性細胞傷害（ADCC）は抗体医薬品の代表的な抗腫瘍メカニズムとして知られている。非ホジキンリンパ腫治療薬である抗 CD20 キメラ抗体 rituximab (Rituxan®) は *in vitro* において CDC 活性および ADCC 活性を誘導することが示されている[31]。さらに、ADCC 活性の高い遺伝子型を示す患者において治療効果が高いこと[32]、投与後すぐに患者の血中より補体成分が消費されること[33]、投与後再発した患者では CDC 活性を抑制する CD59 の発現が上昇していること[34]などから、この抗体はヒト体内においてもエフェクター機能を発揮すると考えられている。また、乳がん治療薬である抗 HER2 ヒト化抗体 trastuzumab (Herceptin®)も、これらの活性を有することが報告されている[35]。このように、ADCC 活性や CDC 活性といった免疫エフェクター効果は抗体医薬品の臨床効果において重要であるが、細胞表面に発現する抗原を認識する特異的抗体が必ずしもエフェクター効果を誘導するとは限らない[36-38]。これまでにラット抗 podoplanin 抗体である NZ-1 に関して、直接的な腫瘍転移抑制効果や放射線核種を結合した抗体医薬品への応用が報告されているものの、CDC 活性および ADCC 活性を有するか否かについては未だ明らかにされていない。したがって NZ-1 がこれらの免疫エフェクター活性により抗腫瘍効果を示した場合、新規抗体療法への応用が期待できると考えられる。そこで我々はヒト悪性胸膜中皮腫細胞をターゲットとして NZ-1 による CDC 活性および ADCC 活性を測定した。⁵¹Cr release assay により baby rabbit complement をエフェクターとした CDC 活性を測定した結果、ACC-MESO-4 に対し有意な細胞傷害活性が誘導された (Figure 6.)。また、ADCC 活性はエフェクターとなる細胞の動物種の違いに

より効果が大きく異なり、このことが非臨床試験や臨床試験を遂行するうえで大きな問題となる。そこで本研究では SCID mouse splenocyte、human MNC および rat splenocyte を用い、NZ-1 による ADCC 活性が効率的に誘導できるエフェクター細胞をスクリーニングした。その結果、rat splenocyte を用いた場合でのみ podoplanin 陽性悪性胸膜中皮腫細胞に対する有意な ADCC 活性の誘導が認められた(Figure 8.)。この活性を Figure 2. の flow cytometry の MSFI と比較すると、podoplanin を高発現している細胞株に対してより高い活性が認められたことから、podoplanin の発現と ADCC 活性の間には相関性があると考えられた。このことから NZ-1 はターゲット細胞に発現している podoplanin を認識することで細胞傷害活性を誘導することが示唆された。また、NZ-1 による高い ADCC 活性が誘導された ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226 を用い、さらに詳細な実験を行ったところ、これら全ての細胞で E/T ratio、抗体濃度、時間依存的な ADCC 活性の誘導が認められた (Figure 9.)。次に、rat splenocyte に含まれるどの細胞のエフェクター活性が ADCC 活性に寄与しているかについて検討した。Rat splenocyte には NK 細胞、モノサイト、マクロファージ、T 細胞、B 細胞などの様々な免疫細胞が含まれるが、一般に、ADCC 活性のエフェクター細胞活性は NK 細胞が担っていることが知られている。そこで rat の NK 細胞が NZ-1 による ADCC 活性にどの程度関与しているかについて検討を行った。まず、anti-asialo GM1 を用いて rat splenocyte より NK 細胞を除去し、ADCC 活性を測定した。その結果、NZ-1 による ADCC 活性の誘導は認められなかった (Figure 10.)。さらにこの結果を裏付けるため、ラット NK 細胞の分子マーカーである CD161a に対する特異的抗体を用いて rat splenocyte の separation を行い、NK cell selection または NK cell depletion による ADCC 活性への影響を検討した。結果、CD161a 陽性細胞では NZ-1 による ADCC 活性が認められたが、CD161a 陰性細胞では認められなかった。また NK cell selection の結果、rat splenocyte の約 10 分の 1 のエフェクター細胞数で rat splenocyte とほぼ同等の ADCC 活性を誘導することが示された (Figure 11.)。以上の結果より、NZ-1

が CDC 活性や ADCC 活性のような免疫エフェクター効果を誘導することが明らかになった。NZ-1 により rat splenocyte をエフェクターとした ADCC 活性が誘導されたが (Figure 8.)、SCID mouse splenocyte と human MNC をエフェクターとした ADCC 活性は誘導されなかった (Figure 7)。これは、NZ-1 がラット抗体であるため、同種のラットに由来するエフェクター細胞により ADCC 活性が誘導されたものと考えられる。このことより *in vivo* での検討においても NZ-1 はラットのエフェクター細胞によってのみ抗腫瘍効果を誘導することが示唆される。これまでの検討より、NZ-1 は悪性胸膜中皮腫に対し、ラット由来細胞をエフェクターとした抗腫瘍効果を有することが示されたが、マウスやヒト由来細胞をエフェクターとした ADCC 活性は誘導されなかったため、これらの細胞を介した抗腫瘍効果については期待できないと考えられる。しかし、抗 podoplanin 抗体を臨床応用するうえでは、ヒト体内においてヒトのエフェクター細胞を介した ADCC 活性を誘導することが必須の条件となる。また、*in vivo* 実験における汎用性や投与抗体量の削減といった観点からマウスモデルの有用性は高く、抗 podoplanin 抗体によりマウス由来細胞をエフェクターとした ADCC 活性が誘導できれば、非臨床試験データの集積の簡便化に寄与することができる。これらの課題は抗体のキメラ化やヒト化など、抗体の改変技術によって解決可能であると考えられる。そこで我々は、NZ-1 の作製者である加藤先生 (山形大学) より NZ-1 を改変して新たに作製されたキメラ抗体を供与いただき、これらの抗 podoplanin 抗体が、CDC 活性および SCID mouse splenocyte や human MNC をエフェクターとした ADCC 活性を誘導するか否かについて検討を行った。これまでの検討で我々はラット抗 podoplanin 抗体 NZ-1 が、ラット由来細胞をエフェクターとして ADCC 活性を誘導することを明らかにしている (Figure 8.)。したがって、まずヒトへの臨床応用の可能性を検討するために、ヒトキメラ型抗 podoplanin 抗体 NZ-8 がヒトエフェクター細胞を介した ADCC 活性を誘導するか否かを検討した。Human MNC をエフェクターとして、podoplanin 陽性悪性胸膜中皮腫細胞株に対して、NZ-8 による有意な ADCC 活性の誘導が認められたが、NZ-1

では認められなかった。(Figure 12A.)さらに、サンプル数を増やして検討しても、同様の結果が得られた。(Figure13.) NZ-8 による有意な ADCC 活性が認められたので、高い ADCC 活性が誘導された ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、NCI-H226 を用い、E/T ratio、抗体濃度、反応時間を変化させた結果、E/T ratio、抗体濃度、時間依存的な ADCC 活性が誘導された (Figure14.)。これは、NZ-8 の Fc 部位がヒト由来であるため、同種のヒトに由来するエフェクター細胞により ADCC 活性が誘導されたものと考えられる。さらに、podoplanin 陰性ヒト悪性胸膜中皮腫細胞 Y-MESO-14 に podoplanin をトランスフェクションした細胞を用いた検討により、NZ-8 による ADCC 活性誘導はポドプラニンの発現によってもたらされることを確認ができた。(Figure 12B.)また、Human MNC には、NK 細胞、単球、マクロファージ、T 細胞、B 細胞が含まれているため、NZ-8 の ADCC 活性誘導にはどの免疫細胞が寄与しているかについて検討した。一般的に、ヒトの ADCC 活性を担っているのは、NK 細胞やマクロファージであるとされているが、NZ-1 を用いた我々の検討において rat NK 細胞を除去することにより NZ-1 による ADCC 活性がほぼ完全に抑制されることが明らかとなっている。そこで、Human MNC から NK 細胞と単球を selection し、NZ-8 による ADCC 活性誘導への寄与を調べた。その結果、NK 細胞をエフェクターとしたときに有意な ADCC 活性の誘導が認められ(Figure 15.)、NZ-8 の ADCC 活性の誘導には、主に NK 細胞が関与していることが示された。抗 podoplanin 抗体 NZ-8 が悪性胸膜中皮腫細胞に対しヒトエフェクター細胞を介して ADCC 活性を誘導したという本研究結果は、ヒトを対象とした悪性胸膜中皮腫の抗体療法を実現する上で非常に意義深いと考えられる。

以上の検討により、NZ-8 はポドプラニンを特異的に認識すること、また、ヒト NK 細胞をエフェクターとして、ADCC 活性を誘導することが明らかとなったので、次に、SCID mouse 悪性胸膜中皮腫皮下移植モデルを用いて、in vivo における NZ-8 の抗腫瘍効果を検討した。その結果、ACC-MESO-4 を担がんさせた SCID mouse の腫瘍皮下近傍に human NK 細胞、腹腔内に NZ-8 を併用投与したところ、コントロール群および NZ-8 単独群と比較して有

意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。(Figure 16.)

本研究より、抗 podoplanin 抗体が悪性胸膜中皮腫に対し CDC 活性および ADCC 活性を誘導することが明らかになった。抗 podoplanin 抗体が免疫のエフェクター活性を誘導することはこれまでに報告されておらず、本研究成果は抗 podoplanin 抗体に関する新たな知見を見出すと同時に、podoplanin 特異的抗体療法が現代のアンメットメディカルニーズに対応する新規治療戦略となる可能性を指し示すものと考えられる。免疫エフェクター効果を機序とする抗体医薬品の作製プロセスとしては、一般的にマウスもしくはヒト由来の細胞をエフェクターとした ADCC 活性の検討が行われるが、実際に活性を誘導する抗体はごく一部に限られる。しかし今回の検討の結果、マウスやヒト由来の細胞によって活性が認められなかった場合でも、これら以外の動物種のエフェクター細胞を用いることで ADCC 活性が誘導されることが示された。さらに、この抗体を改変することによりターゲット細胞に対しヒト由来細胞をエフェクターとした ADCC 活性を誘導させ、臨床応用できる可能性が示唆された。また、過去に抗原提示細胞に内在化でき、ADCC 活性や CDC 活性を示す抗体の産生方法が開発されているが[39]、これらの特性がどのような抗体またはエピトープに対しても発現可能であるわけではない[40]。本研究で使用した抗 podoplanin 抗体は効率的に podoplanin 陽性細胞に内在化できることが過去に報告されており[21]、さらに今回免疫エフェクター活性を誘導することが示されたことから、両者の特徴を持ち合わせた臨床上有用な抗体となり得ることが示唆された。しかし、抗体療法を実現するにはいくつかの問題点も存在する。ADCC 活性におけるエフェクター細胞上の抗体結合部位である Fc γ 受容体 IIIa (Fc γ R IIIa) 遺伝子には 158 位における多型 (Fc γ IIIa 158 V/F) が存在するが、低感受型である F タイプはホモ型・ヘテロ型併せてヒトの 70~80%にあたり、抗体との反応性、ひいては抗体医薬品に対する応答性の違いや奏効率に関係していることが知られている[41-43]。さらに、患者の体内では NK 細胞の数の減少や質の悪化も考えられ、効果への影響が懸念される。また、活性の低い治療抗体は多量の投与を必要とするため、副

作用の発現や高額な薬剤費が問題となる。近年、これらの臨床応用上の問題を解決するため、抗体の糖鎖修飾技術[44-46]やアミノ酸改変技術[47]など Fc γ R への親和性を高める技術の開発が発展している。その他にも、NK 細胞のアゴニスト抗体を治療抗体とともに用いるとトラスツズマブによる ADCC 活性を増強させた[48]といった報告もある。このような技術により強力な ADCC 活性増強を付加する抗体開発が可能であると考えられる。これらの点をふまえたさらなる詳細な検討により、抗 podoplanin 抗体が悪性胸膜中皮腫治療の新たな選択肢となる可能性が期待できる。

小括

本研究により podoplanin は悪性胸膜中皮腫細胞および臨床組織における発現頻度が高く、悪性胸膜中皮腫治療における新規標的分子となる可能性が示唆された。また、抗 podoplanin 抗体 NZ-1 とその改変型キメラ抗体が悪性胸膜中皮腫に対し CDC 活性および ADCC 活性を誘導し、さらに生体モデルにおいて腫瘍増殖抑制効果を発揮するという新たな知見が見出された。本研究は、悪性胸膜中皮腫に対する新規治療法として podoplanin 特異的抗体療法を提案するものである。本研究により、ヒト由来のエフェクター細胞により抗腫瘍活性が示されたことは、ヒトを対象とした悪性胸膜中皮腫に対する抗体療法を実現する上で非常に意義深いと考えられる。

略語一覧

ADCC	: antibody-dependent cellular cytotoxicity
BSA	: bovine serum albumin
CDC	: complement-dependent cytotoxicity
DAB	: diaminobenzidine
DMSO	: dimethyl sulfoxide
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	: fetal bovine serum
IMIG	: International Mesothelioma Interest Group
LSM	: lymphocyte separation medium
MFI	: mean fluorescence intensity
MSFI	: mean specific fluorescence intensity
MNC	: mononuclear cell
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NK	: natural killer
PBS	: phosphate-buffered saline
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
SCID	: severe combined immune deficiency
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SPF	: specific pathogen free

参考文献

- [1]Robinson, et al. : Advances in malignant mesothelioma. *N. Engl. J. Med.* 353: 1591–1603, 2005
- [2]Pelucchi, C. , et al. : The Mesothelioma epidemic in Western Europe: an update. *Br. J. Cancer*, 2004
- [3] Murayama, T., et al. : Estimation of future mortality from pleural malignant mesothelioma in Japan based on an age-cohort model. *Am. J. Ind. Med.* 49: 1–7, 2006
- [4]Ray, M., et al. : Malignant pleural mesothelioma: an update on biomarkers and treatment. *Chest* 136: 888–896, 2009
- [5] Vogelzang, N. J., et al. : Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* 21: 2636–2644, 2003
- [6] Scherpereel, A., et al. : Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur. Respir. J.* 35: 479–495, 2010
- [7] Inamoto, T., et al. : Humanized anti-CD26 monoclonal antibody as a treatment for malignant mesothelioma tumors. *Clin. Cancer Res.* 13: 4191–4200,2007
- [8] Inami, K., et al. : Antitumor activity of anti-C-ERC/mesothelin monoclonal antibody in vivo. *Cancer Sci.* 101: 969–974,2010
- [9] Krug, L. M., et al. : WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 59: 1467–1479,2010
- [10] Hassan, R., et al. : Phase I clinical trial of the chimeric anti-mesothelin monoclonal antibody MORAb-009 in patients with mesothelin-expressing cancers. *Clin. Cancer Res.* 16: 6132–6138,2010
- [11] Tsuruo T, et al. : Characterization of metastatic clones derived from a metastatic variant of mouse colon adenocarcinoma 26. *Cancer Res.* 43, 5437-5442.
- [12] Kahn HJ, et al. : A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest.* 82, 1255-7, 2002.
- [13] Hirakawa S, et al. : Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol.* 162, 575-86, 2003.

- [14] Williams MC, et al. : T1 alpha protein is developmentally regulated and expressed by alveolar type I cells, choroid plexus, and ciliary epithelia of adult rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 14, 577-851, 1996.
- [15] Kato Y, et al. : Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumor Biol.* 26, 195-200, 2005.
- [16] Mishima K, et al. : Podoplanin expression in primary central nervous system germ cell tumors: a useful histological marker for the diagnosis of germinoma. *Acta Neuropathol.* 111, 563-568, 2006.
- [17] Kato Y, et al. : Aggrus : A diagnostic marker that distinguishes seminoma from embryonal carcinoma in testicular germ cell tumors. *Oncogene.* 23, 8552-8556, 2004.
- [18] Mishima K, et al. : Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression. *Acta Neuropathol.* 111, 483-488, 2006.
- [19] Kato Y, et al. : Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation using a novel anti-podoplanin antibody reacting with its platelet-aggregation-stimulating domain. *BBRC.* 349, 1301-1307, 2006.
- [20] Kato Y, et al. : Molecular analysis of pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Science.* 99, 54-61, 2008.
- [21] Kato Y, et al. : Evaluation of anti-podoplanin rat monoclonal antibody NZ-1 for targeting malignant gliomas. *Nuclear Medicine & Biology.* 37, 785-794, 2010.
- [22] Ordóñez NG, et al. : Immunohistochemical diagnosis of epithelioid mesotheliomas: a critical review of old markers, new markers. *Hum Pathol.* 33, 953-67, 2002.
- [23] Ordóñez NG, et al. : The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma : a comparative study of epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 27, 1031-51, 2003.
- [24] Granville LA, et al. : Comparison of monoclonal versus polyclonal calretinin antibodies for immunohistochemical diagnosis of malignant mesothelioma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 13, 75-79, 2005.
- [25] Albert Y Chu, et al. : Utility of D2-40, a novel mesothelial marker, in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Mod. Pathol.* 18, 105-110, 2005.
- [26] Hirakawa S, et al. : Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol.* 162, 575-86, 2003.

- [27] Williams MC, et al. : T1 alpha protein is developmentally regulated and expressed by alveolar type I cells, choroid plexus, and ciliary epithelia of adult rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 14, 577-851, 1996.
- [28] Michael R Clark : IgG Effector Mechanisms. *Chemical Immunology.* 65, 88, 1997.
- [29] Kato Y et al.:Molecular identification of Aggrus/T1alpha as a plateletaggregation-inducingfactor expressed in colorectal tumors.*J Biol Chem.*278,51599–51605,2003
- [30] Gennari R, et al. : Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res.*10, 5650–5655, 2004.
- [31] Mitchell R Smith, et al. : Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Onco gene.* 22, 7359–7368, 2003.
- [32] Cartron G, et al. : Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FCgRIIIa gene. *Blood.* 99, 754, 2002.
- [33] Adam D, et al. : Rituximab Infusion Promotes Rapid Complement Depletion and Acute CD20 Loss in Chronic Lymphocytic Leukemia. *The Journal of Immunology.* 172, 3280-3288, 2004.
- [34] Rajat Bannerji, et al. : Apoptotic-Regulatory and Complement-Protecting Protein Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia: Relationship to In Vivo Rituximab Resistance. *Journal of Clinical Oncology.* 21, 1466-1471, 2003.
- [35] Lewis GD, et al. : Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185 HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother.* 37, 255-263, 1993.
- [36] Kikuchi Y, et al. : Defucosylated chimeric anti-CC chemokine receptor 4 IgG1 with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity shows potent therapeutic activity to T-cell leukemia and lymphoma. *Cancer Res.*15, 64, 2127-2133, 2004.
- [37] Uno S, et al. : Apoptosis inducing bivalent single-chain antibody fragments against CD47 showed antitumor potency for multiple myeloma. *Leuk Res.* 29, 445–450, 2005.
- [38] Andrew M Scott, et al. : Immunological effects of chimeric anti-GD3 monoclonal antibody KM871 in patients with metastatic melanoma. *Cancer Immunity.* 5, 3, 2005.

- [39] Edith A. Wolff, et al. : Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced antitumor activity in nude mice. *Cancer Res.* 53, 2560-2565, 1993.
- [40] Cogliati T, et al. : Preparation and biological characterization of conjugates consisting of ricin and a tumor-specific non-internalizing MAb. *Anticancer Res.* 11, 417-421, 1991.
- [41] Cartron G, et al. : Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood.* 1, 99, 754-758, 2002.
- [42] Gennari R, et al. : Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res.*10, 5650–5655, 2004.
- [43] Zhang W, et al. : FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol.* 20, 5, 712-718, 2007.
- [44] Pablo Umaña, et al. : Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nature Biotechnology.* 17, 176-180, 1999.
- [45] Shields RL, et al. : Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J.Biol. Chem.* 277, 26733-26740, 2002.
- [46] Shinkawa T, et al. : The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem.* 278, 3466-3473, 2003.
- [47] Shields, et al. : Complex formation of SMAP/KAP3, a KIF3A/B ATPase motor-associated protein, with a human chromosome-associated polypeptide. *J Biol Chem.* 273, 6591–6604, 2001.
- [48] Kohrt HE, et al.: Stimulation of natural killer cells with a CD137-specific antibody enhances trastuzumab efficacy in xenotransplant models of breast cancer. *J Clin Invest.* 122,1066-1075,2012.

結論

今回、我々は臨床応用を目的とした腫瘍免疫系を用いた抗腫瘍効果に関する検討を行った。第 1 部では樹状細胞を用いた抗腫瘍効果に関して検討した。本研究では成熟樹状細胞が可溶性血管内皮成長因子受容体 1 を産生することを初めて明らかにした。さらに、生体モデルにおいても抗血管新生抑制効果、それに伴う抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。第 2 部では抗 podoplanin 抗体を用いて検討を行った。本研究では NZ-1 とその改変型キメラ抗体が悪性胸膜中皮腫に対して CDC 活性および ADCC 活性を誘導することを明らかにした。さらに、生体モデルにおいても腫瘍増殖抑制効果を発揮することを明らかにした。

現在、樹状細胞療法や抗体療法においても臨床への応用が期待される研究が次々と報告されているなかで、我々の研究結果も、樹状細胞療法あるいは抗体療法の研究に大いに寄与するものと考えられる。今後は治療法を確立し、早期の臨床試験への応用を目指してさらなる詳細な検討を行っていきたいと考えている。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス部 臨床薬学分野 水口和生教授、川添和義准教授、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 呼吸器・膠原病内科学分野 曾根三郎名誉教授(現 JA 高知病院長)、西岡安彦教授に心より感謝いたします。

また、本研究論文作成におきまして直接のご指導、ご協力を頂きました、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部呼吸器・膠原病内科学分野西岡安彦教授、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 臨床薬学分野 川添和義准教授、徳島大学薬学部阿部真治先生に心からお礼申し上げます。そして、podolaninを研究するにあたり抗podoplanin 抗体をご提供いただきました山形大学医学部分子腫瘍マーカー研究チーム加藤幸成准教授、手技に関しましてご指導、ご協力いただきました大鵬薬品工業株式会社倉本卓哉研究員に深く感謝いたします。

さらに、終始ご協力いただきました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 呼吸器・膠原病内科学分野、徳島大学薬科学教育部臨床薬剤学講座の皆様にご心から御礼申し上げます。