

難治性中皮腫の新規分子標的・抗体治療薬の開発

所属機関 順天堂大学医学部
研究者氏名 樋野興夫

《研究の概要》

我々は、「遺伝性腎がんモデル」の研究に長年従事し、新しいがん関連遺伝子Erc (Expressed in Renal Carcinoma)を発見した。その遺伝子産物はのちに、ERC/Mesothelinタンパク質のホモログであることが判明し、血液検査が可能なN末を用いたELISA法を免疫生物研究所 (IBL) との共同研究により開発した。血中でのバイオマーカーとしての有効性を確認し、これらのデータをもとに、中皮腫の臨床応用へと展開してきた。

2005年、現在も継続されている「アスベスト、中皮腫外来」を順天堂大学に開設した。「中皮腫診断キット」(特許第5143018号)を開発し、そのキット化にも成功している。さらに本キットを利用した大規模研究型検診の推進により、自覚症状のまだ無い中皮腫の発症前診断が出来る可能性と、治療後再発のモニタリングへの有効性を明らかにしている。

我々は、難治性中皮腫の早期診断・早期治療を目指した総合的診療システムの確立を展開している(「中皮腫対策 国家戦略で」、読売新聞、2013年2月21日付け、「中皮腫 発症前に診断」朝日新聞、2012年6月4日付け)。患者の増加が予想されている中皮腫の発症前診断システムの精度の向上のための医師向けの教育、「中皮腫」に関する知識、最先端の研究や治療法を知りたいと思ったときに、きちんとした情報を得られるような拠点、「国際環境発がん制御研究センター」の整備、環境発がんリスクの問題を科学的に検討することのできる人材を育てる教育・育成プログラムの確立、アジアを拠点として世界への情報発信などにも務めている。

ヒトERC産物(70 kDa)は蛋白分解酵素で切断され、40 kDaのC末(C-ERC)と30 kDaのN末(N-ERC)に別れる。C-ERCは膜表面に残り、中皮腫などの組織で高発現しており、細胞接着に関与することが報告されている。一方、N-ERCは細胞外に分泌され、中皮腫患者の血清中に高濃度に検出されるものの、その機能については不明であった。最近、申請者らは、分泌型N-ERCに細胞死抑制効果があることを報告した。

本研究では難治性中皮腫の新規分子標的・抗体治療薬の開発を目指し、中皮腫の抗腫瘍特異的治療薬の開発、さらにHybridomaを用いて、中皮腫細胞を認識して形態変化するモノクローナル抗体の樹立、また細胞増殖を促進ないし抑制する抗体の選別に資する。

| | | |
|-------|-------------------------|-------|
| 梶野 一徳 | 順天堂大学医学部 病理・腫瘍学 准教授 | 分子の同定 |
| 松岡 周二 | 順天堂大学医学部 病理・腫瘍学 助教 | 抗体の開発 |
| 阿部 雅明 | 順天堂大学医学部 病理・腫瘍学 研究技師 | 抗体治療 |

研究報告

I 研究目的

アスベストの問題は 40 年前、既に発がん性が問題になっていたが、軽視されてきた。しかし、2005 年のクボタショック以降、アスベストによる健康被害が明るみになり、国は現在も対策に追われている。さらに、2014 年 10 月 9 日には、最高裁がアスベストによる健康被害について国の責任を認める判決を下したため、国はアスベストによる国民の身体への被害を最小限にし、健康を確保するための速やかな対応が求められている。しかしながら、難治性中皮腫の有効な治療法は確立されておらず、早期診断・治療の実現を目指した研究を推進するとともに、症状緩和の手法に関する研究を推進することが必須である。

我々は、2005 年、現在も継続されている「アスベスト、中皮腫外来」を順天堂大学に開設した。「遺伝性腎がんラットモデルの発がん過程」の研究をもとに中皮細胞特異的遺伝子、ERC/Mesothelin を発見し、早期発見・早期診断が難しいアスベストによる中皮腫の診断マーカーの開発に貢献しているほか、「中皮腫診断キット」(特許第 5143018 号)を開発し、そのキット化にも成功している。さらに本キットを利用した大規模研究型検診の推進により、自覚症状のまだ無い中皮腫の発症前診断が出来る可能性と、治療後再発のモニタリングへの有効性を明らかにしている。

検診者への負担、そして侵襲が少ない血液を利用し、簡便に中皮腫の発症を早期に予測できる可能性のある「中皮腫診断キット」を用いた研究は非常に有用であり、さらなる推進が望まれている。早期に発見することで完治可能な中皮腫を標的にした本キットのがん検診への導入は、発症前診断を可能にし、中皮腫による死亡者数の減少に向けた取り組みの一環としても非常に有用である。我々が行った 5 年間の大規模研究型検診で抽出した、約 60 名のハイリスクグループの丁寧なフォローアップを行い、発症前診断と早期診断への「中皮腫診断キット」の有用性を確実なものにする(総合的中皮腫早期診断システムの推進)。環境発がんのうち、アスベストによる発がん研究をモデルとし、「先楽後憂」ではなく「先憂後楽」の精神で、環境発がんリスクの問題を科学的に検討する専門機関「国際環境発がん制御研究センター」の設置を推進している。

我々は、アスベスト曝露歴者に対して「中皮腫診断キット」を用いた検診の継続と並行して、東京土建国民健康保険組合と連携して、建築作業員等の研究型検診を行い、中皮腫スクリーニング実施の科学的根拠を明らかにした。同時に、未だに治療法が開発されていない難治性中皮腫のハ

イリスクグループに対して、2005年に順天堂大学で開設し、現在も、継続されている「アスベスト・中皮腫外来」で、丁寧なフォローアップを行っている。

本研究は、新規抗体治療法を含めた革新的な治療法の開発に資するものである。

II 研究計画および材料と方法

具体的に、次の2つの研究計画・方法を推進した。

予後不良である肉腫型中皮腫に対する治療戦略の確立：

我々は、ERC/Mesothelin が発現している上皮型中皮腫に対しては、同分子に対する分子標的療法により一定の抗腫瘍効果を報告している (Inami et al. *Cancer Sci* 101:969-74, 2009, Hassan R et al. *Cancer* 120:3311-9, 2014)。一方、ERC 発現のない肉腫型中皮腫は、上皮型中皮腫よりも予後不良であるうえに、手がかりとなる分子マーカーが同定されていないため、分子標的療法の対象にもなり得ていない。我々は、肉腫型中皮腫の治療法確立を目的として、肉腫型中皮腫細胞の遺伝子発現パターンを解析した。さらに肉腫型中皮腫細胞に、ERC を強制発現させることにより生じる変化を調べた。

1) 肉腫型中皮腫培養細胞 2 種 (H2452, 211H) と、上皮型中皮腫細胞 2 種 (H226, MES04) の遺伝子発現パターンを調べ、肉腫型中皮腫に特徴的な遺伝子発現パターンを調べた。Affimetrix 社のプロトコールに従って、細胞内 RNA 処理の後、GeneChip Human Gene 1.0 ST Array (Affimetrix) を用いて遺伝子発現パターンを検出し、得られたデータは GeneSpringGX (Agilent) で解析した。

2) 肉腫型中皮腫細胞 H2452 に、ERC を発現するレンチウイルスベクター (Precision LentiORF MSLN, Thermo Scientific) を導入して ERC を安定的に発現する細胞株を樹立し、その細胞の形態・増殖能・接着能・遺伝子発現パターンを調べた。

中皮腫培養細胞株の免疫により中皮腫細胞増殖抑制を示す抗体の樹立：

中皮腫の培養細胞株である MST0-211H, MES04, NCL-H226 細胞を BALB/c マウスに交互に 3 カ月にわたり免疫し、脾細胞と P3U1 ミエローマ細胞との細胞融合で抗体産生ハイブリドーマを作成した。このハイブリドーマの産生する抗体の中皮腫細胞との反応を、中皮腫細胞の形態変化を光学顕微鏡で確認し、フローサイトメトリーを用いて抗体の結合性を確認することでスクリーニングした。

III 研究成果

肉腫型中皮腫細胞 2 種間で類似の発現パターンを示す遺伝子が多く認められ、同様に、上皮型中皮腫細胞 2 種間で類似の発現パターンを示す遺伝子も多く認められた。肉腫型中皮腫細胞 2 種と上皮型中皮腫細胞 2 種を比較した結果、肉腫型中皮腫細胞では細胞接着に関する多くの遺伝子の発現が低下していた。

肉腫型中皮腫細胞に ERC を強制発現させても細胞の形態は変化しなかった。しかし、ERC 強制発現細胞では細胞接着能が亢進し、細胞接着や上皮構造の維持に関連する遺伝子 (CADM1, EGFR) の発現亢進が認められた。

肉腫型中皮腫細胞と上皮型中皮腫細胞では、形態が異なるのみでなく、遺伝子発現パターンにも特徴的な差異が認められた。肉腫型中皮腫細胞での特徴は、細胞接着に関連した多くの遺伝子の発現レベルが低下していることであった。それらの複数の細胞接着関連遺伝子を肉腫型で発現させれば、肉腫型から上皮型への治療的変換 (吉田富三の提唱した「癌の良性化」) が生じる可能性が示された。ERC は細胞の形態を変化させるほどの機能を持っていなかったが、CADM1 や EGFR の発現を亢進させることにより、分子レベルで、上皮細胞の性状を付加していた。

JMAM1~4 の 4 つのクローンが得られた。患者の体腔液検体の免疫染色を行ったところこれらのモノクローナル抗体はいずれも中皮腫細胞を染色した。それらのモノクローナル抗体のうち JMAM1 は [3H]thymidine incorporation や XTT アッセイにより中皮腫細胞の増殖を強く抑制することが判った。また細胞の遊走を強く阻止することから、転移の抑制能もあることが判った。またこの抗体は中皮腫以外には小細胞型肺癌細胞をも染色することから、肺癌にも抗がん剤として有用であることが判った。また同時に得られたモノクローナル抗体 JMAM4 は検索した二十数種類の中皮腫細胞株以外のいかなるがん細胞株 (肺癌、肝癌、胃癌、大腸癌、膵臓癌、乳癌など) も染色しなかったことから、中皮腫のバイオマーカーとしての有用性が示唆された。

IV 考察

アスベストにより誘発される中皮腫は、一旦発症したら治療が難しいため早期発見・早期治療が目下の急務である。1995 年の阪神・淡路大震災における解体作業、および、看護師の手術用ゴム手袋の再利用作業での中皮腫発生の報道は、曝露期間の短さの観点からも事態の深刻さを示した。東日本大震災の際に発生した津波により生じた瓦礫の中に大量のアスベストが含まれる場合もあることが指摘されており、アスベストの問題は、東日本大震災に関する諸問題のなかでも、喫緊の課題の一つであることはいままでもない。しかしながら、未だ、有効な治療法は確立されておらず、早期発見するための診断システムの整備の他に、新規治療法の開発も急務である。申請者らは、独自に開発した N-ERC/Mesothelin 測定系 (『中皮腫の診断キット』: 特許第 5143018 号) を用いた中皮腫の発症前診断システムの開発と平行して、中皮腫特異的な治療薬の開発を進めてきた。中皮腫に対する標的治療薬開発を目的としてモノクローナル抗体を作製し、すでに動物実験レベルでは高い抗腫瘍効果を認めている。これらの抗体の腫瘍特異的な新規治療薬としての有用性の確認を進め、難治性中皮腫の克服に資する。本研究は、中皮腫の早期診断システムの確立とともに中皮腫特異的な抗体医薬による腫瘍特異的な新規治療薬の開発を目指した難治性中皮腫の総合的な研究であり、基礎と臨床研究を結ぶ Translational research を実践している極めて重要である。

目に見え難いが日常生活を営む環境中に含まれる因子に曝露されることに起因する発がん、い

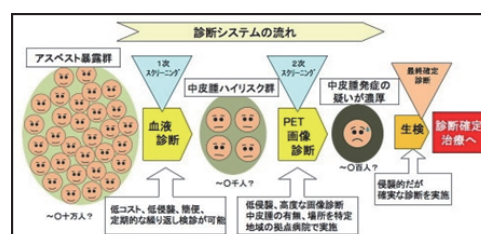
いわゆる「環境発がん」は多く存在するが、そのリスクを科学的に評価するためには、長期的にデータを集積し、解析するための国際的な研究組織が必要である。特にアスベストは40年前、既に発がん性が問題になっていたが「アスベストによる中皮腫」の発症頻度は低率であったため軽視されてきた。アスベストは多様な有益性を持ち、安価でもあることから、日本の経済成長を支えてきたが、2005年、大手機器メーカーのクボタが旧工場の従業員や周辺住民にアスベストによる中皮腫が多発していることを公表した「クボタショック」をきっかけに製造も使用も禁止になった。しかしながら、アスベストを使用した建物の地震による倒壊や老朽化に伴う解体工事により、その飛散量は2030年頃にピークに達すると予想され、2020年から2025年にかけて中皮腫による死亡者数のピークを迎えることが予想されている。

日本では現在、アスベストの使用は禁止されているものの、長い間建材として使用されおり、老朽化した建物の解体によるアスベストが飛散により中皮腫が発症する可能性も残されている。さらに、日本を含めたアジア地域において、中皮腫の発症率の上昇が報告されているが、予防や診断が難しく、病理診断の技術向上を含め、中皮腫の予防・診断および治療システムを確立しておく必要がある。本研究の推進は、地球規模での「環境発がん：アスベスト・中皮腫」の診療体系全体の発展に寄与すると考えられ、日本で確立された診断システムや教育システムがアジアに広まることで、鑑別の難しい中皮腫を、きちんと診断できる専門医師や医療技術者が育成される。また、この研究により確立された国際交流を通じ、我々の生活を豊かにするために生活環境の中に生まれた新しい物質による発がんのリスクのデータの蓄積、早期発見や治療がアジア全体で迅速に行なわれるものと期待される。

まとめ

アスベスト曝露と関係の深い中皮腫は有効な治療法が確立されていないため、症状が出た頃には進行していることが多く、早期発見が必須である。我々は、アスベスト曝露と関係の深い中皮腫の早期・発症前診断を行うために、5年間（2007年～2012年）の大規模研究型検診を行った。その結果3名の発症前診断に成功した。そこで、研究型検診により中皮腫ハイリスク群（2回以上中皮腫の血中マーカーが高い値を示した検診者群）とされた約60名を対象に、N-ERC/Mesothelin ELISA キット（『中皮腫の診断キット』：特許第5143018号）を利用した追跡調査を行い、臨床データおよび検診データ比較、解析し、有効性を検証中した。さらに、なるべく早期に多くの中皮腫患者を効率的・高精度に発見し、発症前診断・早期治療を確立するために、我々が実践し実績を得た血液検査による1次スクリーニングと高精度化した2次スクリーニングを加えた「総合的中皮腫早期診断システム（参考；図）」を全国に広め、さらなる中皮腫の発症前診断・早期治療の推進を行った。今後は、難治性中皮腫の新規分子標的・抗体治療薬の臨床応用を進める。

<図>



本研究では、新規抗体治療法を含めた革新的な治療法開発の基盤作りに成功した。

V 研究成果の発表

1. Hirohashi, T., Igarashi K., Abe M., Maeda M., and Hino, O.: Retrospective analysis of large-scale research screening to the construction workers for an early diagnosis of mesothelioma. *Molecular and Clinical Oncology*, Jan;2(1): 26-30, 2014. (DOI: 10.3892/mo.2013.197)
2. Ito T., Kajino K., Abe M., Sato K., Maekawa H., Sakurada M., Orita H., Wada R., Kajiyama Y. and Hino O.: ERC/mesothelin is expressed in human gastric cancer tissues and cell lines. *Oncology Reports*, 31: 27-33, 2014 (DOI: 10.3892/or.2013.2803)
3. Sato T., Suzuki Y., Mori T., Maeda M., Abe M., Hino O. and Takahashi K.: Newly established ELISA for N-ERC/mesothelin improves diagnostic accuracy in patients with suspected pleural mesothelioma. *Cancer Medicine*, Oct; 3(5): 1377-1384, 2014. (doi: 10.1002/cam4.297)
4. Hino O.: Cancer Philosophy ~Thinking “Cancer Cells” Deeply. *Juntendo Medical Journal*. 60: 200-209, 2014
5. Shiono M., Kobayashi T., Takahashi R., Ueda M., Ishikawa C. and Hino O.: Transgenic expression of the N525S-tuberin variant in Tsc2 mutant (Eker) rats causes dominant embryonic lethality. *Scientific Reports*, Aug 4: 5927, 2014 (doi:10.1038/srep05927)
6. Fukamachi K., Iigo M., Hagiwara Y., Shibata K., Futakuchi M., Alexander D.B., Hino O., Suzui M. and Tuda H.: Rat N-ERC/mesothelin as a marker for in vivo screening of drugs against pancreas cancer. *PLOS ONE*, 9: e111481, 2014 (Doi: 10.1371/journal.pone.0111481)
7. Toriyama A., Mori T., Sekine S., Yoshida A., Hino O. and Tsuta K.: Utility of PAX8 mouse monoclonal antibody in the diagnosis of thyroid, thymic, pleural and lung tumours: a comparison with polyclonal PAX8 antibody. *Histopathology*, 65: 465-472, 2014. (DOI: 10.1011/his.12405)
8. Horimoto Y., Arakawa A., Harada-Shoji N., Sonoue H., Yoshida Y., Himuro T., Igari F., Tokuda E., Mamat O., Tanabe M., Hino O. and Saito M.: Low FOXA1 expression predicts good response to neo-adjuvant chemotherapy resulting in good outcomes for luminal HER2-negative breast cancer cases. *British Journal of Cancer*, 1-7, 2014 (doi: 10.1038/bjc.2014.595)
9. Yasuda S., Sugiura H., Katsurabayashi S., Shimada T., Tanaka H., Takasaki K., Iwasaki K., Kobayashi T., Hino O. and Yamagata K.: Activation of Rheb, but not of MTORC1, impairs spine synapse morphogenesis in tuberous sclerosis complex. *Science Rep.*, 3; 4: 5155, Jun 2014. (doi: 10.1038/srep05155)
10. Imai M. and Hino O.: Asbestos-related mesothelioma: Prevention, early detection,

- treatment. *JSM Clinical Oncology and Research*, 2(3): 1018, 2014.
11. Saeki H., Suzuki C, Yamasaki S, Hashizume A, Izumi H, Suzuki F, Ishi K, Nojima M. and Hino O. : Cotyledonoid dissecting leiomyoma of the uterus: report of two case. *Arch. Gynecology and Obstetrics*, 291: 357-361, 2015(DOI 10.1007/s00404-014-3406-2)
 12. Ito Y., Kawano H., Kanai F., Nakamura E., Tada N., Takai S., Horie S., Arai H., Kobayashi T. & Hino O. : Establishment of Tsc2-deficient rat embryonic stem cells. *Int. J. Oncology*, 46: 1944-1952, 2015 (doi: 10.3892/ijo.2015.2913)
 13. Sugiura H., Yasuda S., Katsurabayashi S., Kawano H., Endo K., Takasaki K., Iwasaki K., Ichikawa M., Kobayashi T., Hino O. and Yamagata K. : Rheb activation disrupts spine synapse formation through accumulation of syntenin in tuberous sclerosis complex. *Nature Communications*, 6: 6842, 2015 (DOI: 10.1038/ncomms7842)