

【要約】

Anti-HER2 antibody therapy using gene-transduced adipocytes
for HER2-positive breast cancer

(遺伝子改変前脂肪細胞を用いた乳癌抗体療法の基礎的検討)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：大塚将之教授)

升田 貴仁

全身治療の進歩は乳がん患者の予後の改善に寄与した。特に近年は分子標的治療薬が数多く開発され、ヒト上皮増殖因子受容体2型 (Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2: HER2) のモノクローナル抗体である trastuzumab は HER2 陽性乳癌患者に対して周術期および転移再発において有用性が示されている。周術期患者では1年間の trastuzumab の投与が標準治療であり、転移再発患者においては trastuzumab を含めた抗 HER2 抗体療法と化学療法の併用が第一選択である。局所進行・転移再発乳癌に関する臨床試験においても、治療効果判定が PD となった場合には併用する化学療法の薬剤を変更し、trastuzumab は継続投与することが予後改善に寄与することが示され、また、trastuzumab により pCR を5年以上維持したという報告もあり、長期にわたって投与されることがある。

しかし、長期間に及ぶ抗体療法による高額な医療費と頻回の通院は個人的負担のみならず社会的負担も増大させている。さらに、定期的なボラス投与の前後で trastuzumab の血中濃度が大きく変化することは副作用のリスクとなり得る。これらの問題を解決する手段として、1回の投与により体内で持続的に抗体が産生され、長期間血中濃度を維持できる遺伝子導入療法にわれわれは着目した。Ex vivo 遺伝子導入療法における遺伝子導入用細胞として、造血幹細胞や神経幹細胞、間葉系幹細胞などを含めた様々な細胞が検討されているが、我々は脂肪細胞に着目した。その特徴としては以下の点が挙げられる。第一に細胞の寿命が長く、癌化のリスクが低い、第二に、脂肪吸引・脂肪注入という技術が形成・再建手術領域において確立されており、臨床的に長期間の安全性が確立されている、第三に、近年脂肪組織は体内最大の分泌臓器と考えられており、抗体を全身へ循環させるのに適している、という点である。我々の研究では脂肪前駆細胞の一つである天井培養由来前脂肪細胞 (ceiling culture-derived proliferative adipocyte: ccdPA) を用いた。一般的に脂肪前駆細胞として使用される脂肪組織由来間葉系細胞と比較すると、ccdPA はより均一な前脂肪細胞であり、長期間の培養においても癌化のリスクが低い、成熟脂肪細胞への分化能に優れている、という特徴を持つ。本報告では、ヒ

ト ccdPA に対して遺伝子導入を行い、抗 HER2 抗体の産生能およびその抗体による抗腫瘍効果を *in vitro* で評価した。

Trastuzumab のアミノ酸配列を元に、レンチウイルスを用いて抗 HER2 抗体遺伝子を ccdPA へ導入した。実験では HER2 陽性乳癌細胞株である BT474 と SK-BR-3、HER2 陰性乳癌細胞株である MDA-MB-231 と MCF-7 を用いた。遺伝子導入 ccdPA による抗 HER2 抗体の産生能および抗体の HER2 への結合特異性を ELISA と蛍光免疫染色法により評価した。また、産生された抗 HER2 抗体を還元条件下、非還元条件下において Western blotting により評価した。さらに遺伝子導入 ccdPA とコントロール ccdPA の培養上清を用いて、抗 HER2 抗体の抗腫瘍効果である、腫瘍細胞の HER2 に結合することによる直接的抗腫瘍効果と ADCC 活性を介した間接的抗腫瘍効果を評価した。加えて、直接的抗腫瘍効果については cell lysate を用いて PI3K/AKT signal pathway を Western blotting で評価した。また、ccdPA を脂肪細胞への分化誘導培地を用いて培養し、成熟脂肪細胞への分化過程が抗体産生能に与える影響を、経時的に採取した上清および Oil red O 染色により評価した。

遺伝子導入 ccdPA による抗体の産生能は遺伝子導入回数が増えるに従って増加し、その産生能は成熟脂肪細胞への分化の過程で増加することが示された。また、産生された抗 HER2 抗体は trastuzumab と同様に HER2 陽性乳癌細胞に特異的に結合することが蛍光免疫染色法で示された。直接的抗腫瘍効果の評価では遺伝子導入 ccdPA の培養上清により HER2 陽性乳癌細胞 BT474 の増殖は阻害され、HER2 陰性乳癌細胞 MDA-MB-231 では増殖は阻害されず、HER2 陽性乳癌細胞に特異的に増殖抑制効果が示された。Western blotting による評価では HER2 陽性乳癌細胞にのみリン酸化 AKT の減少が認められ、PI3K/AKT signal pathway が抑制されていることが示された。遺伝子導入 ccdPA とコントロール ccdPA から採取された培養上清中で、IL-2 で活性化させた末梢血単核細胞と HER2 陽性乳癌細胞の共培養を行うと、遺伝子導入 ccdPA からの培養上清を用いると ADCC 活性が示された。また、乳癌細胞に対する末梢血単核細胞の比を大きくするにつれて ADCC 活性がより増強することが示された。

遺伝子導入 ccdPA により産生された抗 HER2 抗体は HER2 signal pathway を阻害することによる直接的抗腫瘍効果と ADCC 活性を介した間接的抗腫瘍効果を示した。本報告は脂肪細胞を遺伝子導入療法に用いて抗体を産生させた初めての報告であり、このプラットフォームは他の抗体療法に応用できる発展性を有していると考ええる。