

## 論文内容要旨

MT95-4, a fully humanized antibody raised against aminopeptidase N, reduces tumor progression in a mouse model.

(完全ヒト型抗アミノペプチダーゼN抗体であるMT95-4は、マウスモデルにおいて腫瘍の進展を抑制する)

Cancer Science, DOI: 10.1111/cas.12692, 2015.

主指導教員：河野 修興教授  
(応用生命科学部門 分子内科学)  
副指導教員：秀 道弘教授  
(統合健康科学部門 皮膚科学)  
副指導教員：服部 登准教授  
(応用生命科学部門 分子内科学)

秋田 慎

(医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻)

## 【背景】

アミノペプチダーゼ N (APN) は亜鉛依存性のメタロプロテアーゼを有する膜蛋白であり、小腸上皮や神経終末に発現し消化や神経ペプチドの分解に関与している。APN は一部の腫瘍細胞にも発現していることが知られており、腫瘍の浸潤や血管新生に関与していると報告されている。臨床的にも APN を高発現した大腸癌、膵癌、肺癌患者は予後不良であるとされている。これらのことより、APN は癌の治療標的であり、抗 APN 抗体を用いて腫瘍細胞の APN を中和することにより、腫瘍の進展を抑制できるのではないかと考え本研究を行った。

## 【方法】

完全ヒト型抗体を産生する KM マウスに、APN を高発現する HT1080 細胞を用いて免疫することにより、APN 活性を抑制する完全ヒト型抗 APN 抗体 (MT95-4) を樹立した。この抗体をマトリゲルインベージョンチャンバーに添加し、HT1080 細胞の浸潤能への影響を *in vitro* で評価した。次に、APN を遺伝子導入したマウスメラノーマ細胞 (APN-B16 細胞) とコントロールのマウスメラノーマ細胞 (control-B16 細胞) を用いて、マウス尾静脈転移モデル・皮下腫瘍モデルを作製し、APN の腫瘍進展への影響を調べた。さらに APN-B16 細胞を用いたマウスモデルに MT95-4 を週 2 回腹腔内投与し、肺転移数、皮下腫瘍径を測定した。皮下腫瘍の凍結切片を作成し、組織を抗 CD31 抗体で免疫染色して腫瘍組織内の新生血管の面積を計測した。APN を高発現したヒト肺癌細胞株 (H1299、PC14) および APN 低発現ヒト肺癌細胞株 (A549) を用いて、同様にマウス皮下腫瘍モデルを作成し、MT95-4 を腹腔内投与し皮下腫瘍径、腫瘍組織の血管新生の評価を行った。

## 【結果】

MT95-4 は *in vitro* において、APN 活性および腫瘍細胞の浸潤能を抑制していた ( $p < 0.001$ )。マウスモデルでは、B16 細胞に APN を遺伝子導入することにより、肺転移数、皮下腫瘍径が増大し (いずれも  $p < 0.05$ )、腫瘍血管密度も増加しており ( $p < 0.01$ )、APN が腫瘍の進展や血管新生に関与していることが示された。また、APN-B16 細胞を用いたマウス尾静脈転移モデル・皮下腫瘍モデルに MT95-4 を投与することにより、肺転移数、皮下腫瘍径は減少し (いずれも  $p < 0.05$ )、腫瘍血管密度も低下していた ( $p < 0.001$ )。同様に APN 高発現ヒト肺癌細胞株 (H1299、PC14) を用いたマウス皮下腫瘍モデルにおいても、MT95-4 投与群では皮下腫瘍径 ( $p < 0.05$ )、腫瘍血管密度 ( $p < 0.001$ ) とともに減少していたが、APN 低発現ヒト肺癌細胞株 (A549) を用いたモデルでは、皮下腫瘍径、腫瘍血管密度ともに両群で有意差はみられなかった。

## 【考察】

APN-B16 細胞を用いたマウスモデルより、腫瘍細胞の APN が腫瘍の進展、血管新生に関与していることが確認できた。我々の樹立した完全ヒト型抗 APN 抗体をマウスモデルに投与することにより、腫瘍の進展、血管新生が抑制された。またこの抗腫瘍効

果は、腫瘍細胞の APN の発現の有無に依存していた。MT95-4 は *in vitro* で腫瘍細胞表面の APN 活性、腫瘍細胞の浸潤能を抑制しており、マウスモデルでの抗腫瘍効果は、MT95-4 が腫瘍細胞表面の APN 活性を中和し、腫瘍細胞の浸潤能や血管新生を抑制することによりもたらされていると考えられる。実際の腫瘍環境では、腫瘍細胞の APN だけでなく、腫瘍間質や血管内皮細胞に発現している APN も腫瘍の進展に影響すると報告されている。MT95-4 はマウスの APN 活性を中和しないため、我々のマウスモデルでは、MT95-4 抗体の腫瘍間質細胞や血管内皮への影響は評価できない。しかし MT95-4 はヒト臍帯静脈内皮細胞の血管形成を抑制することが確認できており、ヒトにおける腫瘍環境では、より強い抗腫瘍効果が得られる可能性がある。また、抗体依存性細胞傷害活性や補体依存性細胞障害活性についても更なる検討が必要である。

#### 【結論】

我々の樹立した完全ヒト型抗 APN 抗体である MT95-4 は、*in vitro* で腫瘍細胞の浸潤を抑制し、*in vivo* で腫瘍の進展と血管新生を抑制した。この抗腫瘍効果は、腫瘍細胞表面の APN 活性の中和によるものと考えられた。今後 MT95-4 は腫瘍に対する有用な抗体療法となる可能性がある。