様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成　22　年　5　月　17　日現在

研究種目：特定領域研究
研究期間：　2005 年度　～　2009 年度
課題番号：17016060
研究課題名（和文）ヒト型抗がん抗体による免疫治療

研究課題名（英文）　Immunotherapy using humanized monoclonal antibody

研究代表者
今井　浩三（Imai Kohzoh）
札幌医科大学・学長
研究者番号：60117603

研究成果の概要（和文）：我々は IFN の投与によりヒト肝がん細胞において発現が増強されるチロシンキナーゼ受容体である FGFR-1 を標的として新規モノクローナル抗体を作製した。この抗体と IFN を併用することにより、in vitro および in vivo のいずれにおいても著明な抗がん効果を認めた。さらに胃がんの治療を目的とし、CD3 と腫瘍抗原に結合する二重特異性抗体と Fc 部分も持つ三重特異性抗体を作製し、ヒト化にも成功した。

研究成果の概要（英文）：We have been developed the new monoclonal antibody against FGFR-1, which express on human hepatocellular carcinoma and induced by IFN. When we administrate this antibody and IFN simultaneously, strong anti-cancer effect was observed *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, we have been developed other monoclonal antibodies aimed at therapy for gastric cancer. These are the humanized bispecific monoclonal antibody targeted tumor antigen×CD3 and the humanized trifunctional bispecific antibody which have the Fc region.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2005 年度	42,600,000	0	42,600,000
2006 年度	27,500,000	0	27,500,000
2007 年度	27,500,000	0	27,500,000
2008 年度	37,500,000	0	37,500,000
2009 年度	27,500,000	0	27,500,000
総　計	162,600,000	0	162,600,000

研究分野：腫瘍免疫
科研費の分科・細目：
キーワード：ヒト抗体、免疫療法、モノクローナル抗体

１．研究開始当初の背景

(1)抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体を作成する技術が Köhler と Milstein により開発されて以来、最近の分子生物学、遺伝子工学の進歩により、モノクローナル抗体の臨床応用における様々な障壁は急速に乗り越えられつつある。

(2)消化器がんに対する治療は、一般的に第一に手術を選択し次に抗がん剤を用いた化学療法を行う場合が多い。しかし現状の抗がん剤は、がんに選択的に効果を示すことが困

難であり、そのため副作用も多く、治療成績は十分とは言い難い。今後副作用が少なく、抗腫瘍効果の強い抗体療法の開発が必要とされている。

２．研究の目的

(1)消化器がん（肝がん、胃がん）に対する新規モノクローナル抗体を作成し、*in vitro*、*in vivo* での抗腫瘍効果を検討し、その効果発現機序を検討する。

(2)抗体改変技術（遺伝子工学）を用い、モノクローナル抗体のキメラ化、ヒト化を行う。さらに免疫効果を高める目的で、二重特異性抗体、三重特異性抗体の作成を行い、in vitro、in vivo での抗腫瘍効果を検討する。

３．研究の方法

(1)肝細胞がんにおいて発現が認められ、インターフェロン(IFN)投与により発現が増強する抗原に関して DNA アレイを用いて同定する。同定された抗原に対して、モノクローナル抗体を作成し、IFN 併用による抗腫瘍効果を、in vitro、in vivo で検討する。さらに抗腫瘍効果の機序に関して DNA アレイを用いて検討する。

(2) A 抗原（特許申請前であり A 抗原とさせていただく）に対するモノクローナル抗体を改変し、抗 A・抗 CD3－二重特異性抗体、抗 A・抗 CD3－三重特異性抗体を作成し、抗腫瘍効果を、in vitro、in vivo で検討する。

４．研究成果

(1) SCID マウスに肝癌細胞株 HepG2 を移植し、腫瘤を形成した後、IFN を静脈内投与し 24hr 後に取り出した腫瘍の mRNA を DNA アレイで検討した。この結果、レセプター型チロシンキナーゼである線維芽細胞増殖因子受容体 1 (fibroblast growth factor receptor 1: 以下 FGFR-1)が強く発現誘導されることが明らかになった。IFN による FGFR-1 発現増強は、FACS、ウエスタンブロットによっても確認された。

(2)FGFR-1 の遺伝子をクローニングし、発現ベクターに組み込んだ。この発現ベクターを NIH-3T3 細胞に遺伝子導入し、発現を確認した。FGFR-1 発現 NIH-3T3 細胞でマウスを免疫し、マウスの抗 FGFR-1 モノクローナル抗体を作成した。この抗体は FGFR-1 遺伝子導入 NIH-3T3 細胞と反応し、NIH-3T3 細胞には反応しなかった(FACS)。この抗体はウエスタンブロット法にて、FGFR-1 と結合することが確認された。

(3) IFN と作成した抗 FGFR-1 抗体による抗癌効果を検討した。*in vitro*、において、併用療法は抗体単独や IFN 単独に比較して肝癌細胞株に対して強い抗腫瘍効果を認めた(MTT assay)。ヒト肝癌細胞株胆癌マウスにおける *in vivo* の治療実験では、作製した抗 FGFR-1 抗体と IFN の併用により、抗体単独や IFN 単独に比較して強い抗腫瘍効果を認めた

(4) SCID マウスの皮下に肝癌細胞株を移植し、腫瘤形成後に IFN を投与し、尾静脈より作成した抗 FGFR-1 抗体を投与し、時間推移による抗体の分布を検討した。撮影には IVIS LUMINA を使用した。抗体投与後 5 時間までは腹腔内臓器にも集積を認めたが、時間経過とともに腫瘍部位に抗体集積が限局していくことが明らかになった。48 時間後には腫瘍部位にのみ取り込まれ、他の臓器への取り込みは認めなかった。

(5) 肝がん細胞株に IFN と作成した抗 FGFR-1 抗体を加えた系と、IFN とコントロール抗体を加えた系から、RNA を抽出し、マイクロアレイを行った。抗体を加えた系でのみ、FGFR-1 のリガンド遺伝子の発現低下、リガンドの細胞表面への運搬に関与する vesicle 形成関連遺伝子の発現低下を認めた。このことから IFN 投与により、ヒト肝癌細胞株において FGFR-1 発現が亢進し、FGF レセプターを介した増殖シグナルが肝細胞がんに入ることで、代償性にインターフェロンによる細胞死からの逃避に働くと考えられた。作製した抗体は FGF レセプターに結合することにより、シグナル伝達を抑制し、リガンドと vesicle 形成分子の発現を抑制し、その結果、リガンドの分泌が低下し、autocrine loop が抑制されることにより、細胞死の逃避が解除され、抗腫瘍効果に働くメカニズムの一つになっていると考えられた。

(6) A 抗原に対する抗体の遺伝子をクローニングし、遺伝子配列を決定した。この遺伝子配列をもとに抗 A・抗 CD3 ニ重特異性抗体の発現ベクターを作成した。この発現ベクターを用い、二重特異性抗体を作製した。作製した抗 A・抗 CD3 二重特異抗体を用い、LAK 細胞（固層化抗 CD3 抗体と IL-2 添加により培養されたリンパ球）を使用し、ヒト胃がん細胞担癌マウスの *in vivo* 実験で著名な抗がん効果を認めた。しかしながら、ヒト末梢血単核球を用いた系では、十分な抗がん効果は得られなかった。そこで、さらに抗がん効果を高めることを目的に、抗 A・抗 CD3 ニ重特異性抗体を Fc 部分を有するヒト型三重特異性抗体に分子改変を行った。初期の発現ベクターを CHO 細胞に遺伝子導入した結果、ヒト型三重特異性抗体産生効率が悪く、十分な抗体を得ることができなかった。そこで、ベクタ

ーを改変し低分子量にする事で十分量の抗体産生が可能となった。このヒト型三重特異性抗体は、A 抗原への結合、CD3 への結合は親抗体と同等であった。ヒト胃がん細胞株に対するヒト末梢血単核球を用いた治療実験で、十分な抗がん効果を認めた。

(7)研究成果の国内外における位置づけ：肝癌に対する抗体治療は現在国内外とも行われておらず、抗 FGFR-1 抗体による今後の臨床への応用が期待される。三重特異性抗体に関しては、癌性腹膜炎に対して 2009 年 4 月に世界で初めてヨーロッパで認可された Catumaxomab (Removab(R))が存在する。この抗体は CD3 と EpCAM を認識する三重特異性抗体であるが、Fc 部分がマウスとラットの蛋白のままであり、ヒトに投与すると抗マウス抗体、抗ラット抗体が出現することが報告されている。我々の作製した三重特異性抗体はヒト型化に成功しており、今後の臨床応用が期待される。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 67　件）

1. Suzuki H, Igarashi S, Nojima M, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M, Akashi H, Watanabe Y, Yamamoto H, Sasaki Y, Itoh F, <u>Imai K</u>, Sugai T, Shen L, Issa JP, Shinomura Y, Tokino T, Toyota M. IGFBP7 is a p53-responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. Carcinogenesis. 査読有, Vol.31, 2010 , 342-349
2. Taniguchi H, Fernández AF, Setién F, Ropero S, Ballestar E, Villanueva A, Yamamoto H, <u>Imai K</u>, Shinomura Y, Esteller M. Epigenetic inactivation of the circadian clock gene BMAL1 in hematologic malignancies. Cancer Res. 査読有, Vol.69, 2009, 8447-8454
3. Idogawa M, Sasaki Y, Suzuki H, Mita H, <u>Imai K</u>, Shinomura Y, Tokino T. A single recombinant adenovirus expressing p53 and p21-targeting artificial microRNAs efficiently induces apoptosis in human cancer cells. Clin Cancer Res. 査読有, Vol.15, 2009, 3725-3732
4. Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, <u>Imai K</u>, Shinomura Y, Tokino T. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. Cancer Res. 査読有, Vol.68, 2008, 4123-4132
5. Maruyama R, Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Ohe-Toyota M, Yamamoto E, Nojima M, Fujikane T, Sasaki Y, Yamashita T, Watanabe Y, Hiratsuka H, Hirata K, Itoh F, <u>Imai K</u>, Shinomura Y, Tokino T. Cytoplasmic RASSF2A is a proapoptotic mediator whose expression is epigenetically silenced in gastric cancer. Carcinogenesis. 査読有, Vol.29, 2008, 1312-1318
6. Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, <u>Imai K</u>, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R, Dohi T. DNA hypermethylation contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer. Gastroenterology. 査読有, Vol.135, 2008, 142-151
7. <u>Imai K,</u> Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. Carcinogenesis. 査読有, Vol.29, 2008,673-680
8. Yasui H, <u>Imai K</u>. Novel molecular-targeted therapeutics for the treatment of cancer. Anticancer Agents Med Chem. 査読有, Vol.8, 2008, 470-480
9. Taniguchi H, Yamamoto H, Akutsu N, Nosho K, Adachi Y, <u>Imai K</u>, Shinomura Y. Transcriptional silencing of hedgehog-interacting protein by CpG hypermethylation and chromatic structure in human gastrointestinal cancer. J Pathol. 査読有, Vol.213, 2007, 131-139
10. Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y, Maruyama R, Sasaki S, Sasaki Y, Mita H, Nishikawa N, Yamaguchi K, Hirata K, Itoh F, Tokino T, Mori M, <u>Imai K</u>, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. Oncogene. 査読有, Vol.26, 2007, 4699-4713
11. <u>Imai K</u>, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. Nat Rev Cancer. 査読有, Vol.6, 2006 , 714-727
12. Maruyama R, Aoki F, Toyota M, Sasaki Y, Akashi H, Mita H, Suzuki H, Akino K, Ohe-Toyota M, Maruyama Y, Tatsumi H, <u>Imai K</u>, Shinomura Y, Tokino T. Comparative genome analysis identifies the vitamin D receptor gene as a direct target of p53-mediated transcriptional activation. Cancer Res. 査読有, Vol.66, 2006, 4574-4583
13. Kurokawa S, Arimura Y, Yamamoto H, Adachi Y, Endo T, Sato T, Suga T, Hosokawa M, Shinomura Y, <u>Imai K</u>.

Tumour matrilysin expression predicts metastatic potential of stage I (pT1) colon and rectal cancers. Gut. 査読有, Vol.54, 2005, 1751-1758

〔学会発表〕（計　8　件）

1. 石田禎夫。FGFR に対する抗体による肝癌の標的治療。日本癌学会学術総会。2010 年 9 月 22 日。大阪。
2. 佐々木茂。消化器がんに対する改造抗体の作成。日本 DDS 学会。2009 年 7 月 3 日。東京。
3. 安井寛。消化器がんに対する抗体治療を目指して。日本がん免疫学会総会。2009 年 6 月 25 日。北九州
4. Sasaki S. Anti-Tumor Efficacy of Anti-FGFR-1 Monoclonal Antibody for Human Hepatoma Cells. October 9, 2008. Tokyo.

〔産業財産権〕
○出願状況（計　2 件）

名称：肝癌治療剤および肝癌の治療法
発明者：今井浩三、佐々木茂、清藤勉
権利者：北海道公立大学法人札幌医科大学、株式会社免疫生物研究所
種類：特許願
番号：特願 2007-142308
出願年月日：2007 年 5 月 29 日
国内外の別：国内

名称：癌治療剤及び癌の治療方法
発明者：今井浩三、佐々木茂、清藤勉
権利者：北海道公立大学法人札幌医科大学、株式会社免疫生物研究所
種類：特許願
番号：PCT/JP2008/001346
出願年月日：2008 年 5 月 29 日
国内外の別：PCT 出願（日本、欧州、米国、カナダの各国へ、国内移行）

６．研究組織
(1)研究代表者
今井　浩三（IMAI KOHZOH）
札幌医科大学・学長
研究者番号：60117603

(2)研究分担者
石田　禎夫（ISHIDA TADAO）
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20305220