

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19790934
 研究課題名(和文) 上皮増殖因子受容体シグナルを阻害する二重特異性抗体併用養子免疫療法
 研究課題名(英文) Adoptive immunotherapy using bispecific antibody that blocks the EGFR signaling pathway
 研究代表者 林 洋毅 (Hiroki Hayashi)
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：30422124

研究成果の概要(和文)：上皮増殖因子受容体(EGFR)とリンパ球表面マーカー(CD3)を同時に認識する二重特異性抗体を作成し、これをリンパ球と共に腫瘍細胞と共に培養することで、リンパ球の持つ殺腫瘍効果が飛躍的に向上することを示した。この効果は癌細胞表面にEGFRが発現している場合のみ、特異的に見られる効果であった。多くの固形癌でEGFRが発現していることから、極めて有望な治療法となる可能性が示唆された。また、この効果はマウスを用いた動物実験モデルでも確認された。

研究成果の概要(英文)：We develop the bispecific antibody that binds both epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD3 (lymphocyte's cell surface marker). This bispecific antibody greatly enhances lymphocyte's killer activity against cancer cells when administrated with lymphocytes. This effect is only observed against EGFR positive cancer cells (not against EGFR negative cells). This bispecific antibody seems very promising molecules against cancer immunotherapy because EGFR is widely expressing in many type of solid cancer. This effect was also observed in therapeutic models using mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科臨床医学・消化器外科学

キーワード：二重特異性抗体、上皮増殖因子受容体、EGFR、養子免疫療法

- | | |
|------------------------------------|--|
| 1. 研究開始当初の背景
癌細胞とリンパ球の両者を認識する二重 | 特異性抗体を作成し、リンパ球と癌細胞の両者を架橋し、物理的距離の短縮により、選択 |
|------------------------------------|--|

的に癌細胞を殺傷出来るのではないかと考えた。

これまで、二重特異性抗体の作成は2種類の抗体を酵素を用いて化学的に分解し、精製したのちに結合させるという手間がかかり、終了も極めて低かった。

そこで、大腸菌発現系を用いて作成する方法を検討し、低分子の二重特異性抗体(diabody)の作成を工学部熊谷研究室との共同研究で行った。Diabodyは2種類の抗体のVH, VLをそれぞれ遺伝子上でペプチドリンカーを用いてヘテロに結合させた分子を2種類等量ずつ混ぜ合わせることで作成する。

2. 研究の目的

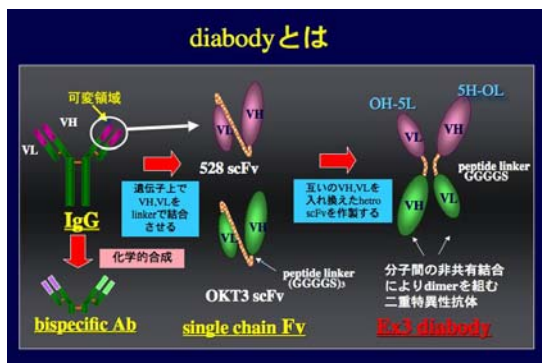
上皮増殖因子受容体(EGFR)とリンパ球方面マーカー(CD3)の両者を認識する二重特異性抗体を作成し、これをリンパ球と共に投与することで、リンパ球の殺腫瘍効果が向上するかどうかを検討する

また、これらの効果がEGFR発現に特異的であるかどうかを検討する。

In vitroのみならず、in vivoでもこの効果が観察されることを確認する。

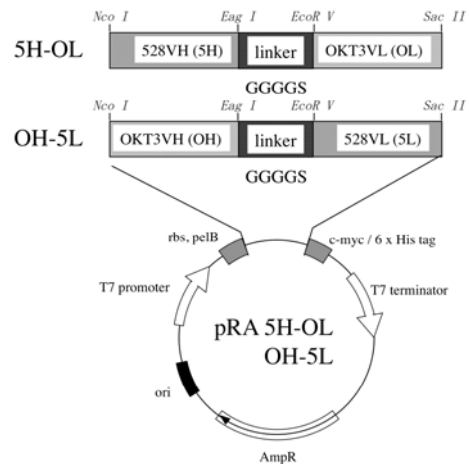
3. 研究の方法

大腸菌発現系を用いて、最小単位の二重特異性抗体(diabody)を作成する。



この二重特異性抗体の抗原認識部位はマウス抗ヒトEGFR抗体(528 IgG)およびマウス抗ヒトCD3抗体(OKT3 IgG)とする。

これらの抗体からVH, VLをそれぞれPCR法を用いて抽出し、互いのVH-VLをペプチドリンカーを用いてヘテロに結合させることにより、抗EGFR×抗CD3二重特異性抗体(diabody)を作成する。

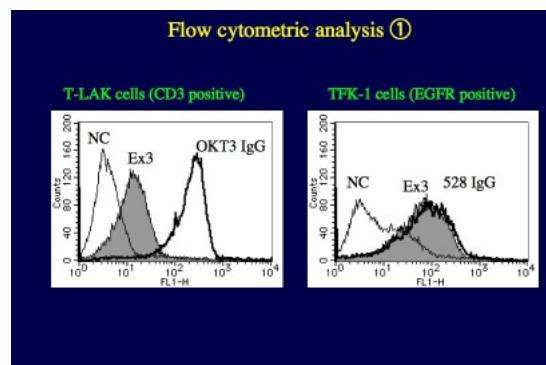


MTS assay法を用いて、EGFR発現細胞株および非発現細胞株に対して、リンパ球と共にdiabodyを投与し、殺腫瘍効果を検討する。

SCIDマウスの背部皮下にEGFR陽性細胞株を移植し、尾静脈よりdiabodyとリンパ球を投与する治療実験モデルを作成し、治療効果を検討する。

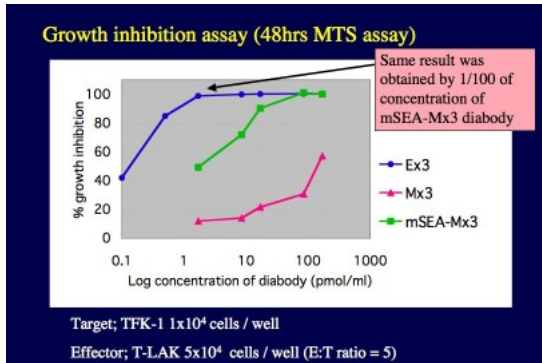
4. 研究成果

大腸菌発現系を用いて作成したEx3 diabodyは、EGFR陽性胆管癌細胞株(TFK-1)およびCD3陽性活性化リンパ球細胞(T-LAK細胞)の両者に対して結合能を有することがflowcytometryで示された。

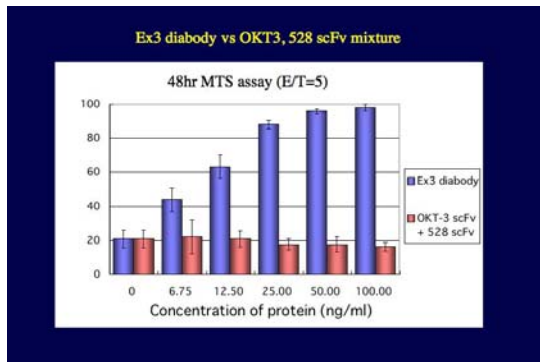


また、このEx3 diabodyをリンパ球と同時に癌細胞株に投与すると、EGFR陽性癌細胞株に対するリンパ球の持つ殺腫瘍効果を劇的に増強することが示された。この効果はEGFRの発現に極めて特異的であることも示された。EGFR陰性のCHO細胞に対しては、Ex3 diabodyは全くリンパ球の殺傷効果を増強しなかったが、EGFRの細胞外ドメインを強制発現させたところ、極めて低濃度で強力な殺腫瘍効果を引き出すことが可能であった。この効果はわれわれが過去に作成した他の腫瘍

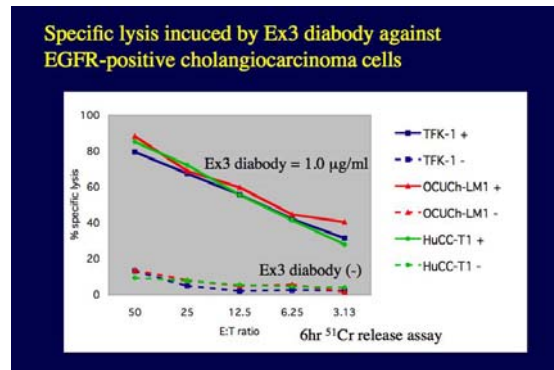
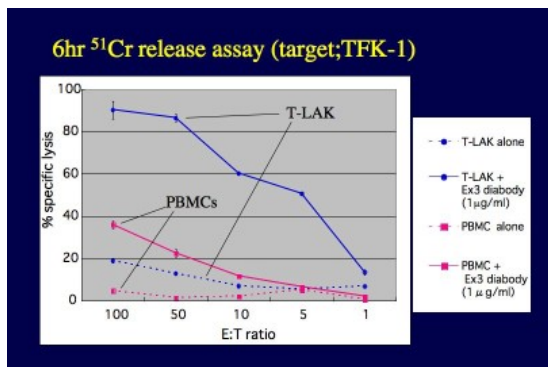
関連抗原 x 抗 CD3 抗体を用いた diabody の約 100 倍低濃度で効果を示した。MTS assay 法で検討すると E/T 比 5 の場合で、約 1pmol/ml という低濃度でほぼ 100%の細胞を殺傷することが分かった。



また、この抗腫瘍効果は、それぞれの scFv (528scFv と OKT3scFv) を等量ずつ混合した場合には全く観察されず、二つの抗原を同時に認識する二重特異性が重要であることが分かった。



また MTS assay のみならず、6hr のクロムリリースアッセイでも強い抗腫瘍効果が認められ、短時間で腫瘍を殺傷していることが示された。

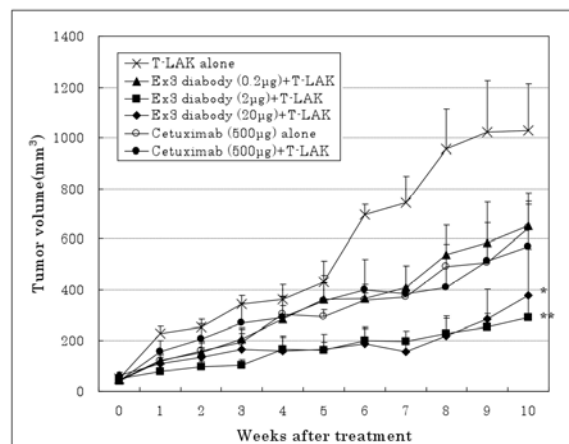


もともとマウスの抗体由来の抗体がベースとなっているが、この相補性決定領域はそのままに、フレーム領域のみをヒト化することにも成功した。これにより、いっそうの低免疫原性を確保することができた。抗 EGFR 抗体の親抗体である 528IgG については、我々が独自に遺伝子配列を解析し、得たものであり、国内外を問わず我々だけが作成出来るものである。

このヒト化 Ex3 diabody についても同様に EGFR の発現特異的に、リンパ球の殺腫瘍効果を極めて強力に増強することが示された。

この抗腫瘍効果は in vitro のみならず、in vivo でも示された。

しかしながら、Fc を有さない diabody は単独では、腫瘍増殖抑制効果はほとんど認められず、リンパ球と diabody を同時に投与した場合にのみ効果が示された。



治療直後のマウス皮下腫瘍を摘出し、免疫染色を行ったが diabody およびリンパ球の集

族については、評価が困難であり、diabody およびリンパ球の集簇の証明できてはいないのが残念であり、今後の課題となる。

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 5 件)

- ① Target cell-restricted apoptosis induction by 528scFv-TRAIL fusion protein specific for human EGFR and expressed in Escherichia coli. Badran A, Asano R, Nakayama M, Watanabe Y, Nakanishi T, Umetsu M, Hayashi H, Katayose Y, Unno M, Kumagai I. *Int J Oncol.* 2010 May;36(5):1229-34. (査読有り)
- ② Application of the Fc fusion format to generate tag-free bi-specific diabodies. Asano R, Ikoma K, Kawaguchi H, Ishiyama Y, Nakanishi T, Umetsu M, Hayashi H, Katayose Y, Unno M, Kudo T, Kumagai I. *FEBS J.* 2010 Jan;277(2):477-87. Epub 2009 Dec 15. (査読有り)
- ③ Diabody-based recombinant formats of humanized IgG-like bispecific antibody with effective retargeting of lymphocytes to tumor cells. Asano R, Kawaguchi H, Watanabe Y, Nakanishi T, Umetsu M, Hayashi H, Katayose Y, Unno M, Kudo T, Kumagai I. *J Immunother.* 2008 Oct;31(8):752-61. (査読有り)
- ④ Preferential heterodimerization of a bispecific diabody based on a humanized

anti-EGFR antibody 528. Asano R, Sone Y, Ikoma K, Hayashi H, Nakanishi T, Umetsu M, Katayose Y, Unno M, Kudo T, Kumagai I. *Protein Eng Des Sel.* 2008 Oct;21(10):597-603. Epub 2008 Jul 11.

(査読有り)

- ⑤ Highly effective recombinant format of a humanized IgG-like bispecific antibody for cancer immunotherapy with retargeting of lymphocytes to tumor cells. Asano R, Watanabe Y, Kawaguchi H, Fukazawa H, Nakanishi T, Umetsu M, Hayashi H, Katayose Y, Unno M, Kudo T, Kumagai I. *J Biol Chem.* 2007 Sep 21;282(38):27659-65. Epub 2007 Jul 19. (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 林 洋毅、海野倫明: EGFRとCD3を標的とした新規ヒト型化二重特異性抗体の抗腫瘍効果の検討 第13回がん分子標的治療学会(2009年6月26日)(徳島)
- ② 渡部泰弘、林 洋毅、浅野竜太郎、吉田寛、片寄友、安井寛、石田禎夫、江川新一、熊谷泉、海野倫明: EGFR標的ヒト型化二重特異性抗体のセツキシマブとの比較検討. 第108回日本外科学会定期学術集会(2008年5月16日)(長崎)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 洋毅 (Hiroki Hayashi)

東北大学・病院・助教

研究者番号: 30422124

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：