

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 7 月 31 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究 (C)

研究機関：2008~2010

課題番号：20591870

研究課題名：(和文)

腎細胞癌特異抗原に対し単離した完全ヒト型抗体の機能解析と治療効果の研究

研究課題名：(英文)

Analysis of biological function and efficacy of anti EGFR antibodies isolated from screening of human antibody phage display library specific to human renal cell carcinoma.

研究代表者名

白木 良一 (SHIROKI RYOICHI)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：70226330

## 研究成果の概要 (和文)

ファージ・ディスプレイ法を用い、ICOS 法 (J Immunol Methods. 351:1-12, 2009) により AIMS-5 ライブラリーより 2 種類のヒト腎細胞癌細胞特異的抗体 (062-130 & 059-152) を選択した。これら抗体が認識する腎がん細胞膜上の抗原は EGFR であった。これら抗体を IgG 化し抗腫瘍効果を検討した。in vitro ではヒト腎癌細胞株である CCF-RC1 に対し、062-130 では濃度依存性に細胞増殖を抑制し、抗体濃度 10 µg/ml にてコントロールに比べ 59.4%、059-152 では 34.8% の細胞増殖抑制効果が得られた。これら腫瘍増殖抑制の機序として、各抗体とも CCF-RC1 および ACHN に対し 35-40 % 程度の腫瘍細胞に対する ADCC 活性を認めたと Caki-1 に対しては全く ADCC 活性を呈さなかった。また、062-130 は CCF-RC1 および ACHN に対しリン酸化阻害活性を示し、これらは EGFR 阻害薬である Cetuximab より強力であった。一方、059-152 は如何なるリン酸化阻害活性も示さなかった。

ヒト腎癌担癌 SCID マウスに対し投与した実験では、コントロールに比べ有為な腫瘍増殖抑制を認めた。抗腫瘍効果は、各抗体において投与スケジュールや投与量、投与方法により増殖抑制に差がみられた。また、抗がん剤等との併用により相乗効果も認められたが、一方で抗がん化学療法剤との併用では宿主の体重減少等が認められ、副作用に対する検討が必要と考えられた。しかし、私どもの腎細胞癌治療用抗体作製のストラテジーは本来ヒト抗体ファージ・ライブラリーより産製される抗体を用いることから交差反応の可能性も少ないため、将来的にも治療の有効性と安全性を十分に諮れるもので、ヒト腎細胞癌に対する臨床応用が期待できると考えられた。

## 研究成果の概要 (英文)

Using the ICOS method, AIMS5 library was screened with human RCC cell lines, Caki-1 (2 cases), CCF-RC1 (2 cases) and ACHN (1 case). RCC-specific antibodies were chosen by immunostaining using clinical samples. We chose two different antibodies (059-152 and 062-130) that exhibited cancer cell-specific staining without staining normal cells on clinical RCC sample. These antibodies also reacted to the cell surface antigen of the selected human RCC cells. Antigens these two antibodies reacted were isolated from immunoprecipitation with CCF-RC1. Consequently, the recognized antigen by these two antibodies was proved to be epidermal growth factor receptor (EGFR). Isolated two different anti-EGFR antibodies were assessed for their functional activity on cell proliferation using Caki-1. At the low concentration (0.1 µg/ml), 059-152 and 062-130 exhibited about 70% cell proliferation. At the high concentration (10 µg/ml), our two anti-EGFR antibodies (059-152, 062-130) elicited up to 40 to 60% cell proliferation. In ADCC assay, 059-152 had about 35% ADCC assay. 062-130 had about 40% ADCC assay. The effects of the Ab on the phosphorylation reaction were examined. 059-152 did not inhibit

phosphorylation in any cell lines. 062-130 and Cetuximab inhibited phosphorylation using CCF-RC1 and ACHN.

To determine if the effects of these antibodies could be translated to inhibition of tumor growth in vivo, the antibody was given to mice transplanted with human RCC cells. Treatment with both antibodies developed significant inhibition on human RCC tumor growth compared with control group. The degree of growth inhibition, however, were dependent on the antibody, administration schedule and doses. Although, synergistic growth inhibitions were observed in combination with chemotherapeutic agents, reduction of host mice body weights reduction were also noted, which meant the necessity of investigation of adverse effects in combination therapy.

We expected these antibodies were candidate therapeutic antibodies. We showed, our anti-EGFR antibodies, especially 062-130 had sufficient effect. Because our antibodies were originated from human phage display system, possibility of cross reaction over animals were thought to be limited. We expect that this antibody will become a therapeutic antibody for RCC in clinical use.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍学

#### 1. 研究開始当初の背景

腎癌による年間の死亡者数は年々増加の傾向にあり、本邦では年間約3000人（全癌死亡者数の約1%）が腎臓悪性腫瘍により死亡しており、その95%が腎細胞癌である。腎癌は化学療法および放射線療法による治療には概ね抵抗性で、手術療法以外に有効な確立された治療法がなく、手術不能例、転移例では非常に予後不良である。一方、インターフェロンやインターロイキンなどの免疫賦活剤が比較的有効であることや、原発巣手術後に転移巣の自然消退が観られる事例があること、病理組織学的な解析では腎細胞癌内に細胞障害性Tリンパ球がみられることなどの理由から免疫原性の高い癌と考えられている。しかし、サイトカイン療法の有効率はほぼ10パーセント台に留まっている。また、VEGF等のターゲットに対する分子標的治療薬（ソラフェニブ、スニチニブ等）も近々上市される予定であるが、基本的にはプラセボに比し無増悪生存期間を4-6ヶ月程度延長するのみであり、決して腎癌の根治が獲得されるものとは言えない。

ヒトゲノムの全塩基配列が決定されたことによりゲノム上にコードされた全タンパク質のアミノ酸一次配列は推定可能となった。正常細胞で使用されない遺伝子の異常発現により癌化が起り、乳ガンにおけるHER2/ハーセ

プチンのように、その遺伝子産物が膜タンパク質であれば抗体治療の標的となる。HER2/neuに対する抗体HerceptinやCD52に対する抗体Campathなど、癌細胞の増殖を特異的に抑制する抗体の存在が知られるようになり、臨床においても一部の癌に対する治療法を大きく変えつつある。しかしこれら抗体は本来遺伝子工学による人工産物であり、ヒトに対する想定不能な様々な副作用を有する可能性もある。

私どもの施設が採択された21世紀COEプログラムの”超低侵襲標的化診断治療開発センター”における1プロジェクトである”癌治療における抗体療法”に当教室も参画しており、藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・免疫学教室との共同研究により本研究は企画、実践されている。共同研究者である黒澤らは数年前に数十人の扁桃、骨髄、末梢血、臍帯血などからBリンパ球を抽出し、10億種類以上からなるヒト抗体型ファージ・ライブラリー（AIMS5ライブラリー）を作製した。このAIMS5ライブラリーはファージのコート蛋白であるCP3と抗体遺伝子のVH、VL-CL領域を融合させ、ファージ内に組み込むことにより、ファージ表面にScFvを提示し、ヒトにB細胞が認識するあらゆる抗原に対する抗体を産生できる可能性がある。このファージ・ライブラリーにより様々な抗原に対して

ヒト抗体単離調製を実施した結果、自然界に存在する抗原となり得る様々な構造（エピトープ）に対して特異的に結合する抗体が必ず含まれていることが既に証明されている（Higo-Moriguchi K, Akahori Y, Iba Y, Kurosawa Y, Taniguchi K.; Isolation of human monoclonal antibodies that neutralize human rotavirus. J Virol. 2004;78:3325-32.）。これに加え、研究分担者である赤堀らが開発した、有機溶媒中で cell line と巨大なレパートリーからなる抗体を発現したファージ粒子を混合し癌細胞膜上で抗原抗体複合体を形成させることにより、そのファージ抗体を細胞と共に全て回収することが可能となった（オーガニック法）。この実験系においてファージ抗体ライブラリーと卵巣ガン細胞株である SKOV3 を用いたスクリーニングにより、すでに乳ガン治療に臨床応用されている Herceptin と同様の VH 認識 region を有する抗体の単離に成功している。次に、選択された抗体を用いて腎癌臨床検体を染色することによる 2 次スクリーニングにより、腫瘍により特異的な抗体を取捨選択することが可能である。特に、このスクリーニングにおいて抗体の腫瘍細胞の膜に対する特異的な染色性と正常細胞に対する非染色性を最大の評価選択ポイントとして候補抗体を選別した。以上により、13 種類のファージ抗体を腎細胞癌特異的として選別した。次に、単離した抗体が認識する腎癌細胞膜上の抗原を western blot によりラベルされたバンドを切り出しマススペクトロメトリーにより検索した。13 種類のファージ抗体のうち 059-152、062-130 の 2 抗体が認識している抗原（150kD 付近のバンド）として同定されたのは EGFR であった。

EGFR は腎癌において 40~85% に発現しているとの報告があり、EGFR 低発現の腎癌患者の 5 年生存率が 72% であるのに対し、過剰発現例では 57% と低く予後に関連していると考えられている。しかし、現在までに臨床応用されている抗 EGFR 抗体はマウス-ヒトキメラ抗体の Cetuximab であり、すでに大腸癌、頭頸部癌に対する有効性は証明されているが腎細胞癌では有効性は報告されていない。

## 2. 研究の目的

(1) 抗 EGFR 抗体の生物学的活性の解析 (in vitro 実験)

現在までに、我々が単離した 2 種類の抗体を IgG 化した *in vitro* において培養樹立腎癌細胞株を用いた細胞増殖抑制を測定した。CCF-RC1 をターゲットとした場合、コントロールに比べ 062-130 では濃度依存性に細胞増殖が抑制された。抗体濃度 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  にて 59.4% 増殖抑制が認められた。059-152 では 34.8% の細胞増殖抑制が得られた。また、ヒト腎癌細胞株 SCID

マウスに投与した場合は、腫瘍容積の縮小効果コントロールに比べある程度の腫瘍増殖抑制を認めた。腫瘍増殖抑制の機序は ADCC、リン酸化阻害などがある。

(2) 抗 EGFR 抗体の生物学的活性の解析 (in vivo 実験)

ヒト腎細胞癌を担癌した SCID マウスでの抗腫瘍効果は、各抗体において投与スケジュールや投与量、投与方法により増殖抑制に差がみられ、至適条件の設定が必要である。また、そのような条件において、生体に対する全身的な副作用の有無も検索する。

## 3. 研究の方法

既存腎ガン細胞株 (3 種類) を用い計 5 回のスクリーニングを行い、cp3 フォームを有するファージ抗体 331 種類が単離された。また、本学の IRB に申請し認可を受けたプロトコルのもと十分なインフォームド・コンセントにより得られた臨床検体 (病理診断で淡明細胞癌であった臨床検体 5 組織) による 2 次スクリーニングにて 13 種類の腎癌に特異的かつ正常組織に反応しない抗体を選別した。これらの抗体での FACS は腎癌細胞株および当科にて樹立した腎癌細胞株により強い陽性像を示し、腎癌組織特異的であることを強く示唆した。また、これら 13 種類の抗体はいずれも淡明細胞癌に起因した樹立細胞株であったことより腎細胞癌の中でも最もその頻度の多い淡明細胞癌に対する抗原の同定およびそれに対するより純化された抗体の単離が可能と考えられた。

次に、単離した抗体が認識する腎癌細胞膜上の抗原を western blot によりラベルされたバンドを切り出しマススペクトロメトリーにより検索した。13 種類のファージ抗体のうち 059-152、062-130 の 2 抗体が認識している抗原 (150kD 付近のバンド) として同定されたのは **EGFR (Epidermal Growth Factor receptor)** であった。腫瘍増殖抑制の機序は ADCC、リン酸化阻害などがあり、いかなる機序による腫瘍増殖抑制であるのかを検討する必要がある。

(1) ADCC 活性

癌組織特異的と考えられた抗体を IgG 型ヒト抗体に変換し、腎癌樹立細胞株を用いた *in vitro* での ADCC 作用を測定する。ADCC 活性は傷害された標的細胞 (ACHN, CCF-RC1, Caki-1) から放出される LDH 酵素活性を測定することにより推定する。

(2) リン酸化阻害

培養した腎癌細胞 (ACHN, CCF-RC1, Caki-1, A431) に抗体 (062-130, 059-152, Cetuximab) を添加し、EGF を添加し反応させ、リン酸化を誘導する。その後、この上清を SDS-PAGE, Western Blotting (WB) を行ない、リン酸化阻害の程度を検出する。

### (3) 細胞増殖抑制

細胞増殖はミトコンドリアの脱水素酵素の代謝を介した XTT による呈色反応により推定する。培養ヒト腎癌細胞 (ACHN, CCF-RC1, Caki-1) に抗体 (062-130, 059-152, Cetuximab) を加え培養し、XTT 反応液を加え比色吸光度を 450~620nm の波長で *in vitro* での細胞増殖抑制の程度を測定する。

これには均一かつ比較的大量の IgG 化した抗体が必要であり、これが得られ次第 H2O カラムも徐々に着手したい。

### (4) 動物実験 (至適投与法の検討)

ヒト腎細胞癌を担癌した SCID マウスでの抗腫瘍効果は、各抗体において投与スケジュールや投与量、投与方法により増殖抑制に差がみられ、至適条件の設定が必要である。

### (5) 動物実験 (副作用の検討)

至適投与条件における条件において、生体に対する全身的な副作用の有無も検索する必要がある。

## 4. 研究成果

現在までに我々が単離した 2 種類の腎癌特異的抗体を IgG 化し *in vitro* において培養樹立腎癌細胞株を用いた細胞増殖抑制を測定した。ヒト腎癌細胞株である CCF-RC1 をターゲットとした場合、コントロールに比べ 062-130 では濃度依存性に細胞増殖が抑制された。抗体濃度 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  にて 59.4% の増殖抑制効果が認められた。059-152 では 34.8% の細胞増殖抑制作用が得られた。また、ヒト腎癌を担癌させた SCID マウスに対し投与した場合には、腫瘍容積の縮小効果コントロールに比べある程度の腫瘍増殖抑制を認めた。これら腫瘍増殖抑制の機序として腫瘍細胞に対する ADCC、リン酸化阻害などがあり、これらに関し検討した。

(1) 抗 EGFR 抗体の生物学的活性の解析 (*in vitro* 実験)

現在までに我々はファージ・ディスプレイ法を用い、ICOS 法 (J Immunol Methods. 351:1-12, 2009) により AIMS-5 ライブラリーより単離した 2 種類のヒト腎細胞癌細胞特異的抗体

(062-130 & 059-152) を IgG 化した。*in vitro* ではヒト腎癌細胞株である CCF-RC1 に対し、062-130 では濃度依存性に細胞増殖を抑制し、抗体濃度 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  にてコントロールに比べ 59.4%、059-152 では 34.8% の細胞増殖抑制効果が得られた。これら腫瘍増殖抑制の機序として、ADCC および EGFR の TK リン酸化阻害の有無につき検討した。両抗体とも CCF-RC1 および ACHN に対し 35-40 % 程度の腫瘍細胞に対する ADCC 活性を認めたが Caki-1 に対しては全く ADCC 活性を呈さなかった。また、062-130 は CCF-RC1 および ACHN に対しリン酸化阻害活性を示し、これらは EGFR 阻害薬であ

る Cetuximab より強力であった。一方、059-152 は如何なるリン酸化阻害活性も示さなかった。

(2) 抗 EGFR 抗体の生物学的活性の解析 (*in vivo* 実験)

ヒト腎癌を担癌させた SCID マウスに対し投与した場合にはコントロールに比べ、ある程度の腫瘍増殖抑制を認めた。

ヒト腎癌担癌 SCID マウスに対し投与した実験では、コントロールに比べ有為な腫瘍増殖抑制を認めた。抗腫瘍効果は、各抗体において投与スケジュールや投与量、投与方法により増殖抑制に差がみられた。また、抗がん剤等との併用により相乗効果も認められたが、一方で抗がん化学療法剤との併用では宿主の体重減少等が認められ、副作用に対する検討が必要と考えられた。

私どもの腎細胞癌治療用抗体作製のストラテジーは、本来ヒト抗体ファージ・ライブラリーより産製される抗体を用いることで将来的にも治療の有効性と安全性を十分に諮れるものと考えられる。腎細胞癌では、以前よりサイトカインや樹状細胞等を用いた免疫療法による治療効果が確認されており、本研究が将来臨床的にも広く応用される可能性が高いものと期待される。

## 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 6 件)

① Kurosawa G, Shiroki R (23 人中 17 番目), et al. Selection and analysis of anti-cancer antibodies for cancer therapy obtained from antibody phage library. 査読 (有) Cancer Science 102: 2011, 175 - 181.

② Kusaka M, Shiroki R (10 人中 7 番目), et al. Serum tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) predicts organ recovery from delayed graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. 査読 (有), Cell Transplantation 19: 2010, 723 - 729.

③ Ichino M, Shiroki R (10 人中 7 番目), et al. Urinary neutrophil-gelatinase associated lipocalin is a potential noninvasive marker for renal scarring in patients with vesicoureteral reflux. 査読 (有) Journal of Urology 183: 2010, 2001 - 2007.

④ Kurosawa G, Akahori Y (16 人中 3 番目), et al. Methods for comprehensive identification of membrane proteins recognized by a large number of monoclonal antibodies. 査読 (有) J Immunol Methods. 351: 2009, 1-12.

⑤ 有馬聡、白木良一 (9人中2番目)、星長清隆 (9人中9番目)、他. 維持透析中の進行性腎癌骨転移例に対するゾレドロン酸投与の検討. 査読(有) 日本泌尿器科学会雑誌. 99(5): 2008, 660 - 665.

⑥ Kurosawa G, Akahori Y (24人中2番目), Shiroki R (24人中20番目), Hoshinaga K (24人中21番目), et al. Comprehensive screening for antigens overexpressed on carcinoma via isolation of human mAbs that may be therapeutic. 査読(有), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 105(20): 2008, 7287 - 7292.

[学会発表] (計3件)

① 森川高光, 白木良一, 他. 進行腎癌に対する分子標的薬治療の有効性と有害事象の検討

第48回日本癌治療学会学術集会、2010/10/28、京都.

② N.Sato, R.Shiroki, Y.Akahori, K.Hoshinaga, 他. Analysis of Biological Function of antiEGFR Antibodies Isolated from Screening of Human Antibody Library Specific to Human RCC. 米国泌尿器科学会 (AUA) 2009年4月27日米国 イリノイ州 シカゴ

③ 佐藤乃理子, 白木良一、星長清隆、赤堀康、黒澤良和、他. 腎細胞癌のスクリーニングによりファージ抗体ライブラリーから単離された抗 EGFR 抗体の機能解析. 日本泌尿器科学会総会, 平成20年4月25日, 横浜.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白木 良一 (SHIROKI RYOICHI)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
研究者番号：70226330

### (2) 研究分担者

星長 清隆 (HOSHINAGA KIYOTAKA)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
研究者番号：30229174  
赤堀 泰 (AKAHORI YASUSHI)  
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教  
研究者番号：80221711

