

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20790134
研究課題名 (和文)
腫瘍血管特異的な細胞内侵入抗体の創製とその新規抗腫瘍血管療法への展開
研究課題名 (英文)
Creation of cell-internalizing antibody for novel tumor endothelial missile therapy
研究代表者
向 洋平 (MUKAI YOHEI)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：60444501

研究成果の概要(和文)：

腫瘍血管特異的マーカー(VEGFR2, Robo4 他)に対する細胞内侵入抗体を独自のファージ表面提示法を改良した方法により単離した。得られた候補クローンのイムノコンジュゲート製剤としての有用性を、腫瘍モデルマウスに対する治療検討により評価したところ、細胞内侵入活性を有する抗体のみが、治療効果を発揮するという非常に興味深い知見を得た。この結果は細胞内侵入抗体を単離することが抗体医薬開発に貢献する可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：

We rapidly isolated “cell-internalizing antibody” against tumor endothelial markers (VEGFR2, Robo4 etc.) using optimized phage display system. Obtained cell-internalizing antibody, anti-VEGFR2 scFv fused with PSIF, significantly suppressed the tumor growth on experimental mouse model. This result indicated that the rapid isolation of cell-internalizing antibody contributes the development DDS medicine, such as immunoconjugate against cancer.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 薬学・医療系薬学

キーワード: 医療薬剤学

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の血管新生の阻害によるがん治療は、1) 腫瘍への栄養供給路を断ち切ることで一つの血管内皮細胞あたり数百とも言われる腫瘍細胞を死滅させ得ること、2) 多種の腫瘍で共通に起こっている血管新生を標的とすることで、がん種を問わず広い抗がんスペクトルを有すること、3) 高速変異するがん細胞ではなく、血管新生という現象を標的していることから、抗癌剤耐性などの問題を生じないこと、等から、がん治療における新たな治療戦略の一つとして注目を集めている。そのため、血管新生に重要な役割を担う分子、例えば血管内皮細胞増殖因子; VEGF や、マトリックスメタロプロテアーゼ; MMP の阻害薬などが開発され、盛んに臨床展開がなされている。特に VEGF に対するモノクローナル抗体である Avastin は、本邦での適応は未だ結腸・直腸癌のみであるものの、海外ではすでに、肺癌、乳癌などにも治療効果が認められ、がんに対するユニバーサルな治療法としてその地位を確立しつつある。しかしながら、このような全身血中に存在する生体内分子を標的にした中和療法は、その生体内分子の枯渇に伴う副作用を招いてしまうことが多い。実際に、Avastin に関しても、生体に必須の因子である VEGF を完全に枯渇しようとする自身の作用メカニズムにより、高血圧、胃腸穿孔、出血などの注意を要する副作用を惹起し、さらには、患者によってはその副作用は重篤であることが報告されている。従って、これは、現存の抗血管新生療法に対する問題提起となっており、既存の方法論とは異なった抗血管新生療法の開発が急務であると考えられている。本観点から申請者は、生体の恒常性維持に必須の分子を標的とする従来まで抗血管新生療法とは異なり、近年腫瘍血管での特異発現が明らかとなった 3 種の腫瘍血管マーカー、Robo4, TEM7, TEM8 を標的とした抗体を樹立することで、副作用の少ないがんミサイル療法へ展開できるものと考えた。

2. 研究の目的

本申請研究は、副作用の少ない新規の抗腫瘍血管療法の開発を目指し、腫瘍血管内皮細胞へと特異的に取り込まれ、細胞内へと薬物をデリバリー可能な機能性抗体分子を創製しようとするものである。本申請研究は、薬物を、正常組織には分布させず腫瘍血管内皮にのみ特異的に蓄積させようとするものであるため、現在注目を集めている抗腫瘍血管療法への更なる発展に大きく貢献するものと期待できる。

3. 研究の方法

1) 各種抗原に対する免疫抗体ライブラリの構築

Robo4, TEM7, TEM8 に対する免疫抗体ライブラリの構築は、これまで我々の構築してきた方法に従って行った。免疫マウスから得られた脾臓

mRNA に対し、抗体遺伝子の定常領域にアニーリングする独自のプライマーセットを用い抗体遺伝子ライブラリを増幅し、ファージ製用ベクターへとライゲーションした。それらが大腸菌に形質転換し、そこからファージを産生させることで、各抗原に対する免疫抗体ライブラリを得た。

2) 各種抗原に対する抗体の濃縮

ライブラリからの抗体の単離は、抗原へとライブラリを添加し、抗原と結合するもののみを回収し、大腸菌で増幅する、パンニングと呼ばれる操作を複数繰り返すことにより行った。

3) 各種抗原に対する細胞内移行活性のスクリーニング

パンニングにより濃縮されたライブラリを、PSIF 融合蛋白質発現用のベクターへと組み替え、モノクローナル化の後、細胞傷害性を指標にしたスクリーニングを行った。またこの際、各々の抗原に対する ELISA も行うことにより、細胞内侵入活性と抗原結合性を評価した。

4) フローサイトメトリーによる細胞内侵入活性評価

得られた候補クローンのうち、抗 VEGFR2 細胞内侵入抗体 V2-01 と、VEGFR2 結合性は有するものの細胞内侵入活性を有さない V2-02 に関して、scFv (一本鎖抗体) リコンビナント蛋白質として大腸菌により発現・精製を行った。この V2-01(scFv) 及び V2-02(scFv) を Cy5.5-NHS でラベル化し、蛍光標識 scFv を作成した。作成した scFv を VEGFR2 発現マウス MS1 細胞へと添加し、トリプシンで細胞表面に結合した scFv を除去することで、細胞内に侵入した scFv をフローサイトメトリーで検出した。

5) PSIF 融合蛋白質の抗腫瘍効果

V2-01(scFv)-PSIF 及び V2-02(scFv)-PSIF は、大腸菌によって発現・精製した。B16BL6 担がんモデルマウスに対して、これら PSIF 融合体を投与 2 日間隔で 3 回静脈内投与を行い、その腫瘍増殖抑制効果を評価した。

4. 研究成果

H20 年度では、新規の腫瘍血管マーカーとして期待される、Robo4, TEM7, TEM8 のリコンビナント蛋白質を作成し、これら 3 種に既存の血管マーカーである VEGFR2 を加えた 4 種に対する免疫抗体ライブラリを構築した。本ライブラリは、各々 1 億種類以上もの多様性を有しており、本ライブラリは、複数種のモノクローナル抗体が単離可能な高品質なものであることが示された。次に、細胞内侵入抗体のハイスループットなスクリーニング法として、蛋白質合成阻害因子 PSIF との融合体によるスクリーニングを行ったところ、VEGFR2, Robo4, TEM7 に関しては、わずか 1 週間以内という短期間で、細胞内侵入抗体の候補クローンを複数得ることに成功した。得られた一本鎖抗体; scFv の親和性は、いずれも 10^{-9} オーダーと非常に高く、優れたものであったが、最も興味深い点は、その親和性と、細胞内侵入活

性が相関しないという事実であった。従って、今回得られたクローンは、単に抗原に結合するだけでなく、積極的にエンドサイトーシスを誘発する機能を有する可能性を示唆するものであった。

H21 年度は、VEGFR2 に対する細胞内侵入抗体について、詳細な特性を評価したところ、本抗体は、細胞表面に結合後、僅か 2 時間という短期間で細胞内へと 33% も取り込まれることが明らかとなった (Fig. 1)。これは、医薬品化されている細胞内侵入抗体 Myrotarg に匹敵する効率であり、本侵入抗体の有用性が示唆される結果であった。また、その細胞内侵入活性を利用したがんミサイル療法へと本抗体を適用すべく、蛋白質合成阻害因子 PSIF との融合体を発現・精製し、その抗腫瘍効果を in vivo 腫瘍モデルマウス (B16BL6 腫瘍モデル) にて評価したところ、細胞内侵入活性を有するクローンのみが顕著な

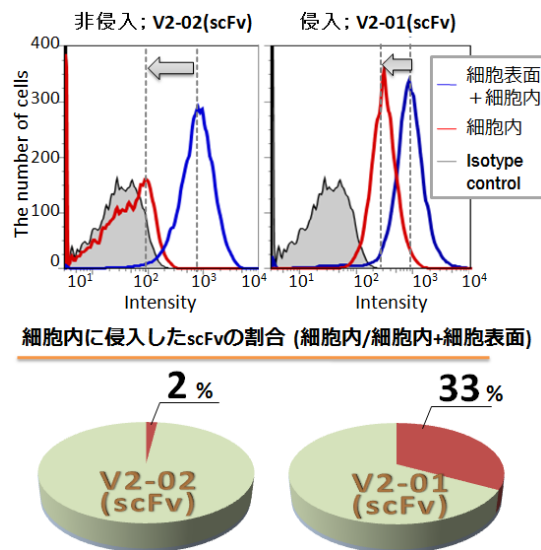


Fig. 1 細胞内侵入抗体の細胞内移行効率

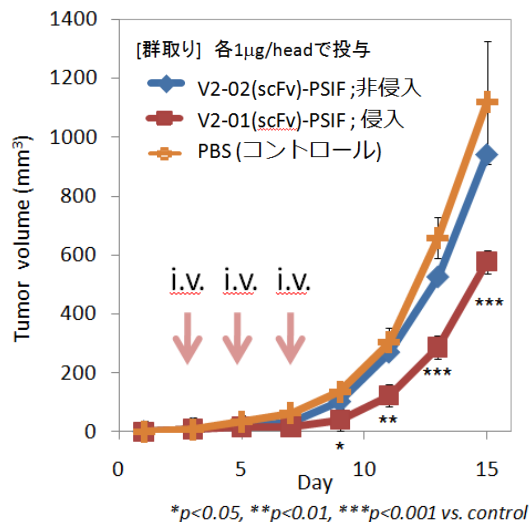


Fig. 2 V2-01(scFv)-PSIF の抗腫瘍効果

抗腫瘍効果を発揮することを明らかとした (Fig. 2)。これは immuno-conjugate 製剤開発における細胞内侵入活性の重要性を示唆するものであり、今後の創薬開発に重要な情報を提示するものであると考えられる。今後は、Robo4, TEM7 に対する細胞内侵入抗体についても同様の検討を行うことで、本テクノロジーから得られたクローンの更なる有用性を追求する予定である。

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 17 件)

- 1) Kojima H, Mukai Y, Yoshikawa M, Kamei K, Yoshikawa T, Morita M, Inubushi T, Yamamoto TA, Yoshioka Y, Okada N, Seino S, Nakagawa S., Simple PEG Conjugation of SPIO via an Au-S Bond Improves Its Tumor Targeting Potency as a Novel MR Tumor Imaging Agent. *Bioconjug Chem.* 2010 in press (査読有)
- 2) Nomura T, Abe Y, Kamada H, Shibata H, Kayamuro H, Inoue M, Kawara T, Arita S, Furuya T, Yamashita T, Nagano K, Yoshikawa T, Yoshioka Y, Mukai Y, Nakagawa S, Tani ai M, Ohta T, Serada S, Naka T, Tsunoda SI, Tsutsumi Y., Therapeutic effect of PEGylated TNFR1-selective antagonistic mutant TNF in experimental autoimmune encephalomyelitis mice., *J Control Release.* 2010 in press (査読有)
- 3) Morishige T, Yoshioka Y, Inakura H, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S., Creation of a LIGHT mutant with the capacity to evade the decoy receptor for cancer therapy., *Biomaterials.* 2010 Apr;31(12):3357-63. (査読有)
- 4) Morishige T, Yoshioka Y, Inakura H, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S., Creation of a lysine-deficient LIGHT mutant with the capacity for site-specific PEGylation and low affinity for a decoy receptor., *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Mar 19;393(4):888-93. (査読有)
- 5) Kanagawa N, Yanagawa T, Mukai Y, Yoshioka Y, Okada N, Nakagawa S., Tumor-targeting CTL expressing a single-chain Fv specific for VEGFR2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Mar 26;394(1):54-8. (査読有)
- 6) Yoshioka Y, Watanabe H, Morishige T, Yao X, Ikemizu S, Nagao C, Ahmad S, Mizuguchi K, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S., Creation of lysine-deficient mutant lymphotoxin-alpha with receptor selectivity by using a phage display system., *Biomaterials.* 2010 Mar;31(7):1935-43. (査読有)

- 7) Morishige T, Yoshioka Y, Tanabe A, Yao X, Mizuguchi H, Tsunoda S, Tsutsumi Y, **Mukai Y**, Okada N, Nakagawa S., Comparison of the anti-tumor activity of native, secreted, and membrane-bound LIGHT in mouse tumor models., *Int Immunopharmacol.* 2010 Jan;10(1):26-33. (査読有)
- 8) Shibata H, Yoshioka Y, Abe Y, Ohkawa A, Nomura T, Minowa K, **Mukai Y**, Nakagawa S, Taniai M, Ohta T, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y., The treatment of established murine collagen-induced arthritis with a TNFR1-selective antagonistic mutant TNF., *Biomaterials.* 2009 Dec;30(34):6638-47. (査読有)
- 9) Morishige T, Yoshioka Y, Inakura H, Tanabe A, Watanabe H, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, **Mukai Y**, Okada N, Nakagawa S., LIGHT protein suppresses tumor growth by augmentation of immune response., *Immunol Lett.* 2009 Dec 2;127(1):33-8. (査読有)
- 10) Nomura T, Abe Y, Kamada H, Inoue M, Kawara T, Arita S, Furuya T, Yoshioka Y, Shibata H, Kayamuro H, Yamashita T, Nagano K, Yoshikawa T, **Mukai Y**, Nakagawa S, Taniai M, Ohta T, Tsunoda SI, Tsutsumi Y., Novel protein engineering strategy for creating highly receptor-selective mutant TNFs., *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Oct 30;388(4):667-71. (査読有)
- 11) **Mukai Y**, Nakamura T, Yoshioka Y, Shibata H, Abe Y, Nomura T, Taniai M, Ohta T, Nakagawa S, Tsunoda S, Kamada H, Yamagata Y, Tsutsumi Y., Fast binding kinetics and conserved 3D structure underlie the antagonistic activity of mutant TNF: useful information for designing artificial proteo-antagonists., *J Biochem.* 2009 Aug;146(2):167-72. (表紙掲載) (査読有)
- 12) Yoshikawa T, Sugita T, **Mukai Y**, Yamanada N, Nagano K, Nabeshi H, Shibata H, Yoshioka Y, Nakagawa S, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y., The augmentation of intracellular delivery of peptide therapeutics by artificial protein transduction domains., *Biomaterials.* 2009 Jul;30(19):3318-23. (査読有)
- 13) **Mukai Y**, Nakamura T, Yoshioka Y, Tsunoda S, Kamada H, Nakagawa S, Yamagata Y, Tsutsumi Y., Crystallization and preliminary X-ray analysis of the tumour necrosis factor α -tumour necrosis factor receptor type 2 complex., *Acta Cryst.* 2009 Mar 1;F65(Pt 3):295-8. (査読有)
- 14) Kamei K, **Mukai Y**, Kojima H, Yoshikawa T, Yoshikawa M, Kiyohara G, Yamamoto TA, Yoshioka Y, Okada N, Seino S, Nakagawa S., Direct cell-entry of gold/iron-oxide magnetic nanoparticles in adenovirus mediated gene delivery., *Biomaterials.* 2009 Mar;30(9):1809-14. (査読有)
- 15) **Mukai Y**, Shibata H, Nakamura T, Yoshioka Y, Abe Y, Nomura T, Taniai M, Ohta T, Ikemizu S, Nakagawa S, Tsunoda S, Kamada H, Yamagata Y, Tsutsumi Y., Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant., *J Mol Biol.* 2009 Jan 30;385(4):1221-9. (査読有)
- 16) Yoshikawa M, **Mukai Y**, Okada Y, Yoshioka Y, Tsunoda SI, Tsutsumi Y, Okada N, Aird WC, Doi T, Nakagawa S., Ligand-independent assembly of purified soluble magic roundabout (Robo4), a tumor-specific endothelial marker., *Protein Expr Purif.* 2008 Sep;61(1):78-82. (査読有)
- 17) 向 洋平、中川晋作:腫瘍 MR イメージングにおける造影剤開発、*JSMI Report.* 2010 3(1):14-17. (査読有)
- [学会発表](計 16 件)
- 1) 吉川舞、向 洋平、岡田欣晃、吉岡靖雄、岡田直貴、Aird WC、土井健史、堤康央、角田慎一、中川 晋作:抗体-薬物複合体; Antibody-drug conjugate の開発に適う細胞内侵入抗体の効率的探索法、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 30 日、岡山
- 2) 向 洋平:Antibody Drug Conjugate 製剤の開発を目指した細胞内侵入抗体の効率的探索法、技術情報協会セミナー「次世代抗体医薬品開発に向けた最新研究動向」、2010 年 1 月 25 日、東京
- 3) 吉川舞、向 洋平、吉岡靖雄、岡田直貴、堤康央、角田慎一、中川 晋作: Antibody-drug conjugate の開発に適う細胞内侵入抗体の効率的探索法、第 8 回ファーマ・バイオフィォーラム、2009 年 11 月 14 日、名古屋
- 4) 吉川 舞、向 洋平、吉岡靖雄、岡田直貴、堤 康央、角田 慎一、中川 晋作: High-throughput screening method of “Cell-internalizing monoclonal antibodies”, potent anti-tumor drug delivery carriers、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月2日、横浜
- 5) Mai Yoshikawa, **Yohei Mukai**, Yoshiaki Okada, Yasuo Yoshioka, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi, Naoki Okada, William C Aird, Takefumi Doi, Shinsaku Nakagawa, : Ligand independent assembly of purified soluble Magic Roundabout (Robo4), a tumor-specific endothelial marker, *ECCO 15 and 34th ESMO Multidisciplinary Congress*, Berlin (Germany), 20-24 September, 2009
- 6) Hiroki Kojima, **Yohei Mukai**, Kazumasa Kamei, Satoshi Seino, Masashi Morita, Toshiro Inubushi, Yasuo Yoshioka, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa., : Design of tumor targeting magnetic resonance imaging (MRI) agent based on gold/iron-oxide composite nanoparticle., *ECCO 15 and 34th ESMO Multidisciplinary Congress*, Berlin (Germany), 20-24 September, 2009

- 7) **Yohei Mukai**, Hiroki Kojima, Tomoaki Yoshikawa, Kazumasa Kamei, Mai Yoshikawa, Takao A Yamamoto, Yasuo Yoshioka, Naoki Okada, Satoshi Seino, Shinsaku Nakagawa., : Direct cell entry of gold/iron-oxide magnetic nanoparticles in adenovirus mediated gene delivery, *ECCO 15 and 34th ESMO Multidisciplinary Congress*, Berlin (Germany), 20-24 September, 2009
- 8) **向 洋平**: 金磁性複合ナノ粒子のバイオ・DDS分野への展開、第 3 回「ナノメディスン・アプリケーション研究会」、2009 年 9 月 16 日、大阪
- 9) **向 洋平**: 金磁性複合ナノ粒子のバイオ分野への応用、第 31 回 ナノバイオ磁気工学専門研究会、2009 年 7 月 23 日、大阪
- 10) 吉川 舞、**向 洋平**、久保 貴、吉岡靖雄、岡田直貴、堤 康央、角田 慎一、中川 晋作 : immuno-conjugate 製剤の開発に適う細胞内侵入抗体の効率的創製法の確立、日本薬剤学会第 24 年会、2009 年 5 月 22 日、静岡
- 11) 小島拓記、**向 洋平**、森田将史、犬伏俊郎、山本孝夫、吉岡靖雄、岡田直貴、清野智史、中川晋作: 微細超常磁性酸化鉄粒子 (USPIO) をコアとした PEG 化金磁性ナノ粒子の創製とその MRI 腫瘍造影剤としての有用性評価、日本薬剤学会第 24 年会、2009 年 5 月 22 日、静岡
- 12) **向 洋平**、柴田 寛子、中村 照也、吉岡 靖雄、阿部 康弘、野村 鉄也、谷合 まどか、太田 恒考、池水 信二、鎌田 春彦、角田 慎一、中川 晋作、山縣 ゆり子、堤 康央: TNFR1 選択的阻害剤の開発を目指した TNFR1 選択的変異体の創製とそのレセプター結合における構造-活性相関研究、第 9 回蛋白質科学会年会、2009 年 5 月 21 日、熊本
- 13) **Yohei Mukai**, Teruya Nakamura, Yasuo Yoshioka, Yasuhiro Abe, Tetsuya Nomura, Madoka Taniai, Tsunetaka Ohta, Shinji Ikemizu, Shinsaku Nakagawa, Shin-ichi Tsunoda, Haruhiko Kamada, Yuriko Yamagata and Yasuo Tsutsumi : Receptor interaction of Tumor Necrosis Factor (TNF) based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant., *12th International TNF Conference*, Madrid (Spain), 26-29 April, 2009.
- 14) Mai Yoshikawa, **Yohei Mukai**, Hiroko Shibata, Yasuo Yoshioka, Yasuhiro Abe, Tetsuya Nomura, Madoka Taniai, Tsunetaka Ohta, Shin-ichi Tsunoda, Haruhiko Kamada, Shinsaku Nakagawa, Yasuo Tsutsumi., The development of fully active receptor selective Tumor Necrosis Factor (TNF) mutants, *12th International TNF Conference*, Madrid (Spain), 26-29 April, 2009.
- 15) **Yohei Mukai**, Hiroko Shibata, Teruya Nakamura, Yasuo Yoshioka, Yasuhiro Abe, Tetsuya Nomura, Madoka Taniai, Tsunetaka Ohta, Shinji Ikemizu, Shinsaku Nakagawa, Shin-ichi Tsunoda, Haruhiko Kamada, Yuriko Yamagata, Yasuo

Tsutsumi, STLUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIP OF TNF BASED ON 3D STRUCTURAL ANALYSIS OF FULLY ACTIVE TNFR1-SELECTIVE TNF MUTANT., *Cytokine 2008*, Montreal, CANADA, Oct 2008

- 16) Kamei K, Yoshikawa T, Kojima H, Seino S, Yamamoto T A, Yoshioka Y, Okada N, **Mukai Y**, Nakagawa S, Direct Cell-entry of Gold/iron-oxide Magnetic Nanoparticles Enhanced Adenovirus Mediated Gene Expression in Adenovirus-resistant cells., *7th international conference on the scientific and clinical applications of magnetic carriers*, Vancouver, CANADA, May 2008

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

大阪大学研究者総覧(向 洋平):

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/kg-portal/aspI/RX0011D.asp?UNO=15207&page=1>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向 洋平(MUKAI YOHEI)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号: 60444501

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし