

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：94410

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590098

研究課題名(和文) 持続的活性型EGF受容体を発現するがんを標的とした抗体医薬の開発

研究課題名(英文) Anti-cancer antibody targeting epidermal growth factor receptor with constitutively active mutations

研究代表者

伊藤 文昭 (Ito, Fumiaki)

サンスター株式会社ヘルスサイエンス研究所・その他部局等・その他

研究者番号：80111764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：がんの中で最も死亡数の多いがんは肺がんである。肺がんの原因の一つは、上皮増殖因子受容体(EGFR)の異常である。EGFRを標的とする抗がん剤(gefitinib、erlotinibなど)が肺がんの治療薬として使用されているが、長期間の使用により効果が見られなくなることから、新たな抗がん剤の開発が急務である。私たちはEGFRに結合する抗体が肺がん細胞内には取込まれるが、正常細胞には取込まれないことを見つけた。そこで、抗体に抗がん剤を結合させて、肺がん細胞に与えた。抗がん剤はがん細胞に取込まれたが、十分な抗がん活性は得られなかった。取込まれた抗がん剤の量が少ないことが一因であろう。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer is the leading cause of death in Japan. Aberrant signaling by epidermal growth factor (EGFR) is found in many cell lung cancer patients, and it leads to uncontrolled cell growth resulting in lung cancer.

Recently, anti-cancer agents (gefitinib and erlotinib) targeting EGFR tyrosine kinases were introduced. Lung cancer patients initially respond well to these anti-cancer agents, but they develop acquired resistance to the agents over time. Therefore, scientists continue to search for new active anticancer agents with better activity.

In this study, we found that antibody against EGFR is incorporated into PC-9 lung cancer cells which display a mutation within the EGFR gene, but not into PC-14 cells which display normal type of EGFR. Then, we conjugated anti-cancer agents (paclitaxel and daunorubicin) to the anti-EGFR antibody. The conjugated antibody showed similar cytotoxic effects on PC-9 and PC-14 cells and it shows less activity than unconjugated anti-cancer agents.

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：薬学・生物薬学

キーワード：上皮増殖因子受容体 チロシンキナーゼ阻害剤 抗体医薬 抗がん剤

### 1. 研究開始当初の背景

がんの中で最も死亡数の多いがんは肺がんである。肺がんになる原因は、いろいろあるが、その一つは上皮増殖因子 (EGF) 受容体の異常である。EGF 受容体は、リガンドである EGF が結合すると、チロシンキナーゼ (TK) が活性化され、細胞内の様々な下流シグナルを活性化して細胞増殖を誘起する。しかし、一部のがんでは EGF 受容体の異常 (過剰発現や TK 領域の変異) が起きており、この異常ががん化の原因となっている。このため EGF 受容体を標的とした EGF 受容体 TK 阻害剤や抗 EGF 受容体抗体ががん治療に用いられている。TK 阻害剤は非小細胞肺がん患者に用いられており、非小細胞肺がんのうち EGF 受容体の TK 領域に特定の変異 (EGF 受容体遺伝子のエクソン 19 の 15 塩基の欠失や L858R など) を有するケースで劇的な腫瘍縮小効果を示す。しかし、重篤な副作用や TK 阻害剤に対する耐性獲得が大きな問題となっており、副作用の少ない抗がん剤や、耐性がん細胞にも効果を示す抗がん剤の開発が期待されている。

### 2. 研究の目的

EGF 受容体に対するモノクローナル抗体 (B4G7) を利用して、抗がん活性を示す抗体医薬の開発。特に、持続的活性型 EGF 受容体 (エクソン 19 の 15 塩基の欠失) を発現している非小細胞肺がんおよび TK 阻害剤に対して耐性を獲得したがんの効果を示す抗がん剤の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞: EGF 受容体遺伝子のエクソン 19 の 15 塩基が欠失しており、リガンドに依存せず TK が持続的に活性化されているヒト非小細胞肺がん細胞 PC-9、正常型 EGF 受容体をもつ非小細胞肺がん細胞 PC-14、および私たちが PC-9 細胞から単離した TK 阻害剤に耐性を示す細胞を用いた。

(2) EGF 受容体量は Western blot 法を用いて調べた。EGFR mRNA の定量は、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いた。抗ヒト EGF 受容体抗体 (B4G7) で処理した細胞から RNA を NucleoSpin RNA キットを用いて調製し、さらに、RNA 増幅試薬キットおよび蛍光・目視検出試薬・カルセイン (栄研化学) を用いて 65 °C で、1 時間、ViiA7 リアルタイム PCR システムを使用して反応させた。使用したプライマー配列は以下の通りである。EGFR: Outer F (ccttc tggagggtga gccaa)、Outer R (cgtacttcca gaccagggtgt)、FIP (ggatgatgtt catggccgag tttgtggaga actctgag)、RIP (acgggg accagacaactgta tcctgccggg caggcttga)、Loop F (cactctgggt ggactgtat)、Loop R (ccagt gtcaccaacta cattg)。-actin: Outer F (ccattggcaat gagcggttc)、Outer R (atgccagggtacatggtgt)、FIP (gtagtttctgtggatgccacactgccctga

ggcactcttc)、RIP (caactccatcatgaagtgtg gccagacagcactgtgttg)、Loop F (gactccatgcc caggaagga)、Loop R (gtggacat cgcgaagacct)。(3) 抗体依存性細胞障害 (ADCC) アッセイは、ADCC Reporter Bioassay Kit (プロメガ株) を用いて測定した。エフェクター細胞 (Jurkat 細胞) の NFAT パスウェイを介したホタルルシフェラーゼ活性の上昇による発光を Promega GLOMAX Multi Detection System (発光マイクロプレートリーダー) で測定した。

(5) Alexa Fluor647 タンパク質ラベリングキットを用いて B4G7 を蛍光標識した。約 5.2 分子の AlexaFluor647 が結合した B4G7 を得た。

### 4. 研究成果

B4G7 で PC-9、PC-14 細胞を処理し、次の (1) から (5) に及ぼす影響を調べた。

(1) 細胞増殖・生存: PC-9 細胞の生存は TK 阻害剤 (AG1478、ゲフィチニブ) により抑制された。一方、PC-14 細胞の増殖は影響を受けなかった。

次に B4G7 処理 (10 µg/ml) で処理したときの細胞増殖を調べた。両細胞とも増殖・生存の低下は見られず、むしろ増殖促進作用が見られた。EGF 受容体を標的とする抗体医薬 (セツキシマブ) が増殖阻害作用を示し、抗がん剤として臨床で利用されていることから、抗体が EGF 受容体のどの領域 (エピトープ) を認識するかにより、その作用は異なると考えられる。

(2) EGF 受容体タンパク質: B4G7 で処理した細胞を Lysis buffer で溶解後、Western blot 法で EGFR 発現量を調べた。図 1 に示すように、PC-9 細胞では、EGFR 量は時間経過と共に著しく減少したが、PC-14 細胞ではほとんど減少しなかった。

一方、EGF 受容体 mRNA に対しては、いずれの細胞でも B4G7 処理による変化は見られず、PC-9 細胞における B4G7 による EGF 受容体タンパク質の減少は、分解の促進作用によると考えられた。

(3) EGF 受容体および B4G7 の細胞内局在: 次に、PC-9 細胞および PC-14 細胞を B4G7 で処理したときの EGF 受容体の細胞内局在を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて調べた。PC-9 細胞では EGF 受容体は細胞内に取り込まれリソソームに輸送されたが、PC-14 細胞では細胞内への取り込みは、ほとんど起きていなかった (図 2)。細胞内の局在については、蛍光標識をしたトランスフェリンおよび LAMP2 を用いて確認をした。

次に、Alexa Fluor647 で蛍光標識をした B4G7 で両細胞を 30 分、あるいは 22 時間処理した後、B4G7 の細胞内分布をオールインワン蛍光顕微鏡 (キーエンス BZ-X700) で調べた。PC-9 細胞では、いずれの時間でも蛍光が細胞内に観察されたが、PC-14 細胞では 30 分後では細胞膜上の広い範囲に検出され (図 3)

22 時間後では細胞膜の特定の領域に観察された。

以上の結果から、PC-9 細胞では EGF 受容体に結合した B4G7 は細胞内に取り込まれリソソームに輸送されるが、PC-14 細胞では細胞内に取り込まれないことが考えられた。また、PC-9 細胞から単離された耐性株でも、B4G7 で処理をすると EGFR の分解が起きたことから(図 4)、TK 阻害剤に耐性を獲得した細胞でも、B4G7 はリソソームへと輸送される可能性が考えられる。

(4) 抗体依存性細胞障害作用: PC-9 細胞、PC-14 細胞を B4G7 で処理後、すぐに、あるいは 1 時間後にエフェクター細胞を添加し、ルシフェラーゼ活性を測定した。いずれの場合も蛍光は微弱であり、かつ、両細胞で有意な違いは検出できなかった。B4G7 はマウスの IgG2 であり、抗体のヒト化の際に IgG2 タイプにすれば、正常型 EGF 受容体を発現している正常細胞に対する抗体依存性細胞障害作用を抑えることが可能かもしれない。

(5) EGF 受容体リン酸化: PC-9 細胞では細胞内に取り込まれた EGF 受容体は、リサイクル経路で細胞膜へと輸送されるが、B4G7 で処理するとリソソームに運ばれ分解される。B4G7 処理後、1 時間までの EGF 受容体チロシンリン酸化を調べ、リン酸化と細胞内輸送経路の関連を調べた。B4G7 処理により 1045 番目のリン酸化が増加しており、1045 番目のリン酸化が EGF 受容体のリソソームへの輸送に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。しかしながら、1045 番目のチロシンに対する抗体の特異性が低かったこともあり、1045 番目のリン酸化を介した EGF 受容体と Cbl タンパク質の結合、EGF 受容体のユビキチン化などを含めた詳細な解析が、今後必要であろう。

次に、抗がん剤を B4G7 に結合させたコンジュゲートを用いて、B4G7 を細胞内に取り込む PC-9 細胞および耐性細胞を特異的に殺すことができないか調べた。

2'-グルタリルパクリタキセルを合成し、45 で 25 分間 *N,N*-カルボジイミダゾールと混合(モル比 = 1:10)した。その後、B4G7 を加え(パクリタキセル : B4G7 = 2 : 1) 4 で一晩反応させ、B4G7 のアミノ基にパクリタキセルを結合させたパクリタキセル/B4G7 コンジュゲートを調製した。PC-9 および PC-14 細胞の生存率は 0.04 μM パクリタキセル処理により 20~30%に低下したが、パクリタキセル/B4G7 コンジュゲート処理では 5 倍量の 0.2 μM で処理しても、両細胞の生存率を低下させることはできなかった。

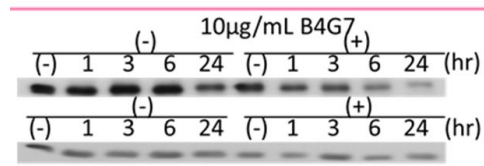
次に、図 5 に示したダウノルビシン(DNR)が B4G7 のアミノ基にアミド結合したコンジュゲートを調製し(参考文献: Proc Natl Acad Sci USA. 1982 Jan; 79(2):626-9.) PC-9 細胞および PC-14 細胞を処理した。両細胞は同じような濃度のコンジュゲートで阻害を受け、また、その増殖阻害作用は抗がん剤単独

の場合より弱かった。

以上からいずれのコンジュゲートも十分な抗がん活性を示さなかった。理由は不明であるが、一つの可能性としては、細胞内に取り込まれた抗がん剤(パクリタキセル、ダウノルビシン)の量が少なかったことが考えられる。

図 1

PC-9 細胞(上段: EGFR 下段: -tubulin)



PC-14 細胞(上段: EGFR 下段: -tubulin)

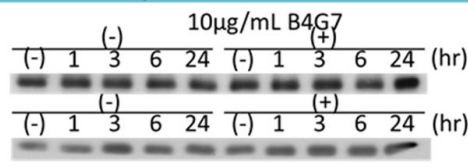


図 2

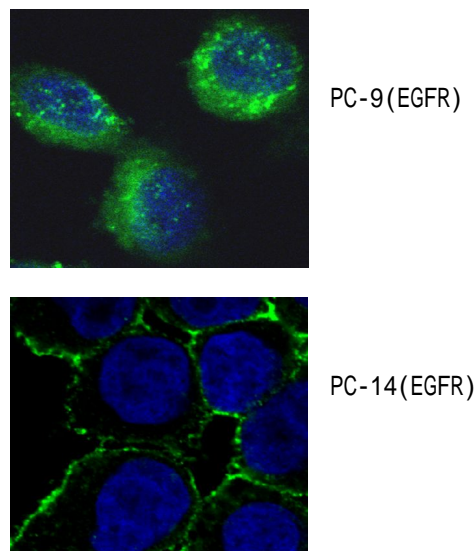


図 3

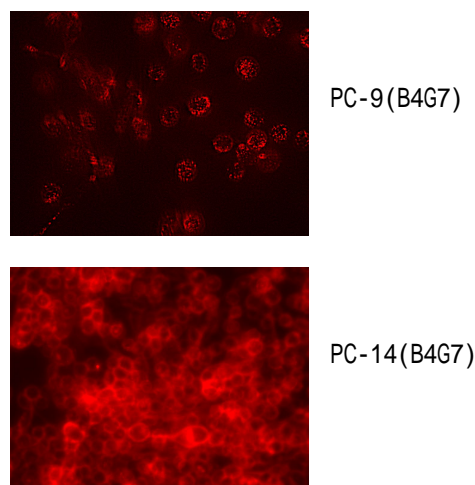
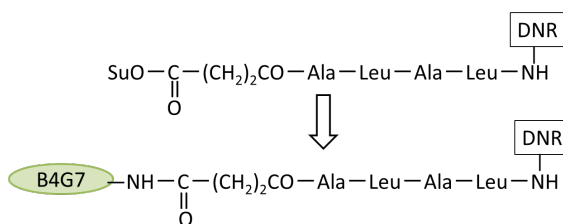




図5



### 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 15 件)

1. Phuong Thien Thuong, Nguyen Minh Khoi, Saho Ohta, Shinichiro Shiota, Hironori Kanta, Kenji Takeuchi and Fumiaki Ito: Ent-Kaurane Diterpenoids from Croton Tonkinensis Induce Apoptosis in Colorectal Cancer Cells through the Phosphorylation of JNK Mediated by Reactive Oxygen Species and Dual-Specificity JNK Kinase MKK4. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2014, 14, 711-721.
2. K.Takeuchi, A.H.Viet, K.Kawasaki, K.Nishio and F.Ito: JNK-mediated FOXO expression plays a critical role in EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced BIM expression and apoptosis. *J Cancer Therapy*. 2012, 3, 424-434.
3. K.Takeuchi and F.Ito: Receptor Tyrosine kinases and Targeted Cancer Therapeutics. *Biol.Pharm.Bull.* 2011 34, 1774-1780.
4. Yamada T, Azuma K, Muta E, Kim J, Sugawara S, Zhang GL, Matsueda S, Kasama-Kawaguchi Y, Yamashita Y,

Yamashita T, Nishio K, Itoh K, Hoshino T, Sasada T: EGFR T790M mutation as a possible target for immunotherapy; identification of HLA-A\*0201-restricted T cell epitopes derived from the EGFR T790M mutation. *PLoS ONE*, 2013 8, e78389.

[学会発表](計 31 件)

1. 竹内健治 EGFRチロシンキナーゼ阻害剤耐性機構における MKP-1 の役割 日本薬学会第 134 年会 熊本 2014 年 3 月 28 日
2. 渡瀬友貴 上皮増殖因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤における FOXO1 の役割 日本薬学会 133 年会 横浜 2013 年 3 月 29 日
3. 塩田真一郎 EGFR 活性型変異を有する非小細胞肺癌細胞における EGFR の細胞内輸送経路 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会 武庫川大学 2012 年 10 月 20 日
4. 伊藤文昭 Antitumor activity and target molecule of ent-kaurane diterpenoids in colorectal cancer cells 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 21 日 札幌
5. 伊藤文昭 ゲフィチニブ感受性非小細胞肺癌細胞における上皮増殖因子受容体の細胞内経路 日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 30 日 札幌
6. 新崎さや乃 EGFRチロシンキナーゼ阻害剤耐性機構における Bcl-2 ファミリー分子発現誘導の役割 日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 29 日 札幌
7. 塩田真一郎 ヒト非小細胞肺癌において発現している変異型 EGF 受容体の細胞内輸送経路の解析 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2011 年 10 月 22 日 神戸学院大学

[図書](計 1 件)

1. 青木隆 スタンダード薬学シリーズ 4 生物系薬学 演習編 2011 年 283 ページ 東京化学同人

[その他]

ホームページ等

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 文昭 (ITO FUMIAKI)

サンスター(株)・ヘルスサイエンス研究所・研究顧問

研究者番号: 80111764

(2)研究分担者

西尾和人 (NISHIO KAZUTO)

近畿大学・医学部・教授  
研究者番号： 10208134

(3)連携研究者  
該当者なし( )

研究者番号：