

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591402

研究課題名(和文) 三重特異性抗体を用いた多発性骨髄腫に対する新領域抗体療法の開発

研究課題名(英文) Development of trifunctional antibodies in multiple myeloma

研究代表者

安井 寛 (Yasui, Hiroshi)

東京大学・医科学研究所・特任講師

研究者番号：40448593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、CD3抗原を有するTリンパ球と、骨髄腫細胞の表面に存在する抗原Aとに同時に結合し、ナチュラルキラー細胞と結合する三重特異性抗体を作成しました。

この抗体は、A抗原、CD3抗原、ナチュラルキラー細胞とのそれぞれによく結合し、骨髄腫細胞株と末梢血単核球との共培養でも、ヒト骨髄腫移植マウスにおいても、抗腫瘍活性を有します。この成果を医薬品としての実用化につなげるために、知財権の確保と産学連携の検討を進めてまいります。

研究成果の概要(英文)：The trifunctional antibody can bind specifically to tumor antigens and the T-cell antigen CD3 via each of the Fab-fragments as well as to macrophages via its Fc-fragment. We have developed a trifunctional antibody, which binds to CD3 and antigen A expressed on the surface of multiple myeloma cells. Such binding results in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against myeloma cells as well as antitumor activity in human myeloma mouse model. We plan on acquiring the intellectual property rights as well as the university-industry research collaboration in order to put this finding to the practical use as an anti-myeloma drug.

研究分野：血液学、腫瘍学

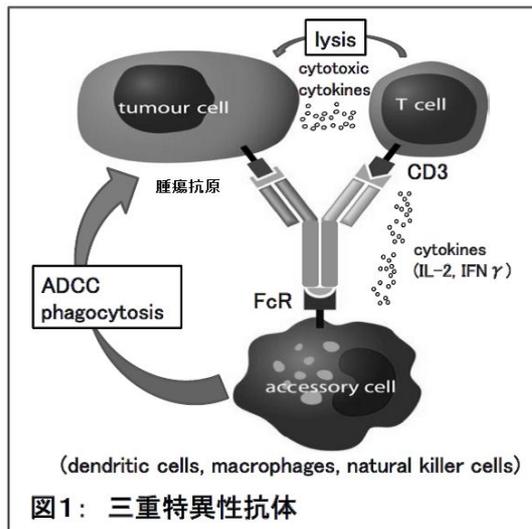
キーワード：多発性骨髄腫 抗体医薬 橋渡し研究 三重特異性抗体 がん免疫療法

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は、B 細胞の最終分化段階である形質細胞の悪性腫瘍であり、経過中に治療抵抗性を獲得するため予後不良である。近年、新規治療薬（ボルテゾミブ・サリドマイド・レナリドマイド）の臨床導入により、有意な予後改善が認められるが、依然として治療困難である。研究代表者の安井はこれまで多発性骨髄腫の分子病態に基づいた新しい治療法の開発を目指し、細胞内シグナル研究や遺伝子研究などの基礎研究と、前臨床試験を中心とした橋渡し研究を実践してきた。

一方、抗体医薬は、分子標的療法としての特異性の高さや安全性の高さ、免疫細胞動員という従来の抗がん剤や低分子化合物にはない新しい機序を有し、その有望な治療効果から、がん診療の現場に大きな変革と進歩をもたらしている。

研究者らのグループは以前より新規抗体治療の実現を目指して独自に抗体作製の研究を進めてきた。従来のモノクローナル抗体は腫瘍細胞のみを標的とし、生体内における免疫賦活作用が比較的弱いと考えられることから、はじめに腫瘍表面に発現する抗原を標的とする抗体と抗 CD3 抗体の Fab 領域により構成され、腫瘍細胞と CD3 発現免疫担当細胞を架橋する二重特異性抗体を作製、さらに ADCC 誘導に寄与するヒト型 Fc 部分が結合した三重特異性抗体（図 1）を作成し、その作製・評価系を確立した。



新領域の抗体医薬である三重特異性抗体は、抗体の Fab 部分により腫瘍細胞と免疫担当細胞とを架橋し、かつ、Fc 部分に集積するアクセサリー細胞により ADCC 活性を誘導し、従来の抗体医薬を上回る強力な抗腫瘍効果が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、多発性骨髄腫・白血病・悪性リンパ腫などの血液がんを高発現する糖蛋白 A（知的財産権確保のため、A と記載）を

標的に、抗腫瘍効果を有する抗 A・抗 CD3 三重特異性抗体を作製し、難治性の形質細胞疾患である多発性骨髄腫に対する抗腫瘍効果を *in vitro*, *in vivo* で実証し、臨床導入への橋渡しを目指す。

3. 研究の方法

当該研究では、新領域の抗体医薬である三重特異性抗体の作成技術をもとに、骨髄腫に対して有効な抗 A・抗 CD3 三重特異性抗体を作製する。作製抗体における標的分子との結合能、*in vitro* での細胞障害活性、*in vivo* での抗腫瘍効果を評価し、その至適化をはかる。臨床応用を目指し、薬剤抵抗性株を含む多数の骨髄腫細胞株に対する抗腫瘍効果を検討する。

1) 三重特異性抗体の作製

本研究では、予備実験で作製した抗 A モノクローナル抗体と抗 CD3 抗体の H 鎖、L 鎖可変領域遺伝子をクローニングし、ヒト IgG の定常領域の遺伝子と融合した抗 A・抗 CD3 三重特異性抗体遺伝子ベクターを作製、CHO 細胞に導入し、発現した抗体を精製する。精製抗体の標的分子に対する結合能を FACS で評価して、有望な抗体を選択する。

2) 抗腫瘍効果の解析・評価

in vitro において、多数の骨髄腫細胞株に対する抗腫瘍効果を評価する。ヒト末梢血単核球との共培養系での骨髄腫細胞に対する ADCC 活性と、ヒト血清存在下での CDC 活性を確認する。次に、ヒト骨髄腫異種移植マウスを用いて、*in vivo* における抗腫瘍効果を検証する。作製抗体の抗腫瘍効果が乏しい場合に備えて、複数のバックアップ品を作製し抗腫瘍効果を検証し、作製抗体の至適化をはかる。

4. 研究成果

はじめに、複数のマウス抗 A モノクローナル抗体を作製し、そのうち分子間相互作用解析装置 Biacore および FACS を用いて抗原 A との結合能力が高いモノクローナル抗体を複数選択の上、ヒト骨髄腫異種移植マウスにおいて著明な抗腫瘍効果を認める抗体を同定した。

次に、同定した抗体と、抗 CD3 抗体において、H 鎖と L 鎖可変領域遺伝子をそれぞれクローニングし、ヒト IgG の定常領域遺伝子と融合した三重特異性抗体（CD3/抗原 A）遺伝子ベクターを作製、CHO 細胞に導入し発現した三重特異性抗体（CD3/抗原 A）を作製し精製した。さらに、遺伝子ベクターを改変することにより、複数のヒト化三重特異性抗体（CD3/抗原 A）を作製し、抗体の安定性、CD3、抗原 A、CD16c (Fc 受容体) との結合能、*in vitro* での細胞障害活性を評価の上、選択した 3 つの有望な抗体のうち、*in vivo* で抗腫瘍効果を認める 1 つの抗体を同定した。

現在、この成果を実用化へとつなげるべく、知財権確保と産学連携についての検討を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文](計 18 件)

Shigematsu A, Kobayashi N, Yasui H, Shindo M, Kakinoki Y, Koda K, Iyama S, Kuroda H, Tsutsumi Y, Imamura M, Teshima T High level of serum soluble interleukin-2 receptor at transplantation predicts poor outcome of allogeneic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia. **Biol Blood Marrow Transplant.** 査読有 20(6):801-5 (2014)
doi: 10.1016/j.bbmt.2014.02.014

Takeuchi M, Sato Y, Yasui H, Ozawa H, Ohno K, Takata K, Iwaki N, Orita Y, Asano N, Nakamura S, Swerdlow SH, Yoshino T. Epstein-Barr virus-infected cells in IgG4-related lymphadenopathy with comparison to extranodal IgG4-related disease **Am J Surg Pathol.** 査読有 38(7):946-55 (2014)
doi: 10.1097/PAS.0000000000000206

Yasui H, Tsurita G, Imai K. DNA synthesis inhibitors for the treatment of gastrointestinal cancer. **Expert Opin Pharmacother.** 査読有 15(16), 2361-72 (2014).
doi: 10.1517/14656566.2014.958074

Hayashi T, Ikeda H, Igarashi T, Maruyama Y, Aoki Y, Nojima M, Ishida T, Shinomura Y. Autologous stem cell transplantation for AL amyloidosis: adjustment of melphalan dose by factors including BNP. **Int J Hematol.** 査読有 2014 100(6):554-8.
doi: 10.1007/s12185-014-1680-1.

Hirayama Y, Ishitani K, Ota S, Kurosawa M, Kondo T, Takimoto R, Mori A, Sakai H, Torimoto Y, Yamamoto S, Sato K, Iwasaki H, Kohda K, Ishida T, Kakinoki Y, Fukuhara T, Kato J. Long-term survey of survival time, histological transformation, and secondary malignancies in Japanese

patients with advanced-stage follicular lymphoma in the rituximab era: Hokkaido Hematology Study Group. **Int J Hematol.** 査読有 2014 100(3):281-9.
doi:10.1007/s12185-014-1629-4.

Kunimoto Y, Yasui H, Touda N, Okazaki M, Nakata H, Noda N, Ikeda H, Hayashi T, Takahashi S, Shinomura Y, Ishida T, Miyamoto A. Coadministration of tenofovir decreased atazanavir plasma concentration after unilateral nephrectomy **J Infect Chemother.** 査読有 19(4):750-3 (2013)
doi: 10.1007/s10156-012-0488-2.

Aoki Y, Nojima M, Suzuki H, Yasui H, Maruyama R, Yamamoto E, Ashida M, Itagaki M, Asaoku H, Ikeda H, Hayashi T, Imai K, Mori M, Tokino T, Ishida T, Toyota M, Shinomura Y. Genomic vulnerability to LINE-1 hypomethylation is a potential determinant of the clinicogenetic features of multiple myeloma. **Genome Med.** 査読有 4(12):101 (2012)
doi: 10.1186/gm402.

Sawada T, Adachi Y, Ishi Y, Yasui H, Arimura Y, Endo T. Esophageal lesions in myeloproliferative neoplasms. **Endoscopy** 査読有 44, 173-4 (2012)
doi: 10.1055/s-0031-1291754.

Yoshii S, Mabe K, Noshio K, Yamamoto H, Yasui H, Okuda H, Suzuki A, Fujita M, Sato T. Submucosal hematoma is a highly suggestive finding for amyloid light-chain amyloidosis: Two case reports. **World J Gastrointest Endosc.** 査読有 4(9):434-7 (2012)
doi: 10.4253/wjge.v4.i9.434.

Yasui H, Ishida T, Maruyama R, Nojima M, Ikeda H, Suzuki H, Hayashi T, Shinomura Y, Imai K. Model of translational cancer research in multiple myeloma. **Cancer Sci.** 査読有 103(11), 1907-1912 (2012)
doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02384.x

安井 寛、今井浩三 抗体医薬 PHARM TECH JAPAN 臨時増刊号「日本 DDS 学会創立 30 周年記念誌」株式会社じほう 2015;31(2)94-101 (総ページ 282)

安井 寛、石田禎夫 多発性骨髄腫に対する新たな抗体医薬開発の現状 血液内科 特集「新規ターゲットおよび医薬品による血液がん治療の新たな展開」 科学評論社 2015;70(2) 203-210 (総ページ 284)

釣田義一郎、谷澤健太郎、篠崎大、安井寛、今井浩三、石井浩、尾阪将人、島宏彰、水口徹、林宏至、鳥越俊彦、佐藤昇志 膵癌に対するサバイピン免疫療法の研究 膵・胆道癌 FRONTIER メディカルレビュー社 2014;4(2): 96 -101

安井 寛、今井浩三 バイオ医薬品と DDS メディカル・サイエンス・ダイジェスト 特集「DDS 技術の進歩と医療応用」ニューサイエンス社 2014;40(2)15-8

安井 寛 核酸を用いる DDS 治療の現状と将来 医薬ジャーナル 特集「Drug delivery system (DDS) の最新展望」 医薬ジャーナル社 2014 年 ; 50(7) 77-81 (総ページ 200)

安井 寛、石田禎夫 多発性骨髄腫におけるエピゲノム異常と治療の可能性 血液内科 2013;66(3):337-345

安井 寛、今井浩三 抗がん細胞抗体 - その開発のあゆみとがん抗体療法の新たな可能性 実験医学増刊「腫瘍免疫学とがん免疫療法」 羊土社 2013;31(12) 1945-51

石田禎夫、安井 寛 多発性骨髄腫 - 現状と進歩 検査法と病態 t(4;14) 転座と多発性骨髄腫 SET ドメインタンパク質 (MMSET) の意義 医学のあゆみ 2012;242(13):1063-1067

[学会発表](計 17 件)

Yasui H, Aoki Y, Nojima M, Suzuki H, Maruyama Y, Maruyama R, Yamamoto E, Itagaki M, Ikeda H, Hayashi T, Asaoku H, Imai K, Ishida T, Shinomura Y. Hypomethylation of Retrotransposons is Correlated with Malignant Levels, Frequency of Chromosomal Aberrations, and Poor Prognosis in Multiple Myeloma. JSH International Symposium 2012 in Kawagoe, May, 26-27, 2012, Kawagoe, Japan

Yasui H, Aoki Y, Nojima M, Suzuki H, Maruyama Y, Maruyama R, Yamamoto E, Itagaki M, Ikeda H, Hayashi T, Asaoku H, Imai K, Ishida T, Shinomura Y. Hypomethylation of endogenous retrotransposons is correlated with frequent chromosomal deletions and poor prognosis in multiple myeloma. 17th Congress of the European Hematology Association, Jun, 15, 2012, Amsterdam, Netherlands

Shigematsu A, Tanaka J, Kobayashi N, Yasui H, Shindo M, Kakinoki Y, Iyama S, Kuroda H, Tsutsumi Y, Hashino S, Imamura M, Teshima T. Role of Allogeneic Stem Cell Transplantation for Adult T-Cell Leukemia in an HTLV-1 Non-Endemic Area of Japan 54th ASH Annual Meeting, Dec, 9, 2012, Atlanta, USA

野島正寛、青木由佳、安井 寛、丸山玲緒、山本英一郎、麻奥英毅、時野隆至、長村文孝、石田禎夫、今井浩三、篠村恭久、鈴木拓. 多発性骨髄腫における LINE-1 異常低メチル化と臨床遺伝子学的特徴の相関 第 72 回日本癌学会学術集会 2013 年 10 月 5 日 横浜

安井 寛 トランスレーショナルリサーチの意義と展望 特別講演【招待講演】 第 23 回日本臨床化学会北海道支部例会 2013 年 12 月 7 日 札幌

佐々木 茂、鈴木 拓、安井 寛、石田禎夫、高木 秀安、本谷雅代、阿久津典之、志谷真啓、今井浩三、篠村恭久 肝細胞がんに対する FGFR1 を標的とした新規抗体治療法の開発 第 19 回肝細胞研究会 2012 年 6 月 29 日 札幌

今井浩三、佐々木茂、安井 寛、谷口博昭. ターゲティングのための抗体医薬による新治療戦略 第 28 回日本 DDS 学会学術集会【シンポジウム】 2012 年 7 月 4 日 札幌

安井 寛、野島正寛、青木由佳、板垣充弘、高塚伸太郎、丸山ゆみ子、丸山玲緒、池田 博、鈴木 拓、林 敏昭、麻奥英毅、今井浩三、石田禎夫、篠村恭久 多発性骨髄腫における DNA メチロームと遺伝子発現・染色体異常との関連 第 37 回日本骨髄腫学会学術集会 2012 年 7 月 7

日 京都

安井 寛 多発性骨髄腫におけるゲノム・エピゲノム解析とトランスレーショナルリサーチの試み 第63回日本電気泳動学会学術集会 ワークショップ【招待講演】 2012年8月21日 沖縄県宜野湾市

安井 寛、石田禎夫、青木由佳、那須野央、丸山ゆみ子、丸山玲緒、野島正寛、池田 博、鈴木 拓、林 敏昭、今井浩三、篠村恭久 多発性骨髄腫における基礎研究の進歩と臨床応用 第54回日本血液学会秋季北海道地方会 シンポジウム【招待講演】2012年9月15日 札幌

石田禎夫、丸山ゆみ子、池田 博、安井寛、林 敏昭、篠村恭久 再発・難治多発性骨髄腫に対する現在の治療と新薬の将来展望 第54回日本血液学会秋季北海道地方会 シンポジウム 2012年9月15日 札幌

Yasui H, Ishida T, Aoki Y, Maruyama R, Nojima M, Ikeda H, Suzuki H, Hayashi T, Shinomura Y, Imai K. A model of Translational Cancer Research in Multiple Myeloma 第71回日本癌学会学術総会 英語口演 2012年9月20日 札幌

Nojima M, Aoki Y, Yasui H, Maruyama R, Asaoku H, Ishida T, Tokino T, Mori M, Suzuki H, Shinomura Y. 多発性骨髄腫の発生における DNA メチロームの意義: MBD シーケンシング法によるアプローチ 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月20日 札幌

Ikeda H, Aoki Y, Yasui H, Hayashi T, Ishida T, Sasaki Y, Shinomura Y. 多発性骨髄腫における骨髄ストローマ細胞と単球との相互作用の解析 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月20日 札幌

Yasui H, Ishida T, Ikeda H, Aoki Y, Maruyama Y, Nojima M, Takahashi F, Minami T, Hayashi T, Imai K, Shinomura Y. Study of FLC and PIC in immunoglobulin light chain amyloidosis 第74回日本血液学会学術集会 口演 2012年10月19日 京都

Aoki Y, Nojima M, Yasui H, Suzuki H, Maruyama R, Ikeda H, Hayashi T, Ishida

T, Asaoku H, Shinomura Y. The significance of global hypomethylation of DNA repetitive elements in multiple myeloma 第74回日本血液学会学術集会 2012年10月19日 京都

安井 寛、石田禎夫、池田 博、青木由佳、中村勝之、丸山ゆみ子、丸山玲緒、野島正寛、林 敏昭、篠村恭久 多発性骨髄腫における新規治療薬の有効性と有害事象 - 日欧米比較研究からの検討 - 第62回日本体質医学会総会 口演 2012年11月4日 大阪

〔図書〕(計5件)

今井浩三, 安井 寛 臨床検査データブック 2015-2016

高久史磨(監修),黒川清ら編 医学書院(東京)2015;626-659(総ページ1059)

Yasui H, Ishida T, Imai K. The role of DNA methylation in the genetics and epigenetics of multiple myeloma. In: Steve Holt, editors. Multiple myeloma: risk factors, diagnosis and treatments. :Series: Cancer Etiology, Diagnosis and Treatments. Hauppauge NY: Nova Science Publishers. 2014;147-156 (総ページ249)

安井 寛, 今井浩三 抗体を用いたターゲティング 応用が広がる DDS -人体環境から農業・家電まで- 寺田弘ら編:エヌ・ティー・エヌ:2013; 38-46(総ページ529)

中村勝之, 安井 寛 E. 骨髄抑制 3. 血小板減少症 がん薬物療法の支持療法マニュアル 症状の見分け方から治療まで:鈴木賢一ら 編:南江堂:2013; 123-9(総ページ263)

安井 寛, 石田禎夫 発症機構とエピジェネティクス異常 6)多発性骨髄腫. 造血器腫瘍とエピジェネティクス-治療への応用と新たな展開-:木崎昌弘 編:医薬ジャーナル社:2012;140-148(総ページ251)

6. 研究組織

(1)研究代表者

安井 寛(YASUI, Hiroshi)
東京大学 医科学研究所・特任講師
研究者番号:40448593

(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