

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04821

研究課題名(和文)抗体薬物複合体による不安定プラークの画像診断・治療の一体化開発

研究課題名(英文)Development of antibody-drug conjugate to diagnose and treat vulnerable plaque

研究代表者

南野 哲男(MINAMINO, TETSUO)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：30379234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ジフテリア毒素の細胞内侵入メカニズムより着想を得た独創的・革新的送達技術であるHB-EGF抗体結合ベクターを用いて、薬剤・核酸(siRNAmicroRNA)・ペプチドなどを疾患部位特異的(不安定プラーク)に送達する基盤技術を開発し、世界をリードする日本発の革新的医薬品の創出に貢献する。動脈硬化部位ではHB-EGF発現が増強しており、HB-EGF抗体結合ベクターは同部位に強く集積し、標的遺伝子を特異的にノックダウンし、動脈硬化を軽減することを明らかにした。HB-EGF抗体は不安定プラークの診断・治療に有効な手段であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We have developed the new antibody against HB-EGF (anti-HB-EGF Ab) that can be internalized into the cell after binding. In atherosclerotic lesions, especially vulnerable plaque, the expression of HB-EGF markedly increased. When we administered anti-HB-EGF labeled with siRNA into severe atherosclerosis mouse model, we find that anti-HB-EGF labeled with siRNA efficiently reduced the expression of target molecules with reduced severity of atherosclerosis. Anti-HB-EGF Ab is a promising tool for the diagnosis and therapy for vulnerable plaque.

研究分野：循環器内科

キーワード：HB-EGF抗体

1. 研究開始当初の背景

冠動脈不安定プラークの破綻抑制を実現する治療法の開発は循環器領域における重要なアンメットニーズである。近年、疾患部位特異的に発現上昇した細胞膜上分子を標的とするモノクローナル抗体を用いた“抗体薬物複合体”の概念に基づく医薬品開発が注目を集めている。これは、標的分子に結合後、細胞内に取り込まれるモノクローナル抗体 (“細胞内侵入抗体”)を用いて、薬剤・核酸 (siRNA や microRNA) を疾患部位へ効率よく送達し、薬効の増加と副作用の軽減を実現する概念である。代表研究者らは、臨床サンプルを用いた検討の結果、冠動脈不安定プラークにおいて、膜結合型ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (HB-EGF) の発現が増大することを見出した (特願 PCT/JP2010/051515)。興味深いことに、膜結合型 HB-EGF は細胞増殖作用を有する分泌型 HB-EGF の前駆体であるのみならず、ジフテリア毒素が細胞内に侵入するための受容体として作用する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞内侵入が可能なヒト HB-EGF 抗体を作製し、不安定プラークの診断・治療に対する創薬基盤技術を開発し、アンメットニーズに応える革新的医薬品を創出することである。

3. 研究の方法

方法1 .ヒト不安定プラークにおける HB-EGF 発現増大

急性冠症候群剖検例から得られたヒト冠動脈不安定プラーク標本と高脂肪食を与えたヒト HB-EGF+/+:ApoE-/-マウスの動脈硬化部位における HB-EGF 発現を免疫染色法にて検討した。

方法2 .HB-EGF 抗体ベクターの作製

研究代表者らが作製した抗ヒト HB-EGF 抗体 (PCT/JP2007/061487) を用いて、核酸デリバリーに特化した HB-EGF 抗体ベクターを

作製し、以下の実験を開始した。HB-EGF 抗体ベクターは、HB-EGF 抗体に NeutrAvidin を架橋剤を介して結合することにより作製し、Protein G カラムを用いて精製した。同ベクターの解離定数は 0.83 ± 0.3 nM であり、既存の抗体医薬品を上回る優れた結合能を示した。

方法3 .HB-EGF 抗体ベクターの動脈硬化部位集積および標的分子ノックダウン効果

マウスとヒトでは HB-EGF 抗体は交差性を持たないため、研究協力者の目加田らはヒト HB-EGF ノックイン (KI) マウスを作製した。野生型マウスではジフテリア毒素に対する感受性は有さないが、ヒト HB-EGF KI マウスではジフテリア毒素に感受性を有しており、同マウスを用いたヒト HB-EGF 抗体の機能解析が可能であることが示された。最初に、動脈硬化モデルマウスである ApoE KO マウスとヒト HB-EGF KI マウスを掛け合わせ、ヒト HB-EGF+/+:ApoE-/-マウスを作製した。

次に、ターゲティングベクター内に存在する GFP を標的とした siRNA を作製し、in vitro でノックダウン効率の高い siRNA563 をフッ素化した後 (図1)

CHOP siRNAのスクリーニング

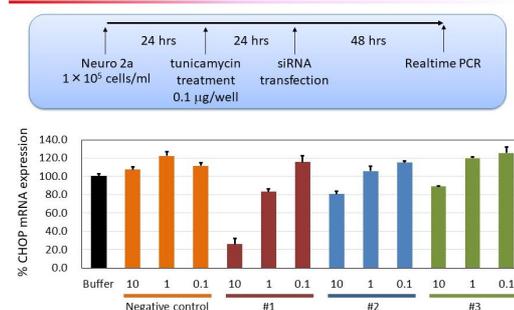


図1 . CHOP siRNA スクリーニング

HB-EGF 抗体ベクターに結合した。動脈硬化マウスモデルに siRNA 結合 HB-EGF 抗体ベクターを静脈内投与した3日後、動脈硬化が進展している大動脈基部を Laser Microdissection 法を用いて取り出し、同部位での GFP 遺伝子発現量を検討した。

方法4 .HB-EGF 抗体ベクターの動脈硬化部位集積および標的分子ノックダウン効果

小胞体ストレス発信アポトーシス C/EBP homologous protein (CHOP)は動脈硬化進展に重要な役割を果たす (Myoishi M, Minamino T, et al. Circulation 2007)。ヒト HB-EGF+/+:ApoE-/-マウス生後 8wks に高脂肪食に切り替え、27wks から siCHOP または saline を眼窩静脈叢より静脈注射した。siCHOP とベクターのモル比は 1:2.5 になるように調整し、週一回計 3 回注射後、30wks に回収した。大動脈を Oil Red 染色により、動脈硬化の面積を測定し、動脈硬化状況の評価した。

4 . 研究成果

成果1 : ヒト冠動脈サンプルにおける HB-EGF 発現増大

ヒト冠動脈プラーク破綻による急性心筋梗塞発症剖検例症例から得た冠動脈サンプルでは HB-EGF 発現が著明に増大していた(図 2)。マウス動脈硬化モデルの大動脈基部の動脈硬化進展部位において、HB-EGF 発現増大が認められた (図 3)。発現細胞はマクロファージ、血管平滑筋細胞であった。

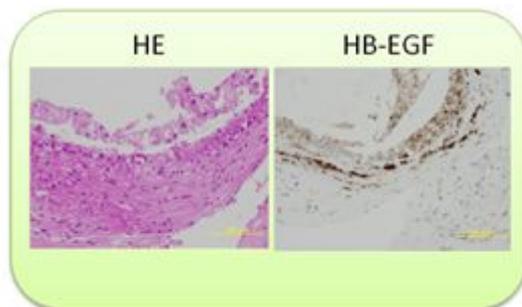


図 2 . ヒト冠動脈不安定プラークにおける HB-EGF 発現増大

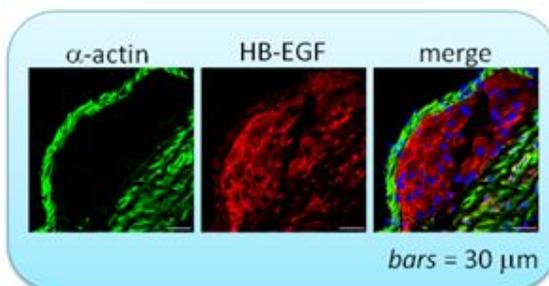


図 3 . マウス動脈硬化モデルにおける HB-EGF 発現増大

成果2 . 細胞内侵入 HB-EGF 抗体ベクター作製

HB-EGF/Luciferase 高発現 Vero (Vero-HL) 細胞を用いた検討では、HB-EGF 抗体ベクターは効率よく細胞内に取り込まれ、Luciferase 遺伝子をノックダウンすることが示された (図 4)。一方、Luciferase 高発現 Vero 細胞を用いた検討では、細胞内への取り込みは認められず、遺伝子ノックダウン効果はなかった。以上より、HB-EGF 抗体ベクターは膜型 HB-EGF に強い結合能を有し、膜型 HB-EGF を介して細胞内に侵入し、NeutrAvidin に結合した siRNA を介して細胞内遺伝子を高い効率でノックダウンすることが明らかになった。

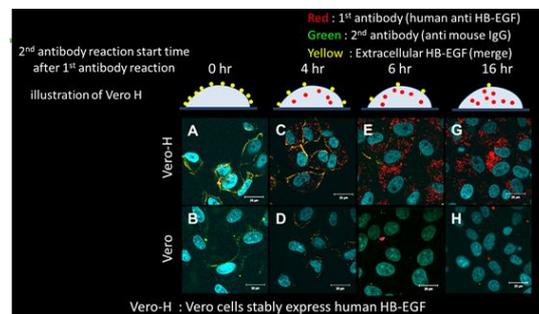


図 4 . HB-EGF 抗体ベクターは HB-EGF 発現細胞内へ侵入する

成果3 .HB-EGF 抗体ベクターの動脈硬化部位集積および標的分子ノックダウン効果

生体内で HB-EGF 抗体ベクターが機能するためには、1) 疾患部位での血管透過性亢進によるベクターの受動的集積 (passive targeting)、2) 疾患部位での HB-EGF 発現増大の二つの条件が必要である。全身静脈内投与した HB-EGF 抗体ベクターは動脈硬化モデルマウスの動脈硬化部位 (大動脈) に強く集積した。また、同部位に集積するマクロファージにおいて、ヒト HB-EGF の著しい発現増加が認められた (図 5)。以上より、HB-EGF 抗体ベクターは動脈硬化部位に集積し、同部位で発現増加が認められる HB-EGF を介する遺伝子ノックダウン効果が期待された。そこ

で、GFP 標的 siRNA 結合 HB-EGF ベクターの投与マウスでは、GFP 遺伝子発現量が低下していた。以上より、HB-EGF 抗体ベクターにより、動脈硬化部位における標的遺伝子のノックダウンが可能であることが示された。

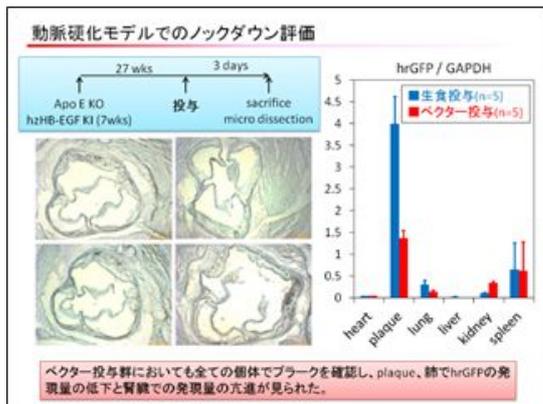


図5 .HB-EGF 抗体ベクターは動脈硬化マウスモデルにおいて標的遺伝子をノックダウンする

成果4 .siRNA(CHOP)修飾 HB-EGF 抗体ベクターによる動脈硬化抑制効果

大動脈を Oil Red 染色により、動脈硬化の面積を測定し、動脈硬化状況を評価した。siRNA(CHOP)修飾 HB-EGF 抗体ベクター投与により、粥状動脈硬化部位の面積が明らかに縮小した(図6)。

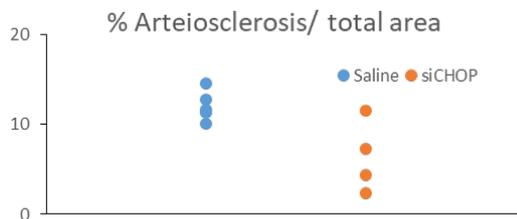
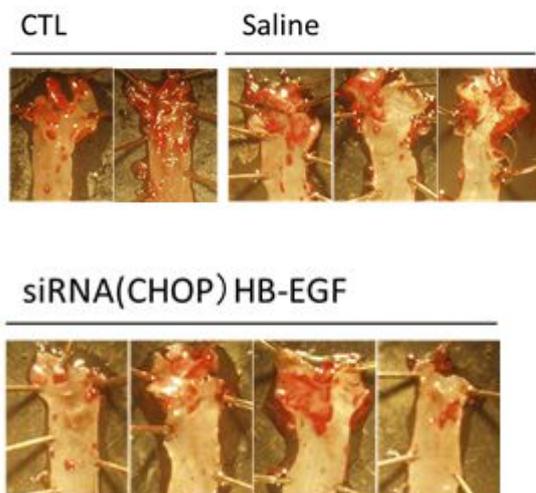


図6 . siRNA(CHOP)修飾 HB-EGF 抗体ベクターは動脈硬化を軽減する

成果のまとめ

本研究では、ジフテリア毒素の細胞内侵入メカニズムより着想を得た独創的・革新的送達技術である HB-EGF 抗体結合ベクターを用いて、薬剤・核酸 (siRNAmicroRNA)・ペプチドなどを疾患部位特異的 (不安定プラーク) に送達する基盤技術を開発し、世界をリードする日本発の革新的医薬品の創出に貢献する。動脈硬化部位では HB-EGF 発現が増強しており、HB-EGF 抗体結合ベクターは同部位に強く集積し、標的遺伝子を特異的にノックダウンし、動脈硬化を軽減することを明らかにした。

今後の展開

- 1 . siRNA(CHOP)修飾 HB-EGF 抗体ベクターによる動脈硬化抑制効果をさらに検証していく。
- 2 . 大阪大学、製薬会社との共同研究として、抗 HB-EGF 抗体を用いて、マイクロドーズ試験を予定している。ヒト HB-EGF 抗体を PET ラベルすることにより、不安定プラーク部位への集積を検討する。
- 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 2件)

1. Anti-HB-EGF antibody-mediated delivery of siRNA to atherosclerotic lesions in mice. Tsuchida S, Matsuzaki T, Yamato M, Okuda K, Fu HY, Araki R, Sanada S, Asanuma H, Asano Y, Asakura M, Hao H, Takashima S, Kitakaze M, Sakata Y, Mekada E, Minamino T. Int Heart J. (In

press)(査読あり)

なし

2. Systemic Administration of siRNA with Anti-HB-EGF Antibody-Modified Lipid Nanoparticles for the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. Okamoto A, Asai T, Hirai Y, Shimizu K, Koide H, Minamino T, Oku N. Mol Pharm. 2018;15(4):1495-1504.(査読あり)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南野 哲男 (MINAMINO, Tetsuo)
香川大学・医学部・教授
研究者番号: 30379234

(2) 研究分担者

浅井 知浩 (ASAI, Tomohiro)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号: 00381731

松崎 高志 (MATSUZAKI, Takashi)
大阪大学・医学系研究科・特任研究員
(常勤)
研究者番号: 90456939

村上 和司 (MURAKAMI, Kazushi)
香川大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 60575207

野間 貴久 (NOMA, Takahisa)
香川大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 20363202

富 海英 (Fu, Haiying)
大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)
研究者番号: 70754646

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者