

機関番号 : 23903

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21791828

研究課題名 (和文) 三重機能抗体による口腔癌の新規抗体免疫療法の開発

研究課題名 (英文) Tri-functional antibody to OSCC and complement regulatory proteins

研究代表者

今井 優樹 (IMAI MASAKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号 : 30440936

研究成果の概要 (和文) :

MUC1 特異的モノクローナル抗体は口腔癌の標的化には有効だが、抗体単独での抗体免疫療法では有効性が見られず、補体膜制御因子の発現によりその作用が抑えられていることを明らかにしてきた。そこで、補体制御因子の機能を抑えることで抗腫瘍効果が増強されるのではないかと考え、抗 MUC1 抗体と補体制御因子阻害抗体の相乗効果を検討した。補体依存性細胞障害反応において、抗 MUC1 抗体単独の場合と比較すると CD55 あるいは CD59 の機能阻害抗体を作用させた方が補体依存性細胞障害をそれぞれ約 2 倍、約 3 倍に増強した。また、口腔癌細胞を強力に破壊できる 3 つの機能を持った遺伝子組み換え三重機能抗体を作製することを試み、補体膜制御因子と阻害する部位と、MUC1 を認識する部位を持ったヒト型三重機能抗体発現ベクターを作製した。

研究成果の概要 (英文) :

We have studied the anti-tumor activities of an anti-MUC1 antibody with oral squamous cell carcinoma (OSCC). We hypothesized the inhibition of complement regulatory proteins (CRPs) could enhance anti-tumor activity. Therefore, that reversing the effects of complement regulatory proteins expressed on a tumor cell surface will allow more effective immune-mediated clearance of tumor cells and improve prospects for successful immunotherapy. When the complement-dependent cytotoxicity was compared treatment with both an anti-MUC1 mAb and inhibiting mAbs of CD55 or CD59 to an anti-MUC1 mAb alone, a 2- to 3-fold increase in C-dependent cell lysis was observed, respectively. It was also proposed to produce the tri-functional antibodies recognized both MUC1 and CRPs. We done to produce the expression vectors of tri-functional antibodies.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード : 口腔癌、抗体、免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

分子標的治療薬の代表的な物としてヒト型抗体がすでに医薬品として認可されている。抗体医薬品は抗原特異性及び親和性が高く、本来生体内に存在するため無毒で副作用が少ないのが特徴である。また、多種多様な抗原に対して高親和性持つための技術や、遺伝子組み換え技術の進歩により、多様なターゲットにも対応でき、テーラーメイド的な医薬品としても期待されている。実際、乳癌やリンパ腫の治療において多くの国で抗体医薬品がすでに認可されており、さらに他の疾患についても新たな抗体医薬品が臨床試験されている。B細胞表面のCD20を標的分子とする抗体医薬品として1999年に厚労省に認可されたリツキサンは、Hainsworthらが行った臨床試験においては奏効率73%と上昇し、うち37%がCRを示したと報告されている。この例も含め、抗体医薬品が癌の分子標的治療において有用なツールになる可能性が高いことは明らかであるが、現在までに国内外で認可された口腔癌治療のための抗体医薬品は未だないのが現状である。

近年、口腔癌において、粘液の主成分で高分子糖蛋白質ムチンMUC1が過剰発現され、その発現が癌の増殖や転移と相関していることが明らかになった。MUC1は、大腸癌、前立腺癌、乳癌など多くの癌においてその過剰発現が高頻度にみられ、MUC1の異常発現が腫瘍の増殖及び転移に寄与し、悪性度と強く相関していることから、癌の新たな分子標的治療薬の候補として注目を浴びている。

Innate Immunityの中心である補体系は、血清中と細胞膜上の30種類以上の蛋白で構成され、病原体に対する初期生体防御機構のみならず、免疫複合体やアポトーシス細胞の体内からの除去など免疫システムにおいて主要な成分の1つである。補体の腫瘍に対する免疫応答は、癌細胞に反応した抗体のFc部分によって直接補体が活性化され、膜障害複合体(MAC)形成により引き起こされる補体依存性細胞障害反応の誘導や、抗腫瘍抗体と補体の両方によりオプソニン化された腫瘍細胞に対するマクロファージやNK細胞の抗体依存性細胞障害反応を著しく増加させることが知られている。ただし、仮に体内で非特異的に抗体が結合し補体系が活性化されたとしても、正常細胞においては細胞膜上の補体制御因子CD46(MCP)、CD55(DAF)及びCD59が発現しており、補体の攻撃から守られている。しかしながら、多くの主な癌細胞においてこの補体制御因子が正常細胞よりも過剰発現していることが数多く報告されており、たとえ癌細胞に対する抗体が産生されたとしても癌細胞上では補体の活性化が起こらず、効率の良い免疫応答が誘導されにくい。

また、この癌細胞上での補体制御因子の発現増強は癌の抗体療法における薬剤耐性の1つであることが報告されている。これらの結果から口腔癌細胞上の補体制御因子を阻害することができたならば、口腔癌特異的な抗体免疫療法の効率を上昇させることができることが示唆された。しかし、補体制御因子は生体内で広く発現しているため、補体制御因子の阻害が意に沿わない重大な副作用を引き起こす可能性が高い。それ故に、口腔癌治療に補体制御因子阻害抗体を点滴などの全身投与で使用した場合では、分子標的されていないがため全身の正常細胞が補体の攻撃に曝され、著しい副作用が予測される。

## 2. 研究の目的

口腔癌治療では、形態及び機能の温存が患者にとっての精神的及び身体的負担を大きく軽減するので、副作用が非常に少なく強力な抗癌剤の開発は急務である。近年、癌細胞特異的な分子の機能や発現を制御する分子標的治療薬が医薬品として認可され、新規癌治療薬として使用されるようになったが、口腔癌治療に適応されるものは未だない。そこで、新規口腔癌治療薬を開発するため、副作用が少なく、口腔癌細胞を強力に破壊できる3つの機能を持った遺伝子組み換え三重機能抗体を作製し、その機能を解析することをこの研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 補体膜制御因子機能阻害による抗腫瘍効果の検討

抗MUC1抗体と補体制御因子阻害抗体の相乗効果を検討するため、口腔癌細胞株HSC4細胞に補体膜制御因子の機能阻害抗体を作用させた時の補体活性化の増大を、C3の沈着レベルで検討した。この際、使用した1C6と1F5は、それら自身では補体を活性化できないようにするために、Fc部分を欠失させたF(ab')<sub>2</sub>型で作用させた。さらに、補体膜制御因子機能阻害抗体の存在下で、抗MUC1抗体により活性化された補体による細胞障害反応をCell Counting Kit-8を用いてCell lysis assayを行った。

### (2) 三重機能抗体の作製

TFAは、口腔癌特異的な抗原(MUC1)に対する特異性①、補体制御因子阻害機能②、及びヒトIgG1抗体のFc部分の機能③を併せ持つ形で設計する。Fc部分を含む抗体の定常領域(constant region; CH1-3)は、将来ヒトへの応用を考え、すでに認可されている抗体医薬品のリタキシマブやハーセプチンに用いられているヒトIgG1の定常領域配列を使用する。このTFAの機能を調べるため、はじめにin vitroでTFAの口腔癌細胞に対する反

応性、Fc 部分によると補体活性化能及び補体依存性細胞障害活性(CDC)を測定し、抗 MUC1 抗体と比較検討する。また、Fc レセプター及び補体レセプターを発現しているエフェクター細胞による抗体依存性細胞障害反応(ADCC)も併せて検討する。次に、口腔癌細胞のマウス移植モデルを用いて、in vivo で TFA の口腔癌に対する特異性及び抗癌活性を検討する。

#### 4. 研究成果

(1) まず、補体初期活性化を制御している CD55 の機能阻害による抗 MUC1 抗体の補体活性化能が上昇するかどうかを検討したところ、20%ヒト新鮮血清下で、33  $\mu$ g/ml の抗 MUC1 抗体を作用させた HSC4 細胞上での C3 の沈着レベルは 59.02 であったが、同条件下で CD55 の機能阻害活性がある 1C6 F(ab')<sub>2</sub> 断片を加えると、C3 の沈着レベルが 101.48 と顕著に上昇した(図 1)。一方、抗 MUC1 抗体非存在下で 1C6 F(ab')<sub>2</sub> と 20%ヒト新鮮血清のみを作用させた HSC4 細胞上の C3 の沈着レベルは 26.52 で、20%ヒト新鮮血清のみを作用させた群(27.71)と同程度であり、補体活性化は確認できなかった。このため 1C6 処置は、抗 MUC1 抗体による補体活性化能を約 2 倍上昇させることが確認された。

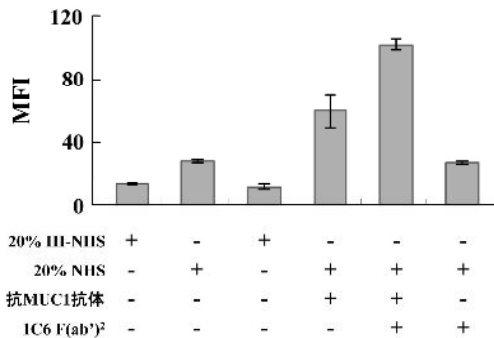


図1. CD55の機能阻害による抗MUC1抗体の補体活性化増強効果

(2) 次に、CD55 および CD59 の機能阻害による抗 MUC1 抗体の補体依存性細胞障害を検討したところ、抗 MUC1 抗体を作用させた HSC4 細胞の補体依存性細胞障害は 13.73%であったが、同条件下で CD59 の機能阻害活性がある 1F5 F(ab')<sub>2</sub> 断片を加えると、補体依存

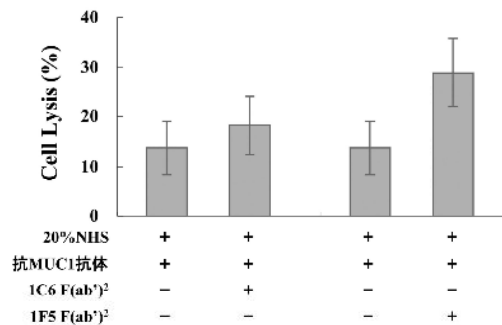


図2. CD55およびCD59の機能阻害による抗MUC1抗体の補体依存性細胞障害の増強効果

性細胞障害は 28.81%と顕著に上昇した(図 2)。一方、HSC4 細胞上で補体活性化を増大させた 1C6 F(ab')<sub>2</sub> 断片を加えた群では、18.20%と若干の上昇であった。以上のことから、補体膜制御因子を阻害すると、抗 MUC1 抗体による補体依存性細胞障害応答が増強することが確認され、CD59 の阻害のみでは約 2 倍、CD55 と CD59 の両者を阻害すると約 3 倍上昇することが明らかになった。

(3) 新規口腔癌治療薬を開発するため、副作用が少なく、口腔癌細胞を強力に破壊できる 3 つの機能を持った遺伝子組み換え三重機能抗体を作製することを試みた。まず、口腔癌に高頻度に発現する腫瘍抗原 MUC1 に対する抗体 BCP8 を産生するハイブリドーマから mRNA を単離し、cDNA を合成後、5' RACE 法により増幅した後、クローニングを行い、抗 MUC1 抗体 BCP8 の可変領域の遺伝子配列を決定した。また、三重機能抗体のもう一つの機能である、補体制御因子 CD59 の阻害機能は、CD59 機能阻害抗体 1F5 の抗原認識部位である可変領域を用いた。こちらも抗体産生ハイブリドーマから mRNA を単離し、cDNA を合成後、5' RACE 法により増幅した後、クローニングを行い、1F5 抗体の可変領域の遺伝子配列を決定することができた(図 3)。さらに、ヒト LCL 細胞より mRNA を単離し、cDNA を合成後、ヒト IgG1 の定常領域と、ヒト軽鎖である  $\kappa$  鎖の定常領域を認識するプライマーを設定して、定常領域遺伝子配列を決定した。これら決定した各種遺伝子を組み合わせ、BCP8 の可変領域 cDNA にヒト型 IgG1 抗体に組み込んだ、ヒト型抗 MUC1 抗体の重鎖発現ベクター(huBCP8H)を構築した。同様の方法で BCP8 の軽鎖配列を決定後ヒト型  $\kappa$  鎖に組み込み、ヒト型抗 MUC1 抗体の軽鎖発現ベクター(huBCP8L)を構築した。

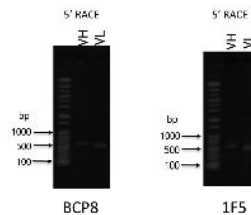


図3. 抗MUC1抗体及び抗CD59抗体の可変領域配列の決定(5' RACE法)

(4) ヒト型抗 MUC1 抗体の発現ベクター(huBCP8 及び huBCP8L)を哺乳類細胞に遺伝子導入し、培養上清を回収し、口腔癌への反応性を確認したところ MUC1 を発現している口腔癌細胞株 HSC4 へ結合することが確認できた(図 4)。

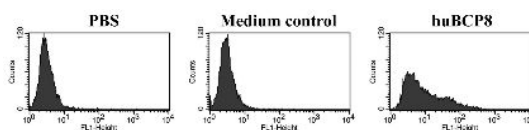


図4. ヒト型抗MUC1抗体の口腔癌細胞株HSC4への結合性の検討

(5) 次に、口腔癌細胞を強力に破壊するために、次に、補体制御因子 CD59 を阻害する 1F5 の可変領域を組み込んだ 3 つの機能を持った遺伝子組み換え三重機能抗体 (Tri-functional antibody; TFA) の一つである補体制御膜因子 CD59 を抑制し、口腔癌特異抗原 MUC1 を認識するヒト型抗体発現ベクター (huBCP8-1F5) を構築した。一方、補体制御膜因子 CD55 を阻害することができる抗体 1C6 を産生するハイブリドーマから mRNA を単離し、cDNA を合成後、5' RACE 法により増幅した後、クローニングを行い、抗体の可変領域の遺伝子配列を決定することができた。CD59 の時と同様に、各種遺伝子を組み合わせて、BCP8 の可変領域 cDNA にヒト型 IgG1 抗体に組み込み、さらに CD55 を阻害する抗体可変領域を組み込んだヒト型三重機能抗体の発現ベクター (huBCP8-1C6) を構築した。

#### 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 4 件)

- ① Ohta R, Torii Y, Imai M, Kimura H, Okada N, Ito Y, Serum concentrations of complement anaphylatoxins and proinflammatory mediators in patients with 2009 H1N1 influenza. *Microbiol. Immunol.*, 査読有 55(3):191-198 (2011)
- ② Goto T, Hussein MH, Kato S, Daoud GA, Kato T, Sugiura T, Kakita H, Nobata M, Mizuno H, Imai M, Ito T, Kato I, Suzuki S, Okada N, Togari H, Okada H, Endothelin receptor antagonist attenuates inflammatory response and prolongs the survival time in a neonatal sepsis model. *Intens Care Med.*, 査読有 36(12):2132-2139 (2010)
- ③ Asai S, Kimbara N, Tada T, Imai M, Campbell W, Okada H, Okada N, Procarboxypeptidase R Deficiency Causes Increased Lethality in Concanavalin A -induced Hepatitis in Female Mice. *Biol Pharm Bull.*, 査読有 33:1256-1259 (2010)
- ④ Mizutani M, Ito Y, Mizuno M, Nishimura H, Suzuki Y, Hattori R, Matsukawa Y, Imai M, Oliver N, Goldschmeding R, Aten J, Krediet RT, Yuzawa Y, Matsuo S, Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is increased in peritoneal dialysis patients with high peritoneal solute transport rate. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 査読有 298: F721-733 (2010)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 太田里永子, 伊藤嘉規, 鳥居ゆか, 木村宏, 岡田則子, 今井優樹, 新型 H1N1 インフルエンザの重症化における補体アナフィラトキシンの関与. 第 47 回補体シンポジウム抄録集, 2010: 2010 年 9 月 10-11 日、福島
- ② Asai S, Imai M, Kimbara N, Tada T, Campbell W, Okada H, Okada N, Procarboxypeptidase R Deficiency Causes Increased Lethality in Concanavalin A -induced Hepatitis in Female Mice. XXIII International Complement Workshop, August 1st-5th, 2010, New York, NY, USA,
- ③ Imai M, Varela JC, Atkinson C, Ohta R, Okada N, Rapisardo M, Tomlinson S, Modulation of protective T cell immunity by complement inhibitor expression on tumor cells. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会記録, 2009: 123. 2009 年 12 月 2-4 日, 大阪
- ④ 太田里永子, 今井優樹, Characterization of CTL downmodulation in patients with Chronic Active EpsteinBarr virus Infection (CAEBV). 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会記録, 2009: 246. 2009 年 12 月 2-4 日, 大阪
- ⑤ Hussein MH, Kato S, Goto T, Daoud GAH, Kato I, Suzuki S, Togari H, Hashimoto T, Imai M, Okada N, Okada H. An acetylated anti-C5a complementary peptide reduced cytokines and free radicals and prolongs survival time in a neonatal sepsis model. 12th European Meeting on Complement in Human Disease, September 5th - 8th, 2009, Visegrád, Hungary
- ⑥ 今井優樹, Varela JC, Atkinson C, 太田里永子, 岡田則子, Rapisardo M, Tomlinson S, 腫瘍細胞上の補体制御因子による T 細胞応答の制御. 第 46 回補体シンポジウム抄録集, 2009: 24, 2009 年 8 月 21-22 日, 福岡

[図書] (計 1 件)

- ① 大井洋之, 他、メジカルビュー社「補体への招待」共著、基礎編「後期経路」、p26-38,

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 優樹 (IMAI MASAKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 30440936