

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17016059

研究課題名（和文） 腫瘍の特異的標的化を目指した遺伝子治療法の開発

研究課題名（英文） Selective targeted drug and gene delivery for cancer treatment

研究代表者

濱田 洋文 (HAMADA HIROHUMI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：00189614

研究成果の概要（和文）： 標的抗原の系統的探索を目指して、抗体の Fc ドメインに結合する Z33 モチーフを含むファイバー変異型 Adv-FZ33 アデノウイルスを用いて、抗体を介して腫瘍細胞への高いウイルス感染効率が得られる標的分子・抗体セットのパネル（約 60 種の抗原）を得た。また、標的化抗体にタンパク合成阻害トキシンを結合させてイミュノトキシン（iTox）を作製する EZiTox 系を樹立し、難治性がんの新しい抗体医薬 iTox 治療樹立がを目指している。

研究成果の概要（英文）： In order to systematically search for the target molecules for cancer gene therapy, we generated a fiber-modified recombinant adenovirus, Adv-FZ33, which contains a Z33 domain with a high affinity for immunoglobulin Fc. By screening with Adv-FZ33, we established a large number of high affinity targeting antibodies (Ab), and identified their target antigen (Ag) molecules, e.g., a panel of 60 Ag species. During these efforts, we also established a unique method (EZiTox) to generate immunotoxins (iTox), which consists of the targeting Ab conjugated with ribosome-inactivating enzyme toxins. EZiTox method will be a strong screening method to find a powerful combination of Ag/Ab for cancer iTox-chemotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	14,900,000	0	14,900,000
2006 年度	15,500,000	0	15,500,000
2007 年度	15,500,000	0	15,500,000
2008 年度	15,500,000	0	15,500,000
2009 年度	15,500,000	0	15,500,000
総計	76,900,000	0	76,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：遺伝子治療、アデノウイルスベクター、モノクローナル抗体、標的化抗体、標的化遺伝子導入、膀胱癌、悪性黒色腫、前立腺癌

1. 研究開始当初の背景

癌をはじめとする難病の治療法の開発を進めてゆく上でもっとも重要なポイントは、標的組織細胞に選択的な治療薬（遺伝子製剤など）の投与を可能とする効果的な方法を編み出すことである。私たちはアデノウイルスを「がん標的化ベクター」のモデル系として用い、難治性がんの細胞表面に存在する候補標的分子を探索することにより、標的化遺伝子治療法の開発を目指している。具体的には、抗体のFcドメインに結合するProtein AのZ33モチーフを含むファイバー変異型アデノウイルス Adv-FZ33 を用いて、アデノウイルスと腫瘍細胞とをモノクローナル抗体で架橋することによって遺伝子導入効率が高まるようなターゲット分子の探索系を樹立した。図はその概念を示したものである。

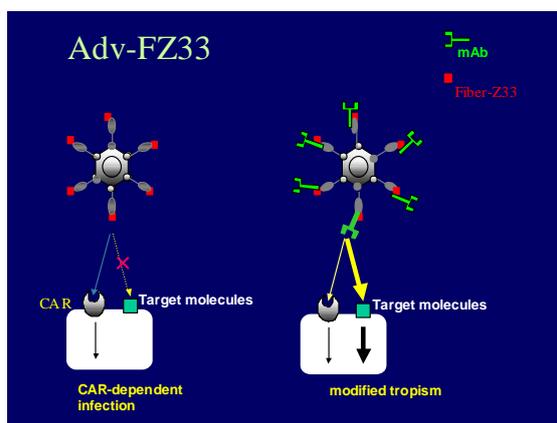


図 スーパー標的抗体 (Staab) スクリーニングの概念図。抗体を黄色ブドウ球菌 Protein A 由来の Z33 モチーフでアデノウイルスと結合させ、抗体を介した遺伝子導入発現量を測定する (Z33 遺伝子導入発現アッセイ)。高い標的化能をもつ抗体を定量的に選別できる。

2. 研究の目的

腫瘍細胞と Z33 ファイバー変異アデノウイルスとを架橋することによって遺伝子導入効率が高まるモノクローナル抗体をスクリーニングすることにより、腫瘍細胞に対して標的化の可能な表面分子と抗体の組み合わせの探索を行い、新規標的化遺伝子治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 膀胱癌・前立腺癌・悪性黒色腫に対するさらに数多くの標的化抗体スクリーニングを行なう。上記に加えて他種の難治性腫瘍、とくに乳癌・卵巣癌・肺癌（悪性中皮腫を含む）などに対するモノクローナル抗体のライブラリーをスクリーニングし、各種難治腫瘍に対して選択的標的化の候補となる新しい表面分子の同定を試みる。さらに、これらの標的化可能な新規の遺伝子導入システムを活用して、選択的かつ高い治療効果を得ることを目的として基盤研究を行う。

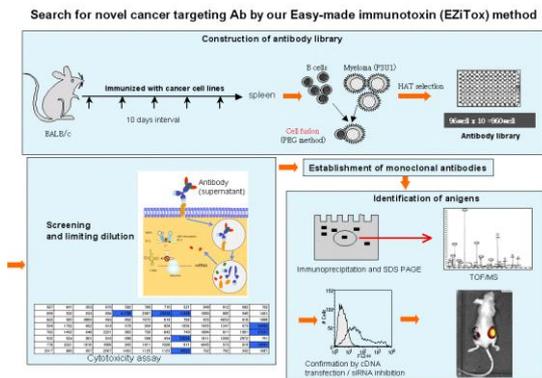
(2) 具体的な方法

注目する腫瘍細胞でマウスを免疫し、腫瘍に対するモノクローナル抗体のライブラリーを作製した。抗体のFcドメインに結合するZ33モチーフを含むファイバー変異 Adv-FZ33 を用いて、抗体を介した遺伝子導入発現量を測定し (Z33 遺伝子導入発現アッセイ)、高い標的化能をもつ抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。免疫沈降して得た抗原のバンドを切り出し、質量分析により、抗体で認

識されるターゲット分子を同定した。当該分子をコードする cDNA の強制発現細胞を用いて、抗体の結合特異性を確認した。手術摘出臨床検体組織での標的候補分子の発現を免疫組織染色法によって検討した。

(3) EZiTox 系の方法

下の図はイーザーメイドイミュノトキシン (EZiTox) 法を用いた標的抗体樹立の方法と、対応する抗原の同定と特異性の確認など、実験の一連の流れを示す概念図である。



注目する腫瘍細胞でマウスを免疫し、腫瘍に対するモノクローン抗体のライブラリーを作製する。EZiTox 系でのスクリーニング：抗体の Fc に結合する Protein G の C ドメイン三個 (3C) を含むジフテリアトキシン (DT) 融合タンパク (DT3C) を用いて、抗体とトキシンとを簡便に架橋する (EZiTox 法)。これを用いてトキシンによる細胞毒性が特段に高い抗体を選別する。免疫沈降・質量分析により、抗体で認識される抗原分子の同定をおこなう。腫瘍細胞に対して選択的治療効果が期待できる標的化分子候補に関して、実用化に必要な解析を進める。

4. 研究成果

(1) アデノウイルス (Adv-FZ33) 標的化による標的分子の系統的探索 難治がんの治療法の開発にとって「選択的な治療薬剤の導入」の戦略を編み出すことが鍵である。私た

ちは、腫瘍の標的化に好適な表面抗原はどのような分子か?という疑問に答えることを目指して、プロテインA由来の抗体結合 Z33 モチーフを Ad5 ファイバーノブ内の HI ループに持つアデノウイルス Adv-FZ33 を作製し、抗体を介した細胞への遺伝子導入発現量を測定し、高い標的化能をもつ抗体を選別した。

腫瘍標的化のターゲットの探索に関して、以下のような成果を得た。

抗体を介した Adv-FZ33 遺伝子導入効率に関して、同一の抗原分子を認識するさまざまな異なった抗体間で比較すると、驚くほど大きな効果差が見られた。たとえば、各種の抗 CEA 抗体を Adv-FZ33 遺伝子導入発現法で比較すると、最も優れた C2-45 抗体は、他の CEA 抗体よりも 100 倍以上優れた標的化能を示した (Tanaka et al. Clin. Cancer Res. 2006)。

Adv-FZ33 の抗体を介した細胞への遺伝子導入発現量を測定し、高い標的化能をもつ抗体を選別した。ヒト悪性黒色腫・前立腺癌・膵癌などに対し計 600 種の高効率標的化抗体を樹立し、現在までに約 60 種の抗原を同定できた。結果のまとめを表に示す。その中には、十数種の既知のウイルス受容体 (CD9、CD13、CD46、CD54、CD155、MHC class I & II、各種 CAM・インテグリンなど) があつた。ほかに、EGFR や CD20 などすでに抗体医薬として腫瘍の標的治療に用いられているもの、あるいは CD44、CD71、CA12、EpCAM、TROP2、MCSF、CD146、CD228、PSMA、CEA など腫瘍標的治療の候補分子として注目され臨床開発途上のものが、高い比率で含まれており、当方法は強力な標的分子スクリーニング手段となることがわかつた。

Staab, Summary 365/573 (Sept. 16, 2009)						
	Ag	Ab number	Ag	Ab number		
	1	Integrins	53	28	MHC classII	2
	2	CD9	29	29	CD54(ICAM1)	5
	3	MHC classI	23	30	CD61	3
	4	CD276	23	31	TMEM2	3
	5	EpCAM	20	32	TROP2	3
	6	CD147	19	33	CD63(ICAM3)	2
	7	CD65	18	34	IGF1R	2
	8	CD98hc	14	35	L1CAM	2
	9	CD71	13	36	Prion Protein	2
	10	CEACAMs	13	37	EGFR	2
	11	Na/K-ATPases	10	38	CD61	2
	12	CD69	12	39	Annexin II	1
	13	CD46	9	40	CAI 2	1
	14	CD146	8	41	CD151	1
	15	CD109	7	42	CD30	1
	16	EphA2	7	43	CD228	1
	17	CD44	6	44	CD82	1
	18	PSMA	6	45	CD99	1
	19	MCSF	5	46	E-cadherin	1
	20	CD73	5	47	HAI-1	1
	21	ADAM10	4	48	JAM3	1
	22	IL13Ra2	4	49	NCAM2	1
	23	CD155	4	50	FRS3	1
	24	CD10	3	51	PTGFRN	1
	25	CD105	3	52	SCAR1B1	1
	26	CD13	3	53	Thy1	1
	27	CD82(F11R)	3			
						365/573

私たちのスクリーニング方法は、標的化治療に必要な資質をすべて併せ持つ「スーパー標的 Super-target とスーパー抗体 ab のセット (Staab)」を同定・樹立できることが、大きなアドバンテージである。類似技術 (たとえば FACS アッセイなど) と比べて特段にダイナミックレンジの広い、優れた抗体を見分けられるユニークな方法となった。

得られた標的化抗原 (PAP2a, IL13Ra2) による新しい診断治療法の特許 2 件など、順調に成果を挙げてきた。また、当研究で得られた抗体に関して、国内の製薬企業 2 社と癌治療抗体医薬としての共同開発研究 2 件を進めている。

Efficient gene transfer via target molecules: A list of representatives ...

Tumor-targeting markers	General markers
<ul style="list-style-type: none"> •CD20 (B1 antigen) •EGFR (Epidermal growth factor receptor) •IGF1R •CD44 •EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) •TROP2 •EphA2 •L1CAM •CEACAMs (Carcinoembryonic antigens) •MCSF (Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan) •CD146 (Melanoma cell adhesion molecule) •CD228 (melanotransferrin) •PSMA (Prostate specific membrane antigen) •CD10 (CALLA) •CD71 (Transferrin receptor) •CD109 (r150) •CD99 (MIC2) •CD147 (EMMPRIN) •CA12 (Carbonic anhydrase XII) •CD276 (B7-H3) •PAP2a (Phosphatidic acid phosphatase 2a) •IL13Ra2 (as a melanoma antigen) 	<ul style="list-style-type: none"> •CD9 •CD13 •CD46 •CD54 •CD55 •CD61 •CD155 •SCAR1B1 •CEACAMs <p>Adhesion molecules</p> <ul style="list-style-type: none"> •Integrin a, b •CD321 •CD82 <p>Transporters</p> <ul style="list-style-type: none"> •CD98 •CD298 (Na-K ATPase b3)

抗原分子の同定のみにとどまらず、同時に極めてアフィニティの高い抗体 (スーパー標的抗体 Staab) が複数得られ、従来よりも 100 倍以上高感度の ELISA 検出法を樹立することもできた。

標的候補分子 PAP2a を同定し、これを認識する高性能抗体 S11、T13 の二つを得た。手術摘出サンプルの免疫組織染色から、PAP2a は膵癌 (ductal adenocarcinoma) では、ほぼ全例 (20 例中 20 例) で発現が高く、PAP2a 弱陽性・陰性の正常細胞とは、容易に染め分けられた。抗 PAP2a 抗体 S11 を用いることにより、ヒト膵癌細胞に対する Adv-FZ33 アデノウイルスの遺伝子導入効率を著明に (70 倍)、しかも腫瘍選択的に高めることができた。PAP2a 抗原は、正常肝組織や間質組織などには発現せず、選択的な治療薬剤投与 (遺伝子導入) による膵癌標的治療に有望である。さらに、外科手術サンプルの S11 免疫組織染色により、著明に高い PAP2a 発現が前立腺癌で認められ、前立腺癌の診断や治療への応用も有望となってきた。

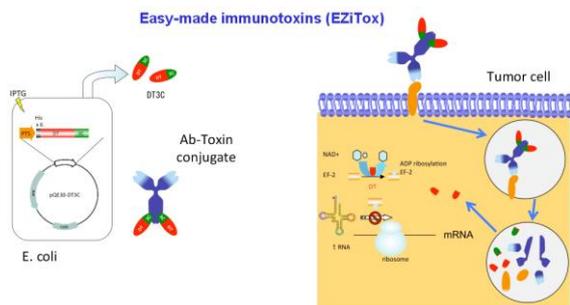
メラノーマの標的化に高い効率を示す抗体 Ab66 の抗原としてサイトカイン IL13 受容体 (IL13Ra2, cancer-testis Ag) を同定した。これは新規メラノーマ抗原であり、難治性のメラノーマに対する標的治療法の可能性が開けた (特許出願済)。同抗原をホルマリン固定パラフィン包埋組織標本で安直に染めることのできる抗体を自作し、臨床手術標本を用いた解析が可能となった。

標的抗原の発現に関する個別診断と Staab 抗体を介した選択的遺伝子導入を組み合わせ、各種の難治進行癌に対する効果的な標的化治療法の開発を進めていく予定である。

(2) iTox 法

この研究の過程で、私たちは、標的化抗体にタンパク合成阻害トキシンを結合させてイミュノトキシン (以下 iTox と略す) を作製する簡便な系を樹立し、EZiTox と名付けた。プロテイン G 由来の抗体結合ドメイン 3C を持つジフテリアトキシン DT3C を大腸菌で作

り、これ (DT3C) を用いて細胞毒性効果を指標に好適な抗体をスクリーニングする系である。



これを用いて細胞傷害活性を調べたところ、肺がんや乳がんなどで高い発現を示す TAg2 を標的化する A*抗体が、抗 EpCAM 抗体に比して数百倍の iTox 活性を示した。A*抗体は、同じ抗原の異なったエピトープを認識している他の抗 TAg2 抗体と比べて 100 倍以上、抗トランスフェリン受容体抗体と比べて 30 倍以上、と肺がんに対して極めて高い iTox 活性を示し、非常に有望であることを見いだした。今までの結果から、1) アデノウイルスの標的化に高効率な標的であっても、その中のごく一部の標的だけが iTox として有効であること、2) さらにその標的抗原に対する抗体のうちでも、高いアフィニティに加え、好適なエピトープ特性をもつことが iTox 活性に必須であること、を見いだした。

現在 iTox に関しては国内外で多くの研究が重ねられているが、標的抗原は (EpCAM などのように) iTox に適しているという直接的な実験証拠から選ばれた分子ではなく、抗体は ELISA など別の選別法で得られたものが流用されている。このため、臨床に使える優れた iTox 活性の得られるものは稀であり、多くの iTox 開発は世界的に見ても行き詰まっている状況である。当研究の EZiTox 法は、標的化治療をシミュレートした、iTox 作製に好適な抗体を得るための直接的な選別法であり、iTox に使用するために特に優れた標的

抗原・抗体をセットで選ぶことができる。私たち独自開発のユニークな系であり、系統的に進めてゆくことによって、難治性がんの新しい抗体医薬候補としてきわめて有望な iTox 抗体の樹立が期待できる。

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 59 件)

- ①Huang J, Inoue M, Hasegawa M, Tomihara K, Tanaka T, Chen J, Hamada H. Sendai viral vector mediated angiopoietin-1 gene transfer for experimental ischemic limb disease. *Angiogenesis*, 12(3): 243-249, 2009, 査読有.
- ②Ishii K, Nakamura K, Kawaguchi S, Li R, Hirai S, Sakuragi N, Wada T, Kato K, Yamashita T, Hamada H. Selective gene transfer into neurons via Na,K-ATPase beta1. Targeting gene transfer with monoclonal antibody and adenovirus vector. *J. Gene Med.*, 10(6):597-609, 2008, 査読有.
- ③Tomihara K, Kato K, Masuta Y, Nakamura K, Uchida H, Sasaki K, Tanaka T, Huang J, Hiratsuka H, Hamada H. Gene transfer of CD40-ligand to dendritic cells stimulates interferon- γ production to induce growth arrest and apoptosis of tumor cells. *Gene Therapy*, 15: 203-213, 2008, 査読有.
- ④Wakayama M, Abei M, Kawashima R, Seo E, Fukuda K, Uqai H, Murata T, Tanaka N, Hyodo I, Hamada H, Yokoyama K. E1A, E1B double-restricted adenovirus with RGD-fiber modification exhibits enhanced oncolysis for CAR-deficient biliary cancers. *Clin. Cancer Res.*, 13(10): 3043-3050, 2007, 査読有.
- ⑤Masuta Y, Kato K, Tomihara K, Nakamura K, Sasaki K, Takahashi S, Hamada H. Gene transfer of noncleavable cell surface mutants of human CD154 induces the immune response and diminishes systemic inflammatory reactions. *J. Immunother.*, 30(7): 694-704, 2007, 査読有.
- ⑥Tomihara K, Kato K, Masuta Y, Nakamura K, Tanaka T, Hiratsuka H, Hamada H. Gene transfer of the CD40-ligand to human dendritic cells induces NK-mediated antitumor effects against human carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 120(7): 1491-1498, 2007, 査読有.
- ⑦Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, Akazawa H, Tateno K,

Kayama Y, Harada M, Shimizu I, Asahara T, Hamada H, Tomita S, Molkenstein JD, Zou Y, Komuro I. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. Nature, 446(7134): 444-448, 2007, 査読有.

⑧ Tanaka T, Huang J, Hirai S, Kuroki M, Watanabe N, Tomihara K, Kato K and Hamada H. Carcinoembryonic antigen targeted selective gene therapy for gastric cancer through FZ33 fiber-modified adenovirus vectors. Clinical Cancer Research, 12(12): 3803-3813, 2006, 査読有.

⑨ Tsuda H, Wada T, Yamashita T, Hamada H. Enhanced osteoinduction by mesenchymal stem cells transfected with a fiber-mutant adenoviral BMP2 gene. J. Gene Med., 7(10): 1322-1334, 2005, 査読有.

⑩ Seo E, Abei M, Wakayama M, Fukuda K, Ugai H, Murata T, Todoroki T, Matsuzaki Y, Tanaka N, Hamada H, Yokoyama K. Effective gene therapy of biliary tract cancers by a conditionally replicative adenovirus expressing uracil phosphoribosyltransferase: significance of timing of 5-fluorouracil administration. Cancer Res., 65(2): 546-552, 2005, 査読有.

⑪ Huang J, Nakamura K, Ito Y, Uzuka T, Morikawa M, Hirai S, Tomihara K, Tanaka T, Masuta Y, Ishii K, Kato K, Hamada H. Bcl-xL gene transfer inhibits Bax translocation and prolongs cardiac cold preservation time in rat. Circulation, 112(1): 76-83, 2005, 査読有.

⑫ Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, Kawano Y, Ishii K, Kobune M, Hirai S, Uchida H, Sasaki K, Ito Y, Kato K, Honmou O, Houkin K, Date I, Hamada H. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. Mol. Ther., 11(1): 96-104, 2005, 査読有.

[学会発表] (計 8 件)

① 濱田洋文、「腫瘍標的遺伝子治療」、第 68 回日本癌学会学術総会教育講演 モーニングレクチャー、2009 年 10 月 2 日、横浜

② 濱田洋文、「膵がんに対する遺伝子治療の展望」、第 68 回日本癌学会学術総会 シンポジウム、2009 年 10 月 1 日、横浜

③ 濱田洋文、「腫瘍の特異的標的化を目指した遺伝子治療法の開発」第 3 次対がん 10 年総合戦略、第 2 回合同シンポジウム、2008 年 2 月 28 日、東京

④ 濱田洋文、臓器がんー膵癌 「新たな膵癌抗原の探索」、日本癌学会総会シンポジウム、2006 年 9 月 30 日、横浜

⑤ 濱田洋文、遺伝子治療 現状と近未来 腫瘍の標的化を目指した遺伝子治療の開発、日本癌学会総会教育講演、2005 年 9 月 16

日、札幌

[図書] (計 1 件)

Hamada H, Imperial College Pres, Stem Cell Repair and Regeneration, pp117-138, 2005.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 抗 CEA 抗体を用いた標的化遺伝子治療
発明者: 濱田洋文、田中俊裕、加藤和則ら
権利者: 札幌医大
種類: 特許
番号: 特願 2005-208800
出願年月日: 平成 19 年 7 月 19 日
国内外の別: 国内

名称: IL-13Ra2 に対する抗体およびこれを含む診断・治療薬
発明者: 濱田洋文、加藤和則、中村公則
権利者: 札幌医大
種類: 特許
番号: 特願 2007-147478
出願年月日: 平成 21 年 6 月 1 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: PAP2a に対する抗体ならびにその診断的および治療的使用
発明者: 濱田洋文、加藤和則、中村公則
権利者: 札幌医大
種類: 特許
番号: PCT/JP2006/310406
取得年月日: 平成 20 年 3 月 21 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 洋文 (HAMADA HIROHUMI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00189614

(2) 研究分担者

加藤 和則 (KATO KAZUNORI)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 60233780
中村 公則 (NAKAMURA KIMINORI)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 80381276
濱 進 (HAMA SUSUMU)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60438041
山口 美樹 (YAMAGUCHI MIKI)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号: 10530454