

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月11日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590853

研究課題名（和文） 三重特異性抗体を用いた進行肝細胞癌に対する治療法の確立

研究課題名（英文） Establishment of a treatment for advanced hepatocellular carcinoma using a tri-functional specific antibody

研究代表者

佐々木 茂（SASAKI SHIGERU）

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：10305229

研究成果の概要（和文）：われわれは治療法の全く確立していない進行肝細胞癌に対して、理想的な治療薬としての抗体医薬の開発を目的として本研究を行ってきた。われわれは、これまでヒト肝癌細胞において、Interferon（IFN） $\alpha/\beta$ 投与により fibroblast growth factor receptor-1（以下 FGFR-1）の過剰発現が生じることを明らかにしてきた。これをふまえ、FGFR-1に対するモノクローナル抗体（以下 MoAb）をいくつか作成した。われわれはヒト肝がん細胞に対する抗 FGFR-1 抗体と IFN  $\alpha/\beta$ 併用療法の *in vitro* および *in vivo* における有用性を明らかにしてきた。本研究では、この抗体治療がより強力な抗癌効果を発揮するように、この抗体に分子改変を加え、三重特異性抗体を確立した。

研究成果の概要（英文）：For advanced hepatocellular carcinoma has not been established at all treatments, we've been doing this research for the purpose of development of therapeutic antibodies as ideal therapeutic agents. We have shown that interferon（IFN）- $\alpha/\beta$  induced the up-regulation of fibroblast growth factor receptor-1（FGFR-1）expression in several human liver cancer cells. Based on this result, we have created several anti-FGFR-1 monoclonal antibodies（MoAbs）. We revealed that the efficacy of combined treatment with anti-FGFR-1 MoAb and interferon- $\alpha/\beta$  in human liver cancer cells *in vitro* and *in vivo*. The aim of this antibody therapy is more potent anti-cancer effects, we performed molecular alterations of this antibody, and established a tri-functional specific antibody in this study.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,200,000 | 660,000   | 2,860,000 |
| 2010年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 2011年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は現在、残念ながら本邦において癌の死因の第3位に位置し、また世界的に見ても癌の死因の高位に位置している。一方、内科および外科治療の進歩によって、肝細胞癌に対する局所制御能は格段の進歩を示してきている。単発かつ腫瘍径の小さい早期の肝細胞癌で肝予備能力が維持されている場合には、肝切除術、経皮治療あるいは経カテーテル治療を組み合わせた集学的治療によって予後も徐々に改善されてきている。しかしながら、進行した肝細胞癌においては、十分な予後の改善が得られていないのが現状である。この進行肝細胞癌の予後の改善が十分でない理由として、肝臓がすでに、治療による肝の損傷に耐えられない状況になっていることがあげられる。肝細胞癌の発生時、多くはすでに肝硬変となっており、予備能力は低下しているわけであるが、これにさらに肝細胞癌の進展に特徴的な「門脈浸潤」が生じた場合、主要な血液の供給を絶たれることになり、肝予備能力の著しい低下が生じ、癌に対する治療が困難となってしまうことが多い。また、肝細胞癌のもう一つの特徴である「多中心性発癌」も治療法選択を非常に狭める要因となっていて、このような状況から、進行した肝細胞癌では、一般的な抗癌剤の動注療法以外に治療法はなく、それでも肝臓への負担は少なからず生じてしまうため、結局、無治療となってしまうことが多い状況となっている。進行肝細胞癌に対する治療として、われわれが理論的にその有用性を明

らかにした IFN $\alpha$ / $\beta$ 併用 5FU 動脈内注入療法は画期的な治療法ではあるが (Nature 424: 516-523, 2003)、この治療法の十分な遂行においてさえ、肝予備能力の十分な維持が必須である。

一方、fibroblast growth factor receptor-1 (以下 FGFR-1) は、肝細胞癌において、発現されていることが報告され、その進展に関与していることが知られている。われわれのこれまでの検討では *in vitro* および *in vivo* のいずれにおいても肝癌細胞において、IFN $\alpha$ / $\beta$  の投与により FGFR-1 がさらに過剰発現されることをすでに見出している (特許申請済み)。この FGFR-1 は非癌肝細胞には発現されていないこと、また、FGFR-1 を介した刺激は細胞増殖および細胞浸潤、さらに血管新生に関与していることが報告されている。

このような背景から、この IFN $\alpha$ / $\beta$  と抗 FGFR-1 抗体を併用することで、非癌肝細胞には影響を与えず、すなわち肝予備能力の低下を引き起こさずに、肝癌細胞の増殖抑制、血管新生阻害、さらには、予後規定因子である門脈内浸潤の抑制が可能になることが予想される。これらのことは、FGFR-1 が抗体療法の標的として、最適であることを示している。また、いくつかの癌種において、この FGFR-1 を介した細胞死は p53 を介さない細胞死を誘導することも報告されている。このことは p53 を介したアポトーシス誘導が作用機序の一つと考えられる IFN $\alpha$ / $\beta$  併用 5FU 療法に対して効果の乏しい症例に対しても有効性が高く期待されることを意味し

ており、この点からも IFN $\alpha/\beta$ に抗 FGFR-1 抗体を併用することに大きな意義があると考えられる。以上のことから、われわれは、この FGFR-1 に対するモノクローナル抗体を作成した。われわれのこれまでの研究において、ヒト肝癌細胞に IFN  $\alpha/\beta$  を投与し、FGFR1 を過剰発現させ、作成した抗 FGFR-1 モノクローナル抗体を投与したところ、*in vitro* および *in vivo* において著明な抗癌効果が認められた。

## 2. 研究の目的

今回の申請では、この抗 FGFR-1 モノクローナル抗体の実際の臨床応用に向けて、さらに抗癌効果を高めることを目的に、作成した抗体の分子改変を行い、まず主要組織適合遺伝子複合体 (Major histocompatibility complex: MHC) 非拘束性に細胞障害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) の活性化をめざし、特異的に CD3 に結合させることを目的として、CD3 に対する抗体の可変領域および抗 FGFR-1 モノクローナル抗体の可変領域とを用い、これらにさらに、抗体依存性細胞障害作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) の誘導能の向上を目的に、ヒト IgG の Fc 領域を結合させた三重特異性抗体の作成を行い、その抗癌効果の増強を検討したい。二つの異なる抗原を近接させることによる免疫作用の増強効果を期待し、さらに Fc 領域を結合させることで、より一層の抗腫瘍免疫の増強も期待されることから臨床応用に向けて大きな前進が図られると考える。

## 3. 研究の方法

抗 FGFR-1 モノクローナル抗体および抗 CD3 モノクローナル抗体はすでに作成して

あり (抗 FGFR-1 抗体に関しては、すでに抗腫瘍効果を確認している)、これらの  $V_H$  および  $V_L$  を用いて、抗 FGFR-1 および抗 CD3 bispecific 抗体を作成し、これにヒト Fc を結合させる。次に、これを用いて、抗癌効果を *in vitro* および *in vivo* で検討する。その効果の作用機序に関して、DNA アレイを用いて、アポトーシスおよび ADCC の増強を意識した免疫関連の遺伝子の動きについて検討を加える。これまで肝細胞癌に対して用いられてきた各種抗癌剤による抗腫瘍効果との相違に関して検討を加え、臨床試験への進展を期する。

## 4. 研究成果

### 1) 塩基配列取得

すでに作成したマウス抗 FGFR-1 抗体発現 Hybridoma から mRNA を抽出し、5' RACE 法を用いて重鎖可変領域 ( $V_H$ ) と軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) の DNA 塩基配列を取得した。

### 2) ベクターへの組み込み

取得した  $V_H$  および  $V_L$  の CDR の DNA 塩基配列を所定の制限酵素サイトを付加したプライマーにて PCR 法により増幅させた後にすでに確立した三重特異性抗体動物細胞発現用ベクターに組み込んだ。一方のベクターにはヒト免疫グロブリン  $\gamma 1$  定常領域 cDNA と抗ヒト CD3 モノクローナル抗体である OKT3 由来ヒト化  $V_L$  配列も組み込まれており、このベクターに抗 FGFR-1 抗体由来のヒト化  $V_H$  を組み込んだ。もう一方にはヒト免疫グロブリン kappa 定常領域 cDNA と OKT3 由来ヒト化  $V_H$  が組み込まれており、このベクターに抗 FGFR-1 抗体由来のヒト化  $V_L$  を組み込んだ。

### 3) 取得した抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性抗体の安定性検討

構築した 2 つのベクターを動物細胞にて共発現させて抗体を取得し、結合活性を検討

し、安定した抗体の取得に成功した。

4) 抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性抗体の ADCC 活性などの検討

精製した抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性抗体の活性に関する検討を行った。ADCC 活性についてはヒト PBMC を用い、FGFR-1 発現腫瘍細胞の細胞増殖率を MTS アッセイと LDH アッセイにて測定した。結果としては、ADCC および細胞増殖抑制効果において残念ながら、十分な効果は得られなかった。現在、この原因として、作成した抗体の安定性の不足がその原因として最も考えられ、さらに、安定性を高めるため、抗体の構造改変を行っている。

#### 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 1 件)

- ① Sasaki S, Ishida T, Toyota M, Ota A, Suzuki H, Takaoka A, Yasui H, Yamamoto H, Takagi H, Maeda M, Seito T, Tsujisaki M, Shinomura Y, Imai K. Interferon- $\alpha/\beta$  and anti-fibroblast growth factor receptor 1 monoclonal antibody suppress hepatic cancer cells in vitro and in vivo. PLoS One. 査読有 2011 May 9;6(5):e19618.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 佐々木 茂 肝細胞がんに対する IFN および抗 FGFR1 抗体併用新規治療法の開発 第 97 回日本消化器病学会総会 2011. 5. 13 東京
- ② 佐々木 茂 肝細胞がんに対する IFN および抗 FGFR1 抗体を用いた新規抗体治療法の開発 第 48 回日本癌治療学会学術集会 2010. 10. 29 京都
- ③ 佐々木 茂 肝細胞がんに対する IFN および抗 FGFR1 抗体を用いた新規抗体治療法の開発 第 47 回日本消化器免疫学会総会 2010. 7. 8 大津
- ④ 佐々木 茂 FGFR1 を標的とした肝細胞がんに対する新規抗体治療法の開発 第 26 回日本 DDS 学会学術集会 2010. 6. 17 大阪

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 茂 (SASAKI SHIGERU)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10305229

(2) 研究分担者

山本 博幸 (YAMAMOTO HIROYUKI)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40332910

(3) 研究分担者

今井 浩三 (IMAI KOHZOH)  
東京大学・医科学研究所・教授  
研究者番号：60117603

(4) 研究分担者

篠村 恭久 (SHINOMURA YASUHISA)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90162619