

## 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25年5月20日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501046

研究課題名（和文） 二重特異性小型化抗体を活用した癌細胞選択的パクリタキセル送達キャリアーの構築

研究課題名（英文） Development of a drug delivery carrier of paclitaxel to cancer cells using a bispecific single chain Fv

## 研究代表者

田中 宏幸（TANAKA HIROYUKI）

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：30253470

研究成果の概要（和文）：癌細胞特異的に発現しているタンパク質に対する single-chain variable fragment (scFv) を作製し、続いて、本 scFv と抗パクリタキセル (PAC) scFv を連結することで目的とする二重特異性小型化抗体を作製した。タンパク質の発現について検討を重ねた結果、高収率で PAC 送達キャリアーを調製することができた。さらに、二重特異性小型化抗体は、インビトロの評価系を用いてキャリアーとしての有効性について評価した。

研究成果の概要（英文）：In this study, anti-paclitaxel (PAC) scFv was successfully prepared and combined with anti-Her2 or LAT1 scFv. The yield of the bispecific scFv was sufficient with an expression system using *Escherichia coli*. The expressed bispecific scFv was purified and evaluated contribution of anti-cancer property. On *in vitro* assay, we treated some cancer cells with PAC and the bispecific scFv. However, there is no significant difference between this experimental condition and the control regarding anti-cancer activity. We will verify the refolding system of the bispecific antibody to give more stable activity, and in addition, we will modify structure of recombinant antibodies for application of a drug delivery system.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：臨床腫瘍学

キーワード：L-amino acid transporter I (LAT1)；パクリタキセル；ミサイル療法；二重特異性抗体；小型化抗体；癌

## 1. 研究開始当初の背景

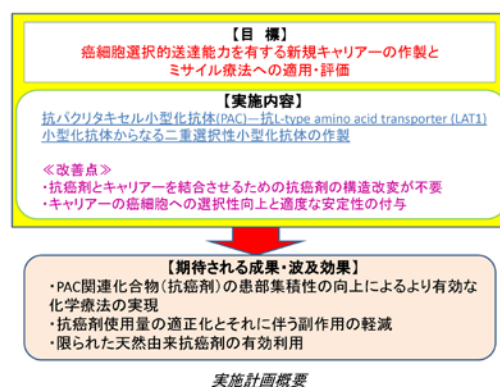
パクリタキセル (PAC) は太平洋イチイ (*Taxus brevifolia*) の樹皮から単離されたタキサン系の化合物であり、細胞の微小管に結

合し、脱重合を阻害することで細胞分裂を阻害する。以上のメカニズムにより PAC 及び PAC 関連化合物である DOC は強力な抗癌作用

を發揮するため、日本では卵巣癌、子宮体癌、非小細胞肺癌、胃癌、乳癌に対する化学療法において多用されており、これらは最も有効な抗癌剤として重要な地位を占めている。現在、これらの薬剤はヨーロッパイチョウ (*Taxus baccata*) の針葉より 10-デアセチルバクカチン III を単離精製し、これを材料として半合成により製造されているが、近年の癌患者の増加に伴い PAC 関連薬剤の需要が増加傾向にある。これまでに申請者は科学研究費補助金を受け、抗 PAC モノクローナル抗体 (MAb) を作製し、これらを活用した enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) や immunochromatographic strip を開発しており、さらに PAC 或いは PAC 関連化合物を高濃度に含有する優良品種の育種研究、新たな抗癌活性成分を求める資源探索研究や薬物動態学的研究など広範な研究を展開している。

PAC 及び DOC は、現在臨床で汎用されている抗癌剤であるものの、正常細胞にも同様な作用を示すことから癌細胞に対する選択性が十分とはいえず、このことが骨髄抑制、末梢神経障害や肝機能障害などの様々な副作用の要因となっている。これまでに、以上のような副作用軽減を目的とした PAC 薬剤の改良が製薬企業において進められた結果、癌細胞への集積性を持つドコサヘキサエン酸 (DHA) 結合 PAC が開発され、臨床において使用されている。さらに、癌細胞に特異的な反応性を持つモノクローナル抗体 (MAb) と PAC を結合させたプロドラッグも開発段階にあるとされる。しかしながら、上記ミサイル療法に使用される薬剤は PAC と癌細胞に送り込むキャリアーを共有結合させた薬剤のため、PAC 本来の抗癌作用の減弱やターゲットでの PAC の効果的放出に関して改良の余地がある。また、癌細胞を認識する MAb の選択性向上や

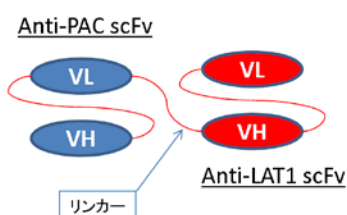
抗原性の軽減についても課題が残されている現状にある。そこで、申請者は癌細胞に特異的に発現している L-type amino acid transporter 1 (LAT1) に対して極めて高い選択性を持つ小型化抗体 (anti-LAT1 scFV) を作製し、これまでに作製した PAC 関連化合物に対して高い選択性を持つ抗 PAC 小型化抗体 (anti-PAC scFV) と連結することで癌細胞への送達能を格段に向上したキャリアーを構築することで上記課題を解決し、PAC 関連薬剤の適正使用を実現することを目標として本申請課題を企画した。



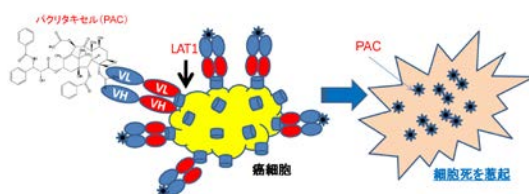
## 2. 研究の目的

申請者は、まず独自の効率的モノクローナル抗体 (MAb) 作製技術を駆使して高い選択性を持つ抗 LAT1 MAb を作製する。既に、anti-LAT1 MAb の作製は報告されている (Ohno Y et al. *Cancer Sci.* 2008, 99, 1000) が、申請者は既報とは異なった免疫源を用いることで、選択性並びに反応性に優れた抗体を独自に作製する。続いて、本抗体を遺伝子工学的手法により小型化し、抗 LAT1 single-chain variable fragment (anti-LAT1 scFV) を作製した後、既に作製している抗バクリタキセル (PAC) scFv と連結することで癌細胞選択的送達能を持つ二重特異性抗体を構築する。本二重特異性抗体をキャリアーとすることで PAC 関連化合物を包み込んだ状態で患部に送達

した後、キャリアーの代謝に伴い患部において抗癌剤が放出されるシステムを構築する。これまで、申請者は約 30 種類の天然有機化合物に対する MAb と 5 種類の scFv を作製しており、本研究を進めるにあたり十分な知識、技術を持つ (Kim J.M. et al., *Biotech. Lett.* 2006, 28, 999; Lu Z.H. et al., *Planta Med.* 2006, 72, 151)。研究期間の後半では、作製したキャリアーの機能について各種癌細胞を用いたインビトロ試験を行い、PAC や DOC 単独使用の場合と比較することで、癌細胞への集積性に加え、抗癌作用、PAC 有効用量等について多面的な解析を行う。さらに、マウス、ラットを用いたインビボ試験を実施し PAC の患部への集積性や適切な放出を確認すると共に、副作用の低減の程度を明らかにすることで、新規ミサイル療法の有用性を評価する。



### 癌細胞選択的送達能を持つ二重特異性抗体を構築



### PAC 関連化合物の癌細胞選択的送達システムの概念図

## 3. 研究の方法

### (1) Anti-LAT1 モノクローナル抗体 (MAb) の作製

LAT1 は 12 回膜貫通型のトランスポーター

であり、申請者は臨床応用を念頭に、ヒト、マウス、ラットの LAT1 に共通した細胞外領域を選択し、免疫原の調製を行った。LAT1 細胞外ドメインの組換え体を作製し、これを免疫原とした。抗 LAT1 MAb の作製についても検討を行った。作製した免疫原をマウスに感作した後、常法により細胞融合、スクリーニング、クローニングを行い抗 LAT1 MAb 産生ハイブリドーマを作製した。

### (2) Anti-LAT1 及び Her2 single-chain variable fragment (scFv) の作製と発現

LAT1 を認識する scFv を作製するために、anti-LAT1 MAb 産生ハイブリドーマから mRNA を得、続いて cDNA の調製を行った。特異的なミックスプライマーを用い VH, VL をコードする遺伝子を増幅し、増幅した遺伝子の配列が正しいことを確認した後、フレキシブルなペプチドリンカーをコードする遺伝子を VH, VL 間に導入する splicing by overlap extension (SOE) PCR を行うことで最終的に scFv 遺伝子を構築した。

構築した scFv 遺伝子を発現用ベクターに組み込み、続いて大腸菌を形質転換した。形質転換を行った大腸菌について、IPTG による発現誘導を行った後、封入体に発現した組換え抗体の巻き戻しを行った。発現システムとしては pET ベクターシステムを試みた。続いて、発現した scFv をアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

同様に、市販の anti-Her2 MAb 産生ハイブリドーマを購入し、上記の手法により anti-Her2 scFv を作製した。

### (3) 二重特異性小型化抗体の構築と評価

Anti-LAT1 scFv と既に構築している anti-PAC scFv を適切なペプチドリンカーを介して連結し、癌細胞選択的送達能を有する

二重特異性小型化抗体 of 構築を目的した。両 scFv をコードする遺伝子を基にプライマーを設計し、上述の SOE-PCR により scFv の連結を行った。作製した二重特異性小型化抗体遺伝子を発現用ベクターにサブクローニングし、大腸菌を形質転換後、組換えタンパクの大量発現を行った。発現した融合抗体の PAC 認識能並びに LAT1 認識能の評価を適切な免疫化学的手法により実施し、材料として用いた両 scFv の機能を比較することで、キャリアーとしての基本的能力を評価した。

Anti-Her2 scFv と anti-PAC scFv との融合組換え抗体も、上記と同様の手法により調製した。

#### (4) 二重特異性小型化抗体のインビトロ試験による評価

作製した新規キャリアーの有用性を、各種癌由来培養細胞を用いたインビトロ試験により検証した。細胞としてマウスミエローマ細胞 (P3×63Ag8.653), ヒト子宮癌由来細胞 (HeLa) を用い、PAC 単独投与とキャリアー共存下での細胞増殖抑制効果について MTT アッセイにより評価した。

#### 4. 研究成果

二重特異性小型化抗体を作製するために必要な癌特異的に発現している LAT1 を認識する MAb の作製を進めた。LAT1 は 12 回膜貫通型のトランスポーターであり、臨床応用を念頭に、ヒト、マウス、ラットの LAT1 に共通した細胞外領域を選択し、免疫原の調製を行った。まず、LAT1 に特徴的な領域に相当するオリゴペプチドを合成し、牛血清アルブミン (BSA) と結合させることで免疫原を調製し、作製した免疫原をマウスに感作した。その結果、高い血中抗体価を得ることができなかったことから、LAT1 細胞外ドメインの組換

え体を作製し、これを免疫原として抗 LAT1 MAb の作製を行うこととした。LAT1 細胞外ドメイン遺伝子の情報を基にプライマーを合成し、HeLa 細胞由来 cDNA ライブラリーを鋳型として常法により PCR を行うことで目的とする遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子の配列を確認した後、当該遺伝子を大腸菌を宿主とした発現に用いるベクター pColdI に組み込み、コンストラクトを構築した。本コンストラクトを用い、BL21 (DE3) を形質転換した後、発現誘導を行った結果、目的とする LAT1 細胞外ドメインの発現に成功した。続いて、発現したタンパクを精製し、これを免疫原としたマウスに免疫感作を行うことで、抗 LAT1 抗体の作出を試みた。その結果、LAT1 を認識する抗体の産生を確認することができた。次に、常法により細胞融合を行うことで抗 LAT1 MAb の作製を行ったところ、LAT1 を認識する MAb を数種得ることができた。

続いて、二重特異性小型化抗体を作製するために anti-LAT1 MAb 産生ハイブリドーマを材料として scFv の調製を行った。常法により mRNA の抽出、cDNA の合成を行った後、VH, VL 遺伝子を増幅し、続いて増幅した遺伝子の配列を確認した結果、complementarity determining region (CDR) を含み、期待した配列を有することを確認した。次に、VH と VL をリンカーで連結した後、発現用ベクター pET28a (+) に組み込み、コンストラクトを構築した。scFv の発現には、大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3) を用いて、本株を確立したコンストラクトを用いて形質転換した。形質転換体を大量培養した後、IPTG による発現を試みた結果、scFv は不溶性画分に発現していることが確認できた。発現した scFv を用いて、透析法による再生を実施し、さらに抗原による反応性を ELISA により確認した結果、作製した組換え scFv が抗原である LAT1 を認識すること

を確認することができた。

同様に、Her2 抗体産生ハイブリドーマを材料として抗 Her2 scFv を構築した。更に、抗 Her2scFv と抗 PAC scFv を連結した二重特異性抗体の構築にも成功した。

次に、抗PAC scFvと抗Her2 scFvからなる二重特異性小型化抗体の効率的な生産系の確立を目指して、種々の大腸菌を形質転換した後、組換えタンパク質の大量発現を検討した。可溶性画分への発現を実現することができなかつたものの、不溶性画分への発現を確認することができた。精製した二重特異性小型化抗体を活性体へと巻き戻した後に、作製した新規キャリアーの有用性について各種癌培養細胞を用いたインビトロ試験により検証した。まず、マウスミエローマ細胞の増殖抑制効果に関して調査した。その結果、PAC単独投与と二重特異性小型化抗体共存下の両条件において、有意な差を確認することができなかつた。そこで、ヒト子宮癌由来細胞を用いて、同様の細胞増殖抑制効果を調べた。しかしながら、同様に作製した新規キャリアーによるPACの抗腫瘍活性の上昇を確認することができなかつた。また、癌細胞内の核酸の断片化についても同様に差異が認められず、新規キャリアーの選択的パクリタキセル送達能が発揮されていないと推察された。その原因として、分子内にジスルフィド結合を持たないscFvの構造的な不安定性が原因と推察し、より安定な antibody binding fragment (Fab) を用いた新規キャリアーの構築を進めている段階にある。既に、抗PAC Fabの作製に成功し、抗原認識能の向上を確認した。今後は、同様に抗LAT-1 Fabの作製を行い、続いて、二重特異性 Fabの構築を進めていく計画である。

## 5. 主な発表論文等

〔論文発表〕(計1件)

(1) Chao Z., Tan M., Paudel M., Sakamoto

S., Ma L., Sasaki-Tabata K., Tanaka H.\*, Shoyama Y., Xuan L., Morimoto S., Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA) using highly specific monoclonal antibody against paclitaxel, *Journal of Natural Medicines*, Springer, **57**, 10.1007/s11418-012-0708-18(査読有)

〔学会発表〕(計1件)

(1) 田中宏幸, 田畑香織、森元 聡、組換え抗 paclitaxel Fab の構築とその機能評価, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 29 日, 横浜, 日本

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 宏幸 (たなか ひろゆき)

研究者番号 : 30253470