

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791512

研究課題名(和文) 4つの機能を有する次世代型新規二重特異性人工抗体を用いた癌分子標的免疫治療の確立

研究課題名(英文) cancer molecule targetting therapy with quad functional next-generation artificial bispecific antibody

研究代表者

林 洋毅 (HAYASHI, HIROKI)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30422124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：上皮増殖因子受容体(EGFR)は多くの癌細胞表面に発現しており、これを介するシグナル伝達は、癌細胞の増殖、浸潤、転移、血管新生、アポトーシスの回避等癌細胞の増殖に関与していることが知られている。したがって、この分子を阻害する抗体は既に重要な抗癌剤として利用されている。

我々はこのEGFRとヒトリンパ球表面マーカーであるCD3に同時に結合することができる二重特異性抗体を人工的に作製した。これにより、EGFRシグナルの阻害のみならず、リンパ球を癌細胞に接近させることが可能となり、リンパ球が癌細胞を直接攻撃することにより極めて強力な癌細胞殺傷効果を有することが示された。

研究成果の概要(英文)：Epidermal growth factor receptor (EGFR) is known as a key target molecule for cancer therapy because ligand binding to EGFR and its signal pathway leads to cancer cell proliferation, invasion, metastasis, angiogenesis, avoidance of apoptosis. So, blocking antibody for EGFR is now become an important therapeutic agent for cancer treatment.

We developed artificial bispecific antibody that binds both EGFR and CD3 which is a surface marker of human lymphocyte. This antibody can not only block the EGFR signal but also lead lymphocytes to cancer cells. We found that this artificial antibody had a very strong anticancer activity for EGFR positive cancer cells.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：二重特異性抗体 胆道癌 上皮増殖因子受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 胆道癌は予後不良な癌腫であり、根治切除が得られたとしても、再発・転移を来す症例が多く、さらなる治療手段が必要である。(2) 現在までのところ、胆道癌に対する分子標的治療薬はない。大腸癌などに対しては抗上皮増殖因子受容体 (EGFR) 抗体が使用されているものの、胆道癌での有用性を示す報告はない。また、抗体医薬単独での効果には限界がある。

(3) これまでに EGFR シグナルを阻害すると共に、リンパ球と癌細胞を架橋するような diabody 型二重特異性抗体を開発し、その効果を示してきた。しかしながら、diabody 型二重特異性抗体は分子量が小さく、組織への高浸透性、高クリアランスといったメリットがある反面、Fc 領域を持たない為に、リンパ球を含む免疫担当細胞を活性化することができず、体外で活性化したリンパ球を同時に戻す養子免疫療法との併用が必要であった。

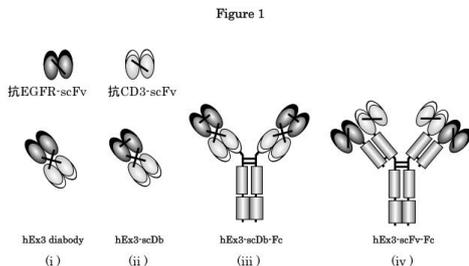
(4) そこで、Fc 領域を有する IgG 型の二重特異性抗体を作製し、生体内で naive なリンパ球を活性化することが出来れば抗体のみの投与での治療が可能であり、治療の簡便さは臨床応用へ繋がると考えて研究を開始した。

2. 研究の目的

遺伝子工学的手法を用いて、ヒト IgG の Fc 領域と 2 つの抗体の変換領域 (抗 EGFR 抗体、抗 CD3 抗体) を結合し、IgG like な二重特異性抗体を作製し、その抗腫瘍効果を検討する。

3. 研究の方法

遺伝子工学的手法を用いて既存の diabody 型の二重特異性抗体 (hEx3 diabody) に加え、一本差抗体型の二重特異性抗体 (hEx3-scDb), scDb に Fc 領域を結合したものの (hEx3-scDb-Fc), 抗体の Vh, VI 部分をそれぞれ抗 EGFR 抗体 scFv, 抗 CD3 抗体 scFv に置き換えたもの (hEx3-scFv-Fc) を作製した (Figure.1)



これらの分子のもつ抗腫瘍効果について in vivo, in vitro で比較を行なうこととした。

4. 研究成果

in vitro

標的細胞を胆管癌細胞株 TFK-1 とし、MTS assay を行なった。diabody 型の二重特異性抗体は活性型リンパ球 (T-LAK 細胞) との共存下でのみ抗腫瘍効果を認めたが、Figure 2 に示すように Fc を有する hEx3-scFv-Fc (Figure 2A), hEx3-scDb-Fc (Figure 2B) は、末梢血単核球 (PBMC) を用いても抗腫瘍活性を確認することができた。これは Fc 領域を有する構造の違いであり、Fc を結合する大きなメリットと考えた。

Figure 2A hEx3-scFv-Fc

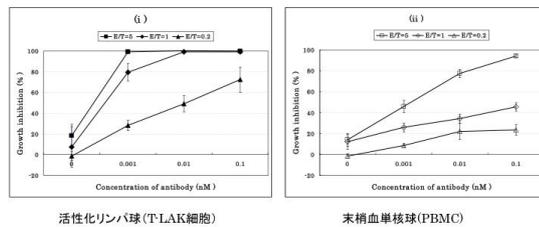
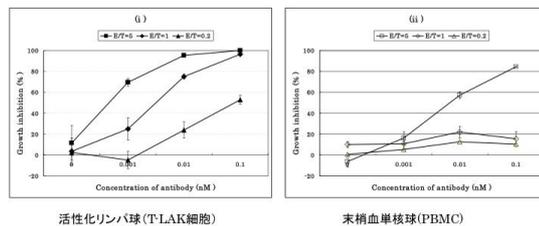


Figure 2B hEx3-scDb-Fc



次に、シャーレ上で EGFR 陽性胆管癌細胞株である TFK-1 細胞と T-LAK 細胞を 37 度で共培養し、顕微鏡で観察すると、hEx3-scDb-Fc を投与することで、TFK-1 細胞周囲に T-LAK 細胞 (白矢印) が時間とともに集簇し、TFK-1 細胞が死滅していく様子が観察されたが、同様の効果は hEx3-scDb-Fc 非存在下には確認されなかった。(Figure 3. hEx3-scDb-Fc 非存在下 A: 0 時間, B: 30 分, C: 1 時間, D: 2 時間後, hEx3-scDb-Fc 存在下 E: 0 時間, F: 30 分, G: 1 時間, H: 2 時間後)

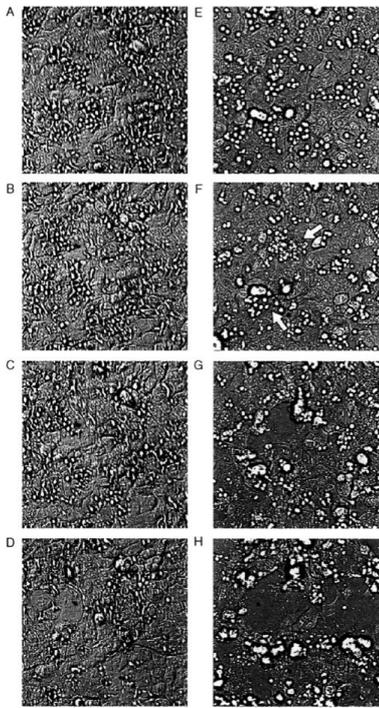


Figure 3

また, in vivo の実験系 (SCID マウス背部に胆管癌細胞株 TFK-1 を皮下移植し, T-LAK 細胞もしくは PBMC と共に抗体を投与したところ, diabody 型では T-LAK 細胞の存在時のみの腫瘍縮小効果であったが, Fc を有するものは PBMC を用いた際にも同様の腫瘍縮小効果を認めた (Figure 4) .

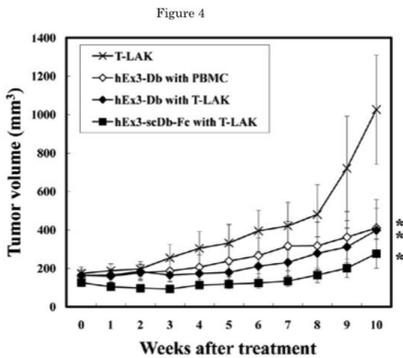


Figure 4

また, これらの効果は既存の抗体医薬 (cetuximab) と同等あるいはそれ以上の効果を示すことが示され, 単なる EGFR の阻害のみならず, 二重特異性抗体がもたらすリンパ球と癌細胞の架橋効果が関与していることが示唆された (Figure 5, 6) .

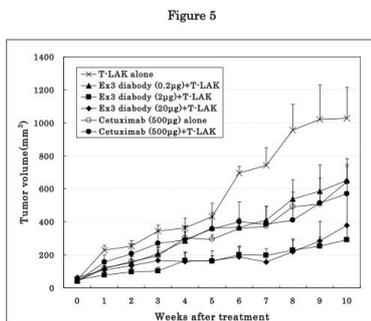


Figure 5

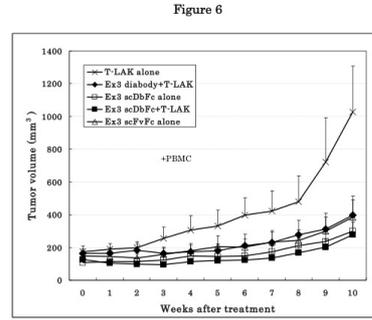


Figure 6

これらの効果は胆道癌に特異的なものではなく, EGFR を発現する種々の癌細胞株に対して確認され, 汎用性が高く, EGFR を発現さえしていればどのような癌に対しても効果を持つことが示唆された (Table. 1) .

Table 1 Comparison of growth inhibition of BsAbs or mAbs with effector cells (MTS assay)

a) Percentage \pm SD of growth inhibition of BsAbs or mAbs with T-LAK cells (Ab: 0.1nM, E:T ratio=5:1)

Target cells	T-LAK alone	Ex3 scFvFc	Ex3 scDbFc	Cetuximab	Trastuzumab	HER1 expression	HER2 expression	Origin
TFK-1	-10.08 \pm 8.73	99.48 \pm 0.59	86.15 \pm 5.28	-12.75 \pm 11.74	-9.93 \pm 9.82	low	low	Bile duct
H1CC-T1	3.34 \pm 3.19	100.85 \pm 0.78	53.61 \pm 3.41	-4.88 \pm 7.67	-2.24 \pm 4.53	high	low	Bile duct
OCUCb-LM1	-3.14 \pm 10.51	98.84 \pm 0.75	76.06 \pm 2.77	10.39 \pm 10.81	4.18 \pm 5.75	high	moderate	Bile duct
A431	5.38 \pm 8.40	98.29 \pm 0.69	98.16 \pm 1.74	-7.39 \pm 9.97	7.67 \pm 9.52	high	low	Epidermoid cancer
Kat5ll	49.55 \pm 5.32	100.98 \pm 0.34	100.63 \pm 0.31	47.34 \pm 8.69	53.84 \pm 5.96	high	low	Stomach
DL-D-1	-1.24 \pm 3.53	99.61 \pm 0.81	101.07 \pm 0.92	11.94 \pm 7.43	6.77 \pm 6.98	high	moderate	Colon
SW480	12.76 \pm 2.07	99.66 \pm 1.41	99.41 \pm 0.62	39.27 \pm 5.53	18.65 \pm 9.44	high	low	Colon
SK-BR-3	12.08 \pm 7.57	99.10 \pm 1.29	94.68 \pm 1.42	9.42 \pm 5.11	19.30 \pm 4.03	high	high	Breast
MCF-7	-4.86 \pm 3.31	99.92 \pm 1.12	50.91 \pm 2.62	8.10 \pm 5.54	11.32 \pm 2.69	low	low	Breast

b) Percentage \pm SD of growth inhibition of BsAbs or mAbs with PBMCs (Ab: 0.1nM, E:T ratio=5:1)

Target cells	PBMC alone	Ex3 scFvFc	Ex3 scDbFc	Cetuximab	Trastuzumab
TFK-1	3.81 \pm 4.09	98.68 \pm 0.86	90.32 \pm 2.23	19.05 \pm 8.99	16.40 \pm 8.13
H1CC-T1	-3.45 \pm 2.92	19.75 \pm 2.84	15.00 \pm 2.39	0.94 \pm 1.64	-0.18 \pm 5.13
OCUCb-LM1	3.23 \pm 4.01	92.79 \pm 1.63	74.50 \pm 8.62	6.32 \pm 12.60	6.98 \pm 12.80
A431	5.12 \pm 5.36	71.75 \pm 2.04	66.82 \pm 3.74	61.01 \pm 5.11	9.90 \pm 12.55
Kat5ll	27.89 \pm 2.71	97.50 \pm 1.92	100.09 \pm 0.32	30.33 \pm 7.74	32.02 \pm 6.25
DL-D-1	6.51 \pm 2.53	96.68 \pm 0.47	93.84 \pm 1.57	34.31 \pm 4.59	15.05 \pm 2.43
SW480	9.29 \pm 3.88	72.44 \pm 4.95	68.76 \pm 2.72	-0.86 \pm 8.79	22.63 \pm 3.44
SK-BR-3	-13.82 \pm 3.68	89.62 \pm 2.11	90.00 \pm 0.84	-9.17 \pm 4.72	46.67 \pm 4.84
MCF-7	5.66 \pm 3.60	95.85 \pm 0.87	97.51 \pm 0.85	6.59 \pm 7.39	12.26 \pm 9.85

Data are representative of at least two independent experiments, with similar results. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. Percentage of growth inhibition of Ab with effector cells vs effector cells alone.

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 7件)

菅野 敦, 正宗 淳, 林 洋毅, 海野 倫明, 下瀬川 徹: 【胆嚢癌の診断と治療】胆嚢癌の進行度診断
日本消化器病学会雑誌;110(8):1400 - 1407.
(2013年8月)(査読なし)

Asano R, Kumagai T, Nagai K, Taki S, Shimomura I, Arai K, Ogata H, Okada M, Hayasaka F, Sanada H, Nakanishi T, Karvonen T, Hayashi H, Katayose Y, Unno M, Kudo T, Umetsu M, Kumagai I.
Domain order of a bispecific diabody dramatically enhances its antitumor activity beyond structural format conversion: the case of the hEx3 diabody. Protein Eng Des Sel. 2013 May;26(5):359-67. doi: 10.1093/protein/gzt009. Epub 2013 Mar 6. (査読あり)

林 洋毅, 海野倫明: 臓器別最新データ胆道癌の疫学
外科医のための癌診療データ; 67(11): 179 - 185. (2012年10月)(査読なし)

林 洋毅, 海野倫明: 切除不能胆管癌の予後と治療戦略
消化器内科; 55(3): 367 - 371. (2012年9月)(査読なし)

林 洋毅, 海野倫明: 【胆嚢癌フロントライン】薬物治療胆嚢癌外科切除後 adjuvant chemotherapy の現状
肝・胆・膵; 64(4): 607 - 612. (2012年4月)(査読なし)

Asano R, Nakayama M, Kawaguchi H, Kubota T, Nakanishi T, Umetsu M, Hayashi H, Katayose Y, Unno M, Kudo T, Kumagai I.
Construction and humanization of a functional bispecific EGFR x CD16 diabody using a refolding system. FEBS J. 2012 Jan;279(2):223-33. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08417.x. Epub 2011 Dec 6. (査読あり)

Watanabe Y, Asano R, Arai K, Shimomura I, Ogata H, Kawaguchi H, Hayashi H, Ohtsuka H, Yoshida H, Katayose Y, Egawa S, Nakanishi T, Umetsu M, Yasui H, Ishida T, Imai K, Kudo T, Unno M, Kumagai I.
In vitro and in vivo antitumor effects of recombinant bispecific antibodies based on humanized anti-EGFR antibody. Oncol Rep. 2011 Oct;26(4):949-55. doi:

10.3892/or.2011.1382. Epub 2011 Jul 4. (査読あり)

[学会発表](計 9件)

Hayashi H, Motoi F, Yoshida H, Morikawa T, Okada T, Nakagawa K, Naitoh T, Katayose Y, Unno M: Impact of additional resection for incidental gallbladder cancer. International Hepatop-Pancreato-Biliary Association 2014 11th World Congress (韓国・ソウル)(平成26年3月25日)

林 洋毅, 元井冬彦, 吉田 寛, 森川孝則, 中川 圭, 大塚英郎, 水間正道, 片寄 友, 海野倫明: 胆道癌における上皮増殖因子受容体(EGFR)発現率および KRAS・BRAF 遺伝子変異率の検討. 第49回日本胆道学会学術集会(舞浜)(平成25年9月19日)

林 洋毅, 片寄 友, 吉田 寛, 森川孝則, 中川 圭, 岡田恭穂, 元井冬彦, 内藤 剛, 江川新一, 海野倫明: 早期再発例と長期生存例の病理組織学的因子の比較からみた進行胆嚢癌の手術適応. (パネルディスカッション)第68回日本消化器外科学会総会(宮崎)(平成25年7月18日)

林 洋毅, 片寄 友, 海野倫明: 胆道癌再発症例に対する再発巣切除の意義. (ワークショップ)第48回日本胆道学会学術集会(東京)(平成24年9月20日)

林 洋毅, 力山敏樹, 元井冬彦, 吉田 寛, 中川 圭, 森川孝則, 岡田恭穂, 片寄 友, 江川新一, 海野倫明: T2胆嚢癌における術式の検討. (シンポジウム)第67回日本消化器外科学会総会(富山)(平成24年7月18日)

林 洋毅, 力山敏樹, 元井冬彦, 吉田 寛, 森川孝則, 岡田恭穂, 中川 圭, 大塚英郎, 乙供 茂, 水間正道, 坂田直昭, 深瀬耕二, 石田晶玄, 片寄 友, 江川新一, 海野倫明: 高度局所進行胆嚢癌の治療戦略と術式選択. (パネルディスカッション)第24回日本肝胆膵外科学会学術集会(大阪)(平成24年6月1日)

林 洋毅, 力山敏樹, 元井冬彦, 吉田 寛, 小野川徹, 森川孝則, 岡田恭穂, 中川 圭, 大塚英郎, 坂田直昭, 乙供 茂, 水間正道, 深瀬耕二, 石田晶玄, 片寄 友, 江川新一, 海野倫明: Stage3以上の進行胆道癌における予後規定因子の検討ならびに手術適応の検討. (サージカルフォーラム)第112回日本外科学会定期学術集会(千葉)(平成24年4月12日)

Hayashi H, Rikiyama T, Motoi F, Onogawa T, Morikawa T, Okada T, Nakagawa K, Ohtsuka

H, Ottomo S, Mizuma M, Sakata N, Fukase K, Katayose Y, Egawa S, Unno M: The Risk Evaluation about Major Hepato-Pancreaticoduodenectomy for Cholangiocarcinoma; 24 cases. 21st World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists (IASGO2011 in Tokyo) (東京) (平成 23 年 11 月 10 日)

林 洋毅, 片寄 友, 海野倫明: 切除不能胆管癌の予後の検討と治療戦略. (パネルディスカッション) JDDW2011 (福岡) (平成 23 年 10 月 20 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 洋毅 (HAYASHI HIROKI)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 30422124