

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590986

研究課題名(和文) 肝細胞癌に対する三重特異性ヒト型カイコ抗体を用いた治療法の開発

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：進行した肝細胞癌に対する理想的な治療薬としての抗体医薬の開発を目指して研究を進めた。われわれは、これまで肝癌細胞に対して、作成した抗FGFR-1モノクローナル抗体を投与し、in vitroおよびin vivoにおいて、著明な抗癌効果を明らかにしてきた。さらに、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、三重特異性ヒト型抗体を作製した。作成した三重特異性ヒト型抗体を用い、in vitroおよびin vivoのADCC活性を検討した。現在までのところ、期待されたADCC活性を得ることはできなかった。現在、さらに分子改変を行い、カイコ抗体作成に向けて研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：We were conducting research with the aim of development of antibody drug as an ideal treatment for advanced hepatocellular carcinoma. We used anti-FGFR-1 monoclonal antibody has been prepared, a significant anti-cancer effect against liver cancer cells in vitro and in vivo, have been clarified. Furthermore, so as to exert a more potent anti-cancer effect, a molecular alteration is added to the antibody to prepare a triple-specific human antibodies. Using a triple-specific human antibody that was created, we examined the ADCC activity in vitro and in vivo. To date, it has not been possible to obtain the expected ADCC activity. Currently, further subjected to molecular modifications are conducting research towards the silkworm antibody preparation.

研究分野：肝臓学

キーワード：三重特異性抗体 肝がん カイコ抗体

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は、現在、本邦における癌による死因の第4位であり、毎年3万人以上の方々の生命を奪っている。さらに、今後の高齢化社会の進展から、肝細胞癌による死亡数の減少は期待できない。また、世界的に見ても今後さらに増加していくことが想定されている。近年の内科的、外科的治療の進歩により、局所制御能に限っては格段の進歩を遂げ、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、肝細胞癌の発生母地がすでに肝硬変であることが多く、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、この点がほかの多くの癌腫に対する治療と大きく異なる点である。現在、進行した肝細胞癌では、抗癌剤の動注療法や経口剤の分子標的薬の投与が行われることがあるが、それらの治療法も一定程度の肝予備能力が必要であり、それを超えた進行肝細胞癌では、多くの場合、全く無治療（あるいは緩和医療のみ）で経過観察を行っている状況にある。進行肝細胞癌に対する治療として、われわれが理論的有用性を明らかにした Interferon (IFN)  $\alpha/\beta$  併用 5FU 動注療法は画期的な治療法ではあるが (Nature 424: 516-523, 2003) この治療法の遂行においても、肝予備能力の維持が前提である。進行肝細胞癌に対しては副作用の限りなく少ない治療薬が早急に是が非でも必要である。

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。われわれはこれまでの検討で、*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 (PLoS One. 2011; 6(5): e19618)。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、非癌肝細胞には大きな影響を与えず、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。また、いくつかの癌種において、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。以上の背景から、われわれは、この FGFR-1 に対するモノクローナル抗体 (以下 MoAb) 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、FGFR-1 を過剰発現させ、作成した抗 FGFR-1 MoAb 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。さらに、この抗体の抗癌効果を高めることを目的に、分子改変を行い、まず、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 非拘束性に細胞障害性 T リンパ球 (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作成した抗 FGFR-1 MoAb の可変領域とを用い、これらにさらに、抗体依存性細胞介在性細胞障害作用 (ADCC)

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ヒト型抗体の作成を行った。二つの異なる抗原を近接させ、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ている。

一方、現在、抗体医薬は、抗体遺伝子を組み込んだ哺乳動物培養細胞（CHO 細胞）により生産されている。この生産系では、製造コストが非常に高いことが大きな問題となり、多くの抗体医薬開発および臨床応用の厳しい足かせになっている。これに対して、トランスジェニック（以下 TG）カイコを用いた抗体生産系は、個体間のばらつきもなく、品質の差異が生じる事もなく、安定的に安全なヒト型抗体を生産でき、さらに CHO 細胞を用いた場合の 1/10 程度のコストで抗体を製造することができるという大きな利点を有している (Nat Biotechnol. 21, 42-56, 2006, FEBS J. 276, 5806-5820, 2009)。このようなカイコ抗体の抗体医薬としての成否は今後の抗体医薬開発における重要な一步になると考えている。

## 2 . 研究の目的

治療法の乏しい状況が続いている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、特に副作用の限りなく少ない安全な抗体医薬の開発を目指して研究を進めたい。われわれは、これまでヒト肝癌細胞に対して、IFN $\alpha/\beta$ 投与により 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を独自に作成し、IFN $\alpha/\beta$ と併用し、*in vitro* および *in vivo* において、著明な抗癌効果を明らかにしてきた。さらに、より強力な抗癌効果を発揮するように、この MoAb に分子改変を加え、抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型抗体（以下三重特異性ヒト型抗体）を作製した。今回の研究では、これを実際の臨床

試験へ早期に持ち込みたいと考え、TG カイコを用いて作成し、安全性、安定性を高め、さらに作成費用の低減化を行い、臨床試験に、より速やかに移行して行ける準備を整えることを目的とした。

## 3 . 研究の方法

(1) 作成した抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型抗体（CHO 細胞使用）のヒト肝癌細胞に対する *in vitro* および *in vivo* おける抗癌効果の検討

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 アッセイにて測定する。

T 細胞の活性化についてはヒト由来 PBMC の増殖能を MTS アッセイにて測定する。

FGFR-1 発現細胞への結合は FACS を用いて腫瘍細胞への結合性を確認する。

IFN $\alpha/\beta$ 単独投与群、5FU 単独投与群、抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型抗体単独投与群、IFN $\alpha/\beta$ に 5FU を併用する群、IFN $\alpha/\beta$ に抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型抗体を併用する群に分け、それぞれヒト肝癌細胞に対するアポトーシス誘導能を TUNEL 法および tripan blue 染色を用いて検討する。さらに、ヒト肝癌細胞移植 SCID マウスを用い、*in vitro* と同様に、本抗体の抗癌効果を *in vivo* でも明らかにする。また、この際、それぞれの群における臓器障害の有無に関する検討も併せて行う。

(2) 抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型抗体（CHO 細胞使用）のヒト肝癌細胞に対する細胞増殖能および浸潤能、血管新生能に与える影響に関する検討

作成した抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型抗体投与による

ヒト肝癌細胞における細胞増殖抑制

効果を *in vitro* で検討する。

ヒト肝癌細胞の浸潤能に与える影響をマトリゲルを用い検討する。

血管新生能に与える影響に関しては、SCID マウスに移植したヒト肝癌細胞に対して、本抗体を投与し、その摘出した腫瘍組織において免疫染色を行い、microvessel density を計測し検討する。

これらの検討はいずれも IFN $\alpha/\beta$ の先行投与有無別に行い、細胞増殖能および浸潤能、血管新生能に関する IFN $\alpha/\beta$ 併用抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型抗体投与の有用性を明らかにするものである。

(3) トランスジェニックカイコ (TG カイコ) を用いた抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型カイコ抗体の作成

研究協力者である株式会社免疫生物研究所に TG カイコを用いた抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型カイコ抗体の作成を依頼する (作成に 6 ヶ月~8 ヶ月間を要する)。

(4) 抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型抗体 (CHO 細胞使用) によるアポトーシスおよび免疫関連遺伝子の変化に関する検討

ヒト肝癌細胞に関して、IFN $\alpha/\beta$ 併用抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型抗体投与による各種アポトーシスおよび免疫関連遺伝子に与える影響を DNA アレイを用いて検討し、抗腫瘍効果の機序を明らかにする。

(5) 作成した抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型カイコ抗体のヒト肝癌細胞に対する *in vitro* および *in vivo* おける抗癌効果の検討

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 アッセイにて測定する。

T 細胞の活性化についてはヒト由来 PBMC の増殖能を MTS アッセイにて測定する。

FGFR-1 発現細胞への結合は FACS を用いて腫瘍細胞への結合性を確認する。

IFN $\alpha/\beta$ 単独投与群、5FU 単独投与群、抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型カイコ抗体単独投与群、IFN $\alpha/\beta$ に 5FU を併用する群、抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型カイコ抗体を併用する群に分け、それぞれヒト肝癌細胞に対するアポトーシス誘導能を TUNEL 法および tripan blue 染色を用いて検討する。さらに、ヒト肝癌細胞移植 SCID マウスを用い、*in vitro* と同様に、本抗体の抗癌効果を *in vivo* でも明らかにする。また、この際、それぞれの群における臓器障害の有無に関する検討も併せて行う。

(6) 抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合ヒト型三重特異性ヒト型カイコ抗体のヒト肝癌細胞に対する細胞増殖能および浸潤能、血管新生能に与える影響に関する検討

作成した抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型カイコ抗体を用いて

ヒト肝癌細胞における細胞増殖抑制効果を *in vitro* で検討する。

ヒト肝癌細胞の浸潤能に与える影響をマトリゲルを用い検討する。

血管新生能に与える影響に関しては、SCID マウスに移植したヒト肝癌細胞に対して、本抗体を投与し、その摘出した腫瘍組織において免疫染色を行い、microvessel density を計測し検討する。

これらの検討はいずれも IFN $\alpha/\beta$ の先行投与有無別に行い、細胞増殖能および

浸潤能、血管新生能に関する IFN $\alpha/\beta$ 併用抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型カイコ抗体投与の有用性を明らかにする。

(7) 抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型カイコ抗体によるアポトーシスおよび免疫関連遺伝子の変化に関する検討  
ヒト肝癌細胞に関して、IFN $\alpha/\beta$ 併用抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型カイコ抗体投与による各種アポトーシスおよび免疫関連遺伝子に与える影響を DNA アレイを用いて検討し、抗腫瘍効果の機序を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) 作成した抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型抗体 (CHO 細胞使用) のヒト肝癌細胞に対する *in vitro* における抗癌効果の検討

これまで作成してきた抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型抗体 (CHO 細胞使用) のヒト肝癌細胞に対する *in vitro* における抗腫瘍効果の検討を行った。 *in vitro* における 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。結果は *in vitro* において、ある程度の ADCC 活性の増強が認められた。 FGFR-1 発現細胞への結合活性を FACS を用いて腫瘍細胞への結合活性で検討した。結果は腫瘍細胞への十分な結合活性が認められた。 IFN $\alpha/\beta$  等を併用して、*in vitro* における抗腫瘍効果の検討を行った。 IFN $\alpha/\beta$  や 5FU を用いる効果は IFN $\alpha/\beta$  や 5FU 投与により FGFR-1 の肝癌細胞における発現誘導を期待して行うものであった。 IFN $\alpha/\beta$  単独投与群、5FU 単独投与群、FGFR-1X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型抗体単独投与群、IFN $\alpha/\beta$  に 5FU を併用する群、IFN $\alpha/\beta$  に抗 FGFR-1X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型抗体を併用する群に分け、それぞれ

FGFR-1 発現ヒト肝癌細胞に対する細胞増殖抑制効果を MTS アッセイを用いて検討した。さらにアポトーシス誘導能を TUNEL 法および tripan blue 染色法を用いて検討した。結果は、いずれの群においても細胞増殖抑制効果は認められた。特に、IFN $\alpha/\beta$  と 5FU を併用する群に強い増殖抑制効果を認めた。また、IFN $\alpha/\beta$  に抗 FGFR-1X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型抗体を併用する群でも増殖抑制効果を認めた。そのいずれにもアポトーシスの誘導は認められた。

(2) 作成した抗 FGFR-1 X 抗 CD3 Fc 結合三重特異性ヒト型抗体 (CHO 細胞使用) のヒト肝癌細胞に対する *in vivo* における抗癌効果の検討

これらの *in vitro* における実験の結果をふまえ、さらにマウスを用いた *in vivo* の実験を行った。

結果として、抗 FGFR-1X 抗 CD3 FC 結合三重特異性ヒト型抗体 (CHO 細胞) のヒト肝癌細胞に対する SCID マウスを用いた *in vivo* 実験において、*in vitro* において得られた結果から期待されたような抗腫瘍効果を得ることができなかった。この原因として、抗 FGFR-1X 抗 CD3 FC 結合三重特異性ヒト型抗体 (CHO 細胞) の抗腫瘍効果が親抗体である抗 FGFR-1 抗体を凌駕するほどの強力な効果ではなく、期待された *in vivo* における ADCC 活性の増強が得られなかったことが考えられた。

(3) 抗 FGFR-1X 抗 CD3 FC 結合三重特異性ヒト型抗体 (CHO 細胞) の構造改変  
*in vivo* における ADCC 活性の増強を改善することが、最終的なカイコ抗体の作成にあたって、前提条件として必要なことであり、抗 FGFR-1X 抗 CD3 FC 結合三重特異性ヒト型抗体 (CHO 細胞) の構造改変を行った。

様々な構造改変を行い、抗 FGFR-1X 抗 CD3 FC 結合三重特異性ヒト型抗体 (CHO

細胞)の作成を継続して行った。それぞれの作成した抗FGFR-1X抗CD3FC結合三重特異性ヒト型抗体(CHO細胞)を用い、まず、*in vitro*のADCC活性を検討した。結果はこれまで作成してきた抗FGFR-1抗体とほぼ同等のADCC活性しか得ることはできなかった。期待したADCCの増強効果までは見いだせなかった。次に、これらの抗体を用いて、ヒト肝がん細胞に対する*in vivo*の実験を行った。結果は抗FGFR-1X抗CD3FC結合三重特異性ヒト型抗体(CHO細胞)による抗腫瘍効果はこれまで作成してきた抗FGFR-1抗体に比べてむしろ弱いという結果であった。これらの*in vitro*および*in vivo*の結果から、これまで構造改変を行って作成してきた抗FGFR-1X抗CD3FC結合三重特異性ヒト型抗体(CHO細胞)において期待されたADCC活性の増強効果は親抗体である抗FGFR-1抗体のADCC活性を凌駕するものではなく、三重特異性抗体に構造改変を行う意義を確認できない結果であり、現在、このままカイコ抗体の作成に進むことが困難な状況に至っている。このため、現在、ADCC活性の増強に至らなかった原因について改めて検討を行っている。本研究課題において、明らかにできたことは、抗FGFR-1X抗CD3FC結合三重特異性ヒト型抗体(CHO細胞)は作成可能であること。また、そのADCC活性については親抗体におけるADCC活性とほぼ同等の効果は発揮できること。しかしながら、三重特異性抗体作成において、最も期待されたADCC活性の増強効果は期待通りには得られなかったことが明らかになった。今後の抗体製剤の作成に関しては、今後もその作用機序から抗腫瘍効果の機序として、ADCC活性が期待されることが多いと考えられる。その際、今回のような試みはどうしても必要なことと思われ、また、さら

に、本研究課題の目標である作成コストの面からもカイコ抗体の作成は非常に有意義な方法であると考えられ、今後も本研究の推進を予定している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. 佐々木 茂、篠村恭久、今井浩三 抗体治療、Drug Delivery System、査読なし、Vol. 30、No.1、2015、pp. 16 - 24 .  
<http://square.umin.ac.jp/js-dds/30/30-1.htm>
2. 佐々木 茂、阿久津典之、伊東文子 他(5名) 肝がん、内科、査読なし、Vol.114、No.4、2014、pp. 613 - 616 .  
<http://www.nankodo.co.jp/g/g3014041/>

〔学会発表〕(計4件)

1. 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79回インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2014年6月19日~20日、北海道大学医学部学友会館フラテホール(札幌市)

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称：癌治療剤及び癌の治療方法  
発明者：今井浩三、佐々木 茂  
権利者：北海道公立大学法人 札幌医科大学、  
国立大学法人 東京大学  
種類：特許  
番号：特許第5563818号  
出願年月日：平成20年5月29日  
取得年月日：平成26年6月20日  
国内外の別：国内、米国、カナダ、欧州

## 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)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40332910