



|              |                                                                                                                                                       |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Claudin-4抗体の創製と抗ガン剤への応用に向けた基盤研究                                                                                                                       |
| Author(s)    | 李, 相儒                                                                                                                                                 |
| Citation     | 大阪大学, 2014, 博士論文                                                                                                                                      |
| Version Type |                                                                                                                                                       |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/34390">https://hdl.handle.net/11094/34390</a>                                                                   |
| rights       |                                                                                                                                                       |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 李 相 儒 )

論文題名 Claudin-4抗体の創製と抗ガン剤への応用に向けた基盤研究

## 論文内容の要旨

依然としてガンは人類の前に立ちはだかる大きな壁であり、ガンの罹患率は、1981年には脳卒中を抜いて死因の第一位になり、現在は年間のガン患者数はおよそ10万人以上と推定され、3人に1人がガンで亡くなることが報告されている。また、ガンの90%以上は上皮由来であることから、上皮癌の克服が癌治療における重要課題のひとつとなっている。

上皮は生体内外、組織内外を隔てるバリアとして機能し、隣接する細胞間隙に存在するTJによって細胞間隙の物質透過が制限されている。しかしながら、上皮細胞の癌化過程において、TJの機能異常が生じ、細胞極性の崩壊に伴うTJ構成蛋白質であるclaudin (CL) の発現変化及び局在の変化が起こっている。さらにCL-4は卵巣癌、膵臓癌など多くの癌で発現が上昇していることが報告されている。このことから、TJ構成蛋白質CLを標的とすることで、新たな抗癌剤が開発できるのではないかと考えられた。

当研究室では、CL-4結合分子として知られているウェルシュ菌由来の下痢毒素断片であるC-CPEを利用し、CL-4を標的とした創薬の可能性を検討し、C-CPEに緑膿菌由来の毒素であるPSIFを融合したC-CPE-PSIFをCL-4発現腫瘍移植マウスに投与するににより抗腫瘍効果が認められた。しかしながら、C-CPEはウェルシュ菌由来のペプチドのため、抗原性の問題が報告されている。そこで、抗原性が少なく、かつ高い治療効果が期待される抗体医薬に注目した。本研究では、CL-4を標的とした抗体の取得と癌治療への可能性を検証した。

まず本研究では、DNA免疫法を利用しCL-4抗体の取得を試みた。その結果、hCL-4抗体産生ハイブリドーマを8クローン樹立することに成功した。また、それぞれのハイブリドーマから抗体の可変領域配列を解析した結果、それぞれ異なる配列を有していたことから、8クローンは独立したクローンであったことがわかった。さらに、得られたクローンは各種CLに対する結合性を解析したところ、すべてのクローンはヒトCL-4 (hCL-4) に結合性を有することを確認した。また、5クローンはhCL-3に、3クローンはマウスCL-4 (mCL-4) に結合性を示した以外、いずれのクローンもhCL-1、-2、-5、-6、-7、-9には結合性を示さなかった。以上の結果から、ヒト-マウス交差性を有するものを含め、hCL-4への結合特異性が高いクローンを多数取得することに成功した。

次に、正常および担癌マウスを利用することでCL-4抗体の体内動態解析を行った。CL-4は甲状腺、腎臓、腸などの正常組織に発現していることが報告されている。このことから、CLを標的とした創薬研究の推進に際しては、CL binderの体内動態を考慮した安全性評価が重要となる。そこで、当該安全性評価の第一歩として、マウスを用いて蛍光標識したCL binderの体内動態を解析した。実験に使うCL binderとして、C-CPEおよびmCL-4に結合性を有することが報告されているラット抗体HKH189. J9を用いて検討した。蛍光物質CF750をC-CPEまたはHKH189. J9に化学修飾することで蛍光標識体を作製した。またそれぞれのネガティブコントロールとしてC-CPE mutant (CL-4結合性欠損体) またはラットIgGを用いた。作製したCF750標識体のmCL-4への結合性を確認後、マウスに尾静脈内に投与し、経時的に臓器を摘出し、イメージング装置で各臓器に存在する抗体量を測定した。

CF750-C-CPEをBALB/cマウスに尾静脈投与したところ、10分後にはC-CPEのほとんどが代謝関連組織である肝臓および腎臓に蓄積することが観察された。C-CPE mutantの分布と比べ、C-CPEは一時的に肝臓への蓄積が観察されたが、30分後から徐々に排出され、すみやかにC-CPE mutantと同様なレベルとなった。また、腎臓においてはC-CPEおよびC-CPE mutantともに同様な蓄積パターンが観察されたことから、CLへの結合性とは無関係な非特異的な集積であると考えられた。他の組織への分布に関して、C-CPEは甲状腺、腸へ蓄積することが観察されたが、蓄積量は肝臓および腎臓と比べ低かった。さらに、C-CPE投与6時間後から96時間まで観察した結果、全身から徐々に排出されることが観察された。C-CPEはCL-4だけではなく、CL-3にも結合性を示すことから、C-CPEの体内分布の結果にはCL-3への結合性による影響も考慮する必要がある。そのため、CL-4のみに結合するラット抗体HKH189. J9を用いた検討を行った。

はじめに、ネガティブコントロールであるCF750-IgGを投与した結果、投与10分後では、肝臓、腎臓および血中への分布が一番多いことを確認した。その後96 hまで観察した結果、肝臓以外の組織では徐々に排出されることが観察さ

れた。一方、mCL-4に結合するCF750-HKH189.J9を投与したところ、CF750-IgG と比べ、投与10分後から肝臓、脾臓および腎臓への分布が高い傾向が観察されたが、6時間後からは排出されはじめ、最終的にCF750-IgGと同様なレベルになった。ほかの臓器への分布に関しては、CF750-IgGと比べ、特に差は見られなかった。以上の結果から、mCL-4抗体は肝臓、脾臓および腎臓に一時的に蓄積するものの、他臓器への蓄積はラットIgGと同程度であることが分かった。抗体では、肝臓、脾臓、腎臓に一時的に蓄積していたが、C-CPEの場合には、肝臓、甲状腺および腸に一時的に蓄積することが観察された。この体内分布の違いとして、抗体（150 kDa）とC-CPE（14kDa）では分子量が約10倍異なることから、組織浸透性の違いが原因になると考えられる。また、いずれのCL-4 binderにおいても、一時的な臓器蓄積が観察されたものの、全体的にはネガティブコントロールと同様な分布を示したことから、CL-4に結合することによる体内分布への影響は少ないと考えられる。

さらに、今回取得したCL-4抗体が腫瘍移植マウスに投与した際、腫瘍に蓄積するかを確認するため、hCL-4に高い結合性を示すクローンclone Bを用い検討した。またCL-4が低発現するヒト膵臓癌細胞Mia Paca-2、CL-4が高発現するヒト胃癌細胞MKN74およびヒト大腸癌細胞LoVoを実験に供した。CF750-clone Bを作製し、癌細胞に対する結合性を確認後、癌細胞移植マウスの腹腔内に投与し、経時的に抗体の体内分布をイメージング装置を用い観察した。その結果、clone Bを投与して6時間後、腫瘍への蓄積は観察できなかったものの、投与24時間から、腫瘍に顕著な蓄積が観察され、その蓄積は96時間まで持続した。以上の結果から、今回取得したhCL-4抗体clone BはhCL-4発現癌への指向性を示すことが明らかとなった。

最後に、CL-4抗体を用いた抗腫瘍効果を検討した。まずclone BのCDC活性を測定した。MKN74、LoVoまたはMia Paca-2細胞を用いて検討した結果、いずれの細胞においてもclone Bの添加による細胞死は観察されず、抗体によるCDC活性は認められなかった。その原因について、二つの可能性が考えられる。ひとつは、本研究に用いるclone Bは血清中の補体に対し親和性が低いと考えられる。もうひとつの原因として、三種類の上皮癌細胞には補体抵抗性を有するCD59が発現していることが報告されている。CD59はCDC活性から腫瘍細胞を保護する機能を担うことが知られているため、CD59の発現はCDC活性を減弱させた可能性も考えられる。次に、clone BのADCC活性を測定には、Fc $\gamma$ 受容体発現細胞を用いたADCC活性評価系を利用し検討した。その結果、clone B添加濃度依存的なFc $\gamma$ 受容体の活性化が観察され、ADCC活性を有することが示唆された。続いて、担癌マウスにおけるclone Bの抗腫瘍効果を検証した結果、MKN74細胞移植マウスにおいて、ラットIgG投与による腫瘍サイズの縮小は見られなかったのに対し、clone Bでは投与量依存的な腫瘍サイズの縮小が見られた。また、LoVo細胞移植マウスでも同様に、clone B投与による腫瘍サイズの縮小が見られた。しかしながら、いずれの結果においても腫瘍の増殖が抑制されたが、十分な効果は得られないとも言える。そこで、clone Bを抗腫瘍活性向上を目指しヒトキメラ化抗体に改変し、その効果の検討を行った。

周知の通り、IgGには、IgG1～4との四つのサブタイプが存在する。また、抗体によるADCC活性およびCDC活性はIgGのサブタイプに大きく依存し、IgG1とIgG3がIgG2やIgG4に比べ強い活性を持つことが知られている。よって、今回作製したキメラclone Bの定常領域をヒトIgG1に改変するように設計した。作製したラット-ヒトキメラclone B (xi-clone B) のMKN74またはMia Paca-2細胞に対するCDC活性を検討した結果、いずれの細胞に対しても血清単独添加群と比べxi-clone B添加濃度依存的な細胞死が見られたことから、定常領域をヒトIgG1に改変したキメラclone BがCDC活性を増強させることを確認した。しかし、CD59存在のため、ヒトキメラ化したclone Bでも、十分なCDC活性が得られなかった。一方、xi-clone B添加濃度依存的なFc $\gamma$ 受容体の活性化の上昇が観察され、ADCC活性が維持されていることを確認した。最後に、作製したxi-clone Bの担癌マウスに対する抗腫瘍効果を検討した。LoVo細胞移植マウスにxi-clone Bを投与することにより、体重の減少は見られず、ラット抗体と比較し、2-3倍強い抗腫瘍活性が示された。この効果は、投与3回目から、有意な腫瘍サイズの縮小として観察された。以上の結果から、ヒトキメラしたclone Bは腫瘍増殖抑制効果が增強されたことがわかった。

今後、本研究で取得したhCL-4抗体をリード抗体とし、抗体エンジニアリング技術を活用することで、さらなる抗腫瘍効果の增強が期待される。近年、抗体のADCC活性を増強する方法が多数報告されている。例えば、抗体可変領域改変による抗原への親和性増強、抗体定常領域のアミノ酸改変、抗体の糖鎖構造の改変により、ADCC活性を増強させるアプローチが報告されている。本研究で取得したhCL-4抗体においてもこのような改変を行えば、さらに強い抗腫瘍活性が得られるのではないかと考えられる。また、CL binderを利用することにより、癌治療のみならず癌診断への応用も期待できる。通常は細胞間隙に存在しているCLが細胞の癌化に際して細胞表面に露出する特徴を利用し、このCLの露出を認識する癌診断法を開発することができれば、癌の早期診断・早期治療の開発にも繋がる事が考えられる。以上、今回取得に成功したCL-4抗体は、癌治療および癌診断において有用な抗体医薬としての可能性を秘めていることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 ( 李 相 儒 ) |     |     |       |
|---------------|-----|-----|-------|
|               | (職) | 氏 名 |       |
| 論文審査担当者       | 主 査 | 教 授 | 八木 清仁 |
|               | 副 査 | 教 授 | 水口 裕之 |
|               | 副 査 | 教 授 | 辻川 和丈 |
|               | 副 査 | 教 授 | 中川 晋作 |

## 論文審査の結果の要旨

上皮は生体内外、組織内外を隔てるバリアとして機能し、隣接する細胞間隙に存在するタイトジャンクション (TJ) によって細胞間隙の物質透過が制限されている。しかしながら、上皮細胞の癌化過程において、TJの機能異常が生じ、細胞極性の崩壊に伴うTJ構成蛋白質であるclaudin (CL) の発現変化及び局在の変化が起こっている。CL-4は卵巣癌、膵臓癌など多くの癌で発現が上昇していることが報告されており、本研究ではCL-4を標的とした抗腫瘍療法が有効であることを示すための基礎検討を行った。

まずDNA免疫法を利用しCL-4抗体の取得を試み、抗ヒトCL-4 (hCL-4) 抗体産生ハイブリドーマを8クローン樹立することに成功した。それぞれのハイブリドーマから抗体の可変領域配列を解析した結果、それぞれ異なる配列を有していたことから、8クローンは独立したクローンであったことがわかった。さらに、得られたクローンが各種CLに対する結合性を解析したところ、すべてのクローンがヒトCL-4 (hCL-4) に結合性を有することを確認した。また、いずれのクローンもhCL-1、-2、-5、-6、-7、-9には結合性を示さずhCL-4への結合特異性が高いクローンを多数取得することに成功した。結合性の高いclone Bを蛍光標識し、癌細胞移植マウスの腹腔内に投与して経時的に抗体の体内分布をイメージング装置を用い観察した。その結果、clone B投与24時間から腫瘍に顕著な蓄積が観察され、hCL-4抗体clone BはhCL-4発現癌への指向性を示すことが明らかとなった。

次にCL-4抗体を用いた抗腫瘍効果を検討した。Fcγ受容体発現細胞を用いたADCC活性評価系を利用し検討した結果、clone B添加濃度依存的なFcγ受容体の活性化が観察され、ADCC活性を有することが示唆された。続いて、担癌マウスにおけるclone Bの抗腫瘍効果を検証した結果、投与量依存的な腫瘍サイズの縮小が見られた。さらなる抗腫瘍活性向上を目指しヒトキメラ化抗体に改変し、その効果の検討を行った。

作製したラット-ヒトキメラclone B (xi-clone B) の担癌マウスに対する抗腫瘍効果を検討したところ体重の減少は見られず、ラット抗体と比較し、2-3倍強い抗腫瘍活性が示された。したがってヒトキメラ化したclone Bは腫瘍増殖抑制効果が増強されたことがわかった。

本論文は臨床応用可能な抗腫瘍効果を有する抗体医薬の開発につながる有用な知見を含んでおり、博士学位にふさわしい内容であると判断した。