

Title	Eph receptor A10 の乳がん標的としての検証
Author(s)	長野, 一也
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/52257">https://doi.org/10.18910/52257</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

**博士論文**

**Eph receptor A10 の  
乳がん標的としての検証**

**2014 年**

**長野一也**

# 目次

略語一覧	2
緒論	4
本論	6
<b>第一章 EphA10 の発現・機能解析</b>	6
第一節 EphA10 の発現特性解析	7
第二節 がんにおける EphA10 の機能解析	16
第三節 EphA10 とリガンドとの相互作用解析	25
第四節 小括	29
<b>第二章 EphA10 に対する創薬コンセプトの構築と検証</b>	30
第一節 抗 EphA10 中和抗体を用いた創薬コンセプトの検証	31
第二節 乳がん以外のがん種における EphA10 の治療標的としての検証	46
第三節 EphA10 の細胞内ドメインの解析を目指した イントラボディ創製の基礎検討	54
第四節 小括	60
総括	62
結論	64
謝辞	65
参考文献	66

## 略語一覽

2-ME	: 2-mercaptoethanol
B buffer	: carbonate-bicarbonate buffer
BrdU	: bromodeoxyuridine
BSA	bovine serum albumin
Bsd	: blasticidin
cDNA	: complementary deoxyribonucleic acid
CMV	: cytomegalovirus promoter
CRPC	: castration-resistant prostate cancer
D-MEM	: dulbecco's modified eagle medium
DMSO	: dimethyl sulfoxide
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	: epithelial growth factor receptor
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	: epithelial-mesenchymal transition
ER	estrogen receptor
Fc	: fragment crystalizable
FCM	: flow cytometry
FCS	: fetal calf serum
FGFR	: fibroblast growth factor receptor
FITC	: fluorescent isothiocyanate
GPI	: glycosylphosphatidylinositol
HE	: hematoxylin and eosin
Her2	: human epithelial growth factor receptor-related 2
HRP	: horseradish peroxidase

IRES	: internal ribosomal entry site
LV	: lentivirus
MAPK	: mitogen-activated protein kinase
MCS	: multi-cloning site
MFI	: mean fluorescence intensity
MOI	: multiplicity of infection
OD	: optical density
PBS	: phosphate buffered saline
PBST	: phosphate buffered saline containing tween20
PCR	: polymerase chain reaction
PFA	: paraformaldehyde
PR	: progesterone receptor
scFv	: single-chain variable fragment
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SIN	: self-inactivating
SPR	: surface plasmon resonance
TBS	: tris-buffered saline
TBST	: tris-buffered saline containing tween20
TGFR	: transforming growth factor receptor
TK	: tyrosine kinase
TMB	: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNFR	: tumor necrosis factor receptor
Tris	: tris(hydroxymethyl)aminomethane
VEGFR2	: vascular endothelial growth factor receptor 2
VSV-G	: vesicular stomatitis virus G glycoprotein
YFP	: yellow fluorescent protein

## 緒論

乳がんは、女性が最も罹患する割合の高いがんであり、患者数は年々増加している<sup>1</sup>。そのため現在では、生涯に乳がんを患う日本人女性は、14人に1人（米国の女性では、6人に1人）とも言われ、乳がんは女性であれば誰もが患う可能性のある疾患になりつつある<sup>1</sup>。そのうえ、死亡者数も増加の一途を辿っており<sup>1</sup>、乳がんに対する治療成績の向上が求められている。このような背景のもと、薬物療法においては、乳がん細胞の増殖に関わる Her2 受容体や、エストロゲン受容体 (ER)・プロゲステロン受容体 (PR) といったホルモン受容体を標的とした治療薬（抗 Her2 抗体や ER 拮抗薬など）が数多く開発され、適用症例の予後が改善されている<sup>2,3</sup>。しかし、これら薬剤が適用可能な Her2、または ER/PR 陽性症例であっても、治療を続けるうちに、その 2-3 割に耐性が生じ、これら治療薬を使用できなくなることが問題となっている<sup>4-6</sup>。また、Her2/ER/PR の発現が全て陰性の Triple Negative 乳がん (TNBC) に至っては、これら薬剤を適用することさえできず、有効な治療薬が乏しい現状にある<sup>7,8</sup>。そのため、上記の症例に対しては、新たな分子標的治療薬の創出に期待が寄せられており、その開発を推進するための治療標的の同定が求められている。

その点、当研究室ではこれまでに、治療標的の候補となる疾患関連蛋白質を効率よく探索可能な「抗体プロテオミクス技術」を開発してきた<sup>9</sup>。本技術の利点は、ファージ抗体ライブラリによる *in vitro* 抗体作製法をプロテオーム解析に応用することで、疾患試料で発現変動している疾患関連蛋白質候補に対して、蛋白質の解析に必須となるモノクローナル抗体を迅速に作製できる点にある。これにより、臨床検体が数多く搭載された組織マイクロアレイを免疫組織化学染色し、候補蛋白質の発現分布と各組織が有する臨床情報との相関を解析することで、数多くの候補の中から有用な蛋白質を効果的に絞り込むことを可能とした。したがって本技術は、同定された多種類の蛋白質を 1 つずつ検証して治療標的を決定していた従来法の非効率性の問題を打破する技術と考えられる。

そこで、乳がんの治療標的探索に本技術を適用したところ、正常乳腺組織では発現が認められず、乳がん組織でのみ発現している新規乳がん関連蛋白質を見出すことに成功している<sup>9</sup>。その中でも、特性が未解明であった Eph receptor A10 (EphA10)に着目して解析した結果、乳がんにおける病期の進行やリンパ節転移に EphA10 の発現が相関することをこれまでに明らかとし、EphA10 は乳がんの悪性化に関与している可能性があることを示してきた<sup>9</sup>。また、EphA10 は、16 種類のヒト正常組織において、精巣以外では発現が認められなかったことから、がん組織特異性の高い受容体であり、乳がんの有望な治療標的候補と考えられる。しかし、分子標的治療薬の薬効と副作用が、標的分子の発現組織とその機能に依存することを考えれば、上述した発現特性に関する若干の知見のみで EphA10 の治療標的としての適性を判定することは到底できない。したがって、EphA10 を標的とした治療法の開発を進めるためには、EphA10 の乳がん組織/正常組織での発現特性をより詳細に解析し、発現組織での機能を明らかにすることが必要である。

そこで本研究では、乳がんに対する新規分子標的治療薬の開発を目指して、EphA10 の乳がんにおける治療標的としての有用性を検証した。その結果、EphA10 が、有効な治療薬に乏しい TNBC 症例を含む全ての乳がんのサブタイプに対してがん組織特異的に発現し、がん細胞の増殖を促進させる機能を有していることを明らかにした。さらに、これらの知見から、「EphA10 のがん細胞増殖促進活性を抑制すること、あるいは EphA10 が発現するがん細胞を傷害することが抗腫瘍効果につながる」と推察されたため、この創薬コンセプトをゼノグラフトモデルマウスで実証し、EphA10 が乳がんにおける治療標的として有望であることを示した。

以上の研究成果は、乳がんに対する新たな分子標的治療薬の開発に資するものであり、がんの分子生物学としても興味深い知見と考え、ここに博士論文として纏めた次第である。

# 本論

## 第一章 EphA10 の発現・機能解析

Eph receptor ファミリーは、受容体型チロシンキナーゼとして知られ、現在ヒトでは 14 種類 (EphA1-A8/A10、EphB1-B4/B6) の分子から構成されている<sup>10, 11</sup>。Eph receptor ファミリーはこれまで、神経細胞の分化や増殖といった多様な生理機能を有していることが知られている<sup>12, 13</sup>。その一方でこれら受容体は、乳がんを始めとする各種がん組織で発現亢進しており<sup>14</sup>、がん細胞の増殖<sup>15, 16</sup>や浸潤<sup>17, 18</sup>、転移<sup>15, 19</sup>といった悪性形質に関与していることが報告されている。そのため、Eph receptor ファミリーは、がんの治療標的として注目されており、医薬品開発も進められている<sup>20-22</sup>。しかし、多様な生理機能を有するが故に、様々な正常組織での機能障害が懸念される。事実、EphA2 に対する抗体医薬の臨床試験 (第 I 相試験) では、EphA2 が発現する肝臓での障害などが一因となって、試験は中断され、実用化には至っていない<sup>23</sup>。

その点、EphA10 の正常組織での発現は、これまでに解析した 16 種類の正常組織の中では、精巣に限局されているため、乳がん患者の 99% を占める女性に対して、優れた治療標的候補と考えられる。しかし、EphA10 に関する知見は、当研究室で明らかにしてきた発現特性以外、ヒトの精巣に mRNA レベルで発現していることや、EphrinA3, EphrinA4, EphrinA5 が結合因子であることが報告されているに過ぎず<sup>24</sup>、未解明な部分の多い受容体である。そのため、EphA10 を治療標的とするには、これらの知見だけでは不十分であり、乳がん組織/正常組織における EphA10 の発現特性を新たに明らかにすると共に、これまでに得られている知見の確度を向上させる必要がある。さらに、EphA10 の機能に関しては、いまだ明らかにされていないため、発現組織における機能を解明することが課題となっている。



本観点から申請者は、EphA10 の治療標的としての有用性を明らかにすることを目的に、乳がんの中でも、EphA10 が発現している症例のサブタイプの特  
定やリンパ節転移との関連、数多くの正常組織における発現分布を解析した。  
また、EphA10 のがん組織における機能を明らかにするため、がんの代表的な  
悪性形質であり、Eph receptor ファミリーの関与も知られている「がん細胞の  
増殖性」に着目して解析を試みた。

## 第一節. EphA10 の発現特性解析

上述してきたように、当研究室ではこれまで、EphA10 の発現は、乳がん組  
織特異性が高く、乳がんの悪性形質と相関することを示してきた。しかし、  
EphA10 が有効で安全な分子標的治療薬の標的分子であることを実証するた  
めには、乳がん患者の中でも EphA10 が発現している症例の特徴を理解するこ  
とや、より多くの正常組織における EphA10 の発現分布を解析し、EphA10 を標  
的とした際に、正常組織が障害される可能性について検証する必要がある。

そこで本節では、様々な臨床情報を有した乳がん組織や多様な正常組織にお  
ける EphA10 の発現特性を解析することで、乳がんの治療標的としての適性を  
検証した。

### 【実験材料と方法】

#### 組織マイクロアレイ (TMA)

乳がんの各サブタイプにおける発現分布解析には、Her2・ER・PR の発現情  
報が既知の Breast cancer mid-density tissue array (BR1502)を用いた。ま  
た、リンパ節転移との関連解析には、上記の TMA に加え、Breast tumor survey  
tissue array (BR2087)を用いた。正常組織における発現分布解析には、FDA

normal organ tissue array of human (FDA997)を用いた。全て、US Biomax社より購入した。

### TMA の免疫組織化学染色

各 TMA を 60℃で 2 時間加温し、キシレンに 3 度浸すことでパラフィンを溶解した。次いで、無水エタノール、90%エタノール、75%エタノールに順次浸すことで各組織を親水化した。抗原の賦活化には、Pascal (DAKO)を利用し、DAKO Target Retrieval Solution pH 9 (DAKO)中で、125℃で 30 秒、90℃で 10 秒処理した。以降の免疫染色の一連の操作には DAKO AutoStainer (DAKO)を使用した。始めに、DAKO Peroxidase-Blocking Reagent (DAKO)を添加し、5 分間静置することにより、各組織の内因性ペルオキシダーゼを不活化した。次いで、10% BSA を TMA に添加し、30 分間静置することで組織中の蛋白質をブロッキングした。10% BSA を取り除いた後、Dako REAL Antibody Diluent (DAKO)で至適濃度に希釈した抗ヒト EphA10 抗体 (Abgent)を TMA に添加し、室温で 30 分間反応させた。Wash buffer (DAKO)で 3 回洗浄後、ENVISION+ System Labelled polymer-HRP (DAKO)を添加し、30 分間反応させた。再度、Wash buffer で 3 回洗浄後、DAB+ liquid (DAKO)を用いて発色させた。最後に、Dako Real Hematoxylin (Mayer's Hematoxylin)で核を対比染色した。

### TMA における EphA10 の発現解析

EphA10 の発現は、各組織中のがん細胞での発現割合を 3 段階【0 (0%)、1 (1-50%)、2 (51-100%)】、発現強度を 4 段階【0 (no signal)、1 (weak)、2 (moderate)、3 (marked)】でスコアリングし、その合計が 2 以下で陰性、3 以上で陽性と判定した。また、陽性症例中、スコア 3 を Weak、スコア 4 を Moderate、スコア 5 を Strong として解析した。

## 定量的 PCR

BioChain Institute, Inc より購入した各種ヒト正常組織由来 cDNA をテンプレートに、TaqMan Probe (ヒト EphA10: Hs01017018\_m1 / ヒト actin-beta: Hs99999903\_m1) と TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies) を加え、StepOne Plus Real Time PCR system (Life Technologies) を用いて PCR を実施した。CT 値は、ソフトウェアに付属の自動設定により決定した。EphA10 mRNA の発現レベルは、actin-beta の発現レベルで補正して示した。

## 統計解析

全ての統計解析は、GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc) を用いた。2 群間のパラメトリック解析、ノンパラメトリック解析には、それぞれ t-test、Mann Whitney test を利用した。また、3 群以上の解析には、One-way ANOVA (Dunnett) を適用した。いずれも、両側検定で  $p < 0.05$  で有意な差があると判定した。

## 【結果と考察】

### 乳がんの各サブタイプにおける EphA10 の発現分布解析

現在、乳がん患者は、抗 Her2 抗体と抗ホルモン剤の標的となっている Her2・ER・PR の発現プロファイルから、下記の Table 1 に示す 4 つのサブタイプに分類され、それぞれに適用可能な分子標的治療薬が決められている<sup>2, 3</sup>。

**Table 1 Applicable molecular targeted therapy in subtypes of breast cancer**

Subtype Name	Expression		Applicable molecular targeted therapy
	Her2	ER/PR	
Luminal A	—	+	Anti-hormone agent
Luminal B	+	+	Anti-Her2 mAb    Anti-hormone agent
Her2 enriched	+	—	Anti-Her2 mAb
TNBC	—	—	

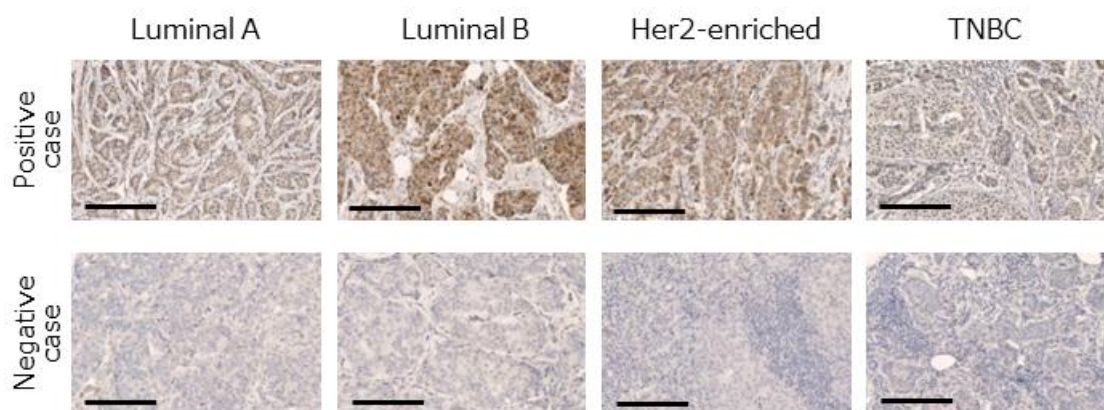
Chemotherapy is applicable in all subtypes of breast cancer

そのため、抗 Her2 抗体や抗ホルモン剤が適用可能なサブタイプ (Luminal A, Luminal B, Her2-enriched) に対して EphA10 が発現していれば、これら薬剤との併用療法や耐性症例に対する治療薬の標的候補として期待される。また、抗 Her2 抗体も抗ホルモン剤も適用することのできない TNBC 症例に対しては、First in Class の分子標的治療薬の標的となる可能性も考えられる。そこで本研究ではまず、既存の治療薬の標的と EphA10 の発現プロファイルを比較することによって、EphA10 の乳がんにおける治療標的としての有用性を評価した。

Her2・ER・PR の発現が既知の乳がん組織が 120 症例搭載された TMA を免疫組織化学染色することにより、各サブタイプにおける EphA10 の発現分布を解析した。その結果、EphA10 は、サブタイプの種類に依存せず、いずれのサブタイプにおいても 50-60%ほど発現していることが判明した (Fig. 1, Table 2)。さらに、各サブタイプにおける EphA10 の発現特性を詳細に評価するため、EphA10 陽性症例を発現レベルによって 3 段階 (Weak, Moderate, Strong) に分けて解析した。その結果、EphA10 は、4 つのサブタイプの中で、Her2-enriched に高発現症例が多い傾向が認められた。また、症例数は少なかつたものの、抗 Her2 抗体と抗ホルモン剤が共に適用できず、化学療法剤しか治療の選択肢のない TNBC 症例にも、高発現症例が認められたことは、治療標的候補の特性として、興味深い知見である (Table 2)。

Her2-enriched 患者には、抗 Her2 抗体を適用可能であるものの、その奏功率は 60-70%と<sup>25-27</sup>、全ての適用症例に効果が認められるわけではない。また、治療を続けるうちに、20-30%の割合で耐性が生じることも知られている<sup>6</sup>。このサブタイプは、ホルモン療法が不適用であることから、これら抗 Her2 抗体が無効な症例に対する治療薬の開発が望まれている。他方、TNBC 患者に関しては、もともと有効な治療薬がないうえ、新たな分子標的治療薬の候補として、poly-ADP ribose polymerase (PARP) 阻害剤が注目されてきたものの<sup>28, 29</sup>、第 III 相試験において、既存のレジメ (Gemcitabine / Carboplatin 併用療法) に PARP 阻害剤 (Iniparib) を追加しても無増悪生存期間などに有意な改善は認め

られず<sup>30</sup>、新たな治療標的の同定が近々の課題となっている。したがって EphA10 は乳がんの中でも治療薬開発のニーズがある症例に高発現している可能性があり、発現分布の観点から有望な治療標的候補であることが示唆された。



**Fig. 1. Immunohistochemistry (IHC) analysis of EphA10 expression in four subtypes of breast cancer tissues**

A breast cancer TMA with Her2, ER and PR expression information was immunostained via use of an anti-human EphA10 polyclonal antibody. upper- and lower-hand panels are representative images of an EphA10-positive and -negative case in luminal A, luminal B, Her2-enriched and TNBC tissues, respectively. Scale bar: 100  $\mu$ m.

**Table 2 EphA10 expression in four subtypes of breast cancer cases**

Subtype name	n	EphA10 expression n (Ratio)			
		Negative	Weak	Moderate	Strong
Luminal A	41	19 (46%)	16 (39%)	5 (12%)	1 (3%)
Luminal B	37	12 (32%)	16 (43%)	6 (16%)	3 (8%)
Her2-enriched	27	11 (40%)	7 (26%)	5 (19%)	4 (15%)
TNBC	15	5 (33%)	7 (47%)	2 (13%)	1 (7%)
Total	120	47 (39%)	46 (38%)	18 (15%)	9 (8%)

## 乳がんのリンパ節転移と EphA10 の発現との相関解析

Her2 受容体を発現する乳がん細胞はもともと、増殖性や転移性が高く、Her2 陽性症例の予後はこれまで不良だった<sup>31</sup>。それが、抗 Her2 抗体の開発によって大きく改善されているように、治療標的の特性として、乳がんの悪性形質との連関を理解することも重要である。その点、当研究室ではこれまでに、182 症例の乳がん組織の発現分布解析から、EphA10 の発現割合が、リンパ節転移陽性症例において、有意に高いことを見いだしている。そこで本研究では、この知見の確度を高めるため、症例数を増やして詳細に相関を解析した。

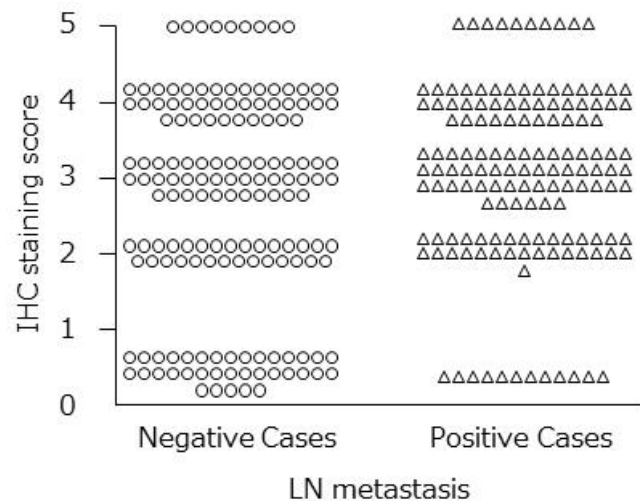
リンパ節転移に関する臨床情報が既知の 302 症例の乳がん組織が搭載されている TMA を免疫組織化学染色し、EphA10 の発現とリンパ節転移との連関を解析した。その結果、EphA10 の陽性率は、乳がんのリンパ節転移陰性症例に比較して、陽性症例において有意に高いことが示され、これまでの知見が強く支持された (Table 3)。そこで、この連関をさらに詳細に解析するため、EphA10 の発現量を染色強度と染色面積から 5 段階でスコア化し、各スコアとリンパ節転移との連関を評価した。その結果、EphA10 の発現量は、リンパ節転移陰性症例に比較して、陽性症例において有意に高いことが示された (Fig. 2)。これらの結果から、EphA10 の発現は、乳がんのリンパ節転移と相関していることが強く示唆された。

**Table 3 Correlation between EphA10 expression and lymph node (LN) metastasis**

LN Metastasis	n	EphA10 expression	
		Positive n (Ratio)	Negative n (Ratio)
Negative cases	154	90 (58%)	64 (42%)
Positive cases	148	105 (71%)	43 (29%)
Total	302	195 (65%)	107 (35%)

$p < 0.05$  (Chi-square test)

これまでも EphA2 や EphB3 が、がん細胞の運動性や浸潤性、上皮間葉転換 (EMT) を亢進させることで転移を促進させることや<sup>17, 18</sup>、EphrinB2 と EphB4 の相互作用によってリンパ管新生を促進させることが報告され<sup>32</sup>、転移における Eph receptor ファミリーの関与が注目されている。EphA10 の発現が転移と関連することから、EphA10 も転移を促進させる機能を有していることも考えられ、乳がんの悪性形質に関わる分子である可能性が考えられる。



**Fig. 2 EphA10 protein expression level analysis in LN positive and negative cases**

IHC staining total score (0, 2, 3, 4 and 5) was regarded as an indicator of EphA10 protein expression level. It was plotted for LN positive and negative cases. Differences were evaluated using the Mann Whitney test ( $p = 0.031$ ).

### EphA10 の正常組織での発現分布解析

安全性の高い分子標的治療薬を開発するためには、標的分子が、がん組織特異的に発現していることが重要である。その点、当研究室ではこれまでに、少なくとも 16 種類の主要な正常組織 (頭頸部・甲状腺・肺・乳腺・胃・脾臓・肝臓・大腸・腎臓・膀胱・前立腺・精巣・子宮・卵巣・リンパ節・皮膚) の中で、EphA10 は、精巣にしか発現していないことを明らかにしてきた。しかし、EphB4 が胸腺などの免疫組織<sup>33, 34</sup>、EphA2 や EphA4 が下垂体などの腺組織<sup>35, 36</sup> に発現しているなど、Eph receptor ファミリー分子の中には、これまでに検証していない正常組織に発現していることが報告されており、EphA10 もこれらの組織で発現していることが懸念される。そこで本研究では、EphA10 のがん組織特異的な発現を詳細に検討するため、上記の免疫組織や腺組織、発現

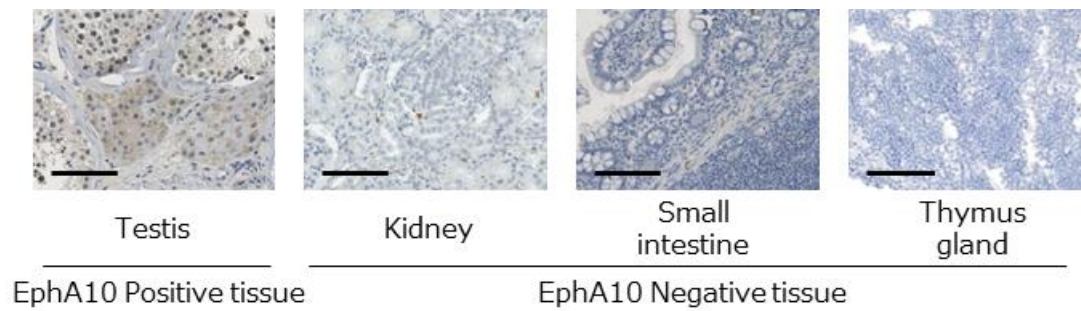
していた場合に死に直結する心臓など、20 種類の正常組織を新たに加えて、EphA10 の発現プロファイルを解析した。

合計 36 種類の正常組織が搭載された TMA を免疫組織化学染色した結果、EphA10 は、本試験においても精巣に発現が認められ、これまでに検証した精巣以外の 15 種類の正常組織では発現が認められないことを確認した (Table 4 左, Fig. 3)。さらに、今回初めて検証した 20 種類の正常組織に対しても、EphA10 の発現が認められないことが示された (Table 4 右, Fig. 3)。また、精巣以外の正常組織で EphA10 の発現が低いことは mRNA レベルでも確認している (Fig. 4)。以上の結果から、EphA10 の発現は、他の Eph receptor ファミリー分子とは異なって、がん組織特異性が高い特徴を有しており、女性患者がほとんどを占める乳がんに対して、格好の治療標的候補であることが示唆された。

**Table 4 Expression profile of EphA10 in various kinds of human normal tissues**

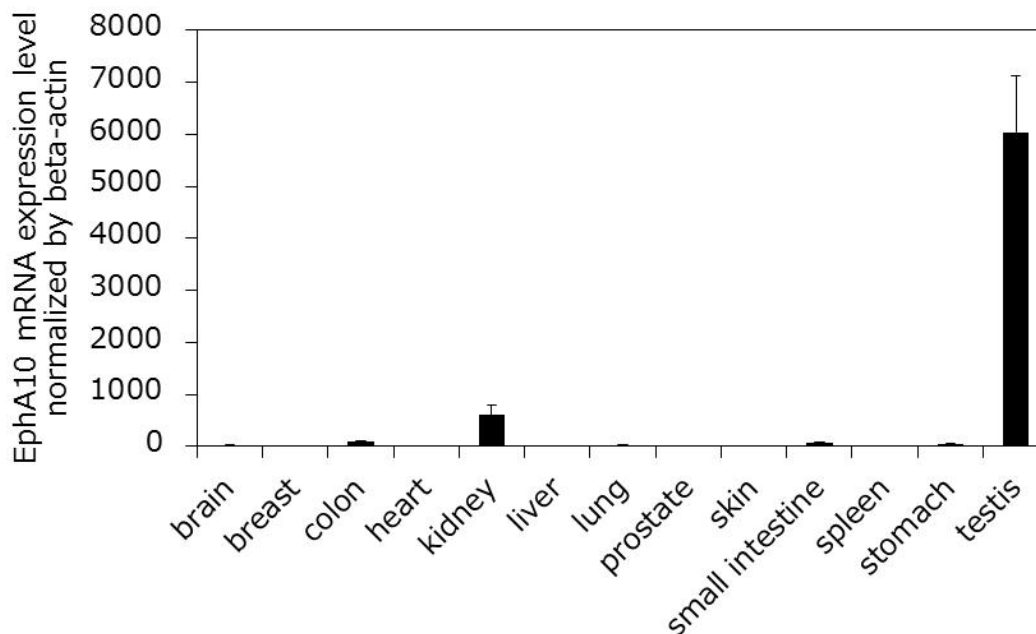
Tissue	EphA10 expression n (Ratio)	Tissue	EphA10 expression n (Ratio)
Bladder	0 / 3 ( 0%)	Adrenal grand	0 / 3 ( 0%)
Breast	0 / 3 ( 0%)	Bone marrow	0 / 3 ( 0%)
Colon	0 / 3 ( 0%)	Cerebellum	0 / 3 ( 0%)
Head and neck	0 / 3 ( 0%)	Cerebral gray matter	0 / 3 ( 0%)
Kidney	0 / 3 ( 0%)	Cerebral white matter	0 / 3 ( 0%)
Liver	0 / 3 ( 0%)	Esophagus	0 / 3 ( 0%)
Lung	0 / 3 ( 0%)	Eye	0 / 3 ( 0%)
Lymph node	0 / 3 ( 0%)	Heart	0 / 3 ( 0%)
Ovary	0 / 3 ( 0%)	Larynx	0 / 3 ( 0%)
Pancreas	0 / 3 ( 0%)	Mesothelium	0 / 3 ( 0%)
Prostate	0 / 3 ( 0%)	Nerve	0 / 3 ( 0%)
Skin	0 / 3 ( 0%)	Parathyroid gland	0 / 3 ( 0%)
Stomach	0 / 3 ( 0%)	Pituitary	0 / 3 ( 0%)
Testis	3 / 3 (100%)	Salivary gland	0 / 3 ( 0%)
Thyroid	0 / 3 ( 0%)	Skeletal muscle	0 / 3 ( 0%)
Uterus	0 / 3 ( 0%)	Small intestine	0 / 3 ( 0%)
		Spleen	0 / 3 ( 0%)
		Thymus gland	0 / 3 ( 0%)
		Tonsil	0 / 3 ( 0%)
		Uterine cervix	0 / 3 ( 0%)





**Fig. 3 EphA10 IHC staining in human normal tissues**

A normal TMA was immunostained via use of an anti-EphA10 polyclonal antibody. Representative images were shown. Scale bar: 100  $\mu$ m.



**Fig. 4 EphA10 mRNA expression levels in normal tissues.**

EphA10 mRNA expression in 13 forms of human normal tissues was quantified by real-time PCR. The expression level of EphA10 mRNA in each sample was normalized according to beta-actin mRNA expression within the same sample. Error bars represent mean  $\pm$  S.D. of triplicate assays.

## 第二節. がんにおける EphA10 の機能解析

がんに対する分子標的治療薬の開発にあたっては、治療標的のがんにおける機能も理解することが重要である。特に、治療標的候補が、がん細胞の増殖に関わる分子であれば、その機能を阻害することで抗腫瘍活性につながることを期待される。その点、Eph receptor ファミリーの中には、EphB4 を始め、乳がん細胞の増殖を促進させる機能を有していることが報告されており<sup>15, 16, 37</sup>、EphA10 も同様の役割を担っている可能性が考えられる。

そこで本節では、がんにおける EphA10 の機能を解析すべく、がん細胞の増殖性に着目して解析を試みた。

### 【実験材料と方法】

#### ヒト EphA10 発現レンチウイルスベクターの構築

レンチウイルスベクターの構築に使用するプラスミド (pCAG-HIVgp, pCMV-VSV-G-RSV-Rev, CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd) は、三好浩之先生 (理化学研究所バイオソースセンター) より供与いただいた。まず、ヒト EphA10 をコードする遺伝子を SIN (self-inactivating) レンチウイルスベクター (CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd) に BamH I と Xho I サイトを用いてライゲーションすることで、EphA10 発現カセットを有する SIN ベクタープラスミド (CSII-CMV-hEphA10-IRES2-Bsd) を構築した。VSV-G をエンベロープ蛋白とするレンチウイルスベクターは、過去の報告に基づいて作製した。10% FCS 及び抗生物質を含む D-MEM (Wako) 培地中で培養したヒト腎臓由来細胞株 293T 細胞に、パッケージングプラスミド (pCAG-HIVgp)、Rev 発現プラスミド (pCMV-VSV-G-RSV-Rev) 及び SIN ベクタープラスミド (CSII-CMV-hEphA10-IRES2-Bsd) をリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした。2日後に培養上清を回収し、 $50,000 \times g$  で2時間、 $20^{\circ}\text{C}$  で超

遠心することでヒト EphA10 遺伝子をコードしたレンチウイルス (LV-hEphA10)を濃縮した。続いて、Hanks' balanced salt solution (Wako) で再懸濁し、使用するまでの期間-80°C で保存した。ウイルスの力価は、段階希釈液を HeLaP4 に感染させた後に、hEphA10 陽性細胞数を FCM 解析することで算出した。

### ヒト EphA10 安定発現乳がん細胞株の作製

EphA10 低発現の MDA-MB-435 細胞 (ATCC)に、LV-hEphA10 を 100 MOI で添加し、遺伝子導入した。24 時間後に、4 µg/mL に調整した Bsd (Life Technologies) 含有培地に交換し、1 週間培養することで、遺伝子が導入された Bsd 耐性細胞をセレクションした。FACS Aria (BD Biosciences)により、EphA10 陽性細胞をソーティングすることで、ヒト EphA10 を安定に発現する MDA-MB-435 (MDA-MB-435<sup>EphA10</sup>)を樹立した。

### 細胞培養と試薬

上記で樹立したヒト EphA10 安定発現細胞株 (MDA-MB-435<sup>EphA10</sup>)は、10% FCS (Biowest)、1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Suspension (Wako)、2 µg/mL Bsd (Life Technologies)を含有した D-MEM 培地 (Wako) を用いて、継代維持した。親株の MDA-MB-435 は、10% FCS (Biowest)、1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Suspension (Wako)を含有した D-MEM 培地 (Wako)を用いて、継代維持した。また、p38 の阻害剤である SB203580 は、Promega より購入し、DMSO に溶解してストック溶液を調製した。

### 蛍光細胞染色

MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> および MDA-MB-435 細胞を Lab-Tek 8-well chamber

slide に  $1 \times 10^4$  cells/well になるように播種し、一晚培養した。細胞を PBS で 2 度洗浄した後、4% PFA を添加し、室温で 10 分間、固定した。固定された細胞を PBS で洗浄した後、5% FCS を添加し、室温で 30 分間、ブロッキングした。抗 EphA10 モノクローナル抗体とそのアイソタイプコントロール抗体を 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で添加し、1 時間作用させた。0.05% PBST で 3 度洗浄した後、2 次抗体として Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体を 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で添加し、1 時間作用させた。スライドは、DAPI 入りの Vectashield mounting medium (Vector laboratories Inc) で封入した。蛍光像は、Leica TCS SP2 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems) により取得した。

#### 細胞増殖性試験

$5 \times 10^4$  cells/mL に調整した MDA-MB-435 および MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> をそれぞれ、96 well culture プレート (Thermo Fisher Scientific Inc.) に 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  で播種し、一晚 37°C、CO<sub>2</sub> 存在下で反応させた。その後、FCS を含まない培地に交換し、24 時間スタベーションをかけた。終濃度 0.25、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように、FCS を含まない培地で希釈したヒト EphrinA3-Fc Chimera、ヒト EphrinA4-Fc Chimera、ヒト EphrinA5-Fc Chimera (R&D Systems) を添加し、37°C、CO<sub>2</sub> 存在下で 12 時間反応させた。細胞増殖は、Cell Proliferation ELISA, BrdU (Roche Applied Science) を用いて、BrdU の取り込みを指標に評価した。BrdU 標識溶液を終濃度 10  $\mu\text{M}$  となるように各 well に添加し、37°C、CO<sub>2</sub> 存在下で 2 時間インキュベートすることで BrdU を細胞に取り込ませた。BrdU 標識溶液を除去し、Fix Denat 溶液を 200  $\mu\text{L}/\text{well}$  で添加し、室温で 30 分インキュベートすることで、細胞を固定した。Fix Denat を除去した後、POD 標識抗 BrdU 抗体を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  で添加し、室温で 90 分反応させた。洗浄液で 3 回洗浄後、基質である TMB 試薬を添加し、適当な時間発色させた後、1 N 硫酸で反応を停止させた。各試料の吸光度を、450 nm (参照波長 : 690 nm)

で測定した。

尚、p38 の阻害剤を用いた試験では、EphrinA3-Fc, EphrinA4-Fc, EphrinA5-Fc で刺激する 2 時間前に、終濃度 40  $\mu\text{M}$  となるように作用させた。

#### Western Blot による MAPK のリン酸化の検出

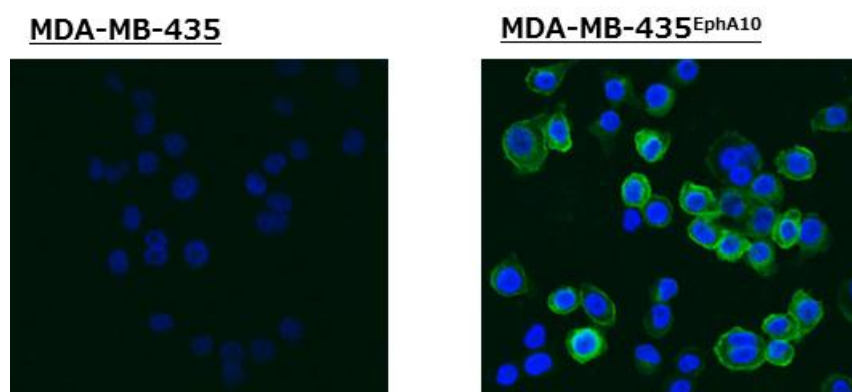
$2.5 \times 10^4$  cells/mL に調製した MDA-MB-435 または MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> を 12 well culture プレート (Thermo Fisher Scientific Inc.) に 2 mL/well で播種し、一晩 37°C、CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。その後、FCS を含まない培地に交換し、24 時間スタベーションをかけた。終濃度 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように FCS を含まない培地で希釈したヒト EphrinA3-Fc Chimera、ヒト EphrinA4-Fc Chimera、ヒト EphrinA5-Fc Chimera (R&D Systems) を、1 mL/well で添加した。0、3、10 分後の細胞を cold PBS で洗浄し、1 well あたり 100  $\mu\text{L}$  の Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Triton X-100、50 mM NaF、30 mM Na<sub>4</sub>O<sub>7</sub>P<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) で可溶化し、蛋白質を回収した。各試料 5  $\mu\text{L}$  と、5% 2-ME (ナカライテスク) 含有 Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories) を等量混合し、95°C で 10 分処理した後、各試料を SDS-PAGE した。電気泳動後のゲルを PVDF 膜 (GE Healthcare) に転写し、5% BSA/TBST (0.1% Tween 20 を含む Tris Buffer Saline) を添加してブロッキングした。5% BSA/TBST で 1,000 倍希釈した Anti-human Erk1/2 (Clone No: 137F5)、phospho-Erk (Clone No: D13.14.4E)、p38、phospho-p38 (Clone No: D3F9)(Cell Signaling Technology) を添加し、緩やかに振とうさせながら 4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、5% BSA/TBST で 2,000 倍希釈した HRP/anti-rabbit IgG antibody (Cell Signaling Technology) を添加し、振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。洗浄後、PVDF 膜を ECL plus Western Blotting Detection System (GE healthcare) で処理し、発光像を LAS-3000 (富士フイルム) により撮影した。

## 【結果と考察】

### EphA10 高発現/低発現細胞ペアの樹立

Eph receptor ファミリー分子は、受容体間でリガンド (Ephrin ファミリー分子) を共有していることが知られている<sup>38, 39</sup>。そのため、EphA10 を介した作用を効率良く解析するためには、EphA10 以外の Eph receptor ファミリー分子の発現が低く、EphA10 の発現レベルに差のある細胞ペアに対して、リガンドの作用を比較することが望まれる。そこで、EphA10 のがん細胞の増殖に及ぼす影響を解析するにあたって、まず、これら細胞ペアの樹立を試みた。

EphA10 とその他の Eph receptor ファミリー分子が共に低発現であった MDA-MB-435 細胞に対して、ヒト EphA10 遺伝子をコードしたレンチウイルスを感染させ、EphA10 安定発現細胞株 (MDA-MB-435<sup>EphA10</sup>) を樹立した。そこで、これら細胞における EphA10 の発現を免疫細胞染色法により評価した。その結果、樹立した MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> 細胞は、親株の MDA-MB-435 に比較して、EphA10 の発現が亢進していることが示され (Fig. 5)、EphA10 を介した作用の評価に適した細胞ペアであることが示唆された。

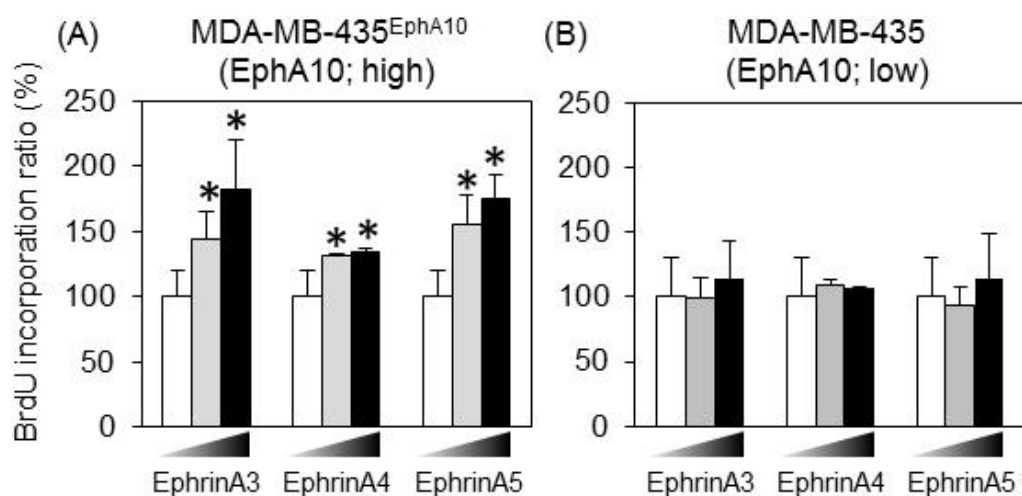


**Fig. 5 EphA10 expression in EphA10 transfectant cells and the parent cells**

EphA10 expressions in EphA10 transfectant cells (MDA-MB-435<sup>EphA10</sup>) and the parent cells (MDA-MB-435) were analyzed by immunocytofluorescent staining. Anti-EphA10 mAb or Alexa Fluor 488 conjugated anti-mouse IgG mAb were used as a primary or secondary mAb, respectively. Fluorescence was detected using confocal microscopy. Blue and green indicate nucleus (DAPI) and EphA10 (Alexa Fluor 488), respectively.

## リガンド刺激によるがん細胞の増殖に与える影響解析

EphA10 を介したがん細胞の増殖活性を評価するため、EphA10 に対する結合因子として知られていた EphrinA3, EphrinA4, EphrinA5 を<sup>24</sup>、上記で樹立した MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> と MDA-MB-435 にそれぞれ添加し、BrdU の取り込み量 (細胞増殖に伴う DNA 合成量) を比較した。その結果、EphrinA3, EphrinA4, EphrinA5 のいずれを添加しても、MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> の細胞増殖活性は濃度依存的に有意に促進された (Fig. 6 (A))。それに対して親株では、BrdU の取り込みにほとんど違いは認められなかった (Fig. 6 (B))。このことから、EphA10 は、EphrinA3, EphrinA4, EphrinA5 の刺激依存的にがん細胞を増殖させる機能を有していることが示された。また本知見によつて、EphrinA3, EphrinA4, EphrinA5 が、単に EphA10 の結合因子としてだけでなく、リガンドとして機能することも示された。



**Fig. 6 BrdU incorporation analysis in relation to EphA10 signaling**

After incubation of EphrinA3-Fc, EphrinA4-Fc or EphrinA5-Fc at a series of concentrations (white, gray or black bars indicate 0, 0.25, 4 µg/ml, respectively) with (A) MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> or (B) MDA-MB-435 cells for 12hr, cell proliferation mediated by EphA10 was evaluated by measuring the rate of BrdU incorporation (\* $p < 0.05$  vs non-treatment group, One-way ANOVA (Dunnett)).

本試験によって、EphrinA3, EphrinA4, EphrinA5 はいずれも EphA10 を刺激しうることが示された一方で、EphrinA4 に比べて、EphrinA3 や EphrinA5 で刺激した細胞の方が、その増殖活性は亢進していた。そこで、この活性の違いを評価する一環として、各リガンドの EphA10 への結合力を比較解析した。EphA10 を固相したセンサーチップに各リガンドを添加し、結合解離定数を算出した。その結果、解離速度定数 :  $k_d$  にはほとんど違いが認められなかったのに対し、結合速度定数 :  $k_a$  では EphrinA4 が EphrinA3 や EphrinA5 に比較して小さく、EphrinA4 は EphA10 への結合速度が遅いことが示唆された。そのため、各リガンドの EphA10 への結合力を示す平衡解離定数 ( $KD = k_d/k_a$ ) も EphrinA4 が他に比較して大きい傾向があり、この中で最も親和性が低い可能性が考えられた (Table 5)。したがって、各リガンドの結合力は、BrdU の取り込み活性と相関傾向にあったことから、リガンド間での細胞増殖活性の違いは、リガンドの EphA10 に対する結合力が要因の 1 つである可能性が考えられる。

**Table 5 Kinetic parameters of the interaction between EphA10 and its ligands**

	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	KD (M)
EphrinA3	$1.3 \times 10^6$	$1.9 \times 10^{-3}$	$1.4 \times 10^{-9}$
EphrinA4	$0.4 \times 10^6$	$1.4 \times 10^{-3}$	$3.8 \times 10^{-9}$
EphrinA5	$1.0 \times 10^6$	$0.9 \times 10^{-3}$	$0.9 \times 10^{-9}$

Indication of each kinetic parameter is as follows.

$k_a$ : association rate constant.

$k_d$ : dissociation rate constant.

KD: equilibrium dissociation constant.



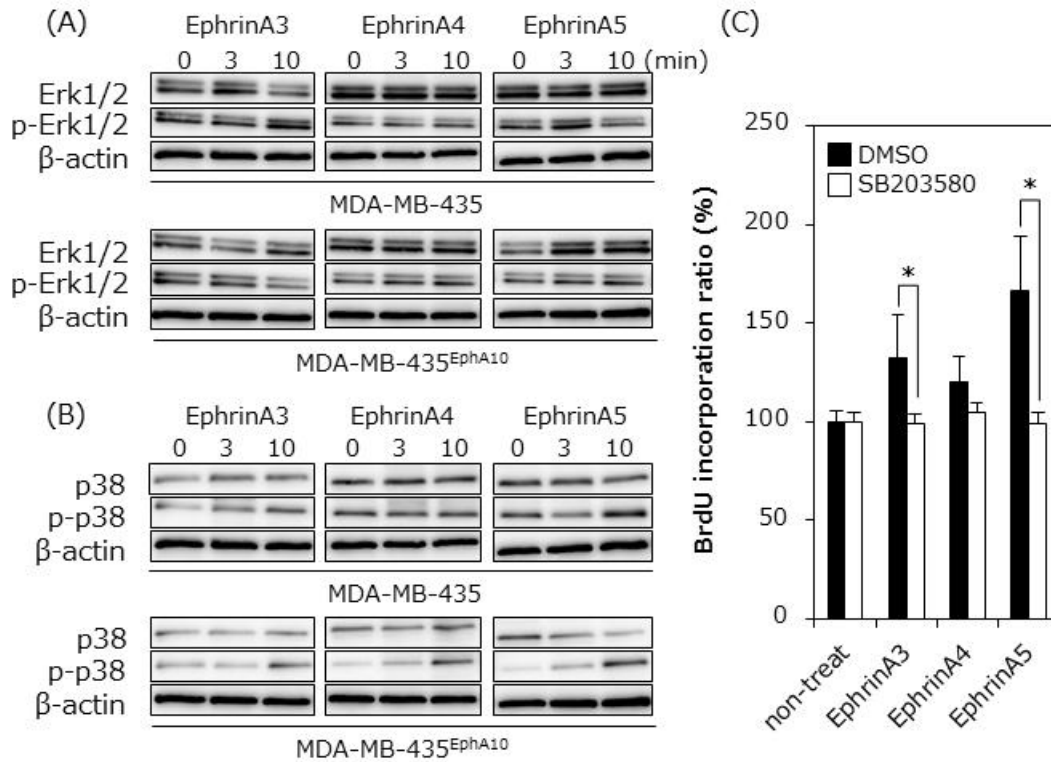
## 細胞内シグナル伝達経路の解析

チロシンキナーゼ型受容体による細胞増殖は、MAPK 経路を介していることが知られている。実際、EGFR や VEGFR といった増殖因子受容体は、Erk1/2 のリン酸化を介して細胞増殖を誘導していることが知られている<sup>40-42</sup>。また、TGFR や FGFR などは、p38 のリン酸化を介して、シグナルを伝達していることが報告されている<sup>43, 44</sup>。そこで申請者は、上記で観察された増殖促進活性を細胞内シグナル伝達の観点からも評価するため、Erk1/2 と p38 に着目し、それぞれのリン酸化に与える影響を解析した。

EphrinA3, EphrinA4, EphrinA5 を MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> と MDA-MB-435 にそれぞれ添加し、経時的にサンプリングした。各細胞中の Erk1/2 と p38 のリン酸化の程度を Western Blot 法により解析した結果、Erk1/2 では、両細胞間でリン酸化の程度にほとんど違いは認められなかった (Fig. 7 (A))。その一方で p38 では、MDA-MB-435 に比較して、MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> において、リガンド刺激によってリン酸化が経時的に亢進されている傾向が認められた (Fig. 7 (B))。以上の検討から、EphA10 シグナルは、p38 経路を介している可能性が考えられた。

そこで次に、EphA10 シグナルにおける p38 のリン酸化が、細胞増殖に関与していることを明らかにするため、p38 阻害剤 (SB203580) を用いて、細胞増殖活性を比較した。MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> にリガンドをそれぞれ作用させたところ、これまでの検討と同様に、細胞増殖活性が有意に亢進したのに対し、p38 の阻害剤を pre-treatment させることで、その活性は抑制された (Fig. 7 (C))。本結果から EphA10 は、リガンド刺激によって、p38 経路を介して細胞を増殖させることが明らかとなった。

現在、Eph receptor ファミリーを介した細胞増殖には、Erk1/2<sup>45</sup> や Cyclin D1<sup>46</sup> などの関与が知られているものの、p38 経路に関する報告はなく、上記の結果は、腫瘍生物学的な観点からも興味深い知見といえる。



**Fig. 7 Erk1/2 and p38 phosphorylation in MDA-MB-435 and MDA-MB435<sup>EphA10</sup> cells following exposure to EphA10 ligands.**

MDA-MB-435 and MDA-MB435<sup>EphA10</sup> cells were stimulated by EphrinA3, A4 or A5 (4  $\mu$ g/mL) for 0, 3 and 10 minutes. (A) In MDA-MB435 and MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> cells, detection of total Erk1/2, phosphorylated Erk1/2 and beta-actin at each time point was determined by Western blotting. (B) In MDA-MB435 and MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> cells, detection of total p38, phosphorylated p38 and beta-actin at each time point was analyzed. (C) In MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> cells, BrdU incorporation with various Ephrins was assessed plus/minus 40  $\mu$ M p38 inhibitor (SB203580). \* $p < 0.05$  (T-test).

### 第三節. EphA10 とリガンドとの相互作用解析

EphA10 のリガンドであることが明らかとなった EphrinA3, EphrinA4, EphrinA5 は、Ephrin A ファミリー (EphrinA1-A5)に属し、GPI アンカーによって細胞膜に連結された蛋白質として知られている<sup>11, 47, 48</sup>。Ephrin ファミリーも、Eph receptor ファミリーと同様に、種々のがん組織で発現亢進し、近接する細胞上に発現する Eph receptor と細胞間で相互作用することが報告されている<sup>11, 47, 48</sup>。

そこで本節では、EphA10 とリガンドとの相互作用機構を明らかにすることを目指し、乳がん組織における EphA10 と EphrinA3, EphrinA4, EphrinA5 の発現分布などを評価した。

#### 【実験材料と方法】

##### TMA の免疫組織化学染色

Breast cancer mid-density tissue array (BR1502)に対し、EphrinA3, EphrinA4, EphrinA5 に対する 1 次抗体としてそれぞれ、抗ヒト EphrinA3 抗体 (Abcam)、抗ヒト EphrinA4 抗体 (Abcam)、抗ヒト EphrinA5 抗体 (Abcam) を用いて、第一節と同様の方法で染色・解析した。

##### 細胞増殖性試験

MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> と MDA-MB-435 をそれぞれ、高密度条件下 ( $5 \times 10^5$  cells/mL)と低密度条件下 ( $2.5 \times 10^4$  cells/mL)で 96 well culture プレートに 100  $\mu$ L/well で播種した。4 日後、WST-8 試験により、各条件での親株に対するトランスフェクタント細胞の増殖活性を比較した。

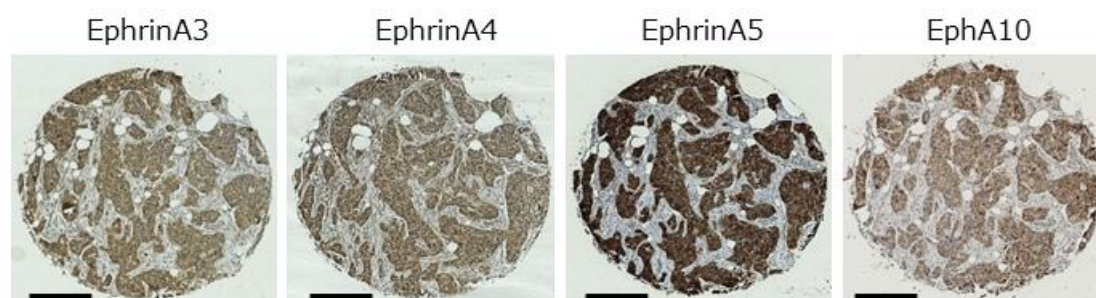
## 【結果と考察】

### リガンドの乳がん組織における発現分布解析

乳がん組織における EphA10 と各リガンドの発現を比較解析するため、同一ロットの TMA に対して、それぞれ免疫組織化学染色を実施した。TMA 解析の結果、乳がん組織には、EphA10 のみならず EphrinA3, EphrinA4, EphrinA5 のいずれも発現し、各リガンドと EphA10 が共に発現している症例も数多く認められた (Table 6)。さらに、興味深いことに、これら症例の EphA10 とリガンドの発現プロファイルが類似していたことから、EphA10 とリガンドががん細胞に共発現していることが示唆され、がん細胞上で相互作用していることが考えられた (Fig. 8)。

**Table 6 Expression profiles of EphA10 ligands in breast cancer tissues**

	EphrinA3		EphrinA4		EphrinA5	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
EphA10	61 (59%)	1 ( 1%)	60 (58%)	2 ( 2%)	49 (47%)	13 (13%)
	37 (35%)	5 ( 5%)	38 (36%)	4 ( 4%)	20 (19%)	22 (21%)
Total Cases	98	6	98	6	69	35



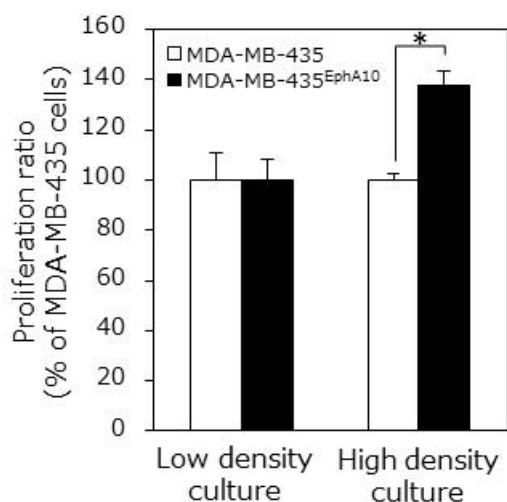
**Fig. 8 Expression analysis of EphrinA3, EphrinA4, EphrinA5 and EphA10 in breast tumor tissues.**

IHC analysis of EphA10 and its ligands, EphrinA3, EphrinA4 and EphrinA5 in serial sections from the same breast cancer tissue. Representative staining images were shown. Each protein was detected using an Envision+ system. Scale bar: 300  $\mu$ m.

## がん細胞同士の相互作用による増殖活性

上記の検討から、EphA10 とそのリガンドは、がん細胞膜上で相互作用することでがん細胞の増殖を促進していることが推察された。そこで、本仮説を検証するため、EphrinA3, EphrinA4, EphrinA5 が共に発現している MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> と MDA-MB-435 の細胞ペアを利用して、細胞上に発現している EphA10 とリガンドを相互作用させた際の細胞増殖に与える影響を解析した。

MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> と MDA-MB-435 をそれぞれ、細胞間で相互作用がおきやすい高密度条件下 ( $5 \times 10^4$  cells/well) と相互作用がおきにくい低密度条件下 ( $2.5 \times 10^3$  cells/well) で 96 well culture プレートに播種した。4 日後、WST-8 試験により、各条件での親株に対するトランスフェクタント細胞の増殖活性を比較した。その結果、低密度条件では、MDA-MB-435 と MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> の増殖性に違いは認められなかった。それに対して、高密度条件では、MDA-MB-435 に比較して、MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> の増殖性が有意に亢進していることが示された (Fig. 9)。これにより、EphA10 とリガンドは、細胞膜上で相互作用することで細胞を増殖させることが示唆された。尚、本結果が、播種細胞数の違いによる影響でないことを評価するため、細胞が接着した直後にも WST-8 試験を実施し、同数播種できていることを確認している。



**Fig. 9 Proliferation analysis by interaction between EphA10 and its ligand expressed on cancer cells**

MDA-MB-435 and MDA-MB-435<sup>EphA10</sup>, which express EphrinA3, A4 and A5, were seeded at  $2.5 \times 10^3$  cells/well (low density culture) and  $5 \times 10^4$  cells/well (high density culture), respectively. At day 4, proliferation in each cell were evaluated by WST-8 assay. Cell proliferation via EphA10 is described as the ratio of the activity in MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> against that in MDA-MB-435 cells. \* $p < 0.05$  (T-test)

これまでに、Eph receptor ファミリー/Ephrin ファミリーの中には、EphA2 と EphrinA1 などのように、がん細胞に共発現し、細胞上で相互作用していることが推察されている分子もあり<sup>49</sup>、EphA10 と EphrinA3, EphrinA4, EphrinA5 も同様に相互作用している可能性が考えられる。今後、血球系に発現するリガンドの関与なども検討する必要があるものの、本結果は、EphA10 が、リガンドとがん細胞上で相互作用することで、細胞増殖に関与している可能性を提示している (Fig. 10)。

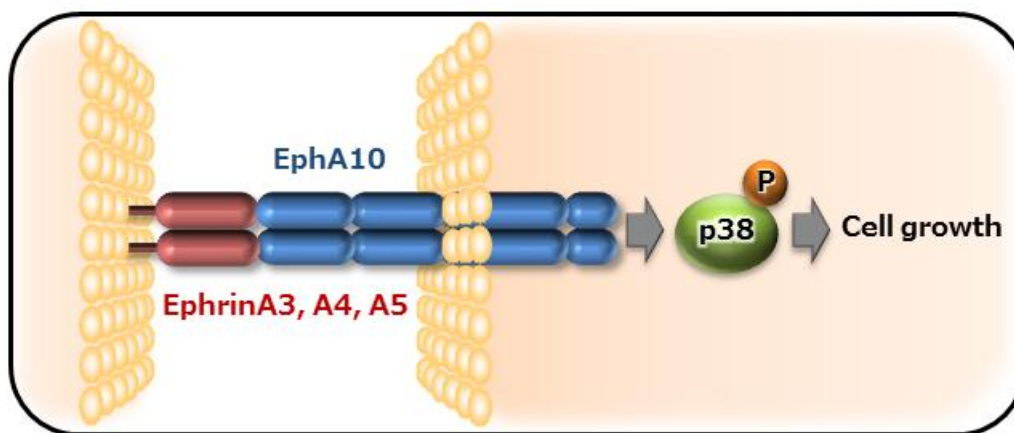


Fig. 10 EphA10 signaling model in cancer cell proliferation

## 第四節. 小括

本章では、EphA10 の治療標的としての有用性を検証するため、EphA10 の発現分布と機能を解析した。始めに、EphA10 発現乳がん症例の特徴を解析すべく、乳がんの各サブタイプにおける発現を評価したところ、EphA10 は、全てのサブタイプに発現していることが示された。特に、①Her2-enriched 患者に EphA10 高発現症例が多く認められること、②数は少ないものの、メディカルアンメットニーズの高い TNBC 症例にも高発現症例が観察され、EphA10 は抗 Her2 抗体が無効な症例や、いまだ有効な治療薬のない TNBC 症例に対する治療標的候補であることが示唆された。また、乳がん症例における EphA10 の発現は、乳がんの予後決定因子の 1 つであるリンパ節転移と有意に相関することが示され、EphA10 の発現が乳がんの悪性形質に関わることが示唆された。その一方で、36 種類の正常組織の中で、EphA10 は、精巣以外で発現が認められず、他の Eph receptor に比較してがん組織特異性に優れた受容体であることが明らかとなり、発現分布の観点から有望な治療標的候補であることが示唆された。

次に、EphA10 のがんにおける機能を解析した結果、EphA10 は、EphrinA3, EphrinA4, EphrinA5 の刺激によって、BrdU の取り込みを促進し、p38 のリン酸化を亢進させた。その一方で、p38 阻害剤存在下では BrdU の取り込みに有意な違いは認められなかったことから、EphA10 は、リガンド刺激依存的に、p38 経路を介してがん細胞を増殖させる機能を有していることが示唆された。

さらに、EphA10 と各リガンドは、乳がん組織/細胞に共発現し、MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> を細胞間で相互作用しやすい高密度条件下で培養したときのみ細胞増殖が亢進したことから、EphA10 はリガンドとがん細胞上で相互作用することによって、上記の細胞増殖活性を誘導している可能性が提示された。

以上の知見から、EphA10 が有するがん細胞の増殖機能を抑制すること、または EphA10 発現がん細胞を傷害することができれば、抗腫瘍効果に繋がるものが推察され、EphA10 は乳がんの有望な治療標的候補と期待される。

## 第二章 EphA10 に対する創薬コンセプトの構築と検証

分子標的治療薬の開発にあたって、その候補薬の患者に対する最終的な有効性と安全性は、臨床試験でしか明らかにすることはできない。しかし、ヒトへの投与を鑑みれば、全ての候補薬を闇雲に臨床試験する訳にはいかず、前臨床の段階で有効性と安全性を極力担保する必要がある。特に、欧米と比較して創薬開発規模の小さな本邦から医薬品を創出するためには、臨床試験にかかる膨大な費用もネックとなっており、開発の成功確率が高い薬剤を効率よく臨床試験することが求められている。本観点から、分子標的治療薬の開発を推進させるためには、治療標的候補の発現分布や機能を明らかにするだけでなく、それらの特性をもとに、創薬コンセプトを構築し、想定した治療効果が得られることや、副作用に繋がるような有害事象について検証する必要がある。

この点、EphA10 については、第一章において、がん組織特異的に発現し、リガンド刺激依存的にがん細胞を増殖させる機能をもつことを明らかにした。したがって、これらの結果から、EphA10 のがん細胞増殖機能を抑制すること、あるいは EphA10 が発現するがん細胞を傷害することができれば、抗腫瘍効果に繋がることが期待される。

そこで本章では、上記の創薬コンセプトの妥当性について、乳がんゼノグラフィトモデルマウスを用いて検証することで、EphA10 の治療標的としての適性を評価した。また、EphA10 の治療標的としての可能性をさらに追求するため、乳がん以外のがん組織における EphA10 の関与を解析した。



## 第一節. 抗 EphA10 中和抗体を用いた創薬コンセプトの検証

第一章で明らかとなった EphA10 の発現・機能特性をもとに、EphA10 を標的とした治療法の開発を前進させるためには、①EphA10 が有するがん細胞の増殖機能の抑制や、②EphA10 が発現するがん細胞の傷害によって、腫瘍の増殖が実際に抑制されることを実証する必要がある。この点、モノクローナル抗体は、標的とする受容体と結合することで、リガンドの結合<sup>50</sup> や受容体の二量体化<sup>51</sup>などを阻害し、受容体がもつ機能を中和することが可能である。またモノクローナル抗体は同時に、Fc領域を介して補体やNK細胞などを活性化させ、補体依存性細胞傷害活性 (CDC)<sup>52</sup> や抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC)<sup>53</sup> によって、抗原発現細胞を殺傷させる機能も有する。そのため mAb は、上記の創薬コンセプトを検証するにあたって、有用なツールと考えられる。

そこで本節では、EphA10 に対する中和抗体を作製・活用することで、上記の創薬コンセプトを検証し、EphA10 の治療標的としてのさらなる有用性を評価した。

### 【実験材料と方法】

#### 抗 EphA10 モノクローナル抗体 (Clone: LBR) の樹立

ヒト EphA10-Fc Chimera (R&D Systems) を等量の Titer Max Gold (Sigma-Aldrich Corporation) と混合し、エマルジョンを形成させた (10 µg/100 µL/mouse)。これを、Balb/c マウス (日本 SLC、雌性、6 週齢) の頸部皮下と左脚筋肉内 2 箇所ずつにそれぞれ 25 µL を投与した。さらに 2 週間おきに追加免疫を 3 回実施した。最終免疫 1 週間後に眼底採血により血清を回収し、EphA10 に対する抗体が誘導されていることを ELISA により確認したうえで、マウスから脾臓を回収した。脾臓細胞とミエローマ細胞を融合させ、96 well culture プレートに適当量播種した。培養後、各上清の EphA10 に対する結合性

を ELISA により 1 次スクリーニングした。次いで、陽性であった well 中の細胞を限界希釈し、各細胞から産生されるモノクローナル抗体の EphA10 に対する結合性を 1 次スクリーニングと同様の方法で評価した。尚、ハイブリドーマの作製は、医学生物学研究所に委託した。

#### Clone: LBR の調製

抗 EphA10 モノクローナル抗体 (Clone: LBR) は、以下の方法で腹水より調整した。まず、プリスタン (Wako) を Balb/c *nu/nu* マウス (日本 SLC、雌性、6 週齢) に 500  $\mu$ L/mouse で腹腔内投与した。その 1 週間後、Clone: LBR のハイブリドーマを  $1 \times 10^6$  cells/mouse に調整し、上記マウスの腹腔内に投与した。経時的にマウスを観察し、腹水が溜まり次第、抗凝固剤 (2.2 g のクエン酸三ナトリウムと 0.8 g のクエン酸一水和物、2.27 g のグルコースを 100 mL の超純水に溶解) を適量入れたチューブに回収した。回収した腹水は、10,000  $\times$  g、10 分間遠心し、上清を回収した。腹水中の Clone: LBR は、Protein A カラムを用いて精製し、透析により Saline に置換後、実験に供した。

#### Clone: LBR のアイソタイプの決定

Clone: LBR のアイソタイプは、IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche Diagnostic Corporation) を用いて決定した。抗マウス  $\lambda$  抗体及び抗マウス  $\kappa$  抗体が被覆されたラテックスビーズが添加されているチューブに Clone: LBR のハイブリドーマの培養上清を添加し、15-25 $^{\circ}$ C で 30 秒間インキュベートさせ、複合体を形成させた。ボルテックスによりビーズを再懸濁させた後、各アイソタイプ (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA 及び  $\kappa$  鎖、 $\lambda$  鎖) に対する抗体が被覆されているストリップを浸した。5-10 分以内に各アイソタイプを示すセクションに現れたバンドの場所から、抗体の軽鎖と重鎖のアイソタイプを決定した。

## Clone: LBR の配列解析

Clone: LBRの可変領域 (VLとVH)の配列は、5'-Full RACE Core Set (Takara Bio)を用いて解析した。以下に概略を示す。上記で決定したアイソタイプの結果をもとに、IgG2bのCH1とκのCLにアニーリングする5'末端がリン酸化された Reverse Primer (IgG2b-CH1-P; 5'-ACAGTCACTGAGCTGC-3', κ-CL-P ; 5'-TGCTGTAGGTGCTGTC-3') を設計し、Clone: LBR のハイブリドーマから抽出した total RNA を逆転写した。尚、IgG2bのCH1とκのCLの遺伝子配列は、<http://imgt.cines.fr/>を参照した。上記の Kit に付属されている RNase H を用いて、Hybrid RNA を分解した後、T4 RNA Ligase により一本鎖 cDNA を環化及びコンカテマー化した。以下に示す IgG2bのCH1とκのCLにアニーリングする Primer セットを用いて、Nested PCR により目的遺伝子を増幅した。予め組み込んであった Xho I と Bam HI サイトを利用して pIRES2-DsRed Express ベクターに組み込み、VL と VH の配列を解析した。

- IgG2b-CH1-S1 ; AGCCAGTGA CTGTGACTTGG
- IgG2b-CH1-A1 ; GGAGGAAC CAGTTGTATCTCCAC
- IgG2b-CH1-S2-2 ;  
AAAAAAAAAACTCGAGCCTGCAGTCTGGACTCTACAC
- IgG2b-CH1-A2-2 ;  
TTTTTTTTTTGAATTCAGTGGGGGTGTTGTTTTGG
- κ-CL-S1 ; GGAAGATTGATGGCAGTGAACG
- κ-CL-A1 ; TTAAGTCTCACTGGATGGTGG
- κ-CL-S2-2 ;  
AAAAAAAAAACTCGAGAGTTGGACTGATCAGGACAGC
- κ-CL-A2-2 ;  
TTTTTTTTTTGAATTCGATGGATACAGTTGGTGCAGC

#### Clone: LBR の Eph receptor A ファミリーに対する特異性評価

ヒト EphA1-Fc Chimera、ヒト EphA2、ヒト EphA3-Fc Chimera、ヒト EphA4-Fc Chimera、ヒト EphA5、ヒト EphA6-Fc Chimera、ヒト EphA7-Fc Chimera、ヒト EphA8-Fc Chimera、ヒト EphA10-Fc Chimera (R&D Systems) をそれぞれ、0.05 M B buffer (Sigma-Aldrich Corporation) で 1 µg/mL に希釈した。これを Maxisorp 96well プレート (Thermo Fisher Scientific Inc.) に 100 µL/well で添加し、4℃で一晩静置させることで固相した。翌日、4% Block Ace (DS ファーマバイオメディカル) を 200 µL/well で添加し、室温で 2 時間インキュベートすることで、ブロッキングした。0.4% Block Ace で 500、100、20 ng/mL に希釈した Clone: LBR を 100 µL/well で添加し、室温で 1 時間反応させた。0.05% PBST で 3 回洗浄後、0.4% ブロックエースで 10 µg/mL に希釈した anti-mouse IgG mAb/Alexa488 (Life Technologies) を 100 µL/well で添加し、室温で 1 時間反応させた。インキュベート後、0.05% PBST で 3 回洗浄し、PBS を 100 µL/well 添加した後、蛍光を ARVO MX (Perkin Elmer) により測定した。

#### Clone: LBR の EphA10 に対する結合力評価

ヒト EphA10-Fc Chimera (R&D Systems) をセンサーチップ CM5 (GE healthcare) 上に、Amine Coupling Kit (GE healthcare) を用いて、固相した。Clone: LBR は、HBS-EP buffer で 400 nM に調製したサンプルを、2 倍ずつ 5 段階に希釈 (400, 200, 100, 50, 25 nM) し、薄いサンプルから順次、Biacore 3000 (GE healthcare) により計測した。各速度論的パラメーターは、測定された各濃度の結合-解離曲線にマルチサイクルカインेटィクス解析プログラム中の Bivalent analyte モデルをフィッティングさせて算出した。

#### Clone: LBR のマウス EphA10 に対する交差性評価

ヒト及びマウス EphA10-pIRES2-DsRed-Express をそれぞれ、Fugene HD (Roche Diagnostic Corporation)を用いて、293T 細胞にトランスフェクションした。24 時間後、各作用群の 293T 細胞  $1 \times 10^6$  cells あたり、Clone: LBR、Mouse IgG2b Isotype control antibody (eBioscience)をそれぞれ 1  $\mu$ g 添加し、4°C、暗所で 30 分間反応させた。冷 PBS で 3 回洗浄後、anti-mouse IgG mAb/Alexa488 (Life Technologies)を  $1 \times 10^6$  cells あたり 1  $\mu$ g 添加し、4°C、暗所で 30 分間反応させた。再度、冷 PBS で 3 回洗浄後、500  $\mu$ L の FCM buffer (2 mM EDTA、0.5% BSA in PBS)で懸濁し、FACS Canto (BD Biosciences)にて測定、解析した。

#### Clone: LBRのCDC活性評価

Cell Dissociation Solution Non-enzymatic (Sigma-Aldrich Corporation)を用いて非酵素的に剥離したMDA-MB-435<sup>EphA10</sup>を  $2 \times 10^4$  cells/wellで、96 well cultureプレート (Thermo Fisher Scientific Inc.)に播種し、一晚培養した。培養液を取り除いた後、Clone: LBRおよびIsotype Control抗体をそれぞれ終濃度2, 10  $\mu$ g/mLで添加した。さらに、補体成分として、マウス血清を添加し、24時間作用させた。各群の細胞傷害活性は、WST-8試験により評価した。

#### Clone: LBR の中和活性評価

$5 \times 10^4$  cells/mL に調製した MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> および MDA-MB-436 をそれぞれ、96 well culture プレート(Thermo Fisher Scientific Inc.)に 100  $\mu$ L/well で播種し、一晚 37°C、CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。翌日、FCS を含まない培地に置換し、24 時間スタベーションをかけた。終濃度 4  $\mu$ g/mL となるように調製したヒト EphrinA3-Fc Chimera、ヒト EphrinA4-Fc Chimera、ヒト EphrinA5-Fc Chimera (R&D Systems)と、終濃度 20  $\mu$ g/mL になるように調

製した Clone: LBR を添加し、37℃、CO<sub>2</sub> 存在下で 12 時間反応させた。細胞増殖阻害活性は、第一章、第二節の「細胞増殖性試験」に準じ、Cell Proliferation ELISA, BrdU (Roche Applied Science)を用いて評価した。

#### MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> のゼノグラフトモデルマウスの作製

MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> を Cell Dissociation Solution Non-enzymatic 1× (Sigma-Aldrich Corporation)を用いて非酵素的に剥離し、Hanks' balanced salt solution (Life technologies)で  $1 \times 10^8$  cells/mL に調整した。細胞懸濁液 50  $\mu$ L に等量の Matrigel Basement Membrane Matrix Phenol Red Free (BD Biosciences)と混合し、日本 SLC より購入した BALB/c *nu/nu* マウス (6 週齢、メス)の fat pad に同所性移植した。その後、腫瘍が生着するまで経時的に観察した。

#### Clone: LBR の腫瘍集積性及び正常組織への分布解析

Clone: LBR、及び Isotype Control 抗体をそれぞれ Alexa Flour 647 carboxylic acid, succinimidyl ester (Life technologies)で標識した。各蛍光標識抗体の Fluorescent intensity/Protein 比を算出し、蛍光強度を揃えて MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> ゼノグラフトモデルマウスに尾静脈内投与(200  $\mu$ g/mouse)した。各マウスの蛍光量を経日的に OV110 in vivo 生体観察システム (Olympus)にて測定し、腫瘍組織への集積性を以下の方法で定量した【腫瘍組織への集積 = (腫瘍組織における平均蛍光強度 - バックグラウンドの平均蛍光強度)/(腫瘍組織と対称の位置にある皮膚の平均蛍光強度 - バックグラウンドの平均蛍光強度)】。4 日目に、マウスから各臓器 (脳、心臓、腎臓、肝臓、卵巣、肺、小腸、脾臓、腫瘍)を摘出し、各平均蛍光強度を測定・比較した。

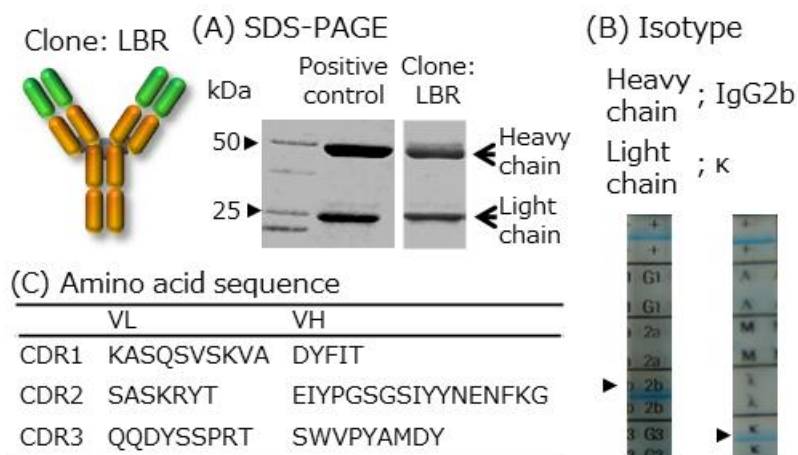
## Clone: LBR による抗腫瘍効果の評価

MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> ゼノグラフトモデルマウスの腫瘍径が 100 mm<sup>3</sup> 程度になった時点を Day 0 とし、Saline (大塚製薬)、Isotype control 抗体 (400 μg/mouse)、Clone: LBR (400 or 200 μg/mouse) をそれぞれ週一回、尾静脈内に投与し、経時的に腫瘍径と体重を測定した。腫瘍体積は、(短径)<sup>2</sup> × (長径) / 2 により算出した。最終投与翌日の Day 56 には腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定した。

### 【結果と考察】

#### 抗 EphA10 モノクローナル抗体の樹立と特性評価

EphA10 に対する中和抗体を作製するため、ヒト EphA10-Fc 蛋白質を免疫したマウスから、ハイブリドーマ法によって、独自に抗 EphA10 抗体 (Clone: LBR) を樹立した (Fig. 11)。



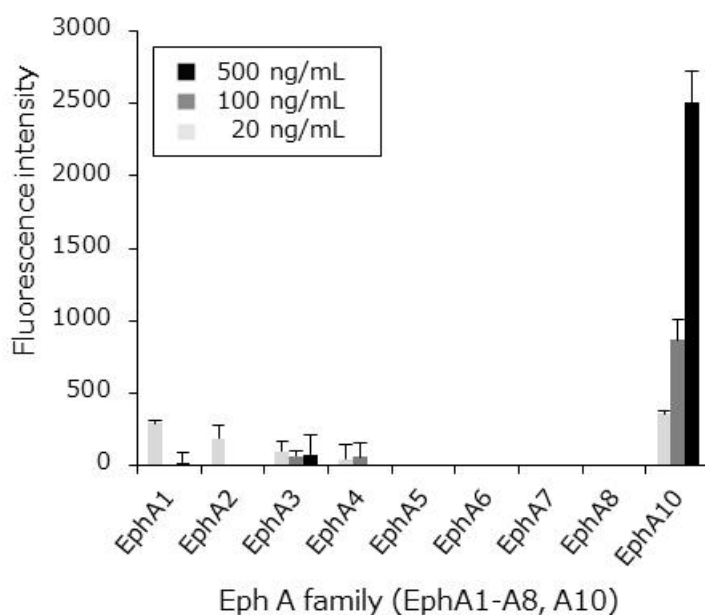
**Fig. 11**  
**Development of anti-EphA10 mAb (Clone: LBR)**

(A) SDS-PAGE image of Clone: LBR. Positive control is anti-Her2 mAb. (B) Isotype of Clone: LBR. (C) amino acid sequence of Clone: LBR

そこで、Clone: LBR が、創薬コンセプトの検証にあたって、ゼノグラフトモデルマウスにおける体内分布解析や治療実験に利用可能な抗体であることを評価するため、Clone: LBR の①特異性、②結合力、③細胞上に発現するヒト・マウス EphA10 との交差性、④補体依存性細胞傷害活性、⑤中和活性を評価した。

始めに、Clone: LBR の特異性を評価するため、Eph A receptor (EphA1-A8, A10)に対する結合性を ELISA により解析した。その結果、Clone: LBR は EphA10 に対して添加濃度依存的に結合性を示したのに対し、その他の受容体には結合性が認められなかった。したがって、Clone: LBR は EphA10 に対して特異性の高い抗体であることが示唆された (Fig. 12)。

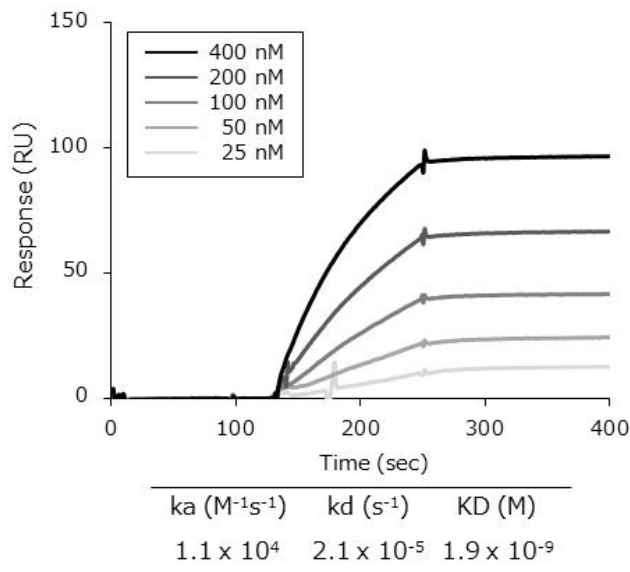
次に、Clone: LBR の結合力を評価するため、SPR 法により結合速度定数を算出した。EphA10-Fc 蛋白質を固相したセンサーチップ上に、各濃度の Clone: LBR を添加し、それぞれの結合・解離曲線から平衡解離定数 (KD)を算出した結果、Clone: LBR の EphA10 に対する KD は、1.9 nM であった (Fig. 13)。Her2 に対する抗体医薬 Trastuzumab や VEGF に対する抗体医薬 Bevacizumab の KD がそれぞれ、1-5 nM<sup>53</sup>、1 nM であることが報告されていることから<sup>50</sup>、既存の抗体医薬と同等の結合活性を有していることが示された。



**Fig. 12 Specificity evaluation of anti-EphA10 mAb by ELISA**

Anti-EphA10 mAb, at a series of concentrations, was incubated with each human EphA recombinant protein. Binding of the mAb towards each receptor was determined by fluorescent intensity measurements. Error bars represent mean  $\pm$  S.D. of triplicate assays.

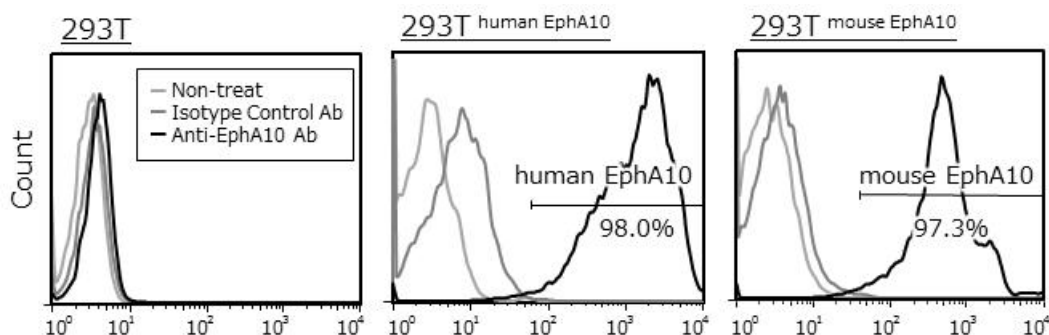




**Fig. 13 Affinity evaluation of anti-EphA10 mAb by SPR analysis.**

Anti-EphA10 mAb, at a series of concentrations, was exposed to a CM5 sensor chip containing immobilized human EphA10-Fc chimera. Association and dissociation curves in respect to interaction of anti-EphA10 mAb with EphA10 were obtained. The kinetic parameters of these interactions were calculated using a multi-cycle kinetic analysis method.

続いて、細胞上に発現するヒトおよびマウス EphA10 への交差性を明らかにするため、293T 細胞にヒトおよびマウス EphA10 をそれぞれ発現させ、Clone: LBR の結合性を FCM 解析により評価した。その結果、Clone: LBR は、293T 細胞には結合性が認められなかったのに対して、ヒトおよびマウス EphA10 を発現させた 293T 細胞では共に結合した。したがって、Clone: LBR は、細胞上に発現するヒトおよびマウス EphA10 に対して、交差性をもった抗体であり、マウスにおける Clone: LBR の体内分布も解析可能であることが示唆された (Fig. 14)。



**Fig. 14 Binding of anti-EphA10 mAb towards human or mouse EphA10 expressed in cells by FCM analysis**

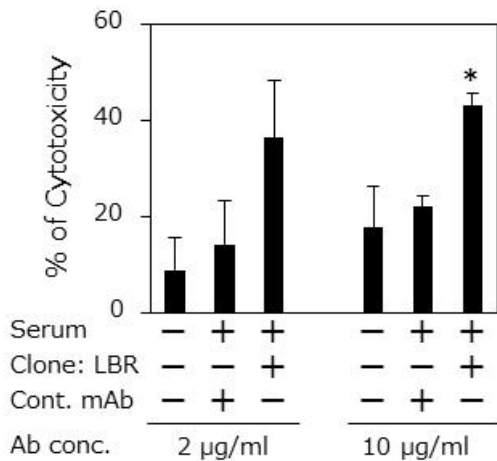
A human or mouse EphA10 expressing plasmids were transfected into 293T cells, respectively. Anti-EphA10 mAb or the isotype control mAb was added to 293T, 293T<sup>human EphA10</sup> and 293T<sup>mouse EphA10</sup> cells, respectively. Black, dark gray and light gray lines showed anti-EphA10 mAb-treated, the control mAb-treated and non-treatment groups, respectively.

次に、EphA10が発現するがん細胞に対する傷害活性を評価する一環として、補体依存性細胞傷害活性を解析した。MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> 細胞に Clone: LBR およびコントロール抗体を添加した。ここに、補体を含むマウス血清を作用させ、24 時間後の細胞傷害活性を WST-8 試験により評価した。その結果、コントロール抗体添加群に比較して、Clone: LBR 添加群において、細胞傷害性が有意に高いことが示された。また、この作用は、Clone: LBR 単独添加群に比較しても有意であったことから、Clone: LBR は、CDC 活性により EphA10 発現細胞を殺傷する作用を有していることが示された (Fig. 15)。また、Clone: LBR の Fc 領域の配列解析から、Clone: LBR のアイソタイプは、IgG2b であることを明らかにしている (Fig. 11 (B))。IgG2b は、CDC のみならず ADCC も誘導することが知られているため、Clone: LBR は、CDC/ADCC の両作用によって、EphA10 発現がん細胞を傷害することが考えられる。

最後に、EphA10 のがん細胞増殖機能に対する Clone: LBR の中和活性を検証するため、リガンド刺激依存的な細胞増殖作用に対する阻害活性を評価した。その結果、MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> 細胞に、各リガンドを添加することによって誘導された細胞増殖活性は、Clone: LBR との共添加によりいずれも有意に抑制された。また、Clone: LBR 単独添加群では、細胞増殖活性に影響を与えなかったことから、Clone: LBR は、リガンド刺激による EphA10 の細胞増殖活性を中和可能な抗体であることが示唆された (Fig. 16 (A))。さらに、EphA10 を内在的に発現する MDA-MB-436 細胞でも同様に試験を実施したところ、リガンドの添加によって、本細胞の増殖活性が有意に促進され、その作用は、Clone: LBR との共添加により抑制された (Fig. 16 (B))。本結果から乳がん細胞は、内在的に発現する EphA10 を介して、増殖する機構を有していることに加え、Clone: LBR はその活性を抑制することが可能な抗体であることが示された。

以上の検討から Clone: LBR は、細胞に発現するヒトおよびマウス EphA10 に対して高い特異性と親和性を有し、EphA10 が有するがん細胞の増殖活性を

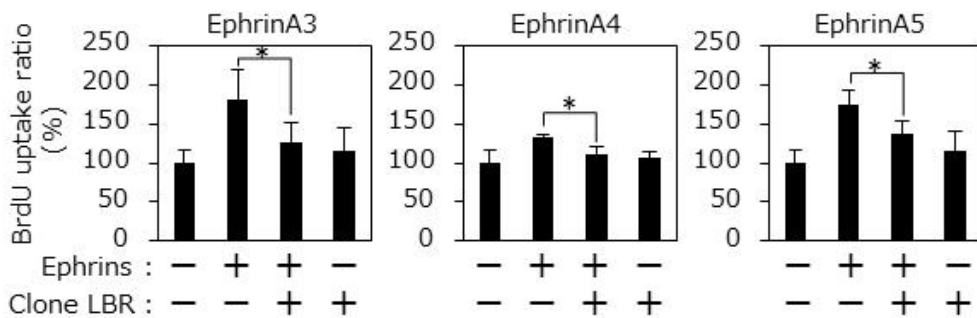
抑制しうるうえ、EphA10 発現細胞を傷害することが可能な抗体であることが示された。これにより、本抗体は、EphA10 を標的とした創薬コンセプトを検証するにあたって、ゼノグラフトモデルマウスでの抗腫瘍効果を解析するための有用な解析ツールであることが示された。



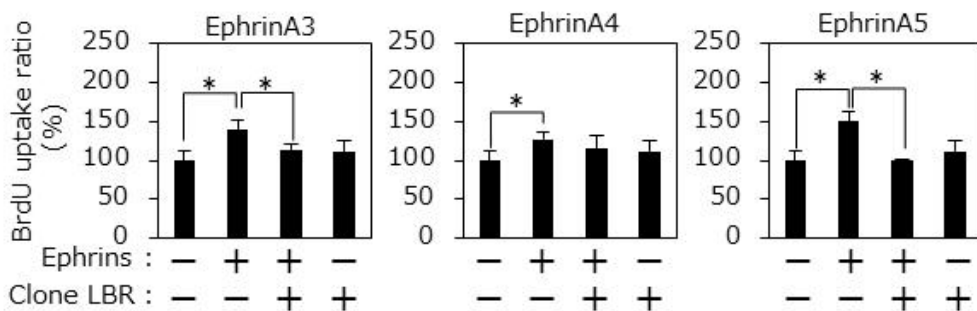
**Fig. 15 CDC effects of anti-EphA10 mAb on EphA10 positive cells**

Anti-EphA10 mAb or the isotype control mAb (2 and 10 µg/ml) with/without mouse serum as complements were added to MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> cells. After 24 hr incubation, CDC effects were assessed by WST-8 assay. \*  $p < 0.05$  vs the isotype control mAb with mouse serum (One-way ANOVA (Dunnett)).  $n = 3$  in each group. Error bars represent the S.D.

(A) MDA-MB-435<sup>EphA10</sup>



(B) MDA-MB-436



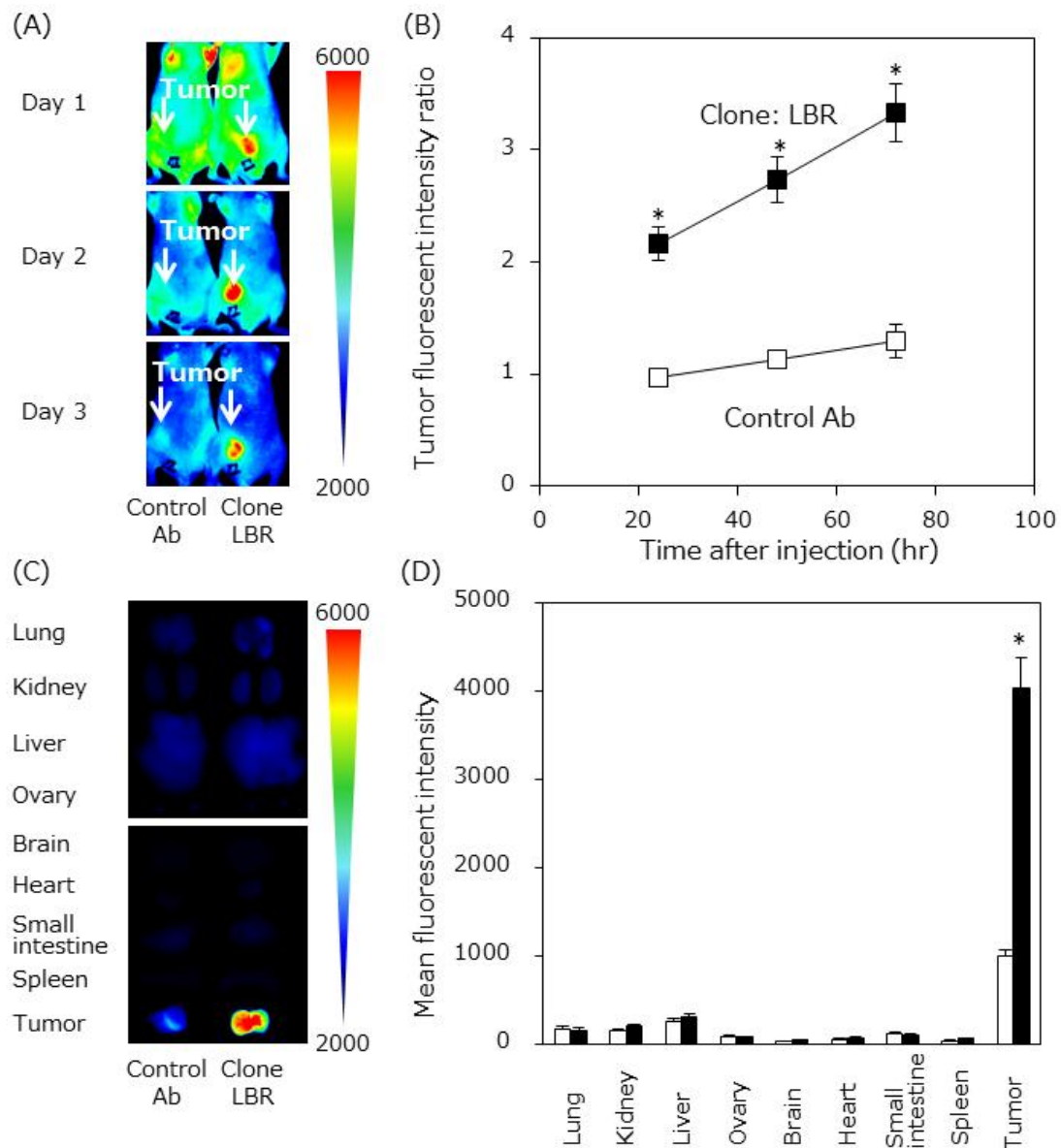
**Fig. 16 Neutralizing activity analysis of anti-EphA10 antibody (Clone: LBR)**

EphrinA3-Fc, EphrinA4-Fc and EphrinA5-Fc (4 µg/ml) and/or anti-EphA10 mAb (20 µg/ml) were incubated with (A) MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> or (B) MDA-MB-436 cells for 12hr. Cell proliferation and inhibition effects were analyzed by measuring the rate of BrdU incorporation (\*  $p < 0.05$ , One-way ANOVA (Dunnett)). Error bars indicate the mean + S.D.

## ゼノグラフトモデルマウスにおける Clone: LBR の体内分布解析

EphA10 を標的とした創薬コンセプトを検証するには、Clone: LBR が、腫瘍組織に移行する必要がある。そこで、ゼノグラフトモデルマウスにおける Clone: LBR の腫瘍集積性および体内分布を評価した。MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> を同所性移植したメスのゼノグラフトモデルマウスに、蛍光標識した Clone: LBR とコントロール抗体をそれぞれ尾静脈内投与し、各抗体のゼノグラフトモデルマウスにおける分布を経時的に観察した。その結果、コントロール抗体を投与したマウスに比較して、Clone: LBR を投与したマウスにおいて、腫瘍組織で顕著な蛍光が認められた (Fig. 17 (A))。そこで、腫瘍への集積性を定量したところ、経時的にみても、コントロール抗体に比較して、Clone: LBR が腫瘍組織に有意に集積していることが示された (Fig. 17 (B))。また、Clone: LBR の各臓器への分布を明らかにするため、主要な臓器を摘出して、その蛍光量を比較した。その結果、Clone: LBR は、上記の結果と同様に、コントロール抗体と比較して、腫瘍組織に集積していることが確認された一方で、腫瘍組織以外の 8 種類の正常臓器には有意な集積が認められなかった (Fig. 17 (C) (D))。

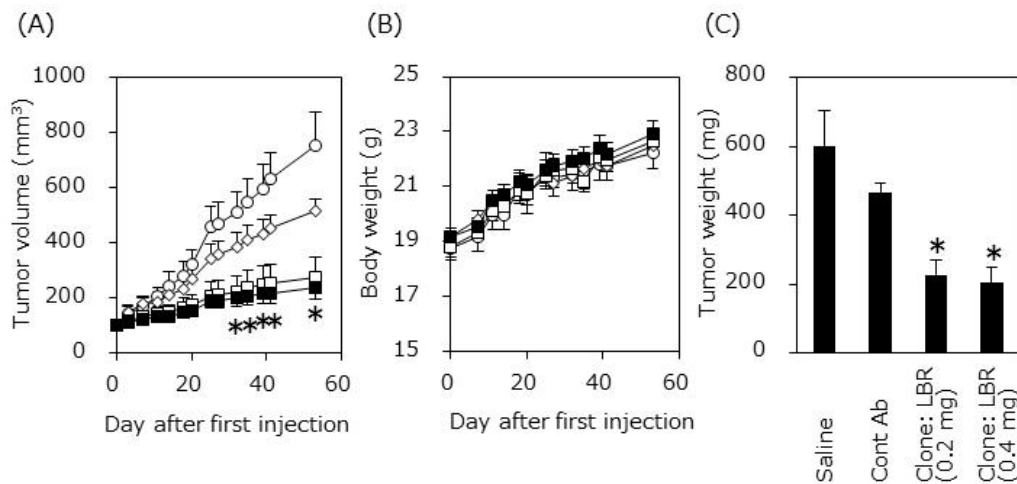
以上、Clone: LBR は EphA10 の発現に依存して腫瘍に集積したことから、本抗体を利用することで、EphA10 を発現する乳がん細胞の増殖抑制や傷害によって、抗腫瘍効果の有無を判定しうることが示された。



**Fig. 17 In vivo biodistribution of anti-EphA10 mAb in a xenograft mouse model** Alexa Fluor 647-labeled Anti-EphA10 mAb or an isotype control mAb were intravenously administered (200  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) into a xenograft mouse model carrying EphA10-expressing tumors ( $n = 4$ ). (A) Fluorescence was observed on a daily basis using a whole animal imaging system. The left- and right-hand mice in each image were treated with Alexa Fluor 647-labeled control mAb and anti-EphA10 mAb, respectively. A right-hand bar indicate fluorescent intensity range (B) Tumor accumulation of anti-EphA10 mAb (■) and the control mAb (□) were quantified as the ratio of fluorescence intensity observed at the tumor over that seen at the contralateral site ( $*p < 0.05$  vs the control mAb-treated mice groups). (C) At day 4, 9 kinds of organ tissues were isolated from dissected mice, with associated fluorescence measured. The left- and right-hand tissues in each image were treated with Alexa Fluor 647-labeled control mAb and anti-EphA10 mAb, respectively. A right-hand bar indicates fluorescent intensity range. (D) Mean fluorescent intensity of each tissue was quantified.  $*p < 0.05$ . Error bars indicate the mean  $\pm$  S.E.

## ゼノグラフトモデルマウスにおける Clone: LBR の抗腫瘍効果

腫瘍に集積した Clone: LBR の EphA10 の機能阻害効果を検討するため、ゼノグラフトモデルマウスに対する治療実験を試みた。Saline とコントロール抗体 (0.4 mg/mouse)、Clone: LBR (0.2 / 0.4 mg/mouse)を、週一回、尾静脈内に投与し、経時的に腫瘍径と体重を測定した。その結果、Saline 投与群とコントロール抗体投与群に比較して、Clone: LBR 投与群では、その増殖が有意に抑制された。また、この効果は、投与量依存的に観察されたため、EphA10 を介した作用であることが示唆された (Fig. 18 (A))。そこで次に、最終投与翌日に、マウスから腫瘍組織を摘出し、腫瘍重量の観点からも Clone: LBR の抗腫瘍効果を評価した。その結果、Saline 投与群およびコントロール抗体投与群に比較して、Clone: LBR 投与群では、腫瘍重量が有意に抑制されていた (Fig. 18 (C))。その一方で、抗体投与期間中のマウスの体重に群間で変化が認められなかったことから、マウスの体重に影響を与えるような副作用は観察されなかったことを確認している (Fig.18 (B))。



**Fig. 18 *In vivo* anti-tumor effects of anti-EphA10 mAb in a xenograft mouse**

Xenograft mouse model was generated by orthotopic transplantation of MDA-MB-435<sup>EphA10</sup> cells. When tumors reached approximately 100 mm<sup>3</sup> in size, Saline (○), isotype control mAb (0.4 mg/mouse) (◇) and anti-EphA10 mAb (0.2 (□) or 0.4 (■) mg/mouse) were intravenously administered Once a week. (A) Tumor volumes and (B) body weights were measured over time was compared with the control mAb group. (C) Tumor tissues were isolated and measured by weight at day 56. (\* $p < 0.05$ , One-way ANOVA (Dunnett)). Error bars in all figures indicate the mean + S.E. (n = 5-6).

以上の結果から、EphA10 が有する細胞増殖活性を抑制し、EphA10 発現がん細胞を傷害することによって、実際に腫瘍組織の増殖が有意に抑制されることが示され、EphA10 が乳がんの治療標的として有用であることがゼノグラフィトモデルマウスで示された。

このように、EphA10 を標的とした創薬コンセプトが実証されたことで、実用化に向けた次のステージとして、本試験で観察された抗腫瘍効果における Clone: LBR の中和活性や、CDC/ADCC 活性の寄与度が明らかにされ、EphA10 の機能阻害に着目したアンチセンスや低分子阻害剤の開発、または EphA10 の発現がん細胞をも傷害可能な中和抗体など、医薬品シーズとして最適なフォーマット選択の推進が期待される。さらに、本検討では完全退縮例は認められなかったものの、近年、抗 Her2 抗体と抗がん剤を標識した抗 Her2 抗体 (T-DM1) が腫瘍の完全退縮を可能にすることが報告されており<sup>54</sup>、抗がん剤とのコンジュゲートによる強力な薬剤の開発も視野に、今後の研究の進展が期待される。

## 第二節. 乳がん以外のがん種における EphA10 の治療標的としての 検証

前述してきたように、EphA2 や EphB4 を始めとした Eph receptor ファミリー分子の多くは、乳がんや肺がん、大腸がん、前立腺がんなど、多種のがん組織で発現亢進していることが報告されている<sup>14</sup>。そのため、EphA10 についても、乳がん以外のがん組織で発現している可能性があり、医薬品開発が望まれているがん種や症例に対して発現していれば、EphA10 の治療標的としての価値はさらに向上するものと考えられる。しかし、EphA10 のがん種別の発現プロファイルの詳細や治療標的としての有用性は、これまでに明らかにされていない。

そこで本節では、乳がん以外のがん組織における EphA10 の発現を解析し、Clone: LBR を利用することで EphA10 の治療標的としての可能性をさらに追求した。

### 【実験材料と方法】

#### 細胞株

以下の細胞株は、American Type Culture Collection から購入した。【乳がん】：HCC70 (乳管がん細胞), MDA-MB-157 (髄様がん細胞), HCC1599 (乳管がん細胞株), MDA-MB468 (腺がん細胞), DU4475 (腺がん細胞), 【前立腺がん】：22Rv1, VCaP, 【大腸がん】：colo201 (腺がん細胞), SW620 (腺がん細胞), HCT116 (腺がん細胞), 【膵臓がん】：BxPC3 (腺がん細胞), Panc1 (膵管がん細胞), AsPC1 (腺がん細胞), 【悪性中皮腫】：H2452, H2052, H28, 【白血病】：Jurkat (T 細胞性白血病細胞)。また、下記の細胞は、Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank から入手した。【肺がん】：RERF-LC-KJ (腺がん細胞), RERF-LC-MS (腺がん細胞), 【胃がん】：MKN1 (腺扁平上皮が



ん細胞), MKN45 (腺がん細胞), 【精巣がん】: NEC8, NEC14, 【メラノーマ】: A2058, G318, Mewo, 【白血病】: K562 (慢性骨髄性白血病細胞). 前立腺がん細胞株 PC3 (腺がん細胞)と LNCaP (腺がん細胞) は、Riken Bioresource Center Cell Bank より購入した。Normal Human Prostate Epithelial Cells (PrEC) and Normal Human Mammary Epithelial Cells (HMEC)は Lonza より入手した。全ての細胞は、入手元のプロトコルに基づいて、5% CO<sub>2</sub> 下、37°C で培養した。

### 定量的 PCR

各前立腺がん細胞、及び正常初代細胞から、RNeasy Mini kit (Qiagen) により total RNA を抽出後、High Capacity RNA-to-cDNA kit (Life Technologies) を用いて、cDNA に逆転写した。得られた cDNA をテンプレートに、TaqMan Probe (ヒト EphA10 : Hs01017018-m1 / ヒト actin-beta : Hs99999903\_m1)と Taq Man Fast Advanced Master Mix により反応液を調製し、StepOne Plus real-time PCR system (Life Technologies)を用いて、リアルタイム PCR を行った。Ct 値は、機器に内蔵されている自動設定を用いて決定した。EphA10 の発現量の比較は、各がん細胞の EphA10 発現量を各 actin-beta 量で補正した後、対照として用いた正常初代細胞株で除すことで解析した。

### 細胞免疫染色

各細胞を Lab-Tek 8-well chamber slide (Thermo Fisher Scientific Inc.) に  $1 \times 10^4$  cells/well になるように播種し、一晩培養した。細胞を PBS で 2 度洗浄した後、4% PFA を添加し、室温で 10 分間、固定した。固定された細胞を PBS で洗浄した後、5% FCS を添加し、室温で 30 分間、ブロッキングした。抗 EphA10 モノクローナル抗体とその Isotype Control 抗体を 10 µg/mL の濃

度で添加し、1時間作用させた。0.05% PBSTで3度洗浄した後、2次抗体として Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体を 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で添加し、1時間作用させた。スライドは、DAPI 入りの Vectashield mounting medium (Vector laboratories Inc)で封入した。蛍光像は、Leica TCS SP2 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems)により取得した。

### 前立腺がんTMAの免疫組織化学染色

第一章、第一節「TMAの免疫組織化学染色」および「TMAにおける EphA10の発現解析」に準じて行った。

### VCaPのゼノグラフトモデルマウスの作製

VCaP 細胞を Cell Dissociation Solution Non-enzymatic 1  $\times$  (Sigma-Aldrich Corporation)を用いて非酵素的に剥離し、Hanks' balanced salt solution (Life technologies)で  $1 \times 10^8$  cells/mL に調整した。細胞懸濁液 50  $\mu\text{L}$  に等量の Matrigel Basement Membrane Matrix Phenol Red Free (BD Biosciences)と混合し、日本 SLC より購入した BALB/c *nu/nu* マウス (6週齢、オス)の右脇腹の皮下に移植した。その後、腫瘍が生着するまで経時的に観察した。

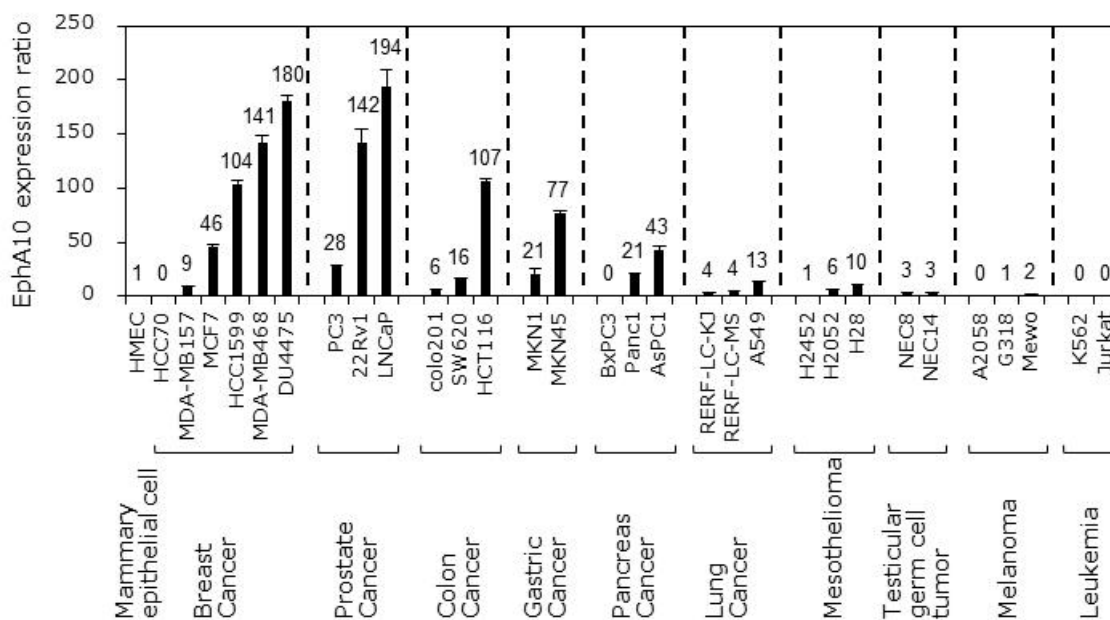
### Clone: LBRによる抗腫瘍効果の評価

VCaP ゼノグラフトモデルマウスの腫瘍径が 100  $\text{mm}^3$  程度になった時点を Day 0 とし、Saline (大塚製薬)、Isotype control 抗体 (400  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ )、Clone: LBR (400  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ )をそれぞれ週一回、尾静脈内に投与し、経時的に腫瘍径と体重を測定した。腫瘍体積は、 $(\text{短径})^2 \times (\text{長径}) / 2$  により算出した。また、Day 62 に腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定した。

## 【結果と考察】

### 各種がん細胞株における EphA10 の発現分布解析

EphA10 が発現しているがん種をスクリーニングするため、乳がんを含む 10 種類のがん細胞株 (乳がん、大腸がん、胃がん、肺がん、膵がん、前立腺がん、精巣がん、白血病、中皮腫、皮膚がん) における EphA10 の発現を定量的 PCR により比較解析した。各がん細胞株の EphA10 の発現レベルを、EphA10 の発現が低いことを確認している正常乳腺初代細胞 (HMEC) に対する比として算出した結果、EphA10 は、乳がんのみならず、前立腺がんや大腸がん、胃がんなど、様々ながん種に発現していることが示された。特に、前立腺がんでは、HMEC に比較して 100 倍以上発現している細胞株 (22Rv1: 142 倍, LNCaP: 194 倍) が複数株あり、乳がん細胞株 (HCC1599: 103 倍, MDA-MB468: 141 倍, DU4475: 181 倍) と同等の発現レベルを有していることが示唆された (Fig. 19)。



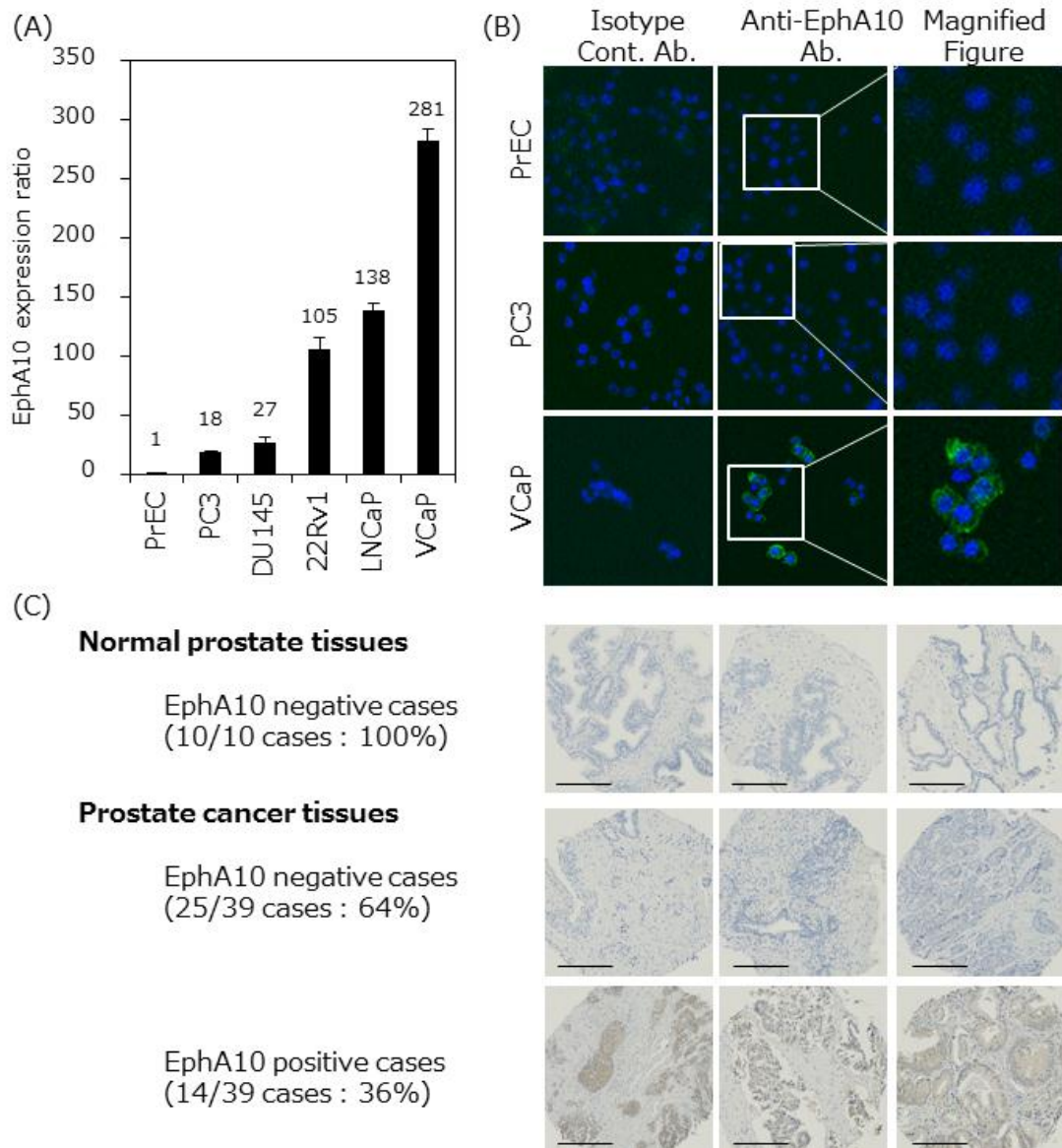
**Fig. 19 Screening of EphA10 expression profile in various kinds of cancer cells**

EphA10 expression in various kinds of cancer cells were screened by quantitative PCR. EphA10 expression level in each cell was normalized by actin-beta expression level and described as a ratio against EphA10 expression level in HMEC, normal human mammary epithelial primary cells. n = 3 in each group. Error bars represent the S.D.

## 前立腺がん細胞株・臨床検体における EphA10 の発現解析

上記の結果を踏まえ、前立腺がんにおける EphA10 の発現を詳細に検討することにした。前立腺がん細胞株の数を増やして EphA10 の発現レベルを解析した結果、前立腺がん細胞株における EphA10 の発現はいずれも、正常前立腺初代細胞 (PrEC) に比較して、高いことが示された (Fig. 20 (A))。また、これら細胞株における EphA10 の蛋白質レベルでの発現を解析するため、細胞免疫染色により評価した。その結果、PrEC、および EphA10 低発現の PC3 では、EphA10 の発現が認められなかった一方で、EphA10 高発現の VCaP 細胞では、抗 EphA10 抗体作用群でのみ EphA10 の発現が観察され、mRNA の発現と相関することが示された。これらの結果から、EphA10 は、前立腺がん細胞株においても高発現していることが示された (Fig. 20 (B))。

そこで、EphA10 の治療標的としての可能性を検証するため、実際の臨床検体における EphA10 の発現を評価した。正常前立腺組織と前立腺がん組織が搭載された組織マイクロアレイを免疫組織化学染色した。その結果、EphA10 の発現は、10 症例の正常前立腺組織では、第一章第一節の結果と同様、認められなかった。その一方で、前立腺がん組織では、39 症例中 14 症例で EphA10 の発現が認められた (陽性率：36%)。これらの結果から、EphA10 は、前立腺がん細胞株のみならず、臨床検体においても正常組織に比較して高発現していることが示唆され、前立腺がんにおいても治療標的になりうることを発現分布の観点から示された (Fig. 20 (C))。

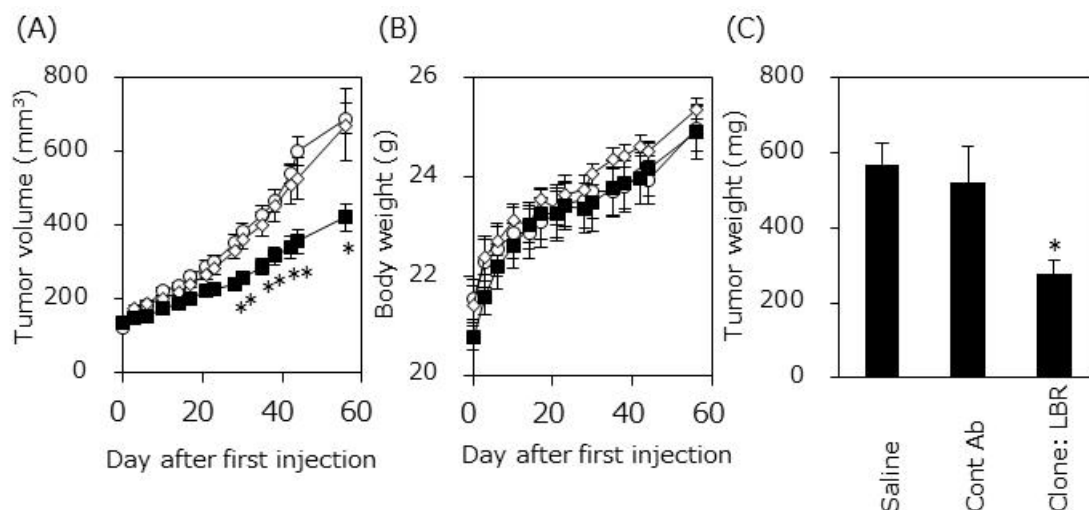


**Fig. 20 EphA10 expression analysis in prostate cancer cell lines and clinical prostate cancer tissues**

(A) EphA10 mRNA expression level in prostate cancer cell lines (PC3, DU145, 22Rv1, LNCaP and VCaP) was quantified by real time PCR. It was normalized by actin-beta expression level and described as a ratio against EphA10 expression level in PrEC, normal human prostate epithelial primary cells.  $n = 3$  in each group. Error bars represent the S.D. (B) EphA10 protein expression in prostate cancer cell lines was analyzed by cell immunofluorescent staining. PrEC, PC3 (EphA10-mRNA low expressing cells) and VCaP (EphA10 mRNA high-expressing cells) were treated with anti-EphA10 mAb or the isotype control mAb (20  $\mu\text{g/ml}$ ), and then with Alexa Flour 488 conjugated anti-mouse IgG antibody. EphA10 protein expression was detected by confocal microscopy. Blue and green signals relate to DAPI and EphA10, respectively. (C) TMAs with clinical prostate cancer tissues (39 cases) and the normal tissues (10 cases) were stained using anti-EphA10 mAb. Representative images of normal breast tissue (positive ratio: 0%), EphA10 negative cancer tissue, and EphA10 positive cancer tissues (positive ratio: 36%) are shown. Scale bar: 200  $\mu\text{m}$ .

## EphA10 の前立腺がんにおける治療標的としての有用性評価

EphA10 の前立腺がんにおける治療標的としての適性をより詳細に解析するため、Clone: LBR を用いて、VCaP 細胞 (EphA10 高発現前立腺がん細胞) のゼノグラフトモデルマウスに対する抗腫瘍効果を評価した。腫瘍径が  $100 \text{ mm}^3$  程度になった時点から、Saline、コントロール抗体、Clone: LBR を週に 1 回尾静脈内投与 ( $400 \mu\text{g}/\text{mouse}$ ) した。その結果、Saline およびコントロール抗体投与群に比較して、Clone: LBR 投与群において、腫瘍増殖の有意な抑制効果が認められた (Fig. 21 (A))。また、最終投与翌日に、各マウスから腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定した。その結果、腫瘍径の結果と相関し、Clone: LBR 投与群において、腫瘍重量が他の群と比較して有意に抑制されていた (Fig. 21 (B))。その一方で、抗体投与期間中のマウスの体重変化に、群間での違いが認められていないことを確認している (Fig. 21 (C))。以上の検討から、EphA10 は、乳がんのみならず前立腺がんにおいても高発現し、Clone: LBR によって抗腫瘍効果が認められたことから、本受容体は、前立腺がんにおいても有望な治療標的候補であることが示唆された。



**Fig. 21** *In vivo* anti-tumor effects of anti-EphA10 mAb in a xenograft mouse

Xenograft mouse model was generated by transplantation of VCaP cells. When tumors reached approximately  $100 \text{ mm}^3$  in size, Saline ( $\circ$ ), isotype control mAb ( $0.4 \text{ mg}/\text{mouse}$ :  $\diamond$ ) and anti-EphA10 mAb ( $0.4 \text{ mg}/\text{mouse}$ :  $\blacksquare$ ) were intravenously administered Once a week. (A) Tumor volumes and (B) body weights were measured over time was compared with the control mAb group. (C) Tumor tissues were isolated and measured by weight at day 56. ( $*p < 0.05$ , One-way ANOVA (Dunnett)). Error bars in all figures indicate the mean + S.E. ( $n = 6-7$ ).



### 第三節. EphA10 の細胞内ドメインの解析を目指したイントラボディ創製の基礎検討

第一章の冒頭でも述べたように、Eph receptor ファミリーは、受容体型チロシンキナーゼ (TK)として知られ、細胞内に TK ドメインを有している<sup>10, 11</sup>。そのため、Eph receptor ファミリー分子の機能発現には、TK 活性依存的にシグナルを伝達する機構が数多く報告され<sup>55, 56</sup>、Eph receptor ファミリーの TK を標的とした阻害剤も開発段階にある<sup>11, 47</sup>。その一方で、TK 活性には依存しない経路も知られており<sup>18, 56</sup>、EphA10 による細胞増殖シグナルが誘導されるメカニズムを明らかにすることができれば、乳がんや前立腺がんが発現する EphA10 に対する医薬品シーズのフォーマット選択や開発に有用な知見が提供できるものと考えられる。

その点、モノクローナル抗体は、TKによって修飾されたリン酸化蛋白質や様々なドメインに結合・阻害することで、EphA10 の機能発現に重要な部位や領域を検証可能である。特に、蛋白質の発現そのものをノックダウンしてしまう siRNA などでは、上記のような検証は成しえず、モノクローナル抗体が果たすべき役割は大きい<sup>57, 58</sup>。このような観点から、抗体の適用範囲を本来機能する細胞外から細胞内にまで拡大し、細胞内で機能する抗体を自在に創製できれば、EphA10 の細胞内ドメインの解析は勿論、抗体プロテオミクス技術で見いだされてくるような細胞内の疾患関連蛋白質に対しても、強力な解析ツールになるものと期待される<sup>57, 58</sup>。しかし、抗体を細胞内で活用しようとするイントラボディ技術はそもそも、抗体のような巨大分子を本来存在しえない細胞内の還元的な環境下で機能させようとするため、細胞内で可溶型として発現しないことが障壁となって、実用化には至っていない<sup>59</sup>。その点、当研究室ではこれまでに、生体内の数十億とも言われる多様な抗体レパートリーに対応するため、抗体のデータベースを参考に独自設計したプライマーセットを用いて、抗体の可



変領域である VL と VH をリンカーでつないだ低分子型抗体 (scFv)をファージ上に提示したライブラリ構築の最適化を図ってきた<sup>60</sup>。

そこで本節では、EphA10 の細胞内ドメインの解析に向けて、イントラボディ創出基盤を開発すべく、申請者らが最適化したファージ抗体ライブラリの中から、モデル抗原 Bid に対する低分子型抗体 (scFv)を取得し、細胞内での発現特性を評価した。

### **【実験材料と方法】**

#### ファージ抗体ライブラリの調製

scFv ライブラリ遺伝子で形質転換された大腸菌 TG1 株を 50 µg/mL Ampicillin、2% glucose 含有 2YT 培地で 250 rpm、37°Cで OD<sub>600</sub> = 0.3 ~ 0.6 まで培養した。M13KO7 ヘルパーファージ (Life Technologies)を添加し、110 rpm, 37°Cで 30 分間、250 rpm, 37°C で 30 分間培養することで、ヘルパーファージを感染させた。2,000 rpm で 10 分間遠心後、得られたペレットに対して 100 µg/mL Ampicillin、50 µg/mL Kanamycin 含有 2YT 培地を添加し、6 時間培養することで scFv 提示ファージを産生させた。4°C、2,000 rpm で 10 分間、さらに 10,000 rpm で 15 分間遠心し、回収した上清に氷冷した 20% PEG-6000、2.5 M NaCl を 1/5 volume 加え、激しく混和して氷上で 1 時間静置した。15,000 rpm で 10 分間遠心して得られたペレットを NTE buffer (100 mM NaCl、10 mM Tris、1 mM EDTA) に懸濁し、0.45 µm の Millex-HV を用いてフィルターろ過し、scFv 提示ファージを回収した。

#### Biacore を用いたパンニング

パンニングには、Biacore 3000 (GE Healthcare)を用いた。まず、抗原蛋白質 Bid (Sigma-Aldrich Corporation)をセンサーチップ CM5 (GE healthcare)

上に、Amine Coupling Kit (GE healthcare)を用いて固相した。作製したファージ scFv ライブラリを input として固相抗原に添加し、結合させた。HBS-EPT buffer (0.05% Tween-20 を含む HBS-EP (GE Healthcare))で 10 回洗浄後、抗原に結合した scFv 提示ファージを glycine-HCl (pH 2.0) と glycine-NaOH (pH 11.0) により回収し、output とした。1 M Tris-HCl (pH 8.0) を 4  $\mu$ L と 2% glucose 含有 2YT 培地を 250  $\mu$ L 加え、その一部を用いて、次に示す方法でタイターを測定した。残りのファージを大腸菌 TG1 株に感染させ、増殖させた後、上記のファージ作製法に準じてファージを産出し、パンニング操作を繰り返し行った。

#### タイターの測定

2% glucose 含有 2YT 培地で OD<sub>600</sub> = 0.3 ~ 0.6 まで培養した TG1 に対して、10 倍希釈で段階希釈したファージ溶液を添加し、37°C、1 時間培養した。培養液の一部に 50  $\mu$ g/mL Ampicillin、2% glucose 含有 2YT 培地を添加し、Petrifilm に播種して一晩培養した。各希釈段階でのコロニー数を計測することで、ファージタイターを算出した。

#### シーケンス解析

上記でモノクローン化されたプラスミドを QIAprep Miniprep Kit (QIAGEN) を用いて回収し、プライマー 156 (5'-CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC-3') とプライマー 158 (5'-GTAAATGAATTTTCTGTATGAGG-3')、及び BigDye Cycle Sequencing Kit (Life Technologies)を用いてサイクルシーケンス反応を行った。その後、PERFORMA Gel Filtration Cartridge を用いて精製し、ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Life Technologies)により DNA 配列を解析した。

### 各種抗原蛋白質を用いた Anti-Bid scFv の特異性評価

固相化する抗原として、ヒト Bid (Sigma-Aldrich Corporation)、ヒト Caspase8-his-tag、ヒト TNFR2-Fc chimera (R & D Systems)、ヒト VEGFR2-Fc chimera (Genzyme/Techne)、ヒト importin- $\beta$  (Merck KGaA)、Venus (YFP mutant 理化学研究所 宮脇敦史博士より供与いただいた)、Luciferase (Promega Biosciences, Inc.) を用い、各抗原蛋白質を 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように固相化した。ファージの作製、タイターチェックは上記各項に準じて行い、ファージ量として  $3.0 \times 10^{10}$ 、 $1.0 \times 10^{10}$ 、 $3.3 \times 10^9$  CFU を各抗原に添加し、室温で 1 時間反応させた。PBST (0.05% Tween-20 を含む PBS) で 3 回洗浄後、0.4% Block Ace で 3,000 倍希釈した HRP/anti-M13 monoclonal antibody (GE Healthcare) を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  添加し、室温で 1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、で 3 回洗浄後、TMB 溶液を加えて発色を行い、2 N 硫酸を添加することで反応を停止させた。吸光度 (測定波長 450 nm、対照波長 655 nm) はマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Inc.) で測定した。

### Anti-Bid scFv の哺乳類発現ベクターの構築

ファージミドベクター pCANTAB5E に組み込まれた anti-Bid scFv 遺伝子を制限酵素 *Nco* I および *Not* I で処理し、Venus が C 末に組み込まれた哺乳類細胞用発現ベクター pTriEx (Novagen) に、DNA Ligation Kit (Takara Bio) を用いて、16 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間反応させることでライゲーションした。

### Anti-Bid scFv の細胞への遺伝子導入と発現評価

12 well culture プレート (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用い、 $2 \times 10^5$  cells/well にて HEP-2 細胞株を播種し、24 時間培養することで細胞を接着させ

た。1  $\mu\text{g}$  の pTriEx anti-Bid scFv-Venus を、50  $\mu\text{L}$  の Opti-MEM (Life Technologies)で希釈した後、2.5  $\mu\text{L}$  の遺伝子導入試薬 FUGENE HD (Roche Diagnostic Corporation) と複合体を形成させ、トランスフェクションを行った。サンプルは、遺伝子導入 48 時間後の細胞を回収し、以下の実験に用いた。

上記方法に準じ、遺伝子導入後 48 時間後の細胞に関して、Venus 由来の蛍光を OLYMPUS IX 81 を用いた顕微鏡観察を行った。

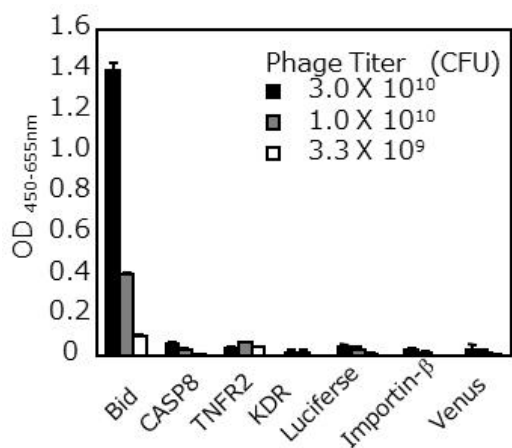
## 【結果と考察】

### モデル抗原 Bid に対する低分子型抗体 (scFv)の単離

始めに、モデル抗原 Bid に対する scFv 抗体を取得するため、Biacore のセンサーチップに固相した Bid 蛋白質上に、当研究室で樹立したファージ scFv ライブラリを添加し、洗浄後、結合性を有した scFv 提示ファージを回収した。これらのファージを大腸菌に感染させることで増幅し、上記の操作を 5 回繰り返すことによって、Bid に結合する scFv 提示ファージを濃縮した。再度、大腸菌に感染させて、モノクローン化し、Bid に結合性を有する抗体クローンを取得した。この抗体クローンの Bid への結合特異性を評価する一環として、各種組換え蛋白質に対する結合性を ELISA により評価した。その結果、得られた scFv 提示ファージは、タイター依存的に Bid に結合したのに対して、その他の蛋白質には結合性を示さず、Bid に対して特異的に結合しうる scFv であることが示唆された (Fig. 22)。

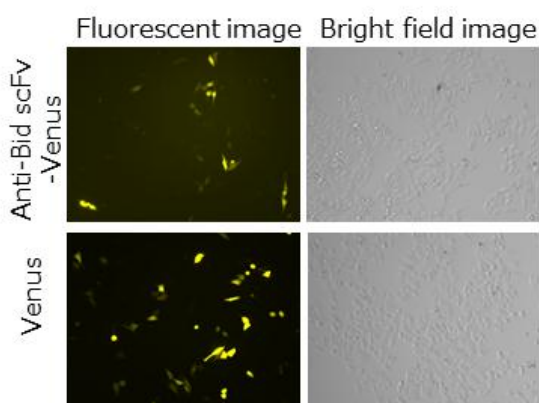
## Anti-Bid scFv の細胞内発現特性の評価

取得した Bid に対する scFv の細胞内での発現特性を評価するため、本抗体の遺伝子の C 末に黄色蛍光蛋白質 Venus を融合させ、ほ乳類発現ベクターへと組換え、HEp-2 細胞にトランスフェクションした。その結果、Anti-Bid scFv-Venus 融合体は、Venus 単独発現群と同様に、細胞内で発現することが示された (Fig. 23)。イントラボディとしての有用性を明らかにするためには、細胞内での抗原との結合活性など、詳細を詰める必要はあるものの、本検討で取得した Anti-Bid scFv は、細胞内で可溶型に発現しうることが示された。今後、様々な候補クローンの発現特性や機能と、クローン間の配列情報との相関を解析することによって、細胞内で機能しやすい抗体の創製基盤が確立され、EphA10 の機能発現メカニズムの解明に繋がることを期待する。



**Fig. 22 Specificity of the isolated anti-Bid scFv antibody**

Binding specificity of the anti-Bid scFv was determined by phage ELISA. Each protein was immobilized on the immunoassay plate and then the purified anti-Bid scFv phage was applied to the wells. Each bar represents the S.D.



**Fig. 23 Intracellular expression of scFv-Venus protein**

The expression plasmid containing the scFv-Venus gene fusions or Venus gene only was transiently transfected into the HEp2 cells by lipofection. The fluorescence in the Venus was detected by fluorescent microscopy.

## 第四節. 小括

前章で示された EphA10 の発現/機能特性から、EphA10 のがん細胞増殖促進作用を抑制し、EphA10 発現がん細胞を傷害することができれば、抗腫瘍効果に繋がるのが推察された。そこで本章では、標的分子の機能抑制とその発現細胞を傷害可能なモノクローナル抗体を活用し、上記の創薬コンセプトを検証することで、EphA10 の治療標的としての適性を治療効果の観点から評価した。

まず、独自に樹立した抗 EphA10 抗体 (Clone: LBR) は、EphA10 を介したがん細胞増殖活性を中和するうえ、EphA10 発現がん細胞を CDC 活性によって傷害しうることが示され、創薬コンセプトを検証するための有用なツールとなることが示唆された。また、Clone: LBR は、ゼノグラフトモデルマウスにおいて、腫瘍組織に集積した一方で、正常臓器には有意な分布は観察されなかった。この結果から、Clone: LBR を用いることで EphA10 発現腫瘍の増殖抑制効果を解析可能であることが示された。そこで実際に、治療実験を試みたところ、Clone: LBR を投与することで、腫瘍増殖が有意に抑制されることが示された。

また、EphA10 の治療標的としての更なる可能性を追求するため、乳がん以外の 9 種類のがん種においても検証を試みた。その結果、EphA10 は、特に前立腺がんにも高発現していることが示された。そこで、前立腺がんのゼノグラフトモデルマウスでも Clone: LBR の効果を評価したところ、乳がん同様に抗腫瘍効果が観察された。今後、前立腺がん組織においても、EphA10 のリガンドが EphA10 と共発現し、EphA10 を介した細胞増殖を促進させる機構が存在するかなど、抗腫瘍効果のメカニズムの解明や、前立腺がんの中でも新たな治療薬が望まれている去勢抵抗性前立腺がん (CRPC)<sup>61</sup> との関連を明らかにしていくことが望まれるものの、本知見は、EphA10 が前立腺がんの新たな治療標的候補として、有望な受容体であることを示している。

さらに、EphA10 の機能発現メカニズムの解明を目標に、その解析ツールとして有用なイントラボディを創製すべく、独自のファージ抗体ライブラリから低分子化抗体を単離し、細胞内での発現特性を評価した。蛍光蛋白質 Venus との融合体として発現させた結果、Venus 単独で発現させた群と同様に蛍光が観察されたことから、本手法で単離した scFv は、細胞内で可能型に発現する可能性が示された。本検討で得られた知見をもとに、イントラボディを用いた EphA10 の細胞内領域の解析が推進され、機能発現機構が明らかになることが期待される。

## 総括

近年のオミクス研究の進展に伴って、疾患の発症や悪化に関わる遺伝子や RNA、蛋白質が同定され、種々の疾患の分子病態が徐々に解明されつつある<sup>62</sup>。さらに、昨今の抗体工学や遺伝子工学、有機合成化学などの技術基盤の向上も相まって、これら疾患関連分子に対して結合し、その機能を制御する「分子標的治療薬」が開発されている<sup>63</sup>。これら薬剤は、抗体や核酸、低分子など、そのフォーマットは違えども、標的分子に対して特異性を持たせるように設計されているため、既存の治療薬と比較して副作用が少なく、鋭い薬効を示し、現在の医薬品開発の中心を担っている<sup>63</sup>。その一方で本薬剤は、標的分子に作用することで薬効を発揮するが故に、標的分子の発現が陰性の症例には、適用すること自体できない。特に、症例ごとに多様性の大きながんでは、同じ乳がん患者でも、Trastuzumab (抗 Her2 抗体)の標的である Her2 は、全症例の 20-30%に発現しているに過ぎず、適用症例は限局されている<sup>64, 65</sup>。また、緒論でも述べたように、優れた治療薬であっても多かれ少なかれ耐性は生じてしまう。このような背景から、数多くの新規分子標的治療薬が開発され、これまで有効な治療薬に乏しかった症例に対しても、その恩恵が享受されることや、治療薬の選択肢を増やすことで、耐性を生じにくくすることが求められている。

以上の観点から本論文では、新たな分子標的治療薬の開発を目指し、当研究室が見いだした新規乳がん関連蛋白質 EphA10 の治療標的としての有用性を検証した。その結果、EphA10 は、Her2-enriched や TNBC を含む全ての乳がんのサブタイプに対して、がん組織特異的に発現し、がん細胞の増殖促進に関わることを明らかにした。さらに、これら知見をもとに、EphA10 のがん細胞増殖活性の抑制と EphA10 が発現するがん細胞の傷害が可能な中和抗体を用いることで、実際に乳がんや前立腺がんの腫瘍増殖が抑制されることを示し、EphA10 ががんの治療標的として有望な受容体であることを明らかにした。さらに、EphA10 の細胞内ドメインの解析に有用なイントラボディ創製に向けて、



独自のファージ抗体ライブラリから単離した scFv が、細胞内で可溶型に発現しうることを示した。

したがって、以上の研究成果は、EphA10 が、多数の臨床検体や KO マウスなどを用いた大規模なバリデーションによって、治療標的としての有用性がより詳細に評価される価値のある治療標的候補であることを示唆している。今後、臨床情報が充実した多数の臨床検体を用い、EphA10 の発現と予後との関連、がん組織における EphA10 の変異の有無と悪性化への関与、発現量と治療効果の相関、EphA10 のプロモーター領域のゲノム/エピゲノム解析によるがん組織特異的な発現機構の解明など、EphA10 の治療標的としての臨床的な価値が明らかにされるものと推察される。また、EphA10 の KO マウスを活用し、発癌・増殖・転移といった *in vivo* での EphA10 の機能や EphA10 が発現している精巣などにおける生理機能を明らかにすることで、EphA10 を標的とした治療法の有効性と安全性がより担保され、その開発が推進されるものと期待される。

また一方で、Her2 は、Her2 同士でホモダイマーとなって活性化する以外に、Her3 を始めとする他のファミリー分子とヘテロダイマー化することで増殖活性が亢進することが知られている<sup>66, 67</sup>。本知見をもとに最近、Her2 の二量体化を阻害する抗体医薬 (Pertuzumab) が本邦でも臨床応用され、その効果に期待が寄せられているところである<sup>68-70</sup>。本観点において、Eph receptor ファミリーも、他の Eph receptor や、EGFR や Her2 などをはじめとする増殖受容体とのヘテロ二量体化によってがん細胞が活性化することが近年指摘され始めている<sup>15, 71-73</sup>。そのため、EphA10 のみに着目した解析から、Eph receptor ファミリーや Her ファミリーとの相互作用にまで目を向けることで、がんの新たな分子病態の解明や、より有効で安全な医薬品シーズの作用点の同定にも繋がる可能性を秘めている。

以上、本研究で明らかにされた成果がもとになって、EphA10 の治療標的としての価値がさらに追求されると共に、最適な医薬品シーズが開発されることによって、将来、EphA10 を標的とした新たな分子標的治療薬の開発に繋がることを期待している。

## 結論

本博士論文では、申請者の研究室で同定した新規乳がん関連蛋白質 EphA10 に対する医薬品開発を目指し、以下の有用な結論を得た。

1. EphA10 は、難治性の TNBC 症例を含む全てのサブタイプに対して、がん組織特異的に発現し、乳がんの予後決定因子であるリンパ節転移にも相関していることを示した。
2. EphA10 は、がん細胞上でリガンドと相互作用することで p38 のリン酸化を亢進させ、細胞増殖を促進させる機能を有していることを提示した。
3. 上記の知見から推定された「EphA10 の細胞増殖促進作用の抑制、または EphA10 発現がん細胞の傷害が抗腫瘍効果につながる」という創薬コンセプトをゼノグラフトモデルマウスで実証した。
4. EphA10 は、乳がん以外のがん種（前立腺がん、大腸がん、胃がんなど）においても高発現しており、特に発現レベルの高かった前立腺がんにおいて、腫瘍増殖が Clone: LBR により有意に抑制されることが示された。
5. EphA10 の細胞内ドメインの解析に有用なイントラボディーを創出するため、独自に構築したファージ抗体ライブラリから単離した scFv が、細胞内環境下でも可溶性に発現しうることが示された。

以上、本研究では、EphA10 の発現分布やがんにおける機能をもとに創薬コンセプトを構築・検証し、EphA10 が乳がんの治療標的として有用であることを示した。今後、これらの知見がもとになって、EphA10 を標的とした治療法の開発に向けた研究の推進が期待される。また、本研究成果は、これまで特性が未解明であった EphA10 に対し、がん細胞の増殖に関わることを明らかにした点で、医薬品開発といった応用研究のみならず、腫瘍生物学などの基礎研究の進展にも貢献しうるものと期待し、博士論文として括らせて頂く。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、大阪大学大学院薬学研究科教授の堤 康央先生に、懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました。ここに衷心より感謝の意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、終始熱心な御指導と御鞭撻を賜り、研究に対する喜びと厳しさを御教授頂きました医薬基盤研究所・プロジェクトリーダーの角田慎一先生(大阪大学大学院薬学研究科招聘准教授)、同サブリーダーの鎌田春彦先生と同サブリーダーの向 洋平先生に心より深謝致します。

本研究に際し、貴重な御助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授の中川晋作先生、同准教授の岡田直貴先生、同准教授の吉岡靖雄先生、同元講師の伊藤徳夫先生、同助教の東阪和馬先生、大阪府立成人病センター研究所元部長の西澤恭子先生、アステラス製薬研究員の吉川友章先生、医薬品食品衛生研究所研究官の柴田寛子先生、同研究官の阿部康弘先生、医薬品医療機器総合機構審査専門員の杉田敏樹先生、塩野義製薬研究員の今井 直先生に心から御礼を申し上げます。

さらに、レンチウイルスベクターを御供与いただきました理化学研究所バイオリソースセンターの三好浩之先生、及び Venus 遺伝子を御供与下さいました同研究所脳科学総合センターの宮脇敦史先生に感謝申し上げます。

本稿を纏めるにあたり、御指導を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授の高木達也先生、辻川和丈先生、小比賀 聡先生に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究を遂行するにあたり、多大な御協力を賜りました、山下琢矢博士、岡村賢孝修士、渡邊貴信修士、金崎聡一郎修士、前田祐香修士を始めとする医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクトの皆様、並びに鍋師裕美博士、野村鉄也博士、萱室裕之博士、山名田夏枝修士、森重智弘博士、姚醒蕾博士、本村吉章修士、飯田恵介学士を始めとする同志に御礼申し上げます。

最後に、在学中の経済的援助を賜りました日本学術振興会、また常に温かく見守り支えてくれた妻と子供たちに心より感謝致します。

## 参考文献

- [1] がん情報サービス・統計 .  
<http://ganjoho.jp/professional/statistics/index.html>.
- [2] Lin SX, Chen J, Mazumdar M, et al. Molecular therapy of breast cancer: progress and future directions. *Nat Rev Endocrinol*. 2010; 6: 485-93.
- [3] Ocana A, Cruz JJ, Pandiella A. Trastuzumab and antiestrogen therapy: focus on mechanisms of action and resistance. *Am J Clin Oncol*. 2006; 29: 90-5.
- [4] Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005; 365: 1687-717.
- [5] Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: 631-43.
- [6] Nahta R, Esteva FJ. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res*. 2006; 8: 215.
- [7] Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011; 5: 5-23.
- [8] Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 10869-74.
- [9] Imai S, Nagano K, Yoshida Y, et al. Development of an antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of biomarker proteins. *Biomaterials*. 2011; 32: 162-9.
- [10] Pasquale EB. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6: 462-75.

- [11] Pasquale EB. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10: 165-80.
- [12] Konstantinova I, Nikolova G, Ohara-Imaizumi M, et al. EphA-Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. *Cell*. 2007; 129: 359-70.
- [13] Yamaguchi Y, Pasquale EB. Eph receptors in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol*. 2004; 14: 288-96.
- [14] Xi HQ, Wu XS, Wei B, Chen L. Eph receptors and ephrins as targets for cancer therapy. *J Cell Mol Med*. 2012; 16: 2894-909.
- [15] Brantley-Sieders DM, Zhuang G, Hicks D, et al. The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling. *J Clin Invest*. 2008; 118: 64-78.
- [16] Kumar SR, Singh J, Xia G, et al. Receptor tyrosine kinase EphB4 is a survival factor in breast cancer. *Am J Pathol*. 2006; 169: 279-93.
- [17] Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. EphA2: a determinant of malignant cellular behavior and a potential therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene*. 2004; 23: 1448-56.
- [18] Ji XD, Li G, Feng YX, et al. EphB3 is overexpressed in non-small-cell lung cancer and promotes tumor metastasis by enhancing cell survival and migration. *Cancer Res*. 2011; 71: 1156-66.
- [19] Brantley-Sieders DM, Fang WB, Hicks DJ, Zhuang G, Shyr Y, Chen J. Impaired tumor microenvironment in EphA2-deficient mice inhibits tumor angiogenesis and metastatic progression. *FASEB J*. 2005; 19: 1884-6.
- [20] Jackson D, Gooya J, Mao S, et al. A human antibody-drug

- conjugate targeting EphA2 inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 2008; 68: 9367-74.
- [21] Lee JW, Han HD, Shahzad MM, et al. EphA2 immunoconjugate as molecularly targeted chemotherapy for ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101: 1193-205.
- [22] Lee JW, Stone RL, Lee SJ, et al. EphA2 targeted chemotherapy using an antibody drug conjugate in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2010; 16: 2562-70.
- [23] Annunziata CM, Kohn EC, LoRusso P, et al. Phase 1, open-label study of MEDI-547 in patients with relapsed or refractory solid tumors. *Invest New Drugs.* 2013; 31: 77-84.
- [24] Aasheim HC, Patzke S, Hjorthaug HS, Finne EF. Characterization of a novel Eph receptor tyrosine kinase, EphA10, expressed in testis. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1723: 1-7.
- [25] Burstein HJ, Harris LN, Marcom PK, et al. Trastuzumab and vinorelbine as first-line therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predictive factors, and cardiac surveillance algorithm. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 2889-95.
- [26] Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet.* 2010; 375: 377-84.
- [27] Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor

- 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 4265-74.
- [28] Chuang HC, Kapuriya N, Kulp SK, Chen CS, Shapiro CL. Differential anti-proliferative activities of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 134: 649-59.
- [29] Liang H, Tan AR. Iniparib, a PARP1 inhibitor for the potential treatment of cancer, including triple-negative breast cancer. *IDrugs.* 2010; 13: 646-56.
- [30] J OS, LS S, al DMe. A randomized phase III study of iniparib (BSI-201) in combination with gemcitabine/carboplatin in metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011; 29.
- [31] Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 3271-7.
- [32] Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature.* 2010; 465: 483-6.
- [33] Jin W, Luo H, Wu J. Effect of reduced EPHB4 expression in thymic epithelial cells on thymocyte development and peripheral T cell function. *Mol Immunol.* 2014; 58: 1-9.
- [34] Stimamiglio MA, Jimenez E, Silva-Barbosa SD, et al. EphB2-mediated interactions are essential for proper migration of T cell progenitors during fetal thymus colonization. *J Leukoc Biol.* 2010; 88: 483-94.
- [35] Katoh M. Comparative integromics on Eph family. *Int J Oncol.* 2006; 28: 1243-7.
- [36] Keating GM. Pertuzumab: in the first-line treatment of

- HER2-positive metastatic breast cancer. *Drugs*. 2012; 72: 353-60.
- [37] Mohammed KA, Wang X, Goldberg EP, Antony VB, Nasreen N. Silencing receptor EphA2 induces apoptosis and attenuates tumor growth in malignant mesothelioma. *Am J Cancer Res*. 2011; 1: 419-31.
- [38] Pasquale EB. The Eph family of receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 1997; 9: 608-15.
- [39] Surawska H, Ma PC, Salgia R. The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004; 15: 419-33.
- [40] Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007; 26: 3291-310.
- [41] Zachary I. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans*. 2003; 31: 1171-7.
- [42] Zhong H, Bowen JP. Molecular design and clinical development of VEGFR kinase inhibitors. *Curr Top Med Chem*. 2007; 7: 1379-93.
- [43] Boilly B, Vercoutter-Edouart AS, Hondermarck H, Nurcombe V, Le Bourhis X. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000; 11: 295-302.
- [44] Buck MB, Knabbe C. TGF-beta signaling in breast cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1089: 119-26.
- [45] Yu J, Bulk E, Ji P, et al. The kinase defective EPHB6 receptor tyrosine kinase activates MAP kinase signaling in lung adenocarcinoma. *Int J Oncol*. 2009; 35: 175-9.
- [46] Genander M, Halford MM, Xu NJ, et al. Dissociation of EphB2 signaling pathways mediating progenitor cell proliferation and



- tumor suppression. *Cell*. 2009; 139: 679-92.
- [47] Boyd AW, Bartlett PF, Lackmann M. Therapeutic targeting of Eph receptors and their ligands. *Nat Rev Drug Discov*. 2014; 13: 39-62.
- [48] Pasquale EB. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell*. 2008; 133: 38-52.
- [49] Ishikawa M, Miyahara R, Sonobe M, et al. Higher expression of EphA2 and ephrin-A1 is related to favorable clinicopathological features in pathological stage I non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer*. 2012; 76: 431-8.
- [50] アバスチン インタビューフォーム . 中外製薬 .  
[http://chugai-pharm.jp/hc/ss/pr/drug/ava\\_via0100/if/index.html](http://chugai-pharm.jp/hc/ss/pr/drug/ava_via0100/if/index.html)
- [51] パージェタ インタビューフォーム . 中外製薬 .  
[http://chugai-pharm.jp/hc/ss/pr/drug/per\\_via0420/if/index.html](http://chugai-pharm.jp/hc/ss/pr/drug/per_via0420/if/index.html)
- [52] リツキサン インタビューフォーム . 中外製薬 .  
[http://chugai-pharm.jp/hc/ss/pr/drug/rit\\_via0010/if/index.html](http://chugai-pharm.jp/hc/ss/pr/drug/rit_via0010/if/index.html)
- [53] ハーセプチン インタービューフォーム . 中外製薬 .  
[http://chugai-pharm.jp/hc/ss/pr/drug/her\\_via0060\\_01/if/index.html](http://chugai-pharm.jp/hc/ss/pr/drug/her_via0060_01/if/index.html)
- [54] カドサイラ インタビューフォーム . 中外製薬 .  
[http://chugai-pharm.jp/hc/ss/pr/drug/kad\\_via0100/if/index.html](http://chugai-pharm.jp/hc/ss/pr/drug/kad_via0100/if/index.html)
- [55] Fang WB, Brantley-Sieders DM, Parker MA, Reith AD, Chen J. A kinase-dependent role for EphA2 receptor in promoting tumor growth and metastasis. *Oncogene*. 2005; 24: 7859-68.
- [56] Taddei ML, Parri M, Angelucci A, et al. Kinase-dependent and -independent roles of EphA2 in the regulation of prostate cancer invasion and metastasis. *Am J Pathol*. 2009; 174: 1492-503.
- [57] Lo AS, Zhu Q, Marasco WA. Intracellular antibodies (intrabodies)

- and their therapeutic potential. *Handb Exp Pharmacol*. 2008; 343-73.
- [58] Williams BR, Zhu Z. Intrabody-based approaches to cancer therapy: status and prospects. *Curr Med Chem*. 2006; 13: 1473-80.
- [59] Cattaneo A, Biocca S. The selection of intracellular antibodies. *Trends Biotechnol*. 1999; 17: 115-21.
- [60] Imai S, Mukai Y, Nagano K, et al. Quality enhancement of the non-immune phage scFv library to isolate effective antibodies. *Biol Pharm Bull*. 2006; 29: 1325-30.
- [61] Suzman DL, Antonarakis ES. Castration-resistant prostate cancer: latest evidence and therapeutic implications. *Ther Adv Med Oncol*. 2014; 6: 167-79.
- [62] Hanash S. Disease proteomics. *Nature*. 2003; 422: 226-32.
- [63] Ocana A, Pandiella A, Siu LL, Tannock IF. Preclinical development of molecular-targeted agents for cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011; 8: 200-9.
- [64] Bell R. Ongoing trials with trastuzumab in metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2001; 12 Suppl 1: S69-73.
- [65] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989; 244: 707-12.
- [66] Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 2000; 19: 3159-67.
- [67] Sergina NV, Rausch M, Wang D, et al. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature*. 2007; 445: 437-41.

- [68] Miles D, Baselga J, Amadori D, et al. Treatment of older patients with HER2-positive metastatic breast cancer with pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel: subgroup analyses from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial (CLEOPATRA). *Breast Cancer Res Treat.* 2013; 142: 89-99.
- [69] Scheuer W, Friess T, Burtscher H, Bossenmaier B, Endl J, Hasmann M. Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. *Cancer Res.* 2009; 69: 9330-6.
- [70] Capelan M, Pugliano L, De Azambuja E, et al. Pertuzumab: new hope for patients with HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol.* 2013; 24: 273-82.
- [71] Fox BP, Kandpal RP. A paradigm shift in EPH receptor interaction: biological relevance of EPHB6 interaction with EPHA2 and EPHB2 in breast carcinoma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics.* 2011; 8: 185-93.
- [72] Freywald A, Sharfe N, Roifman CM. The kinase-null EphB6 receptor undergoes transphosphorylation in a complex with EphB1. *J Biol Chem.* 2002; 277: 3823-8.
- [73] Larsen AB, Pedersen MW, Stockhausen MT, Grandal MV, van Deurs B, Poulsen HS. Activation of the EGFR gene target EphA2 inhibits epidermal growth factor-induced cancer cell motility. *Mol Cancer Res.* 2007; 5: 283-93.