

Title	腫瘍血管内皮細胞特異的な細胞内侵入抗体を用いた腫瘍ターゲティングに関する研究
Author(s)	吉川, 舞
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59419">https://hdl.handle.net/11094/59419</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	よし かわ まい 吉 川 舞
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬学)
学位記番号	第 25178 号
学位授与年月日	平成24年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	腫瘍血管内皮細胞特異的な細胞内侵入抗体を用いた腫瘍ターゲティング に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 中川 晋作 (副査) 教 授 土井 健史 教 授 八木 清仁 教 授 堤 康央

#### 論 文 内 容 の 要 旨

近年、モノクローナル抗体に抗がん剤を修飾した新たな抗体医薬、抗体薬物複合体 (Antibody Drug Conjugate ; ADC)が上市され、抗がん剤由来の強い細胞傷害活性と抗体由来の標的分子ターゲティング能の双方を享受した次世代型の抗体医薬として期待されている。ADCの開発には、抗がん剤の多くが細胞内で活性を発揮するものであることから、標的分子に対するターゲティング能のみならず、積極的な細胞内移行能を有する抗体 (細胞内侵入抗体)が必要不可欠であると考えられる。しかし、近年次々と同定されている有望ながん治療標的に対し、細胞内侵入抗体を効率的に単離可能な方法論は未だ開発されていない。そこで本研究では、独自のファージ表面提示法を駆使することで細胞内侵入抗体の効率的単離法を確立するとともに、単離した細胞内侵入抗体の腫瘍ターゲティングキャリアとしての有用性を評価した。標的分子としては、腫瘍血管内皮細胞上に発現する分子 (Tumor Endothelial Marker ; TEM)として世界的に良く知られているVEGFR2及び、近年新たに同定されたTEMであるRobo4を選択した。腫瘍血管を標的にしたがん治療は、薬物の血管内腔から腫瘍組織内への移行を考慮する必要がない、がん種によらず有効であるなどの利点を有することから、これらを標的にしたADCを開発することができれば極めて効率の良いがん治療が実現するものと期待できる。

まず、著者は、多様な抗原特異的抗体を含む免疫ファージ抗体ライブラリを構築することで細胞内侵入抗体の単離を加速化しようと考えた。しかし、通常のファージ表面提示法では抗体の抗原親和性を評価することはできても細胞内侵入活性を測ることはできない。この点、緑膿菌菌体外毒素フラグメント (PSIF)は細胞内に取り込まれたときのみ細胞傷害性を発揮可能な毒素蛋白質である。従って、抗原特異的な抗体が濃縮された免疫ファージ抗体ライブラリ中の各クローンをPSIFとの融合蛋白質として大腸菌培養上清中に誘導し、抗原結合性をELISA

で、一方で細胞内侵入活性を抗原発現細胞に対する傷害性を指標に細胞傷害性試験で同時に評価すれば、多様な抗原特異的抗体の中から細胞内侵入抗体を一挙に単離できると考えられる。そこで、実際にVEGFR2及びRobo4に対する抗体を多種類含む免疫ファージ抗体ライブラリについてスクリーニングを試みた結果、細胞内侵入抗体(VEGFR2;2種類、Robo4;1種類)と、細胞内に取り込まれにくい細胞内低侵入抗体(VEGFR2;14種類、Robo4;3種類)を単離することに成功した。本スクリーニング法はライブラリ中に含まれる多数の抗原高親和性抗体の中から細胞内侵入抗体をたった一度の簡便なアッセイによって、わずか2週間という短期間で単離可能であった。本方法は、細胞内侵入抗体の同定に要する時間を一気に短縮し、次世代型の抗体医薬として期待されるADCの開発を加速しうる技術であると考えられる。

また、スクリーニングで特に強い細胞傷害性を示したVEGFR2に対する細胞内侵入抗体V2-05iと低侵入抗体V2-02、さらにRobo4に対する細胞内侵入抗体R4-13iと低侵入抗体R4-16についてscFvリコンビナント蛋白質を作製し、その抗原結合性と細胞内侵入活性について詳細に評価した。その結果、VEGFR2及びRobo4に対する細胞内侵入抗体と低侵入抗体は、いずれもKD値にして3~5 nMと極めて強い抗原結合性を有していた。一方、これらの抗体の抗原発現細胞に対する取り込み効率を測定したところ、細胞内低侵入抗体では2時間で3%、8時間で10%程度しか細胞内に取り込まれないのに対し、細胞内侵入抗体では2時間で30%、8時間では実に40%の抗体が取り込まれており、既にADCとして臨床応用されている抗体とほぼ同等の極めて強い細胞内侵入活性を有することが明らかとなった。続いて、V2-05iを用い、細胞内侵入抗体の細胞内取り込み後の動態を評価したところ、V2-05iはVEGFR2依存的なエンドサイトーシスで取り込まれた後、主にVEGFR2とともにエンドソームからリソソームへと移行するリソソーム経路を辿ることが明らかとなった。後期エンドソームやリソソームは酸性環境や還元環境といった特殊な環境を有することから、このような環境で特異的に切断されるリンカーを用いて細胞内侵入抗体に抗がん剤を修飾すれば、抗がん剤を細胞内に送達するのみならず、その細胞質内への効率的な移行をも制御できる。また著者は、V2-05iとともに細胞内に取り込まれたVEGFR2は、抗体とともにリソソーム経路で分解される一方、新たにVEGFR2が何らかの機構により細胞表面に誘導されることで細胞表面VEGFR2量は維持され、細胞内侵入抗体の更なる結合と取り込みを可能にすることを示唆する知見を得ている。このような細胞内動態は、今後、本抗体を抗がん剤キャリアとして利用し、ADCを開発していく上で極めて有利な性質である。

さらに、細胞内侵入抗体の抗がん剤キャリアとしての有用性を評価するためにADCのモデルとしてPSIF融合蛋白質を作製し、その抗原発現細胞に対する細胞傷害性を評価した。その結果、細胞内低侵入抗体のPSIF融合蛋白質やPSIF単独では全く細胞傷害性を示さない条件において、細胞内侵入抗体のPSIF融合蛋白質は顕著な細胞傷害性を示した。また、これを腫瘍モデルマウスに投与した際も同様に、細胞内侵入抗体のPSIF融合蛋白質投与群のみが顕著な腫瘍増殖抑制効果を示し、抗がん剤の活性発揮にはやはり標的細胞内にまで薬物を効率よく送達することが極めて重要であることが示された。また、細胞内侵入抗体と低侵入抗体の体内動態を評価したところ、細胞内侵入抗体と低侵入抗体は生体内においても確かに腫瘍組織内の標的分子をほぼ同等に認識し、同等に腫瘍に

集積するものの、腫瘍への滞留性の観点からは細胞内侵入抗体が低侵入抗体と比較して圧倒的に優れていることが示された。細胞内侵入抗体は標的細胞内に効率よく薬物をデリバリーできるのみならず、より多くの薬物をより長時間作用させることのできる画期的な腫瘍ターゲティングキャリアであり、低分子抗がん剤のみならず、リポソーム、蛋白質、ウイルスベクターなど細胞内で機能する様々な医薬を標的細胞内へと送達可能な基盤技術として広く応用できるものと考えられる。なお、以上の検討において、VEGFR2とRobo4に対する細胞内侵入抗体の有用性を比較評価すると、両抗体はほぼ同等に腫瘍組織内へと集積しており、ADCとしての抗腫瘍効果もほぼ同等であった。一方、詳細は現在検討中であるが、体重減少を指標とした副作用の検討から、Robo4を標的としたADCの方が副作用が少ないことを示唆するデータを得ている。ADCは標的分子特異的に極めて強力な細胞傷害性を誘導しようとするがん治療戦略であることから、極めて腫瘍特異性に優れた標的分子の選択が重要である。この点においても、Robo4のように新たに同定されたばかりの有望ながん治療標的に対し、従来法と比較して圧倒的なスループットで細胞内侵入抗体を単離可能な著者のスクリーニング技術は、有効性高く副作用少ないADCの開発に大きく貢献するものと期待している。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究では、ファージ表面提示法と独自のPSIFを用いたスクリーニングシステムを融合することにより、抗体薬物複合体 (Antibody-Drug Conjugate ;ADC) の開発に有用な細胞内侵入抗体の迅速かつ簡便な単離創製技術の確立を試みた。効率のよいがん治療標的として注目されている腫瘍血管内皮細胞上に発現する分子VEGFR2とRobo4を標的分子として検討を行い、以下のような結果を得た。

1. 腫瘍血管内皮細胞上に特異的に発現する分子、VEGFR2及び Robo4に対する免疫ファージ抗体ライブラリに対し、PSIF融合蛋白質を用いた細胞死を指標にした簡便なスクリーニング法を適用することで、細胞内侵入抗体を迅速かつ簡便に単離することに成功した。
2. 単離したVEGFR2及びRobo4に対する細胞内侵入抗体は既存のADCに匹敵する強力な細胞内侵入活性を有することが明らかとなった。
3. 単離したVEGFR2及びRobo4に対する細胞内侵入抗体は腫瘍モデルマウスの腫瘍組織に確かに集積しており、同等の抗原親和性を有する細胞内低侵入抗体と比較して腫瘍への蓄積性に優れていることが示された。
4. 単離したVEGFR2及びRobo4に対する細胞内侵入抗体は優れた抗がん活性を示し、ADCの開発には細胞内侵入活性に優れた細胞内侵入抗体の単離が必須であることが明らかとなった。
5. 近年、新たに同定されたTEMの一つであるRobo4を標的にした細胞内侵入抗体はVEGFR2を標的にした細胞内侵入抗体と同等に腫瘍に集積する一方、正常組織に対する集積は認められず、より副作用の少ないがん治療を達成しうるものであることが示唆された。

以上、本研究で確立した細胞内侵入抗体単離技術は、既存の技術と比較して圧倒的なスループットを誇り、現在待望されているADCの開発を一気に加速するものと考えら

れる。また、単離した腫瘍血管特異的な細胞内侵入抗体は腫瘍組織さらには標的細胞内への効率的な薬物送達を達成可能なキャリアであり、近い将来、低分子抗がん剤のみならず、リポソーム、核酸、蛋白質など細胞内で機能する様々な医薬を標的細胞内へと送達可能な基盤技術として広く応用されるものと期待され、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものとする。