The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Claudinを標的とした創薬基盤研究 : がん治療の標的としての有用性評価
Author(s)	橋本, 洋佑
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61701
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　橋本　洋佑　）	
論文題名	Claudinを標的とした創薬基盤研究　―がん治療の標的としての有用性評価―

論文内容の要旨

上皮組織は、隙間なく細胞が並ぶ、極性を有するといった形態学的特徴を持ち、我々の体内と体外を隔てる役割を果たしている。これらの形態学的特徴は、tight junction (TJ)により維持されている。TJは、細胞側面の最も頂端面に近い部位に存在し、その他のadherence junctionやdesmosomeといった接着機構とは異なり、隣り合う細胞を完全に密着させ、細胞間隙を介した物質の透過を制限している。このTJを構成するタンパク質群の1つがclaudin (CLDN) familyである。CLDNは、27種の分子種が報告されている4回膜貫通タンパク質であり、2つの細胞外領域を持つ。がん組織における細胞間では、TJが部分的に崩壊しており、正常時では細胞間隙を透過しないようなものが透過するようになる。この際、CLDNを始めとするTJを構成するタンパク質が細胞表面全体に分布するようになり、その発現量も著しく増減する。特に、CLDN-1, -3, -4, -7は多くの種類のがんで過剰発現しているため、これらに対するbinderは、がん診断薬、がん治療薬、外科的手術補助薬としての応用が期待されている。

そのCLDN binderの先駆けとなったのが、*Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE)である。このCPEは、N末端側半分から成る細胞毒性を発揮するドメインとC末端側半分から成るCLDN結合ドメインから成る毒素であり、CLDNと結合することで細胞膜表面に微細な小孔を開け、細胞死を誘導させる。このCPEのCLDN結合ドメインは、主にCLDN-3と-4を始めとし、様々なCLDNに結合する。CPEを用いた抗がん戦略は、動物モデルで顕著な抗腫瘍効果が得られるものの、強い肝毒性を示すことが分かっており、投与量の設定等が非常に難しく、臨床応用が極めて困難とされている。

CPEが有する毒性の課題を解決するために考えられたものの1つが抗CLDN抗体である。単一のCLDNを認識する高い特異性を有する抗体を作製できれば、よりCLDN標的化分子としての安全性と有用性は向上すると想定される。常法であるハイブリドーマ法でCLDNのような4回膜貫通タンパク質に対するモノクローナル抗体を取得するにあたっては、免疫誘導が最大の関門となる。当研究室では、CLDNに対する免疫法としてDNA免疫法が有効であることを見出し、これまでにヒトCLDN-1及び-4を発現するプラスミドDNAを免疫原に用いて抗CLDNモノクローナル抗体の作製を行ってきた。しかし、これらの抗体が優れた腫瘍標的化抗体としての性質、すなわち、腫瘍組織に特異的に集積し、かつ、正常組織へは特異的に集積しない性質を示すかは、未だ確かめられていない。これは、取得したヒトCLDNに結合する抗CLDN抗体が、体内分布実験に汎用的に使われる齧歯類のCLDNを認識するとは限らない、といった種間交差性の問題のためである。そのため本博士論文では、樹立した抗CLDN抗体の中から齧歯類との種間交差性を有する抗体を選別し、その抗体が齧歯類において優れた腫瘍標的性を示すかを検討し、CLDNが腫瘍標的化抗体の標的として有用であるかを評価した。

最初に、当研究室で取得した抗CLDN-1抗体3クローン、抗CLDN-4抗体8クローンの中から、ラット又はマウスCLDNとの交差反応性を有する抗CLDN抗体の選抜を行った。その結果、抗CLDN-1抗体の全クローンがラットCLDN-1との交差性を示し、抗CLDN-4抗体の内2クローンが、ラット及びマウスCLDN-4と交差反応性を示すことが分かった。これらの抗体の結合親和性を評価したところ、抗CLDN-1抗体ではクローン3A2が、抗CLDN-4抗体ではクローン5D12が最も強い親和性を示したため、この2つを選抜することにした。これらの抗体は、CLDN-1及び-4の第2細胞外領域中の152～155番目のアミノ酸周辺を認識していることが、各種変異導入CLDNとの結合性より明らかとなった。この領域は、CLDN family間の相同性が低い領域であり、かつ、ウシ、イヌ、ヒツジ、ブタのCLDNにおいても保存されている領域であった。

続いて、実際に選抜した抗体の齧歯類における体内分布を評価した。抗体の体内分布は、抗体に近赤外蛍光物質を修飾し、抗体を投与して一定時間後に動物を屠殺後、各臓器を取り出し、その臓器中の蛍光量を蛍光imaging装置により測定することで評価した。まず、3A2及び5D12の両方が種間交差性を示すラットを用いて、体内分布の違いを評価した。近赤外蛍光修飾control抗体、3A2及び5D12を100 μgの投与量で腹腔内投与し、その24時間後に体内分布を評価した。ラットやマウスのタンパク質に対し、結合性を示さないcontrol抗体の体内分布と比べ、3A2は確認した全ての臓器にcontrol抗体より多く移行していた。一方、5D12は確認した全ての臓器でcontrol抗体と同様の移行量を示した。このことは、5D12は正常組織に対し、特異的な移行性を示さないことを意味する。そのため、この5D12が、正常組織に対し特異的な移行性を示さず、腫瘍組織に対し特異的に移行性を示すかを、担癌モデルマウスを用いて評価した。

ヒト大腸癌細胞であるLoVo、ヒト胃癌細胞であるMKN74を用いて皮下腫瘍を形成させた後、近赤外蛍光修飾抗体を20 μgの投与量で尾静脈内投与し、その72時間後に体内分布を評価した。その結果、5D12は正常組織に対しては、やはりcontrol抗体と同様の体内分布プロファイルを示す一方で、腫瘍組織に対してはcontrol抗体の2倍量移行することが分かった。よって、5D12は腫瘍標的化抗体として好ましい性質を示すことが明らかとなった。

最後に、この5D12に抗腫瘍活性を付与し、抗腫瘍活性を示す投与レジメにおける毒性発現を評価した。5D12は、ヒトにおける主要な抗腫瘍活性メカニズムであるantibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) を活性化させる機能を持たないFc部分を持つサブタイプであるため、十分にADCC活性の高いヒトIgG1にFc部分を含む定常領域を置換、すなわち、キメラ化することで抗腫瘍活性を付与した。このキメラ5D12を、LoVo又はMKN74を皮下移植して1日後のマウスに1 mg/kgの投与量で週に2回投与していくと、計8回投与して以降に、どちらの担癌モデルにおいても有意な腫瘍増殖抑制効果が表れた。この投与レジメを、野生型マウスに適用し、最終投与24時間後の血中の組織傷害マーカーを評価してみたところ、これらのマーカーの異常値は観察されなかった。このことより、キメラ5D12は、CPEと比べ安全性の高いCLDN binderであることが明らかとなった。

本博士論文の単一のCLDNに対し結合性を示すbinderの体内分布を比較した実験により、抗CLDN-1抗体は正常組織への移行性を示すこと、抗CLDN-4抗体は腫瘍標的化抗体として有用な体内分布傾向を示すことが明らかとなった。このことより、CLDN-4は腫瘍標的化分子の標的として優れていることが示された。このCLDN-1と-4の違いは、これらのCLDNの細胞上での発現の仕方の違いやTJへの組み込まれ方の違いにより、CLDNが存在している部位に抗体が到達できたか否かが関与していると考えられる。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（ 橋本洋佑 ）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	八木清仁
	副 査	教授	中川晋作
	副 査	教授	辻川和丈

論文審査の結果の要旨

当該博士論文はタイトジャンクションの構成タンパクであるClaudin（CLDN）が癌治療における標的分子として有用であることを示す実験結果をまとめたものである。

申請者は所属する生体機能分子化学分野で取得されていた11種類の抗ヒトCLDN抗体の中から正常組織には移行せず、選択的に腫瘍組織のみに移行する抗体をスクリーニングするために齧歯類CLDNとの結合交差性について検討を行った。その結果ラットCLDN-1と結合性を有する3A2抗ヒトCLDN-1抗体及びラット、マウスCLDN-4と結合性を有する5D12抗ヒトCLDN-4抗体を選出した。更に各CLDNのアミノ酸配列情報、及び、抗体と各種変異CLDNとの結合性を基に、抗体の詳細なCLDNへの結合領域を特定している。

続いて動物種間交差性を有し、かつ高い親和性を持つ3A2抗CLDN-1抗体と5D12抗CLDN-4抗体の体内分布を、実際に齧歯類に投与して評価した。その結果、抗ヒトCLDN-1抗体の体内分布プロファイルはCLDN-1の組織発現プロファイルと一致した。一方、抗ヒトCLDN-4抗体の体内分布プロファイルはCLDN-4の組織発現プロファイルとの関係性が薄いことが認められた。加えて5D12は、正常組織へはcontrol抗体と同様の体内分布プロファイルを示し、かつ、腫瘍組織に対しては特異的に移行するという腫瘍標的化抗体として望ましい性質を有することを見出した。

さらに腫瘍標的化抗体として有用な性質を示した5D12抗ヒトCLDN-4抗体にキメラ化を施すことでADCC活性化能を付与し、5D12のがん治療用の抗体としての有用性を評価した。xi-5D12は、繰り返しの投与で顕著な抗腫瘍効果を示し、同治療レジメンを野生型マウスに適応した場合でも、毒性を示さないことを明らかにした。このことより、CLDN-4は、がん治療用の抗体の標的として非常に有用であることを示した。

以上、CLDNを標的とした癌治療戦略の発展に大いに貢献する成果を得たことにより、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。