

PEG修飾リポソーム化バイオ改変分子を用いた癌分子標的治療の開発

佐々木 茂 [札幌医科大学大学院消化器制御医学／助手]
遠藤 高夫 [札幌医科大学大学院消化器制御医学／助教授]

背景・目的

我々は、多くの消化器癌において過剰発現しているレセプター型チロシンキナーゼであるErbB-2に対するモノクローナル抗体を全く独自に確立し、この抗体が抗体単独で、世界で初めて強力にアポトーシスを誘導すること、そして、その効果はこれまでに類を見ない強力な抗癌作用であることを明らかにしてきた。本研究では、このモノクローナル抗体（以下MoAb）CH401を用い、これに更に分子改変を施し、全く新しいバイオ改変分子として、より強力な抗癌効果を示す新しい治療薬を開発することを目的とする。

内容・方法

本研究では、当初、抗体をファージディスプレイ法によりヒト型化し、これにPEG修飾リポソーム化を行う予定であったが、ヒト型化では、完全に副作用を抑制しきれず、さらにPEG修飾リポソーム化を行なう事によって、副作用の増強も懸念され、これを払拭することを目的に、まず初めに、ヒト抗体产生マウスを用い、完全なヒト抗体の作成を行い、この作成したヒト抗体にPEG修飾リポソーム化を行なうこととし、当初の予定に若干の変更を加えた。

現在、このヒト抗体の作成を行なっている。また、一方では、医薬品としての付加価値を高めるため、このアポトーシス誘導抗ErbB-2マウス・ヒトキメラMoAb CH401によるアポトーシス誘導の機序解析を行なった。この機序を詳細に明らかにすることは、現在作成を進めているPEG修飾リポソーム化ヒト抗体を投与する際に強力な理論的背景となるばかりでなく、今後の製品化に向けて、本抗体治療に付加価値を与える可能性が高いと考えられる。このことから以下の研究を行なった。

細胞のアポトーシスに関して、近年、MAPK経路、PI3K-Akt経路、caspase経路などの細胞内情報伝達系の役割が注目されている。本研究では、CH401投与に伴うこれらの活性の変化について、ウェスタンプロット法およびin vitroキナーゼアッセイ法を用いて検討した。さらに、CH401にMAPK阻害剤を併用した場合の抗癌効果の増強についてin vitroおよびin vivoで検討を加えた。

結果・成果

1)ヒト抗体の作成

抗ErbB-2マウス・ヒトキメラMoAb CH401のエピトープ解析の結果を用い、最も細胞傷害活性の高い抗体を產生するペプチドを合成し、これをヒト抗体产生マウスに免疫し、抗体产生クローンを取得中である。現在、約300クローンのハイブリドーマを取得しているが、これらの抗体の細胞傷害活性に関する検討を行なっている段階にある。これを見出した後、CHO細胞を用い、抗体を大量に作成し、これに対して、PEG修飾リポソーム化を行なう予定である。

2)アポトーシス誘導機序解析

MoAb CH401がMAPKのERKおよびPI3K-AktのAktの活性を抑制すること、さらに、JNKおよびp38 MAPK経路に強い

活性化をも誘導することを見出した。従って、CH401はERKやAktなどの生存シグナルを抑制するだけでなく、アポトーシス促進に関与するJNKおよびp38経路を活性化することによって、ErbB-2過剰発現癌細胞にアポトーシスを誘導することが明らかになった。

さらに、CH401が、直接的なアポトーシス実行機構であるcaspase経路（caspase-3, 8, 9）に与える影響についても解析を行なった。その結果、CH401投与8時間後からcaspase-3の有意な活性化を検出した。さらに、caspase-8およびcaspase-9の活性を検討したところ、CH401投与により、主にcaspase-8が活性化されることを見出した。従って、CH401によるアポトーシス誘導には、caspase-8, caspase-3の経路が重要であると考えられた。MEK阻害剤U0126を用いて、ERK経路の活性をさらに積極的に抑制することで、CH401のアポトーシス誘導効果を増強することが可能であるかを検討した。CH401にU0126を併用した群では、投与2時間後、32%の細胞でアポトーシスが誘導されていた。一方、CH401単独投与群では、抗体投与2時間後のアポトーシス誘導細胞の比率は8%であり、CH401にU0126を併用することで、より強いアポトーシス誘導効果が得られることが認められた。さらに、in vivoにおいても、CH401にU0126を併用することによって、抗腫瘍効果が増強されるかを検討した。ErbB-2過剰発現胃癌細胞株JRSTを移植し、腫瘍を形成したSCIDマウスを用いて検討した。コントロール群では腫瘍が次第に増大し、25日目には $33490 \pm 2564 \text{ mm}^3$ に達していたが、CH401単独投与群、これにU0126を併用した群では、それぞれ $6367 \pm 452 \text{ mm}^3$ 、 $4186 \pm 325 \text{ mm}^3$ と腫瘍の増殖の著明な抑制が認められた。すなわち、抗体単独でも強力な抗癌作用が認められ、U0126を併用することで、さらに効果の増強が認められた。

以上のことより、CH401のアポトーシス誘導効果は、MAPK、PI3K-Akt経路を介しているものであり、最終的には、caspase8、caspase3を経ていることが明らかになった。この機序解析の結果から、さらに、MAPK阻害剤を併用したところ、in vivoおよびin vitroの両者において、アポトーシスの増強が認められた。このことは、今後行なうPEG修飾リポソーム化によって、その作用増強を目指した場合に、従来の抗癌剤との併用による抗体療法ではなく、抗体単独による高い抗癌効果が期待されるばかりでなく、MAPK阻害剤というあくまでも生物物質を併用するという理想的な癌治療を指向するもので、現在作成しているPEG修飾リポソーム化ヒト抗体を用いることに大きな優位性を付加するものであると考えられた。

今後の展望

現在、ヒト抗体产生マウスを用いた抗ErbB-2ヒト抗体の作成にとりかかっているが、今後はまず、早急に細胞傷害活性の最も強力なクローンを選定し、これにPEG修飾リポソーム化を行い、その作用増強効果を確認したい。また一方、医薬品としての完成のため、臨床試験の実施に向けて、抗体の大量生産を行なう施設の増設を行ないたい。次に、DNAアレイ技術を用い、患者ごとの本抗体治療の効果予測を可能にしたい。このことは、本抗体治療の最適な条件を明らかにすることとなり、これを確立することは、本抗体にさらにテーラーメイド治療としての価値を付与するものであると考えられる。