

抗腫瘍免疫応答活性化を指向した ヒト化抗体開発とその前臨床応用

地主 将久 [北海道大学遺伝子病制御研究所/准教授]

秋田 弘俊 [北海道大学医学系研究科腫瘍内科学/教授]

木下 一郎 [北海道大学医学系研究科腫瘍内科学/講師]

吉山 裕規 [北海道大学遺伝子病制御研究所/准教授]

大野 裕深 [有限会社ミクロバイオテック/代表取締役]

浅野 行蔵 [北海道大学農学研究院応用菌学/教授]

背景・目的

MFG-E8は、樹状細胞による腫瘍免疫寛容をはじめ、腫瘍内マクロファージを介したがん幹細胞活性化など、腫瘍細胞、免疫細胞を中心とした腫瘍微小環境内因子の修飾を介して発癌促進、治療抵抗性を制御する重要な蛋白であることが推察される。以上より抗体医薬による標的療法は既存の抗がん剤の臨床効果増強に大いに資することになると考えられる。以上より、本研究ではヒトMFG-E8モノクローナル抗体開発と其の作用機序を、ヒト化マウスを活用することで検証する。

内容・方法

ヒトMFG-E8のリガンドIntegrin- $\alpha\beta3$ 認識部位(RGD配列)を含むpeptideによるラット免疫により得られた抗体産生形質細胞とヒト形質細胞腫を用いてハイブリドーマを作成する。産生抗体をProtein A columnにて精製後、阻害効果をELISA法にて測定する。さらに、抗MFG-E8阻害抗体単独、および各種抗癌剤や分子標的剤併用による腫瘍縮退効果を、各種ヒト癌細胞株の他、患者検体から採取したPrimary tumor sampleの皮下腫瘍モデルを対象に検証する。以上の検証を通して、抗MFG-E8抗体に感受性の高い癌腫の選定、および併用療法の最適化を遂行する。また、患者検体を対象としてMFG-E8の定量的検出を行い、治療前後および治療経過中に抗癌剤不応性を呈した時期で区分化して、MFG-E8発現と再発、治療不応性、生存率との相関性の有意性を検証する。以上よりヒト癌の抗癌剤応答性や予後において、MFG-E8が果たす臨床的意義を明らかにする。

結果・成果

ヒトMFG-E8リガンドIntegrin- $\alpha\beta3$ 認識配列LVLTLDTRGRGDIFTEYを決定し、KLHとの配合体をラット腹腔投与によって免疫した。6週間後得られた脾臓細胞とヒト形質細胞腫瘍株との融合によるハイブリドーマ作成を行い、ELISA法にてヒトMFG-E8蛋白との結合性を検証した。その結果、得られた2種類のクローン(R1、R2)において高い結合性を確認できた(図1)。その阻害活性の検証として、ヒトMFG-E8ポリクローナル

抗体において認めたがん幹細胞に対する*in vitro*でのアポトーシス細胞死や*in vivo*でのNOD-SCID免疫不全マウスにおける、がん幹細胞増殖抑制効果を検証した。その結果、ヒト肺非小細胞がん由来のCD133⁺EpCAM⁺Aldflour⁺がん幹細胞において、上皮性増殖因子阻害剤Gefitinibによる細胞死誘導効果を増強すること、*in vivo*における免疫不全マウスの腫瘍増殖を有意に抑制することを確認した。それに対し、コントロール抗体での生物活性は認めなかった。以上より、本研究で得られたヒトMFG-E8抗体クローンによる特異的な阻害活性を確認できた。

ヒト化マウス作成については、NSGマウス導入を完了したところであり、理研BRSとのヒト臍帯血幹細胞譲渡に関わるMTA関連の書類作成を行なっているところである。以上より、本研究期間でのヒト化マウス作成は途上段階にあり、ヒト抗MFG-E8抗体による抗腫瘍作用機序の検証に至っていないのが現状である。今後もヒト化マウス作成および作用機構の検討を精力的に進めていきたいと考えている。

担がん患者におけるMFG-E8発現については、抗癌剤不応性の進行癌症例3名について腫瘍細胞、および腫瘍浸潤マクロファージにおいてMFG-E8産生を確認することができた。今後、治療前後腫瘍検体を含めさらに症例を増やしてMFG-E8発現解析を進め、おその予後との相関について検証する予定である。

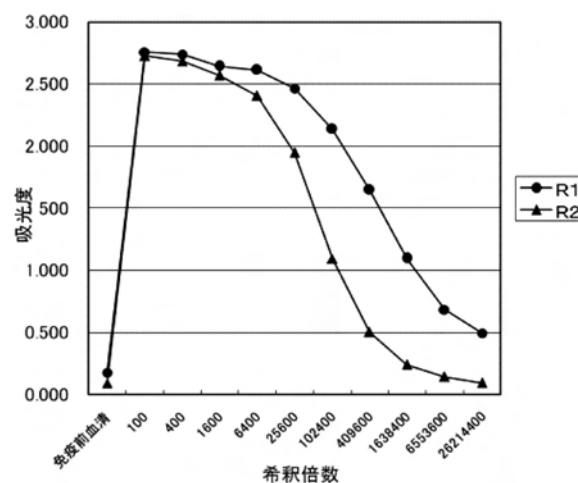


図1. ヒトMFG-E8抗体とMFG-E8蛋白の結合能の検証

今後の展望

今後の展望として本研究期間では完遂できなかった検証項目(ヒト化マウスを対象とした抗腫瘍効果、作用機序の検証および担がん患者サンプルを対象とした発現解析)について継続して検証を推進していく予定である。以上の検証によるPOC取得とともに、GMP gradeのヒト化抗体の改良、改変については道内企業との連携を図ることで推し進めていく予定である。ヒト化抗体を用いた治療不応性がんを対象とした臨床試験についても、準備を進めていく。