



Title	抗TR0P-2抗体Pr1E11の生化学的特性解析と抗腫瘍活性の評価に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	池田, 昌弘
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第13241号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70105
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Masahiro_Ikeda_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（工学） 氏名 池 田 昌 弘

学 位 論 文 題 名

抗 TROP-2 抗体 Pr1E11 の生化学的特性解析と抗腫瘍活性の評価に関する研究

抗体は高い親和性と優れた特異性をもって標的分子に結合し、多様なメカニズムで生物活性を発揮することが出来る。また、血清中での安定性も高く、血中半減期も長いことから、医薬品のフォーマットとして魅力的な性質を有している。近年、抗体を利用した医薬品が多数承認されているが、固形癌を対象とした抗体医薬品は依然ニーズが高く、新たな抗体医薬品の開発が求められている。そこで本研究では、様々な癌種において高発現していることが報告されている TROP-2 に注目し、ファイバー改変アデノウイルス Adv-FZ33 を用いた抗体スクリーニングにて取得された抗 TROP-2 抗体 Pr1E11 の生化学的特性及び抗腫瘍活性を評価し、Pr1E11 の抗癌抗体医薬品としての可能性を検証すると共に、Pr1E11 の生物活性と Adv-FZ33 を用いた抗体スクリーニング方法の因果関係について考察することを目的とした。

第1章では序論であり、本研究の背景と目的を述べた。

第2章ではPr1E11の生化学的特性を解析した。初めに細胞結合性を評価した結果、Pr1E11は既知の抗 TROP-2 抗体 AR47A6.4.2 と同様に多様な癌種に強く結合することが確認された。一方、Pr1E11 は複数の正常組織に対しても結合したことから、臨床応用する場合は正常組織に対する作用に注意する必要があると考えられた。次に、組み換え TROP-2 タンパク質に対する反応速度論定数(k_{on} , k_{off})と解離定数(K_{D})を解析した。その結果、Pr1E11 は高い k_{on} 値と低い k_{off} 値を有しており、比較した既知のクローンよりも数倍低い K_{D} 値を有していた。最後に Pr1E11 のエピトープをフローサイトメトリーによる競合試験及びウエスタンブロット法による組み換え細胞外ドメイン欠損変異体タンパク質に対する結合性評価により解析した。競合試験の結果、Pr1E11 は AR47A6.4.2 と異なる部位を認識することが示唆された。ドメイン欠損変異体に対する結合性解析結果から、Pr1E11 は cysteine-rich domain に、その他6クローンは cysteine-poor domain のN末端側に結合することが明らかとなった。以上の結果から、Pr1E11 は既知のクローンとは異なるユニークな部位に結合することが明らかとなった。

第3章では、Pr1E11 の抗腫瘍活性メカニズムを解明することを目的に、*in vitro*における antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)活性、complement-dependent cytotoxicity (CDC)活性及び細胞増殖阻害活性を評価した。比較対象には、高い *in vivo* 抗腫瘍活性を有する AR47A6.4.2 を用いた。初めにヒト新鮮血より単離した PBMC を用いて、ADCC 活性を評価した。その結果、Pr1E11 は2種の TROP-2 陽性癌細胞株に対して ADCC 活性を

発揮し、そのエフィカシー及びポテンシーはAR47A6.4.2と同等であった。また、Fuc(-)型抗体を用いることで、エフィカシー及びポテンシーが向上することを確認した。次にヒト補体成分を用いてCDC活性を評価した。その結果、両クローン共に癌細胞株に対してCDC活性を発揮することは出来なかった。最後に細胞増殖阻害活性を評価した。抗TROP-2抗体単独又は二次抗体共存下で評価を行ったが、いずれの条件においても両クローンに増殖阻害活性は認められなかった。以上の結果から、Pr1E11は少なくともADCC活性を有するクローンであることが明らかとなった。また、その活性はFuc(-)型抗体で増強されたことから、抗腫瘍活性を最大限に発揮させるためにはFuc(-)型抗体が最適なフォーマットであると考えられた。

第4章では、Pr1E11の癌治療抗体としてのポテンシャルを明らかにすることを目的に、Fuc(-)型キメラ抗体の*in vivo*抗腫瘍活性をSCIDマウス担癌モデルで評価した。また、*in vivo*抗腫瘍メカニズムを解明することを目的に、ADCC活性やCDC活性が低いマウスIgG1型抗体の*in vivo*抗腫瘍活性、及び、*in vitro*における抗体の内在化活性を評価した。比較対象にはAR47A6.4.2を用いた。初めに、BxPC-3担癌モデル及びColo-205担癌モデルを用いてFuc(-)型キメラ抗体の*in vivo*抗腫瘍活性を評価した結果、両モデルにおいてPr1E11はAR47A6.4.2よりも優れた抗腫瘍活性を示した。次にFuc(-)型キメラ抗体に認められた抗腫瘍活性がエフェクター活性に因るものかを明らかにするため、Colo-205担癌モデルを用いてマウスIgG1型抗体の*in vivo*抗腫瘍活性を評価した。その結果、両クローン共にマウスIgG1型抗体に抗腫瘍活性は認められなかった。本結果及び第3章の結果から、両クローンの*in vivo*抗腫瘍活性に対するFc非依存的活性の寄与は無い、もしくは非常に小さく、*in vivo*抗腫瘍活性はADCC活性に大きく依存していることが明らかとなった。続いて、Pr1E11及びAR47A6.4.2の内在化活性を評価することを目的に、両クローンの細胞表面結合持続性を解析した。その結果、両クローン共に37°Cでの培養で細胞表面上の抗体結合量が減少し、その度合いはAR47A6.4.2のほうがPr1E11よりも有意に高かった。本結果から、Pr1E11の内在化活性はAR47A6.4.2よりも低いと考えられた。抗体の内在化はADCC活性や腫瘍内抗体濃度を低下させる可能性があることから、Pr1E11の高い*in vivo*抗腫瘍活性は、低い内在化活性に起因していると考えられた。最後に、一連の検討から明らかとなったPr1E11の生物活性と、Adv-FZ33を用いた抗体スクリーニングの因果関係について考察をした。Pr1E11は低い内在化活性と優れた親和性を有することでAdv-FZ33を標的細胞に強く接着させることに加え、比較的柔軟性の高いN末端側ドメインをエピトープとすることでウイルスのペントンベースと標的細胞の $\alpha v \beta 5$ インテグリンへの結合を容易にし、Adv-FZ33に優れた感染能を付与していることが考えられた。ADCC活性も抗体の親和性やエピトープの影響を大きく受けることが知られており、Adv-FZ33の感染を促進するエピトープは高いADCC活性を誘発し得ることが考えられた。

第5章では本研究の総括を述べた。一連の検討結果から、ファイバー改変アデノウイルスAdv-FZ33を用いたスクリーニングにより樹立された抗TROP-2抗体Pr1E11は、既知の抗TROP-2抗体クローンとは異なる生化学的特性を有しており、これまでに報告されている抗TROP-2抗体の中では最も高い*in vivo*抗腫瘍活性を有していることが明らかとなった。また、一連の検討結果から、Pr1E11の優れた*in vivo*抗腫瘍活性は低い内在化活性によりもたらされている可能性が考えられた。このような知見はこれまでに報告が無く、本知見を取り入れた抗体スクリーニングを実施することで、高い*in vivo*ADCC活性を有するクローンを効率的に取得できる可能性が考えられた。