

博士論文

論文題目 抗腫瘍活性の高い新しい抗HM1.24抗体の創製

氏名 金子 悦士

目次

1. 序文.....	1
1.1. 抗体の役割、及び構造と機能.....	1
1.2. 抗体医薬品の作用機序と機能改変	3
1.2.1. 標的分子の中和.....	3
1.2.2. 抗体リサイクリングと機能中和の関係性.....	4
1.2.3. 血中半減期延長技術.....	5
1.2.4. 標的細胞の傷害作用	6
1.2.5. CDC 活性	6
1.2.6. CDC 活性増強技術.....	7
1.2.7. Fc γ 受容体依存的機構	7
1.2.8. ADCC 活性増強技術.....	8
1.2.8.1. Fc γ RIIIa 親和性を向上させるアミノ酸改変.....	8
1.2.8.2. Fc γ RIIIa 親和性を向上させる糖鎖エンジニアリング	9
1.3. 標的抗原の限界.....	11
1.4. HM1.24 を標的とする抗体医薬品の価値.....	12
1.5. 先行 HM1.24 抗体の問題点.....	14
1.6. 本研究の目的.....	16
2. 方法.....	17
2.1. 実験材料.....	17
2.2. 実験方法.....	18
2.2.1. 動物細胞および菌体の培養.....	18
2.2.2. 抗原の調製.....	19
2.2.2.1. 動物細胞発現系.....	19
2.2.2.2. 大腸菌発現系.....	20
2.2.3. SDS-PAGE.....	20
2.2.4. 抗 HM1.24 モノクローナル抗体の確立	21
2.2.5. 抗 HM1.24 抗体遺伝子のクローニングと発現ベクター構築	21

2.2.6. 抗 HM1.24 キメラ抗体、AHM の調製	22
2.2.7. HM1.24 抗体の活性評価.....	22
2.2.7.1. Binding ELISA を用いた抗 HM1.24 抗体の結合活性評価	22
2.2.7.2. BIAcore を用いた抗 HM1.24 抗体の結合活性評価	23
2.2.7.3. フローサイトメトリーを用いた抗 HM1.24 抗体の結合活性評価.....	24
2.2.7.4. 抗 HM1.24 抗体の ADCC 活性評価	24
2.2.7.5. 抗 HM1.24 抗体の CDC 活性評価	24
2.2.7.6. 抗 HM1.24 抗体のアポトーシス誘導活性評価	25
2.2.7.7. 抗 HM1.24 抗体の internalization 活性評価.....	25
2.2.7.8. 抗 HM1.24 抗体を用いた免疫組織染色.....	26
2.2.7.9. 抗 HM1.24 抗体の <i>in vivo</i> 薬効評価.....	26
2.2.7.10. RT-PCR	27
3. 結果.....	28
3.1. 可溶性抗原の取得	28
3.2. 抗 HM1.24 モノクローナル抗体の樹立	29
3.3. 抗 HM1.24 モノクローナル抗体の解析	30
3.4. 抗 HM1.24 キメラ抗体の作製	30
3.5. 抗 HM1.24 キメラ抗体の解析	31
3.5.1. 結合活性評価 (Binding ELISA)	31
3.5.2. 結合活性評価 (BIAcore)	32
3.5.3. 内在化活性評価.....	32
3.5.4. ADCC 活性評価.....	33
3.5.5. CDC 活性評価.....	34
3.5.6. Apoptosis 誘導活性評価.....	34
3.5.7. エプトープ解析.....	35
3.6. 各種固形癌における HM1.24 発現解析.....	35
3.6.1. RT-PCR.....	35
3.6.2. フローサイトメトリー	36
3.6.3. ヒト大腸癌アレイを用いた免疫組織染色	36
3.7. 固形癌細胞株に対しての ADCC 活性評価	37

3.8. 固形癌ゼノグラフトモデルにおける薬効評価	37
3.8.1. HT-29 ゼノグラフトモデルにおける免疫組織染色	37
3.8.2. HT-29 ゼノグラフトモデルにおける <i>in vivo</i> 薬効評価	38
4. 考察	39
5. 総括	47
6. 図表	48
7. 引用文献	81
8. 謝辞	95

要旨

HM1.24 は多発性骨髄腫(Multiple myeloma; MM)に特異的に発現する抗原として知られてきた。最近では各種固形癌においても発現が確認されることが報告され、癌治療における標的抗原としては魅力的な分子である可能性が示唆されている。HM1.24 を認識する抗体の臨床応用は既に試みられたものの、残念ながら高い有効性を確認するには至らなかった。この原因として、HM1.24 抗体の高い内在化活性が考えられたことから、新たに内在化活性の低い抗体の取得を試み、それに加えて抗体依存性細胞障害 (Antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC) 活性増強技術であるデフコース化を施すことにより、抗腫瘍活性の高い新規の抗 HM1.24 抗体 cKM3590 を得ることに成功した。また、HM1.24 が MM だけでなく、大腸癌・肺癌・膵癌細胞株においても発現していることを確認し、更に、ヒト大腸癌組織を対象とした IHC により、HM1.24 の発現を確認した。本研究により、cKM3590 が MM 治療のみならず、固形癌治療において有効なアプローチとなりうることが示唆された。

1. 序文

1.1. 抗体の役割、及び構造と機能

ヒトなどの高等生物においては、微生物・ウイルス感染や異物の侵入に備え、免疫反応機構が構築されており、この免疫反応機構は自然免疫と獲得免疫に大別される。自然免疫においては微生物自体を食細胞が貪食することにより排除する、あるいは微生物由来の核酸や糖成分を非特異的に感知するセンサーを介した顆粒球画分の活性化により病原体を排除する一方、獲得免疫では、一度病原体を取り込んだ後に特異的にそれを認識するT細胞もしくはB細胞を誘導し、これにより異物の排除を行う。T細胞のうちCD8陽性T細胞が担う免疫機構を主に細胞性免疫、CD4陽性T細胞またはB細胞が担う免疫反応を液性免疫と称する[1]。

液性免疫においては、異物排除のために抗体が産生される。抗体分子はB細胞では膜タンパク質として細胞表面上に発現し、B細胞受容体(B cell receptor; BCR)として機能するが、B細胞から分化した形質細胞において、スプライシングにより膜結合ドメインが除去されるため、分泌型に変換される。抗体分子は糖タンパク質であり、抗原特異的に結合することにより、病原体や異物の排除に関与する[2]。

抗体は、ジスルフィド結合を介して重鎖(H鎖)2本、軽鎖(L鎖)2本のヘテロ4量体を構成する。H鎖及びL鎖はそれぞれ可変領域(Heavy-chain variable; VH、Light-chain variable; VL)、定常領域(Heavy-chain constant-1; CH1ドメイン、Hinge、CH2ドメイン、CH3ドメイン、Light-chain constant; CLドメイン)と称し、また、VH~CH1とVL~CLで構成される部分をFab(Fragment, antigen binding)領域、Hinge~CH3で構成される部分をFc(Fragment, crystallizable)領域と呼ぶ。

可変領域において、VHとVLは静電相互作用及び水素結合によりその構造が維持されており、多様なアミノ酸配列により極めて特異的な抗原認識を担うことが可能となっている。中でも特に多様性の高い相補性決定領域(Complementarity determining region; CDR)と呼ばれる配列が3箇所存在し、これにより抗原特異性が決定される。可変領域中のCDR以外の配列はフレームワークと称され、可変領域の立体構造を維持するとされている。ヒンジ領域は二つのFabドメインの柔軟性及び抗体のアビディティに寄与することが知られており、Fc γ 受容体(Fc γ R)とIgGの結合に部分的に関与することが示唆されている[3]。

加えて、定常領域、その中でも特にFc領域は分子間の相互作用を担うことにより、抗体特有のエフェクター機能を惹起する役割を有する。IgGのCH2ドメインはFc領域のリガンドを結合する部分として機能し[8]、特にCH2ドメイン中の297番目のアスパラギン(Asn297)に結合するN結合型糖鎖は、IgGのFc γ Pへの結合に必須である。CH3ドメインでは強力な非共有結合により、2本のH鎖の相互作用を安定化する役割を担う[9]。また、CH2とCH3の間に形成される溝にはで胎児性Fc受容体(neonatal Fc receptor; FcRn)が結合するとされている[10]。このような定常領域は比較的アミノ酸配列が保存されており、L鎖定常領域には κ と λ の2種類、H鎖定常領域にはヒトではIgM、IgG、IgA、IgD、IgEの5種類のクラスが存在する。その中でも、多様なエフェクター機能を惹起するIgG、特にIgG1サブクラスはその強力なエフェクター機能ゆえに、最も治療用抗体プラットフォームとして用いられている[3]。

1.2. 抗体医薬品の作用機序と機能改変

抗体は血液中に安定的に存在する分子であり、生体にとって抗原性が低いことは当然のこと、投与後血中に長時間安定的に存在することによって、薬効を発揮できると考えられている。一般的に、その作用機序は、標的分子と結合することによりその機能を制御し薬効を発現する作用と、標的分子を発現する細胞を抗体特有のエフェクター活性により排除する作用、といった2つの種類に大別される(図1)。以降で、機能の詳細と関連する抗体改変技術について述べたい。

1.2.1. 標的分子の中和

標的分子の機能を制御する代表的な抗体医薬としては、Remicade®(抗 Tumor necrosis factor (TNF)- α キメラ抗体)やHumira®(抗 TNF- α ヒト抗体)等の慢性関節リウマチ適応の抗体医薬が挙げられる[4]。また、希少疾患であるキャスルマン病適用で認可された Actemra®(抗 IL-6 受容体ヒト化抗体)は IL-6 中和機能を主薬効とし、関節リウマチ領域においてもきわめて高い有効性を示している[5]。一方、癌治療において大きな成功を収めたと考えられているのは Avastin®(抗 VEGF ヒト化抗体)である[6]。これは、腫瘍組織において血管新生を担う血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)の機能を阻害し、抗癌活性を発揮している。高分子体であるタンパク質間相互作用を制御することは、これまでの低分子を中心とした創薬技術では困難であり、標的分子の中和機能を主たる薬効メカニズムとする医薬品として抗体分子が適していたと考えられる。

1.2.2. 抗体リサイクリングと機能中和の関係性

中和作用を主とする抗体医薬品においては、抗体の血中半減期延長が活性増強の有用な手法として考えられている。その際に重要となる分子が FcRn である。FcRn は Major histocompatibility complex (MHC) 様分子であり、血管内皮上に発現した FcRn は抗体の代謝とリサイクルに関与するとされている[7]。IgG は血管内皮細胞によって取りこまれ、初期エンドソーム内で低 pH (pH 6.0-6.5) 環境下において FcRn と結合することにより、リソソームにより消化を回避する[7]。エンドソームから脱出した IgG は細胞表面上までベシクル輸送され、中性環境下 (pH 7.0-7.5) では FcRn との結合が解除されるため、細胞外に放出される。一般的には、IgG のリサイクルは FcRn との相互作用に依存するため、FcRn と高い親和性を有する IgG は長い血中半減期を有すると考えられている。実際、インビボ薬効モデルにおける抗体の半減期の重要性は Roopenian らが証明している[8]。野生型マウス、FcRn 欠損マウス、およびヒト FcRn トランスジェニックマウスにヒト IgG を腹腔内投与したところ、FcRn 欠損マウスにおいては速やかにクリアランスされたが、ヒト FcRn トランスジェニックマウスは長時間にわたり血中濃度が維持されることが確認されている。また、彼らは、同種異系マウスの尾皮膚を移植した WT マウスおよび FcRn 欠損マウスにおいて Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen (CTLA) 4-Ig、抗 CD40L 抗体の治療効果を評価したところ、FcRn 欠損マウスにおける移植片拒絶は WT マウスよりも速やかに生じた。これらの結果から、半減期の延長は治療効果を発揮する上で重要な因子であると考えられた。

1.2.3. 血中半減期延長技術

Zuckierらは、IgG1/4のドメインキメラがそれぞれの基となる抗体であるIgG1型抗体、IgG4型抗体よりも予想外に延長されていることを報告している[9]。この報告においては詳細なメカニズムが解析されていなかったものの、近年ではより合理的なアプローチ、具体的にはFcRn結合性を向上したIgG1変異体の作製が試みられている。前項にて述べたように、FcRn結合を介したIgGのリサイクルは、IgGとFcRnの間のpH依存的相互作用に影響されるため、理想的なIgG変異体としては、pH6環境下においてFcRn結合活性が向上し、pH7.4におけるFcRn結合活性が変化しないことが求められる。Hintonらは、Thr250Gln/Met428Leu変異体の、アカゲザルFcRnに対する低pH環境下における結合活性が37倍亢進しており、アカゲザルにおける血中半減期が2.5倍延長していることが見出された[10]。また、Dall'AcquaらはMet252Tyr/Ser254Thr/Thr256Glu(YTE)トリプル変異体の、カンクイザルFcRnに対する低pH環境下における結合活性が10倍亢進しており、カンクイザルにおける血中半減期が4倍延長していることを見出した[11]。さらに、ZalevskyらはMet428Leu/Asn434Ser変異体では、カンクイザルFcRnへの親和性が12倍亢進しており、カンクイザルにおける半減期が3倍延長していることを示した[12]。興味深いことに、変異を加えたアミノ酸の部位はIgGとFcRnの界面に存在せず、界面近傍に埋もれていた。これは、界面のアミノ酸残基の物理化学的性質が変化することにより、FcRnとの結合活性が変化しているものと考えられる[10]。また、ZalevskyらはhFcRn/Rag1欠損マウスを用いたゼノグラフトモデルにおいて、血中半減期を延長したbevacizumabおよびcetuximab変異体(Met428Leu/Asn434Ser)が有意に抗腫瘍効果を増強したことを報告している[12]。

1.2.4. 標的細胞の傷害作用

一方、抗体医薬には、抗体依存性細胞傷害活性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC) や補体依存性細胞傷害活性 (complement-dependent cytotoxicity; CDC) と呼ぶエフェクター機能による薬効の発現といった、低分子医薬には無い、特有の機能が備わっており、このエフェクター機能の発現が治療効果に重要であるという知見が蓄積されつつある。その代表例は非ホジキンリンパ腫治療剤 Rituxian® (抗 CD20 キメラ抗体) [13, 14] や乳癌治療剤 Herceptin® (抗 HER2 ヒト化抗体) [15] である。これらはそれぞれ、CDC やアポトーシス誘導、あるいは受容体型チロシンキナーゼ HER2 の機能阻害といった活性を有しているものの、ADCC が薬効発現及び治療予後に大きな影響を与える重要な機能であると考えられている。

1.2.5. CDC 活性

CDC 活性は、補体を用いた古典的な細胞障害メカニズムであり、抗原に結合した抗体に対して補体成分 C1q が結合することで開始される。通常、CDC 活性は数分のうちに生じる迅速な細胞傷害機構として認識されており、時に ADCC 活性よりも重要視される場合がある。一方、臨床的意義は、Rituxan® 投与患者における急激な補体成分の消費 [16] や Rituxan® 耐性癌細胞では補体抑制性タンパク質の発現が高い [17] 等、間接的なエビデンスが存在するに留まっている。但し、また、最近では Rituxan® よりもきわめて高い CDC を有する Arzerra® (抗 CD20 ヒト化抗体) が慢性リンパ性白血病において高い治療効果を示しており、薬効発現における CDC の重要性も認識されている [18]。

1.2.6. CDC 活性増強技術

CDC 活性は、多価の Fc、例えば人工的に二量化した抗体分子や IgM 等により、C1q に対するアビディティを向上することで増強されると考えられてきた[19, 20]。しかし、このような分子は、毒性面や生産面の懸念から、医薬品としての利用には適していないと考えられる。それ故、よりシンプルな IgG 分子の改変が求められていた。Idusogie らは C1q の結合残基が CH2 ドメイン中に存在することを明らかにし、これらのアミノ酸を改変する事で C1q に対する結合活性を亢進し、結果として CDC 活性を 2 倍向上させることに成功している[21, 22]。但し、これらのアミノ酸改変は ADCC 活性を減弱させることも報告されている。

一方、Natsume らは IgG1/3 のドメインキメラを作製し、親抗体である IgG1 および IgG3 を超える C1q 結合活性と CDC 活性を発揮させることに成功している[23, 24]。このキメラ分子を用いることにより、カンクイザル体内及び、ヒト血液中で効率的に標的細胞を除去することができ、ヒト体内において増強された CDC 活性が発揮されることが示唆された。

1.2.7. Fc γ 受容体依存的機構

標的細胞表面上に結合した抗体は、白血球上の Fc γ R (Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIIa) の活性化を誘導し、シグナル伝達を惹起する。その中で、Fc γ RIIIa は、その多型と抗体医薬品の臨床アウトカムがリンクすることから、治療効果を得るうえで重要とされている[11]。Fc γ RIIIa は NK 細胞を介した ADCC 活性発揮に重要な受容体であり、158 番目のアミノ酸が Val である場合、IgG との結合活性が高いために強力な ADCC 活性が発揮される一方、Phe である場合は比較的弱い活性となる[25]。

実際に、Rituxan の臨床試験では、FcγRIIIa-Val158 型の genotype を有する患者では良好な治療応答性が得られている[13,14]。また、同様な現象は Herceptin® [15]、Erbitux® [26]、Rho(D)抗体[27]においても確認されており、それ故 ADCC 活性は抗体医薬品の重要なメカニズムであると考
えられている。

1.2.8. ADCC 活性増強技術

抗体医薬の ADCC 活性を向上させるためには、NK 細胞等のエフェクター細胞上に発現する Fc 受容体 (FcγRIIIa) への親和性を上げることが重要となる。このような抗体医薬の改良技術は既に複数報告されており、主に、Fc 領域に人工的なアミノ酸変異を導入する方法と、Fc 領域に結合する糖鎖を最適な構造に均一化する方法の 2 つに大別される。

1.2.8.1. FcγRIIIa 親和性を向上させるアミノ酸改変

Rituxan®や Herceptin®の臨床試験の経験[13-15]から、これまでに FcγRIIIa 結合活性を更新させるアミノ酸改変が試みられてきたが、Fc 領域のアミノ酸は 200 以上存在し、その最適化は容易ではない。それゆえ、重要なアミノ酸部位にフォーカスして改変を行う、もしくはハイスループットの発現系を活用するなどの取り組みがなされている。たとえば、Shields らは CH2ドメインの表面に分布するアミノ酸に限定してアラニンスキャンを実施し、結果として Ser298Ala/Glu333Ala/Lys334Ala トリプル変異体 IgG1 において、FcγRIIIa 親和性及び ADCC 活性が飛躍的に向上することを見出した[28]。最近では Lazar らがコンピューターモデリングを駆使

することにより、ライブラリーサイズを最小化した上で AlphaScreen™ (Perkin Elmer 社、ビーズを利用したハイスループットスクリーニングシステム) を用いて、Ser239Asp/Ile332Glu または Ser239Asp/Ile332Glu/Ala330Leu といった IgG1 変異体が高い FcγRIIIa 結合活性及び ADCC 活性を有することを見出している[29]。一方、Stavenhagen らは、独自の酵母ディスプレイ法を活用することで Phe243Leu/Arg292Pro/Tyr300Leu/Val305Ile/Pro396Leu といった、FcγRIIa と FcγRIIIa 結合活性を高めた IgG1 バリエントを見出している[30]。

1.2.8.2. FcγRIIIa 親和性を向上させる糖鎖エンジニアリング

抗体の Fc 領域、Asn297 には、N 結合型糖鎖が修飾されるため、抗体 1 分子あたり 2 本の糖鎖が存在する。この糖鎖は、2 分岐複合型であり、末端のシアル酸、ガラクトース、コアフコースの有無によりヘテロ性を呈し、このヘテロ性は抗体のエフェクター機構とも関連することが報告されている。Hodoniczky らはガラクトースを欠損した rituximab が、Rituxan® と比較して低い CDC 活性を示すことを報告している[31]。また、末端シアル酸量が FcγRIIIa 結合活性及び ADCC 活性に影響を与えることも報告されている[32]。興味深いことに、彼らは高度にシアル酸化された IgG は柔軟性を失うとともに FcγRIIIa 結合活性も低下するとしている。Umana らは、糖転移酵素 N-Acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII) を強制発現した CHO において IgG を生産すると、バイセクティング N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) がコアマンノースに付加され、IgG の ADCC 活性が 10 倍増強することを見出した。そのような中で、抗体の FcγRIIIa 結合活性増強技術として最もインパクトが大きいのは、Shinkawa らによって見出されたコアフコース除去技術

「POTELLIGENT®」である。Shinkawaらは、Fc領域に修飾される2分岐複合型糖鎖還元末端のGlcNAcからコアフコースを欠損させる、いわゆるデフコース化することにより、FcγRIIIa結合活性が増強され、ADCC活性が約100倍増強されることを見出している[33](図2)。このデフコース化は、ガラクトースやバイセクティングGlcNAcの改変と比較してきわめてインパクトの大きいものであった。

糖鎖の改変が抗体のエフェクター機能を生み出す理由を探るべく、を通常の抗体とデフコース型抗体の結晶構造を比較したもの、Asn297周辺の微妙な水和状態の変化を除いて、目立った構造上の変化は確認されていない[34]。近年の解析においては、抗体とFcγRIIIaの結合は、FcγRIIIa自身の糖鎖からも影響を受け、中でも特にFcγRIIIa中のAsn162に結合するN型糖鎖と抗体Fc部分の相互作用が、抗体糖鎖からのフコース除去により安定化する可能性が示唆されている[35, 36, 37]。このような検証を通じ、デフコース型抗体は低用量、抗原発現レベルが低い、もしくはエフェクター細胞数が少ない状況下においてもADCC活性を誘導することができる可能性が示唆されたため、このデフコース型抗体が臨床の現場においても利用可能であると考えられた[38, 39]。このようなADCC増強効果は、FcγRIIIa、158番目のVal/Pheの多型に依存しないため、遺伝子多型によるADCC活性のヘテロ性を克服できるとも期待された [13-15, 25-27, 40]。また、コアフコースが無い2分岐複合型糖鎖を有する抗体は天然にも存在することから、アミノ酸改変を主としたアプローチと比較すると、抗原性リスクは低いと考えられる[41, 42]。FcγRとIgGの結合性には種差が存在し、増強されたADCC活性をげっ歯類モデルにおいて評価することは困難である。そこで、ヒト末梢血由来単核球(PBMC)を移入したマウスもしくはPBMCを用いた*ex vivo*

評価系が用いられるが、このような系においてデフコース型抗体は劇的に亢進した ADCC 活性を示した[38, 43]。

抗体の臨床応用をする上では、生産系についても考慮しなくてはならない。ただし、これまでに用いられてきた動物細胞発現系と同様、フコース転移酵素 FUT8 (α 1,6- fucosyltransferase) をノックアウトもしくはサイレンシングした細胞を用いることで、デフコース型抗体は容易に製造することが可能である[43-45]。Yamane-Ohnuki らによって樹立された FUT8 欠損 CHO 細胞株はコアフコースを有する通常抗体のコンタミネーション無しに、通常の CHO 細胞株と同程度の発現量でデフコース型抗体を産生することが可能である[45, 46]。

現在では、デフコース型抗体の臨床試験は順調に進んでおり、きわめて低用量で高い治療効果が得られており[47, 48]、デフコース型抗体を次世代抗体医薬の開発に応用することは、優れた方法の一つとして期待されている。

1.3. 標的抗原の限界

前項で触れたように現在では様々な抗体改変技術が開発されている。このような技術を応用して優れた抗体医薬品を創出することが、今後の課題である。一方、これまでに数多くの抗体医薬品もしくは医薬品候補が研究開発される中で、各研究グループによる特許の出願競争が激化することとなった。そもそも、抗体の標的分子は細胞膜表面上に露出する、もしくは分泌されるタンパク質等に限られることから、必然的にその候補には数に限りがある。その結果、多くの製薬会社が CD20 や TNF- α といった代表的な標的ばかりに着目し、これらに対する抗体医薬品ばかりが数多く

開発される結果となってしまった[49]。一方、それでは特定の疾患の治療薬ばかりが研究されることになり、真に医療ニーズの高い疾患に対しての治療法を提供することはできないと思われる。

HM1.24 は糖鎖改変技術を応用することにより臨床開発が可能となる標的抗原であると考えられた。

以下にその詳細を述べる。

1.4. HM1.24 を標的とする抗体医薬品の価値

形質細胞リンパ腫の一種である多発性骨髄腫(multiple myeloma; MM)は70歳以上の男性に発症することが多く、癌化した形質細胞が骨髄内外で増殖し腫瘍を形成する。MM細胞が増殖することにより、正常な造血機能が阻害されることで、感染や出血リスクが上昇し、MM細胞が大量に産生する異常M蛋白(単一のモノクローナル抗体)により血液の粘性が亢進する過粘稠度症候群、あるいはこれらが臓器や組織に沈着し機能を阻害するアミロイドーシスが起きることもある。MM細胞はRANKLなどの分子を発現することで破骨細胞を誘導し、骨破壊等の症状を引き起こす。また、MM細胞の多くは骨髄内に留まることで、骨髄内微小環境がMM細胞の増殖を足場として支持しアポトーシスを阻害するとされ、その結果薬剤抵抗性を獲得するため、難治性の疾患とされてきた[50]。

1960年代には、アルキル化剤であるMelpharanや副腎皮質ステロイドがMM治療薬として臨床応用されるようになり、更には多剤併用化学療法の開発が進んだことから、その予後は顕著に改善された。1980年代からは自家造血幹細胞移植の試みもなされた[51]ものの、化学療法を含め再発を防ぐことは出来ず、完治にいたる例は稀である。特に化学療法においては、正常細胞に対しても

薬剤が毒性を示し、重篤な副作用が発現することがある。患者が比較的高齢であることから、化学療法に耐え切れないこともあり、新たな治療法の開発が望まれていた。そこで近年では異なるアプローチとして、MM 細胞のみをターゲットとする分子標的治療が予後の改善に有効であると考えられ、その一つとして抗体療法が試みられてきた。CD38[52], ICAM-1 (CD54)[53], CD20[54], CD40[55], CD52[56], CD74[57], MUC-1[58], Syndecan-1[58], IL-6 Receptor[59], IGF-1 Receptor[60], RANKL[61]等、骨髄腫細胞に発現している表面抗原に対するモノクローナル抗体が作製され、その効果が検証されてきた。その中で MM 細胞表面上に高率に発現している HM1.24 がその標的として注目されてきた。

HM1.24(別名 Bone marrow stromal antigen-2; BST-2、CD317、Tetherin)は 29~33 kDa の II 型膜タンパク質として 1994 年に Goto らにより同定された[62]。HM1.24 は pre-B 細胞の増殖に関わっているとされ、ジスルフィド結合を介して細胞膜上にホモダイマーとして発現し、その遺伝子は chromosome 19p13.2. にコードされている[63](図 3)。また、HM1.24 の C 末端には GPI アンカーが付加され、それにより HM1.24 の C 末端は細胞膜に結合しており、lipid raft に集積しやすいとも言われている[64]。HM1.24 は分化終末段階の B 細胞に選択的にかつ高率に高発現しており、それゆえ MM 特異的抗原としての標的抗原に適していると考えられた[65]。1994 年に Goto らにより HM1.24 に対するマウスモノクローナル抗体が作製され、この抗体が CDC 活性及びマウスエフェクター系における ADCC 活性を有することが Ozaki らにより確認された[66]。その後、この抗 HM1.24 モノクローナル抗体は中外製薬においてキメラ化及びヒト化がなされ、ヒト骨髄腫を移植したマウスにおいて *in vivo* 抗腫瘍効果を発揮することが示された[67, 68]。続いて、ヒト化抗 HM1.24 抗体

(AHM)の開発が中外製薬社により行われ、欧州にてMM患者を対象に第1相臨床試験が実施されている。化学療法もしくは造血幹細胞移植後再発MM患者を対象とした試験であり、計24名が参加した。AHMを10、30、100、200 mg/m²投与し、安全性及び有効性について評価を行った[69]。その結果、安全性については、投与時の発熱、悪寒、血圧低下などのインフュージョンリアクションおよび皮膚乾燥などが確認されたがGrade3以上の重篤な有害事象は発現していない。しかし、有効性に関しては、30および100 mg/m²において、それぞれ1例ずつ部分寛解が確認されたのみであった。用量依存性も見られず、期待された薬効が示されなかったことから、中外製薬は2004年10月の時点で開発の中止を公表した。

しかし、HM1.24陽性細胞を特異的に傷害するCTLの作製が試みられる[70]など、HM1.24はMM細胞に対する標的マーカーとして未だに魅力的な標的であり、HM1.24をクロスリンクすることで標的細胞にapoptosisを誘導することが可能であるとの情報もある[71]。また、近年では、各種固形癌における発現も報告され始めていることから、HM1.24の、癌治療における標的抗原としての魅力が増していると考えられる[72-74]。

1.5. 先行HM1.24抗体の問題点

中外製薬社が開発していたAHMはこれまでの非臨床試験においては、抗原結合活性等も申し分ないことが確認されているが、残念ながら臨床効果を得るには至らなかった。その一因として考えられるのがHM1.24抗体の高い内在化活性である。AHMの非臨床試験では、他の抗体と比べると、カニクイザル投与時の速やかなクリアランスが確認されている[75-77]。通常、血中から抗体が

クリアランスされる場合には、投与個体において抗抗体産生が惹起されている場合が多いが、今回のケースでは抗抗体との関連性は低いとされている[75]。Amanoらの解析によっては、MM細胞に対して結合したAHMは速やかに細胞内に移行し、リソソームの分解を受けているという可能性が示唆されている。そもそもHM1.24には細胞質内に移行しやすい性質が報告されており、細胞膜上においても脂質ラフト局在し、ゴルジ体と細胞膜を往復している可能性が示唆されている[69]。このような標的抗原の性質を反映して、AHMも速やかに血中からは消失してしまい、それ故、薬効を発揮できる血中濃度を維持できなかったのではないかと考えられる。事実、サルにおける血中半減期は2 mg/kg投与時に7.56時間、20 mg/kg投与時に28.6時間と非常に短く[75]、ヒトにおける薬効も高くなかったことから、本薬剤の臨床開発は中止せざるを得なかったことが予想される。単に血中濃度を維持することを目的とするならば、血中半減期を延長すればよいので、1.2.3で触れたような血中半減期延長技術を応用することで解決できると考えられるが、このケースはそれで十分であるとは考えにくい。

当然のように、ADCC活性を発揮するためには、標的細胞とエフェクター細胞が抗体によって連結される必要があり、標的抗原に結合している抗体は細胞表面上に存在しなくてはならない。近年の報告からは、標的細胞とエフェクター細胞が抗体を介して、膜脂質を交換するなど強固に結合することにより、シナプスが形成され、ADCC反応が生じると考えられている[78, 79]。一方、抗HM1.24抗体のように速やかに細胞内に移行してしまう場合には、標的細胞とエフェクター細胞の架橋が行われずに、シナプスも形成されず、その結果、ADCC活性が発揮できなくなってしまうのではないかと考えられた(図4)。

血中半減期延長は FcRn との相互作用に基づく抗体のリサイクリング機構を増強したものであり、最も重要であると考察される標的細胞とエフェクター細胞の連結を維持するものではない。抗体の血中濃度が高くとも、細胞表面上で標的細胞に結合している状態を維持できなければ、主薬効である ADCC 活性は十分に発揮されないままである。このような速やかな内在化活性を示す抗原に対しては、なるべく内在化自体を抑制することが ADCC 活性発揮、ひいては抗腫瘍活性の発揮に重要であると考えられた。

1.6. 本研究の目的

これまで述べてきたように、HM1.24 抗原は正常組織では発現が低く、血液癌のみならず固形癌においても発現しており、エフェクター活性も期待できる良い標的抗原である。一方、その早い内在化性質のため、抗体医薬の開発が難しく、中外製薬による HM1.24 抗体 AHM は臨床開発に至っていない。そこで、①内在化が遅い抗体を樹立し、②エフェクター活性の増強を行うことにより、抗腫瘍活性の高い新規の抗 HM1.24 抗体の樹立を目指した。

2. 方法

2.1. 実験材料

哺乳動物細胞株

CHO: Chinese Hamster Ovary (CHO) / DG44 (コロンビア大 Chasin 博士より分与)

Ms705: Chinese Hamster Ovary (CHO) / DG44 FUT8 欠損株 (協和発酵キリン社樹立)

YB2/0: ラットミエローマ細胞株

P3U1: マウスミエローマ細胞株

KMS-18: ヒト多発性骨髄腫細胞株

KMS-11: ヒト多発性骨髄腫細胞株

RPMI8226: ヒト多発性骨髄腫細胞株

IM-9: ヒト多発性骨髄腫細胞株

SBC-5: ヒト肺小細胞癌細胞株

HT-29: ヒト大腸癌細胞株

PSN-1: ヒト膵癌細胞株

実験動物

Balb/c (日本エスエルシー社より購入)

SD rat (日本エスエルシー社より購入)

C.B-17/lcr-scid/scid Jcl (日本クレア社より購入)

抗体

通常型中外製薬社抗 HM1.24 ヒト化抗体 AHM(協和発酵キリン社調製品)

デフコース型中外製薬社抗 HM1.24 ヒト化抗体 AHM(協和発酵キリン社調製品)

2.2. 実験方法

2.2.1. 動物細胞および菌体の培養

可溶性抗原もしくはキメラ抗体の発現宿主として、CHO/DG44 株もしくは Ms705 株、YB2/0 株を用いた。いずれの CHO 株は 10 % (v/v) FCS (Invitrogen 社)、50 µg/mL gentamicin (ナカライテスク社)、HT supplement (Invitrogen 社)を含む IMDM (Invitrogen 社)中で、YB2/0 株は 5 % (v/v) FCS、1 % (v/v) penicillin-streptomycin (Invitrogen 社)を含む Hybridoma-SFM (Invitrogen 社)中で培養した。ヒト MM 細胞株 RPMI8226、KMS-11 及びヒト膵癌細胞株 PSN-1 は 10 % (v/v) FCS、1 % penicillin-streptomycin を含む RPMI1640 (Invitrogen 社)中で、ヒト肺小細胞癌細胞株 SBC-5 は 10 % (v/v) FCS、1 % penicillin-streptomycin、1 % NEAA (Invitrogen 社)、4 mM HEPES (Invitrogen 社)を含む MEM-α (Invitrogen 社)中で、ヒト大腸癌細胞株 HT-29 は 10 % (v/v) FCS、1 % penicillin-streptomycin を含む McCoy's 5A (Invitrogen 社)中で培養した。

遺伝子構築用の宿主として用いた大腸菌 JM109 (東洋紡社)もしくは DH5α (東洋紡社)、可溶性抗原の発現宿主として用いた大腸菌株 BL21 (タカラバイオ社)は 100 µg/mL Ampicillin (ナカライテスク社)を含む LB broth (Becton Dickinson 社)中で 37 °Cにおいて培養を行った。

2.2.2. 抗原の調製

免疫原もしくは評価用抗原として用いるため、可溶性 HM1.24 抗原もしくは細胞膜上に HM1.24 を発現した強制発現株を作製した。可溶性抗原としては、ヒト IgGFc あるいは glutathione S-transferase とヒト HM1.24 を連結させたキメラたんぱく質をデザインし、それぞれを Fc-sHM1.24、GST-sHM1.24 とした(図 5)。

2.2.2.1. 動物細胞発現系

Fc-sHM1.24 発現ベクター pKANTEX-Fc-sHM1.24 は PCR を利用して作製した Fc-sHM1.24 遺伝子配列断片を協和発酵キリンオリジナルベクターである pKANTEX93 ベクター[80]に挿入することで得た。pKANTEX-Fc-sHM1.24 はラットミエローマ細胞株 YB2/0 に電気穿孔法により導入し、回収した培養上清を遠心、ろ過した。上記の方法で回収した培養上清を ProteinA カラム (Prosep A; Millipore 社)に通塔し、Fc-sHM1.24 を担体に吸着させた。Prosep A に付属のマニュアルに従い、カラムをバッファーで洗浄した後、溶出バッファーにより、吸着した Fc-sHM1.24 を溶出した。溶出画分は PBS 中で一晩培養を行った後、0.22 μm 孔径のフィルターを用いてろ過滅菌した。

また、細胞膜上に HM1.24 を発現した CHO 細胞を調製するため、ヒト HM1.24 遺伝子全長を CHO/DG44 株に電気穿孔法により導入し、G418(ナカライテスク社)および MTX(Sigma-Aldrich 社)を用いた薬剤選抜により強制発現細胞 HM1.24/CHO を得た。

2.2.2.2. 大腸菌発現系

GST-sHM1.24 発現ベクター-pGEX-sHM1.24 は pGEX-6P-1 ベクター (GE Healthcare 社) にヒト HM1.24 細胞外ドメイン配列を挿入することで得た。pGEX-6P-1-sHM1.24 を BL21 (DE3) に形質転換し、LB/Amp プレートに播種した。単コロニーを 2×YT broth (Becton Dickinson 社) (100 µg/mL ampicillin 含) に植菌し、培養液の O.D.600 nm が約 0.6 になるまで 37 °C で振盪培養を行った後、IPTG (Wako 社) を添加し、25 °C で 4 時間振盪培養を行い、融合蛋白質の発現を誘導した。培養液を遠心 (6 krpm, 15 min, 4 °C) にかけることにより回収した大腸菌を TES Buffer (0.2 M Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 M Sucrose, pH 8.0) に懸濁し、超音波破碎を行った。室温で 30 分放置した後、Lysozyme (Wako 社) を添加し、超音波破碎を行った。室温で 30 分放置した後 Triton-X100 (Wako 社) を添加し、超音波破碎を行った。更に室温で 30 分放置した後、10 krpm, 60 min, 4 °C で遠心し、上清を回収した。この上清を Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare 社) を充填・平衡化したカラムに通塔した。カラムを PBS で洗浄した後、還元型 Glutathione 溶液をカラムに通塔し、GST-sHM1.24 の溶出を行った。溶出画分を回収した後、0.22 µm 孔径のフィルターでろ過滅菌した。

2.2.3. SDS-PAGE

培養上清 20 uL もしくは 3 µg/20 uL に調製したタンパク質溶液に SDS サンプルバッファー (2-ME±) を添加し 15 分間煮沸したサンプルを 5-20 % アクリルアミドゲル e-PAGEL (ATTO 社) にアプライし、20 mA/枚の電流で 1.5 時間泳動した。イオン交換水でゲルを洗浄した後、CBB 染色液

に浸して 1 時間振盪させた。ゲルをイオン交換水でゲルを洗浄した後、今度は脱染液に浸し 1 時間振盪させ、その後はイオン交換水で一晩振盪させた。

2.2.4. 抗 HM1.24 モノクローナル抗体の確立

ヒト MM 細胞株 IM-9 もしくは、可溶性抗原 (Fc-sHM1.24, GST-sHM1.24) を動物 (C57BL/6, Balb/C, SD rat) の腹腔に投与した。免疫を 1 週間おきに 4 回実施した後、脾臓を摘出した。脾臓細胞をマウスミエローマ細胞株 P3U1 と PEG 融合法にて融合させ、ハイブリドーマを作製した。プレートアナライザー 8200 Cellular detection System (FMAT) (Applied Biosystems 社) とフローサイトメトリー (Beckman Coulter 社) を用いた初期スクリーニングを行い、選択された HM1.24/CHO に対して特異的に反応するハイブリドーマに関して、2 度の single cell cloning をを行い、抗 HM1.24 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した (図 8)。

2.2.5. 抗 HM1.24 抗体遺伝子のクローニングと発現ベクター構築

ハイブリドーマ株を回収し、PBS を用い洗浄した。この細胞より、RNAeasy Maxi Kit (キアゲン社) を用いて total RNA を回収した。得られた total RNA より Oligotex-dT30<super> mRNA purification Kit (タカラバイオ社) を用い、mRNA を回収した。mRNA を鋳型として、SMART RACE cDNA Amplification Kit (クロンテック社) を用い、RT-PCR を行った。調製した cDNA を鋳型として 5'-RACE PCR を実施した。増幅断片を QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社) で精製した後、SmaI (タカラバイオ社) と CIAP (タカラバイオ社) で処理した pBluescript SK(-) 上にクローニングし、

抗体遺伝子配列を決定した(図 10)。

決定した各抗体遺伝子配列を鋳型として抗体発現ベクターpKANTEK93 に挿入し、キメラ抗体発現プラスミド pKANTEK-KM3590、pKANTEK-KM3591、pKANTEK-KM3594、pKANTEK-KM3610 を得た。

2.2.6. 抗 HM1.24 キメラ抗体、AHM の調製

各キメラ抗体発現ベクター及び AHM 発現ベクターを電気穿孔法により CHO/DG44 株(通常型抗体を発現する細胞株)および Ms705 株(デフコース型抗体を発現する細胞株)に導入した。各抗体発現細胞を培養フラスコ中においてコンフルエントまで培養し、PBS で洗浄した後、6 mM L-glutamine(ナカライテスク社)を含む Excell302(JRH Bioscience 社)培地を添加した。発現細胞の生細胞率が 50 %程度に低下するまで培養を継続し、その後培養上清を培養フラスコより回収し、0.22 μm 孔径のフィルターでろ過した。上記の方法で回収した培養上清を Prosep A を充填したカラムに通塔し、抗 HM1.24 キメラ抗体及び AHM を担体に吸着させた。カラムをバッファーで洗浄した後、溶出バッファーにより、吸着した抗体を溶出した。溶出画分は PBS 中で一晩培養を行った後、0.22 μm 孔径のフィルターを用いてろ過滅菌した。

2.2.7. 抗 HM1.24 抗体の活性評価

2.2.7.1. Binding ELISA を用いた抗 HM1.24 抗体の結合活性評価

96 穴 ELISA プレートに、PBS で希釈した Anti-human IgG antibody(BD Pharmingen 社)を分

注し、固相化した。PBS で洗浄した後、1 % BSA-PBS によりブロッキングを行った。その後、Fc-sHM1.24 溶液を添加し、1.5 時間室温放置し、PBS で洗浄を行った。Plate に抗 HM1.24 抗体を含む溶液を 50 μ L/well で添加し、1.5 時間室温放置した後、0.05 % Tween-PBS で洗浄した。更に、PBS で 1000 倍に希釈した HRP anti-human IgG1 (Southern Biotech 社) を 50 μ L/well で分注し、1.5 時間室温放置し、0.05 % Tween-PBS で洗浄を行った。その後、イオン交換水で洗浄し、ABTS (Wako 社) を 50 μ L/well で分注し、数分間発色反応をさせ、5 % SDS を 50 μ L/well で添加し、反応を停止させた。この 96 穴 ELISA プレートをプレートリーダー (Molecular Device 社) にかけて、O.D.415-490 nm を測定した(図 12A)。

2.2.7.2. BIAcore を用いた抗 HM1.24 抗体の結合活性評価

Acetate 4.5 (BIAcore 社) で希釈した Anti-human IgG antibody (BD Pharmingen 社) を Amine Coupling Kit (BIAcore 社) を用いて CM5 sensor chip (BIAcore 社) 上に固定化した。Anti-human IgG antibody を固定化したセンサーチップに、HBS-EP バッファー (BIAcore 社) で希釈し Fc-sHM1.24 を添加して結合させた後、抗 HM1.24 抗体を 1.25、2.5、5、10、20 nM を添加した。また、各サイクルの終わりに Glycine 1.5 (BIAcore 社) を添加して、センサーチップの再生をおこなった。以上の操作は BIAcore 2000 システムもしくは BIAcore T-100 システム (BIAcore 社) を用いて実施した。得られたセンサーグラムを解析して各抗体の結合速度定数 K_a 、解離速度定数 K_d 及び解離定数 KD を算出した(図 13A、B)。

2.2.7.3. フローサイトメリーを用いた抗 HM1.24 抗体の結合活性評価

0.5 ~ 1.0 × 10⁶ cells の標的細胞を 0.05 % の NaN₃ を含む抗 HM1.24 抗体溶液もしくはハイブリドーマ培養上清に懸濁し、氷上において 30 分静置した。0.05 % の NaN₃ を含む PBS で 2 回洗浄した後、0.05 % の NaN₃ を含む各種二次抗体溶液に懸濁し、氷上において 30 分静置した。0.05 % の NaN₃ を含む PBS で 3 回洗浄した後、フローサイトメリーにより細胞の蛍光強度を測定した。

2.2.7.4. 抗 HM1.24 抗体の ADCC 活性評価

標的細胞を Assay buffer (phenol-red free RPMI1640 (Invitrogen 社)、5 % FCS、1 % penicillin-streptomycin) で 1 × 10⁴ cells/50 μL に調製した後、96 穴 U 底プレート (BD Falcon 社) に分注し、更に Lymphoprep (Axis-Shields 社) を用いてヒト健常人末梢血より採取した PBMC を Assay buffer で 2.5 × 10⁵ cells/50 μL に調製した細胞懸濁液をプレートに分注した。Assay buffer を用いて各種濃度に調製した抗 HM1.24 抗体溶液を 50 μL/well で添加し、800 rpm、3 min で遠心を行った後、4 時間培養 (37 °C、5 % CO₂) を行った。1200 rpm、3 min で遠心を行った後、上清 50 μL を用いて、添付の説明書に従い、CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega 社) を行い ADCC 活性の測定を行った。

2.2.7.5. 抗 HM1.24 抗体の CDC 活性評価

標的細胞を Assay buffer (phenol-red free RPMI1640、5 % FCS、1 % penicillin-streptomycin)

で 5×10^4 cells/50 μ L に調製した後、96 穴 U 底プレートに分注した後、イオン交換水 1 mL に溶解し、更に Assay buffer で希釈した Complement sera human (Sigma-Aldrich 社) を 50 μ L/well でプレートに添加した。Assay buffer を用いて各種濃度に調製した抗 HM1.24 抗体溶液を 50 μ L/well で添加した後、2 時間培養 (37 $^{\circ}$ C、5 % CO_2) を行った。その後、WST-1 (Roche Diagnostics 社) を用いて CDC 活性の測定を行った。

2.2.7.6. 抗 HM1.24 抗体のアポトーシス誘導活性評価

標的細胞を 24 穴培養プレートに 3×10^5 cells/well で播種した後、抗 HM1.24 抗体を、培地を用いて各種濃度に調製し添加した。更に、架橋抗体 goat F(ab')₂, anti-human IgG-Fc (PIERCE 社) を終濃度 40 μ g/mL で添加し、24 時間培養 (37 $^{\circ}$ C、5 % CO_2) した。その後、各条件で培養した細胞を回収し、Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (MBL 社) を用いてアポトーシス細胞を染色し、フローサイトメトリーによりアポトーシス細胞を検出した。尚、陽性対照として Staurosporin (協和発酵キリン社調整品) を用いた。

2.2.7.7. 抗 HM1.24 抗体の internalization 活性評価

$0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ cells の標的細胞を 10 μ g/mL の抗 HM1.24 抗体溶液に懸濁し、氷上において 1 時間静置した。PBS で 2 回洗浄した後、継代用培地中で培養 (37 $^{\circ}$ C、5 % CO_2) を行い、0, 10, 30, 60, 120 分後に終濃度 0.05 % の NaN_3 を添加し、氷上に静置した。PBS で 2 回洗浄した後、二次抗体 FITC rabbit anti-human IgG, F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch 社) を添加し、氷上にお

いて1時間静置した。PBSで3回洗浄した後、フローサイトメトリーにより細胞の蛍光強度を測定した(図 14A)。

2.2.7.8. 抗 HM1.24 抗体を用いた免疫組織染色

ホルマリン固定したパラフィン包埋材料より脱パラフィンした後、クエン酸溶液に浸し、121 °C で20分処理し抗原性の賦活化を行った。その後、0.3 % H₂O₂/Methanol に室温で10 min 浸し、内因性のペルオキシダーゼの失活を行った。正常血清でのブロッキングをした後(室温、20 min)、1次抗体(1 µg/mL、室温、60 min)を結合させ、更に Biotin 標識した2次抗体(室温、30 min)を結合させた。VECTASTAIN Elite ABC Reagent (VECTOR 社)を用いてペルオキシダーゼを結合させ、DAB で発色させた。核染色を行った後、脱水・透徹・封入を行った。

2.2.7.9. 抗 HM1.24 抗体の *in vivo* 薬効評価

SCID マウス(7w、♂)の腹側皮下に 5.0×10⁶ cells の HT-29 を移植した。移植後 0、4、8、12、16、20 日目に抗 HM1.24 抗体溶液を 2 mg/kg (= 60 µg/head)、もしくは 10 mg/kg (=300 µg/head) で尾静脈内投与した。移植後 6、10、14、18、22、26、30 日目における腫瘍径の測定を行った。測定した腫瘍径より以下の式にしたがって腫瘍体積を算出した。

$$\text{Tumor volume [mm}^3\text{]} = 0.5 \times (\text{major diameter [mm]}) \times (\text{minor diameter [mm]})^2$$

更に移植後 35 日目に動物を屠殺し、腫瘍塊を採取し、重量を測定した。

2.2.7.10. RT-PCR

多様なヒト癌細胞株より調製した cDNA を鋳型として、以下のプライマーを用いた PCR (94 °C, 5 min → 94 °C, 30 sec 秒、60 °C, 30 sec、72 °C, 30 sec を 25 サイクル) を実施し、電気泳動を実施した。

NM_004335-829F: 5'- TCGCAATGTCACCCATCTC -3'

NM_004335-829R: 5'- GGAATGTTCAAGCGAAAAG -3'.

3. 結果

3.1. 可溶性抗原の取得

免疫原あるいは抗体の評価用抗原として、HM1.24 細胞外領域を有する可溶性抗原の調製を目指した(図 4)。HM1.24 はジスルフィド結合を介したホモダイマー構造をとるものの、抗原は複雑な立体構造を取らないことがこれまでの報告から予想された[81]ため、大腸菌を発現宿主とした抗原調製が可能であると考えた。とはいえ、HM1.24 には糖鎖修飾もされることが知られているため、動物細胞を宿主とした抗原調製も同様に価値があると考えた。そこで、両者の発現系を用いた抗原調製を実施した。

まず、動物細胞発現系においては、タグとしてヒト IgG の Fc 領域を用いることとした。これをヒト HM1.24 細胞外領域 N 末端側に配置したキメラタンパク質 Fc-sHM1.24 をデザインし、発現ベクター pKANTEX-Fc-sHM1.24 を構築した。これをラットミエローマ細胞株 YB2/0 に導入し、その培養上清から Fc-sHM1.24 の精製を目指した。4 つの溶出画分を SDS-PAGE にて解析したところ、還元条件下(2-ME(+))において約 50 kDa、非還元条件下(2-ME(-))において約 100 kDa の位置にバンドを確認した(図 5)。推定した分子量の一致、非還元条件下においてはダイマー化されているために分子量が 2 倍になっていること、及び別途実施した抗 HM1.24 抗体を用いた Western Blotting 解析の結果(Data not shown)より Fc-sHM1.24 であることが確認された。

次に、大腸菌発現系においては、精製が容易であり、融合タンパク質が可溶性画分に発現しやすいとされる GST タグをヒト HM1.24 細胞外領域 N 末端側に配置したキメラタンパク質 GST-sHM1.24 をデザインし、発現ベクター pGEX-sHM1.24 を構築した。大腸菌 BL21 を発現宿主と

して用い、GST-sHM1.24 の発現を目指した。大腸菌においては精製を簡略化するため、可能な限り可溶性画分に GST-sHM1.24 が含まれるよう発現条件の最適化を実施した。その結果、最適化した発現誘導条件下においては、可溶性画分に一定量の割合で GST-sHM1.24 が多く含まれることが予想された。最適な条件で発現誘導を行い、菌体を超音波破碎した後、グルタチオンカラムを用いて精製、溶出した。精製前のライセート、flow through 画分、溶出画分を SDS-PAGE 解析に供したところ、溶出画分において予想分子量に近い約 37 kDa の位置にバンドが濃縮されていることが確認された(図 6)。別途実施した抗 HM1.24 抗体を用いた Western Blotting 解析の結果から、このバンドが GST-sHM1.24 に相当することが明らかとなった。尚、溶出画分に確認される低分子量バンドは GST-sHM1.24 の分解物である可能性が示唆されたため、評価用抗原としては用いず、精製純度を問わない免疫原として用いることとした。

3.2. 抗 HM1.24 モノクローナル抗体の樹立

前項にて調製された可溶性抗原あるいは native に HM1.24 を発現するヒト MM 細胞株 IM-9 を、Balb/c マウスあるいは SD rat に投与し、動物における HM1.24 特異的抗体の誘導を目指した。HM1.24/CHO を用いたフローサイトメリーの結果、HM1.24 に対する抗体価が誘導できている個体を選択し、安楽死させた後に、脾臓細胞を回収し、マウスミエローマ細胞株 P3U1 と融合させてハイブリドーマを作製した(図 8)。IM-9 免疫動物から 9 クローンの抗体、GST-sHM1.24 免疫動物より 64 クローン、Fc-sHM1.24 免疫動物より 1 クローンの抗 HM1.24 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを樹立することができた。これらのハイブリドーマの培養計 74 クローンの培養上清を用いて、

BIAcore を用いた結合活性評価及びフローサイトメトリー (図 9) を実施し、ラット抗体 KM3584、KM3586、KM3590、KM3591、KM3594、KM3601、KM3668、及びマウス抗体 KM3606、KM3608、KM3610、計 10 クローンの抗体を選択した (表 1)。

3.3. 抗 HM1.24 モノクローナル抗体の解析

前項にて選択された 10 クローンの抗体については、ハイブリドーマ培養上清より精製した抗体標品を用い、BIAcore を用いて詳細に Affinity 解析を実施し、ベンチマークであった中外製薬社抗体 AHM と比較を実施した (表 2)。結合速度定数 K_a 、解離速度定数 K_d 、解離定数 K_D 、及び理論的最大結合量 R_{max} について算出し、これらを AHM と比較したところ、KM3590、KM3591、KM3594、KM3610 については抗原に対しての結合活性が比較的高いと考えられた。そこでこれらのモノクローナル抗体について、今後のさらなる検討を実施することとした。

3.4. 抗 HM1.24 キメラ抗体の作製

AHM との比較、あるいは樹立クローン間での活性比較を均一な実験系にて行うため、各抗 HM1.24 抗体の定常領域 (CH1~CH3) をヒト IgG1 定常領域の配列に置換するキメラ化を実施した。

まず、前項で選択された 4 クローンの抗体について、5'-RACE PCR を実施し、可変領域の並列同定を実施した。試薬に付属しているユニバーサルプライマー (UPM) と、抗体定常領域にハイブリダイズするように設計したプライマーを用いて可変領域配列を増幅し、これをクローニングした (図

10)。単離された配列を解析し、各クローンの可変領域を同定した。BLAST データベースで検索を行った結果、いずれも配列としては新規であることが確認された。

決定した抗体可変領域遺伝子配列を元に、各キメラ抗体発現ベクター pKANTEX-cKM3590、pKANTEX-cKM3591、pKANTEX-cKM3594、pKANTEX-cKM3610 を設計し、作製した。尚、既にデフコース化は ADCC を主薬効とする抗体医薬に汎用的に応用できる技術となりつつあるため、デフコース化した各キメラ抗体の調製し、デフコース型 AHM と比較することとした。電気穿孔法により FUT8 欠損 CHO 株である Ms705 に導入した後、G418 及び MTX 存在下において遺伝子導入細胞を選択した。選択された細胞より培養上清を回収し、得られた培養上清より Prosep A を用いて各キメラ抗体を精製した。精製抗体の SDS-PAGE 解析の結果、分解産物等は確認されず抗体の精製に関しては特に問題が無いことを確認した(図 11)。

3.5. 抗 HM1.24 キメラ抗体の解析

3.5.1. 結合活性評価 (Binding ELISA)

まず、そもそも結合活性がキメラ化後にも維持されているかを確認するため、Binding ELISA により各キメラ抗体および AHM の、プレート表面上に固相化した Fc-sHM1.24 に対する結合活性を比較した(図 12A)。その結果、cKM3590、cKM3591、cKM3610 はほぼ同程度の結合活性を示し、cKM3594 や AHM よりもわずかに高い結合活性を示した。また、cKM3594 は AHM とほぼ同程度の結合活性を示した(図 12B)。

3.5.2. 結合活性評価 (BIAcore)

BIAcoreを用いて各キメラ抗体およびAHMの、CM5 sensor chip上にanti-human IgGを介してキヤプチャーしたFc-sHM1.24抗原に対する結合活性(結合速度定数 K_a 、解離速度定数 K_d 、解離定数 KD)を比較した(図 13A、B)。その結果を表 3 に示す。算出された解離定数 KD からは、cKM3594 が最も結合活性が強く、cKM3591、cKM3610、cKM3590、AHM といった順で弱くなることが見出された(表 3)。尚、各キメラ抗体と基となったラットもしくはマウス抗体のセンサーグラムを比較したところ、目立った変化は無かったが、cKM3594 を除いたいずれの抗体もキメラ化することで明確に抗原結合活性が上昇することが明らかとなった(表 2、3)。特にcKM3590はその上昇が顕著であり、 KD 値が約 1/5 までに低下した。原因の詳細は不明であるが、定常領域をヒト IgG1 タイプに置換することで、可変領域部分の高次構造が静電相互作用等により若干変化することで、そのアフィニティーが改善したものと予想される。また、BIAcore で得られた KD 値と ELISA で得られた結合活性には違いが存在するが、固相化した抗原の性状、各測定系の特性によるものと考えられる。ただし、BIAcore で算出された理論最大結合量 R_{max} と ELISA で得られた結合活性については、ほとんどその順序が一致していた。

3.5.3. 内在化活性評価

各キメラ抗体およびAHMを用い、ヒトMM細胞株KMS-11における内在化活性を評価した(図 14A)。既報の通り、AHMは培養開始30分時点において、表面に存在する抗体量が半分に減少しており、速やかな内在化活性が観察された。cKM3591についてもAHMと同様な速やかな内在

化を確認した。一方、cKM3590、cKM3594 については、AHM よりも抑制された内在化活性を確認した。cKM3610 については、その他の抗体に比べてさらにゆっくりと内在化をする傾向を確認した。しかし、cKM3610 以外の抗体が、培養開始 60 分を過ぎたあたりから、内在化速度が緩やかになり始めるが、cKM3610 は継続して内在化が進む傾向を示した(図 14B)。

3.5.4. ADCC 性評価

健康人末梢血より得られた PBMC をエフェクターとしてヒト MM 細胞株 RPMI-8226 に対するキメラ抗体 cKM3590、cKM3594、cKM3610 の ADCC 活性を評価した。尚、得られる PBMC の細胞数には限りがあったため、別途実施した試験において物理化学的安定性に問題のあった cKM3591 について本試験の評価対象から除外した。その結果、cKM3590 が最も強い ADCC 活性を示し、cKM3594、AHM、cKM3610 といった順で弱くなることが確認された(図 15)。また、PBMC とは異なる細胞をエフェクターとして、ヒト MM 細胞株 KMS-18 に対する ADCC 活性評価を実施したところ、上記と同様な結果となった(Data not shown)。図 15 に示す ADCC 活性の違いは大きいものではないが、エフェクター細胞や標的細胞が異なる場合においてもその強弱が維持されていることから、確からしい結果であると推察される。尚、KMS-18 に対する ADCC 活性を評価した際、AHM と cKM3591 の ADCC 活性はほぼ同等であることを確認している。

また、最も強い ADCC 活性が確認された cKM3590 に関してはデフコース体のみならず、通常型糖鎖を持つ cKM3590 を CHO/DG44 を発現宿主として調製し、ADCC 活性を比較した。健康人末梢血より得られた PBMC をエフェクターとしてヒト MM 細胞株 KMS-11 に対する ADCC 活性を測

定した結果、デフコース型 cKM3590 では明確に ADCC 活性が確認されたものの、通常型 cKM3590 ではほとんど ADCC 活性が確認されなかった(図 16)。

3.5.5. CDC 性評価

ヒト MM 細胞株 KMS-11 を標的細胞として、cKM3590 および AHM の CDC 活性を測定した。その結果、cKM3590 及び AHM において CDC 活性は全く確認されなかった(図 17)。データは示していないが、他のキメラ抗体を用いた際にも CDC 活性は確認されなかった(Data not shown)。更に補体成分として CDC 活性が出やすいウサギ補体を用いた場合にも、AHM を含む全ての抗 HM1.24 抗体に CDC 活性を検出することはなかった。これまでに AHM が CDC 活性を有するとの報告がある[73]が、以上の検討結果からは、AHM を含め抗 HM1.24 抗体全般においては CDC 活性が発揮されにくいのではないかと考えられた。

3.5.6. Apoptosis 誘導活性評価

cKM3590、cKM3594、cKM3610 およびヒト化抗体 AHM によるヒト MM 細胞株 RPMI8226 に対するアポトーシス誘導活性を、Annexin-V 陽性率を指標に評価した。その結果、AHM を用いた際に、架橋抗体存在下において抗体濃度依存的に Annexin-V 陽性細胞率の上昇、つまりアポトーシス誘導活性が確認された(図 18A)。cKM3590 及び cKM3594 においてはそのような活性は確認されなかったが、cKM3610 においてはわずかに用量依存的にアポトーシス細胞が増加する傾向を確認した。一方、別途実施した、ラット抗体 KM3591 を用いたヒト肺癌細胞株 SBC-5 に対するアポト

ーシス活性評価結果からは、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加時に明確なアポトーシス細胞の増加が確認されていた (図 18B)。このことから、cKM3591 (実際には基となった抗体の KM3591) 及び cKM3610 には、AHM 同様、アポトーシス誘導活性を有している可能性が示唆された。

3.5.7. エピトープ解析

cKM3590、cKM3594、cKM3610 が AHM と異なるエピトープを認識するか否かを評価するため、BIAcore を用い、簡易的なエピトープ解析を実施した。CM5 sensor chip 上にキャプチャーした Fc-sHM1.24 に対する反応性が、抗原に AHM を結合させておくことにより阻害されるか否かを検討した。仮に、認識エピトープが重複しないのであれば、AHM の結合センサーグラムに上乗せして、キメラ抗体のレスポンスカーブが描かれると想定される。反対に、エピトープが重複するあるいは近傍に存在することにより片方の抗体が立体障害を及ぼすのであれば、キメラ抗体のレスポンスの上乗せは抑制されると想定される (図 19)。

実際に検討を実施した結果、cKM3590、cKM3594、cKM3610 全てのキメラ抗体で抑制が確認された (図 20)。このことから、AHM と cKM3590、cKM3594、cKM3610 のエピトープは重複する、あるいは近傍に存在する可能性が示唆された。

3.6. 各種固形癌における HM1.24 発現解析

3.6.1. RT-PCR

固形癌組織における HM1.24 の遺伝子レベルでの発現を確認するため、複数の固形癌細胞株

(大腸癌、膵癌、肺癌)由来 cDNA を用い、RT-PCR を実施した。その結果、大腸癌細胞株においては 6 株中 3 株(50.0%)、膵癌細胞株においては 5 株中 2 株(40.0%)、肺癌細胞株においては 16 株中 6 株(37.5%)で明確な発現を確認することができた(図 21)。

3.6.2. フローサイトメトリー

遺伝子発現だけでなく、実際にタンパク質として発現していることを確認するため、ヒト大腸癌細胞株 HT-29、ヒト肺癌細胞株 SBC-5、ヒト膵癌細胞株 PSN-1 を用い、フローサイトメトリー解析を実施した。通常型及びデフコース型の cKM3590 もしくは AHM の反応性を確認した結果を図 22 及び図 23 に示す。cKM3590 のヒストグラムデータを図 22 に示したが、いずれの細胞株においても陰性対照染色に比べ明確な発現ピークシフトが確認されたことから、HM1.24 抗原が細胞膜上に発現していることが明らかとなった。その際、HM1.24 強制発現細胞株 HM1.24/CHO や MM 細胞株 KMS-11 への反応性も同時に測定したところ、cKM3590 による染色強度が AHM のものよりもわずかに高い程度であったが、興味深いことに各種固形癌細胞株への染色性については、cM3590 が有意に高いことが確認された(図 23)。尚、各抗体において、通常型、デフコース型ともに反応性はほぼ変わらないことを確認している。

3.6.3. ヒト大腸癌アレイを用いた免疫組織染色

ヒト癌細胞株を用いた遺伝子発現解析の結果からは大腸癌における発現率が最も高いことが見出されている。そこで、ヒト大腸癌アレイを用い、KM3590 による免疫組織染色を試み、臨床サンプル

ルにおける HM1.24 の陽性率を算出した。代表的な画像を図 24 に示す。HM1.24 が陽性と確認されたのは 25 例/58 例であり、陽性率は 43%であった(表 4-6)。癌組織陽性染色像の特徴としては、陽性の大部分は管腔側の細胞膜に発現が確認され、細胞質や管腔側以外の細胞膜は弱い染色が観察された(図 24B)。また、正常大腸組織では、ほぼ発現は確認されなかった。

3.7. 固形癌細胞株に対する ADCC 活性評価

通常型及びデフコース型 cKM3590、AHM に関して ADCC 活性を比較した。標的細胞には、HT-29、SBC-5、PSN-1 を用い、PBMC をエフェクターとして ADCC 活性を測定した。その結果、デフコース型 cKM3590 及びデフコース型 AHM は明確な ADCC 活性を示した(図 25)。特にデフコース型 cKM3590 はデフコース型 AHM よりも反応性が高いことを反映してか、デフコース型 AHM よりも明らかに高い ADCC 活性を示した。また、通常型 cKM3590 や通常型 AHM では SBC-5 を除き、ADCC 活性がほとんど検出されなかった。

3.8. 固形癌ゼノグラフトモデルにおける薬効評価

3.8.1. HT-29 ゼノグラフトモデルにおける免疫組織染色

HT-29 ゼノグラフトモデル作製時の腫瘍塊における HM1.24 抗原の発現を確認するため、陰性対照組織を HM1.24 陰性である A549 ゼノグラフトとして、HT-29 ゼノグラフトの組織切片を用い、KM3590 の反応性を評価した。その結果、抗体濃度 1 µg/mL において陽性対照組織で、明瞭な陽性所見が確認(図 26B)され、陰性対照組織における反応性は陰性であることが確認できた(図

26A)。このことから、HT-29 ゼノグラフトモデルを用いて、抗 HM1.24 抗体を評価することが可能であると考えられた。

3.8.2. HT-29 ゼノグラフトモデルにおける *in vivo* 薬効評価

ヒト大腸癌細胞株 HT-29 ゼノグラフトモデルにおける cKM3590 および AHM による生着阻害効果を評価した。HT-29 を皮下移植した当日より 4 日おきに抗体溶液を 6 回静脈内投与した結果、cKM3590 及び AHM の両者において生着阻害効果は確認されなかったものの、cKM3590 は有意な腫瘍に対する増殖阻害効果を示した(図 27A)。但し AHM に関して、増殖阻害効果は生理食塩水投与群に対して有意差は確認されなかった。腫瘍移植後 35 日目に動物から腫瘍塊を採取し重量を比較したところ、上記同様、cKM3590 は有意に腫瘍に対して増殖阻害効果を示す結果となった(図 27B)。

4. 考察

本研究において、抗腫瘍活性の高い抗 HM1.24 を創製し、癌治療における新たなアプローチを提案することを目的として検討を行ってきた。動物免疫を実施し、複数の抗 HM1.24 抗体クローンを新たに樹立し、これらをキメラ抗体に変換した後、AHM との比較を行った。その結果、cKM3590 においては内在化活性が抑制されていることが見出され、高い ADCC 活性が発揮されることが明らかとなった。

まず、新規の抗体を樹立するため、可溶性 HM1.24 抗原を調製し、動物免疫を実施した。計 74 クローンの抗体を樹立したが、そのほとんどは大腸菌において発現した GST-sHM1.24 を免疫原として接種した動物から樹立されたものであった。一般的に、抗体は高次構造や翻訳後修飾を含むエピトープを認識する場合があることから、標的抗原を発現している動物細胞株、あるいは動物細胞株を宿主として発現した可溶性抗原を免疫することが望ましいと考えられる。ただし、以前に述べたように、HM1.24 は複雑な高次構造を取らず、糖鎖修飾を受ける部分も限定的であることから、大腸菌にて発現した可溶性 HM1.24 抗原であっても免疫原として用いることが可能であると考えられる。事実、IM-9 を免疫して取得された抗体のほとんどは還元条件下での Western Blotting 解析において HM1.24 抗原を認識することが可能であった (Data not shown)。このことは、動物細胞株を免疫したとしても、得られた抗 HM1.24 抗体が認識するのは、HM1.24 中の一次配列、即ちリニアエピトープに集約されることを示していると考えられる。それゆえ、大腸菌において発現した GST-sHM1.24 を免疫することは合理的なアプローチであったと考えている。ただし、免疫原として用いた対象によってこれほど、得られた抗体クローンの数に差が出るとは予想外であった。糖鎖修飾を受けないことにより

HM1.24 アミノ酸配列の抗原性が増した可能性も考えられるが、最も大きい要因としては、大腸菌ライセートから精製した際のエンドトキシン混入が、抗原感作時にアジュバントとして作用したのではないかと予想している。事実、エンドトキシンは免疫惹起時においてポジティブに作用することが報告されており[82]、このような情報からも、今回のように大腸菌由来免疫原により抗体が高頻度で樹立できたこの現象は合理的な結果であったと考えられる。

また、本研究では、内在化活性が抑制された抗体クローンを取得することが重要であったことから、各抗 HM1.24 抗体について内在化活性を評価した。これまでの報告では、HM1.24 は脂質ラフト上に存在し、クラスリン依存的に内在化し、細胞膜とトランスゴルジ網間の移行に関与していることが示唆されている。HM1.24 細胞内ドメイン N 末端には種間で保存された 2 つのチロシン残基を有し、これが内在化に重要なモチーフであることが報告された[83]。このチロシンモチーフがアダプター分子を介して、小胞を形成する被膜タンパク質であるクラスリンと結合し、引き寄せられることで小胞が形成されると考えられている[84]。最近では、HM1.24 は形質様樹状細胞 (pDC) 上に発現している ILT-7 のリガンドとして作用し、pDC からの I 型 IFN を抑制することが報告されている[85]。また、HM1.24 はインターフェロン (Interferon; IFN) により誘導され、C 末端の GPI アンカーモチーフを用いてウイルス粒子に結合し、ウイルス発芽を阻害する抗ウイルス因子としての機能が報告されている[86]。pDC はウイルス感染を検知して IFN を産生することから、HM1.24 には一連の抗ウイルス反応を調節するフィードバック機構を担う、更にはウイルス粒子を細胞内に取り込みウイルスを閉じ込める役割を担う機能が予想されるが、生理的機能の詳細はいまだ不明である。いずれにせよ、HM1.24 はそもそも内在化しやすい性質を有しており、その内在化を抑制することは非常に難しいと予想された。

ただし、実際に樹立された抗体間で内在化活性を比較したところ、思いのほか内在化活性に差が確認された。特に cKM3590 や cKM3594 については AHM よりも抑制された内在化活性を示した。cKM3591 については AHM とほぼ同程度の速やかな内在化活性を示し、cKM3610 については緩やかではあるが継続的に内在化するという他の抗体と異なるパターンを観察した。これと並行して実施したアポトーシス誘導活性評価においては、内在化が強い傾向である AHM、cKM3591、cKM3610 に、強弱の差はあるが、一様にアポトーシス誘導活性が備わっていることが確認され、内在化が抑制されている cKM3590、cKM3594 にはアポトーシス誘導活性が確認されなかった。興味深いことに、このように内在化活性の強弱と、アポトーシス誘導活性の有無に相関が確認された。これまで、内在化とアポトーシスという二つの現象について研究された例はあまり多くないが、過去に Endo らがクラスリンと p53 の相互作用について報告している[87]。p53 は、DNA 傷害などのストレスを検知することによりリン酸化、アセチル化されることにより、アポトーシスをはじめとする生理反応を惹起する転写因子であるが、Endo らは、p53 がクラスリンと結合することで内在化の制御にも関与していると報告している。このことから、AHM や cKM3591 のような内在化を引き起こす抗体は、何らかのメカニズムを介して p53 を活性化し、クラスリン依存的な内在化を活性化する一方で、p53 を介したアポトーシスを誘導しているのではないかと考えられた。このことは、HM1.24 は先にも述べたように恒常的に内在化を繰り返している可能性があることから、その内在化現象に加えて、AHM や cKM3591 は内在化を更に促進していると推察される。そのように仮定した場合、cKM3590 や cKM3594 については、標的抗原の内在化する性質にのみ依存する内在化活性となり、抗 HM1.24 抗体の内在化レベルとしては下限値まで抑えられているのではないかと考えている。抗 HM1.24 抗

体の内在化を、これ以上に積極的に抑制することが求められる場合には、例えば抗体にクロルプロマジンのようなクラスリン阻害剤を連結するといった抗体に対する分子改変、あるいは、クラスリン阻害剤との併用を行うことが必要になるかもしれない。

本研究は、複数の内在化活性が異なる、同一標的抗原に対する抗体を用い、ADCC 活性を比較した初めての例である。今回、内在化活性が遅い抗体である cKM3590 については AHM と比較して高い ADCC 活性を確認した。また、cKM3594 に関しては、cKM3590 同様に内在化活性が抑制されているものの、特に低濃度域において AHM に比べてわずかに ADCC 活性が高い結果となった。この二つの抗体の ADCC 活性の違いは、抗原結合活性の強弱に依存するものと考えている。Binding ELISA の結果からは、cKM3590 は高い抗原結合活性を確認する一方、cKM3594 は AHM よりもわずかに弱い抗原結合活性が確認されている。ADCC 活性は、当然のことながら、抗原結合活性にも大きく左右されることから、高い ADCC 活性を発揮するためには内在化が抑制されていることに加え、高い抗原結合活性が維持されていることが必要となる。また、内在化を起こしやすい cKM3591 及び cKM3610 は、複数の実験系において再現良く低い ADCC 活性を示した。特に、cKM3591 及び cKM3610 はいずれも高い抗原結合活性を有していることから、内在化によって ADCC 活性が抑制されたものと考えられる。以上のように、本研究において、ADCC 活性発揮に、抗原結合活性と内在化活性の両者が関与していることを初めて示すことができた。今回、内在化が抑制された cKM3590 によって得られた AHM に対しての ADCC 活性優位性は僅かなものであったが、このように非常に血中半減期の短い抗体を用いる場合は、少しでも ADCC 活性が高く、抗体濃度が低くなったとしても薬効を発揮する抗体を創出することには意義があると考えられる。

また、MM 細胞株におけるデフコース型抗体と通常型抗体の ADCC 活性を比較する実験を実施したところ、デフコース型抗体では明確な ADCC 活性が確認できた一方、通常型抗体ではほとんど ADCC 活性が確認できない、あるいはきわめて弱いものであった。内在化活性は観察されるが、それが急激なものではない Rituxan や Herceptin に関しては ADCC 活性に大きな影響はないことが確認されている[88, 89]が、HM1.24 抗体と同様に速やかな内在化を示す BDCA-2 抗体では、カニクイザルへの投与試験において、ADCC 活性発揮可能な IgG1 サブクラスであるにもかかわらず、標的細胞である pDC が抗体による除去を受けないことが報告されている[90]。これらのことから、抗体の速やかな内在化が、ADCC 活性発揮までのタイミング以前に生じた場合、ADCC 活性発揮にとって大きな障害となるのではないかと考えられた。そのような状況打破には、デフコース化が有効な手段であるということが、本研究によって示された。デフコース化や抗体アミノ酸改変によって AHM の ADCC 活性が発揮可能になるということが、他のグループによっても報告されており、確からしいことであると思われる[91-93]。また、Shibata-Koyama らはデフコース型抗体を投与することで、FcγRIIIb を介して死細胞が積極的に好中球に貪食されること、そして貪食した好中球では HLA classII の発現レベルが上昇することを報告している[94]。好中球は抗原提示細胞として機能する可能性が示唆されていること[95]、抗体投与により獲得免疫が誘導されること[96]から、デフコース型抗 HM1.24 抗体により治療を行った際に、患者体内で HM1.24 に対する免疫応答が惹起される可能性が考えられる。以前に触れたように、HM1.24 は T 細胞を用いた免疫療法の標的ともなり得ることが報告されており[70]、液性免疫、細胞性免疫を誘導することには価値があると考えられる。

これまで述べてきたように、本研究において得られたデフコース型 cKM3590 は内在化が抑制され、

なおかつ ADCC 活性が増強されているため、抗 HM1.24 抗体に本来期待された薬効を発揮でき、強力な MM 治療薬になると期待される。その一方で、HM1.24 は固形癌における発現が報告され始めている。これまでに、転移性卵巣癌や肺癌における HM1.24 発現が報告されており、特に肺癌細胞株を用いた検討では抗 HM1.24 抗体が薬効を示すことが確認されており、肺癌治療薬としての可能性が示唆されている[72-74]。そこで、肺癌を含め、大腸癌、膵癌といった消化器癌治療薬としての可能性を探るべく、これらの癌細胞株における遺伝子発現解析を実施した。その結果、大腸癌細胞株において高率に発現していることを見出した。既報においても、大腸癌細胞株 HT-29 における HM1.24 の遺伝子発現が確認されていた[97]が、タンパク質レベルでの発現確認を実施した例はなかったため、癌細胞株を用いたフローサイトメトリー解析を実施した結果、HM1.24 が大腸癌細胞株上に膜タンパク質として発現していることが初めて明らかとなった。HM1.24 は MM 細胞株上では 10^6 分子/細胞のオーダーで発現している[98]が、固形癌細胞株上においても同様なレベルで発現していることが示唆された。また、HM1.24 は大腸癌患者由来組織を対象とした免疫組織染色により、大腸癌組織においても発現していることが確認でき、なおかつ高率に発現していることが確認できた。このことから、抗 HM1.24 抗体が大腸癌治療薬としても有効である可能性が期待される。

これまで一連の評価を行う中で、AHM と cKM3590 の結合活性の違いは CHO 強制発現細胞株や MM 細胞株を用いる上ではあまり確認されていなかった。一方、各種固形癌株を用いたフローサイトメトリー解析の結果、cKM3590 の癌細胞株への反応性が有意に高いことが確認された。フローサイトメトリー解析においては、抗体の内在化ではなく、抗体の抗原結合活性がそのまま反映される。それ故、固形癌細胞株上の HM1.24 に対しては cKM3590 が AHM よりも明確に高い結合活性を示

すと考えられる。細胞の性質によって翻訳後修飾が異なることから、cKM3590 が固形癌細胞に特有の翻訳後修飾を含むエピトープを認識しやすい、といった理由が想定される。例えば、固形癌においては糖転移酵素 GnT-V が高発現することにより分岐型の N 結合型糖鎖が合成されるといった治験がある[99]。HM1.24 は 65 番目及び 92 番目の Asn 残基に N 結合型糖鎖が修飾されることから、エピトープとしてこのような部分を含むと思われる。一方、AHM の認識エピトープは 116 番目から 127 番目のアミノ酸配列 LEGEITTLNHKL であることが報告されている[99]。BIAcore を用いたエピトープ解析からは、両者のエピトープは重複している、もしくは近接しているのではと示唆されたが、上記の事実から、cKM3590 と AHM のエピトープは異なると想定される。HM1.24 には GPI アンカーモチーフを含む C 末端領域を欠損するアイソフォームも存在することが報告されており[100]、C 末端側をエピトープとする AHM は全長型を認識し、N 末端側を認識する cKM3590 は全長型に加え GPI アンカーモチーフ欠損型も認識すると予想される。GPI アンカーモチーフにより脂質ラフトに局在することが、HM1.24 の効率的な内在化に重要という報告もある[101]ことから、内在化しにくいタイプの HM1.24 をも認識する cKM3590 は内在化が抑制されている可能性も考えられる。何れにせよ、固形癌に対して高い結合活性を示す cKM3590 は、AHM に比較して、固形癌細胞株に対して高い ADCC 活性を示し、HT-29 ゼノグラフトモデルにおいても高い腫瘍増殖抑制活性を示した。尚、マウスゼノグラフトモデルにおいては、マウスエフェクター細胞に発現するマウス FcγR とヒト IgG の結合性に種差があり、抗体のデフコース化による ADCC 活性増強を反映できないため、デフコース型 cKM3590 の治療薬としてのポテンシャルを正確に評価しきれていないが、ヒトにおいては更に強力に作用できるものと考えられる。また、ADCC 活性による障害されやすい血液がんである MM 細胞株

移植マウスモデルであれば、より強い抗腫瘍活性が発揮できるものと期待される。

本研究では、内在化を抑制することにより強力な ADCC 活性を発揮する抗体医薬品創製に焦点を当てて検討を行ってきた。一方、HM1.24 抗原は以前にも触れたように、内在化する性質を生来から持ち合わせている分子である。この内在化する性質を利用して、薬剤を送達する Antibody-drug conjugate (ADC) といった活用法も当然考えられる。事実、HM1.24 を認識する単鎖抗体に緑膿菌毒素を連結したイムノキシンを用いる試みも報告されている[102]。但し、HM1.24 は低いレベルで PBMC 及び各種組織にも分布しているため、一般的な抗体医薬品ではなくイムノキシンを用いるケースでは、より一層正常組織への毒性を考慮しなくてはならない。いずれにしても、HM1.24 はその抗原の特性から癌治療の標的として様々な活用が考えられており、抗 HM1.24 抗体を用いた医薬品開発には期待が高まっている。

5. 総括

本研究で得られた結果から、内在化を抑制し ADCC 活性を増強した抗 HM1.24 キメラ抗体 cKM3590 が、MM 治療及び固形癌治療において有用であることを示した。cKM3590 は中外製薬社ヒト化抗体 AHM を含めた抗 HM1.24 抗体クローンの中で、最も内在化が抑制され、かつ MM 細胞株に対する高い ADCC 活性を示していた。更に、cKM3590 の固形癌細胞株に対しての高い反応性や固形癌ゼノグラフトモデルにおける薬効を確認することができた。また、これらの解析を進める中で、抗 HM1.24 抗体の内在化とアポトーシス誘導活性、エピトープの関連性や、速やかな内在化を示す抗体の ADCC 活性発揮のためにはデフコース化などの ADCC 活性増強が必要であることを示すことができた。以上の知見から、cKM3590 をはじめとした抗 HM1.24 抗体の臨床応用が促進されることが強く期待される。

6. 図表

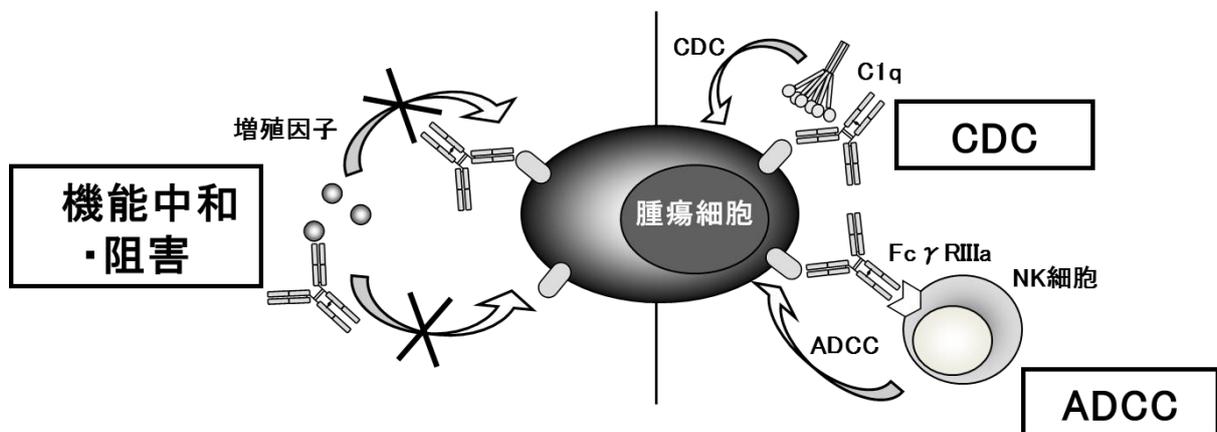


図1. 抗体医薬品の作用機序

抗体医薬品の作用機序として、①標的分子の機能中和・阻害と、②抗体特有のエフェクター機構 (ADCC、CDC) による標的細胞の障害が知られている。

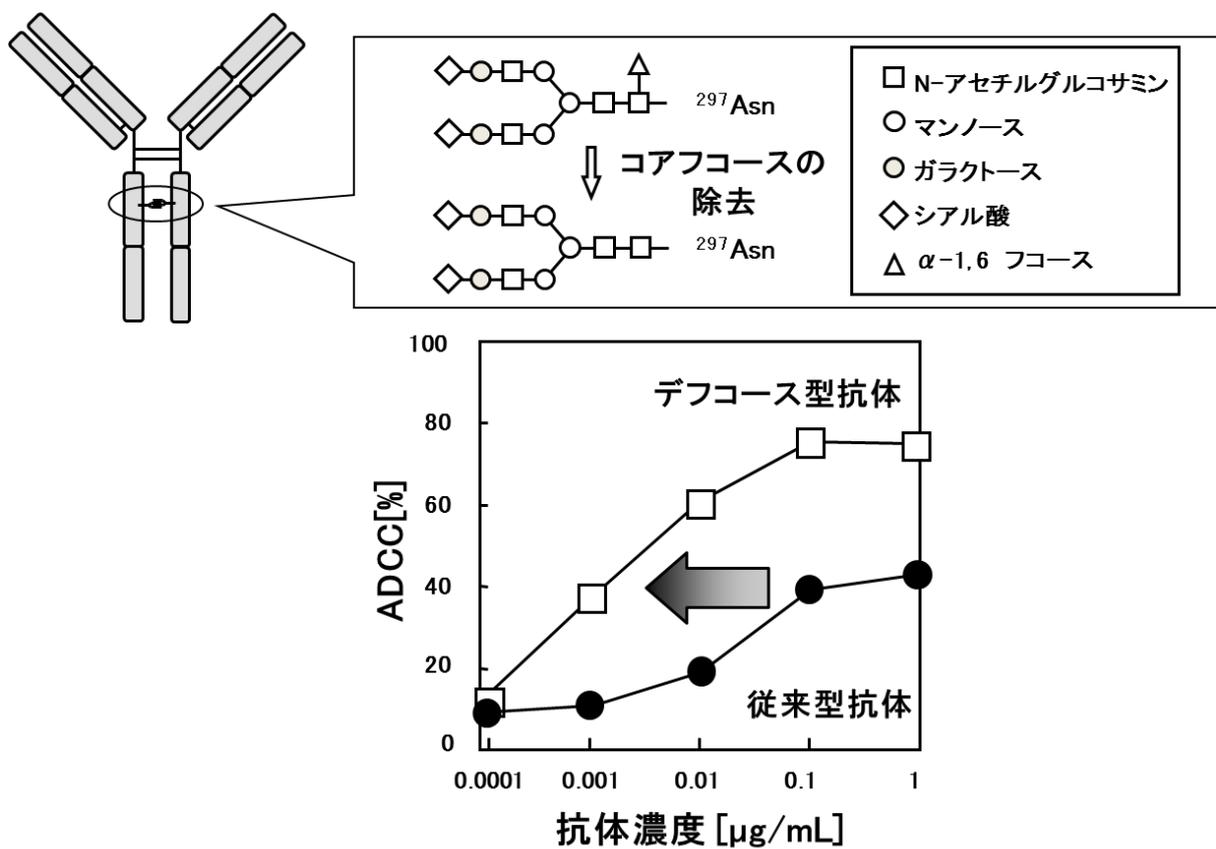


図 2. デフコース化による ADCC 活性増強

抗体 IgG の定常領域 Asn297 に修飾する N 結合型糖鎖中のコアフコースを除去することにより、ADCC 活性が劇的に増強することができる。

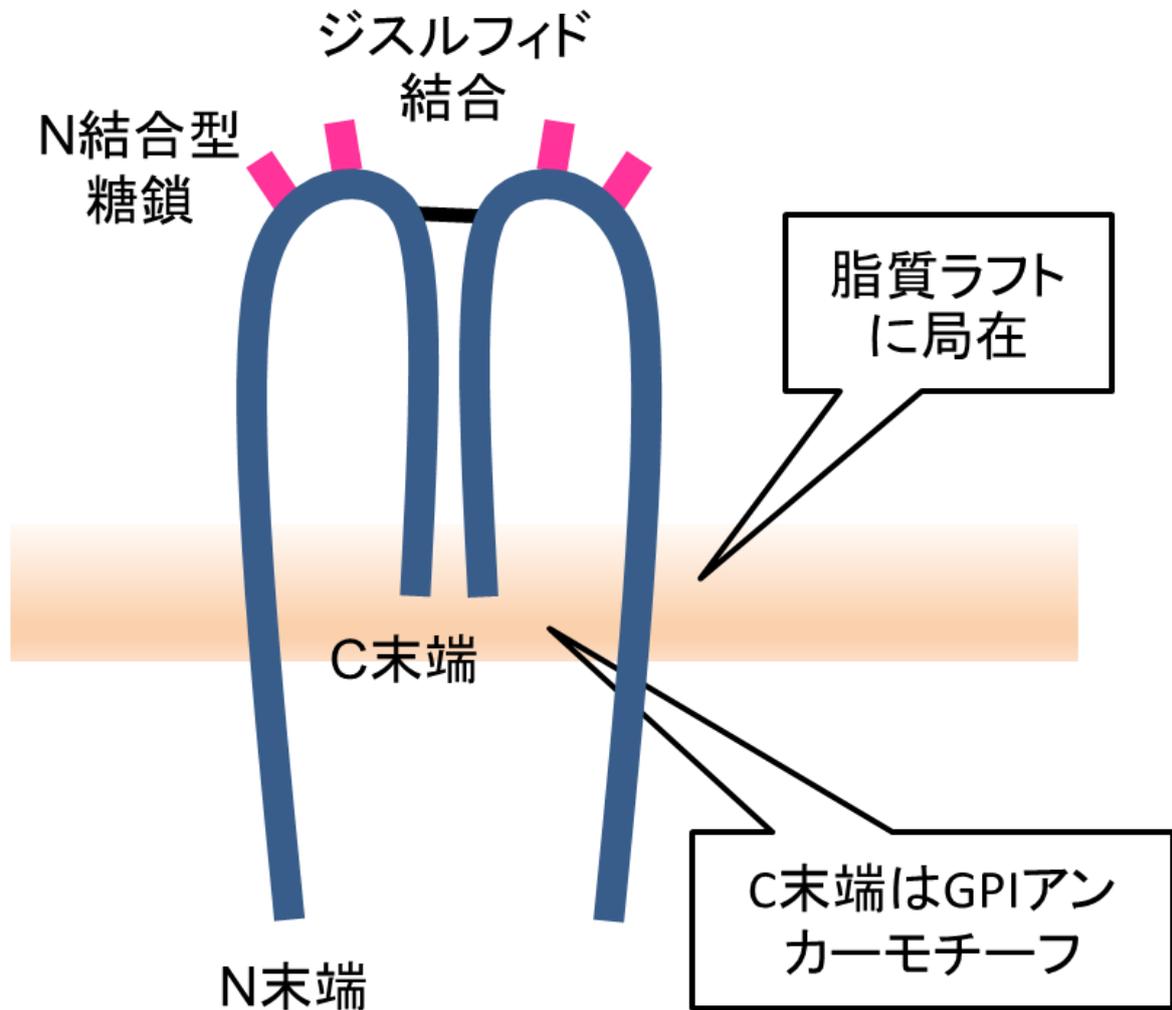


図 3. HM1.24 の構造

HM1.24 は II 型膜タンパク質であり、N 末端は細胞内に存在する。C 末端には GPI アンカードメインが髣化しており、これにより脂質ラフトに局在するものと考えられている。HM1,24 はジスルフィド結合によりホモダイマーを形成する。また、HM1.24 中に 2 か所の N 結合型糖鎖付加部位が存在している。

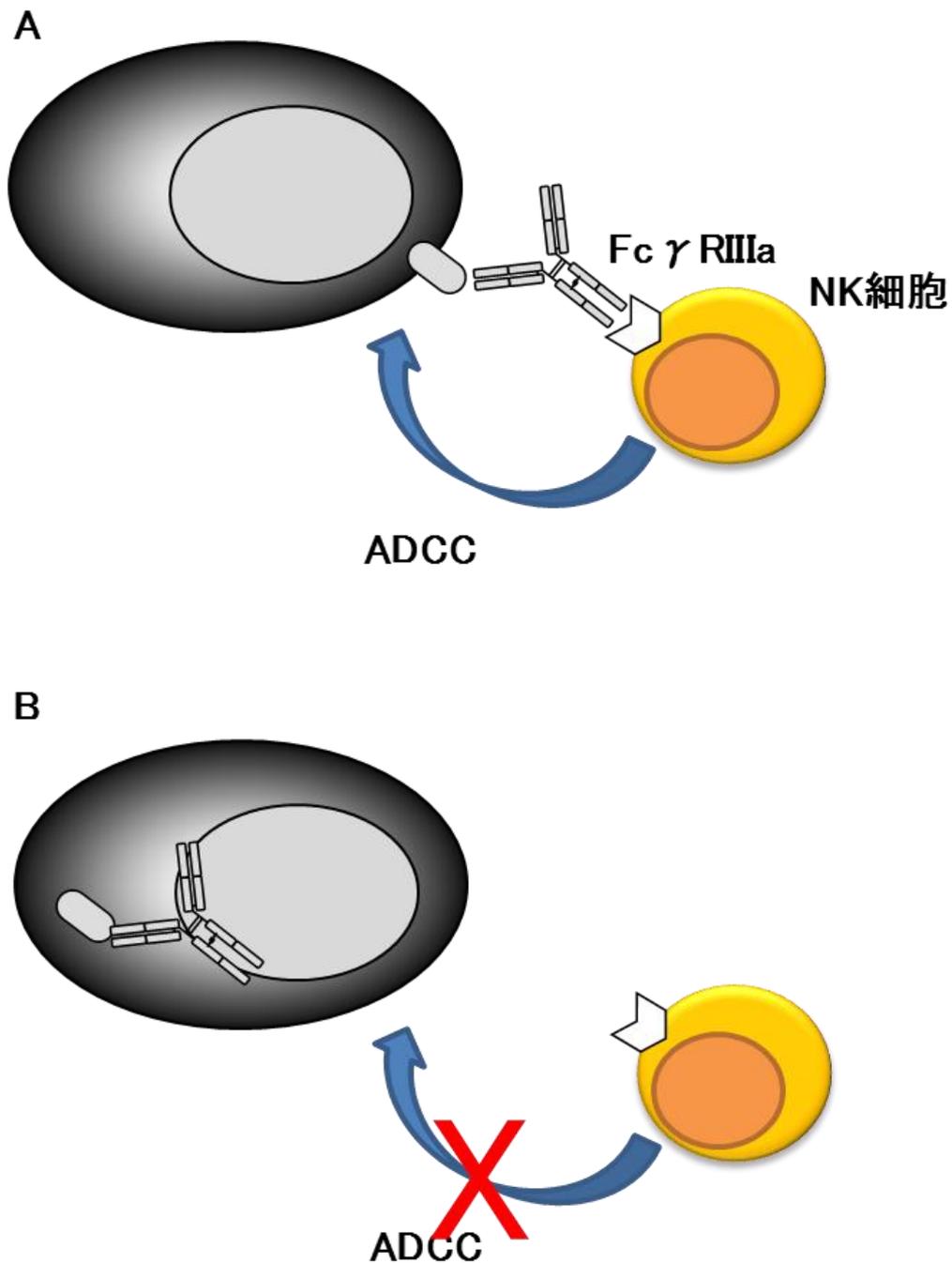


図4. 内在化とADCC活性

(A) ADCC 活性が発揮されるためには、標的細胞とエフェクター細胞が抗体によって連結されている必要がある。(B) 抗体の内在化により、標的細胞とエフェクター細胞間の連結が成立しなかった場合にはADCC 活性は発揮されにくくなると予想される。

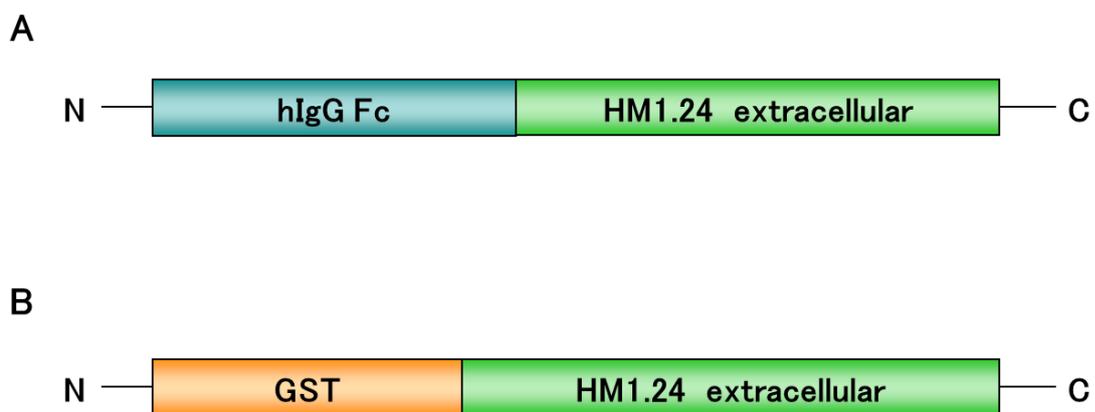


図 5. 可溶性抗原のデザイン

(A) 動物細胞を宿主として発現する分子として、Fc-sHM1.24 をデザインした。ヒト IgG の Fc ドメインとヒト HM1.24 細胞外領域が連結されている。(B) 大腸菌を宿主として発現する分子として、GST-sHM1.24 をデザインした。GST とヒト HM1.24 細胞外領域が連結されている。

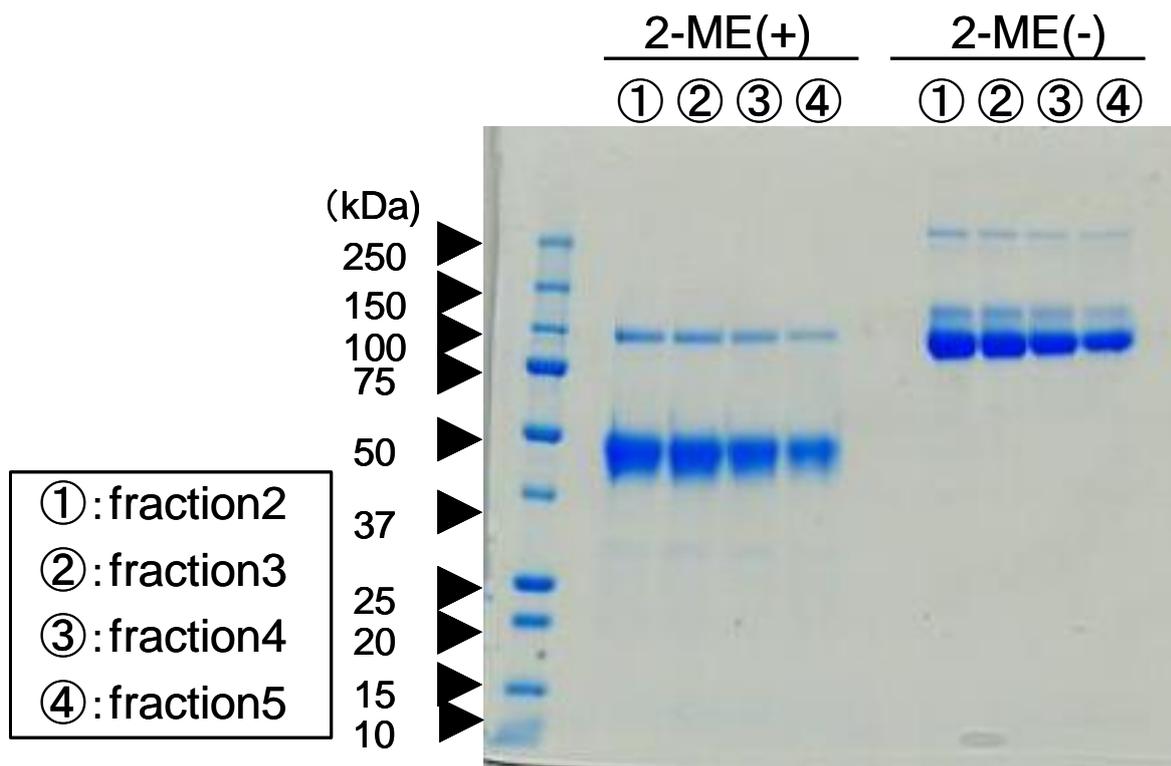


図 6. Fc-sHM1.24 の精製

Fc-sHM1.24 発現ベクターを導入した YB2/0 培養上清より、Prosep-A を用いて Fc-sHM1.24 を精製した。SDS-PAGE によりリッチカットした溶出画分 (fraction2-5) を解析したところ、還元条件下 (2-ME(+)) においては約 50 kDa の、非還元条件下 (2-ME(-)) においては約 100 kDa の Fc-sHM1.24 に相当するバンドが確認された。

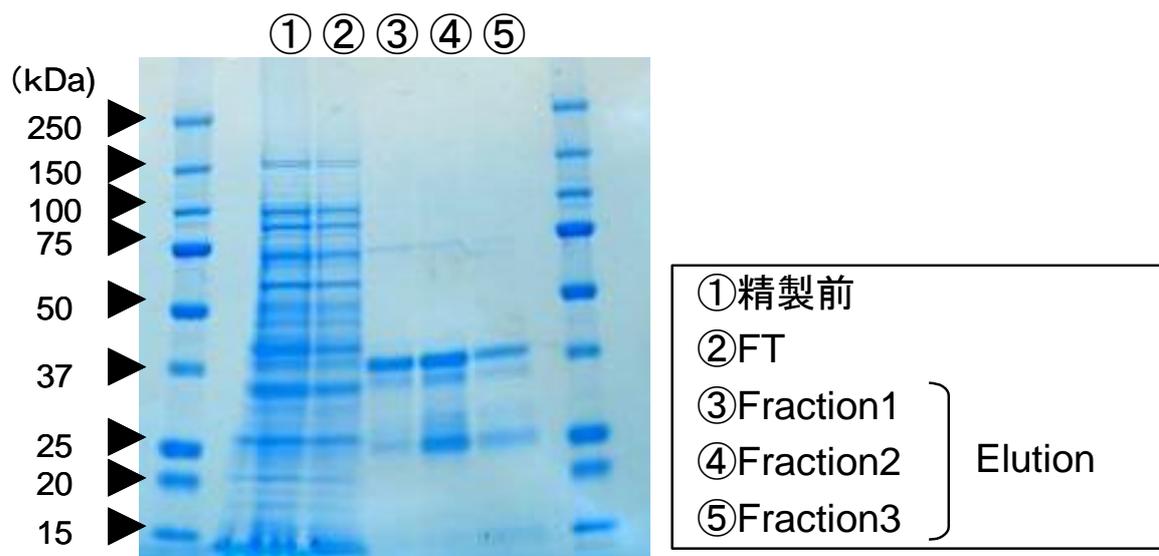


図 7. GST-sHM1.24 の精製

GST-sHM1.24 発現ベクターを導入した大腸菌破碎液より、グルタチオンカラムを用いて GST-sHM1.24 を精製した。SDS-PAGE により精製前のライセート(「精製前」)、カラム通過画分(「FT」)、溶出画分(Fraction1-3)を解析したところ、溶出画分において約 37 kDa の GST-sHM1.24 に相当するバンドが確認された。

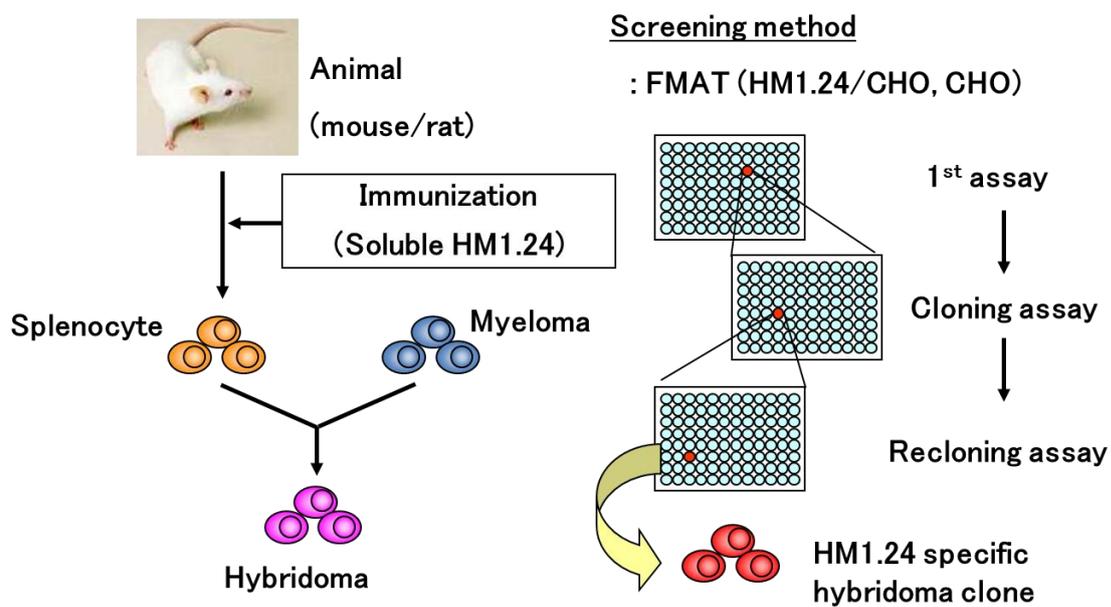


図 8. 抗体の作製方法

抗 HM1.24 抗体を動物免疫法により樹立した。可溶性抗原をマウスあるいはラットに免疫してハイブリドーマを樹立した。得られたハイブリドーマから、目的の抗体を産生する細胞を、FMAT を用いてスクリーニングし、2 回のシングルセルクローニングを経てハイブリドーマクローンを単離した。

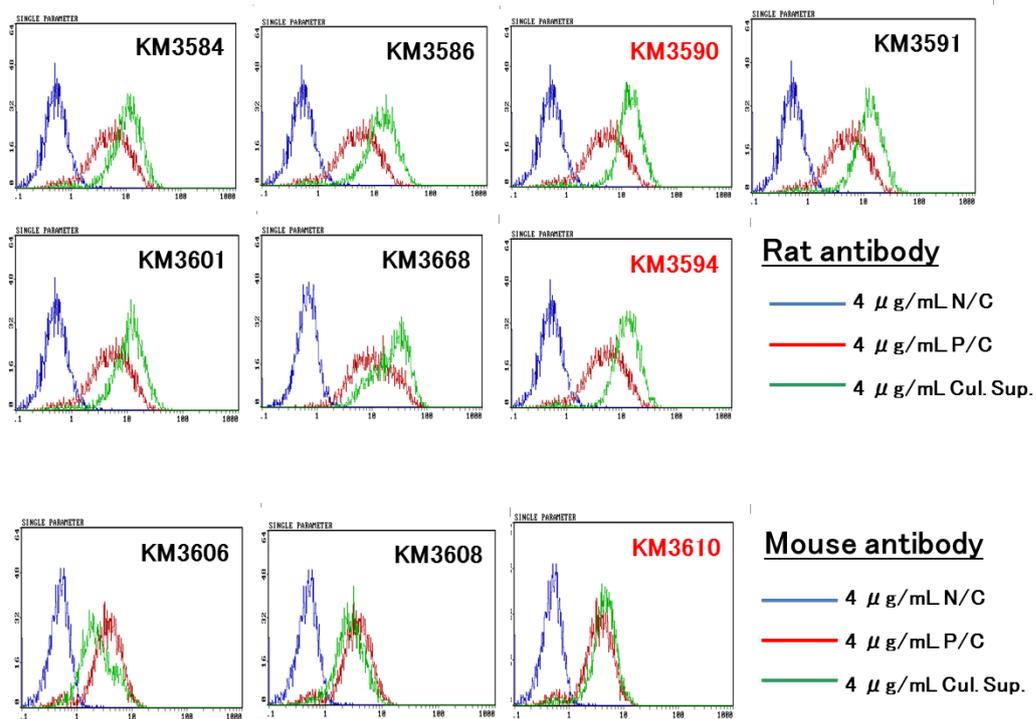


図9. 抗 HM1.24 モノクローナル抗体の HM1.24/CHO 結合活性

得られた抗 HM1.24 モノクローナル抗体の中で比較的結合活性の高かった 10 クローンの HM1.24/CHO に対する反応性をフローサイトメトリーにより評価した。評価対象の抗体で染色したヒストグラムを緑線、以前に取得された陽性対照で染色したヒストグラムを赤線、陰性対照で染色したヒストグラムを青線で示した。いずれの抗体も陽性対照と同等以上の染色性を示した。

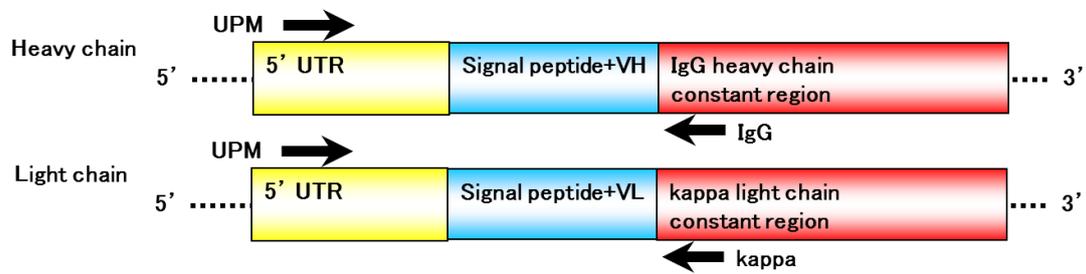


図 10. 抗体可変領域の同定法

ハイブリドーマから抽出した cDNA を鋳型として、ユニバーサルプライマーミックス (UPM) と定常領域配列に相補的に結合するプライマーを用いて可変領域配列を増幅し、これをクローニングベクターに挿入することで、可変領域配列を回収した。得られたベクターについて配列解析を行い、抗体可変領域遺伝子配列を決定した。

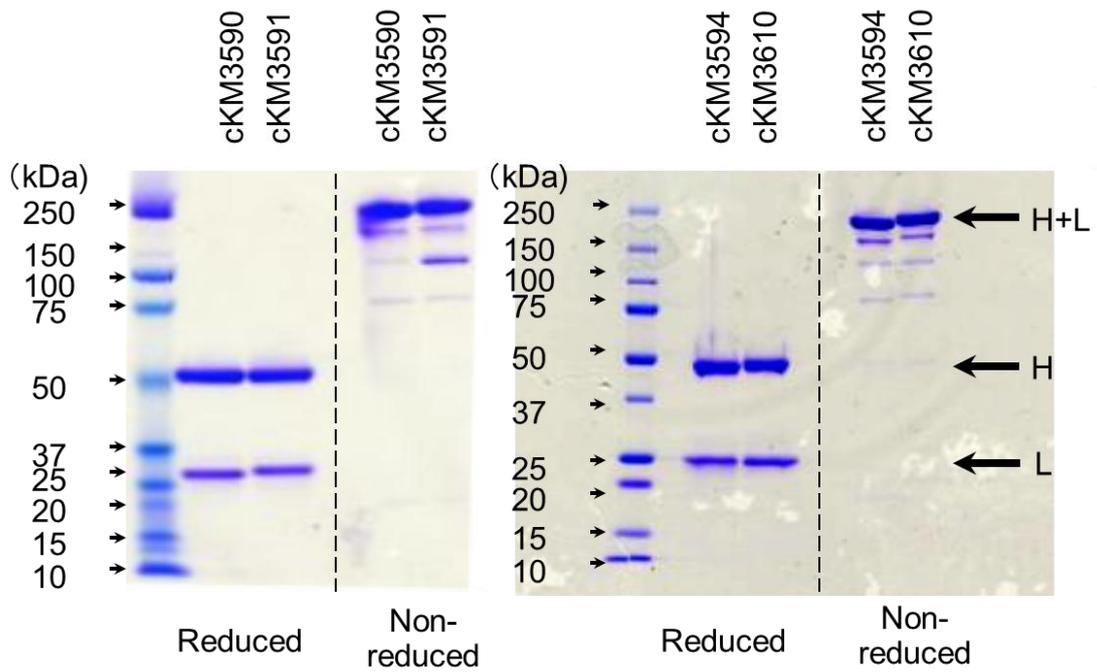


図 11. SDS-PAGE 解析

精製したキメラ抗体 cKM3590, cKM3591, cKM3594 及び cKM3610、各 3 μ g をウェルにアプライし、SDS-PAGE を還元条件下、非還元条件下において実施した。分解物や不純物も確認されず、品質に問題がないことが確認できた。

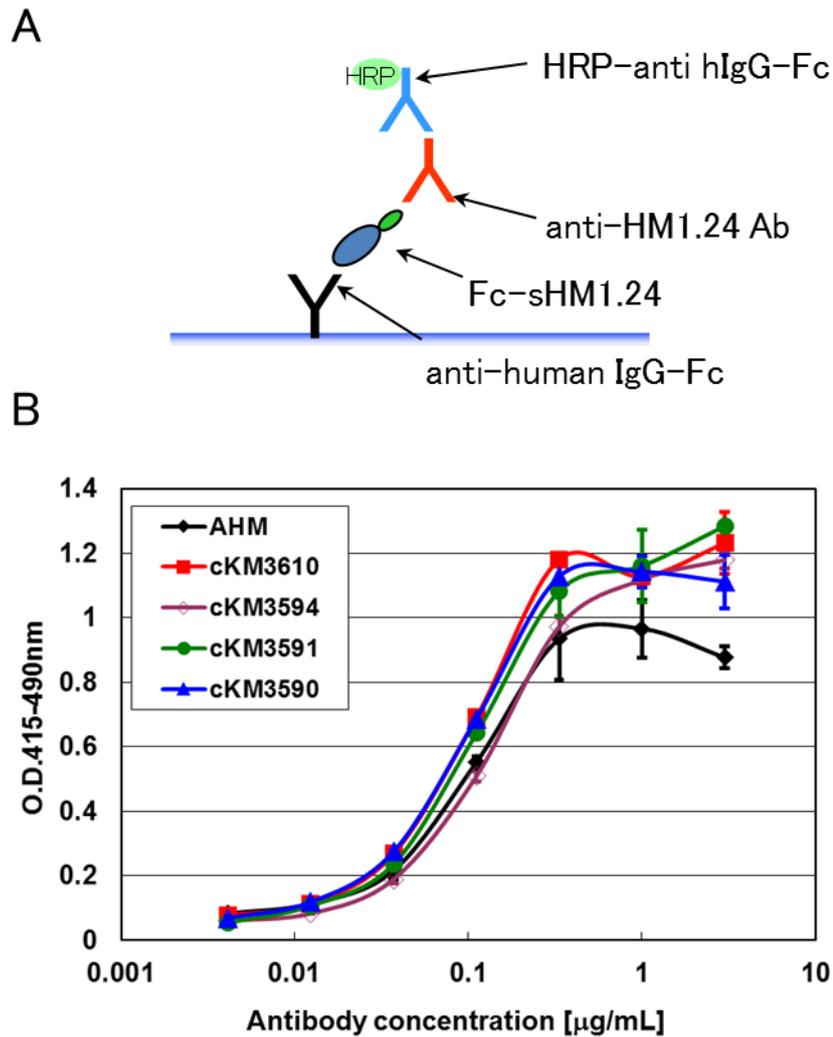


図 12. Binding ELISA を用いた各キメラ抗体の抗原結合活性評価

精製したキメラ抗体 cKM3590, cKM3591, cKM3594, cKM3610 及び AHM を用い、96 穴プレートに固相化した HM1.24 抗原に対する反応性を ELISA により評価した。本 ELISA 系の概要を図 12A に示す。すべての抗体において抗原結合活性が確認され、中でも cKM3590, cKM3591, cKM3610 は AHM や cKM3594 よりも高い抗原結合活性を示した(図 11B)。

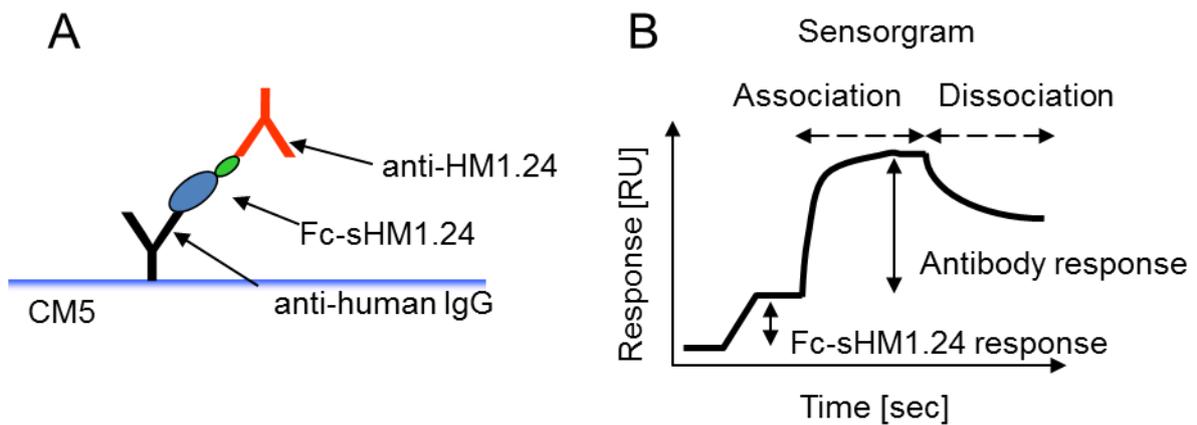


図 13. BIAcore を用いた各キメラ抗体の抗原結合活性評価

(A) BIAcore を用いて抗 HM1.24 抗体の、CM5 sensor chip 上にキャプチャーした Fc-sHM1.24 抗原に対する結合活性(結合速度定数 K_a 、解離速度定数 K_d 、解離定数 KD)を比較した。(B) その際に得られるセンサーグラムの一例を示す。

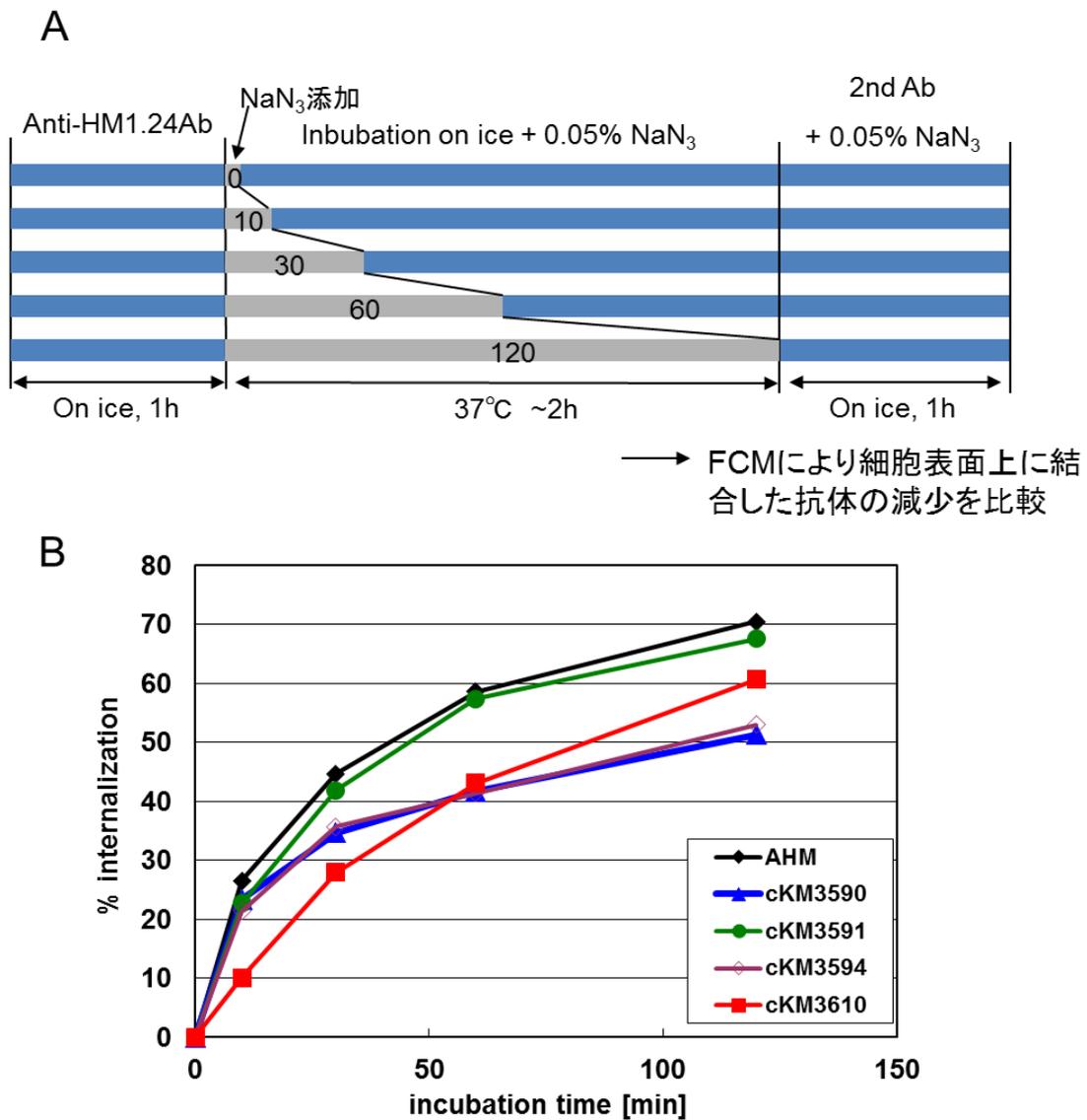


図 14. KMS-11 における内在化活性評価

cKM3590, 3591, 3594, 3610 および AHM を用い、ヒト MM 細胞株 KMS-11 における Internalization 活性を評価した。方法を図 14A に示す。すべての抗体において内在化活性が確認され、中でも AHM、cKM3591 はその他の抗体よりも速やかな内在化活性を示した(図 14B)。

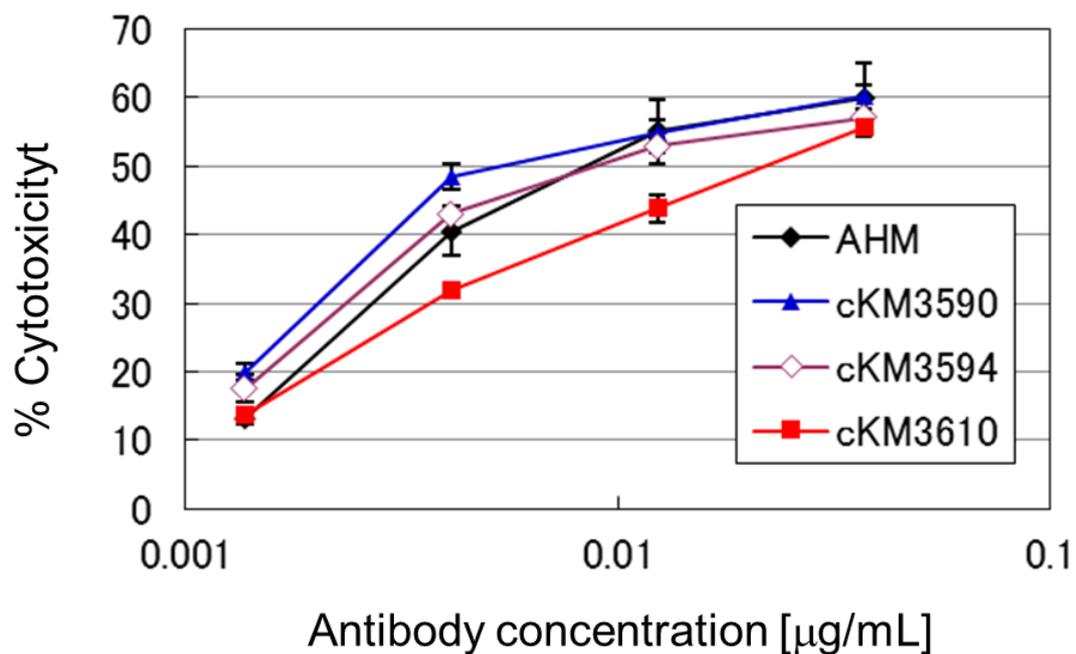


図 15. RPMI8226 に対する ADCC 活性評価

デフコース化した cKM3590, cKM3591, cKM3594, cKM3610 及び AHM を用い、ヒト MM 細胞株 RPMI8226 に対する ADCC 活性を測定した。エフェクター細胞にはヒト PBMC を用い、E/T 比を 25:1 に調整した。いずれの抗体においても ADCC 活性が確認されたが、中でも cKM3590 は最も高い ADCC 活性を示し、cKM3594 は AHM 同等以上の ADCC 活性を示した。

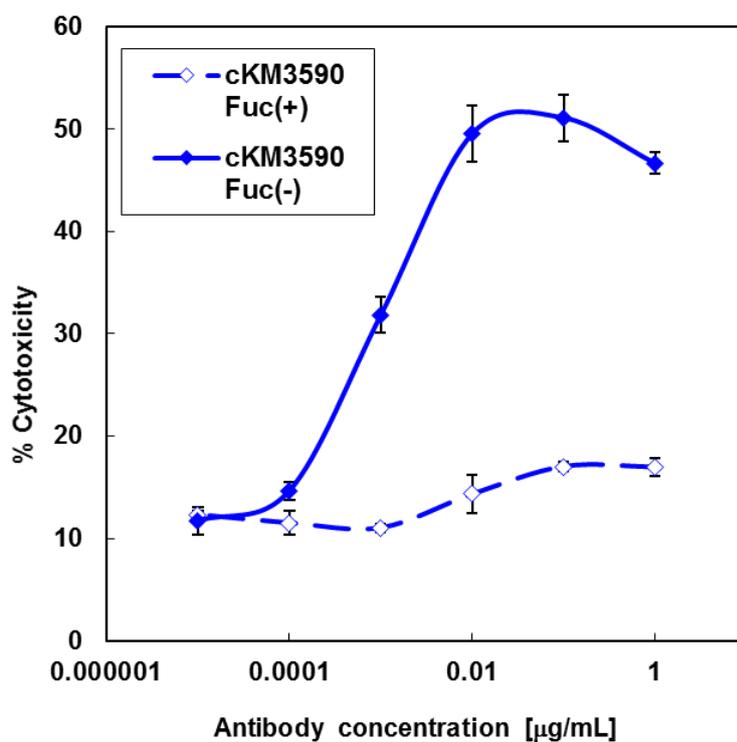


図 16. KMS-11 に対する ADCC 活性評価

通常型 cKM3590 (cKM3590 Fuc(+)) 及びデフコース型 cKM3590 (cKM3590 Fuc(-)) を用い、ヒト MM 細胞株 KMS-11 に対する ADCC 活性を測定した。エフェクター細胞にはヒト PBMC を用い、E/T 比を 25:1 に調製した。デフコース型 cKM3590 では ADCC 活性が確認されたが、通常型 cKM3590 では ADCC 活性がほとんど確認されなかった。

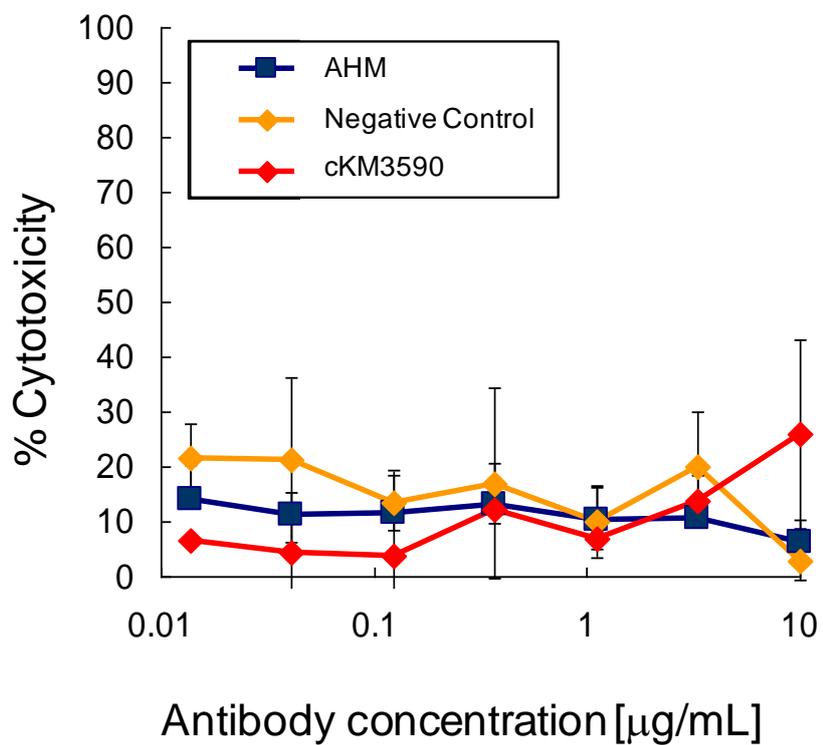


図 17. KMS-11 に対する CDC 活性評価

cKM3590 及び AHM の KMS-11 に対する CDC 活性を測定した。その結果、いずれの抗体においても CDC 活性は確認されなかった。

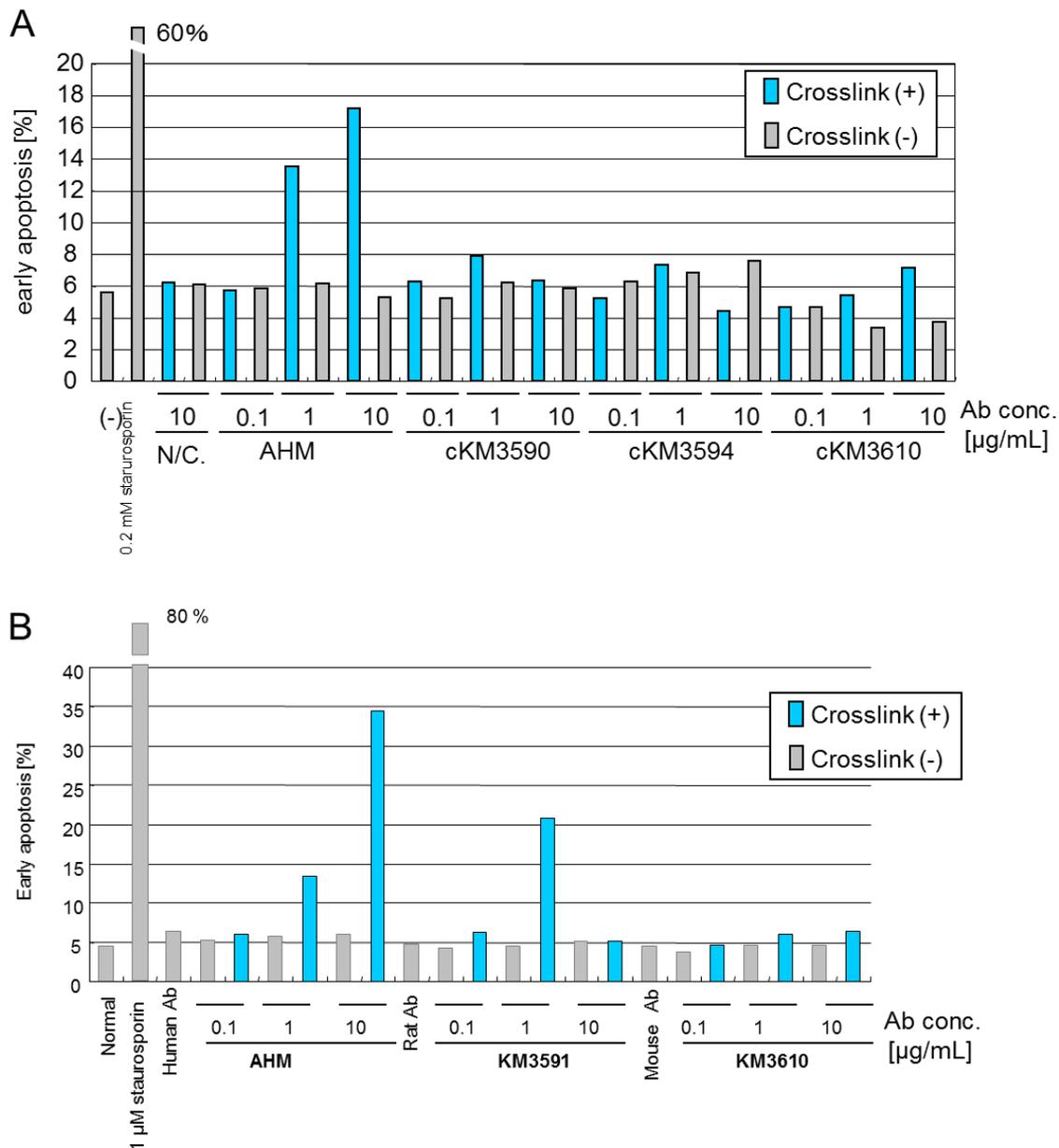


図 18. アポトーシス誘導活性評価

(A) cKM35901、cKM3594、cKM3610 および AHM によるヒト MM 細胞株 RPMI8226 に対するアポトーシス誘導活性を、Annexin-V 陽性率を指標に評価した。その結果、AHM 添加時において架橋抗体存在下で抗体濃度依存的にアポトーシス誘導活性が確認された。また cKM3610 添加時においても弱いながらも、架橋抗体存在下で抗体濃度依存的にアポトーシス誘導活性が確認された。

(B) (B) KM3591、KM3610 および AHM によるヒト肺癌細胞株に対するアポトーシス誘導活性を、Annexin-V 陽性率を指標に評価した。その結果、すべての抗体に、架橋抗体存在下において抗体濃度依存的にアポトーシス誘導活性が確認された。

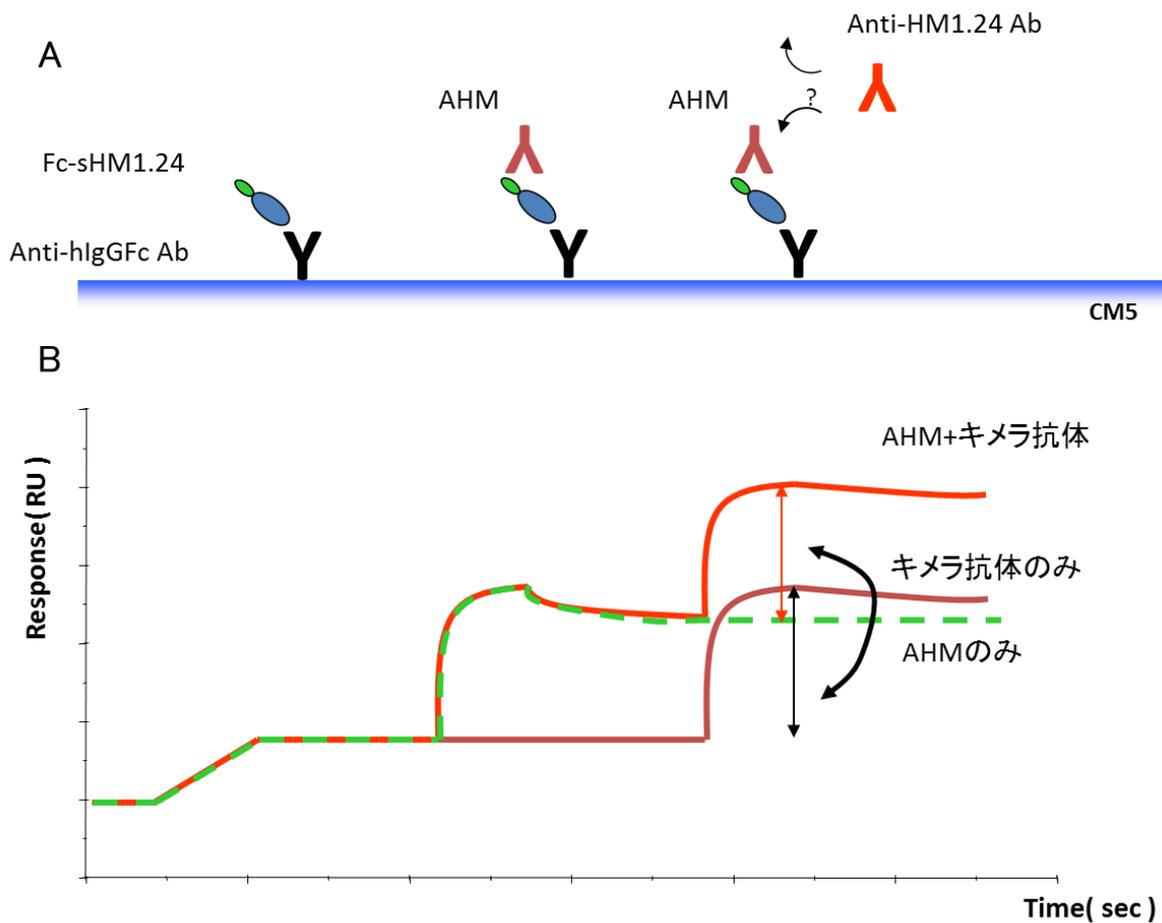


図 19. BIAcore を用いたエピトープ解析

cKM3590、cKM3594、cKM3610がAHMと異なるエプトープを認識するか否かを評価するため、BIAcoreを用い、簡易的なエピトープ解析を実施した。(A)CM5 sensor chip 上にキャプチャーした Fc-sHM1.24 に対する反応性が、抗原に AHM を結合させておくことにより阻害されるか否かを評価した。(B) 認識エピトープが重複しない場合、AHM の結合センサーグラムに上乘せしてキメラ抗体のレスポンスカーブが得られる。エピトープが重複する若しくは近傍に存在することにより片方の抗体が立体障害を及ぼす場合、キメラ抗体のレスポンスの上乗せは抑制される。

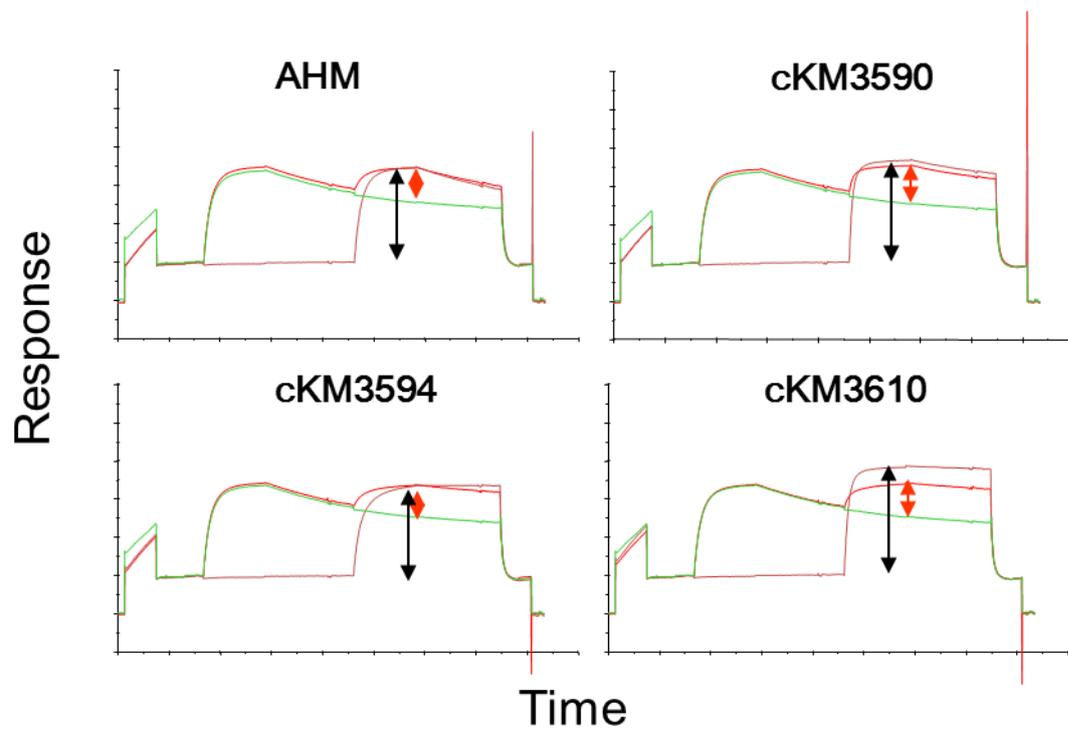


図 20. BIAcore を用いたエピトープ解析結果

cKM3590、cKM3594、cKM3610 が AHM と異なるエピトープを認識するか否かを評価するため、BIAcore を用い、簡易的なエピトープ解析を実施した。その結果、cKM3590、cKM3594、cKM3610 全ての抗体で阻害が確認された。

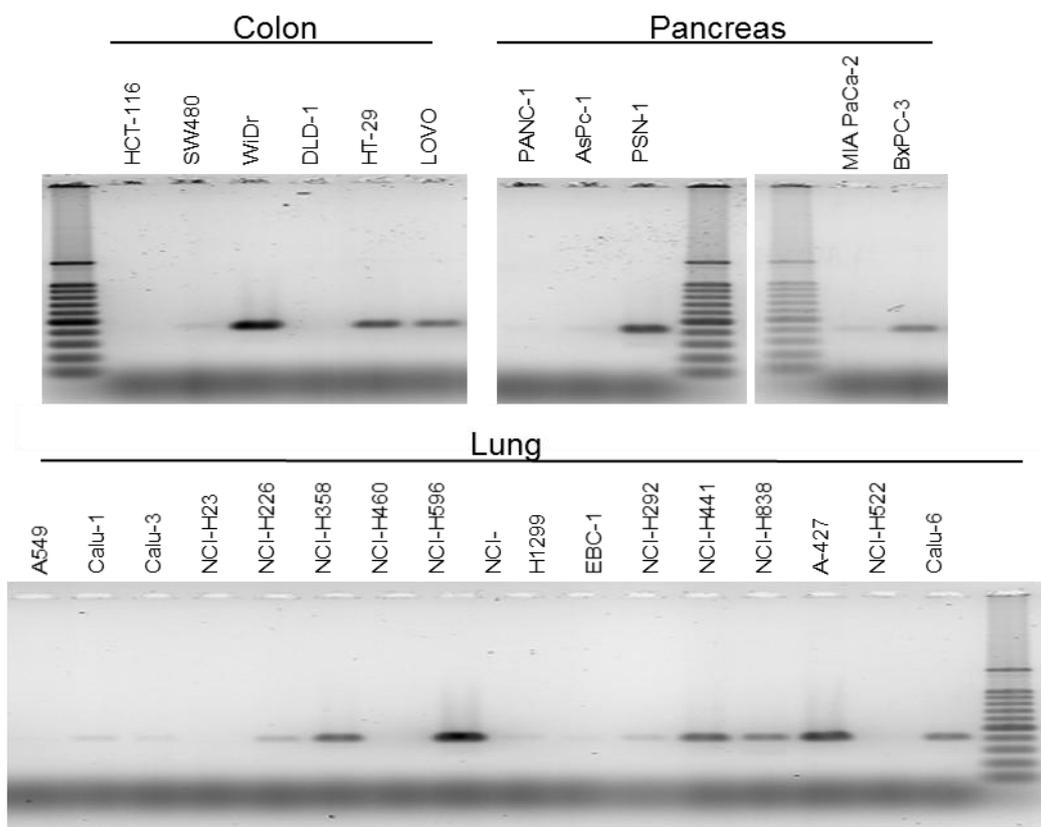


図 21. 固形癌細胞株における HM1.24 の発現

固形癌細胞株(大腸癌、膵癌、肺癌)における発現を、癌細胞株 cDNA パネルを用いた RT-PCR により調べた結果、数種類の癌細胞株において HM1.24mRNA の発現が確認された。

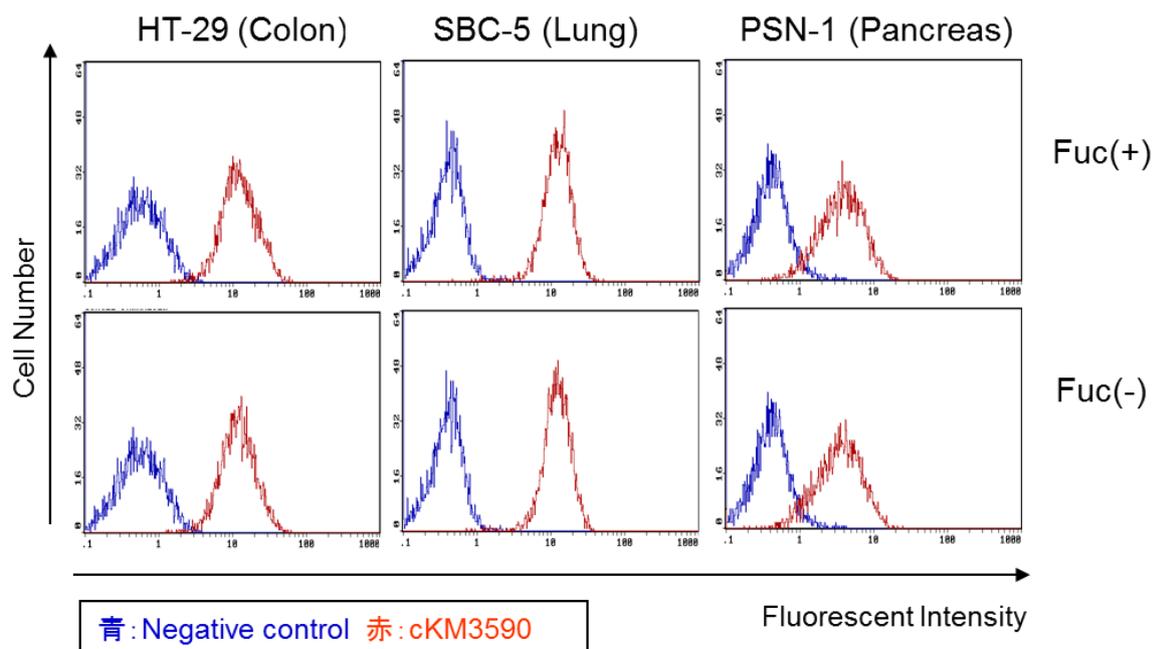


図 22. 固形癌細胞株における HM1.24 の発現

フローサイトメリーにより cKM3590 の反応性を評価したところ、ヒト大腸癌細胞株 HT-29、ヒト非小細胞肺癌細胞株 SBC-5、ヒト膵臓癌細胞株 PSN-1 において HM1.24 の発現が確認された。

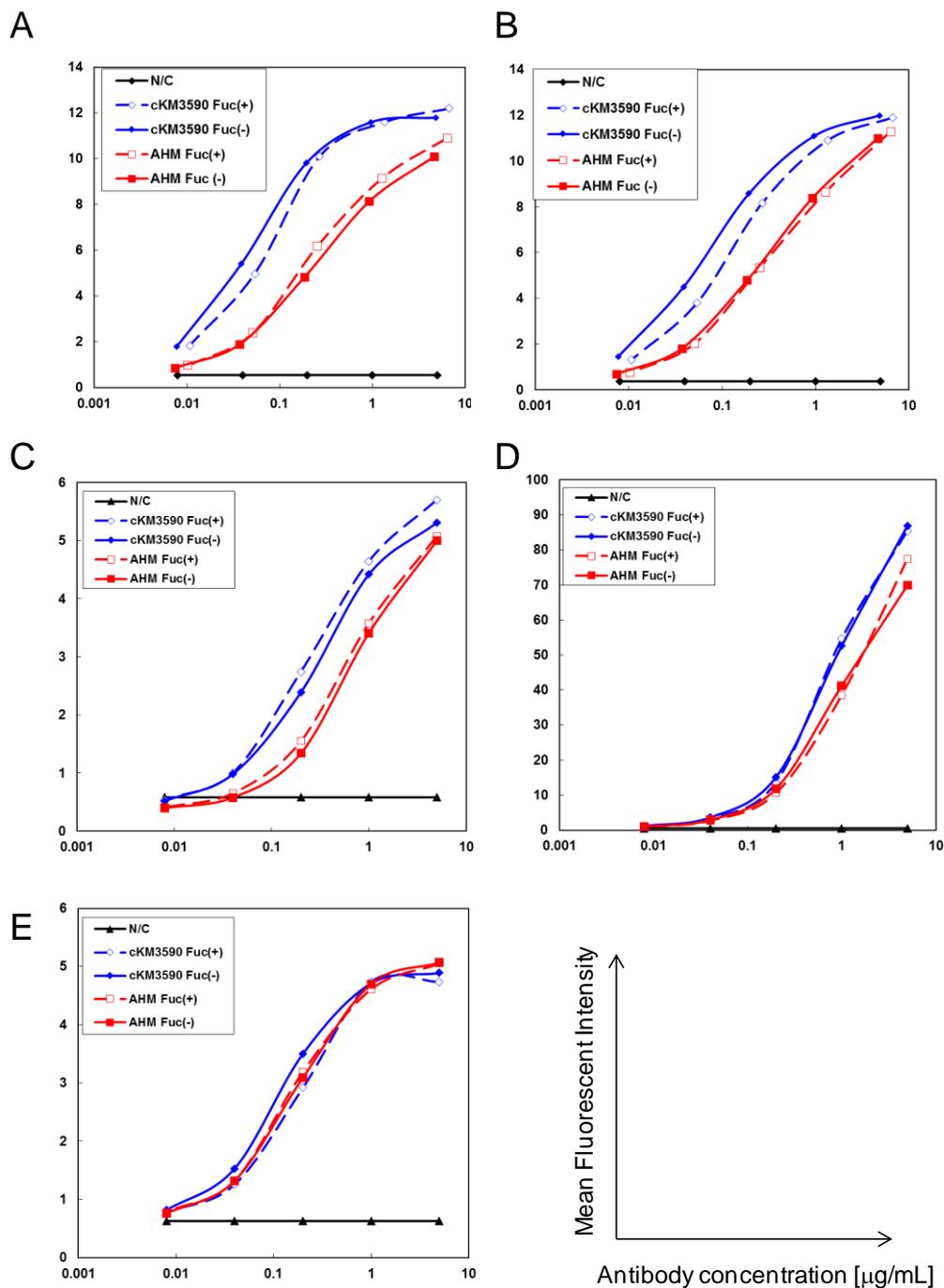


図 23. 固形癌細胞株に対する cKM3590 及び AHM の反応性評価

フローサイトメリーにより cKM3590 及び AHM の、各種細胞株に対する抗体濃度依存的な反応性を評価した。ヒト大腸癌細胞株 HT-29 (A)、ヒト非小細胞肺癌細胞株 SBC-5 (B)、ヒト膵臓癌細胞株 PSN-1 (C)、HM1.24 強制発現株 HM1.24/CHO (D)、ヒト MM 細胞株 KMS-11 (E) に対する反応性を比較したところ、固形癌細胞株に対して cKM3590 が AHM と比べて有意に高い結合活性を示した。

A



B

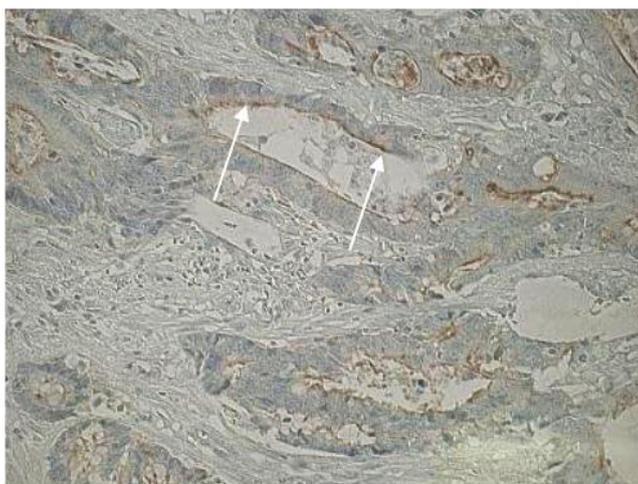


図 24. 大腸癌組織アレイを用いた免疫組織染色

ヒト大腸癌アレイを用い、KM3590 による免疫組織染色を実施した。癌組織陽性染色像の特徴としては、陽性の大部分は管腔側の細胞膜に発現が見られ(図 24B 白矢印部)、細胞質や管腔側以外の細胞膜は弱い染色が見られた。図 24A に陰性対照抗体(ラット IgG)を用いた免疫組織染色像を示す。

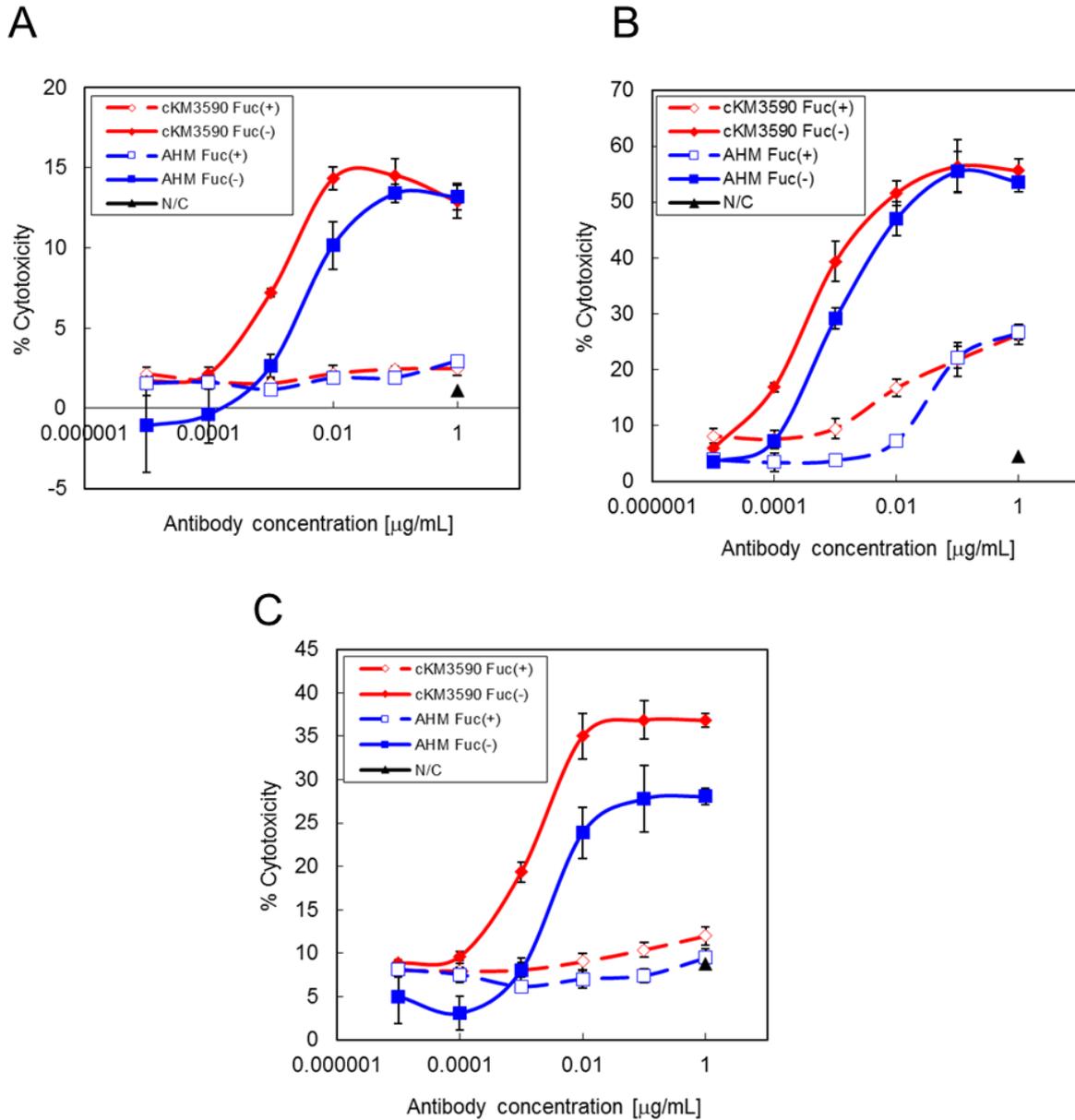
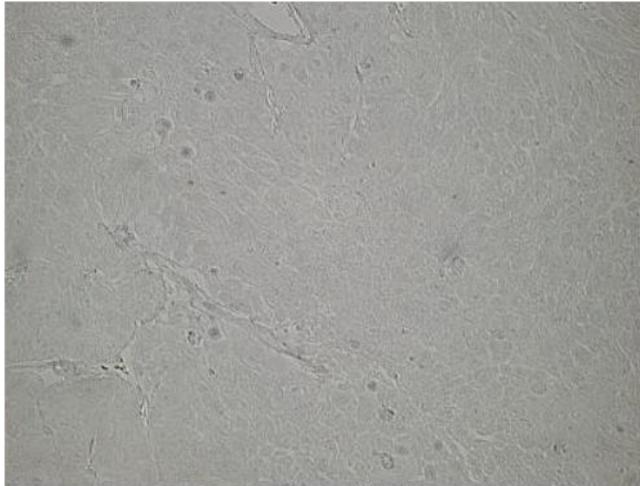


図 25. 固形癌細胞株に対する ADCC 活性評価

通常型 cKM3590 (cKM3590 Fuc(+)) 及びデフコース型 cKM3590 (cKM3590 Fuc(-))、通常型 AHM (AHM Fuc(+)) 及びデフコース型 AHM (AHM Fuc(-)) を用い、ヒト大腸癌細胞株 HT-29、ヒト非小細胞肺癌細胞株 SBC-5、ヒト膵癌細胞株 PSN-1 に対する ADCC 活性を比較した。エフェクターには PBMC を用い、E/T 比を 25:1 に調製した。その結果、デフコース型 cKM3590 で高い ADCC 活性を確認し、デフコース型 AHM の ADCC 活性よりも高いことが確認された。

A



B

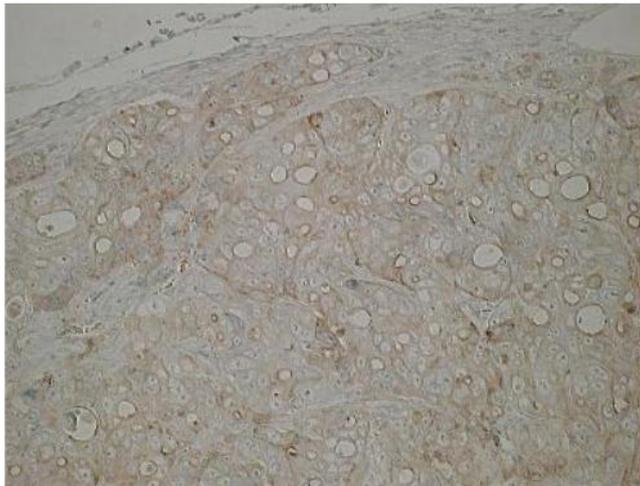


図 26. HT-29 ゼノグラフト組織切片を用いた免疫組織染色

HT-29 ゼノグラフトの組織切片を用い、KM3590 の反応性を免疫組織染色にて評価した。陰性対照組織をHM1.24陰性であるA549ゼノグラフトとした。その結果、抗体濃度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において陽性対照組織で、明瞭な陽性所見が確認(図 26B)され、陰性対照組織における反応性は陰性であることが確認できた(図 26A)。

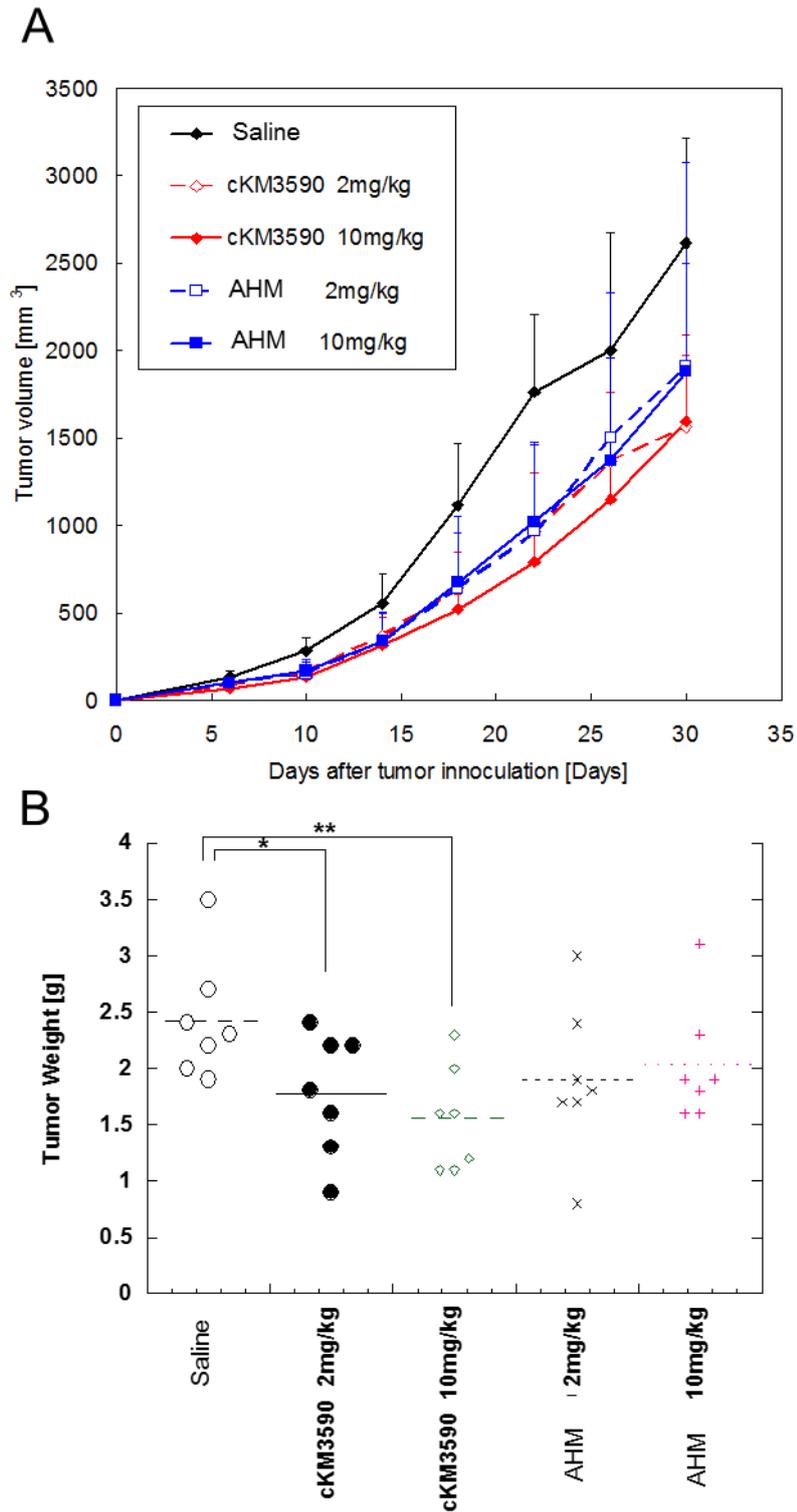


図 27. HT-29 ゼノグラフトモデルにおける cKM3590 および AHM の抗腫瘍活性評価

ヒト大腸癌細胞株 HT-29 を皮下接種した cKM3590 および AHM による生着阻害効果を評価した。その結果、cKM3590 は有意に腫瘍に対して増殖阻害効果を示した(図 27A)。腫瘍移植後 35 日目に採取した腫瘍塊の重量で比較しても、cKM3590 は有意に腫瘍に対して増殖阻害効果を示した(図 27B)。

Clone ID	Subclass	Species
KM3584	IgG2a	Rat
KM3586	IgG1	Rat
KM3590	IgG2a	Rat
KM3591	IgG2b	Rat
KM3594	IgG2a	Rat
KM3601	IgG2a	Rat
KM3606	IgG1	Mouse
KM3608	IgG1	Mouse
KM3610	IgG2a	Mouse

表 1. 動物免疫により得られた新規抗 HM1.24 抗体クローンの一覧

マウスあるいはラットへの免疫を実施することにより複数の抗体クローンを得ることができた。中でも結合活性を高かった抗体 10 クローンを選抜し、以降の評価を実施することとした。

	Ka × 10 ⁵ (1/Ms)	Kd × 10 ⁻⁴ (1/s)	K _D (nM)	1/K _D (1/nM)	Ratio (1/K _D)	R _{max} ** (RU)	Ratio (R _{max})
AHM	5.41	30.9	6.11	0.16	1.0	460	1.00
KM3584	1.86	21.0	11.62	0.09	0.5	333	0.72
KM3586	2.34	8.1	3.48	0.29	1.8	304	0.66
KM3590	3.86	36.2	8.89	0.11	0.7	436	0.95
KM3591	3.80	3.7	0.85	1.17	7.2	444	0.97
KM3594	2.39	0.3	0.12	8.52	52.1	410	0.89
KM3601	2.59	5.3	1.89	0.53	3.2	438	0.95
KM3606	1.61	6.4	3.99	0.25	1.5	425	0.92
KM3608	0.28	6.9	53.27	0.02	0.1	382	0.83
KM3610	3.03	5.1	1.38	0.73	4.4	486	1.06
KM3668	1.48	38.3	25.71	0.04	0.2	255	0.55

表 2. 新規抗 HM1.24 抗体クローンの結合活性一覧

マウス・ラット抗 HM1.24 抗体及び AHM の結合活性を、BIAcore を用いて解析した。結合速度定数 Ka、解離速度定数 Kd、解離定数 KD を算出し、AHM の値と比較を行った。

	$K_a \times 10^5$ [1/Ms]	$K_d \times 10^{-4}$ [1/s]	KD [nM]	Rmax[RU]
AHM	5.68	59.22	10.43	350.7
cKM3590	10.95	35.45	3.24	230.4
cKM3591	5.684	5.548	0.98	268.8
cKM3594	4.252	0.8827	0.21	233.6
cKM3610	8.984	14.17	1.5	291.1

表 3. キメラ抗体の結合活性一覧

cKM3590、cKM3591、cKM3594、cKM3610 及び AHM の結合活性を、BIAcore を用いて解析した。結合速度定数 K_a 、解離速度定数 K_d 、解離定数 KD を算出した。

	Age	Sex	site	Pathology	Negative ctrl	KM3590	コメント
1	60	F	ascending	adenocarcinoma, M/D	-	-	
2	58	F	rectum	adenocarcinoma, M/D	-	-	
3	51	M	transverse	adenocarcinoma, P/D	-	+	slight positive
4	38	F	transverse	adenocarcinoma, M/D	-	-	
5	56	M	sigmoid	adenocarcinoma, W/D	-	-	
6	46	F	cecum	adenocarcinoma, M/D	-	2+	#A
7	61	M	cecum	adenocarcinoma, mucinous	-	+	slight positive
8	40	F	sigmoid	adenocarcinoma, W/D	-	-	
9	36	F	descending	adenocarcinoma, M/D	-	2+	#A
10	68	M	sigmoid	adenocarcinoma, M/D	-	-	
11	62	F	sigmoid	adenocarcinoma, M/D	-	2+	#A
12	65	M	ascending	adenocarcinoma, W/D	-	+	#A
13	65	M	sigmoid	adenocarcinoma, M/D	-	-	
14	72	F	sigmoid	adenocarcinoma, W/D	-	-	
15	63	M	ascending	adenocarcinoma, W/D	-	2+	#A
16	73	F	transverse	adenocarcinoma, M/D	-	2+	#A
17	60	M	sigmoid	adenocarcinoma, M/D	-	-	
18	65	F	cecum	adenocarcinoma, mucinous	-	-	
19	57	M	sigmoid	adenocarcinoma, M/D	-	-	
20	58	M	cecum	adenocarcinoma, M/D	-	+	#A
21	56	M	ascending	adenocarcinoma, mucinous	-	+	#A
22	57	M	sigmoid	adenocarcinoma, M/D	-	-	
23	56	M	ascending	adenocarcinoma, M/D	-	-	
24	36	M	transverse	adenocarcinoma, M/D	-	2+	#A
25	65	F	sigmoid	adenocarcinoma, W/D	-	+	
26	62	M	ascending	adenocarcinoma, M/D	-	2+	#A
27	57	F	sigmoid	adenocarcinoma, W/D	-	-	
28	78	M	sigmoid	adenocarcinoma, W/D	-	+	#A
29	45	M	rectum	adenocarcinoma, W/D	-	+	slight positive
30	65	M	ascending	adenocarcinoma, W/D	-	3+	#A
31	61	M	transverse	adenocarcinoma, mucinous	-	-	
32	52	M	rectum	adenocarcinoma, M/D	×	×	
33	52	F	sigmoid	adenocarcinoma, M/D	-	-	
34	47	F	cecum	adenocarcinoma, M/D	-	-	
35	63	F	descending	adenocarcinoma, M/D	-	-	
36	53	M	cecum	adenocarcinoma, M/D	-	-	
37	53	F	transverse	adenocarcinoma, W/D	-	2+	#A
38	64	M	sigmoid	adenocarcinoma, M/D	-	-	
39	59	M	sigmoid	adenocarcinoma, M/D	-	-	
40	57	M	ascending	adenocarcinoma, M/D	-	-	
41	46	F	ascending	adenocarcinoma, P/D	-	+	#A
42	59	M	ascending	adenocarcinoma, M/D	-	-	
43	35	F	ascending	adenocarcinoma, mucinous	-	-	
44	42	M	transverse	adenocarcinoma, M/D	-	-	
45	49	F	ascending	adenocarcinoma, M/D	-	-	
46	76	M	sigmoid	adenocarcinoma, M/D	-	-	
47	74	M	ascending	adenocarcinoma, M/D	-	-	
48	60	F	rectum	adenocarcinoma, M/D	-	-	
49	62	M	sigmoid	adenocarcinoma, M/D	-	+	slight positive
50	62	M	sigmoid	adenocarcinoma, M/D	-	+	#A
51	57	M	sigmoid	adenocarcinoma, M/D	-	-	
52	56	F	sigmoid	adenocarcinoma, M/D	-	+	slight positive
53	75	F	rectum	adenocarcinoma, W/D	-	+	slight positive
54	58	M	rectum	adenocarcinoma, M/D	-	-	
55	56	M	ascending	adenocarcinoma, M/D	-	+	slight positive
56	35	M	rectum	adenocarcinoma, M/D	-	+	
57	34	M	ascending	adenocarcinoma, M/D	-	2+	#A
58	60	M	transverse	adenocarcinoma, W/D	-	-	
59	70	M	descending	adenocarcinoma, M/D	-	-	
60	carbon						

-:negative, +:5-25% positive or slight positive, 2+:25-50% positive, 3+:>50% positive
#A: 内腔側の細胞膜に発現

表 4. 大腸癌組織アレイにおける KM3590 反応性所見一覧

大腸癌組織アレイを用い、大腸癌検体に対する KM3590 の反応性を評価した。

#NAME?	Age	Sex	site	Histology	Abnormal finding	No. of CDN1#	Negative ctrl	KM3590
101	60	F	ascending	large boewl,mucosa		1	-	-
102	58	F	rectum	large boewl,mucosa		2	-	-
103	51	M	transverse	large boewl,mucosa		3	-	-
104	38	F	transverse	large boewl,mucosa		4	-	-
105	56	M	sigmoid	large boewl,mucosa		5	-	-
106	46	F	cecum	large boewl,mucosa		6	-	-
107	61	M	cecum	large boewl,mucosa		7	-	-
108	40	F	sigmoid	large boewl,mucosa		8	-	-
109	36	F	descending	large boewl,mucosa		9	-	-
110	68	M	sigmoid	large boewl,mucosa		10	-	-
111	62	F	sigmoid	large boewl,mucosa		11	-	-
112	65	M	ascending	large boewl,mucosa		12	-	-
113	65	M	sigmoid	large boewl,mucosa		13	-	-
114	72	F	sigmoid	large boewl,mucosa		14	-	-
115	63	M	ascending	large boewl,mucosa		15	-	-
116	73	F	transverse	large boewl,mucosa		16	-	-
117	60	M	sigmoid	large boewl,mucosa		17	-	-
118	65	F	cecum	large boewl,mucosa		18	-	-
119	57	M	sigmoid	large boewl,mucosa		19	-	-
120	58	M	cecum	large boewl,mucosa		20	-	-
121	56	M	ascending	large boewl,mucosa		21	-	-
122	57	M	sigmoid	large boewl,mucosa		22	-	-
123	56	M	ascending	large boewl,mucosa		23	-	-
124	36	M	transverse	large boewl,mucosa		24	-	-
125	65	F	sigmoid	large boewl,mucosa		25	-	-
126	62	M	ascending	large boewl,mucosa		26	-	-
127	57	F	sigmoid	large boewl,mucosa		27	-	-
128	78	M	sigmoid	large boewl,mucosa		28	-	-
129	45	M	rectum	large boewl,mucosa		29	-	-
130	65	M	ascending	large boewl,mucosa		30	-	-
131	61	M	transverse	large boewl,mucosa		31	-	-
132	52	M	rectum	large boewl,mucosa		32	+	+
133	52	F	sigmoid	large boewl,mucosa		33	-	-
134	47	F	cecum	large boewl,mucosa		34	-	-
135	63	F	descending	large boewl,mucosa		35	-	-
136	53	M	cecum	large boewl,mucosa		36	-	-
137	53	F	transverse	large boewl,mucosa		37	-	-
138	64	M	sigmoid	large boewl,mucosa		38	-	-
139	59	M	sigmoid	large boewl,mucosa		39	-	-
140	57	M	ascending	large boewl,mucosa		40	-	-
141	46	F	ascending	large boewl,mucosa		41	+	+
142	59	M	ascending	large boewl,mucosa		42	-	-
143	35	F	ascending	large boewl,mucosa		43	-	-
144	42	M	transverse	large boewl,mucosa		44	-	-
145	49	F	ascending	large boewl,mucosa		45	-	-
146	76	M	sigmoid	large boewl,mucosa		46	-	-
147	74	M	ascending	large boewl,mucosa		47	-	-
148	60	F	rectum	large boewl,mucosa		48	-	-
149	62	M	sigmoid	large boewl,mucosa		49	-	-
150	62	M	sigmoid	large boewl,mucosa		50	-	-
151	57	M	sigmoid	large boewl,mucosa		51	-	-
152	56	F	sigmoid	large boewl,mucosa		52	-	-
153	75	F	rectum	large boewl,mucosa		53	-	-
154	58	M	rectum	large boewl,mucosa		54	x	x
155	56	M	ascending	large boewl,mucosa		55	-	-
156	35	M	rectum	large boewl,mucosa		56	-	-
157	34	M	ascending	large boewl,mucosa		57	-	-
158	60	M	transverse	large boewl,mucosa		58	-	-
159	70	M	descending	large boewl,mucosa		59	-	-
	carbon					60		

-:negative, +: ppositive, x:no tissue

表 5. 健常大腸組織アレイにおける KM3590 反応性所見一覧

健常大腸組織アレイを用い、健常大腸組織に対する KM3590 の反応性を評価した。

-:negative
 +:5-25% positive or slight positive
 ++:25-50% positive
 +++:>50% positive

	-	+	++	+++
Colon cancer	33/58	15/58	9/58	1/58
Normal colon	58/58	0/58	0/58	0/58

表 6. 大腸癌／健常大腸組織アレイにおける KM3590 反応性

大腸組織に対しての免疫組織染色結果(表 4, 5)をまとめた。KM3590 は癌組織に特異的かつ効率に反応した。

7. 引用文献

1. Iwasaki A., Medzhitov R., Control of adaptive immunity by the innate immune system., *Nat. Immunol.*, **16**, 343–353, 2015
2. Cooper MD., The early history of B cells., *Nat. Rev. Immunol.*, **15**, 191–197, 2015
3. Kaneko E., Niwa R., Optimizing therapeutic antibody function: progress with Fc domain engineering., *BioDrugs*, **25**, 1-11, 2011
4. Ma X., Xu S., TNF inhibitor therapy for rheumatoid arthritis., *Biomed Rep.*, **1**, 177-184, 2013
5. Rossi D., Modena V., Sciascia S. et al., Rheumatoid arthritis: Biological therapy other than anti-TNF. *Int. Immunopharmacol.*, in press, 2015
6. Ferrara N., Hillan KJ., Novotny W., Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **333**, 328-335, 2005.
7. Roopenian DC., Shreeram A., FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age., *Nat. Rev. Immunol.*, **7**, 715-725, 2007
8. Roopenian DC., Christianson GJ., Sproule TJ., et al. The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgGFc-coupled drugs. *J. Immunol.*, **170**, 3528-3533, 2003
9. Zuckier LS., Chang CJ., Scharff MD., et al. Chimeric human-mouse IgG antibodies with shuffled constant region exons demonstrate that multiple domains contribute to in vivo half-life., *Cancer Res.*, **58**, 3905-3908, 1998

10. Hinton PR., Xiong JM., Johlfs MG., et al. An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life., *J. Immunol.*, **176**, 346-356, 2006
11. Dall'Acqua WF., Kiener PA., Wu H., Properties of human IgG1s engineered or enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J. Biol. Chem.*, **281**, 23514-23524, 2006
12. Zalevsky J., Chamberlain AK., Horton HM., et al., Enhanced antibody half-life improves in vivo activity., *Nat. Biotechnol.*, **28**, 157-159, 2010
13. Weng WK., Levy R., Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma., *J. Clin. Oncol.*, **21**, 3940-3947, 2003
14. Anolik JH., Campbell D., Felgar RE., et al., The relationship of Fc γ RIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus., *Arthritis Rheum.*, **48**, 455-459, 2003
15. Musolino A., Naldi N., Bortesi B., et al., Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer., *J. Clin. Oncol.*, **26**, 1789-1796, 2008
16. Kennedy AD., Beum PV., Solga MD., et al., Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia., *J. Immunol.*, **172**, 3280-3288, 2004
17. Treon SP., Mitsiades C., Mitsiades N., et al., Tumor cell expression of CD59 is associated with resistance to CD20 serotherapy in patients with B-cell malignancies., *J. Immunother.*, **24**, 263-271,

2001

18. Coiffier B., Lefebvre S., Pedersen LM., et al., Safety and efficacy of ofatumumab, a fully human monoclonal anti-CD20 antibody, in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: a phase 1–2 study., *Blood*, **111**, 1094-1100, 2008
19. Shopes B., A genetically engineered human IgG mutant with enhanced cytolytic activity., *J. Immunol.*, **148**, 2918-2922, 1992
20. Azuma Y., Ishikawa Y., Kawai S., et al., Recombinant human hexamer-dominant IgM monoclonal antibody to ganglioside GM3 for treatment of melanoma. *Clin. Cancer Res.*, **13**, 2745-2750, 2007
21. Idusogie EE., Wong PY., Presta LG., et al., Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J. Immunol.*, **166**, 2571-5, 2001
22. Idusogie EE., Presta LG., Gazzano-Santoro H., et al., Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J. Immunol.*, **164**, 4178-4184, 2000
23. Natsume A., In M., Takamura H., et al., Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities., *Cancer Res.*, **68**, 3863-3872, 2008
24. Natsume A., Shimizu-Yokoyama Y., Satoh M, et al., Engineered anti-CD20 antibodies with enhanced complement-activating capacity mediate potent anti-lymphoma activity., *Cancer Sci.*, **100**, 2411-2418, 2009
25. Cartron G., Dacheux L., Salles G., et al., Therapeutic activity of humanized anti- CD20

- monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcRIIIa gene., *Blood*, **99**, 754-758, 2002
26. Bibeau F., Lopez-Crapez E., Fiore FD., et al., Impact of FcRIIIa-FcRIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan., *J. Clin. Oncol.*, **27**, 1122-1129, 2009
27. Miescher S., Spycher MO., Amstutz H., et al., A single recombinant anti-RhD IgG prevents RhD immunization: association of RhD-positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the FcγRIIA and FcγRIIIA genes., *Blood*, **103**, 4028-4035, 2004
28. Shields RL., Namenuk AK., Hong K., et al., High resolution mapping of the binding site on Human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR., *J. Biol. Chem.*, **276**, 6591-6604, 2001
29. Lazar GA., Dang W., Karki S., et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**, 4005-4010, 2006
30. Stavenhagen JB., Gorlatov S., Tuailon N., et al., Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fcγ receptors., *Cancer Res.*, **67**, 8882-8890, 2007
31. Hodoniczky J., Zheng YZ., James DC., Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro., *Biotechnol. Prog.*, **21**, 1644-1652, 2005
32. Scallon BJ., Tam SH., McCarthy SG., et al., Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality., *Mol. Immunol.*, **44**, 1524-1534, 2007

33. Shinkawa T., Nakamura K., Yamane N., et al., The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity., *J. Biol. Chem.*, **278**, 3466-3473, 2003
34. Matsumiya S., Yamaguchi Y., Saito J., et al., Structural comparison of fucosylated and nonfucosylated Fc fragments of human immunoglobulin G1., *J. Mol. Biol.*, **368**, 767-779, 2007
35. Ferrara C., Stuart F., Sonderrmann P., et al., The carbohydrate at Fc γ RIIIa Asn-162: an element required for high affinity binding to nonfucosylated IgG glycoforms., *J. Biol. Chem.*, **281**, 5032-5036, 2006
36. Shibata-Koyama M., Iida S., Okazaki A., et al., The N-linked oligosaccharide at Fc γ RIIIa Asn-45: an inhibitory element for high Fc γ RIIIa binding affinity to IgG glycoforms lacking core fucosylation., *Glycobiology*, **19**, 126-134, 2009
37. Mizushima T., Yagi H., Takemoto E., et al., Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans., *Genes Cells*, **16**, 1071–1080, 2011
38. Niwa R., Shoji-Hosaka E., Sakurada M., et al., Defucosylated chimeric anti-CC chemokine receptor 4 IgG1 with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity shows potent therapeutic activity to T-cell leukemia and lymphoma., *Cancer Res.*, **64**, 2127-2133, 2004
39. Niwa R., Sakurada M., Kobayashi Y., et al., Enhanced natural killer cell binding and activation by low-fucose IgG1 antibody results in potent antibodydependent cellular cytotoxicity induction at lower

- antigen density., *Clin. Cancer Res.*, 11, 2327-2336, 2005
40. Niwa R., Hatanaka S., Shoji-Hosaka E., et al., Enhancement of the antibodydependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of Fc γ RIIIa functional polymorphism., *Clin. Cancer Res.*, **10**, 6248-6255, 2004
41. Harada H., Kamei M., Tokumoto Y., et al., Systematic fractionation of oligosaccharides of human immunoglobulin G by serial affinity chromatography on immobilized lectin columns., *Anal. Biochem.*, **164**, 374-381, 1987
42. Mizuochi T., Taniguchi T., Shimizu A., et al., Structural and numerical variations of the carbohydrate moiety of immunoglobulin G., *J. Immunol.*, **129**, 2016-2020, 1982
43. Iida S., Misaka H., Inoue M., et al., Nonfucosylated therapeutic IgG1 antibody can evade the inhibitory effect of serum immunoglobulin G on antibodydependent cellular cytotoxicity through its high binding to Fc γ RIIIa., *Clin. Cancer Res.*, **12**, 2879-2887, 2006
44. Miyoshi E., Noda K., Yamaguchi Y., et al., The α -1-6-fucosyltransferase gene and its biological significance., *Biochem. Biophys. Acta*, **1473**, 9-20, 1999
45. Yamane-Ohnuki N., Kinoshita S., Inoue-Urakubo M., et al., Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity., *Biotechnol. Bioeng.*, **87**, 614-622, 2004
46. Kanda Y., Yamane-Ohnuki N., Sakai N., et al., Comparison of cell lines for stable production of fucose-negative antibodies with enhanced ADCC., *Biotechnol. Bioeng.*, **94**, 680-688, 2006

47. Subramaniam JM., Whiteside G., McKeage K. et al., Mogamulizumab: first global approval., *Drugs*, **72**, 1293-1298, 2012
48. Nowak RM., Parker JM., Silverman RA., et al., A randomized trial of benralizumab, an antiinterleukin 5 receptor α monoclonal antibody, after acute asthma., *Am. J. Emerg. Med.*, **33**, 14-20, 2015
49. Shim H., One target, different effects: a comparison of distinct therapeutic antibodies against the same targets., *Exp. Mol. Med.*, **43**, 539-549, 2011
50. Palumbo A., Anderson K., Multiple Myeloma., *New. Eng. J. Med.*, **364**, 1046-1060, 2011
51. Heffner LT. Jr, Lonial S., Breakthroughs in the management of multiple myeloma., *Drugs*, **63**, 1621-1636, 2003
52. Goldmacher VS., Bourret LA., Levine BA., et al., Anti-CD38-blocked ricin: an immunotoxin for the treatment of multiple myeloma., *Blood*, **84**, 3017-3025, 1994
53. Huang YW., Vitetta ES., Immunotherapy of multiple myeloma., *Stem Cells*, **13**, 123-134, 1995
54. Treon SP., Raje N., Anderson KC., Immunotherapeutic strategies for the treatment of plasma cell malignancies., *Semin. Oncol.*, **27**, 598-613, 2000.
55. Tai YT., Catley LP., Mitsiades CS., et al., Mechanisms by which SGN-40, a humanized anti-CD40 antibody, induces cytotoxicity in human multiple myeloma cells: clinical implications., *Cancer Res.*, **64**, 2846-2852, 2004
56. Kumar S., Kimlinger TK., Lust JA., et al., Expression of CD52 on plasma cells in plasma cell

- proliferative disorders., *Blood*, **102**, 1075-1077, 2003
57. Burton JD., Ely S., Reddy PK. et al., CD74 Is Expressed by multiple myeloma and is a promising target for therapy., *Clin. Cancer Res.*, **10**, 6606-6611, 2004
58. Supiot S., Faivre-Chauvet A., Couturier O., et al., Comparison of the biologic effects of MA5 and B-B4 monoclonal antibody labeled with iodine-131 and bismuth-213 on multiple myeloma., *Cancer*, **94**, 1202-1209, 2002
59. Tsunenari T., Koishihara Y., Nakamura A., et al., New xenograft model of multiple myeloma and efficacy of a humanized antibody against human interleukin-6 receptor, *Blood*, **90**, 2437-2444, 1997
60. Ogawa M., Nishiura T., Oritani K., et al., Cytokines prevent dexamethasone-induced apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in a new multiple myeloma cell line., *Cancer Res.*, **60**, 4262-4269, 2000
61. Body JJ., Facon T., Coleman RE., et al., A study of the biological receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand inhibitor, denosumab, in patients with multiple myeloma or bone metastases from breast cancer., *Clin. Cancer Res.*, **12**, 1221-1228, 2006
62. Goto T., Kennel SJ., Abe M., et al., A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells., *Blood*, **84**, 1922-1930, 1994
63. Ishikawa J., Kaisho T., Tomizawa H., Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth., *Genomics*, **26**, 527-534, 1995

64. Kupzig S., Korolchuk V., Rollason R., et al., Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology., *Traffic*, **4**, 694-709, 2003
65. Ohtomo T., Sugamata Y., Ozaki Y., et al., Molecular cloning and characterization of a surface antigen preferentially overexpressed on multiple myeloma cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **258**, 583-591, 1999
66. Ozaki S., Kosaka M., Wakatsuki S., et al., Immunotherapy of multiple myeloma with a monoclonal antibody directed against a plasma cell—specific antigen, HM1.24., *Blood*, **90**, 3179-3186, 1997
67. Ono K., Ohtomo T., Yoshida K., et al., The humanized anti-HM1.24 antibody effectively kills multiple myeloma cells by human effector cell-mediated cytotoxicity. *Mol. Immunol.*, **36**, 387-395, 1999
68. Ozaki S., Kosaka M., Wakahara Y., et al., Humanized anti-HM1.24 antibody mediates myeloma cell cytotoxicity that is enhanced by cytokine stimulation of effector cells., *Blood*, **93**, 3922-3930, 1999
69. Harada T. Ozaki S., Targeted Therapy for HM1.24 (CD317) on Multiple Myeloma Cells., *BioMed Res. Int.*, **2014**, Article ID 965384
70. Chiriva-Internati M., Liu Y., Weidanz JA., et al., Hermonat Testing recombinant adeno-associated virus-gene loading of dendritic cells for generating potent cytotoxic T lymphocytes against a prototype self-antigen, multiple myeloma HM1.24., *Blood*, **102**, 3100-3107, 2003
71. Ozaki S., Maekawa M., Ohshima T., et al., Cross-linking of HM124 antigen induces

- caspase-independent cell death in myeloma cells., *Blood*, **98**, 642A-642A 2001
72. Walter-Yohrling J., Cao X, Callahan M et al., Identification of Genes Expressed in Malignant Cells That Promote Invasion., *Cancer Res.*, **63**, 8939–8947, 2003
73. Wang W., Nishioka Y., Ozaki S., et al., Chimeric and humanized anti-HM1.24 antibodies mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity against lung cancer cells., *Lung Cancer*, **63**, 23–31, 2009
74. Wang W., Nishioka Y., Ozaki S., et al., HM1.24 (CD317) is a novel target against lung cancer for immunotherapy using anti-HM1.24 antibody., *Cancer Immunol. Immunother.*, **58**, 967–976, 2009
75. Amano J., Masuyama N, Hirota Y., et al., Antigen-dependent internalization is related to rapid elimination from plasma of humanized anti-HM1.24 monoclonal antibody. *Drug Metabol. Deposition*, **38**, 2339-2346, 2010
76. Lin YS., Nguyen C., Mendoza JL., et al., Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **288**, 371–378, 1999
77. Tokuda Y., Watanabe T., Omuro Y. et al., Dose escalation and pharmacokinetic study of a humanized anti-HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer., *Br. J. Cancer*, **81**, 1419–1425, 1999
78. Stockmeyer B., Beyer T., Neuhuber W., et al., Polymorphonuclear granulocytes induce antibody-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *J. Immunol.*, **171**, 5124-5129, 2003
79. Horner H., Frank C., Dechant C., et al., Intimate cell conjugate formation and exchange of

- membrane lipids precede apoptosis induction in target cells during antibody-dependent, granulocyte-mediated cytotoxicity., *J. Immunol.*, **179**, 337-345, 2007
80. Nakamura K., Tanaka Y., Fujino I., et al., Dissection and optimization of immune effector functions of humanized anti-ganglioside GM2 monoclonal antibody., *Mol Immunol* 37: 1035-1046, 2000
81. Hinz, A., Miguet, N., Natrajan, G., et al., Structural basis of HIV-1 tethering to membranes by the BST-2/Tetherin ectodomain., *Cell Host Microbe*, **7**, 314–323, 2010
82. Casella CR., Mitchell TC., Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant., *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 3231-40, 2008.
83. Rollason R., Korolchuk V., Hamilton C., et al., Clathrin-mediated endocytosis of a lipid-raft-associated protein is mediated through a dual tyrosine motif., *J. Cell. Sci.*, **120**, 3850-3858. 2007
84. Masuyama N., Kuronita T., Tanaka R., et al., HM1.24 is internalized from lipid rafts by clathrin-mediated endocytosis through interaction with alpha-adaptin., *J. Biol. Chem.*, **284**, 15927-15941, 2009
85. Tavano, B., Galao, RP., Graham, DR., et al., Ig-like transcript 7, but not bone marrow stromal cell antigen 2 (also known as HM1.24, tetherin, or CD317), modulates plasmacytoid dendritic cell function in primary human blood leukocytes., *J. Immunol.*, **190**, 2622–2630, 2013
86. Sauter D., Contraction of the multifunctional restriction factor tetherin., *Frontiers in Microbiol.*,

5, 163, 2014

87. Endo Y., Sugiyama A., Li S., et al., Regulation of clathrin-mediated endocytosis by p53., *Genes Cells*, **13**, 375–386, 2008
88. Beum PV., Peek EM., Lindorfer MA., et al., Loss of CD20 and bound CD20 antibody from Oopsonized B cells occurs more rapidly because of trogocytosis Mmediated by Fc receptor-expressing effector cells than direct Internalization by the B Cells., *J. Immunol.*, **187**, 3438-3447, 2011
89. Minami T., Kijima T., Kumanogoh A., Overcoming chemoresistance of small-cell lung cancer through stepwise HER2-targeted antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and VEGF-targeted antiangiogenesis., *Sci. Reports*, **3**, 2669, 2013
90. Pellerin A., Otero K., Czerkowicz JM., et al., Anti-BDCA2 monoclonal antibody inhibits plasmacytoid dendritic cell activation through Fc-dependent and Fc-independent mechanisms., *EMBO Mol. Med.*, **7**, 464-476, 2015
91. Tai YT., Horton HM., Kong SY., et al., Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered humanized anti-HM1.24 antibody against multiple myeloma via augmented effector function., *Blood*, **119**, 2074-2082, 2012
92. Ishiguro T., Kawai S., Habu K., et al., A defucosylated anti-CD317 antibody exhibited enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity against primary myeloma cells in the presence of effectors from patients., *Cancer Sci.*, **101**, 2227-2233, 2010
93. Harada T., Ozaki S., Oda A., et al., Combination with a defucosylated Anti-HM1.24 monoclonal

- antibody plus lenalidomide induces marked ADCC against myeloma cells and their progenitors., *PLoS One.*, **8**, e83905, 2013.
94. Shibata-Koyama M., Iida S., Misaka H. et al., Nonfucosylated rituximab potentiates human neutrophil phagocytosis through its high binding for FcγRIIIb and MHC class II expression on the phagocytotic neutrophils., *Exp. Hematol.*, **37**, 309-321, 2009
95. Potter NS., Harding CV., Neutrophils process exogenous bacteria via an alternate class I MHC processing pathway for presentation of peptides to T lymphocytes. *J. Immunol.*, **167**, 2538-2546, 2001
96. Ferris RL., Jaffee EM., Ferrone S., Tumor antigen-targeted, monoclonal antibody-based immunotherapy: clinical response, cellular immunity, and immunoescape., *J. Clin. Oncol.*, **28**, 4390-4399, 2010. Robert L. Ferris, Elizabeth M. Jaffee, and Soldano Ferrone
97. Orian-Rousseau V., Mink S., Mengwasser J., et al., Genes upregulated in a metastasizing human colon carcinoma cell line., *Int. J. Cancer*, **113** , 699-705, 2005
98. Tai YT., Horton HM., Kong SY., et al., Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered humanized anti-HM1.24 antibody against multiple myeloma via augmented effector function., *Blood*, **119**, 2074-2082, 2012
99. Kawai S., Yoshimura Y., Iida S., et al., Antitumor activity of humanized monoclonal antibody against HM1.24 antigen in human myeloma xenograft models., *Oncol. Rep.*, **15**, 361-367, 2006
100. Kamogawa Y., Namiki S., Cho M., et al., Anti-BST2 antibody., US Patent 8529896 (16, October, 2008)

101. Rollason R., Korolchuk V., Hamilton C., et al., Clathrin-mediated endocytosis of a lipid-raft-associated protein is mediated through a dual tyrosine motif., *J. Cell Sci.*, **120**, 3850-3858, 2007
102. Staudinger M, Glorius P., Burger R., et al., The novel immunotoxin HM1.24-ETA' induces apoptosis in multiple myeloma cells., *Blood Cancer J.*, **4**, e219, 2014

8. 謝辞

本研究を実施するにあたり、ご指導・ご協力を頂きました津本浩平教授(東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻疾患蛋白質工学分野)、佐藤光男博士、中村和靖博士、太田聡博士、榊田和宏博士、前田宣丈博士、大木祐二氏、古谷安希子氏、土岐浩恵氏、椎名さかの氏、夏目由香里氏、見坂博文氏、竹内京子氏(以上、協和発酵キリン社)に御礼申し上げます。