

論文の内容の要旨

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

[背景]

抗体医薬品の作用機序には標的分子の機能阻害と、抗体特有のエフェクター機構（補体依存性傷害活性、抗体依存性細胞傷害（antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC）活性）による標的細胞の傷害が知られているが、その中でADCC活性は重要な活性とされている。既往の研究により、ヒト抗体IgG1の定常領域に存在するN結合型糖鎖からコアフコースを除去（デフコース化）することにより飛躍的に抗体のADCC活性が向上することが見出されており、この技術はADCC活性を主たる薬効メカニズムとする抗体医薬品に応用できると考えられる。

その中で応用する対象の一つとして見出されたのがHM1.24を認識する抗体である。この標的分子は2型膜貫通糖タンパク質であり、N末に膜貫通領域、C末にGPIアンカーを有し、ジスルフィド結合によりホモダイマーを形成することが知られている。形質細胞腫と骨髄腫を含むリンパ球系腫瘍に高効率に発現する一方、正常組織での発現レベルはきわめて低い。

抗HM1.24抗体はADCC活性により多発性骨髄腫（MM）細胞を傷害することが確認されており、過去に多発性骨髄腫を対象とした抗HM1.24ヒト化抗体AHMの第1相臨床試験も実施されている。重篤な副作用は認められなかった一方で、有効性については2例の部分寛解が確認されたのみに留まり、期待された薬効を得ることはできず、臨床開発は中止されている。一方、近年の報告では、HM1.24が固形癌においても発現していることが報告されていることから、HM1.24の癌治療の標的分子としての可能性は今なお高いと考えられており、抗HM1.24抗体の臨床開発研究を加速することが求められてきた。

[目的]

抗HM1.24ヒト化抗体AHMの臨床開発が失敗した原因として、抗HM1.24抗体の特徴である速やかな細胞内への内在化が考えられた。実際にカニクイザルへの投与試験やMM細胞を用いて検討したところ、速やかにAHMが内在化し、循環血中から除去される可能性が強く示唆された。抗HM1.24抗体が主たる薬効メカニズムとするADCC活性を発揮するには抗原-抗体反応が細胞表面上で起こることが必要であるため、内在化されることによりADCC活性が発揮されにくい状況になることが想定される。そこで、本研究では、内在化が遅いあるいは内在化されない抗体を新たに樹立することに加え、エフェクター活性を増強することにより、抗腫瘍活性の高い抗体の創製を目指した。

[結果]

初めに、哺乳動物細胞及び大腸菌を用い、HM1.24細胞外領域を有する可溶性HM1.24抗原を調製、これを免疫原として動物に免疫し、HM1.24特異的抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。樹立したハイブリドーマが産生する抗体について結合活性を評価したところ、比較的結合活性が高いKM3590（ラットIgG2a）、KM3591（ラットIgG2b）、KM3594（ラットIgG2a）、KM3610（マウスIgG2a）という4つの抗HM1.24抗体クローンを見出した。

これらのモノクローナル抗体について更なる評価を実施するため、定常領域配列をヒトIgG1に置換するキメラ化を行い、これらをフコース転移酵素Fut8欠損CHO細胞株で発現させ、デフコース化したキメラ抗体cKM3590、cKM3591、cKM3594、cKM3610を得た。これらのキメラ抗体及びヒト化抗体AHMを用いて、ヒトMM細胞株に対する内在化の活性評価を実施したところ、AHM及びcKM3591では同程度の高い内在化活性を確認する一方、cKM3590、cKM3594では内在化が抑えられていることを見出した。cKM3610については緩やかに内在化されるが、それが長時間維持されるといった特徴的な挙動を確認した。

このように異なる内在化挙動を示す抗体が、どのようなADCC活性を示すのかを明らかにするため、デフコース型cKM3590、cKM3591、cKM3594、cKM3610、AHMのMM細胞株に対するADCC活性を評価した。その結果、各デフコース型抗体は一律にADCC活性を発揮し、中でも内在化活性の低いcKM3590が最も高いADCC活性を示していた。cKM3590同様に内在化活性が抑えられていたcKM3594についてはAHMと同程度のADCC活性であった。cKM3594は比較的抗原結合活性が低めであったことから、ADCC活性への寄与としては内在化活性だけでなく、結合活性も重要な因子である可能性が示唆された。

また、cKM3590については、野生型CHO株を用いてフコースを含む通常型抗体も作製し、ADCC活性を評価したところ、ほとんどADCC活性が認められないことが明らかになった。HM1.24抗原は分子自身が高い内在化の性質を有していることが報告されており、その性質に依存して内在化傾向を示す抗体では、ADCC活性が非常に発揮されにくく、それ故デフコース化などのADCC活性増強が重要である可能性が強く示唆された。

また、各抗体の特徴を調べる評価の一環として、cKM3590、cKM3594、cKM3610、AHMについてアポトーシス誘導活性があるか検討した。興味深いことに、高い内在化活性を示すAHMについてはアポトーシス誘導活性が観察されたのに対し、内在化が抑制されていたcKM3590、cKM3594についてはアポトーシス誘導活性がないことが確認された。またAHM同様に内在化活性の高いcKM3591の基となる抗体であるKM3591がアポトーシス誘導活性を有することが確認されており、内在化に特徴のあるcKM3610についても弱いながらもアポトーシス誘導活性が認められた。これまでに内在化関連因子とアポトーシス関連因子の関係性は多く報告されていないが、本研究の結果から、この二つの現象の間に関連性があることが推測された。

以上のように、有望なMM治療薬としてデフコース型cKM3590の取得に成功した。一方で、固形癌におけるHM1.24の発現に関する近年の報告から、抗HM1.24抗体については固形癌治療薬としての応用の可能性が期待される。そこで、HM1.24がどのような癌腫において有効であるかを探るため、ヒト大腸癌、肺癌、膵癌細胞株における遺伝子発現解析を実施した。RT-PCR及びフローサイトメトリーを用いて検証したところ、いずれの癌腫についても複数の癌細胞株においてHM1.24の発現を確認することができた。特に大腸癌細胞株については最も高率に発現が認められた。加えて、健常大腸組織及び大腸癌組織アレイを用いた免疫組織染色の結果から、大腸癌組織において特異的にかつ高率に発現していることが確認された。以上から、抗HM1.24抗体が大腸癌治療薬として候補となりうる可能性が示唆された。

フローサイトメトリーを用いて抗HM1.24抗体の固形癌細胞株に対する反応性を評価したところ、cKM3590はAHMに比べ高い結合活性を示していた。MM細胞株やHM1.24強制発現細胞株に対しては、cKM3590はAHMと同程度もしくはわずかに高い反応性を示したことから、cKM3590は固形癌細胞株上に発現したHM1.24に対して選択的に高い親和性を示し、AHMとは異なる特徴的なエピトープを認識することが示唆された。そこで、HM1.24の発現が確認できたヒト大腸癌細胞株HT-29、ヒト肺癌細胞株SBC-5、ヒト膵癌細胞株PSN-1に対するADCC活性を評価したところ、デフコース型cKM3590は各種固形癌細胞株に対してADCC活性を発揮することが確認された。その作用はデフコース型AHMよりも有意に高く、cKM3590の高い癌細胞反応性と低い内在化活性の両者を反映していると予想された。尚、この場合においても、通常型cKM3590はデフコース型cKM3590とは異なり、ADCC活性が認められない、あるいは非常に弱いことが明らかとなり、固形癌治療を想定した状況においても、デフコース化は有効な手段であると推察された。

最後に、cKM3590の大腸癌治療薬としての能力を評価するため、HT-29ゼノグラフトモデルを用いた抗腫瘍試験を実施した。デフコース型cKM3590を細胞移植当日より4日間隔で6連投したところ、Saline投与群と比較し、有意に腫瘍増殖を抑制することを確認した。この腫瘍増殖抑制効果はデフコース型AHMよりも高い傾向が認められた。この結果は、これまでに実施した*in vitro*評価系において確認されていた強力な活性を反映しているものと考えられ、cKM3590の大腸癌治療薬としての応用できる可能性が示唆された。

[結論]

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抗体cKM3590が、当該抗体の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大腸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。