

論文の内容の要旨

論文題目 新規癌抗原に対するモノクローナル抗体の作製と解析

氏名 作本 裕史

【研究の背景】

本邦において、2004年における死亡数を死亡原因順位別に見ると、第一位は癌（悪性新生物）であり、32万315人、全死亡者に占める割合は31.1%となっており、全死亡者のおよそ3人に1人は癌で死亡したことになる。その中でも肺癌は、癌死のうち部位別では男性では第1位（年間4万3910人が死亡）、女性において第3位（年間1万6000人が死亡）で、その予後が最も悪い癌の一つであり、肺腺癌は肺癌全体の約半数を占める。従って、その肺腺癌に対する新規治療法が強く望まれている状況である。

【研究の目的】

本研究の目的は、エクソンアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析によって、肺腺癌の新規抗体医薬標的分子を同定しその分子を標的とした抗体医薬による肺腺癌治療の可能性を示すことである。

【方法と結果】

Human Exon 1.0 ST Array（「エクソンアレイ」）を用いた肺腺癌に対する抗体医薬標的分子の同定

エクソンアレイを用いたデータマイニングによって、肺腺癌に対する抗体医薬の標的分子探索を行った。データマイニングに使用したデータセットは、5例の肺腺癌臨床検体、及び骨髓、末梢血、心臓、腎臓、肺、脾臓、肝臓の7種類の正常組織のエクソンアレイのデータである。本データセットから、肺腺癌臨床検体での発現値が高く、正常組織での発現値の低いプローブセット抽出を行い、膜蛋白質であるTMP-02（Trans-Membrane Protein-02）を抗体医薬標的分子として選出した。

TMP-02 発現解析

エクソンアレイデータからTMP-02高発現癌細胞株と低発現癌細胞株とを選び出し、また、TMP-02高発現臨床癌症例と低発現臨床癌症例とを選び出し（肺腺癌、卵巣癌）、蛋白質抽出後、抗TMP-02抗体によるウエスタン解析を実施した。結果、TMP-02高発現癌細胞株、及びTMP-02高発現臨床癌症例においてTMP-02蛋白質を検出した。

細胞膜表面上のTMP-02を認識するモノクローナル抗体の作製

癌細胞膜表面上のTMP-02を認識するモノクローナル抗体は、腫瘍へのターゲティングの観点から、有効な抗腫瘍剤となり得ることが期待されたので、モノクローナル抗体の作

製を実施した。DNA 免疫と強制発現細胞免疫を行ったマウスからハイブリドーマを作製し、TMP-02 強制発現細胞株を用いたフローサイトメトリーによって細胞膜表面上の TMP-02 に結合するモノクローナル抗体のスクリーニングを行った。結果、全部で 18 種類の抗 TMP-02 モノクローナル抗体を作製することに成功した。また、TMP-02 陽性癌細胞株を用いたフローサイトメトリー解析から、これら 18 種類の抗体は、内在性の TMP-02 を認識することが明らかとなった。

他のファミリー分子への交差性評価

上述の 18 種類の抗 TMP-02 モノクローナル抗体の他のファミリー分子に対する結合活性について、強制発現細胞株を作製しフローサイトメトリーによって調べた。結果、AE3-20 抗体が TMP-02 特異的であることが明らかとなった。他の 17 種類の抗体は、何れも他のファミリー分子に結合した。

in vitro 抗腫瘍活性の測定

作製した抗 TMP-02 抗体の *in vitro* ADCC 活性を ^{51}Cr 法によって調べた。結果、AB3-1、AE1-16、AE49-11、AE3-20 抗体は、TMP-02 発現肺腺癌細胞株である ABC-1 および 胃癌細胞株 AGS に対し、*in vitro* ADCC 活性を示した。

また、作製した抗 TMP-02 抗体のイムノトキシンとしての可能性について評価するために、ヤギ抗マウス IgG サポリン標識体である Mab-ZAP と抗体との共存下における癌細胞株に対する増殖抑制効果について調べた。結果、AE1-16、AE49-11 抗体は、ABC-1、AGS の増殖を抑制した。

【結論】

本研究において達成したことは、(1) 臨床肺腺癌、臨床卵巣癌において TMP-02 蛋白質が発現亢進していることを初めて明らかにしたこと、(2) 細胞膜表面上の TMP-02 を認識し、且つ ADCC 活性を有するモノクローナル抗体を初めて作出したことである。

今後の本研究の課題としては、(1) 免疫組織染色を行い、TMP-02 が臨床腫瘍組織のどこで発現しているのか、明らかにすること (2) *in vivo xenograft* 試験を実施し、作製した抗体の *in vivo* 抗腫瘍効果について調べることである。

以上、本研究によって、TMP-02 を標的とした抗 TMP-02 モノクローナル抗体による、肺腺癌、卵巣癌、および胃癌等、TMP-02 陽性癌治療の可能性を示すことに成功した。

以上