

## 審査の結果の要旨

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

癌は、本邦における死亡原因第一位の疾患であり、年間約 32 万が癌で死亡し、全死亡者のおよそ 1/3 を占める。中でも肺癌は、癌の部位別では男性で第 1 位、女性で第 3 位となっており、予後が最も悪い癌の一つである。肺癌は、大別して、小細胞癌、非小細胞肺癌に分けられる。病理学的には、非小細胞肺癌はさらに、扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌などに分類される。肺癌の約半数を占める腺癌は、小細胞癌に比べやや予後が良好である一方、有効な化学療法や放射線治療が少なく、肺腺癌に対する新規治療法が強く望まれている。

本研究では、肺腺癌における抗体医薬の標的分子を同定し、肺腺癌に対する抗腫瘍剤としての抗体を開発することが目的とされた。

2001 年にドラフトシーケンスが明らかにされたヒトのゲノム情報は、未知の遺伝子の予測を可能にただけでなく、多くの遺伝子が一つの遺伝子から複数の転写産物を産生している可能性を示した。例えば、臓器によってスプライシングの違う転写産物を産生することが報告され、エクソンレベルでの発現量の評価が必要となっている。

Affymetrix 社は、スプライシングバリエントを検出するために、エクソンごとにプローブを設計した GeneChip Human Exon 1.0 ST Array (「エクソンアレイ」)を開発した。このマイクロアレイは、既知の遺伝子の全エクソンに加えて、dbEST に登録されている全ての EST や、GENE SCAN による予測遺伝子の全てのエクソンに対してプローブが設計されたものである。このマイクロアレイを用いてエクソンごとの発現量を評価することで、スプライシングバリエントの検出が可能となる。

本研究では、まず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、抗体医薬のターゲット候補分子が同定された。エクソンアレイを用いた遺伝子発現解析は、癌特異的な転写産物が同定されることが期待された。また、複数のエクソンの発現量が評価できることより、データの安定性が向上することが期待された。

データマイニングに使用されたデータセットは、5 例の肺腺癌臨床検体、及び骨髄、末梢血、心臓、腎臓、肺、膵臓、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の抽出が行われ、膜タンパク質である Claudin-6 (CLDN6) が抗体医薬標的分子として選出された。

CLDN6 は、抗体医薬の標的分子としての報告は無かった。また、本解析で抽出されたプローブセット（プローブセット ID：3677351）の発現値は、胎児肺を除くと、全ての成体正常組織では極めて低かった。

上皮細胞シートには、タイトジャンクションと呼ばれる細胞接着装置が存在し、細胞間隙における物質の拡散を防ぐ役割を果たしている。CLDN6 は、タイトジャンクションを構成する Claudin ファミリーに属する、分子量約 23 kDa の 4 回膜貫通タンパク質である。

エクソンアレイデータから CLDN6 高発現癌細胞株と低発現癌細胞株とが選出され、また、CLDN6 高発現臨床癌症例と低発現臨床癌症例が選出され（肺腺癌、卵巣癌）、タンパク質抽出後、CLDN6 の細胞内をエピトープとするポリクローナル抗体によるウェスタン解析が実施された。結果、CLDN6 高発現癌細胞株および CLDN6 高発現臨床癌症例において CLDN6 タンパク質が検出された。

複数回膜貫通タンパク質の多くは、そのネイティブな立体構造を認識する抗体を作製することは難しいとされるが、ネイティブな状態の CLDN6 を検出できる抗体を作製することは、癌細胞における CLDN6 の機能を解析するだけでなく、治療薬へと応用する上で重要である。そのような抗体作製の報告は無いことから、細胞膜表面上のネイティブな状態の CLDN6 を認識するモノクローナル抗体の作製が行われた。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が作製され、CLDN6 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、モノクローナル抗体のスクリーニングが実施された。結果、全部で 18 種類の抗 CLDN6 モノクローナル抗体の作製に成功した。また、CLDN6 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 CLDN6 を認識することが明らかとなった。

作製した抗 CLDN6 抗体の *in vitro* 抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）活性がクロム放出法によって調べられた。結果、AB3-1、AE1-16、AE49-11、AE3-20 抗体は、CLDN6 陽性肺腺癌細胞株である ABC-1 および 胃癌細胞株 AGS に対し、ADCC 活性を示した。

また、作製した抗 CLDN6 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試験が実施された。結果、AE1-16、AE49-11 抗体は、ABC-1、AGS の増殖を抑制した。

以上、抗腫瘍剤としての活性をもつ抗 CLDN6 抗体が選出された。抗体の非特異的な結合は抗腫瘍剤としての薬効を下げるだけでなく、副作用も引き起こすことが懸念される。そこで、ADCC 活性の高い 4 種類の抗体（AE3-20、AE1-16、AE49-11、AB3-1）について、他の CLDN ファミリータンパク質の中でも特に CLDN6 と相同性の高い CLDN1、CLDN3、CLDN4 および CLDN9 との交差反応が評価された。

結果、AE3-20 抗体が CLDN6 特異的であることが明らかとなった。他の 3 つの抗体は、何れも CLDN9 分子に結合した。

CLDN9 は CLDN6 と高い相同性を持ち、特に細胞外領域での相同性が高い。そこで、

AE3-20のエピトープは、CLDN6の中でもCLDN9とアミノ酸が異なる領域にエピトープがあると推測され、その領域に対する変異体が作製され、交差性が調べられた。CLDN6の156番目のアミノ酸がグルタミンであるのに対し、対応したCLDN9のアミノ酸はロイシンであった。CLDN6の156番目のグルタミンをロイシンに変えた変異体を作製し、CLDN9を模倣したところ、AE3-20の結合活性は大きく低下した。一方で、CLDN6を模倣したCLDN9のL156Q変異体に対して、AE3-20は高い結合を示した。これらの結果は、AE3-20のエピトープは156番目のアミノ酸の付近にあり、156番目のアミノ酸が結合に重要な役割を果たしていることが示された。

本研究において達成されたことは、(1) 臨床肺腺癌、臨床卵巣癌においてCLDN6タンパク質が発現亢進していることが初めて明らかにされたこと、(2) 細胞膜表面上のCLDN6を認識し、かつADCC活性を有するモノクローナル抗体が初めて作製されたことである。以上本研究において、抗CLDN6抗体の肺腺癌や卵巣癌に対する抗腫瘍剤としての可能性が示された。

本内容は、7月31日に口頭発表および質疑応答が行われ、審査員一同は本研究が博士論文として十分独創的であると判断した。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。