

論文の内容の要旨

論文題目：抗腫瘍アプローチとしての特異的薬物複合体の有用性の検証、
およびオレキシン 2 受容体に対する特異的薬物複合体の探索

氏名：岸田将人

抗体やキナーゼ阻害剤に代表される分子標的薬の登場によって、抗癌剤の有効性と安全性は急速に向上しつつある。一方で、分子標的薬でも薬剤耐性の発生や有効性が限られる等の課題が散見される。抗体のような標的志向性を持ちながら標的腫瘍細胞での殺細胞効果を発揮する ADC (antibody-drug conjugate: 特異的薬物複合体) もしくは immunotoxin と呼ばれるアプローチが 1980 年頃から研究され、近年では注目度が高まっている。特にこの 10 年程度で技術の成熟化が進んだと見られており、実際に上市段階に至ったり、proof of concept を達する ADC が増加している。しかし、その有用性など臨床的アウトカムについて検証した研究は数少ない。

ADC/immunotoxin のターゲットとしては受容体が重要であるが、本研究ではオレキシン 2 受容体 (OX2R) に着目した。ターゲット探索の第一段階として、正常細胞では脳内のみで特異的に発現する受容体を候補とした。ADC/immunotoxin は結合分子のため、一般的に分子量は大きくなり、理論的には血液脳関門を透過しない可能性が高い。実験による確認が必要であるが、設計した医薬品は脳内の正常細胞には作用せず、体幹部の腫瘍の特異的な治療薬となる可能性がある。このような受容体の中から、腫瘍との関連を示唆する報告がある受容体を複数絞り込んだ。OX2R はこの中でも発現解析自体が探索的なテーマであり、発現解析と創薬ターゲットとしての研究の両面で意義があると考えられたため、研究対象として選択した。

本研究では、第一に成熟期を迎えつつある ADC/immunotoxin の臨床的有用性や進歩を実証研究で明らかにする。臨床試験各フェーズの成功確率を算定し、それを他の抗癌剤クラス、具体的には抗癌剤全体、抗体、新規作用機序等と比較することで ADC/immunotoxin の意義や臨床的な有用性を探る。

第二に、このアプローチを新たな特異的分子標的薬に活用するため、腫瘍特異的な受容体の発現や局在等の解析を OX2R に注目して確認した。加えて、この受容体を標的とした分子標的薬 (Orexin-saporin) を用いて、その腫瘍細胞における殺細胞作用等を検証した。

特異的薬物複合体((ADC: antibody-drug conjugate)/immunotoxin)の臨床的有用性の検証

本研究では 2000 年以前に開発が始まったものを「第 1 世代」と定義し、技術的に急速な進歩があると見られる最近の開発事例 (2001 年以降に P1 を開始したものを「第 2 世代」とし、世代間の技術進歩を臨床試験の成功確率から検証した。第 2 世代および第 1 世代の ADC/immunotoxin の成功確率で統計的な有意差が見られるのは、proof of concept study に相当する Phase2 である。第 2 世代は 67% であるのに対して、第 1 世代は 11% であった。ターゲットの絞り込みやリンカー等の改善によって、適

切に薬効を発揮する狙いが実証されつつあることを示している。加えて、同データを抗癌剤全体および従来の抗癌剤、抗体、既存作用機序、革新的作用機序（いずれも抗癌剤として開発されたもののみを対象とする）といったサブクラスと比較した。第2世代 ADC/immunotoxin は各臨床段階において抗癌剤全体の成功確率を上回った。Phase2 の成功確率 67%は、抗体の 57%および革新的作用機序の 36%を上回った。

Between-phase Success Rates	P1	P2	P3	NDA
第一世代Immunotoxin/ADC	81% (n=21)	11% (n=18)	67% (n=3)	100% (n=2)
第二世代Immunotoxin/ADC	71% (n=17)	67% (n=9)	100% (n=1)	100% (n=1)
抗癌剤全体	68% (n=219)	47% (n=142)	65% (n=41)	87% (n=12)
従来の抗癌剤(cytotoxic)	66% (n=104)	37% (n=92)	61% (n=36)	93% (n=12)
抗体(生物製剤)	74% (n=82)	57% (n=40)	67% (n=12)	100% (n=4)
既存作用機序(best in class)	70% (n=68)	64% (n=52)	60% (n=10)	- (n=2)
革新的作用機序(first in class)	69% (n=178)	36% (n=90)	53% (n=32)	89% (n=16)

表 1. 抗癌剤サブクラス間での成功確率の比較

OX2R の腫瘍発現解析および同ターゲットに対する ADC/immunotoxin の検証

本研究では、脳腫瘍から子宮頸部腫瘍まで 36 細胞株を用いて mRNA およびタンパク質の発現解析を行った。

36 種の細胞株中、頭頸部扁平上皮癌 (YCUM862), 多型性神経膠芽腫 (SF295), 胆嚢癌 (TGBC2) から 3 株で OX2R mRNA およびタンパク質の発現を確認した (図 1)。いずれも、正常細胞では発現の見られないとされる部位である。RT-PCR 産物を用いたシークエンスの確認では 98%の相同性が認められ、その発現は十分に示唆された。

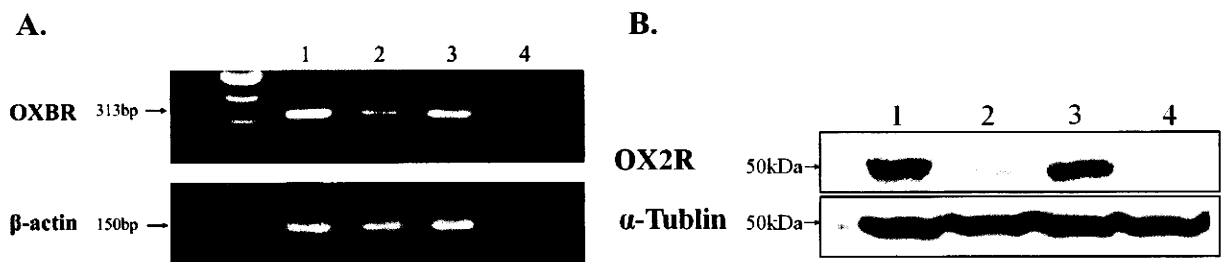


図 1. OX2R の mRNA およびタンパク質発現解析

- A. RT-PCR による mRNA 発現解析: 3 種の細胞株 (Lane1: TGBC2, lane2: SF295, lane3: YCUM862, lane4: 逆転写を行わない TGBC2 mRNA) から抽出したトータル RNA を逆転写し、cDNA を作成し、RT-PCR を実施した。
- B. Western Blot によるタンパク質発現解析 (Lane1: TGBC2, lane2: SF295, lane3: YCUM862, lane4: OE19)。OE19 は mRNA 解析で発現が見られなかった陰性コントロール。

加えて、市販の組織検体を用いて、221 の臨床サンプルで免疫染色を実施した。免疫染色の結果、221 サンプル中 70 サンプル (31.7%) で特異的な染色が観察された。染色像からは、OX2R が所在すべき細胞膜上での発現がみられた。癌腫別では胃、唾液腺、喉頭等での発現頻度が高かった。癌腫別では胃、唾液腺、喉頭等での発現頻度が高かった。正常組織では、9 サンプル中 1 サンプルで中程度の発現を確認した (11.1%)。

Organ	Number of patients	Staining Intensity			Percentage of positive
		-	+	++/+++	
Liver	80	71	7	2	11%
Stomach	34	16	17	1	53%
Colon	20	13	7	0	35%
Salivary gland	15	8	6	1	47%
Larynx	15	7	7	1	53%
Rectum	9	6	2	1	33%
Lung	9	8	1	0	11%
Esophagus	6	6	0	0	0%
Small intestine	6	0	5	1	100%
Nasopharynx	6	4	2	0	33%
Pancreas	6	3	3	0	50%
Gallbladder	5	2	3	0	60%
Tongue	2	2	0	0	0%
Maxilla	2	0	1	1	100%
Bile duct	2	2	0	0	0%
Mandible	1	0	1	0	100%
Lower lip	1	1	0	0	0%
Tonsil	1	1	0	0	0%
Anus	1	1	0	0	0%
Total	221	151	62	8	

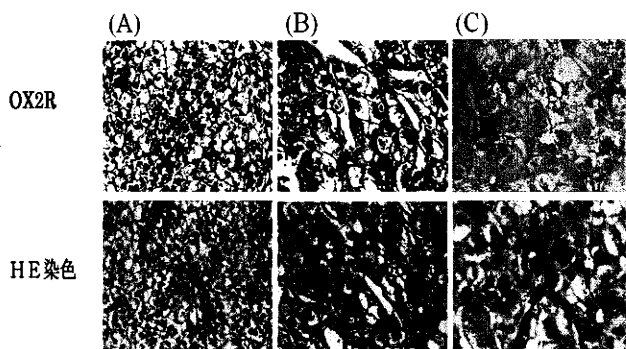


図 2. OX2R の免疫染色

表 2. 221 検体の部位および発現強度の分布

組織アレイは、hematoxylin & eosin (HE)染色もしくは、抗 OX2R ポリクロー抗体に対応したアルカリホスファターゼ(AP)のいずれかで染色した。(A)肝細胞がんである Folio ARY-HH0075 C6 (200 倍) (B) Folio ARY-HH0075 G3 の拡大像 (400 倍)。細胞膜における発現が観察される (C) 染色の見られない ARY-HH0075 (400 倍)

発現解析の結果から、一部の腫瘍では OX2R を高発現する可能性が示唆された。このため、OX2R に対して ADC/immunotoxin の手法を活用すべく、OX2R を標的とした分子標的薬を入手し、腫瘍での殺細胞効果を検討した。具体的には、OX2R のリガンドである OrexinB とたんぱく質性毒素の Saporin を化学結合した、Orexin-Saporin を購入した。Orexin-Saporin は、SF295 等の OX2R 陽性細胞株において用量依存的な殺細胞作用を発揮したものの、Saporin 単独との効果の差を示すまでには至らなかった。したがって、本結果から Orexin-Saporin が OX2R 発現がん細胞株における特異的殺細胞作用を有するとは言いがたい。

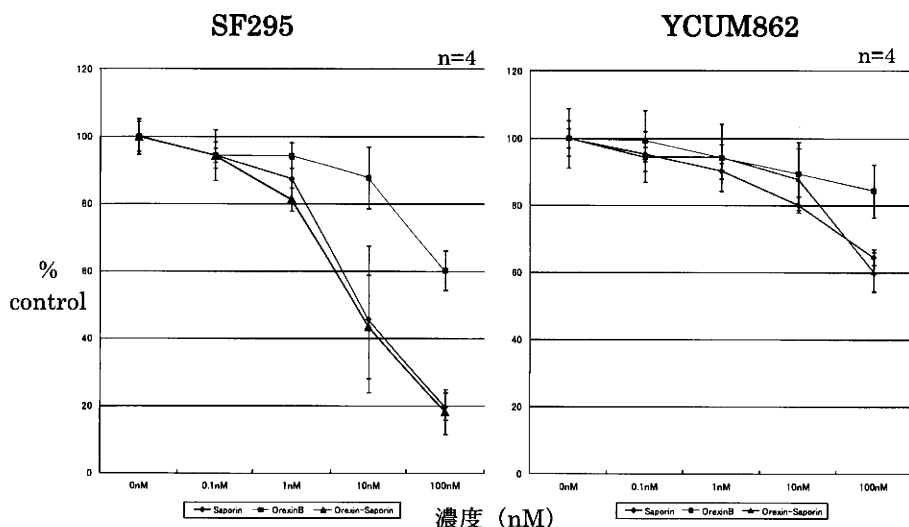


図 3. Orexin-Saporin による抗腫瘍効果の検証

OX2R 受容体発現が示唆された細胞株に対して、Orexin-Saporin と OrexinB (Orexin-Saporin のリガンド部位) および Saporin を比較した抗腫瘍効果を、WST-1 を用いて細胞数の変化によって観察した。

考察、結論

本研究はこれまで概念的、もしくは個別薬剤の比較として語られるに留まっていた ADC/immunotoxin の薬剤クラスとしての有用性を定量的に示した初めての研究である。ADC/immunotoxin のアプローチが抗癌剤のサブクラスとしての地位を確立しつつあることは、第2世代の ADC/immunotoxin の成功確率を第一世代や他の医薬品と比較することで明らかとなった。この技術進歩はリンカーの改善など化学修飾技術等に長けるベンチャー企業のノウハウに依る部分が多い。公知とならない情報が多いため、共同研究の実施が望ましい。研究の課題は、ADC/immunotoxin の分析母集団数が限られている点である。統計的有意差を各段階で示すためには、事例が増加した段階で再分析する必要がある。また、統計解析手法に一定の限界がある点にも留意したい。また将来的には、適応疾患別や臨床試験の中止の原因別の層別解析も、有益な示唆を得るための方策となる。

OX2R の発現解析では、3種の癌細胞株で OX2R の mRNA およびタンパク質の発現を確認した。また、臨床検体では胃、唾液腺、喉頭等の腫瘍においては高発現が示唆されており、新たな治療標的として注目される可能性はある。しかし、免疫染色の結果の解釈には一定の限界があるため、更なる検証が望ましい。正常細胞の発現解析も、今後本格的に行う必要がある。Orexin-Saporin は Saporin 単独と比較した明確な特異的抗腫瘍効果を示せなかった。同分子は第一世代にあたる古典的な手法で合成したものであり、OrexinB と結合する毒物の変更やリンカーの改善等の工夫が必要である。最新の知見を活かして特異的薬物複合体を再設計・創出すれば、OX2R も今後は重要なターゲットとして注目される可能性もある。

以上