

論文内容の要旨

論文題目 : Studies on neutralizing anti-heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) antibodies for drug development of cancer treatment

(抗へパリン結合性上皮成長因子 (HB-EGF) 中和抗体による抗癌治療薬に関する研究)

氏名 : 佐藤 秀司

高齢化や生活習慣の変化に伴い癌の発生率は上昇しており、新たな治療法の開発が望まれている。進行性、転移性癌においては抗癌剤が広く用いられてきたが、癌細胞は画一的な細胞集団ではなく、発生組織だけではなく癌細胞を取り巻く微小環境によって異なる性質を獲得するため、従来の化学療法を主体とした治療法では効果が不十分で副作用も無視できないという問題があった。標的とする癌細胞の特定と分子標的を基礎にした抗癌剤として、近年、抗体医薬が注目されている。本研究では、へパリン結合性上皮成長因子 (HB-EGF) を標的とした抗癌剤の開発を目的とし、HB-EGF の機能に対する活性を測定することで抗 HB-EGF 抗体の医薬品としての可能性を検証すると同時に、これまで不明瞭であった細胞膜結合型 proHB-EGF の癌細胞における機能を見出した。HB-EGF は上皮成長因子受容体である EGFR のリガンドとして機能し、細胞の増殖・生存を誘導する分子である。HB-EGF は、卵巣癌、胃癌、膀胱癌、膵臓癌、乳癌、肺癌、神経芽腫を含む多種の癌組織において発現亢進していることが報告され、癌組織における発現と癌患者の予後不良に相関が見られることが知られている。

本論文は三章より構成され、第一章では HB-EGF に対する中和抗体の作出と、それらの性状解析、第二章では上市された医薬品と比較することにより抗 HB-EGF 中和抗体 Y-142 の癌治療への可能性検証、第三章では作出した抗体を用いた proHB-EGF の癌細胞における機能解析を行なった。

第一章 : Characterization of a variety of neutralizing anti-HB-EGF monoclonal antibodies by different immunization methods

(複数の免疫法を用いて取得した多様性を有した抗 HB-EGF 中和抗体の性状解析)

HB-EGF は細胞増殖活性を有し、特定の癌細胞において発現の亢進が見られることから、抗癌剤の標的分子としての可能性が示唆されてきた。しかし、これまで HB-EGF 中和抗体作製の成功例は少なく、成功したとする報告例においても十分な癌細胞増殖を抑制する活性を有しているとは言い難い。

本章では、中和活性を有する抗 HB-EGF 抗体の作出を目的とした。抗体作製の困難さを考慮し、異なる遺伝的背景を有するマウスと、複数の免疫原を用い、ハイブリドーマ法による抗体の作製に挑戦した。ハイブリドーマの産生には電気融合法を用いた。抗体産生ハイブリドーマの選択には fluorometric microvolume assay technology を用いた。

用いたマウス種のうち、主に BALB/c、CD1 マウスより抗 HB-EGF 中和抗体が得られ、合計 146 種の中和抗体を機能評価に用いた。これらの抗体は可溶性 HB-EGF (sHB-EGF) に対する競合的結合性により 7 種のエピトープビンに分類された。得られた中和抗体は、sHB-EGF に対する中和活性、ヒト sHB-EGF に対する結合性、マウス/ラット sHB-EGF に対する交差結合性、及び細胞膜結合型 HB-EGF (proHB-EGF) に対する結合活性のいずれにおいても、エピトープビン毎に特徴的な活性を示していた。中和抗体の産生効率、及びエピトープビンの割合はマウス種、免疫原種によって著しく異なることも示された。

本章において多様性を有した抗 HB-EGF 抗体が作製され、マウス種、免疫原種の違いが、個々の抗体の活性に強く影響することが示された。本知見は HB-EGF のみならず他の標的分子に対する機能性抗体の取得時にも有用な情報となり得る。また、取得した抗体の中には強い中和活性を有する抗体も含まれていた。

第二章： An anti-HB-EGF monoclonal antibody inhibits cancer cell proliferation and multiple angiogenic activities of HB-EGF: a potential anti-cancer therapeutic agent

(抗 HB-EGF モノクローナル抗体による HB-EGF 誘導性癌細胞増殖・血管誘導の阻害)

本章では、第一章において作製した抗 HB-EGF 中和抗体のうち、HB-EGF に対して強い中和活性を示した Y-142 の癌細胞の増殖および血管新生に対する中和活性を測定し、抗癌抗体としての可能性を検証した。

Y-142 の EGFR リガンドに対する結合、および種特異性結合は ELISA 法により決定し、sHB-EGF に対する中和活性の評価は、受容体である EGFR および ERBB4 の細胞内シグナルの活性化を測定することにより行った。Y-142 の生物活性は、HB-EGF 機能阻害タンパク質

CRM197、抗 EGFR 抗体 cetuximab、抗 VEGF 抗体 bevacizumab と比較し、Y-142 のエピトープ同定にはアラニンスキャニング法を用いた。

Y-142 は EGFR リガンドである HB-EGF、及び amphiregulin (ARG) に対して結合性を示した。また、Y-142 はマウス、ラット HB-EGF へは結合せず、ヒト HB-EGF に対する種特異的結合性を示した。Y-142 は sHB-EGF によって誘導された EGFR、ERBB4 のリン酸化、細胞内シグナルの下流に位置する ERK1/2、および AKT のリン酸化を阻害した。さらに、Y-142 は CRM197、および cetuximab に比べ、低濃度において HB-EGF 誘導性の癌細胞の増殖、血管内皮細胞 HUVEC の増殖、管腔形成、VEGF の産生を抑制した。また、sHB-EGF 誘導性の HUVEC の管腔形成に対する Y-142 の阻害活性は、bevacizumab と比較して強いものであった。Y-142 のエピトープとして EGF 様ドメインに存在する 6 アミノ酸が同定され、このうち F115、および Y123 によって ARG に対する交差結合性、F115 によって Y-142 の種交差性が決定されていることが示唆された。Y-142 の強力な中和活性は、Y-142 が EGFR への結合に重要な HB-EGF の R142、Y123 を認識すること、および高親和性に由来していると推察された。

本章において、Y-142 の HB-EGF への結合様式を明らかにし、Y-142 が sHB-EGF の活性を強力に抑制することで、癌細胞の増殖、および複数の血管新生プロセスを抑制することを見出した。Y-142 は本章で用いた卵巣癌細胞を含め、HB-EGF シグナルに依存した癌の治療薬としての可能性が期待された。

第三章：Identification of cancer cell proliferative and survival role of proHB-EGF using anti-HB-EGF antibody

(抗 HB-EGF 抗体を用いた proHB-EGF の癌細胞増殖・生存促進機能の同定)

細胞膜結合型 proHB-EGF は sHB-EGF の前駆体として存在する。これまで sHB-EGF の機能は幅広く検証され、細胞の増殖・生存を促進することが知られている。ところが、proHB-EGF についての研究は少なく、機能解明は進んでいない。第一章で作製した 2 種の抗体 (Y-142、Y-073) は proHB-EGF に対して異なる結合性を示す。そこで本章では Y-142 と Y-073 を利用し proHB-EGF の機能解析を試みた。

その結果、Y-142、及び Y-073 は sHB-EGF に対し同程度の結合活性、中和活性を有するものの、Y-142 のみが proHB-EGF に対する結合活性を有していることが判明した。Y-142 を用いて proHB-EGF の機能を抑制したところ、胃癌細胞 NUGC-3 のスフェロイド形成抑制と、細胞増殖抑制が見られ、カスパーゼ活性化も誘導されることが明らかとなった。

これらの結果から、proHB-EGF が癌細胞の増殖・生存を促進する機能を有することが示され、proHB-EGF が癌の進行に重要な役割を担っていることが示唆された。

本研究では、取得した抗 HB-EGF 抗体、特に Y-142 の評価を行い、上市されている抗 EGFR 抗体や他の HB-EGF 阻害剤に比べ HB-EGF に対する中和活性が強いことを見出した。HB-EGF を標的とした Y-142 による癌治療が副作用の面からも優れていることが示されれば、Y-142 の開発価値はさらに高まると考えられる。抗 EGFR 抗体を含めた EGFR 阻害剤は重度の発疹が副作用として出現する。この副作用は EGFR 阻害剤に共通して出現するため、EGFR シグナル遮断によるものと考えられる。EGFR 阻害剤は、複数の EGFR リガンドの機能を阻害するが、例えば、卵巣癌組織において HB-EGF の発現亢進が報告されているが、他の EGFR リガンドの発現亢進は見られていない。抗 HB-EGF 抗体は、癌組織で発現亢進を示す HB-EGF シグナルを特異的に阻害するため、EGFR 阻害剤に比較し副作用の面で優れている可能性が考えられる。Y-142 は sHB-EGF 及び proHB-EGF の機能を阻害する。一方、Y-073 は sHB-EGF の機能のみを阻害する。そのため、proHB-EGF の機能を阻害することで副作用が出現する場合には、Y-073 を用い sHB-EGF シグナルのみを阻害するという選択も可能である。また、本研究においては、卵巣癌、胃癌細胞株を主に用いて検討を実施したが、神経芽腫、膀胱癌、膵臓癌、乳癌組織においても HB-EGF の発現亢進は報告されているため、Y-142 は幅広い癌種に対して有効であると期待される。

本研究において、筆者は抗 HB-EGF 抗体の医薬品としての価値を見出すだけでなく、proHB-EGF の癌細胞における機能の重要性を見出した。これらの知見は、HB-EGF を標的とした抗体医薬の開発、並びに癌の増殖メカニズムの解明に重要な知見となった。