

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 佐藤 秀司

---

本研究では、ヘ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 中和抗体の医薬品としての可能性を検証したものである。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、多種の癌組織において発現が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の比較による抗 HB-EGF 中和抗体 Y-142 の癌治療利用への可能性の検証、第三章では作出した抗体を用いた膜結合方 HB-EGF の癌細胞における機能解析が行なわれている。

HB-EGF は細胞増殖活性を有し、特定癌細胞では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。第一章では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が行われた。合計 146 種の中和抗体について調べたところ、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 種のエピトープピンに分類された。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、エピトープピン毎に特徴的な活性を示していた。中和抗体の産生効率、及びエピトープピ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。

第一章において作製した抗 HB-EGF 中和抗体のうち、第二章では HB-EGF に対して強い中和活性を示した Y-142 について抗癌剤としての可能性が調べられた。その結果、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 (ジフテリア毒素変異体)、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。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された。

proHB-EGF は sHB-EGF の前駆体であるが、proHB-EGF 自体も生理的機能を有する。第三章では、Y-142 と、第一章で得た他の抗体 (Y-073) を利用し proHB-EGF の癌細胞における機能解析が試みられた。Y-142 と 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。Y-142 を用い 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になった。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。本研究においては、卵巣癌、胃癌細胞株を主に用いて解析したが、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。

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。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品の開発、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。これらの発見は癌の基礎として重要であるばかりでなく、抗体医薬の新たな視点を提供している。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。