

# 新規乳癌治療薬としての三重機能抗体の開発

名古屋市立大学大学院医学部研究科  
免疫学分野・講師 今井 優樹

## 1. 研究の目的

乳癌治療では、形態及び機能の温存が患者にとっての精神的及び身体的負担を大きく軽減するので、副作用が非常に少なく強力な抗癌剤の開発は急務である。近年、癌細胞特異的な分子の機能や発現を制御する分子標的治療薬が医薬品として認可され、乳癌では、抗体医薬品ハーセプチンが使用されている。しかしながら、未だ標的となる癌特異分子の数は少なく、その標的分子の発現が減弱してしまうと効果がなくなってしまうため、新たな標的分子とその標的分子を発現している癌細胞を効率的に殺傷する機能を持った抗体医薬品の開発が必要となっている。一方、粘液の主成分で高分子糖蛋白質ムチン MUC1 が乳癌のみならず、大腸癌、前立腺癌など多くの癌において過剰発現され、その発現が腫瘍の増殖及び転移に寄与し、悪性度と強く相関していることから、癌の新たな分子標的治療薬の候補として注目を浴びている。我々も新たな分子標的治療薬の開発のため、抗 MUC1 抗体の乳細胞障害活性を検討し、MUC1 をターゲットとした抗体免疫療法の可能性を示してきたが、癌細胞においては、補体制御因子が正常細胞よりも過剰発現しており、抗体免疫療法によって活性化される補体系が効率よく働かないことを明らかにした。そこで、乳癌細胞上の補体制御因子のみを阻害することが出来れば、癌細胞のみを強力に破壊することが可能ではないかと考え、MUC1 に対する抗体の可変領域と、補体制御因子阻害抗体を融合した新規遺伝子組み換え抗体医薬品を作製することをこの研究の目的とする。

## 2. 研究の方法

### 乳癌特異的ヒト型三重機能抗体の作製及び精製

今回作製する三重機能抗体(tri-functional antibody; TFA)は、乳癌特異的な抗原(MUC1)に対する特異性、補体制御因子阻害機能、及びヒト IgG1 抗体の Fc 部分の機能を併せ持つ形で設計した。Fc 部分を含む抗体の定常領域(constant region; CH1~3)は、将来ヒトへの応用を考え、すでに認可されている抗体医薬品のリタキシマブやハーセプチンに用いら

れているヒト IgG1 の定常領域配列を使用した。

1) 抗 MUC1 抗体産生ハイブリドーマ BCP8 から mRNA を単離し、cDNA を合成後、定常領域のプライマーを用いた 5' RACE 法により、重鎖及び軽鎖の可変領域の遺伝子配列を決定した。(BCP8-VH 及び BCP8-VL)。CD59 機能阻害抗体産生ハイブリドーマ 1F5 も、同様の手法で遺伝子配列を決定した。(1F5-VH 及び 1F5-VL)。

2) BCP8-VH をヒト型 IgG1 抗体の発現ベクターに組み込んで、ヒト型抗 MUC1 抗体の重鎖発現ベクター(huBCP8H)を作製した。軽鎖についても同様にヒト型抗 MUC1 抗体の軽鎖発現ベクター(huBCP8L)を作製した。また、一方で、1F5-VH と 1F5-VL を人工的にリンカーでつなぎ、1F5 単鎖抗体(single chain 1F5: sc1F5)を発現できるベクターも作製した。最後に sc1F5 の遺伝子配列をヒト型抗 MUC1 抗体の重鎖発現ベクター(huBCP8H)に組み込み、ヒト型抗 MUC1 x CD59 三重機能抗体重鎖発現ベクター(huBCP8 x 1F5H)の作製を行った。

3) 作製した三重機能抗体発現ベクターを CHO 細胞に遺伝子導入を行い、スクリーニングを行った。スクリーニングは、遺伝子組み換え抗体の癌細胞への結合をフローサイトメーターにて確認した。

### 3. 研究成果

抗 MUC1 抗体産生ハイブリドーマ BCP8 及び CD59 機能阻害抗体産生ハイブリドーマ 1F5 から mRNA を単離し、cDNA を合成後、定常領域のプライマーを用いた 5' RACE 法により、各抗体の可変領域の PCR 産物を増幅した(図 1)。目的のバンドを切り出し、クローニングを行った後、重鎖及び軽鎖の可変領域の遺伝子配列を決定した。

各抗体の可変領域とヒト IgG1 の定常領域の遺伝子配列を組み換え、各抗体発現ベクターを作製した。作製した三重機能抗体発現ベクターはリポフェクトアミンを用いて CHO 細胞に遺伝子導入を行い、作製したヒト型三重機能抗体とヒト型抗 MUC1 抗体の分子量を確認するためにウェスタンブロッティングを行ったところ、それぞれ 250kDa 及び 170kDa の分子量を示した(図 2)。ヒト型三重機能抗体は予想通り抗 MUC1 抗体よりも抗 CD59 機能阻害抗体の単鎖抗体分だけ分子量が大きくなった。また、還元状態では、重鎖はそれぞれ 75kDa 及び 50kDa の分子量を示した。軽鎖は共に 25kDa にバンドが見られた。これらのことから正しく作製されたことが確認できた。

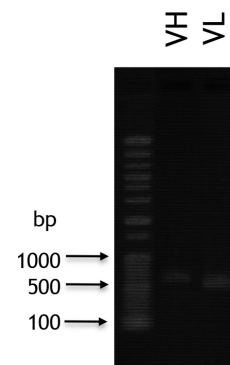


図 1、5' RACE 法により、増幅された 1F5 の重鎖及び軽鎖可変領域の可変領域

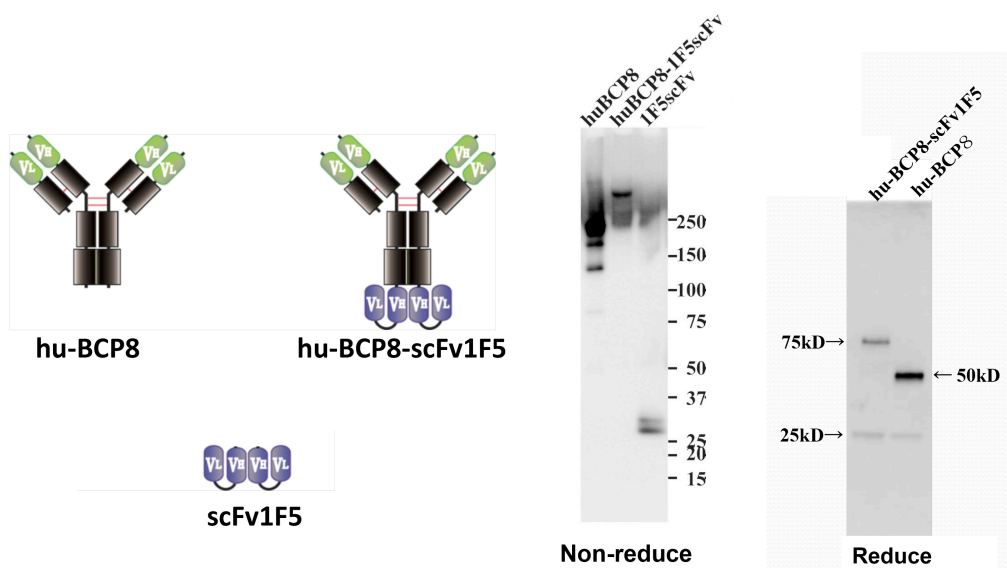


図2、Western Blotting によるヒト型三重機能抗体の検出

作製したヒト型三重機能抗体の癌細胞への結合の確認をしたところ、hu-BCP8-scFv1F5 及び hu-BCP8 共に、濃度が高くなると癌細胞への結合が増加したので、ヒト型三重機能抗体の癌細胞への結合能に問題はないことが分かった(図3)。

これらの結果から、癌の癌細胞上の補体制御因子のみを阻害

することが出来れば、口腔癌細胞のみを強力に破壊し、且つ、副作用を著しく減弱させることが可能ではないかと考え、癌特異的に発現する抗原 MUC1 を認識し、補体制御因子 CD59 阻害抗体を融合したヒト型新規遺伝子組み換え抗体を作製に成功した。今後、この抗体の機能を解析し、癌細胞上の補体制御因子のみを阻害することを明らかにしていく。口腔癌特異的な抗体免疫療法の効率を上昇させることができることが示唆された。

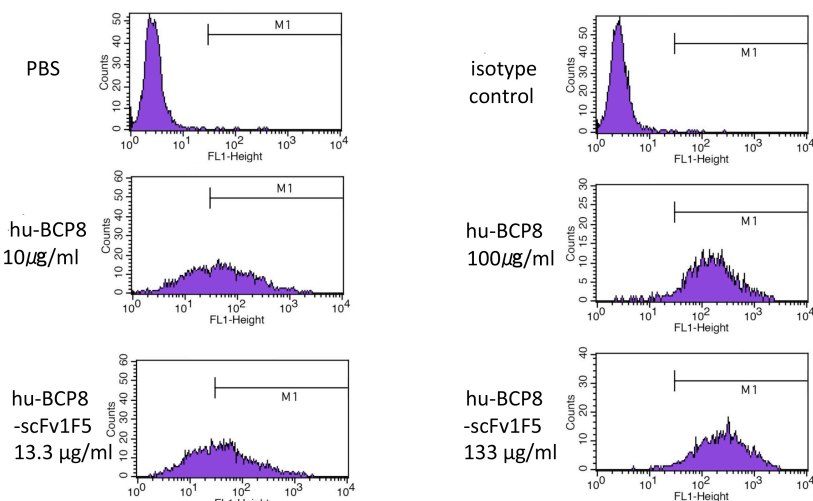


図3、MUC1 発現がん細胞に対するヒト型三重機能抗体の結合性

#### 4. 主な発表論文等

なし