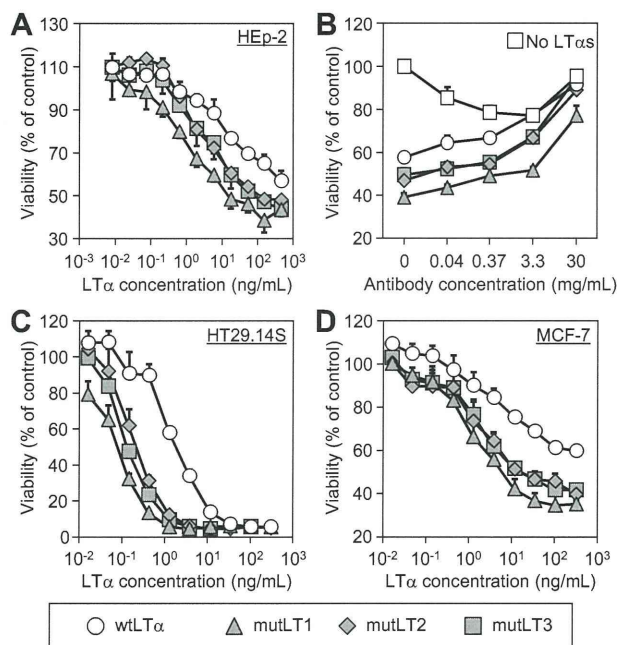


**Fig. 1.** Properties of recombinant LT $\alpha$  mutants. (A) SDS-PAGE analysis of wtLT $\alpha$  and LT $\alpha$  mutants. All products were separated on an SDS-PAGE gel and visualized by means of Coomassie Brilliant Blue staining. Marker indicates molecular weight standards. (B) Chromatograms of purified wtLT $\alpha$  and LT $\alpha$  mutants. wtLT $\alpha$  or LT $\alpha$  mutants were loaded onto a size-exclusion column and eluted at 1.0 mL/min. (C) The electrostatic potential surface was generated by using GRASP software. Red and blue indicate negative and positive electrostatic potentials, respectively. The electrostatic potential ranged from  $-7.5$  kT (bright blue) to  $7.5$  kT (bright red). The relative accessible surface areas were calculated by using JOY software.



**Fig. 2.** TNFR1-mediated cytotoxic activity of wtLT $\alpha$  and LT $\alpha$  mutants. (A) HEP-2 cells were incubated with wtLT $\alpha$  or LT $\alpha$  mutants in the presence of cycloheximide. After 18 h incubation, cell viability was assessed by methylene blue assay. (B) HEP-2 cells were treated with serially-diluted MAB225, an anti-TNFR1 neutralizing antibody, for 30 min. The cells were then incubated with 100 ng/mL wtLT $\alpha$  or LT $\alpha$  mutants in the presence of cycloheximide. After 18 h incubation, the cell viability was assessed by methylene blue assay. (C) HT29.14S cells and (D) MCF-7 cells were incubated with wtLT $\alpha$  or LT $\alpha$  mutants in the presence of IFN $\gamma$ . After 72 h incubation, the cell viability was assessed by WST-8 assay. EC30 and EC50 are the concentrations of LT $\alpha$  required for 30% and 50% inhibition of cell viability, respectively. Each value represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ).

activities of mutLT $\alpha$ s in two other cell types (Fig. 2C and D, Table 2). When compared with wtLT $\alpha$ , the LT $\alpha$  mutants exhibited 8–24 times the cytotoxicity in HT29.14S cells, and 16–34 times the cytotoxicity in MCF-7 cells (Fig. 2C and D, Table 2). To specifically evaluate the TNFR2-mediated bioactivity of the LT $\alpha$  mutants, we examined the levels of cytotoxicity induced by LT $\alpha$  mutants in

hTNFR2/mFas-PA cells. These cells have been engineered to exhibit hTNFR2- but not hTNFR1-mediated activities [14]. The human TNFR2-mediated bioactivities of LT $\alpha$  mutants were 2.2–4.1 times those of wtLT $\alpha$  in hTNFR2/mFas-PA cells (Fig. 3). The calculated ratios of TNFR1-mediated bioactivity by using HEP-2 cells/TNFR2-mediated bioactivity induced by mutLT1, mutLT2, and mutLT3 were 7.8, 3.2, and 1.9 times that of wtLT $\alpha$ , respectively. This result suggests that LT $\alpha$  mutants, especially mutLT1, have selectivity for TNFR1 in addition to their augmented bioactivity.

Next, to measure the binding affinity of LT $\alpha$  mutants to TNFRs, we performed an SPR analysis by using a BIAcore 2000 biosensor (Table 3). The binding affinities of mutLT1, mutLT2 and mutLT3 to TNFR1 were 2.7, 2.0, and 1.4 times those of wtLT $\alpha$ , respectively. We considered that the increased affinity of LT $\alpha$  mutant for TNFR1 might be related to the enhanced bioactivity through this receptor. In particular,  $k_{off}$  values for LT $\alpha$  mutants binding to TNFR1 were 39–57% of the value for wtLT $\alpha$ , whereas the  $k_{on}$  values for LT $\alpha$  mutants binding to TNFR1 were almost the same as that for wtLT $\alpha$ . These results suggest that TNFR1 interacts more strongly with the LT $\alpha$  mutants than wtLT $\alpha$  due to slow dissociation kinetics, and that this binding mode between LT $\alpha$  mutant and TNFR1 induces a potent signaling pathway. We then evaluated the affinity of the LT $\alpha$  mutants for TNFR2 by using SPR methodology (Table 4). The affinity of TNFR2 for LT $\alpha$  mutants was 1.5–2.1 times that for wtLT $\alpha$  due to fast association kinetics. Taken together, these results indicate that the binding modes of LT $\alpha$  mutants to TNFR1 and TNFR2 might dictate their bioactivity.

We previously demonstrated that Lys84 in LT $\alpha$  plays a crucial role in the protein's interaction with the main chain of TNFR1 [12]. Therefore, to investigate the importance of the amino acid sequence at position 84, we created LT $\alpha$  mutants with Lys84 replaced by Ser84 (K84S), Thr84 (K84T), or Ala84 (K84A), and evaluated their binding kinetics and bioactivities via TNFR1. We found that these point mutants exhibited a slower dissociation rate and increased bioactivity via TNFR1 when compared with wtLT $\alpha$ . K84S showed especially high bioactivity even though its affinity for TNFR1 was lower than that of wtLT $\alpha$  (Table 5).

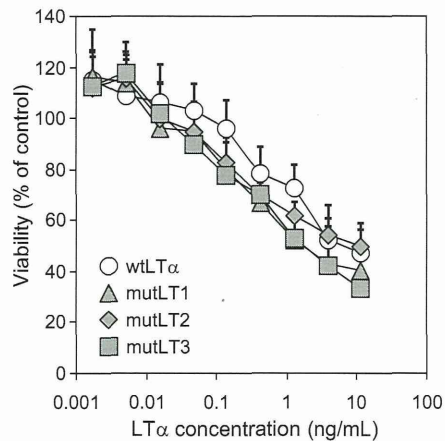
### 3.3. Activation of caspases by LT $\alpha$ mutant

It is known that TNFR1-mediated cell death is regulated by the activities of caspases including caspase-3, -7, and -8 [17].

**Table 2**

The TNFR1-mediated bioactivities of wtLT $\alpha$  and LT $\alpha$  mutants. EC30 and EC50 were calculated from the cytotoxic activity of wtLT $\alpha$  and LT $\alpha$  mutants against HEp-2, HT29.14S and MCF-7 cells. Relative activity values were calculated as EC30 (wtLT $\alpha$ )/EC30 (LT $\alpha$  mutant) or EC50 (wtLT $\alpha$ )/EC50 (LT $\alpha$  mutant).

	HEp-2 cells		HT29.14S cells		MCF-7 cells	
	EC30 (ng/mL)	Relative activity	EC50 (ng/mL)	Relative activity	EC50 (ng/mL)	Relative activity
wtLT $\alpha$	47.7	1.0	1.80	1.0	36.7	1.0
mutLT1	1.5	31.8	0.08	23.6	1.1	33.7
mutLT2	6.8	7.0	0.21	8.5	2.3	16.0
mutLT3	7.8	6.1	0.13	14.2	2.3	16.0



**Fig. 3.** TNFR2-mediated cytotoxic activities of wtLT $\alpha$  and LT $\alpha$  mutants. hTNFR2/mFas-PA cells were incubated with serial dilutions of wtLT $\alpha$  or LT $\alpha$  mutants in the presence of cycloheximide. After 48 h incubation, cell viability was assessed by methylene blue assay. EC30 is the concentration of LT $\alpha$  required for 30% inhibition of cell viability. Each value represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ).

**Table 3**

The binding kinetics of interactions between LT $\alpha$  mutants and hTNFR1 analyzed by using an SPR biosensor.  $k_{on}$  is the association kinetic constant;  $k_{off}$  is the dissociation kinetic constant; and  $K_D$  is the equilibrium dissociation constant. Relative affinity values were calculated as  $100 \times K_D$  (wtLT $\alpha$ )/ $K_D$  (LT $\alpha$  mutant).

	$k_{on}$ ( $10^6$ /M s)	$k_{off}$ ( $10^{-4}$ /s)	$K_D$ ( $10^{-10}$ /M)	Relative affinity (% vs wtLT $\alpha$ )
wtLT $\alpha$	1.2	6.1	4.9	100
mutLT1	1.3	2.4	1.8	269
mutLT2	1.4	3.5	2.5	195
mutLT3	0.97	3.4	3.4	143

Therefore, to examine the mechanism behind the augmentation of TNFR1-mediated bioactivity, we investigated the association between caspase activity and LT $\alpha$  mutant-induced cell death. First, we treated cells with LT $\alpha$  mutants in the presence of a broad caspase inhibitor, zVAD-fmk, and analyzed the cell viability (Fig. 4A). The results showed that zVAD-fmk almost completely abrogated the cytotoxicity induced by wtLT $\alpha$  and LT $\alpha$  mutants. These results indicate that both wild-type and LT $\alpha$  mutant-induced cell death were dependent on the activation of caspase. We then examined the activity of caspase-3/7 (Fig. 4B) and -8 (Fig. 4C) induced by LT $\alpha$  mutants in HEp-2 cells. LT $\alpha$  mutants, especially

**Table 4**

Binding kinetics of interactions between LT $\alpha$  mutants and hTNFR2 were analyzed by using an SPR biosensor.  $k_{on}$  is the association kinetic constant;  $k_{off}$  is the dissociation kinetic constant; and  $K_D$  is the equilibrium dissociation constant. Relative affinity values were calculated as  $100 \times K_D$  (wtLT $\alpha$ )/ $K_D$  (LT $\alpha$  mutant).

	$k_{on}$ ( $10^6$ /M s)	$k_{off}$ ( $10^{-4}$ /s)	$K_D$ ( $10^{-10}$ /M)	Relative affinity (% vs wtLT $\alpha$ )
wtLT $\alpha$	2.8	23.5	8.3	100
mutLT1	4.7	25.0	5.4	154
mutLT2	6.2	24.0	3.9	213
mutLT3	4.5	25.3	5.6	148

mutLT1, which has the highest bioactivity, quickly and strongly induced the activation of caspases. These results suggest that stabilization of the LT $\alpha$ -TNFR1 complex by the presence of LT $\alpha$  mutant contributed to increased caspase activity, which in turn induced cytotoxic effects.

#### 3.4. Activation of NF $\kappa$ B by LT $\alpha$ mutants

It is well known that TNFR1 activates NF $\kappa$ B signaling pathway in addition to the caspase cascade [18,19]. Therefore, to investigate whether the LT $\alpha$  mutants activate NF $\kappa$ B, we assessed the association between NF $\kappa$ B activity and LT $\alpha$  mutant-induced cell death. First, we prepared cells transfected with luciferase expressing vector activated by NF $\kappa$ B. Then, we treated cells with LT $\alpha$  mutants and analyzed the NF $\kappa$ B activity by measuring the expression level of luciferase (Fig. 5). Despite the higher TNFR1-mediated bioactivity of LT $\alpha$  mutants, we found that NF $\kappa$ B activity was induced to a similar extent by LT $\alpha$  mutants and wtLT $\alpha$ . This finding indicates that the LT $\alpha$  mutants selectively activate the caspase cascade but not NF $\kappa$ B activation via TNFR1.

#### 4. Discussion

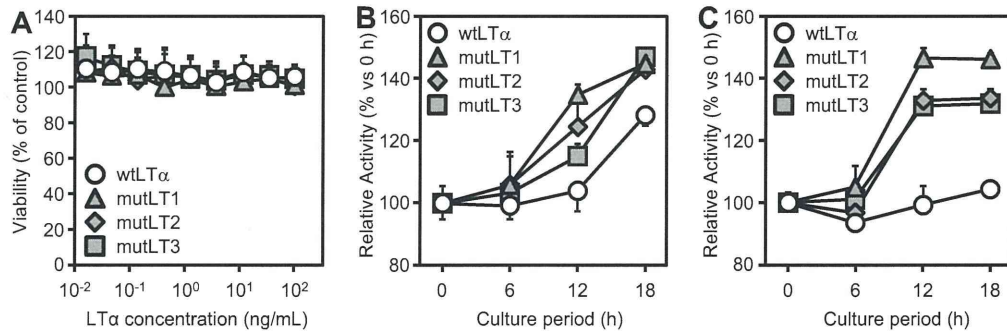
When constructing a LT $\alpha$  mutant as an anti-cancer agent, it is important that the mutant exhibits TNFR1 selectivity because of the lethal side-effects of TNFR2-mediated bioactivity. We previously created a LT $\alpha$  mutant (R1selLT), which had only 2.5% of the TNFR2-mediated bioactivity of wtLT $\alpha$  and 3.5 times of the TNFR1-mediated bioactivity of wtLT $\alpha$  [12]. The ratio of TNFR1/TNFR2 bioactivity of R1selLT was 145.8 times that of wtLT $\alpha$ . In addition to TNFR1 selectivity, augmentation of TNFR1-mediated bioactivity is also highly desirable in a therapeutic agent for cancer. Here, we created three lysine-deficient LT $\alpha$  mutants with greatly increased levels of TNFR1-mediated bioactivity through an altered binding mode. These mutants showed preferentially augmented bioactivity via TNFR1 compared with TNFR2. The TNFR1 selectivity of mutLT1, 2, and 3 was 7.8, 3.2, and 1.9 times that of wtLT $\alpha$ , respectively. Although the TNFR1 selectivity was lower for mutLT1 than for R1selLT, the TNFR1-mediated bioactivity of mutLT1 was 31.8 times that of wtLT $\alpha$  compared to 3.5 times of R1selLT. Such extreme augmentation of bioactivity is rarely reported. As



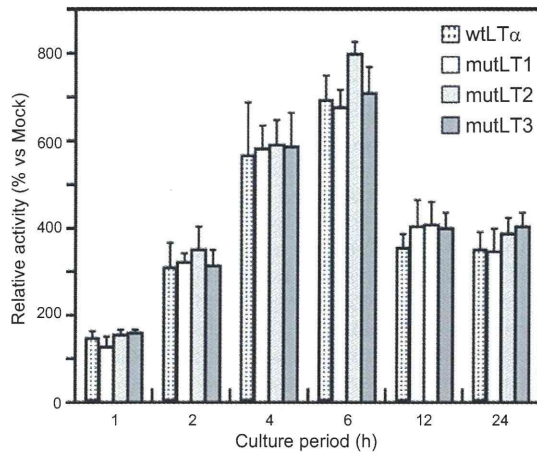
**Table 5**

Binding kinetics of interactions between point-mutated LT $\alpha$ s and hTNFR1 were analyzed by using an SPR biosensor.  $k_{on}$  is the association kinetic constant;  $k_{off}$  is the dissociation kinetic constant; and  $K_D$  is the equilibrium dissociation constant. Relative affinity values were calculated as  $100 \times K_D(\text{wtLT}\alpha)/K_D(\text{point mutated LT}\alpha)$ . TNFR1-mediated relative activities of LT $\alpha$  mutants were calculated from the concentration of LT $\alpha$  required for 30% inhibition of HEp-2 cell viability.

	$k_{on}$ ( $10^6/\text{M s}$ )	$k_{off}$ ( $10^{-4}/\text{s}$ )	$K_D$ ( $10^{-10}/\text{M}$ )	Relative affinity (% vs wtLT $\alpha$ )	Relative activity(% vs wtLT $\alpha$ )
wtLT $\alpha$	1.2	6.1	4.9	100	100
K84S	0.28	2.2	8.0	62	4810
K84T	1.0	4.3	118	195	1100
K84A	1.5	5.3	3.5	143	910



**Fig. 4.** Caspase activities in HEp-2 cells treated with wtLT $\alpha$  or LT $\alpha$  mutants. (A) Cycloheximide treated HEp-2 cells were incubated with wtLT $\alpha$  or LT $\alpha$  mutants in the presence of zVAD-fmk. After 18 h incubation, cell viability was assessed by methylene blue assay. (B and C) Cycloheximide treated HEp-2 cells were incubated for 6, 12, or 18 h with 10 ng/mL LT $\alpha$ s, and the activities of intracellular caspase-3/7 (B) and intracellular caspase-8 (C) were measured by using Caspase-Glo assays. Each value represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ).



**Fig. 5.** NF $\kappa$ B activities in HEp-2 cells treated with wtLT $\alpha$  or LT $\alpha$  mutants. HEp-2 cells were co-transfected with pGL4.32 and pRL-TK (Promega). Eighteen hours after transfection, the cells were treated with 10 ng/mL LT $\alpha$ s for the indicated period. The intracellular luciferase activity was then quantified. Data are shown as the relative NF $\kappa$ B activity compared with the mock-transfected group. Each bar represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ).

described above, high TNFR1 selectivity of R1seLT was mainly resulted from the significant decreased TNFR2-mediated bioactivity. On the other hand, the TNFR1 selectivity of mutLT1 was obtained from the augmented TNFR1-mediated bioactivity, while TNFR2-mediated bioactivity was maintained. On this point, TNFR2 is known to play essential role for the induction of immune responses. Therefore, we consider that a TNFR1-selective LT $\alpha$  mutants with high TNFR1-mediated and equivalent TNFR2-mediated bioactivity compared to wtLT $\alpha$ , such as mutLT1, would be a superior candidate for cancer therapy by combination of direct pro-apoptotic effects of LT $\alpha$  on tumor cells and an enhancement of local/systemic immunity.

Many cellular signaling processes are hypothesized to depend not only on the equilibrium strength of the ligand–receptor interactions but also on the average durations or kinetic dissociation rates of these interactions [20–23]. In some cases, the intensity of distal signaling depends on the off-rate rather than on the on-rate of the ligand–receptor complex [20,22]. For interactions with TNFR1, the LT $\alpha$  mutants exhibited higher  $k_{off}$  values compared with the value for wtLT $\alpha$ , whereas the  $k_{on}$  values for the LT $\alpha$  mutants were almost same as that for wtLT $\alpha$ . In addition, the bioactivity of wtLT $\alpha$  and LT $\alpha$  mutants was related to  $k_{off}$  but not to  $k_{on}$ . These data suggest that the LT $\alpha$  mutants interact with TNFR1 by slow dissociation and induce robust signal transduction. In contrast, for interactions with TNFR2, the LT $\alpha$  mutants showed a higher  $k_{on}$  than that for wtLT $\alpha$ , whereas the  $k_{off}$  values for the LT $\alpha$  mutants was almost same as that for wtLT $\alpha$ . These data indicate that the detailed molecular dissection of ligand–receptor binding kinetics is important for the construction of functional LT $\alpha$  mutants with desired TNFR-mediated bioactivity.

We previously demonstrated that Lys84 of LT $\alpha$  plays a crucial role in the protein's interaction with the main chain of TNFR1 [12]. Here, to explore the role of Lys84 further, we created LT $\alpha$  mutants with Lys84 replaced by Ser84 or Thr84, and found that the mutant with Ser84 showed slower dissociation kinetics and increased bioactivity when compared with wtLT $\alpha$  or the other mutants (Table 5). These results suggest that Lys84 contributes to the TNFR1-mediated bioactivity and the binding kinetics of the TNFR1–LT $\alpha$  interaction. In all three mutants analyzed here, the amino acid Lys at position 28 was changed to Gln (Table 1). Whereas these mutants exhibited increased TNFR1-mediated bioactivity, our previous data showed that a mutant with a K28Q substitution had decreased TNFR1-mediated bioactivity compared with that of wtLT $\alpha$ . Furthermore, mutLT2, which has the Lys at position 39 replaced by Ser, showed slightly increased TNFR2-mediated bioactivity, but a mutant containing the equivalent substitution at the same position showed decreased TNFR2-mediated bioactivity in our previous study [12]. These results suggest

that the sum of the mutations, including those at positions 28 and 39, were responsible for the augmented binding affinities to TNFR1 and TNFR2.

TNFR1 triggers apoptotic caspase signaling following activation of Fas-associated protein with death domain (FADD) [17]. At the same time, triggering of TNFR1 signals induces the anti-apoptotic NF $\kappa$ B cascade following the activation of TNF receptor-associated death domain (TRADD) and TNF receptor-associated factor (TRAF) adaptors [18,19,24]. Active NF $\kappa$ B induces transcription of a set of genes encoding anti-apoptotic proteins [25,26]. Therefore, in many cell types, TNF  $\alpha$  has no apoptotic effects due to the parallel triggering by TNF  $\alpha$  of a signaling pathway that activates NF $\kappa$ B via the TRADD and TRAF adaptors. Here, however, we found that the LT $\alpha$  mutants, which showed augmented bioactivity via TNFR1, efficiently induced caspase activation but induced NF $\kappa$ B to the same level as that induced by wtLT $\alpha$  (Figs. 4 and 5). We consider that the slower rate of dissociation of the LT $\alpha$  mutants from TNFR1 was important to the activation of FADD signaling cascade, but not to the activation of TRADD and TRAF adaptors. We speculate that the alteration of the binding mode of LT $\alpha$  mutant to TNFR1 increased the caspase signaling pathway, but not TRADD- and TRAF-mediated NF $\kappa$ B signaling. These findings will facilitate the construction of functional LT $\alpha$  mutants with even higher receptor selectivity and bioactivity in the future.

## 5. Conclusions

Here, we created highly bioactive LT $\alpha$  mutants with TNFR1-selectivity by using a phage display technique, and we clarified the molecular basis of their augmented TNFR1-mediated bioactivity. A better understanding of the correlation between structure, kinetic behavior, and activity will likely accelerate drug discovery because it will increase awareness of the properties of therapeutic proteins. We suggest that LT $\alpha$  mutants have the potential to be a powerful tool for cancer therapy by combination of direct pro-apoptotic effects of LT $\alpha$  on tumor cells and an enhancement of local/systemic immunity, and that our findings provide valuable information for the construction of even more functional LT $\alpha$  mutants.

## Acknowledgements

The authors declare that they have no conflict of interests. This study was supported in part by grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare in Japan; by the Research on Health Sciences focusing on Drug Innovation from the Japan Health Sciences Foundation; and by the Takeda Science Foundation.

## References

- [1] Neumann B, Luz A, Pfeffer K, Holzmann B. Defective Peyer's patch organogenesis in mice lacking the 55-kD receptor for tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1996;184:259–64.
- [2] Kratz A, Campos-Neto A, Hanson MS, Ruddle NH. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. *J Exp Med* 1996;183:1461–72.
- [3] Koni PA, Sacca R, Lawton P, Browning JL, Ruddle NH, Flavell RA. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity* 1997;6:491–500.
- [4] Schrama D, thor Straten P, Fischer WH, McLellan AD, Brocker EB, Reisfeld RA, et al. Targeting of lymphotoxin-alpha to the tumor elicits an efficient immune response associated with induction of peripheral lymphoid-like tissue. *Immunity* 2001;14:111–21.
- [5] Schrama D, Voigt H, Eggert AO, Xiang R, Zhou H, Schumacher TN, et al. Immunological tumor destruction in a murine melanoma model by targeted LTalpha independent of secondary lymphoid tissue. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:85–95.
- [6] Ryan SM, Mantovani G, Wang X, Haddleton DM, Brayden DJ. Advances in PEGylation of important biotech molecules: delivery aspects. *Expert Opin Drug Deliv* 2008;5:371–83.
- [7] Yamamoto Y, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Nishibata T, Kobayashi K, Okamoto T, et al. Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF-alpha with full bioactivity. *Nat Biotechnol* 2003;21:546–52.
- [8] Shibata H, Yoshioka Y, Ikemizu S, Kobayashi K, Yamamoto Y, Mukai Y, et al. Functionalization of tumor necrosis factor-alpha using phage display technique and PEGylation improves its antitumor therapeutic window. *Clin Cancer Res* 2004;10:8293–300.
- [9] Narimatsu S, Yoshioka Y, Watanabe H, Masano T, Morishige T, Yao X, et al. Lysine-deficient lymphotoxin-alpha mutant for site-specific PEGylation. *Cytokine* 2011;56:489–93.
- [10] Everaerd B, Brouckaert P, Shaw A, Fiers W. Four different interleukin-1 species sensitize to the lethal action of tumour necrosis factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;163:378–85.
- [11] Brouckaert P, Libert C, Everaerd B, Fiers W. Selective species specificity of tumor necrosis factor for toxicity in the mouse. *Lymphokine Cytokine Res* 1992;11:193–6.
- [12] Yoshioka Y, Watanabe H, Morishige T, Yao X, Ikemizu S, Nagao C, et al. Creation of lysine-deficient mutant lymphotoxin-alpha with receptor selectivity by using a phage display system. *Biomaterials* 2010;31:1935–43.
- [13] Browning JL, Miatkowski K, Sizing I, Griffiths D, Zafari M, Benjamin CD, et al. Signaling through the lymphotoxin beta receptor induces the death of some adenocarcinoma tumor lines. *J Exp Med* 1996;183:867–78.
- [14] Abe Y, Yoshikawa T, Kamada H, Shibata H, Nomura T, Minowa K, et al. Simple and highly sensitive assay system for TNFR2-mediated soluble- and transmembrane-TNF activity. *J Immunol Methods* 2008;335:71–8.
- [15] Nicholls A, Sharp KA, Honig B. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* 1991;11:281–96.
- [16] Mizuguchi K, Deane CM, Blundell TL, Johnson MS, Overington JP. JOY: protein sequence-structure representation and analysis. *Bioinformatics* 1998;14:617–23.
- [17] Sheikh MS, Huang Y. Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1. *Cell Cycle* 2003;2:550–2.
- [18] Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002;296:1634–5.
- [19] Magne N, Toillon RA, Bottero V, Didelot C, Houtte PV, Gerard JP, et al. NF-kappaB modulation and ionizing radiation: mechanisms and future directions for cancer treatment. *Cancer Lett* 2006;231:158–68.
- [20] Hlavacek WS, Redondo A, Metzger H, Wofsy C, Goldstein B. Kinetic proofreading models for cell signaling predict ways to escape kinetic proofreading. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:7295–300.
- [21] Liu ZJ, Haleem-Smith H, Chen H, Metzger H. Unexpected signals in a system subject to kinetic proofreading. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:7289–94.
- [22] Krippner-Heidenreich A, Tubing F, Bryde S, Willi S, Zimmermann G, Scheurich P. Control of receptor-induced signaling complex formation by the kinetics of ligand/receptor interaction. *J Biol Chem* 2002;277:44155–63.
- [23] Torigoe C, Faeder JR, Oliver JM, Goldstein B. Kinetic proofreading of ligand-epsilonRI interactions may persist beyond LAT phosphorylation. *J Immunol* 2007;178:3530–5.
- [24] Kim JY, Lee JY, Kim DG, Koo GB, Yu JW, Kim YS. TRADD is critical for resistance to TRAIL-induced cell death through NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 2011;585:2144–50.
- [25] Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) – a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* 1998;12:2821–30.
- [26] Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:239–52.



# 細胞内侵入抗体による腫瘍血管への ドラッグデリバリー

独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬支援スクリーニングセンター 抗体スクリーニングプロジェクト\*1)・大阪大学大学院薬学研究所\*2)  
向 洋平\*1)・中川晋作\*2)

## *Drug delivery into the tumor vasculature with the cell-internalizing monoclonal antibody*

Monoclonal antibodies (mAbs) that are internalized into cells are a current focus in the development of DDS-based drugs such as antibody-drug conjugates (ADCs). The discovery of potent cell-internalizing mAbs, however, requires labor-intensive screening of a massive number of candidates. Here we describe a phage display-based high-throughput screening system to rapidly isolate cell-internalizing mAbs, then also discuss about the efficacy of tumor vascular targeting with cell-internalizing mAbs which target tumor endothelial cells.

細胞内へ効率的に取り込まれる「細胞内侵入抗体」は、Antibody-Drug Conjugate (ADC) の開発をはじめ、さまざまな DDS 研究に応用可能な優れた細胞内薬物送達キャリアである。しかしながら、これまで、細胞内侵入活性を有する抗体を探索するために有効な方法論は存在せず、それが細胞内侵入抗体を利用した創薬の妨げとなっていた。本稿では、著者らの開発した細胞内侵入抗体の迅速単離法について紹介し、創薬標的として期待される腫瘍血管内皮細胞マーカーに対する細胞内侵入抗体による、腫瘍血管特異的な薬物デリバリーの有用性について概説する。

Yohei Mukai\*1), Shinsaku Nakagawa\*2)

**Keywords:** Cell-internalizing antibody, phage display, tumor endothelial cell, antibody-drug conjugate

## はじめに

近年、モノクローナル抗体医薬をはじめとする分子標的医薬の台頭により、がんに対する創薬研究は、これまでの低分子有機化合物を中心とした抗がん剤開発からの転換期を迎えている。がんに対する分子標的薬は、がんを高発現するマーカー分子を標的とする治療薬であり、優れた薬効を保持しつつも正常組織への毒性を最小化し、いくつかのがんに対して著しい治療成績の向上をもたらした。しかしながら、がんはその種類によって多様な表現型を有するため、1つの分子標的薬が全てのがん種に有効であることはありえず、分子標的薬の有効性を判定するためのコンパニオン診断薬も含め、多様な分子標的薬の開発が世界的に求められている。

モノクローナル抗体医薬は、1990年以降、その切れ味鋭い効果から全世界の医薬品市場を席卷し、今や医薬品売り上げの上位を占めるに至っている<sup>1)</sup>。現在、モノクローナル抗体医薬は、がんに対してだけでも10種類以上が上市されており、後続の多くも現在臨床試験段階にあるなど、現在の医薬品開発における最も大きな潮流の1つといえる<sup>2-5)</sup>。近年では、モノクローナル抗体医薬の高度化が進み、次世代型モノクローナル抗体医薬の代表格として、モノクローナル抗体に抗がん剤を標識することで直接的な殺細胞活性を付与した Antibody-Drug Conjugate (ADC) が注目されている<sup>6-8)</sup>。この ADC は、通常のモノクローナル抗体医薬の有効性を向上し得る技術として大きな注目を集め、現在の ADC 開発は、世界的な技術開発競争の真っただ中にある。

DDS 研究者が ADC で着目すべき点は、その作用発現メカニズムにある。ADC は、モノクローナル抗体部分が細胞膜表面の標的分子(抗原)へと結合

\*1) Laboratory of Innovative Antibody Engineering and Design, National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO)

\*2) Graduate School and School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

した後に、エンドサイトーシスにより取り込まれ、細胞内に抗がん剤を放出することによって薬効を発揮する(図1)。言い換えるならばADCは、細胞内への取り込み(DDS)によってはじめて作用発現するモノクローナル抗体医薬に他ならない。この性質は、現在世界で開発が進められている核酸医薬や、細胞内を標的にした治療薬開発におけるニーズに合致したものであり、このモノクローナル抗体の細胞内取り込みに着目した研究は、DDS研究領域において極めて重要な役割を担うものと考えられる。そこで本稿では、著者らがこれまでに着目してきた腫瘍血管ターゲティング領域において、細胞内に効率的に取り込まれる「細胞内侵入抗体」の細胞内薬物送達キャリアとしての有用性に焦点をあて、その単離から治療展開に至るまでの、著者らの最新の知見を紹介する。

#### 抗腫瘍血管新生療法における腫瘍血管ターゲティング

がん病巣では、正常な成人臓器ではあまり見られない血管新生が盛んであることから、この血管新生に着目した抗腫瘍血管新生療法が、古くから注目さ

れてきた<sup>9)</sup>(図2)。抗腫瘍血管新生療法は、腫瘍の新生血管の発育阻害あるいは破壊によって、腫瘍への栄養供給を遮断しようとするものであり、兵糧攻めによる効率的な抗腫瘍効果、さらには、高分子であるがゆえに組織浸潤性に乏しい抗体医薬でさえも容易に標的へ到達できることなど、がん細胞自身を標的とした治療法にない利点を有している<sup>10)</sup>。

この抗腫瘍血管新生療法では、血管新生に重要な役割を担う液性因子、血管内皮細胞増殖因子; VEGF<sup>11)</sup>やマトリックスメタロプロテアーゼ; MMP<sup>12)</sup>などの機能を阻害(中和)することによって、腫瘍の血管新生を抑制する試みが先行的に進められてきた。事実、VEGF に対するモノクローナル抗体医薬である bevacizumab<sup>13)</sup>は、FDA から転移性大腸がん・転移性非小細胞肺がん・Her2 陰性転移性乳がんへの承認を受けており、抗腫瘍血管新生療法は幅広いがん種に対するユニバーサルな治療法としてその地位を確立しつつある。しかしながら、VEGF や MMP などの生体の恒常性維持に必須の液性因子を標的とした場合、全身性の機能の枯渇に伴う副作用が懸念されており、近年の抗血管新生療法における課題となっている<sup>14)</sup>。

一方で、抗腫瘍血管新生療法には、上記の液性

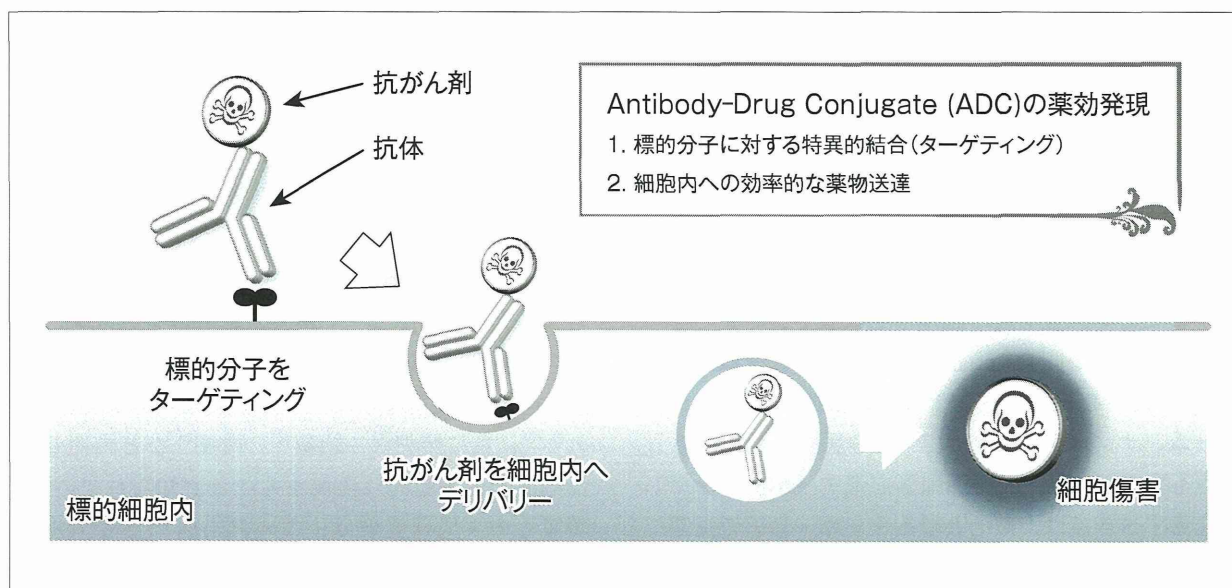


図1 ADCの薬効発現

エンドサイトーシスで取り込まれたADCは、細胞内小胞輸送経路によって運搬され、最終的に細胞質に放出された薬剤が機能することで薬効を発揮する。このためには、細胞表面マーカーを単にターゲティングするだけでなく、細胞内へと薬物が送達されることが重要となる。



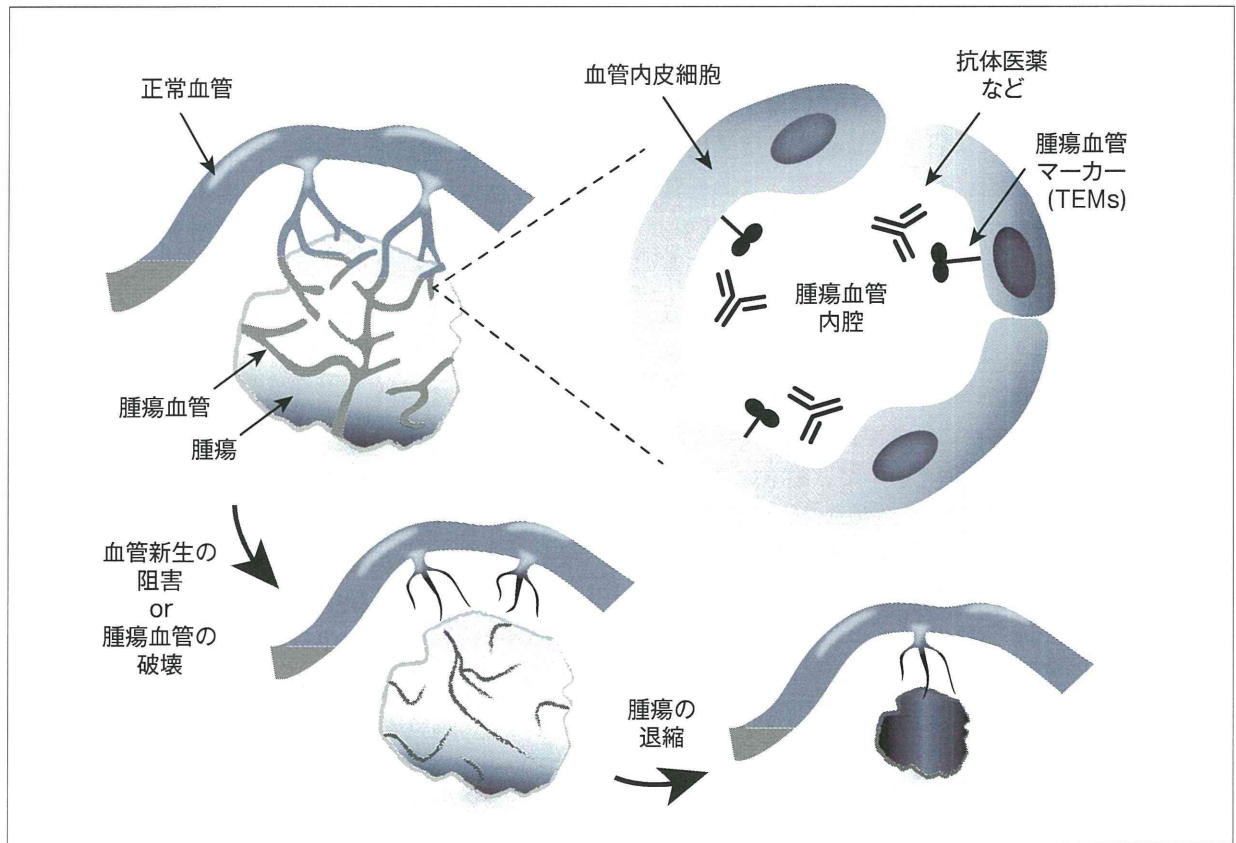


図2 抗腫瘍血管新生療法の概念図

腫瘍では、増殖を続ける組織への栄養供給のため、血管新生が盛んである。この血管新生を阻害、あるいは、腫瘍血管を破壊することによって、腫瘍への栄養供給を阻害できれば、腫瘍の増殖を抑制することが可能となる。また、腫瘍血管には腫瘍血管マーカー(TEMs)の存在が知られ、これらを標的にした治療薬の開発が世界的に注目されている。

因子を標的とした治療法とは別に、腫瘍の血管皮膚細胞表面に存在するマーカー(Tumor endothelial markers; TEMs)を標的とすることで、腫瘍血管を破壊あるいは正常化しようとする試み(腫瘍血管ターゲティング)が存在する<sup>15)</sup>。この方法では、全身に循環する液性因子を標的とする前述の治療法とは異なり、腫瘍血管にのみ発現する TEMs を標的とすることで、全身性の副作用を軽減できるというメリットがある。また、腫瘍血管内皮細胞を標的とするため、抗体医薬のみならず、核酸医薬やリポソーム、ナノ医薬などの種々 DDS 医薬が利用できる点も重要である<sup>16)</sup>。この腫瘍血管ターゲティングで注意すべき点は、標的となるマーカー分子の正常組織での存在が、その副作用発現に直結することであり、マーカー分子の発現が「腫瘍血管特異的」であることが肝となる。事実、VEGF のレセプターで

ある VEGFR2<sup>17)</sup>は、このような腫瘍血管ターゲティングにおいて最も利用されているマーカーであるものの<sup>16,18)</sup>、その正常血管での発現が問題視され<sup>19,20)</sup>、より腫瘍血管に特異性の高い TEMs を標的とした腫瘍血管ターゲティングの必要性が議論されている<sup>15)</sup>。

Roundabout homolog 4(Robo4)は、著者らが着目する TEM の1つ<sup>15)</sup>であり、腫瘍血管内皮細胞上での特異的な発現が報告されている分子である<sup>21)</sup>。Robo4 は、血管新生が盛んな領域のみに観察され<sup>22,23)</sup>、主に胎児<sup>24)</sup>、胎盤<sup>22)</sup>、腫瘍<sup>25)</sup>などの血管内皮細胞上に限定的に発現することが知られている。著者らの共同研究者は、この Robo4 の血管内皮細胞表面での発現を、Robo4 プロモーター搭載トランスジェニックマウスによって確認している<sup>26,27)</sup>。Robo4 の生理的役割は、いまだ不明な点は多く残さ

れているものの、VEGF-VEGFR シグナリングを調節することで、血管新生イベントに関わるものとされている<sup>28-31)</sup>。

以上のように、Robo4 は、成人ではほとんど起こらない血管新生部位に限局して発現する分子であることから、高い特異性で腫瘍血管に発現する TEM であるものと期待される。以上の背景のもと、著者らの研究グループは、この Robo4 を標的分子とし、細胞内へ効率的に取り込まれる「抗 Robo4 細胞内侵入抗体」を単離することで、正常組織への副作用を最小化した、新規の腫瘍血管ターゲティングが達成できるものと考えた。

#### 抗 Robo4 細胞内侵入抗体の単離に向けて

腫瘍血管ターゲティングにおいて、ADC をはじめとする細胞内を標的とする DDS 製剤に重要な性質は、前述のとおり、①腫瘍血管特異的なマーカーを標的としていること、さらには、②薬物を効率よく細胞内へと送達できること、である。この点、腫瘍血管への特異的なターゲティング能と、細胞内への薬物送達能をあわせ持つ、抗 Robo4 細胞内侵入抗体は、腫瘍血管ターゲティングにおいて極めて有用なツールとなり得る。しかしながらこれまで、細胞内侵入抗体を効率的に単離する方法は存在せず、これが ADC をはじめとする細胞内を標的とする医薬品の開発における、1つのボトルネックとなっていた。

ハイブリドーマ法をはじめとする、通常モノクローナル抗体の作製法での細胞内侵入抗体の探索では、樹立したモノクローナル抗体の細胞内侵入活性をひとつひとつ試験することしかできない。この方法では、多大な時間・労力を要するのみならず、その結果は運に大きく左右されてしまう。そのため、近年、細胞内侵入抗体の積極的なスクリーニング法として、数十億もの多様性を有するファージ抗体ライブラリを培養細胞に添加し、細胞内に侵入したファージのみを増幅することで、細胞内侵入抗体を見い出そうという試みが提案された<sup>32)</sup>。しかしながら、本方法では、①抗体提示ファージが何に結合して細胞内に取り込まれたかが不明瞭であるだけでな

く、②得られる最終産物は、「ポリクローナル」なファージ集団であり、この中から細胞内侵入抗体を単離同定するには、やはり個々のクローンの細胞内侵入活性をひとつひとつ試験せねばならない。従って、このようなファージ抗体ライブラリから細胞内侵入抗体を効率的に見いだすためには、いかにして「モノクローナル」抗体の細胞内侵入活性を、簡便かつハイスループットに評価するかが課題であった。

#### PSIF を利用した細胞内侵入抗体の効率的探索法

緑膿菌由来の蛋白性毒素フラグメント；PSIF は、エンドサイトーシスにより細胞内へと侵入すると、逆行輸送経路によって効率的に細胞質へと放出され、蛋白質合成に必須の伸長因子 2(EF2)を不活化することにより細胞傷害を引き起こす<sup>33)</sup>。PSIF は、細胞結合ドメインを欠損しているために、単独では細胞傷害を示さないが、なんらかのガイドによってひとたび細胞内へと取り込まれると、極めて強力な殺細胞活性を発揮する<sup>34)</sup>。この性質を利用したモノクローナル抗体との融合蛋白質(イムノトキシン)は、古くから研究がなされ、幾つかのイムノトキシンは現在臨床試験段階にある<sup>35)</sup>。一方、この PSIF は、これとの融合蛋白質の「細胞内侵入活性」を「細胞死」という表現系で簡便に評価可能な強力なツールとなる。これまでに著者らのグループでは、PSIF を細胞内移行ペプチド(PTD)との融合体として大腸菌培養上清へと発現させ、その上清を用いた細胞傷害性試験を行うことで、数百もの PTD 変異体の中から最も細胞内侵入活性に優れる PTD を一挙にスクリーニングできることを示している<sup>36)</sup>。

以上の背景から、著者らは、PSIF を細胞内侵入抗体の探索法に応用することで、数百クローンものモノクローナル抗体の細胞内侵入活性をわずか一度の試験で評価可能な、細胞内侵入抗体の効率的スクリーニング法を構築した(図 3)。免疫ファージ抗体ライブラリを標的蛋白質(抗原)で濃縮の後、得られた大腸菌コロニーをピックアップすることで数百クローンをモノクローン化する。それぞれの大腸菌クローンからは、抗体と PSIF の融合体が産生され、抗原結合性を ELISA で、細胞内侵入活性を細



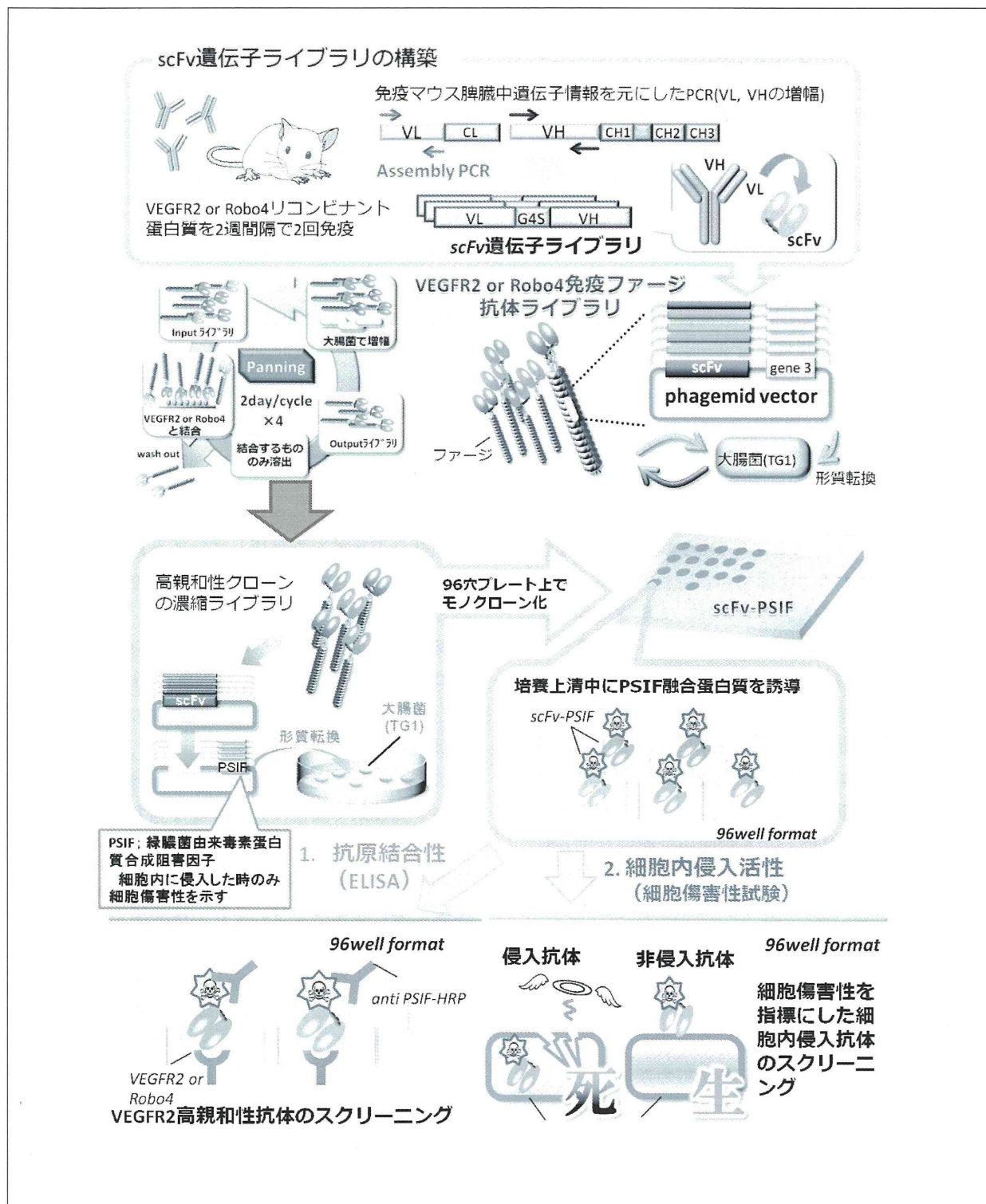


図3 PSIFを用いた細胞内侵入抗体の効率的スクリーニング法

PSIFは、細胞内に取り込まれることで強力な殺細胞活性を發揮する生物毒であるが、単独では細胞内に入ることができず、細胞傷害を示さない。PSIFと抗体との融合体は、細胞内に取り込まれた際のみ細胞傷害を發揮するため、細胞傷害を指標にしたスクリーニングによって、細胞内侵入抗体を簡便に探索するためのツールとなる。

胞傷害性試験で検証することで、簡便に細胞内侵入活性を有するクローンを見いだすことができる。本方法論を、腫瘍血管マーカー Robo4、VEGFR2 へ適用した検討では、各 300 種類の抗 Robo4、抗 VEGFR2 抗体の細胞内侵入活性を一挙に試験し、結果として抗 Robo4 細胞内侵入抗体(R4-13i)、抗 VEGFR2 細胞内侵入抗体(V2-05i)を同定することに成功している<sup>37)</sup>。本方法論は、候補クローンの精製やラベル化、細胞内侵入活性評価(顕微鏡観察やフローサイトメトリーなど)を必要とせず、細胞傷害性試験というシンプルな系で抗体の細胞内侵入活性をスクリーニングできるという圧倒的な利点を有しており、これまで ADC などの開発で問題となっていた細胞内侵入抗体の探索過程を大きく加速可能な基盤技術となり得るものと期待される。

### 抗 Robo4 細胞内侵入抗体の特性

得られた抗 Robo4 細胞内侵入抗体(R4-13i)の特性を解析するために、著者らは、一本鎖抗体(scFv)、二量化一本鎖抗体(dscFv)、完全型抗体(IgG)の3種のフォーマットのモノクローナル抗体を準備した。蛍光標識した各種抗体を Robo4 発現細胞に添加し、インキュベーション後、細胞表面の抗体分子をトリプシンで消化することによって、細胞内に侵入した抗体のみをフローサイトメトリーにより評価した。その結果、いずれの抗体フォーマットにおいても、細胞表面に結合した抗体の約 40% 程度が、8 時間以内に細胞内に取り込まれることが明らかとなった<sup>37)</sup>。この細胞内への移行効率は、すでに

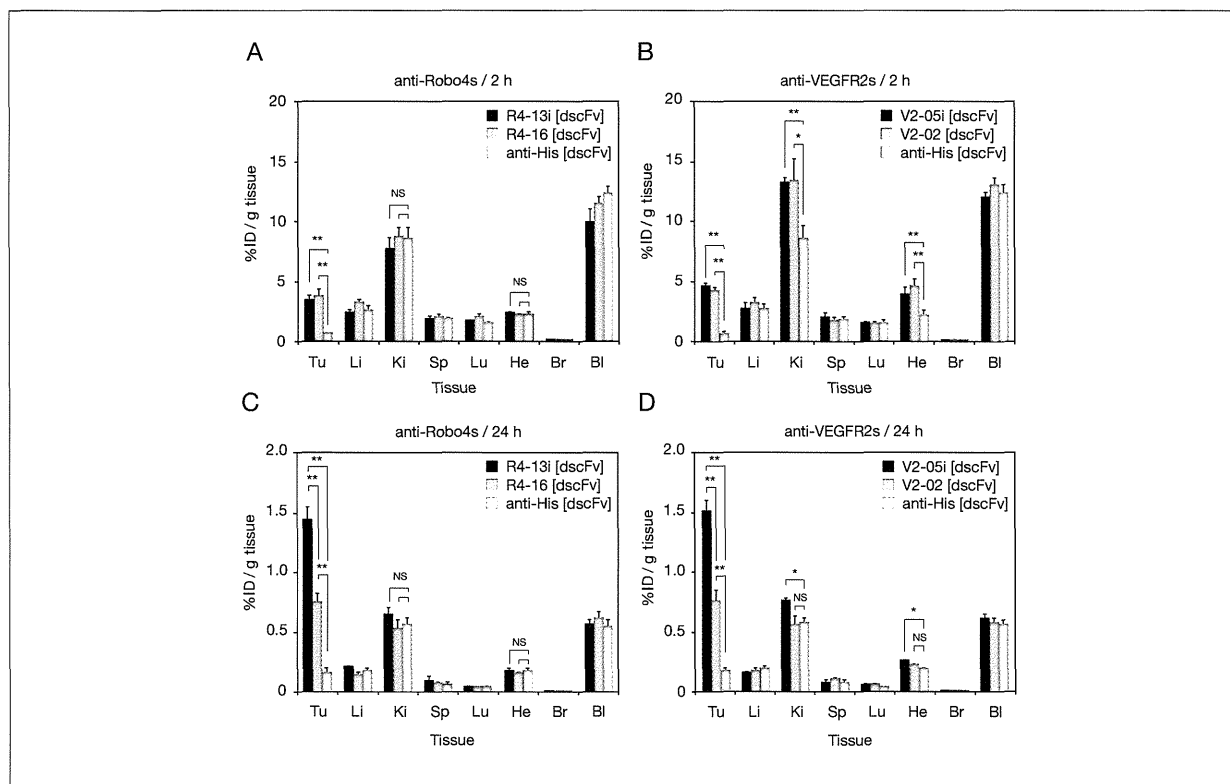


図4 抗 Robo4、抗 VEGFR2 細胞内侵入抗体の体内分布

B16BL6 腫瘍移植モデルマウスに対し、<sup>125</sup>I でラベルした dscFv を投与し、2 時間後(A, B)、24 時間後(C, D)に組織を回収し、放射線量をγカウンターにより測定した。 $\%ID/g \text{ tissue} = \text{組織 } 1 \text{ g あたりのカウント} / \text{投与した総カウント} \times 100$ 。Tu: 腫瘍、Li: 肝臓、Ki: 腎臓、Sp: 脾臓、Lu: 肺、Br: 脳、BI: 血液。R4-13i: 抗 Robo4 細胞内侵入抗体、R4-16: 抗 Robo4 低侵入抗体、V2-05i: 抗 VEGFR2 細胞内侵入抗体、V2-02: 抗 VEGFR2 低侵入抗体、anti-His: ネガティブコントロール抗体。This research was originally published in Blood. Mukai Y. et al. Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody-drug conjugates based on the rapid isolation of the anti-Robo4 cell-internalizing antibody. Blood. 2013;121(14):2804-13. © the American Society of Hematology.



ADCとして上市された gemtuzumab ozogamicin、T-DM1と同程度であり<sup>38,39)</sup>、得られた抗 Robo4 細胞内侵入抗体は、抗体のフォーマットに依存せず、高効率に細胞内に取り込まれる分子であることが明らかとなった。

次に、抗 Robo4 細胞内侵入抗体(R4-13i)の体内分布を、<sup>125</sup>Iでラベル化した dscFv を、B16BL6 マウスメラノーマ移植モデルマウスに尾静脈内投与することで評価した<sup>37)</sup>。本実験では、R4-13i と同じ抗原(Robo4)を認識し、かつ同等の親和性を有するものの、細胞内侵入活性をほとんど持たない細胞内低侵入抗体;R4-16、ならびに、抗 His-tag 抗体をネガティブコントロール抗体として用いている。投与後2時間後に各臓器を回収し、放射活性から体内分布を評価したところ、抗 Robo4 抗体は、細胞内侵入活性の有無にかかわらず、ネガティブコントロール抗体と比較して腫瘍に5倍以上集積すること、ならびに正常組織への分布はネガティブコントロール抗体と同程度であることが示された(図4A)。また、同様の検討を抗 VEGFR2 細胞内侵入抗体(V2-05i)と低侵入抗体 V2-02 についても実施したところ、抗 VEGFR2 抗体は抗 Robo4 抗体と同程度の腫瘍集積性を示す一方で、腎臓や心臓といった正常組織へもネガティブコントロール抗体に比べて優位に分布することが判明した(図4B)。VEGFR2は腫瘍血管のみならず、腎臓や心臓の血管に発現することが報告されており<sup>14,19,20)</sup>、本結果は、Robo4がVEGFR2よりも特異性に優れた腫瘍血管マーカーとなり得ることを示している。

次に、細胞内侵入抗体の腫瘍滞留性を評価する目的で、血中の dscFv の大部分が消失する投与後24時間後における組織分布を、先と同様に方法にて評価した<sup>37)</sup>。細胞内侵入抗体と低侵入抗体の比較において、細胞内侵入抗体の腫瘍への集積は、Robo4、VEGFR2いずれを標的にした場合においても、低侵入抗体の2倍であることが示された(図4C、D)。前述のとおり、今回用いた細胞内侵入抗体と低侵入抗体は同程度の抗原親和性を有していることから、

この腫瘍移行性の差は、細胞内侵入活性の有無によって生じたものと考えられる。現在、この現象の詳細なメカニズムは解析中であるが、著者らは、細胞内に侵入した抗体は、血流から隔離されることで全身循環への再分布を免れ、結果としてより多く腫瘍へ蓄積した可能性を考えている。

Robo4、VEGFR2を標的とした細胞内侵入抗体の細胞内薬物送達キャリアとしての効果判定には、ともに細胞内で機能することで殺細胞活性を発揮する、PSIF、抗がん剤ネオカルチノスタチン(NCS)<sup>40)</sup>を用いた<sup>37)</sup>。scFvとPSIFの融合蛋白質(scFv-PSIF)、ならびに、NCS結合IgG(IgG-NCS)をそれぞれ調製し、マウス血管内皮細胞MS1に対する細胞傷害性を*in vitro*で評価したところ、細胞内侵入抗体は低侵入抗体に比べ、10倍程度強い殺細胞活性を有することが示された(図5A~D)。また、これらの*in vivo*での有効性を評価する目的で、B16BL6腫瘍移植モデルマウスに対する治療効果を検討したところ、細胞内侵入抗体を用いた群のみが有意な腫瘍増殖抑制効果を発揮することが明らかとなった(図5E~H)。

以上の結果は、細胞内侵入抗体による細胞内への薬物送達が*in vivo*でも有効に機能したこと、さらには、抗体の細胞内侵入活性が、ADCをはじめとする細胞内を標的とするモノクローナル抗体製剤にとって極めて重要であることを示している。一方で、本治療実験中のマウスの体重推移を観察した結果、興味深いことに、V2-05i-PSIF(抗VEGFR2細胞内侵入抗体-PSIF融合蛋白質)投与群においてのみ、顕著な体重減少が観察された(図5I~L)。これは、正常血管にも発現するVEGFR2を標的とした弊害であるものと予想され、より腫瘍血管特異性の高い、Robo4を標的とした腫瘍血管ターゲティングの有用性を示している。これは、腫瘍血管マーカーと期待されつつも、治療標的としての実績がなかったRobo4に対し、その有効性を始めて示したものであり、本結果は、今後のRobo4を標的とした治療研究の基礎となるものと期待される。

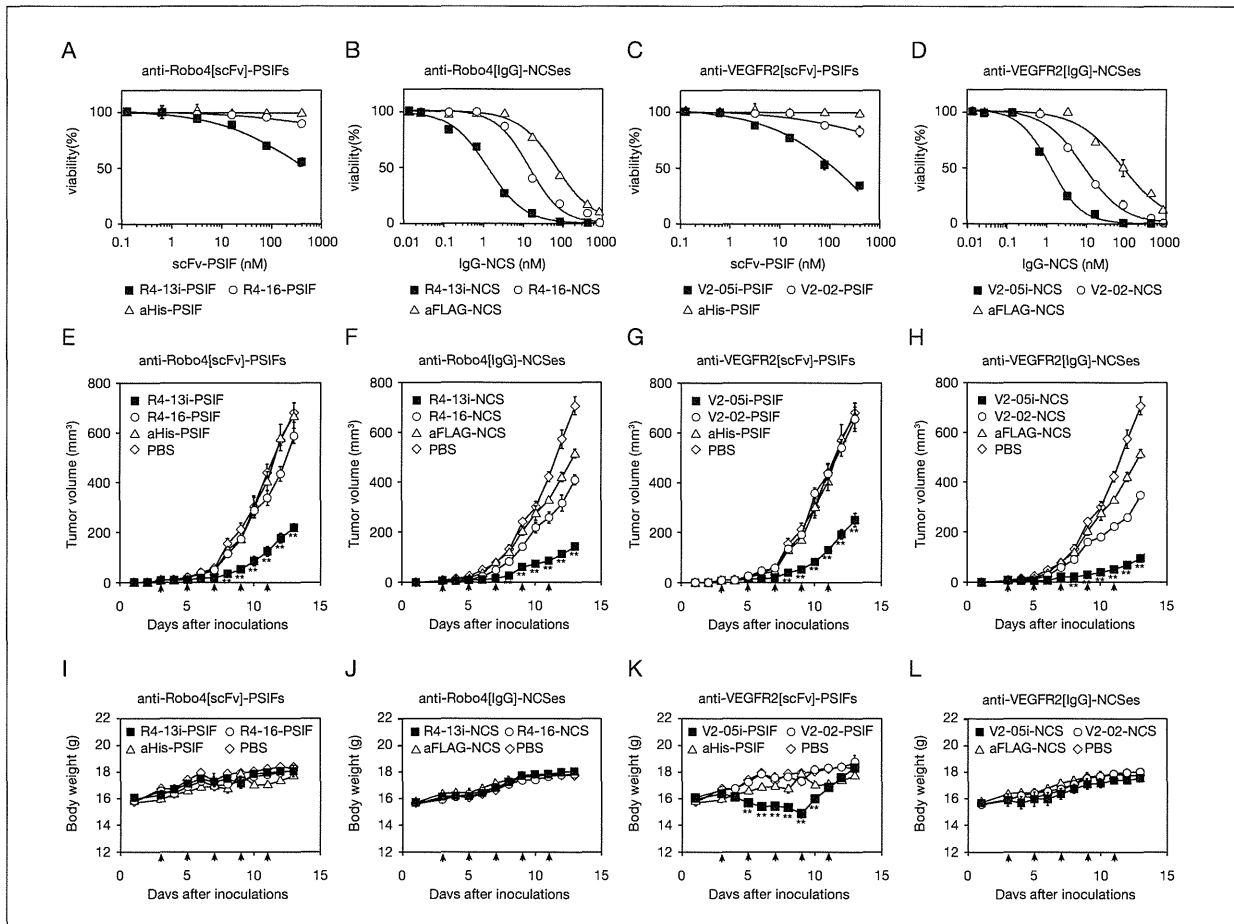


図5 抗 Robo4、抗 VEGFR2 細胞内侵入抗体—薬物複合体の治療効果

(A~D)scFv-PSIF と IgG-NCS の M51 細胞に対する *in vitro* 細胞傷害性試験。各々の複合体を細胞に添加し、24 時間後に細胞の生存率を WST-8 assay により評価した。(E~H)scFv-PSIF または IgG-NCS の腫瘍増殖抑制効果。C57BL/6 マウスに対し B16BL6 細胞を移植し、3 日後より 2 日間隔で 5 回、それぞれの薬物を投与し、腫瘍径を測定することでその腫瘍増殖抑制効果を評価した (\*\* $p < 0.01$ ; 細胞内侵入抗体投与群 vs 低侵入抗体投与群)。(I~L)*in vivo* 治療実験中の体重の推移 (\*\* $p < 0.01$ ; 細胞内侵入抗体投与群 vs PBS 投与群)。R4-13i: 抗 Robo4 細胞内侵入抗体、R4-16: 抗 Robo4 低侵入抗体、V2-05i: 抗 VEGFR2 細胞内侵入抗体、V2-02: 抗 VEGFR2 低侵入抗体、anti-His: ネガティブコントロール抗体。This research was originally published in Blood. Mukai Y. et al. Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody-drug conjugates based on the rapid isolation of the anti-Robo4 cell-internalizing antibody. Blood. 2013;121(14):2804-13. © the American Society of Hematology.

## おわりに

本稿では、腫瘍血管ターゲティング領域における細胞内侵入抗体の有用性について、著者らの知見を中心に紹介させていただいた。ADCをはじめとする次世代型の医薬は、薬効が向上されることと引き換えに、予期せぬ副作用のリスクも向上している。従って、臨床応用が進んでいる既存のmarkerのみに着目していたのでは、次世代型医薬の開発において大きな壁におつかる可能性も十分に考えられる。このような問題に対処するためには、Robo4のような、創薬標的としての有効性が明確でない、いわゆ

るハイリスクなmarker群にも積極的にチャレンジをし、その有効性を実証していくことも重要であろう。また、細胞内侵入抗体については、未だそのメカニズム解析に研究の余地は残しているものの、ADCのみならず、遺伝子治療をはじめとする各種DDS製剤へも積極的に応用すべき技術と、著者らは考えている。今回の著者らの検討で、少なくとも、「細胞内侵入抗体の単離過程の非効率性」という問題点は克服できたと考えている。今後、著者らの研究成果が、現在世界的に開発が試みられているDDS製剤の有効性向上に貢献できることを期待し、これを本稿の結語とさせていただく。



## 文献

- 1) Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol*, 2010. 28(9): p. 917-24.
- 2) Hughes B. Antibody-drug conjugates for cancer: poised to deliver? *Nat Rev Drug Discov*, 2010. 9(9): p. 665-7.
- 3) Nelson A.L., et al. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. 9(10): p. 767-74.
- 4) Weiner L.M., et al. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2010. 10(5): p. 317-27.
- 5) Scott A.M., et al. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2012. 12(4): p. 278-87.
- 6) Senter P.D. Potent antibody drug conjugates for cancer therapy. *Curr Opin Chem Biol*, 2009. 13(3): p. 235-44.
- 7) Alley S.C., et al. Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. *Curr Opin Chem Biol*, 2010. 14(4): p. 529-37.
- 8) Sievers E.L. and Senter P.D. Antibody-drug conjugates in cancer therapy. *Annu Rev Med*, 2013. 64(p. 15-29).
- 9) Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 1971. 285(21): p. 1182-6.
- 10) Liu Y. and Deisseroth A. Tumor vascular targeting therapy with viral vectors. *Blood*, 2006. 107(8): p. 3027-33.
- 11) Rosen L.S. VEGF-targeted therapy: therapeutic potential and recent advances. *Oncologist*, 2005. 10(6): p. 382-91.
- 12) Rundhaug J.E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 2005. 9(2): p. 267-85.
- 13) Ferrara N., et al. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. 3(5): p. 391-400.
- 14) Kamba T. and McDonald D.M. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br J Cancer*, 2007. 96(12): p. 1788-95.
- 15) Neri D. and Bicknell R. Tumour vascular targeting. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(6): p. 436-46.
- 16) Wicki A., et al. Targeting tumor-associated endothelial cells: anti-VEGFR2 immunoliposomes mediate tumor vessel disruption and inhibit tumor growth. *Clin Cancer Res*, 2012. 18(2): p. 454-64.
- 17) Olsson A.K., et al. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(5): p. 359-71.
- 18) Clarke J.M. and Hurwitz H.I. Targeted inhibition of VEGF receptor 2: an update on ramucirumab. *Expert Opin Biol Ther*, 2013. 13(8): p. 1187-96.
- 19) Choueiri T.K., et al. Congestive heart failure risk in patients with breast cancer treated with bevacizumab. *J Clin Oncol*, 2011. 29(6): p. 632-8.
- 20) Eremina V., et al. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med*, 2008. 358(11): p. 1129-36.
- 21) Legg J.A., et al. Slits and Roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration. *Angiogenesis*, 2008. 11(1): p. 13-21.
- 22) Huminiecki L., et al. Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics*, 2002. 79(4): p. 547-52.
- 23) Huminiecki L. and Bicknell R. In silico cloning of novel endothelial-specific genes. *Genome Res*, 2000. 10(11): p. 1796-806.
- 24) Park K.W., et al. Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial migration. *Dev Biol*, 2003. 261(1): p. 251-67.
- 25) Seth P., et al. Magic roundabout, a tumor endothelial marker: expression and signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 332(2): p. 533-41.
- 26) Okada Y., et al. A GABP-binding element in the Robo4 promoter is necessary for endothelial expression in vivo. *Blood*, 2008. 112(6): p. 2336-9.
- 27) Okada Y., et al. A three-kilobase fragment of the human Robo4 promoter directs cell type-specific expression in endothelium. *Circ Res*, 2007. 100(12): p. 1712-22.
- 28) Koch A.W., et al. Robo4 maintains vessel integrity and inhibits angiogenesis by interacting with UNC5B. *Dev Cell*, 2011. 20(1): p. 33-46.
- 29) Marlow R., et al. Vascular Robo4 restricts proangiogenic VEGF signaling in breast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(23): p. 10520-5.
- 30) Jones C.A., et al. Slit2-Robo4 signalling promotes vascular stability by blocking Arf6 activity. *Nat Cell Biol*, 2009. 11(11): p. 1325-31.
- 31) Jones C.A., et al. Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability. *Nat Med*, 2008. 14(4): p. 448-53.
- 32) Poul M.A., et al. Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries. *J Mol Biol*, 2000. 301(5): p. 1149-61.
- 33) Pastan I. and FitzGerald D. Pseudomonas exotoxin: chimeric toxins. *J Biol Chem*, 1989. 264(26): p. 15157-60.
- 34) Chaudhary V.K., et al. Activity of a recombinant fusion protein between transforming growth factor type alpha and Pseudomonas toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(13): p. 4538-42.
- 35) Reichert J.M. Antibodies to watch in 2013: Mid-year update. *MAbs*, 2013. 5(4): p. 513-7.
- 36) Mukai Y., et al. Creation of novel Protein Transduction Domain (PTD) mutants by a phage display-based high-throughput screening system. *Biol Pharm Bull*, 2006. 29(8): p. 1570-4.
- 37) Yoshikawa M., et al. Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody-drug conjugates based on the rapid isolation of the anti-Robo4 cell-internalizing antibody. *Blood*, 2013. 121(14): p. 2804-13.
- 38) Walter R.B., et al. Influence of CD33 expression levels and ITIM-dependent internalization on gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity. *Blood*, 2005. 105(3): p. 1295-302.
- 39) Mandler R., et al. Herceptin-geldanamycin immunoconjugates: pharmacokinetics, biodistribution, and enhanced antitumor activity. *Cancer Res*, 2004. 64(4): p. 1460-7.
- 40) Maeda H. SMANCS and polymer-conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. 46(1-3): p. 169-85.

# 応用が広がる DDS

人体環境から農業・家電まで

第1編 人体環境における DDS 医薬の学問的基礎と応用展開

第1章 医学・薬学を中心とした学問的基礎

第10節 がんの診断・治療における DDS

**4** がんのサイトカイン療法とその医薬品化のための DDS

独立行政法人医薬基盤研究所 向 洋平

## 第10節 がんの診断・治療における DDS

### 4 がんのサイトカイン療法とその医薬品化のための DDS

#### 1. はじめに

がんに対する薬物治療は、分子標的治療薬の出現により飛躍的な進歩を遂げた。現在、世界での売上上位の抗がん剤は、分子標的薬に分類されるモノクローナル抗体医薬あるいはチロシンキナーゼ阻害剤のいずれかとなっている。モノクローナル抗体医薬の主な作用メカニズムは、がん増殖に必須のタンパク質の中和、あるいは、特定抗原を発現するがん関連細胞の破壊であり、チロシンキナーゼ阻害剤はがんの増殖に関わるチロシンキナーゼ型受容体のシグナルを遮断することでがん増殖を阻害する。これら既存の抗がん剤は一定のがん種には高い有効性を発揮するものの、未だ高い治療効果が期待できないがんも多数存在するのが現状である。したがって、分子標的治療の枠に留まらず、多様な切り口からの抗がん剤を開発していくことは次世代のがん治療に有効な創薬戦略となる。

この点、生体内で多様な生物活性を有するサイトカインによる免疫制御機構を制がんに利用しようとする「がんのサイトカイン療法」は、微量での切れ味鋭い薬理活性を発揮することからその実用化に大きな期待が寄せられている。しかしながら、血中に安定に存在可能なモノクローナル抗体医薬とは異なり、多くのサイトカインは生体内安定性に乏しく、作用発揮のためには大量頻回投与を余儀なくされ重篤な副作用を引き起こすことが問題となり、実用化は極めて制限されている。そのため、今後、さまざまなサイトカインをがんに対する新規治療薬として開発するためには、体内安定性の克服、体内動態制御といった DDS 技術の開発が不可欠である。

以上の背景から、本稿では、がんに対するサイト

カイン療法の現状と、サイトカインの医薬価値を向上させるための DDS 研究について、がんのサイトカイン療法の候補として期待されるものの、その全身投与時の副作用の克服が実用化の障壁となっている腫瘍壊死因子 TNF に対する研究を中心に触れさせていただく。

#### 2. がんのサイトカイン療法

タンパク性医薬品は、①タンパク質-タンパク質相互作用は複雑かつ広範囲での相互作用であるために作用発現の特異性が高く、副作用につながる非特異的な作用が少ないこと、②体内に存在するヒトタンパク質を用いれば望まない免疫応答を最小限に抑えることができること、③タンパク質異常発現が病因である多くの難治性疾患に対しそのタンパク質の中和や置換等によって直接的な薬物治療が行えること等、低分子有機化合物にはない利点を有しており、近年の医薬品開発における大きな潮流となっている<sup>1)</sup>。標的レセプターを介して多種多様な免疫系を制御（活性化/抑制）するメッセンジャータンパク質であるサイトカインもこのタンパク性医薬品の一翼を担っており、このサイトカイン自身を治療薬と見なす薬物治療をサイトカイン療法と呼ぶ。サイトカインとレセプターの相互作用様式は多くの場合、細胞膜上あるいは分泌されたサイトカインが、別の細胞表面上に存在するレセプターに結合し、そのレセプター依存的な細胞内シグナルが伝わり、免疫応答を引き起こす。がんのサイトカイン療法は、サイトカインの直接的な細胞傷害作用、あるいは、免疫賦活化作用によりがんに対する効率的な免疫応答を引き起こし、がんを排除しようとするものであ



る<sup>2),3)</sup>。

現在、本邦では、血管肉腫および腎がんに対してインターロイキン2 (IL-2) 製剤<sup>4),5)</sup>が、慢性骨髄性白血病およびヘアリー細胞白血病等に対してインターフェロン $\alpha$  (IFN $\alpha$ )<sup>6)~8)</sup>が認可されている。これに加え、欧州では黒色腫に対する治療薬として四肢のみに抗がん剤を循環させる分離式肢灌流法でのTNFの利用<sup>9),10)</sup>が認められている。いずれの治療も20年以上もの歴史を有しており、現在もなお利用し続けられている一方、新たなサイトカインの医薬品化の報告は現在影を潜めているのが現状である<sup>11)</sup>。これは、多様な生理作用を有するサイトカインの大量投与によって重篤な副作用を発揮してしまうこと、主作用と副作用の分離が困難であること等に起因するものと考えられる。そのため近年では、サイトカインそのものを利用する古典的なサイトカイン療法の開発は限界に達しており、DDS技術によって副作用を制御した次世代型のサイトカイン療法の開発が待望されている。

### 3. ファージ表面提示法による人工サイトカインの創製

1970年代に開発されたりコンビナントタンパク質の発現・精製技術により、われわれ人類はDNA配列から人工的にタンパク質を発現・精製することが可能となった。それに伴いタンパク質自身に人為的な変異を加えることでタンパク質の機能を改変することが可能となり<sup>12)</sup>、これまで、産・官・学の多くのバイオ研究機関が、特定レセプターへの親和性や選択性に優れた「生理活性タンパク質のアミノ酸置換体(機能性人工タンパク質)」の創製を精力的に試みている<sup>13)~15)</sup>。しかし、このような変異型タンパク質の多くは点突然変異法によって作製されており、その手法では、まず構造変異体の立体構造や機能をシミュレーションし、トライアル・アンド・エラーで生理活性タンパク質の構成アミノ酸を一つずつ他のアミノ酸に改変することにより、個々の構造変異体を作製しなければならない。そのうえ、それら構造変異体を別々に試験することで機能性人工タンパク質を同定するため、その創製には膨大な時間・労力を費やすばかりか、作製し得る構造変異体の多様性(種類)にも限界がある等、克服すべき課題が多く残されていた。

一方で近年、バクテリオファージの生活環を巧みに利用し、ターゲット(分子・粒子・細胞)への高親和性結合分子を網羅的かつ迅速に探索・同定し得る基盤技術として、ファージ表面提示法<sup>16)~19)</sup>の応用が注目されている。このファージ表面提示法の際だった特徴は、別々の外来性遺伝子産物を表面提示したファージを数億種類以上の多様性に富んだライブラリとして容易に調製可能であり、その中からターゲットに対する高親和性に結合するクローンを迅速に単離・同定可能であること等が挙げられる(図1)。また、単離されたクローンに関してはファージに内封される遺伝子の配列から、提示タンパク質のアミノ酸配列を容易に得ることが可能であるといった圧倒的な利点を有している(図1)。しかしながらこのファージ表面提示法は、現在までのところ特定ターゲットに親和性を有する抗体やペプチドを同定する手段として利用されているにすぎず、そもそもサイトカイン等の生理活性タンパク質をファージ表面に提示させた例すら皆無であった。筆者らの研究グループは以上の点に着目し、ファージ表面提示法を独自に改良することにより数億種類以上もの多様性を有した構造変異タンパク質(生理活性タンパク質のアミノ酸置換体)を一挙に発現させ、この構造変異体ライブラリの中からレセプター親和性や特異性等が向上した「医薬価値に優れた機能性人工サイトカイン」を迅速かつ効率よく同定できる基盤技術を確立した。本技術を応用することで、筆者らはTNFスーパーファミリーに属するTNF<sup>20)~31)</sup>、Lymphotoxin- $\alpha$ <sup>32),33)</sup>、LIGHT<sup>34),35)</sup>に対して、後述の部位特異的バイオコンジュゲーションのためのリジン欠損変異体、生物活性増強変異体、特定のレセプターに対する選択性を有する変異体等を取得しており(表1)、本技術はタンパク質工学によるサイトカインの効率的機能改変法として、広く用いられるにいたった<sup>36),37)</sup>。

### 4. リジン欠損人工TNFに対する部位特異的バイオコンジュゲーション

1980年代以降のDDS医薬品開発の分野において、生理活性タンパク質の生体内安定性を改善するために、ポリエチレングリコール(PEG)等の水溶性高分子をタンパク質に結合させた、いわゆる高分

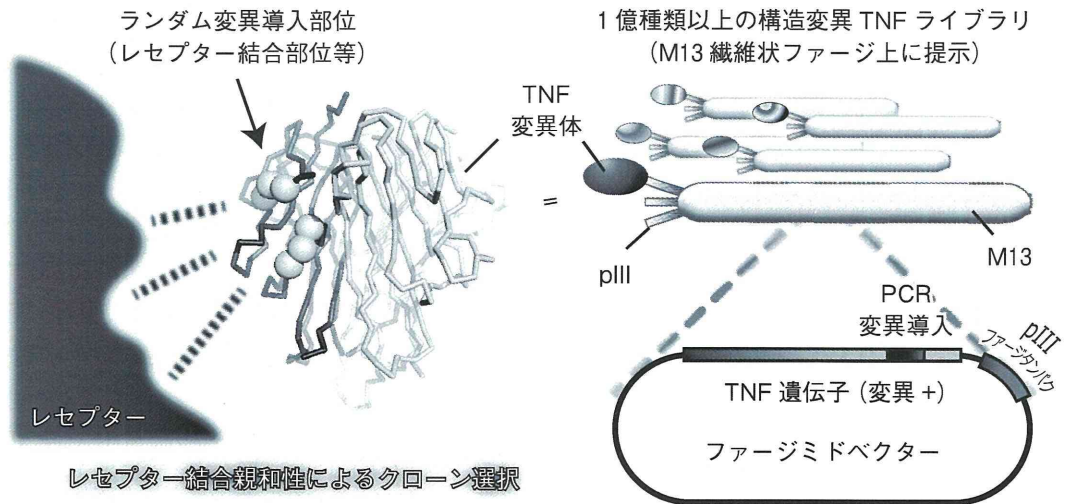


図1 ファージ表面提示法による機能性人工サイトカインの創製

サイトカイン遺伝子中の特定配列（レセプター結合部位等）に全てのアミノ酸をコードするNNS配列（N=A/T/G/C, S=G/C）を導入することでランダム変異を導入する。一般的には6~10アミノ酸を同時に変異させたサイトカイン遺伝子を作成し、ファージミドベクターへとライゲーションする。ファージミドベクターは大腸菌TG1株に形質転換し、その大腸菌からファージを産生させる。ファージミドベクター中でサイトカイン遺伝子はファージ外殻タンパク質 pIII 遺伝子と連結されており、産生されたファージの pIII にサイトカインが融合（提示）された状態となる。多様な遺伝子ライブラリが導入された大腸菌からは、その多様性を反映した（一般的には一億種類以上）の変異サイトカインを提示したファージ集団が産生される。これらファージライブラリからは、レセプターとの結合親和性によるセレクションを繰り返すことで、優れた結合分子を濃縮することができ、再度大腸菌に感染後にモノクローン化することで、個々の変異サイトカインの親和性ならびに生物活性をベースにしたスクリーニングが可能となる。得られたポジティブクローンの配列はファージミドベクターのシーケンスを解析することによって容易に得ることができる。

表1 筆者のグループがこれまで作製した機能性サイトカイン変異体

サイトカイン	機能	Ref.
TNF	リジン欠損変異体	20), 21)
TNF	活性増強変異体、リジン欠損変異体	22)
TNF	TNF レセプター-1 選択的アゴニスト	26), 27)
TNF	TNF レセプター-2 選択的アゴニスト	27), 30)
TNF	TNF レセプター-1 選択的アンタゴニスト	23)~25), 28), 29), 31)
Lymphotoxin- $\alpha$	リジン欠損変異体	33)
Lymphotoxin- $\alpha$	TNF レセプター-1 選択的アゴニスト	32)
LIGHT	リジン欠損変異体	34)
LIGHT	デコイレセプター回避能	35)

子バイオコンジュゲーションが考案されてきた（吉岡らの項を参照）<sup>38)</sup>。このタンパク質のバイオコンジュゲーションは、分子量増大による腎排泄速度の減少、高分子鎖の形成する立体障害によるプロテアーゼ抵抗性の獲得、抗原性および免疫原性の低下により、最終的にはタンパク質の体内安定性を向上させ、投与量・回数を削減可能である。現在、このPEG化を施された医薬品は年々増加しており、古

くは急性リンパ性白血病に対するPEG-アスパラギナーゼ<sup>39)</sup>、C型肝炎に対するPEG-IFN $\alpha$ <sup>40), 41)</sup>、最近ではクローン病や関節リウマチに対するPEG化抗TNF抗体 (Fab) セルトリズマブペゴール<sup>42), 43)</sup>が上市され、いずれのPEG化医薬品も世界的に高い評価を得ている。一方で、このバイオコンジュゲーションをサイトカイン等へ応用しようとした場合、その高分子鎖の形成する立体障害によりレセプ

ターとの結合を阻害してしまい、致命的な比活性低下を引き起こすことが問題視されている。事実、40 kDa の PEG で修飾された IFN $\alpha$  は、PEG の結合によってその生物活性の 93% を失ってしまう<sup>40)</sup>。すなわち、サイトカインに対する通常のバイオコンジュゲーションは、体内安定性の向上という利点と生物活性の喪失との間の微妙なバランスの上に成り立っているといえる。したがって、この致命的問題点を克服することができれば、バイオコンジュゲーション技術はサイトカインの医薬品化に叶う最適 DDS になり得るものと期待される。

これまで汎用されてきたバイオコンジュゲーション法は、アミノ基（リジン残基の有する  $\epsilon$  アミノ基および N 末端の  $\alpha$  アミノ基）をターゲットとしたものである。しかしながら、多くのタンパク質においてリジン残基は高次構造の形成やリガンド-レセプター間結合等にも必須の役割を担っているため、これらリジン残基へのバイオコンジュゲーションは、必然的に著しい比活性低下を招く結果となっている。また修飾高分子のタンパク質への導入はランダムであるため、得られたバイオコンジュゲート体は、タンパク質のさまざまな部位に種々個数の修飾高分子が結合した、分子的に不均一な混合物となる。その結果、バイオコンジュゲート体は比活性や体内挙動、安定性等の機能面でもヘテロな集団になってしまうのである。

この点筆者らは、前述の「ファージ表面提示法による機能性人工サイトカインの創製技術」を応用することで、抗がん剤としての応用が期待される

TNF のリジン欠損体を創製することにはじめて成功した<sup>20)</sup>。このようにタンパク質の活性発現や立体構造維持に必須の役割を担っている全てのリジン残基を欠損させつつも、その生物活性を完全に保持したリジン欠損機能性人工タンパク質を創製し得た例は著者らのグループを除いては皆無であった。TNF は N 末端が活性発現に重要でないことが過去の報告から明らかとなっていたため、N 末端特異的な部位特異的バイオコンジュゲーションは、比活性の低下や分子的不均一性といった従来までのランダム・バイオコンジュゲーションの問題点を一挙に解決可能であると期待された(図 2)。事実、N 末端アミノ基のみを 5 kDa の PEG で修飾した部位特異的モノ PEG 化リジン欠損 TNF ; sp-PEG-mutTNF Lys(-) は 80% 以上の活性を保持している等、圧倒的な利点を有していることが判明した。一方で、野生型 TNF (wtTNF) のリジン残基に対し、わずか 1 分子の 5 kDa PEG が結合したランダムモノ PEG 化 wtTNF ; ran-PEG-wtTNF では、活性発現や立体構造維持に必須の役割を担っていると考えられている Lys11, Lys65, Lys90 への高分子導入による比活性低下は避けることができず、その比活性は約 10% にまで低下していた。この分子的均一性や比活性、収率に優れた部位特異的 PEG 化リジン欠損 TNF は、血中滞留性や抗腫瘍作用の選択的発現能に優れているうえ、従来法で作製したランダム PEG 化 TNF よりも著しく強い *in vivo* 抗腫瘍効果を有していることも見出している<sup>20)~22)</sup>。前述のとおり、抗がん剤としての TNF

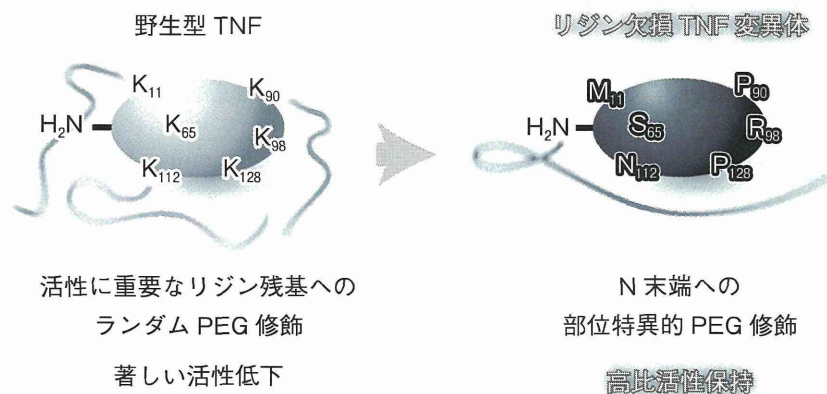


図 2 TNF の N 末端への部位特異的 PEG 修飾

ファージ表面提示法により作成されたリジン欠損 TNF では PEG が N 末端のみに結合するため、活性低下を伴わずに生体内安定性の向上を獲得可能である。



は現在臨床応用に向けた研究を推進中である。

## 5. おわりに

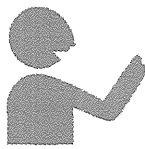
サイトカインは、古くから医薬品化が望まれてきたものの、その生物活性が多様であること、生体内安定性が乏しいこと等が理由となり、医薬品化された例はごく少数に限られている。今回は詳しくは述べることができなかつたが、近年ではモノクローナル抗体とサイトカインの複合体(イムノサイトカイン)という概念が生み出され、標的組織にサイトカインをターゲティングすることでサイトカインの副作用軽減が可能になることが示されている<sup>44)</sup>。実際に、強い副作用のために全身投与ができず使用が分離式肢灌流法に限局される TNF<sup>9), 10), 45), 46)</sup>についても、腫瘍ターゲティング抗体とのイムノサイトカインとすることで新たな臨床試験が実施される可能性は出てくるだろう。このイムノサイトカイン技術や本総説で述べた部位特異的バイオコンジュゲーション技術は、がんのサイトカイン療法において、これまで副作用の大きさから臨床応用が断念されてきた多くのサイトカインに新たな可能性を与える糸口となり得る。今後もこれらの DDS 研究の積極的な推進によって、がんに対するサイトカイン療法の門戸が大きく開かれ、そのがん治療における重要性が増していくことを期待している。

### 【引用・参考文献】

- 1) B. Leader, et al. : *Nat. Rev. Drug Discov.*, **7**, 21 (2008).
- 2) A. Cutler, F. Brombacher : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1056**, 16 (2005).
- 3) M. J. Smyth, et al. : *Immunol. Rev.*, **202**, 275 (2004).
- 4) S. A. Rosenberg : *Cancer J. Sci. Am.*, **6 Suppl 1**, S2 (2000).
- 5) S. A. Rosenberg, et al. : *JAMA*, **271**, 907 (1994).
- 6) J. R. Quesada, et al. : *N. Engl. J. Med.*, **310**, 15 (1984).
- 7) M. Talpaz, et al. : *N. Engl. J. Med.*, **314**, 1065 (1986).
- 8) M. Talpaz, et al. : *Blood*, **62**, 689 (1983).
- 9) J. P. Deroose, et al. : *J. Clin. Oncol.*, **29**, 4036 (2011).
- 10) D. J. Grunhagen, et al. : *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, **3**, 94 (2006).
- 11) G. Walsh : *Nat. Biotechnol.*, **28**, 917 (2010).
- 12) J. A. Brannigan, A. J. Wilkinson : *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 964 (2002).
- 13) X. J. Zhang, et al. : *Protein Eng.*, **8**, 1017 (1995).
- 14) H. Li, et al. : *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1117 (2000).
- 15) M. Onda, et al. : *Bioconjug. Chem.*, **14**, 480 (2003).
- 16) G. P. Smith : *Science*, **228**, 1315 (1985).
- 17) J. McCafferty, et al. : *Nature*, **348**, 552 (1990).
- 18) J. K. Scott, G. P. Smith : *Science*, **249**, 386 (1990).
- 19) T. Clackson, et al. : *Nature*, **352**, 624 (1991).
- 20) Y. Yamamoto, et al. : *Nat. Biotechnol.*, **21**, 546 (2003).
- 21) Y. Yoshioka, et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 808 (2004).
- 22) H. Shibata, et al. : *Clin. Cancer Res.*, **10**, 8293 (2004).
- 23) H. Shibata, et al. : *Cytokine*, **44**, 229 (2008).
- 24) H. Shibata, et al. : *J. Biol. Chem.*, **283**, 998 (2008).
- 25) Y. Mukai, et al. : *J. Biochem.*, **146**, 167 (2009).
- 26) Y. Mukai, et al. : *J. Mol. Biol.*, **385**, 1221 (2009).
- 27) T. Nomura, et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **388**, 667 (2009).
- 28) H. Shibata, et al. : *Biomaterials*, **30**, 6638 (2009).
- 29) T. Nomura, et al. : *Pharmazie*, **65**, 93 (2010).
- 30) Y. Abe, et al. : *Biomaterials*, **32**, 5498 (2011).
- 31) T. Nomura, et al. : *J. Control. Release.*, **149**, 8 (2011).
- 32) Y. Yoshioka, et al. : *Biomaterials*, **31**, 1935 (2010).
- 33) S. Narimatsu, et al. : *Cytokine*, **56**, 489 (2011).
- 34) T. Morishige, et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **393**, 888 (2010).
- 35) T. Morishige, et al. : *Biomaterials*, **31**, 3357 (2010).
- 36) E. Kalie, et al. : *J. Biol. Chem.*, **282**, 11602 (2007).
- 37) K. Yamamoto, et al. : *J. Interferon Cytokine Res.*, **29**, 161 (2009).
- 38) F. M. Veronese, G. Pasut : *Drug Discov. Today*, **10**, 1451 (2005).
- 39) M. L. Graham : *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**, 1293 (2003).
- 40) P. Bailon, et al. : *Bioconjug. Chem.*, **12**, 195 (2001).
- 41) Y. S. Wang, et al. : *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 547 (2002).
- 42) N. Goel, S. Stephens : *MAbs*, **2**, 137 (2010).
- 43) G. Y. Melmed, et al. : *Nat. Rev. Drug Discov.*, **7**, 641 (2008).
- 44) N. Pasche, D. Neri : *Drug Discov. Today*, **17**, 583 (2012).
- 45) T. Moritz, et al. : *Cancer Immunol. Immunother.*, **29**, 144 (1989).
- 46) W. E. Aulitzky, et al. : *Eur. J. Cancer*, **27**, 462 (1991).

〈向 洋平〉





## 話 題

# ポリγグルタミン酸ナノ粒子により形成される ER-endosome fusionとそれを介した 抗原のクロスプレゼンテーション\*

向 洋 平\*\* 中 川 晋 作\*\*

**Key Words** : poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticle, ER-endosome fusion, vaccine adjuvant, cross-presentation

### はじめに

本邦における死因の第1位は悪性新生物(癌)であり, 三大標準療法(外科療法・化学療法・放射線療法)の目覚ましい発展にもかかわらず, 癌による死亡者数は増加の一途を辿っている。周知のとおり, 癌の治療には外科的療法が第一選択となるが, 転移を併発する重度の癌の場合, 外科的手術で摘出できない転移巣に対応するため, 化学療法などの薬物治療や放射線療法が重要な役割を担う。近年, モノクローナル抗体医薬や分子標的医薬の台頭によって, いくつかの癌に対しては根治も夢ではなくなりつつあるものの<sup>2)</sup>, いまだ既存の化学療法・放射線療法では治療が難しい癌種は数多く存在しているのが現状である。したがって, 本現状を打破するためには, 現存する癌治療を含め, さまざまな角度から癌の根治を目指す研究開発が必要不可欠となる。本観点から近年, 患者自らの免疫系を効率的に駆動することで全身的な癌の排除を達成しようとする癌ワクチン療法に注目が集まっている<sup>3)4)</sup>。

癌ワクチン療法とは, 癌細胞を特異的に認識・攻撃する免疫応答, いわゆる腫瘍免疫によって

癌を征圧する治療法であり, 近年の研究において化学療法抵抗性の患者に対してもその有効性が実証されつつある<sup>5)6)</sup>。この腫瘍免疫誘導においては, ①免疫系の司令塔である抗原提示細胞(APC)に腫瘍関連抗原(TAA)を効率よく送達することで, ②主要組織適合性複合体(MHC)クラスI抗原提示を強力に誘導し, ③MHCクラスI抗原提示により活性化された細胞傷害性T細胞(CTL)により抗原特異的な抗腫瘍効果を発揮する, というメカニズムが有望視されている<sup>7)</sup>。しかし, TAAやTAA由来ペプチドをそのままの形で投与するだけでは生体内での拡散・分解を避けることはできず, 十分な腫瘍免疫の誘導には至らない。したがって, 十分な腫瘍免疫誘導を達成するためには, TAAをAPCへと効率よく送達可能な抗原送達キャリアの開発が必要である<sup>8)</sup>。

この点, 著者らの研究グループでは, APCが直径30nm~数 $\mu$ mの微粒子を効率よく取り込むという性質<sup>9)10)</sup>を利用し, ポリγグルタミン酸を素材としたナノ粒子〔ポリγグルタミン酸ナノ粒子( $\gamma$ PGA NP)〕<sup>11)~13)</sup>の抗原送達キャリアとしての有用性を検証してきた<sup>14)~19)</sup>。本研究を通じ, 著者らは, この $\gamma$ PGA NPが効率的にCTLを誘導し強力な腫瘍免疫を誘導可能であること<sup>16)~19)</sup>,

\* The antigen cross-presentation via the ER-endosome fusion induced by the poly  $\gamma$ -glutamic acid nanoparticle.

\*\* Yohei MUKAI, Ph.D. & Shinsaku NAKAGAWA, Ph.D.: 大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6); Department of Biotechnology and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, JAPAN

\*\*\* 独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト