

氏 名（本籍）	たけ 竹	むら 村	しん 真	いち 一
学位の種類	博 士（医 学）			
学位記番号	医 博 第 1 7 7 4 号			
学位授与年月日	平 成 13 年 3 月 26 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）外科学系専攻			
学位論文題目	変異型 SEA を融合した抗 MUC1×抗 CD3 二重特異性 diabody による特異的胆管癌養子免疫療法の研究			

（主 査）

論文審査委員	教授 松 野 正 紀	教授 土 屋 滋
	教授 金 丸 龍之介	

論文内容要旨

【研究目的】

臨床的に遭遇する胆管癌のほとんどは進行例で集学的治療を必要とする。教室では非特異的抗腫瘍効果を有する T-LAK 細胞を用いた養子免疫療法に着目し、Bispecific 抗体 (BsAb) を用いた養子免疫療法の基礎検討を行い、著明な抗腫瘍効果を得た。しかし化学的に合成した BsAb は低収量・高価・ヒト免疫原性など臨床応用をはかる上で問題があった。これらを解決すべく、遺伝子工学的手法を用いて recombinant BsAb の一種である diabody を大腸菌発現系で作製、臨床応用への可能性を検討した。

【研究方法】

標的分子として胆管癌に高頻度に発現する腺癌関連抗原 MUC1 を選択し、抗 MUC1 抗体 MUSE11 および抗 CD3 抗体 OKT3 の bispecific diabody (Mx3 diabody) を大腸菌発現系で作製した。MUC1 陽性胆管癌細胞株 TFK-1 に対する機能および T-LAK 細胞を effector 細胞とした抗腫瘍効果を評価した。

また、細菌性 superantigen の一種である野生型 SEA (SEAwt) は MHC class II, TCR V β と結合し、T 細胞を強力に活性化する immunostimulator である。しかし、生体内に投与した際、class II 発現の高い肺などの組織に集積し cytokine の過剰産生から shock を誘発する危険性がある。そこで SEAwt の MHC class II への結合能を低下させ、副作用の軽減を目指した変異体 SEA D227A を作製し、Mx3 diabody の抗腫瘍効果を増強させるために、Mx3 diabody に SEA D227A を fusion させた SEA D227A-Mx3 diabody を構築した。これを大腸菌発現系で作製し、*in vitro* および *in vivo* における Mx3 diabody との機能の差を検討した。

【研究結果】

Mx3 diabody および SEA D227A-Mx3 diabody は、大腸菌菌体内不溶性蛋白を refolding することにより作製に成功した。Mx3 diabody, SEA D227A-Mx3 diabody とともに MUC1 および CD3 陽性細胞への結合は flow cytometry で確認した。また、T-LAK 細胞を effector 細胞とし、MUC1 陽性胆管癌細胞株 TFK-1 に対する抗腫瘍効果を MTS assay 法による生細胞数測定法にて検討したところ、いずれも濃度依存性の抗腫瘍効果を示した。特に SEA D227A-Mx3 diabody は Mx3 diabody よりも低濃度で優れた抗腫瘍効果を示した。また、SEA D227A は SEA wt に比し MHC class II への結合能の低下を認めるものの、末梢血リンパ球 (PBMC) に対する増殖

促進能は十分に保持されており、SEA D227A-Mx3 diabody は PBMC を effector 細胞とした場合でも *in vitro* で十分な抗腫瘍効果を得た。更に SCID マウスの TFK-1 担癌モデルに対して、T-LAK 細胞を effector 細胞として *in vivo* での治療実験を行ったところ、SEA D227A-Mx3 diabody 投与群で著明な抗腫瘍効果を認め、50%のマウスで腫瘍の完全消失を認めた。

【結 論】

今回作製した SEA D227A-Mx3 diabody は SCID マウス担癌モデルでも著明な抗腫瘍効果を示した。*in vitro* と *in vivo* の実験結果を考慮すると、SEA D227A-Mx3 diabody は 1) 非特異的な抗腫瘍効果を有する T-LAK 細胞を MUC1 陽性腫瘍細胞に誘導する、2) 腫瘍局所での T-LAK 細胞の活性を維持する、3) さらに腫瘍局所に浸潤している T 細胞の免疫活性を賦活・維持する、という 3 つの機能を有しており、臨床の場においてもその有用性が期待できる recombinant bispecific 抗体である。

【研究の意義・独創的な点】

今回作製した Mx3 diabody および SEA D227A-Mx3 diabody は 腺癌関連抗原 MUC1 を認識する初めての bispecific diabody である。また、その作製方法も、独自の蛋白質 refolding 系を用いることにより菌体内の不溶性蛋白質から diabody を大量に得ることに成功した。diabody と SEA のような immnstimulator との融合蛋白質の作製も初めてのものであり、これにより *in vitro* のみならず *in vivo* でも MUC1 特異的で強力な抗腫瘍効果を有する recombinant bispecific 抗体を作製できたことが独創的な点である。

審査結果の要旨

教室では進行胆管癌に対する集学的治療の一環として、非特異的抗腫瘍効果を有する T-LAK 細胞と Bispecific 抗体 (BsAb) を用いた養子免疫療法の基礎検討を行い、著明な抗腫瘍効果を得た。今回、recombinant BsAb の一種である diabody を大腸菌発現系で作製、臨床応用への可能性を検討した。

標的分子として胆管癌に高頻度に発現する腺癌関連抗原 MUC1 を選択し、抗 MUC1 抗体 MUSE11 および抗 CD3 抗体 OKT3 の bispecific diabody (Mx3 diabody) を大腸菌発現系で作製した。更に、細菌性 superantigen の一種である SEA の変異体 SEA D227A を作製し、Mx3 diabody の抗腫瘍効果を増強させるために、Mx3 diabody に SEA D227A を fusion させた SEA D227A-Mx3 diabody を構築した。これを大腸菌発現系で作製し、MUC1 陽性胆管癌細胞株 TFK-1 に対する機能を *in vitro* および *in vivo* で検討した。

大腸菌菌体内不溶性蛋白を refolding することにより作製した Mx3 diabody, SEA D227A-Mx3 diabody は、ともに MUC1 および CD3 陽性細胞への結合が flow cytometry で確認した。また、T-LAK 細胞を effector 細胞とし、TFK-1 に対する抗腫瘍効果を *in vitro* にて検討したところ、いずれも濃度依存性の抗腫瘍効果を示し、特に SEA D227A-Mx3 diabody は低濃度で優れた抗腫瘍効果を示した。また、SEA D227A-Mx3 diabody は末梢血リンパ球 (PBMC) を effector 細胞とした場合でも *in vitro* で十分な抗腫瘍効果を得た。更に SCID マウスの TFK-1 担癌モデルに対して、T-LAK 細胞を effector 細胞として *in vivo* での治療実験を行ったところ、SEA D227A-Mx3 diabody 投与群で著明な抗腫瘍効果を認め、50%のマウスで腫瘍の完全消失を認めた。

今回作製された SEA D227A-Mx3 diabody は *in vitro* のみならず *in vivo* でも MUC1 特異的で強力な抗腫瘍効果を有する recombinant bsAb であり、特に SCID マウス担癌モデルでも強力な抗腫瘍効果を示した。臨床の場においてもその有用性が期待できる recombinant bispecific 抗体であるという意味で学位論文に値する重要な研究といえる。