

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 576 号	学位申請者	横田 璃里	
審査委員	主査	久保田 龍二	学位	博士 (医学)
	副査	池田 正徒	副査	草野 秀一
	副査	橋口 照人	副査	濱田 季之

主査および副査の5名は、令和2年8月17日、学位申請者 横田璃里 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) PBMCの結果でコントロールでも死細胞があるようだが、一般的にそれは見られるものなのか。

(回答) 凍結のPBMCを解凍後そのまま使用したので、どうしても一部死細胞は確認されると思われる。

質問2) DM1は健常者のPBMCに対して感受性が高いようだが、抗がん剤はがん細胞に選択的に効果をもつものではないのか。

(回答) DM1は選択性をあまり持たず細胞の種類に関わらず殺傷能力が高い薬剤である。そのためT-DM1のようにADCとして使用されており、単剤で用いられることはほとんどない。

質問3) DM1よりがん細胞のみに効果をもつ抗がん剤をADCにしたら良いのではないのか。

(回答) より選択性の高いADCになる可能性があるので試してみたいと考える。

質問4) ホジキンリンパ腫でCD70に対するADCが成功していないのに、なぜ今回同じターゲットのADCを開発しようとしたのか。

(回答) 今回は薬剤のコンジュゲートの仕方が特殊なので、試してみたいと考えた。

質問5) CCAP法でFcのコンジュゲート部位は1ヶ所のみなのか。

(回答) 重鎖のCH2とCH3の間2ヶ所に結合が可能である。

質問6) リジン残基は1か所のみ存在するのか。

(回答) リジン残基自体は複数存在するが、このペプチドがコンジュゲート出来る距離まではまり込むリジン残基はこの部位のみになる。

質問7) 細胞によってDM1単剤の殺傷能力とADCの感受性に関係性はあるのか。

(回答) その相関は見られていない。

質問8) CD70の発現量とADCの効果(IC<sub>50</sub>値)についての関係はどうか。

(回答) 発現量が多いと効きやすい可能性はあるが、その関係性は確認できていない。

質問9) DM1はコンジュゲートに使いやすい薬剤なのか。

(回答) はい。先駆体のメイタンシンにチオール基を導入して、コンジュゲートの際にマレイミドと反応できるように作られている薬剤である。

質問10) ADCで使う薬剤はそういう改変が必要なのか。

(回答) 基本的には必要である。今回のCCAP法では、抗体とのリンカーとなるペプチドにDM1をコンジュゲートするための残基は必要になる。もともと結合に使うチオールないしマレイミド基を持っているか、それを導入し

## 最終試験の結果の要旨

た上で薬剤自身の毒性を保持できるものであれば使用できる。

質問 1 1) DM1 以外にコンジュゲートしてみたい薬剤はあるか。

(回答) 以前、接着細胞の ADC に使用したときに殺傷能力が高かったので、MMAE を試してみたいと思う。

質問 1 2) HPLC の ADC の 1 価と 2 価のピークがブロードに重なっているが、1 回で分取できるものなのか。

(回答) 重なっている部分を取らないよう、ピークの先端の狭いフラクションのみで分取を行っている。

質問 1 3) 今回の反応で使用したペプチド量 (0.9 mg) は ADC を作製して本研究で使用するのに十分な量なのか。

(回答) In vivo の実験を行うには足りないが、アッセイや In vitro の実験のみでは十分な量である。

質問 1 4) CCAP 法で作製したペプチドは抗体と反応する際のバッファーで反応性が落ちるのではないか。

(回答) その通りである。今回のペプチドは溶解するバッファーの pH や抗体とのモル比、DMSO の割合で反応性がかなり異なるので、多くの検討を行い、最適条件を検討した。

質問 1 5) 今回の抗体は細胞内部に取り込まれているが、他の一般的な抗体と比較して取り込まれやすいのか。

(回答) 以前 B 細胞で CD20 をターゲットに ADC を作製したときはほとんど全く取り込まれなかったもので、それと比べると今回の抗体はかなり取り込まれやすいと考える。

質問 1 6) 抗体の HPLC でピークが複数確認できている理由は何か。

(回答) 今回の抗体は自分で作製・精製したため、立体構造が不安定だと推定される。CCAP でコンジュゲート体にする事でこの構造は安定することが分かっている。

質問 1 7) MT-2 だけ DM1 の細胞増殖抑制効果が無い理由は何か。

(回答) 理由は不明である。MT-2 に関しては薬剤濃度を 200 nM まで検討したが、細胞に影響はみられなかった。

質問 1 8) Fc 部位にコンジュゲートを行っているが、Fc 部分は単球系の Fc レセプターには結合しないのか。

(回答) 結合する可能性はあるが、詳細は不明である。

質問 1 9) ADC が標的的特異的に結合することはフローサイトメーターで確認しているか。

(回答) 確認してる。

質問 2 0) トリプシン処理で細胞表面の抗体は取れるものなのか。その割合はどの程度か。

(回答) 論文などでそのように実験しているものが複数見られるので一般的な手法だと考える。割合は不明である。

質問 2 1) PBMC の実験で ATL 特異的と言っている理由は何か。

(回答) DM1 単剤では健常者の PBMC の方が感受性が高いのに対し、ADC にすることで健常者 PBMC の死細胞率を大幅に低減できているためである。

質問 2 2) AnnexinV は現在起こっているアポトーシス細胞は評価できるが、それまでに死んだ細胞は評価できない。

この点を考慮して ATL 細胞に対する ADC の効果を評価しているのか。

(回答) 今回はサンプルが少なかつたため、経時変化などは見ることが出来ず総細胞数もカウントしていない。次回以降の実験ではアッセイ期間中の死細胞も含めて確認を行いたい。

質問 2 3) CD70 の ADC を使用することで生体内で免疫抑制が起こる可能性はないのか。

(回答) NF $\kappa$ B 経路などが遮断されるので可能性はある。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。