

## 次世代抗体医薬としてのポテリジェント抗体

設 楽 研 也

## Potelligent Antibodies as Next Generation Therapeutic Antibodies

Kenya SHITARA

Strategic Product Planning Department, Kyowa Hakko Kirin Co. Ltd., 1-6-1 Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, Japan

(Received August 5, 2008)

Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), a lytic attack on antibody-targeted cells, is triggered upon binding of lymphocyte receptors (FcγRs) to the antibody constant region. ADCC is considered to be a major therapeutic function of antibodies. ADCC requires the presence of oligosaccharides in the Fc region and is sensitive to change in the oligosaccharide structure. We have demonstrated that fucose is the most critical IgG1 oligosaccharide component, and the removal of fucose from IgG1 oligosaccharides results in a very significant enhancement of ADCC and anti-tumor activity *in vivo*. Many therapeutic antibodies approved or clinical development are produced using Chinese hamster ovary (CHO) cells that express high level of α1,6-fucosyltransferase and consequently produce highly fucosylated antibodies. We have established the fucosyltransferase knockout CHO cells which could stably produce non-fucosylated antibodies, designated as Potelligent antibodies. Potelligent antibodies show potent ADCC upon target cells through the effective and antigen-specific activation of NK cells due to augmented binding to FcγRIIIa. Moreover, Potelligent antibodies can evade the inhibitory effect of plasma IgG on ADCC through its high FcγRIIIa binding. Thus, the application of Potelligent antibodies is expected to be a promising approach as next-generation therapeutic antibodies with improved efficacy, even when administered at low doses in humans *in vivo*.

**Key words**—antibody; antibody-dependent cellular cytotoxicity; oligosaccharide; fucose

## 1. はじめに

近年の抗体工学の進歩により、ヒトに対する抗原性が低く、臨床応用可能な遺伝子組換え抗体の作製が可能となった。米国では20種類以上の抗体が医薬品として販売されており、抗体は新しい医療分野を開拓しつつある。引き続き多くの抗体医薬が承認される見込みである。しかし、抗体医薬は従来の低分子医薬に比べ生産にコストが掛かるため値段が高い欠点があり、コスト低減が抗体医薬のさらなる普及のための重要な課題となっている。抗体医薬のコスト低減の一手段として、抗体を改変して薬効を高めるアプローチが注目されている。抗体の薬効の向上は、コスト低減以外にも抗体の臨床効果を高める効果が期待される。

このような状況の中で、筆者らは、IgG型抗体のFc領域に結合しているN型複合型糖鎖からフコースを除去することで、抗体の抗腫瘍メカニズムとして注目されている抗体依存性細胞傷害活性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC 活性) を大幅に高めることができることを発見した。フコース除去によるADCC活性増強メカニズムの解析、薬効評価を進め、併せて高ADCC活性型の低フコース抗体を製造する技術を開発した。

## 2. 抗体の薬効を高める工夫

抗体医薬の高い製造費の問題とともに、抗体医薬の薬効はかならずしも十分ではなく抗体の薬効を高める新しい技術の研究開発が活発となっている。抗体の薬効を高めることができれば、臨床効果を高める効果、投与する抗体量を減らすことによる薬剤費の低下が期待される。抗体の薬効メカニズムは大きく4つに分類することができる (Fig. 1)。1つ目は、ターゲット分子が病態形成に重要な機能を有しており、中和型抗体によりターゲット分子の機能を

協和発酵キリン㈱製品戦略部 (〒100-8185 東京都千代田区大手町 1-6-1)

e-mail: kenya.shitara@kyowa-kirin.co.jp

本総説は、日本薬学会第128年会シンポジウムS14で発表したものを中心に記述したものである。

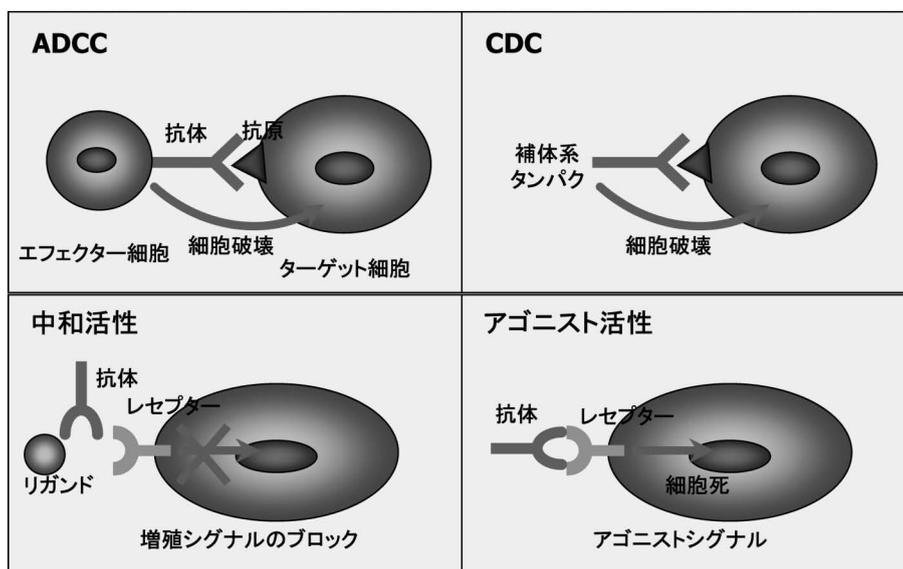


Fig. 1. Mechanism of Therapeutic Antibodies

ADCC (upper left), CDC (upper right), neutralizing activity (lower left) and agonistic activity (lower right) are major mechanisms.

阻害することで薬効発揮をねらうものである。中和型抗体の例として、炎症領域では抗 TNF $\alpha$  キメラ抗体 infliximab, がん領域では抗 VEGF ヒト化抗体 bevacizumab が挙げられる。2つ目は、ターゲット分子が細胞の生存に関する重要な機能を持つレセプター分子であり、アゴニスト活性を有する抗体により細胞死シグナルを誘導しターゲット細胞の破壊をねらうものである。3つ目、4つ目は、がん細胞の表面に発現している抗原に抗体が結合し、抗体が有する免疫機能を利用してがん細胞を破壊するものである。免疫機能としては、ADCC および補体依存性傷害活性 (Complement-dependent cytotoxicity ; CDC) が重要である。ADCC あるいは CDC が重要な抗体の実例としては、非ホジキンリンパ腫適応の抗 CD20 キメラ抗体 rituximab, 乳がん適応の抗 Her2 ヒト化抗体 trastuzumab が挙げられる。抗体の薬効を高める研究は主に ADCC, CDC 活性の増強を目指した研究が盛んである。

### 3. ADCC 活性の重要性

ADCC 活性とは、ターゲット細胞に結合した抗体に NK 細胞やマクロファージなどのリンパ球がエフェクター細胞として結合し、抗体依存的にターゲット細胞を傷害する活性である。ADCC は、われわれの体の重要な生体防御機構の1つである。抗体の抗腫瘍効果のメカニズムとして ADCC 活性に加えて、CDC 活性、アポトーシス誘導活性、アゴニ

スト活性などの重要性が指摘されているが、臨床などのメカニズムが最も重要なのか明らかとなっていなかった。最近になり、臨床上有効な抗体である rituximab 及び trastuzumab のマウスでの抗腫瘍効果のメカニズムが解析された結果、Fc 受容体が抗腫瘍活性発現に非常に重要であったことから、ADCC 活性が脚光を浴びている。<sup>1)</sup> さらに、ADCC 活性の重要性は臨床試験の結果からも示唆され始めている。ヒトの Fc $\gamma$  受容体 IIIa には、158 番目のアミノ酸がバリンであるタイプ (Val タイプ) とフェニルアラニンであるタイプ (Phe タイプ) の遺伝子多型が存在する。Cartron らは、抗 CD20 キメラ抗体 rituximab の非ホジキンリンパ腫に対する臨床試験を実施し、Fc $\gamma$  受容体 IIIa の多型との関係を分析した結果、ADCC 活性が高い Val タイプの Fc $\gamma$  受容体 IIIa を2つのアレルに有する患者は、ADCC 活性が低い Phe タイプの Fc $\gamma$  受容体 IIIa を一方のアレルに有する患者より rituximab の抗腫瘍効果が優れていた。<sup>2)</sup> Trastuzumab による乳がん治療においても小規模な臨床検討ではあるが ADCC 活性と trastuzumab の治療効果が相関する結果が報告された。<sup>3)</sup> これらの結果は、抗体による患者の治療においても ADCC 活性が非常に重要な役割を有していることを示しており、さらには抗体の ADCC 活性を増強することができればより高い抗腫瘍効果が期待できることを示唆している。

#### 4. 糖鎖制御により ADCC 活性を増強するアプローチとポテリジェント技術

**4-1. 抗体の糖鎖構造と ADCC 活性** ADCC 活性の重要性が明らかとなるに従い、抗体の ADCC 活性を増強させるアプローチが注目されている。ADCC 活性を増強するアプローチとしては、抗体の Fc 領域のアミノ酸配列を改変するもの<sup>4)</sup>と抗体の糖鎖構造を制御するものの2つの手法が報告されている。<sup>5-7)</sup> アミノ酸を改変した抗体は、ヒトの体に存在しない人工型のアミノ酸配列を有することから、ヒトに投与した際に抗原性が問題になるリスクを負っている。

抗体の糖鎖構造は Fig. 2 に示すように、Mannosyl-chitobiose Core 構造を基本構造とする N 型複合型糖鎖であり、末端のガラクトース、バイセクティング N アセチルグルコサミン、シアル酸の有無、根元のフコースの有無のバリエーションが報告されている。抗体の糖鎖は CH2 ドメインの内側を向いており CH2 ドメインの三次構造の維持に係わっている。また、糖鎖はエフェクター機能発現に重要であり、糖鎖がないと ADCC 活性は消失してしまう。以前より抗体糖鎖の微細な構造と ADCC 活性の相関が研究されてきた。中でもバイセクティング N アセチルグルコサミンが付加した糖鎖を持つ抗体の ADCC 活性は 10-20 倍増強することが報告され注目されてきた。<sup>5)</sup>

抗体の N 型複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンへのフコースの付加修飾に関してはこれまで注目されていなかったが、このフコース残基の付加こそが抗体の ADCC 活性に最も大きな影響を

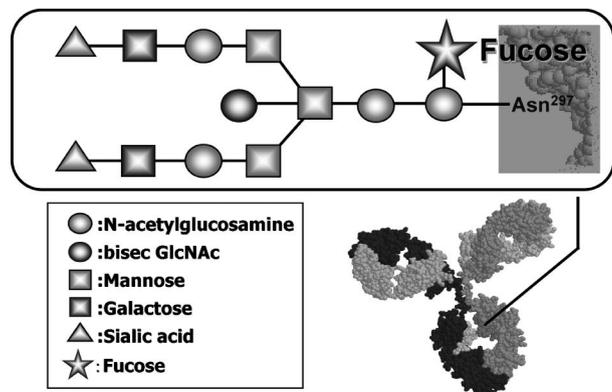


Fig. 2. Basic Oligosaccharide Structure of IgG

与えることを、われわれ及び Shields らが明らかにした。<sup>6,7)</sup> 同じ抗体遺伝子の発現ベクターを導入しても、取得された抗体の ADCC 活性はその抗体を生産した宿主細胞によって大きく異なる。タンパク質部分のアミノ酸配列には相違は観察されないことから、糖鎖構造の違いにその原因があるのではないかと考え詳細な解析を行ったところ、偶然にも抗体糖鎖のフコース含量と ADCC 活性の間に負の相関関係があることが分かった。また、ADCC 活性の高い抗体の生産が可能な宿主細胞では、N 型複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンへのフコースの付加修飾を触媒する  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) の活性が低く、FUT8 を人為的に過剰発現させることで産生抗体の ADCC 活性を著しく低下させることができた。一方、フコースの有無とバイセクティング N アセチルグルコサミン有無を同時に比較した結果、バイセクティング N アセチルグルコサミンを付加する効果による ADCC 活性増強はわずかに数倍程度であるのに対し、フコースがない効果による ADCC 増強は 50-1000 倍と顕著であることを見出した (Fig. 3)。<sup>7)</sup>

以上のような結果から、抗体糖鎖の微細構造のうちフコースが ADCC 活性に最も大きな影響を与えており、糖鎖中のフコースを除去することで抗体の ADCC 活性を顕著に増強可能であることが明らかとなった。フコース除去による ADCC の増強技術をポテリジェント技術、低フコース抗体をポテリジェント抗体と命名した。

アミノ酸改変抗体には抗原性のリスクがあることを上述したが、フコース修飾のない抗体はヒト血清中にもマイナー成分ではあるが存在することが知ら

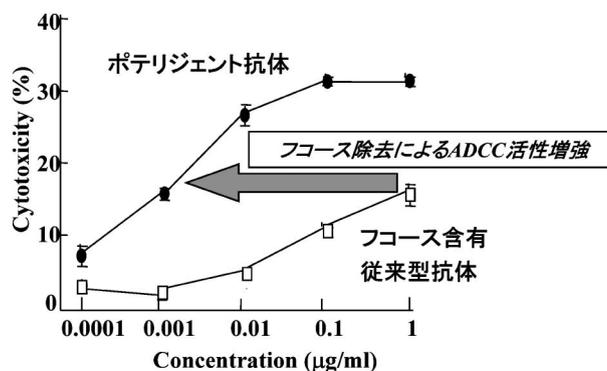


Fig. 3. Enhanced ADCC Activity of IgG by Fucose Removal

れており,<sup>8)</sup> 決して人工的な糖鎖構造という訳ではない。したがって、ポテリジェント抗体を抗体医薬として投与しても抗原性の心配はないと思われる。なお、フコースが結合している抗体とフコースが結合していない抗体の生理的意義については未解明である。

**4-2. ポテリジェント抗体の製造技術** 抗体医薬は動物細胞を用いて生産されているが、スケールアップ可能な堅牢な製造プロセスを構築可能である実績のある動物細胞は、チャイニーズハムスター卵巣由来 CHO 細胞、マウスミエローマ由来 NS0 細胞あるいは SP2/0 細胞の 3 種に集約している。しかしながら、これらの細胞の生産する抗体はフコース含量が 80% 以上の高フコース抗体であり、ADCC 活性が非常に低いタイプである。そこで次に、最も実績ある宿主細胞として CHO 細胞を選択し、ポテリジェント抗体を製造する方法について検討を加えた。CHO 細胞は N 型複合型糖鎖の  $\alpha$ 1-6 フコース転移を触媒する FUT8 酵素活性が高い。そこで、FUT8 活性を完全に抑制するため、相同組み換え法により CHO 細胞の FUT8 遺伝子を破壊した FUT8 ノックアウト細胞を樹立した。FUT8 遺伝子ノックアウト細胞では産生抗体へのフコース修飾はみられず、ADCC 活性が顕著に増強した抗体の生産が可能となった (Fig. 4).<sup>9)</sup> FUT8 遺伝子ノックアウト細胞を用いた 1 L スケールの培養検討を行った結果、無タンパク培地を用いたフェッドバッチ培養により 14 日間で 1 グラムを超える抗体が培地中に蓄積し、<sup>10)</sup> 抗体生産宿主として利用可能であると判断された。また、最近注目されている RNAi

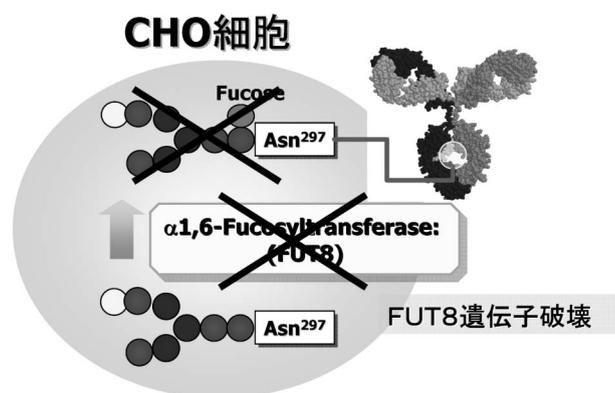
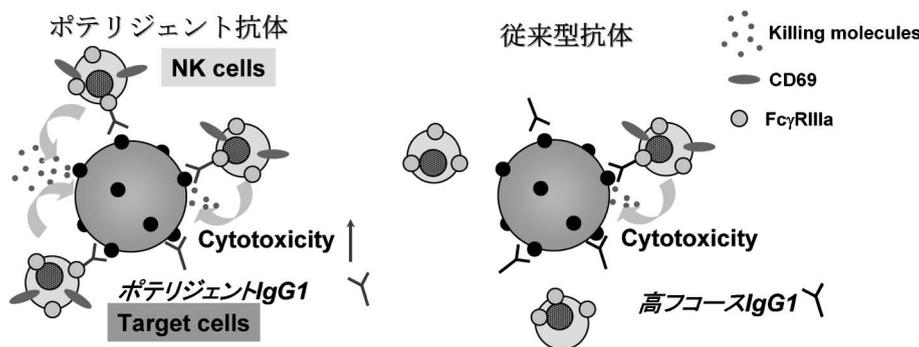


Fig. 4. Production of 0% Fucose Antibody by  $\alpha$ 1,6-Fucosyltransferase (FUT8) Knock Out CHO Cells

の手法を用いて、既に確立済みの抗体生産細胞をポテリジェント抗体を生産する細胞に変換する糖鎖制御技術の確立にも成功した。<sup>11)</sup>

**4-3. ポテリジェント抗体の ADCC 活性増強のメカニズム** ポテリジェント抗体がなぜ ADCC 活性を増強できるかについて解析した結果、抗体のポテリジェント化により Fc $\gamma$  受容体 IIIa への結合アフィニティーが上昇していることを確認した。<sup>12,13)</sup> 次に、ヒト末梢血の白血球を分画してエフェクター細胞を解析した結果、ポテリジェント抗体により高い ADCC 活性を示すエフェクター細胞は NK 細胞であった。<sup>13)</sup> ポテリジェント化により抗体は NK 細胞上の Fc $\gamma$  受容体 IIIa への結合アフィニティーが上昇することで、抗体を介して NK 細胞が効率よくターゲット細胞に結合することができ、さらに抗原特異的に NK 細胞を効率よく活性化できることを確認した。<sup>13)</sup> 従来抗体に比べてポテリジェント抗体では活性化 NK 細胞がより多くターゲット細胞に結合することで高い ADCC 活性を示すものと推定している (Fig. 5)。さらに、ポテリジェント抗体と Fc $\gamma$ R IIIa の結合を熱力学的及び速度論的に解析した結果、ポテリジェント抗体による Fc $\gamma$ R IIIa へのアフィニティー上昇はエンタルピー駆動でありかつ結合速度定数の増加に起因していた。<sup>12)</sup> ポテリジェント化により抗体の Fc $\gamma$ R IIIa への結合アフィニティーが上昇するメカニズムを立体構造情報に基づき議論するため、フコース結合 Fc フラグメント及びフコース非結合 Fc フラグメントの X 線結晶構造を解析し、比較を行った。<sup>14)</sup> その結果、フコース結合 Fc フラグメント及びフコース非結合 Fc フラグメントの立体構造はフコースのあるなしを除けば非常によく似ており、フコース以外の細かい違いは 296 番目のチロシン残基周辺の水分子の結合数と位置であった。フコースがなくても Fc フラグメントの立体構造がほとんど変化しないことは予想外の結果であり、フコースがなくなることによるわずかな立体構造の違いにより ADCC が顕著に増強するメカニズムについてはさらなる解析が必要である。

**4-4. ポテリジェント抗体の優位性** 次に、ADCC 活性の増強したポテリジェント抗体にどのような優位性が期待できるか検討を加えた。上述のように rituximab の治療では効果ので難い Fc $\gamma$  受容体 IIIa の遺伝子多型が問題となっており、すべての



#### ポテリジェント抗体

1. 高フコース抗体と同じアフィニティーおよび特異性を示しターゲット細胞に結合
2. 高フコース抗体に比べ高いアフィニティーでFcγRIIIaに結合
3. 高フコース抗体に比べ多くのNK細胞に結合
4. 高フコース抗体に比べ多くのNK細胞を抗原依存的に活性化
5. 高フコース抗体に比べ高いADCC活性を示す

Fig. 5. Deduced Mechanism of Enhanced ADCC Activity of Potelligent Antibody

遺伝子型に対し ADCC 活性を増強できる抗体医薬が望まれている。市販の rituximab とポテリジェント型 rituximab を比較した結果、ポテリジェント抗体は Fcγ 受容体 III a の 158 番目のアミノ酸の遺伝子多型に係わらず高い親和性を示し、すべてのドナーで例外なくポテリジェント抗体は市販の rituximab が示す ADCC 活性よりも強い ADCC 活性を惹起できた。<sup>15)</sup> また、抗体の ADCC 活性はターゲット細胞上に発現する抗原数と正相関することが明らかとなっており、従来型抗体では高い ADCC 活性を誘導するためには細胞当たり  $10^5$  個以上の抗原の発現が必要である。抗原発現数が段階的に異なるターゲット細胞のパネル細胞を作製して、従来型抗体とポテリジェント抗体を比較した結果、ポテリジェント抗体では ADCC 活性を示すのに必要な抗原数は  $10^4$  オーダーと大幅に低くなっていた。<sup>13)</sup> CD20 や Her2 などがんで高発現している理想的な抗原は限られており、ゲノムプロジェクトで発見される新規抗原はがん選択性は高くても、がん細胞当たりの抗原発現量が十分でないものも多数存在すると思われる。このような抗原に対しては高 ADCC 活性型のポテリジェント抗体の方が臨床開発に成功する確率が高いと期待している。次に、ポテリジェント抗体の薬効優位性を検討するため、マウスにエフェクターとしてヒトの末梢血単核球を移植する評価モデルを構築した。その結果、腹水がんモデル系におい

て、従来抗体に比べポテリジェント抗体は顕著に高い延命効果を示し、ADCC 活性の増強によりマウスモデルの抗腫瘍効果も増強することを確認した。<sup>16)</sup>

4-5. ポテリジェント抗体の臨床応用に向けて  
通常 *in vitro* の ADCC 活性は、末梢血より調製した単核球をエフェクター細胞として用い、抗体及びターゲット細胞を加え、約 4 時間培養し、抗体結合エフェクター細胞により破壊されたターゲット細胞の割合を測定することで ADCC 活性の強さを解析している。最近の研究により、*in vitro* の ADCC 評価系よりも *in vivo* に近いと考えられる末梢血全血を用いた ADCC 活性評価系では、血液中に大量に含まれる内在性 IgG により、従来型の抗腫瘍抗体の NK 細胞上の FcγR III a への結合及び ADCC 活性が抑制されてしまうことが分かった。<sup>17)</sup> 抗体の臨床応用を考えると、末梢血全血を用いたアッセイ系での活性評価がより重要であると考え、ポテリジェント抗体と従来型抗体の活性を全血系で比較した。その結果、血清 IgG より FcγR III a への高い結合アフィニティーを示すポテリジェント型抗体では内在性 IgG が存在しても ADCC 活性はほとんど阻害されないことが確認できた。したがって、血清 IgG により ADCC 活性阻害を受け難いポテリジェント抗体は臨床でも低濃度で高い効果を示すことが期待される (Fig. 6).<sup>18)</sup>

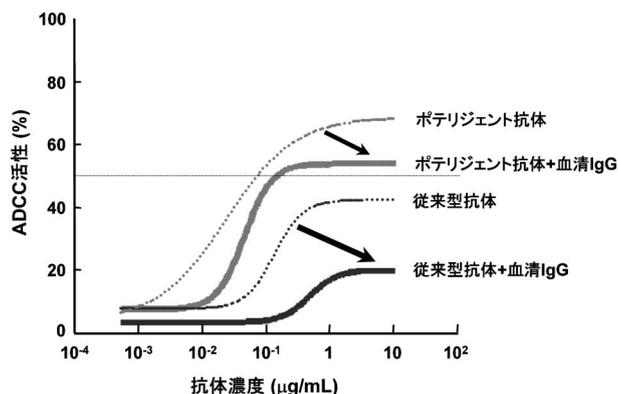


Fig. 6. Effect of Endogenous Serum IgG on ADCC Activity

ポテリジェント抗体により ADCC 活性が上昇することは、これまで健康人ボランティアの末梢血単核球をエフェクター細胞として用いて検討してきた。しかしながら、ポテリジェント抗体のがん治療への臨床応用を考える場合には、がん患者の末梢血単核球をエフェクター細胞として用いてもポテリジェント抗体により ADCC 活性が上昇するかの確認が必要である。20 名の乳がん患者及び 10 名の健康人ボランティアより採血し調製した末梢血単核球をエフェクター細胞として用いて、抗 Her2 抗体及びポテリジェント型抗 Her2 抗体の ADCC 活性を比較した結果、乳がん患者の末梢血単核球においてもポテリジェント抗体の ADCC 活性は増強すること、増強の程度は健康人の ADCC 活性の増強と同等であることが確認できた。<sup>19)</sup> 乳がん患者の中には抗がん剤治療を受けた患者も含まれているが、抗がん剤治療によりポテリジェント抗体の ADCC 増強活性が変化することはなかった。<sup>19)</sup> がんに対する抗体医薬は抗がん剤を含めた標準的な治療と併用されることが多いが、以上の結果から、ポテリジェント抗体と抗がん剤の併用効果も期待できる。現在、ポテリジェント技術を応用した複数の抗体の臨床試験が開始されており (Table 1)、ポテリジェント技術の臨床での有用性が証明されつつある。

### 5. おわりに

以上紹介したように、フコースを制御することで ADCC 活性を大幅に高めたポテリジェント抗体は、治療効果の増強、あるいは、少ない投与量での治療効果が期待できる。本技術は世界に通用する日本発の次世代型の抗体機能向上技術であり、医学及び産業界の発展に大きく貢献できるものと考えられる。

Table 1. Potelligent Antibodies in the Clinical Studies

抗体名	抗原名	抗体タイプ	適応疾患	開発ステージ
KW-0761	CCR4	ヒト化 IgG1	喘息などのアレルギー疾患、T 細胞リンパ腫	第 I 相臨床試験
BIW-8405	IL-5R	ヒト化 IgG1	喘息	第 I 相臨床試験
BIW-8962	GM2	ヒト化 IgG1	肺癌、脳腫瘍など	第 I 相臨床試験 準備中

**謝辞** 本研究は協和発酵キリン㈱にて行われたものであり、研究グループのリーダーとして研究を推進頂きました花井陳雄博士、山崎基生博士、穴澤秀治博士、細井伸二博士、小池正道博士、佐藤光男博士、中村和靖博士、内田和久博士に深謝するとともに、研究に従事して頂きました多くの方々に厚く御礼申し上げます。また、共同研究をして頂きました、名古屋市立大学医学部の上田龍三教授、東京大学医学部の松島綱治教授、東北大学工学部の熊谷泉教授、名古屋市立大学薬学部に加藤晃一教授、京都大学医学部の戸井雅和教授に深謝致します。

### REFERENCES

- 1) Clynes R. A., Towers T. L., Presta L. G., Ravetch J. V., *Nat. Med.*, **6**, 443-446 (2000).
- 2) Cartron G., Dacheux L., Salles G., Solal-Celigny P., Bardos P., Colombat P., Watier H., *Blood*, **99**, 754-758 (2002).
- 3) Gennari R., Menard S., Fagnoni F., Ponchio L., Scels M., Tagliabue E., Castiglioni F., Villani L., Magalotti C., Gibelli N., Oliviero B., Ballardini B., Da Prada G., Zambelli A., Costa A., *Clin. Cancer Res.*, **10**, 5650-5655 (2004).
- 4) Shields R. L., Namenuk A. K., Hong K., Meng Y. G., Rae J., Briggs J., Xie D., Lai J., Stadlen A., Li B., Fox J. A., Presta L. G., *J. Biol. Chem.*, **276**, 6591-6604 (2001).
- 5) Umaña P., Jean-Mairet J., Moudry R., Amstutz H., Bailey J. E., *Nat. Biotechnol.*, **17**, 176-180 (1999).
- 6) Shields R. L., Lai J., Keck R., O'Connell L. Y., Hong K., Meng Y. G., Weikert S. H., Presta L. G., *J. Biol. Chem.*, **277**, 26733-26740 (2002).

- 7) Shinkawa T., Nakamura K., Yamane N., Shoji-Hosaka E., Kanda Y., Sakurada M., Uchida K., Anazawa H., Satoh M., Yamasaki M., Hanai N., Shitara K., *J. Biol. Chem.*, **278**, 3466–3473 (2003).
- 8) Harada H., Kamei M., Tokumoto Y., Yui S., Koyama F., Kochibe N., Endo T., Kobata A., *Anal. Biochem.*, **164**, 374–381 (1987).
- 9) Yamane-Ohnuki N., Kinoshita S., Inoue-Urakubo M., Kusunoki M., Iida S., Nakano R., Wakitani M., Niwa R., Sakurada M., Uchida K., Shitara K., Satoh M., *Biotech. Bioeng.*, **87**, 614–622 (2004).
- 10) Kanda Y., Yamane-Ohnuki N., Sakai N., Yamano K., Nakano R., Inoue M., Misaka H., Iida S., Wakitani M., Konno Y., Yano K., Shitara K., Hosoi S., Satoh M., *Biotech. Bioeng.*, **94**, 680–688 (2006).
- 11) Mori K., Kuni-Kamochi R., Yamane-Ohnuki N., Wakitani M., Yamano K., Imai H., Kanda Y., Niwa R., Iida S., Uchida K., Shitara K., Satoh M., *Biotech. Bioeng.*, **88**, 901–908 (2004).
- 12) Okazaki A., Shoji-Hosaka E., Nakamura K., Wakitani M., Uchida K., Kakita S., Tsumoto K., Kumagai I., Shitara K., *J. Mol. Biol.*, **336**, 1239–1249 (2004).
- 13) Niwa R., Hatanaka S., Shoji-Hosaka E., Sakurada M., Kobayashi Y., Uehara A., Yokoi H., Nakamura K., Shitara K., *Clin. Cancer Res.*, **11**, 2327–2336 (2005).
- 14) Matsumiya S., Yamaguchi Y., Saito J., Nagano M., Sasakawa H., Otaki S., Satoh S., Shitara K., Kato K., *J. Mol. Biol.*, **368**, 767–779 (2007).
- 15) Niwa R., Sakurada M., Kobayashi Y., Uehara A., Matsushima K., Ueda R., Nakamura K., Shitara K., *Clin. Cancer Res.*, **10**, 6248–6255 (2004).
- 16) Niwa R., Shoji-Hosaka E., Sakurada M., Shinkawa T., Uchida K., Nakamura K., Matsushima K., Ueda R., Hanai N., Shitara K., *Cancer Res.*, **64**, 2127–2133 (2004).
- 17) Preithner S., Elm S., Lippold S., Locher M., Wolf A., da Silva A. J., Baeuerle P. A., Prang N. S., *Mol. Immunol.*, **44**, 1815–1817 (2007).
- 18) Iida S., Misaka H., Inoue M., Shibata M., Nakano R., Yamane-Ohnuki N., Wakitani M., Yano K., Shitara K., Satoh M., *Clin. Cancer Res.*, **12**, 2879–2887 (2006).
- 19) Suzuki E., Niwa R., Saji S., Muta M., Hirose M., Iida S., Shiotsu Y., Satoh M., Shitara K., Kondo M., Toi M., *Clin. Cancer Res.*, **13**, 1875–1882 (2007).