

平成30年6月5日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06884

研究課題名(和文)新規がん評価モデルの構築とがん特異的抗体セットの取得

研究課題名(英文) Isolation of antibody set for anticancer agents and development of novel cancer model rat for evaluation of them.

研究代表者

黒澤 仁 (Kuosawa, Gene)

藤田保健衛生大学・研究支援推進センター・講師

研究者番号：10410739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は免疫系に異常の無い、ヒトがん患者に極めて近い発がん様相を示すRas変異発がんモデルラットを用いて評価したヒト高機能抗体の提示を目的に進行した。現在がんの抗体を用いた治療法の確立の為に自らが保持する免疫系の存在を無視できない潮流があり、免疫寛容系は次世代抗体医薬品の最大のターゲットとなっている。一方で未だこれらの解析には同種移植モデル等の限られた解析動物モデルしか存在していない。そこで有望なヒトがん治療用抗体を"intactな免疫系を保持し自発的に発がんしたモデル"によって評価出来るかという課題の解決を試み、これらの成功をもって次世代がん治療薬開発に貢献できるモデルの完成を目指した。

研究成果の概要(英文)：This project aim to develop the next generation human monoclonal antibodies, using spontaneous tumorigenesis rat model via mutated Ras over expression. Currently an immune check point are most important concept for development of anti cancer monoclonal antibody agents. In this regards, the immune check point inhibitor were strongly expected to be next generation anti cancer agents. On the other hand, the evaluation system for these agent are still limited such as a Syngenic grafting model. Therefore this project try to solve this matter using the spontaneous tumorigenesis rat model. Thus, we have isolated antibody set for anticancer agents and development of novel cancer model rat for evaluation of them.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：がん がん周辺微小環境 ヒトRas変異 抗体評価系 ヒト抗体 免疫 モデル動物 免疫寛容

## 1. 研究開始当初の背景

我が国で 2001 年に Her2 過剰発現型乳がんに対する抗 Her2 抗体と CD20 陽性 B 細胞性非ホジキン型リンパ腫に対する抗 CD20 抗体が医薬品として初めて承認されて以降、多くの研究グループが、がん治療の特効薬として抗体研究を精力的に行っているにも関わらず、がん治療への突破口を開いた例は依然限定的である。

現在確認できる米国食品医薬品局(Food and Drug Administration: FDA)によって認可されている抗体医薬品は 35 種類で、うち対象をがんとしているものは 15 種類である。また、これら 15 種類のがんに対する抗体のうち、完全ヒト抗体であるものは抗 EGFR 抗体の Panitumumab (Amgen 社)と抗 CD20 抗体の Ofatumumab (Genmab 社)そして抗 CTLA4 の Ipilimumab (ブリストル・マイヤーズ社)のわずか 3 種類に留まる。他方で、我が国で承認されているがん治療用抗体医薬品は 2012 年段階で 9 種類に留まり、対象疾患は転移性乳がんと血液がんそして転移性、進行性大腸がんのみであった。

これに対し最近(2014 年 7 月)根治切除不能な悪性黒色腫に対する製造販売承認取得をした抗 PD-1 ヒト抗体のニボルマブ(メダレックス社)が登場し、外科手術適用が出来ず、根治も難しい難治性の固形がん治療の現場に光明をもたらした。

本研究申請者らはこれまでに、新しいがん細胞膜上分子に対する特異的抗体の網羅的単離法を開発し(下記\*1.及び\*2参照)、(引用文献1)、500 種類以上の新規がん細胞膜得意的ヒト抗体セットの完備に成功した。また、そこまでに臨床検体から膨大なデータを取得した。(引用文献2,3)そこで、申請者らはこれらの成果を実際の臨床へ結びつける為に、知的財産化や前臨床研究を精力的に行った結果、1 種類の抗体に関しては企業との協力関係を築き、がん治療に有望な抗体ポテンシャルを保持する抗体の選抜と GLP 純薬の製造まで到達した。(下記\*3参照)

### ( \* 1 ) ヒト抗体ファージライブラリー

申請者らのグループは藤田保健衛生大学の全面的支援体制のもと、数十人のヒト由来免疫組織細胞から抗体遺伝子領域の DNA をクローニングし、ライブラリー化した後これをもとに抗体遺伝子ファージライブラリーを作成した。その後の解析と研究進行により、このライブラリーのレパートリーは世界最大級で、含まれている抗体の性能も他に比類のないものである事が分かった。また、本ライブラリーは次の特許として知的

財産化している(引用文献4)

### ( \* 2 ) 癌細胞膜上標的分子に対する特異的抗体の網羅的単離法の確立

申請者らは上記\*1で説明した抗体ライブラリーを用いてがん表面上に提示されている標的分子に対して網羅的に特異的抗体を取得する方法として独自に ICOS 法と言う方法を確立し、それまでのファージディスプレイ法による同様の試みの問題点を解決し、極めて高機能性の抗体を単離、選択する方法を確立に成功した。そして本技術は次の特許として知的財産化している。(引用文献5)

### ( \* 3 ) がん特異的モノクローナル抗体群

申請者らは上記\*2で説明した抗体単離法を用いて 50 種類を超える様々ながん細胞に対してがん細胞膜特異的抗体の網羅的抗体取得を行い、がん特異的抗体ライブラリーとがん特異的モノクローナル抗体群の完備を行った。そしてがん特異的モノクローナル抗体群に関しては、がん細胞への反応性や生理活性等の影響を調査し、キャラクタライズを進めた。その結果得られている抗体は、様々なエピトープに対する抗体を網羅的に覆っており、例えば同じ抗原に対する抗体のみにフォーカスした時、抗原の様々な動態に合わせて変化するエピトープですら見分ける抗体セットである事が判明し、その有用性を示した(引用文献6)

## 2. 研究の目的

### (新規がん治療用並びに診断用抗体の評価系の確立)

がんの動物試験モデルを用いて対象となる医薬品候補物質の抗がん作用を評価する時、これまでの多くは対象のヒトがん組織もしくは細胞を免疫不全マウスに移植した Xenograft mouse model を用いる例が多かった。しかしこの様なモデルでは免疫系の相互作用が一切関与しない抗がん作用しか評価出来ないばかりか、がんが着生している環境が極めて artificial な系である為正確ながんへの生理活性が評価出来ない。

そこで、本課題申請者は以下の要件を満たす発がんモデル動物を用いてより適切な評価系の構築を目指す事を目的としている。

・免疫系に欠陥が無く、免疫系からの相互作用も含めて抗体の評価が出来るモデル。

・がんが自発的に発がんしたモデルであり、外から移植されたもので無いモデル。

・発がん部位を研究に即して任意に決定できるモデル

・発がんタイミングが研究に即して任意に決定できるモデル

・発がん組織がもともと知られる自然発生のがん組織と極めて高い相同性を有し、全ての現象が再現性を有するモデル。

### （評価系モデル動物から取得されたがん細胞の細胞表面に対する抗体取得）

本課題申請者は評価系モデル構築の為にモデル動物から得られたがん細胞表面に intact に存在する膜上標的抗原に対して特異的に結合する。抗体を網羅的に取得し、該モデル生物のがん部免疫組織並びに、他の各正常組織切片と合わせて免疫組織染色に使用可能な抗体群を整備する。またこの抗体群は可能であればヒト免疫染色に応用できればなお汎用性が広がるため、これら得られた抗体群の中からヒト抗原との交叉性を示す抗体が無いのか、探索を合わせて行った。

（がん発生過程の可視化）白血病で先行して進んだがん幹細胞の研究で、がんの成立の為に少なくともがん幹細胞能力の存在が発がんメカニズムの理解に必要不可欠な存在であると考えられつつある。更にこの幹細胞様の能力獲得と同時に、がんが成立する為には少なくとも3つの条件を乗り越える必要がある。すなわち、異常細胞化に伴うアポトーシスの誘導、免疫系からの攻撃そして生着環境への適応である。

また、がんの発生源に関しては、もともとこれら幹細胞様能力を有する一部の成体幹細胞や前駆細胞がそれにあたると考えられている。そこで、これらの仮説に答えを出せるように、本申請課題では発がん誘導からがんの成立の各箇所における組織を免疫染色し、各細胞や組織の可視化を目指した。

### 3. 研究の方法

モデル動物候補の取得：申請者とこれまで長く共同研究を続けて頂いている、名古屋市立大学の津田洋幸教授らのグループは ras 遺伝子活性化により、自らの体内で移植を経ずに発がんしたモデルラットの開発に成功しており、このラットを使用することによってこれまで不可能であった解析を可能としている。ここまでの共同研究で本課題申請者は本ラットの作成技術協力を得て本モデルラットが使用可能であるため、本ラット技術と他の発がん技術動物モデル技術を用いて、発がんモデルラットを作成し、目的に最適化されたラットモデルを探索した。

### 4. 研究成果

本研究ではまず ras 遺伝子活性化により、自らの体内で移植を経ずに発がんした膵臓がんモデルラットの作成に成功し、ヒトがん細胞膜上特異的抗体群のプレリミナリー評価を行った。また、評価用抗体抗体セットを完備し、キャラクタライズを進めた。モデル動物に関しては膵臓がんモデルラットの作成に成功し、本ラットより樹立された細胞株を用いた親和性、特異性評価を1次評価、生理活性評価を2次評価、更に発がんラットそのも

のをを用いた動態評価を3次評価として、ヒト Ras 変異型のがんに対する解析系を確立した。これにマウスのヒトがん細胞移植系を組み合わせる事によってほぼ完ぺきな評価系になると考えられた。これらの意義としては現在がんの抗体を用いた治療法の確立の為に自らが保持する免疫系の介在を無視できない潮流があり、事実 PD-1、CTLA4等の次世代抗ガン抗体医薬品はこれらの視点で開発がなされた医薬品である。一方で未だこれらの解析には Syngenic mouse 等の限られた解析動物モデルしか存在せず、全ての課題を完璧に評価できる系は存在しない。その意味でも本課題は有望なヒトがん治療用抗体を”intact な免疫系を保持し自発的に発がんしたモデル”によって評価出来るかという課題を解決しようとしており、研究計画を概ね順調に遂行し、次のターゲットとして更に重要性の高いモデルも評価していき、次世代がん治療薬開発に貢献できるモデルの完成を目指した。一方で、これまではがん細胞表面上に特異的に提示され、かつ正常組織には発現が無い、抗原を標的として治療をする事をコンセプトとするいわゆる“魔法の弾丸”理論が一般的であった。本申請者らもこれらのコンセプトに従いがん細胞膜上に提示される抗原に対する特異的抗体の網羅的単離に成功し、これらのセットの完備を行った。これに加えて本申請者は直接攻撃性以外の因子に効果を示す事が示唆された抗体の候補も完備し、このモデルで解析出来る様に系の開発を進めた。これらの研究を通じて、

1. 膵臓がんラットの作成に成功し、ヒトがん細胞表面特異的抗体を用いて、細胞染色、組織染色で評価を行った。これらの結果をヒト膵臓がん細胞株染色、組織染色の結果と比較する事によって、膵臓がんラットの組織態様はヒトと見分けがつかないレベルで形成されることに成功している事を示した。

2. 上記プレリミナリーな解析を通じて30種類のがん細胞表面特異的抗体の中から上記モデルラットに対して陽性（親和性を有する）抗体の選別を行った。

3. 大規模抗体セットの完備、モデルラットの再現性をもった作成の成功に加え、モデルラットには転移、侵潤、遊走と言った他のゼノグラフトモデルには無い性質も見出し、この評価系のポテンシャルの高さを証明した。

4. 他方今回対象とした肺がんに関しては病理組織の免疫染色から得られる組織像の膨大な病理診断結果をまとめて上記抗体セットの肺がんにおけるデータを体系的にまとめた。

5. 複数の本課題対象のモデルラットのがん組織並びにヒト由来がん細胞に陽性でマウス細胞株には陰性の抗体の提示を行った。

6. がん微小環境免疫環境の解除に貢献する有望な合目的抗体、並びにこれらのコンセプトに相乗効果をもって使用可能な抗体を提示を行った。等の具体的成果創出に成功した。

<引用文献>

1 .G. Kurosawa, et al., *Journal of Immunological Methods*, 351 <2009> 1-12  
2 .G. Kurosawa, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, Vol. 105 no. 20, 7287-7292.,

3 . G. Kurosawa, et al., *Cancer Sci.*, 2011, vol. 102, no. 1, 175-181

4. 特許 539363 号 : 抗体ライブラリー

5. 特許 4870348 号 : 細胞表面抗原に対する抗体取得とその抗原同定

6. Y. Kitamura, G. Kurosawa et al. *BBRC*. 383 (2009) 480-484

5 . 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

**1. Preclinical Evaluation of <sup>89</sup>Zr-labeled Human Anti-Transferrin Receptor Monoclonal Antibody as a Positron Emission Tomography Probe using a Pancreatic Cancer Mouse Model**

Aya Sugyo, Atsushi B. Tsuji, Hitomi Sudo, Kotaro Nagatsu, Mitsuru Koizumi, Yoshinori Ukai, Gene Kurosawa, Ming-Rong Zhang, Yoshikazu Kurosawa, and Tsuneo Saga  
*Nuclear Medicine Communications*; 2015 36(3):286-94. (査読あり)

**2. Evaluation of Efficacy of Radioimmunotherapy with <sup>90</sup>Y-Labeled Fully Human Anti-Transferrin Receptor Monoclonal Antibody in Pancreatic Cancer Mouse Models**

Aya Sugyo, Atsushi B. Tsuji, Hitomi Sudo, Maki Okada, Mitsuru Koizumi, Hirokazu Satoh, Gene Kurosawa, Yoshikazu Kurosawa, Tsuneo Saga  
*PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0123761 20, 2015 (査読あり)

**3. A variety of human monoclonal antibodies against epidermal growth factor receptor isolated from a phage antibody library**

Gene Kurosawa, Mariko Kondo and Yoshikazu Kurosawa  
*Biochem Biophys Res Commun.* 2016, 480 (1); 94-100 (査読あり)

**4. Classification of 27 tumor-associated antigens by histochemical analysis of 36 freshly resected lung cancer tissues**

Gene Kurosawa, Mototaka Sugiura, Yoshinobu Hattori, Hiroyuki Tsuda and Yoshikazu Kurosawa  
*Int J Mol Sci.* 2016, 17(11) pii: E1862. 8pages

(査読あり)

**5. Uptake of <sup>111</sup>In-labeled fully human monoclonal antibody TSP-A18 reflects transferrin receptor expression in normal organs and tissues of mice**

Aya Sugyo, Atsushi B. Tsuji, Hitomi Sudo, Fumiko Nomura, Hirokazu Satoh, Mitsuru Koizumi, Gene Kurosawa, Yoshikazu Kurosawa, Tsuneo Saga  
*Oncol Rep.* 2017, 37(3):1529-1536. (査読あり)

**6. Development of a complete human IgG monoclonal antibody to transferrin receptor 1 targeted for adult T-cell leukemia/lymphoma**

Shunsuke Shimosaki, Shingo Nakahata, Tomonaga Ichikawa, Akira Kitanaka, Takuro Kameda, Tomonori Hidaka, Yoko Kubuki, Gene Kurosawa, Lilin Zhang, Yukio Sudo, Kazuya Shimoda, Kazuhiro Morishita\*  
*Biochem Biophys Res Commun.* (2017) 485 (1) 144-151 (査読あり)

[学会発表](計2件)

1. 鉄代謝異常に依存した白血病がん治療法の開発

下崎俊介、湯地久美子、須藤幸夫、張黎臨、中畑新吾、市川朝永、黒澤仁、森下和広  
第4回がん代謝研究会 鹿児島県民交流センター 2016, Jul, 7<sup>th</sup>-8<sup>th</sup>

2. Development of complete human IgG antibody against human TFR1 for novel therapy of ATLL

Shingo Nakahata, Tomonaga Ichikawa, Shunsuke Shimosaki, Gene Kurosawa, Lilin Zhang, Yukio Sudo, Kazuya Shimoda, Kazuhiro Morishita  
18<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses  
Tokyo 2017 March7~10

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: Antibody which specifically reacts with human integrin  $\alpha 6 \beta 4$

発明者: Kazuhiro Morishita, Kazuko Kaneda, Yoshikazu Kurosawa, Gene Kurosawa, Katsuyuki Mitomo, Katsushi Kouda, Yoshinori Ukai

権利者: Fujita Health University, University of Miyazaki, Perseus Proteomics Inc

種類: EP Patent (A4)

番号: EP3042956A4

取得年月日: 2017-03-15

国内外の別: 海外(欧州)

取得状況（計4件）

1.

名称：抗体及びその用途  
発明者：杉岡篤，黒澤仁，住友万里子，黒澤良和  
権利者：学校法人藤田学園  
種類：特許(B2)  
番号：特許第 6063494 号  
取得年月日：平成 28 年 12 月 22 日  
国内外の別：国内

2.

名称：トランスフェリン受容体抗体  
発明者：森下和広，張黎臨，黒澤仁，見供克之，須藤 幸夫  
権利者：国立大学法人 宮崎大学，株式会社ペルセウスプロテオミクス  
種類：特許(B2)  
番号：特許第 5939855 号  
取得年月日：平成 28 年 5 月 27 日  
国内外の別：国内

3.

名称：Antibody for detecting DNA damage in cells utilizing cell membrane surface antigen Ly6D  
発明者：Yoshikazu Kurosawa, Maiko Kurosawa, Gene Kurosawa  
権利者：Fujita Health University Perseus Proteomics Inc  
種類：US PATENT(B2)  
番号：US9273140B2  
取得年月日：2016-03-01  
国内外の別：海外（米国）

4.

名称：Antibody capable of specifically recognizing transferrin receptor  
発明者：Yoshikazu Kurosawa, Kazuhiro Morishita, Lilin Zhang, Gene Kurosawa, Katsuyuki Mitomo, Yukio Sudo, Fumiko Nomura, Yoshinori Ukai  
権利者：University of Miyazaki, Perseus Proteomics Inc  
種類：US PATENT(B2)  
番号：US9593165B2  
取得年月日：2017-03-14  
国内外の別：海外（米国）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒澤 仁 (KUROSAWA, Gene )  
藤田保健衛生大学・研究支援推進センター・講師

研究者番号：10410739

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

津田 洋幸 (TSUDA, Hiroyuki)

名古屋市立大学・教授

岡 千恵子 (OKA, Chieko)