

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15969

研究課題名（和文）免疫チェックポイント分子などに対するエフェクター活性を有するイヌ用抗体医薬の創出

研究課題名（英文）Development of antibody drugs for dogs against immune checkpoint molecules etc. with effector functions

研究代表者

前川 直也（Maekawa, Naoya）

北海道大学・獣医学研究院・特任助教

研究者番号：70829035

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：イヌ腫瘍に対する新規治療薬の開発を目指し、本研究では遺伝子工学技術により抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性や補体依存性細胞傷害（CDC）活性などのエフェクター機能を付加したイヌ用抗体薬候補を作製した。作製した抗体について、抗原への結合性やエフェクター活性を検討したところ、*in vitro*の試験において良好な活性が認められ、イヌへの反復投与では安全性の懸念は認められなかった。現在、安全性についてさらに詳細な解析を進めているところである。本研究によりエフェクター活性を有するイヌ用抗体薬の作製が可能であることが実証され、その臨床応用に向けた道筋を開拓することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で作製したADCC活性やCDC活性などのエフェクター機能を付与したイヌ用抗体は、イヌ難治性腫瘍に対する新しい治療の選択肢の一つとして臨床応用・実用化される可能性があり、小動物医療の高度化に貢献することが期待される。本研究はイヌに対する抗体医薬の創出のモデルケースとなり、後続研究へ応用されることで関連分野のさらなる発展が見込まれる。イヌ腫瘍に対する新規治療薬の開発は、ヒトの類似疾患に対する治療法の開発においても有効性や安全性等の情報を提供できることから、医薬品開発にも有益である可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In order to develop novel therapeutic agents for canine cancers, this study used genetic engineering techniques to produce antibody drug candidates for dogs with effector functions such as antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity (CDC) activities. The antibodies were tested for antigen binding and effector activities, demonstrating expected biological activities *in vitro*, and no safety concerns were observed after repeated administration to dogs. We are now in the process of detailed analysis of the safety. This study has demonstrated the feasibility of producing antibody drugs for dogs with effector functions and has paved the way for their clinical application.

研究分野：獣医学

キーワード：イヌ腫瘍 抗体医薬 免疫チェックポイント がん免疫療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イヌの死因のおよそ 30%は腫瘍(がん)であるとされ、近年のペットの高齢化に付随して今後もその傾向は続いていくと考えられる。現在はイヌの腫瘍に対する治療法として、外科切除、放射線療法、化学療法の三大療法が一般に行われている。イヌにおいても上述の理由から腫瘍疾患に対する高度治療のニーズはますます高まっており、新規治療法のイヌでの実用化が急務である。ヒト医療ではがんに対する新規治療薬の開発が目覚ましく、特に分子標的薬や抗体医薬の実用化が進められている。特に PD-1、PD-L1、CTLA-4 などの免疫チェックポイント分子に対する抗体薬は、これまでのがん治療と作用機序が異なる免疫療法として悪性黒色腫をはじめとする種々のがんでその有効性が報告されている。イヌの腫瘍に対しても同様の作用機序を有する薬剤が有効である可能性があるが、いまだそのような研究動向は少ない。これまでに我々の研究グループでは、PD-L1 を標的としたイヌ用抗体薬の開発に取り組んできており、悪性黒色腫や未分化肉腫に罹患した一部のイヌにおいて腫瘍の縮小が認められることを報告してきた。動物用抗体薬開発はいまだ世界でも数例程度しか報告がなく、今後の発展が期待される分野である。

2. 研究の目的

以上の背景から、イヌ腫瘍に対する新規治療薬の開発を最終目標として、ヒト用抗腫瘍抗体薬において主流である、エフェクター活性を有する抗体薬をイヌ抗体薬開発に応用することとした。遺伝子工学技術により、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性や補体依存性細胞傷害(CDC)活性などのエフェクター機能を有するイヌ抗体を作出し、まずは目的の活性を持つかどうかを組換えタンパク質や培養細胞を用いた実験系により検討することとした。目的の活性を持つ抗体が得られた場合、イヌへの投与に必要な大量の抗体を準備するために哺乳類細胞を用いた安定発現系の樹立を行い、得られた精製抗体を用いて、イヌへの投与試験により反復投与における安全性を検討することとした。一定の安全性が確認されれば、腫瘍罹患犬に対する臨床試験へと進めることとした。

3. 研究の方法

抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性や補体依存性細胞傷害(CDC)活性などのエフェクター機能は抗体定常領域の配列に依存することが知られている。GenBank などの公開データベースよりイヌ抗体遺伝子配列情報を取得し、4 種類の定常領域配列を使用して抗原 X に対するイヌ用抗体試作品 4 種を設計した。各抗体をコードする発現ベクターを作製し、哺乳類由来細胞を使用して発現を行い、その培養上清からプロテイン A/G を用いて各抗体を精製した。組換え抗原 X を使用して、ELISA やフローサイトメトリー、表面プラズモン共鳴解析等を行って抗原に対する結合親和性を評価した。CDC 活性には補体の結合が必要であることから、補体成分の各抗体への結合性を ELISA 法により検討した。さらに、抗原 X を強制発現させた培養細胞を標的細胞として、イヌ末梢血単核球(エフェクター細胞)との共培養により ADCC 活性を検討した。良好な結合親和性および CDC/ADCC 活性を示した抗体薬候補について哺乳類由来細胞を用いた安定発現系の樹立を行った。発現ベクターをリポフェクション法により培養細胞に導入し、耐性遺伝子マーカーを利用して安定発現細胞の選抜を行った。多数の安定発現細胞の中から、抗体発現量の高いものをスクリーニングして選抜し、高発現クローンを単離した。高発現クローンを培養することにより、抗体を含む培養上清を取得し、抗体を精製した。精製抗体を生理食塩水に希釈してイヌ 2 頭へ反復投与し、一般状態の観察や血液検査を含む各種検査を行った。

4. 研究成果

抗原 X に対するイヌ用抗体薬試作品 4 種(A-1、A-2、A-3、A-4)は、すべて抗原 X への結合性を保持していたが A-4 ではその結合親和性が軽度低下していた。ELISA プレートに固着化したすべての抗体に補体成分の結合が認められたことから、程度の差はあるが CDC 活性を有することが示唆された。特に A-3 と A-4 では補体成分の結合が多く、強力な CDC 活性を有する可能性が示された。

イヌ末梢血単核球をエフェクター細胞にした ADCC 活性試験では、A-3 でコントロール抗体と比較して有意な細胞傷害を認めた一方、A-1 および A-2 の添加では標的細胞の有意な減少は認められなかった(A-4 は結合親和性の低下があったため除外)。

以上より A-3 が良好な結合親和性と CDC/ADCC 活性を有する抗体薬候補であることが示された。次に、A-3 の安定発現細胞の樹立を行った。樹立した高発現クローンは 0.3 g/L 以上の抗体を培

養上清中に産生した。培養上清より抗体を精製し、試作品と同等の結合親和性を保持していることを確かめたのちに、イヌへの投与試験を行った。1頭には計5回、もう1頭には3回の反復投与を行った。観察期間中を通して重大な安全性の懸念は認めず、薬としての安全性に問題はないと考えられた。現在その詳細について追加の解析を行っているところであり、今後の腫瘍罹患犬への投与試験に向けた準備がほぼ完了した。

本研究ではさらに別の標的抗原に対する抗体医薬品候補の作製も行った。定常領域にはA-3と同じものを使用したところ、同様の *in vitro* 試験において良好な CDC/ADCC 活性が認められた。2020 年度中に安定発現細胞の樹立に着手し、高発現クローンの取得に成功した。今後は精製抗体を準備し、安全性試験へと進めていくことが可能である。この結果から、本研究で開発したエフェクター活性を有するイヌ用抗体薬作製技術は汎用性があることが示され、今後のイヌ用抗体薬開発において重要な知見となることが期待される。

以上本研究によって、遺伝子工学技術により ADCC 活性や CDC 活性などのエフェクター機能を付与したイヌ用抗体の作製が可能であることが実証され、その臨床応用に向けた道筋を開拓することができた。本研究はイヌに対する抗体医薬の創出のモデルケースとなり、当該分野の発展に寄与するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|------------------|
| 1. 著者名 Maekawa Naoya, Konnai Satoru, Nishimura Maki, Kagawa Yumiko, Takagi Satoshi, Hosoya Kenji, Ohta Hiroshi, Kim Sangho, Okagawa Tomohiro, Izumi Yusuke, Deguchi Tatsuya, Kato Yukinari, Yamamoto Satoshi, Yamamoto Keiichi, Toda Mikihiro, Nakajima Chie, Suzuki Yasuhiko, Murata Shiro, Ohashi Kazuhiko | 4. 巻 5(1) |
| 2. 論文標題 PD-L1 immunohistochemistry for canine cancers and clinical benefit of anti-PD-L1 antibody in dogs with pulmonary metastatic oral malignant melanoma | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 npj Precision Oncology | 6. 最初と最後の頁 10 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41698-021-00147-6 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Takeuchi Hiroto, Konnai Satoru, Maekawa Naoya, Minato Erina, Ichikawa Yoshiki, Kobayashi Atsushi, Okagawa Tomohiro, Murata Shiro, Ohashi Kazuhiko | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Expression Analysis of Canine CMTM6 and CMTM4 as Potential Regulators of the PD-L1 Protein in Canine Cancers | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Veterinary Science | 6. 最初と最後の頁 330 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fvets.2020.00330 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 前川直也、今内覚、岡川朋弘、村田史郎、大橋和彦 | 4. 巻 7(2) |
| 2. 論文標題 免疫チェックポイント阻害薬を用いた腫瘍免疫療法. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 VETERINARY ONCOLOGY | 6. 最初と最後の頁 89-94 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 今内 覚, 岡川 朋弘, 前川 直也, 中島 千絵, 鈴木 定彦, 山本 啓一, 戸田 幹洋, 村田 史郎, 大橋 和彦 | 4. 巻 67(2) |
| 2. 論文標題 動物用抗体医薬品の開発および臨床研究 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 日本動物用医薬品協会会報 | 6. 最初と最後の頁 1-10 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 前川直也 | 4. 巻 6(4) |
| 2. 論文標題 北海道大学動物医療センターにおける臨床研究の紹介 悪性黒色腫に対する抗PD-L1抗体を用いた免疫療法. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 VETERINARY ONCOLOGY | 6. 最初と最後の頁 94-100 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 竹内 寛人, 前川 直也, 今内 覚, 高木 哲, 細谷 謙次, 賀川 由美子, 岡川 朋弘, 鈴木 定彦, 山本 啓一, 村田 史郎, 大橋 和彦 | 4. 巻 63(8) |
| 2. 論文標題 免疫チェックポイント分子Programmed death ligand 1(PD L1)を標的とする抗体薬による免疫療法が奏功した肺転移のある口腔内悪性黒色腫の犬の1例 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 北海道獣医師会雑誌 | 6. 最初と最後の頁 343 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 前川直也 |
| 2. 発表標題 動物のがん免疫療法 |
| 3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会(招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大塚拓海、今内覚、前川直也、渡慧、岡川朋弘、村田史郎、大橋和彦. |
| 2. 発表標題 ネコCytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) を標的とした新規免疫抑制剤の開発における基礎的検討. |
| 3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Maekawa N, Konnai S, Okagawa T, Murata S, Ohashi K. |
| 2. 発表標題 Development of a sensitive PD-L1 immunohistochemistry of canine cancers and clinical efficacy of an anti-PD-L1 antibody in canine oral malignant melanoma with pulmonary metastasis. |
| 3. 学会等名 The 12th International Veterinary Immunology Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 前川直也 |
| 2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害抗体を用いた免疫療法. |
| 3. 学会等名 第3回獣医がん分子生物研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 前川直也、今内覚、浅野裕美恵、岡川朋弘、高木哲、村田史郎、大橋和彦. |
| 2. 発表標題 COX-2阻害剤の併用による抗PD-L1抗体を用いたイヌ腫瘍免疫療法の効果増強に向けた基礎的検討. |
| 3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 竹内寛人、今内覚、岡川朋弘、前川直也、村田史郎、大橋和彦. |
| 2. 発表標題 イヌ腫瘍由来細胞株におけるCKLF-like MARVEL transmembrane domain containing protein 6 (CMTM6) および4 (CMTM4) の発現解析. |
| 3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉武志江奈、今内覚、前川直也、賀川由美子、西村麻紀、岡川朋弘、鈴木定彦、高木哲、中川貴之、村田史郎、大橋和彦。 |
| 2. 発表標題 イヌ腫瘍組織およびイヌ腫瘍由来細胞株におけるイヌHER2の発現解析。 |
| 3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 新規ベクターおよびその利用 | 発明者 鈴木定彦、中川美樹、亀田弥生、今内覚、岡川朋弘、前川 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/ 18899 | 出願年 2019年 | 国内・外国の別 外国 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |