

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H05957・19K21113

研究課題名(和文) CADM1抗体による成人T細胞白血病に対するチオストレプトンの細胞内デリバリー

研究課題名(英文) Thiostrepton Antibody-Drug Conjugate Targeting CADM1 for Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma Therapy

研究代表者

田部 亜季 (Tanabe, Aki)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任助教

研究者番号：60786367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病リンパ腫(ATLL)はヒトレトロウイルスであるHTLV-1感染が原因となる血液悪性腫瘍である。ATLLにおいて過剰発現が認められる、細胞接着因子CADM1に対する抗体取得と、その抗体を用いた抗腫瘍薬剤の細胞内デリバリー開発を研究目的としている。ファージディスプレイ法を用いて抗CADM1抗体の取得に成功し、CADM1陽性細胞への結合を確認した。得られた抗体は結合親和性に課題が残されており、結晶構造解析や構造に基づく計算科学的手法による親和性向上を試みた。得られた抗体に抗腫瘍薬剤の化学修飾を行なったが、薬剤の水溶性の低さとリンカー設計が今後の課題として残された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CADM1は通常のマウス免疫ではモノクローナル抗体を得ることが非常に難しく、現在モノクローナル抗体としてトリIgY抗体が研究用に用いられている。研究成果の意義として、本研究では将来的な治療薬を指向し、ヒト可変領域のフレームワークを基本骨格とする人口ファージディスプレイライブラリを用いて、通常のマウス免疫で得ることが困難であった抗CADM1抗体を取得することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Adult T-cell leukemia/lymphoma is hematological malignancy associated with Human T-lymphotropic virus type1(HTLV-1) infection. CADM1 is cell adhesion molecule, and overexpression of CADM1 in ATLL has been reported. In this study, we attempted to develop novel anti-CADM1 antibody and Antibody-Drug Conjugate targeting ATLL cells. We succeeded to obtain anti CADM1 antibody by phage display method, and attempted to conjugate anti-cancer drugs to anti CADM1 antibody. However, the affinity of anti CADM1 antibody was not high, and further antibody engineering was required. Crystal structure analysis and structure-based antibody engineering was performed. Moreover, solubility of the compound was very low, and linker design was another problem to improve in the future plan.

研究分野：抗体工学

キーワード：抗体工学 ファージディスプレイ 抗体薬物複合体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

成人T細胞白血病リンパ腫(ATLL)はHTLV-1感染を原因とする難治性末梢性T細胞腫瘍で、くすぶり、慢性型の indolent type とリンパ腫型、急性型の aggressive type に分類される。ATL 発症機構は多段階発がんとしてされており、乳児期に母乳を介してHTLV-1にCD4陽性T細胞が感染し、その後約40-60年という長期にわたる潜伏感染期間を経てATLを発症すると考えられている。Tax、Rex、HBZなどのウイルス蛋白質の機能とともに、HTLV-1感染細胞は宿主免疫を回避しながら、HTLV-1感染からATL発症までの長期潜伏期間中に、ゲノムの異常、エピゲノムのリプログラミング、miRNAの発現異常、それによって引き起こされる遺伝子発現異常と細胞内シグナルの異常や細胞周期の脱制御等の様々な細胞の異常を蓄積することによりATLを発症すると考えられている。ATLは一旦発症するとその予後は極めて不良であり、造血幹細胞移植の適応症例で一部長期生存例を認めているが、ATLの発症年齢中央値は60歳を超えているため、適応症例は一部に限られており、未だ有効な治療法は得られていない現状がある。

ATLはキャリアーの生涯で数%にしか発症しないが、発症すると極めて難治性であり、未だ有効な治療法は確立されていないため、新規の治療薬開発が長年求められている。

CADM1(Cell Adhesion Molecule 1)は細胞接着因子であり、ATL患者で高頻度の過剰発現が報告され、CADM1はATLLの治療標的として注目されてきた。リツキシマブ、ブレンツキシマブ、ベドチンをはじめとするモノクローナル抗体医薬、抗体薬物複合体(ADC)は血液悪性腫瘍において予後の改善に貢献してきたが、同様に新規抗体医薬開発は難治性ATLLの予後改善に寄与できる可能性がある。CADM1を標的とした抗体治療薬の開発において、CADM1は通常のマウス免疫によるモノクローナル抗体取得が困難とされてきた。現在抗CADM1モノクローナル抗体としてトリIgY抗体が研究用に使用されている背景があり、モノクローナル抗体の取得が最初の大きな課題となっている。

### 2. 研究の目的

以上を背景に、本研究では難治性ATLLに対する新たな抗体医薬開発として、抗CADM1抗体を取得し、抗腫瘍薬として報告されているチオストレプトンをはじめとする薬剤のADC開発を目的としている。

### 3. 研究の方法

抗CADM1抗体は通常のマウス免疫によって得ることが困難であることされているため、ヒトscFvフレームワークを基本骨格とするファージディスプレイ法を用いて抗CADM1抗体を試みた。得られた抗体をヒト定常領域に移植し、哺乳動物細胞を用いてFabやIgGのフォーマットでリコンビナントの発現精製を行った。得られた抗体クローンについて、結合親和性を表面プラズモン共鳴(SPR)、熱安定性について示差走査熱量測定(DSC)などを用いた解析機能解析、細胞への結合についてフローサイトメトリーを用いて検討を行った。

### 4. 研究成果

#### 1)CADM1細胞外ドメインの発現精製

哺乳動物細胞を用いて、CADM1細胞外ドメインを可溶化タグとの融合タンパク質として発現させて、各種クロマトグラフィーを用いて発現と精製を行った。得られた蛋白質はその後のファージディスプレイやSPR解析などの各種解析に用いた。

また、CADM1は肺がんではスプライスバリエーションの存在が報告されているためHTLV-1感染細胞株とATLL細胞株を用いて、CADM1バリエーション解析を5'RACE法、3'RACE法を用いて行った。ATLL細胞株とHTLV-1感染細胞株で既に肺がんでは報告されているものと同様のバリエーションの存在が示唆された。

#### 2)抗CADM1抗体の取得と細胞への結合活性評価

CADM1は通常のマウス免疫などで抗体を得にくいいため、CADM1細胞外ドメイン全長を抗原として、ヒトフレームワークを基本骨格とする2種のscFv人工合成ライブラリを用いたファージディスプレイ法で抗体クローンの選別を行った。最終のphage ELISAで得られたヒットクローンの配列解析では1つのライブラリから各1つずつ、計2種のヒットクローンに配列は収束していた。

当研究室の先行研究でこれまでにCADM1抗体の取得が試みられてきたが、ELISAやSPRなどでリコンビナント抗原には結合が確認されるが、細胞への結合活性が得られないという現象を認めていた。そのため、phage ELISAで得られた2種のクローンについてまずCADM1陽性細胞への結合活性を評価した。得られたヒットクローンをscFvとして大腸菌発現系を用いて、タグ化可溶性蛋白質として発現と精製を行った。得られた2種の抗体について、フローサイトメトリーを用いた結合解析を行い、クローン1のみCADM1陽性細胞への結合を認めた。

#### 3)リコンビナント抗CADM1 Fab抗体とIgG抗体の作製と物性機能評価

得られたヒットクローン1(ヒトscFv)をヒトの定常領域に移植し、Fab(humanIgG1)、IgG1のフォーマットでリコンビナント抗体を、哺乳動物細胞を用いて作製した。示差走査熱量測定

(DSC)による熱安定性評価では良好な熱安定性を示したが、表面プラズモン共鳴法(SPR)による結合親和性解析では IgG でも  $K_D=10^{-7}$  オーダーであり、結合親和性に課題が残された。親和性改善のため、エピトープ解析と抗体親和性向上のため抗体エンジニアリングを目的として結晶構造解析と構造を基にした計算的手法を用いた親和性向上を試みた。

結晶化条件や結晶化のコンストラクトなどの条件検討を行ったが、共結晶構造獲得が難航しており現在も継続中である。計算的手法の進行状況として蛋白質のモデリングや分析などを行う様々なアプリケーションを持つソフトウェア Rosetta を用いて、親和性向上を目的とした野生体と変異体の相互作用界面の相互作用エネルギー変化を計算し、実験的に検証したデータとの比較を行う研究に着手し、スーパーコンピュータを用いた演算などの準備を行った。

#### 4)チオストレプトンの抗 CADM1 抗体への化学修飾

チオストレプトンはマイケル付加反応によって、システインのチオール基と反応することが報告されているため、この反応機構を利用して IgG 抗体への化学修飾反応を行い、未反応化合物の除去を行い精製した。SDS-PAGE などで修飾されていることが示唆されたが、WST8 アッセイなどの cell viability assay では明らかな ATLL 細胞の増殖抑制効果を得ることはできなかった。

また、化合物の溶解性が非常に悪く反応時の濃度を上昇させることも修飾効率を改善できない原因と考えた。今後の課題として修飾効率の良い ADC リンカーの修飾と水溶性の改善を行うための化合物のデザインが重要であると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田部亜季、中木戸誠、山本菜央佳、中野和民、内丸薫、津本浩平
2. 発表標題 成人T細胞白血病(ATL)を標的としたPhage display法による抗CADM1 scFvの取得
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田部 亜季、中野 和民、中木戸 誠、長門石 暁、田中 勇悦、津本 浩平、内丸 薫、渡邊 俊樹
2. 発表標題 ドラッグデリバリーの標的特異性創出を目的とした部位特異的化学修飾が可能な抗 OX40単鎖 抗体の取得と機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masashi Okawa, Aki Tanabe(2番目)
2. 発表標題 Production of rhTSG-6 using Expi293 expression system
3. 学会等名 The 14th Asian Congress on Biotechnology, July 1-4, 2019, Taiwan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野和民、山本菜央佳、田部亜季、中木戸誠、宇都宮與、津本浩平、内丸薫、渡邊俊樹
2. 発表標題 小分子抗体ペプチド「チオストレプトン」によるFoxM1を標的したATL細胞に対する新規アプローチ
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本菜央佳、中野和民、中木戸誠、田部亜季、宇都宮與、渡邊俊樹、津本浩平、内丸薫
2. 発表標題 HTLV-1感染細胞およびATL細胞に対するFoxM1を標的とした新規治療アプローチの検討
3. 学会等名 第5回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大川将志、田部亜季、太田誠一、長門石暁、津本浩平、伊藤大知
2. 発表標題 ヒアルロン酸特異的結合能を持つ機能化リンクモジュールの開発
3. 学会等名 化学工学会 第85年会 2020年3月17-19日 *コロナウイルス感染症の影響ため中止
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学工学系研究科バイオエンジニアリング専攻津本研究室HP  <a href="http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/phys-biochem/">http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/phys-biochem/</a></p>
--

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