

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07685

研究課題名(和文) PD-1治療抵抗性の克服と副作用発現を制御可能ながん血管標的治療法の開発

研究課題名(英文) Creation of cancer therapy targetting tumor blood vessels to overcome resistance to immuno checkpoint inhibitors

研究代表者

野村 鉄也 (Tetsuya, Nomura)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40582854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、免疫チェックポイント阻害薬(抗PD-1抗体や抗PD-L1抗体)が著効を示さない腫瘍に対する新たな治療戦略の構築を目的に、がん組織血管に対する特異抗体の創製を目指して研究を行った。その結果、ファージディスプレイ法を駆使することで、腫瘍血管内皮細胞に強く結合する一本鎖抗体提示ファージを創出することに成功した。また、結合力向上を目的に構築したFcキメラタンパク質を用いた検討から、得られた抗体は正常血管内皮細胞には結合しないこと、さらにはがんの種類に依らず結合できることが明らかとなった。以上、創出したがん血管特異抗体は、免疫チェックポイント阻害薬との併用に資する抗体であることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、近年がん治療領域における画期的治療薬として開発されてきた免疫チェックポイント阻害薬を用いても治療が困難な症例に対して、新たな治療方を提示するものである。また今回創出したがん血管に対する特異抗体は、VEGFやVEGFR2などを標的とした既存の血管新生阻害薬とは異なり、正常な血管には作用しないことから、既存の血管新生阻害薬において問題となっている大血管傷害や創傷治癒遅延などの副作用を呈することがなく、安全性にも優れた治療薬となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, isolation of tumor endothelial cell-specific antibody was tried, to establish novel therapeutic method for resistant tumor to immuno checkpoint inhibitor, such as anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibody. As a result, we succeeded to create phage displaying single chain fragment variable (scFv) binding to tumor endothelial cells, with phage display techniques. Fc-fusion scFv targetting tumor endothelial cells did not bind to normal endothelial cells, while it binded to tumor endothelial cells. Additionally, Fc-fusion scFv targetting tumor endothelial cells binded to tumor endothelial cells in many kinds of tumor tissues. Therefore, isolated antibody may be promising drug as combined medicine with immuno checkpoint inhibitor.

研究分野：DDS、薬剤学、腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍血管内皮細胞 免疫逃避機構 免疫チェックポイント阻害薬 ファージディスプレイ法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

がん組織に対する細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導に基づくがん免疫療法が、三大療法(外科療法、放射線療法、化学療法)に代わる画期的ながん治療法として近年大きな期待が寄せられている。ところががん組織では、抗腫瘍免疫が誘導されにくい免疫疲弊状態(免疫逃避機構)が構築されており、がん免疫療法をより効果的な治療法として開発する上での障壁となっている。近年腫瘍内に浸潤するエフェクターT細胞に発現する免疫抑制分子PD-1に対する中和抗体を用いた免疫チェックポイント阻害療法が開発されるなど、免疫逃避機構の改善に基づく研究開発が行われている。しかし、腫瘍局所にCTLが浸潤できないこと、腫瘍局所に制御性T細胞(Regulatory T cell: Treg)や免疫抑制性細胞(Myeloid derived suppressor cell: MDSC)などの免疫抑制細胞が多数浸潤していることが原因でPD-1抗体の使用でも奏功しない症例が多数存在する。その点、近年がん血管が免疫抑制細胞を誘引するケモカインを産生し、免疫抑制環境を積極的に構築することが明らかとなってきた。したがって、がん組織での血管新生を阻害できれば、免疫抑制細胞の浸潤そのものを抑制できる新たな治療戦略になると期待される。一方で、VEGF抗体などの既存の血管新生阻害薬は、がん組織での血管新生以外にも生理的な血管新生を一様に阻害してしまい大血管傷害や消化管狭窄などの重篤な副作用を呈する。そこで、がん組織での血管新生を選択的に抑制できれば、副作用発現を低減しつつPD-1抗体治療抵抗性を克服できる新たながん治療法の開発に繋がると考えた。

その点申請者らはこれまでに、がん血管を構成するがん血管内皮細胞(Tumor endothelial cell: TEC)をワクチン抗原として用いた樹状細胞免疫療法を開発してきた。その結果、がん血管の形成阻害により抗腫瘍効果を示すこと、生理的な血管新生に対して影響を及ぼさないこと、すなわちTECにはECでは発現しない抗腫瘍免疫の誘導に関与する特異的な抗原タンパク質が存在する可能性を明らかにしている(Nomura T, et al, *Biol. Pharm. Bull.*, 2017, 2019)。

これまでの申請者らの検討から、TECでは、正常血管を構築するECには発現しない特異的な抗原が存在する可能性は明らかにしてきたものの、TECのマーカー分子は同定されていないことから、TECを標的とした治療法開発は進んでいない。そこで今回の研究では、TECの細胞膜表面に発現するありとあらゆるタンパク質に対する膨大な数の抗体からなるライブラリを構築し、TECとの親和性に基づいてTECに選択的に結合する抗体の創出を試みた。

## 2. 研究の目的

本研究では、がん血管特異的な抗体の創製を通じて、血管新生阻害作用によるPD-1抗体抵抗性腫瘍の免疫抑制環境に対する改善作用を示しつつ、創傷治癒の遅延・大血管傷害・高血圧など生理的な血管新生には影響を及ぼさない新規治療法の確立を目的とする。そのために、正常血管には結合せず、がん血管に選択的に結合する抗体分子の創出を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、ファージディスプレイ法を駆使してがん血管を特異的に認識しうる抗体を創製し、PD-1抗体への治療抵抗性を示す腫瘍における免疫逃避機構の克服を目指した機能特性の評価を行った。

### (1) *In vitro* TECモデルの構築

TECはマーカー分子が同定されておらず、がん組織の中からTECを単離することはできない。そこで、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)やマウス血管内皮細胞株(F2)を、PD-1抗体への抵抗性腫瘍であるCT26(大腸がん細胞株)や4T1(乳がん細胞株)の培養上清環境下で培養することで、*in vitro* TECモデルを構築した。モデルのがん血管としての特性については、物質透過性の亢進作用に基づき評価を行った。

### (2) ファージディスプレイ法を駆使したTEC免疫一本鎖抗体ファージライブラリの構築

TEC膜表面に発現するタンパク質に対する抗体ライブラリを構築するため、TECの膜タンパク質を合成アジュバントと混合して調製したエマルジョンをマウスに免疫し、抗体を誘導した。血清中の抗体産生をELISAにより評価した。その後、脾臓より抗体遺伝子の軽鎖VL、重鎖VH遺伝子を増幅しランダムに連結した。これら遺伝子ライブラリをファージウイルスベクターに挿入し、膨大な種類の抗体からなる一本鎖抗体(scFv)ファージライブラリを構築した。

### (3) TEC免疫scFvファージライブラリからのTEC特異scFvの単離・創出

TEC免疫抗体ライブラリの中から、TECに強く結合するscFvファージを選別するため、ライブラリとTECを相互作用させた。なお、TECとECでは共通に発現するタンパク質も多く存在すると予想されるため、あらかじめライブラリをECと相互作用した後に結合しないファージを*in vitro* TECモデルと相互作用させることで、TEC特異的な抗体ファージを選別した。

### (4) 結合性向上を目指したTEC特異抗体Fcキメラタンパク質の創製と機能評価

*In vivo*への応用を念頭に、抗体の結合性と体内安定性の向上を目指してscFvとIgG抗体の

定常領域 (Fc) を融合したキメラ抗体を精製した。ScFv-Fc 抗体を、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) にて発現させ、IgG に対するアフィニティー精製を行った。In vitroでの結合力は、cell ELISA や免疫組織染色により評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) In vitro TEC モデルの構築

CT26 および 4T1 細胞いずれの培養上清を用いて構築した in vitro TEC モデルにおいても TEC が有する特性である物質透過性や細胞遊走性の亢進が認められた。さらに、TEC において発現上昇することが明らかとなっている TEM8 の遺伝子発現が増加していることも示唆された。このように、がん細胞の種類に依らず TEC モデルはがん血管の特性を有するモデルであることが明らかとなった。

##### (2) ファージディスプレイ法を駆使した TEC 免疫一本鎖抗体ファージライブラリの構築

In vitro TEC モデルより抽出した膜タンパク質を TiterMax により作成したエマルジョンとして投与したところ、TEC に対して結合する抗体の上昇が確認された。そこで、脾細胞より抗体遺伝子を単離し遺伝子合成を行った後に大腸菌に感染して増幅するファージウイルスの構成遺伝子に導入したところ、数千種類以上もの多様性からなる scFv により構成される scFv ファージ抗体ライブラリの構築に成功した。

##### (3) TEC 免疫 scFv ファージライブラリからの TEC 特異 scFv の単離・創出

ライブラリの中から EC には結合せず TEC に選択的に結合する抗体を単離するために、得られたライブラリをあらかじめ EC に結合させて EC に結合する抗体を除いたのちに TEC に作用したところ、TEC に選択的に結合する scFv の候補クローンを 2 種類単離することに成功した。

##### (4) 結合性向上を目指した TEC 特異抗体 Fc キメラタンパク質の創製と機能評価

得られた TEC 特異抗体候補クローンの結合力を向上させることを目的として、抗体の定常領域である Fc を人工的に融合させたキメラタンパク質の創出を試みた。CHO 細胞を用いて遺伝子を導入し、培養上清中の発現をウエスタンブロッティングにより検出したところ、単量体である約 54kD 付近にタンパク質発現が確認できた。プロテイン A により精製後、抗体を用いて cell ELISA 法および蛍光免疫染色法により結合特性を評価したところ、EC に対しては低い結合性であったものの TEC に対しては結合性を示すことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野村 鉄也, 山下 千紗都, 小泉 直也, 宇都口 直樹
2. 発表標題 腫瘍血管を標的とした治療法開発を目指したin vitro腫瘍血管内皮細胞モデルの特性解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi
2. 発表標題 Development of Dendritic cell-based immunotherapy targeting tumor blood vessels in a mouse model of lung metastasis
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tetsuya Nomura, Mai Furukawa, Yuuka Kawashima, Naoki Utoguchi
2. 発表標題 Characteristic analysis of novel tumor derived endothelial cells-specific antibody
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 野村 鉄也, 宇都口 直樹, 他執筆者:101名	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 598
3. 書名 創薬研究者・アカデミア研究者が知っておくべき最新の免疫学とその応用技術	

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------