

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16377

研究課題名（和文）難治性血液悪性腫瘍と自己免疫性疾患に対する新規抗体薬物複合体療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel antibody-drug conjugate for refractory hematological malignancy and autoimmune disease

研究代表者

田部 亜季（Tanabe, Aki）

国立感染症研究所・エイズ研究センター・研究員

研究者番号：60786367

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）：血液悪性腫瘍、自己免疫疾患に対する新規抗体薬物複合体の開発にあたり、本研究では新規に抗体を取得し、定常領域をヒト置き換えたキメラ抗体化に成功した。また既に臨床で実績のある化合物を抗体に化学修飾後、精製を行い、抗体薬物複合体を作成した。細胞株と血液悪性腫瘍患者由来の細胞を用いた解析では、本研究で作成した抗体薬物複合体は標的抗原を発現する細胞に対して特異的に作用することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性血液悪性腫瘍とされてきたT細胞リンパ腫で、近年ブレンツキシマブドリンなどの抗体薬物複合体について良好な治療成績が報告され、新規抗体医薬開発は難治性悪性腫瘍に対する有効な治療法となり得る可能性がある。また自己免疫疾患の治療においても抗体医薬は非常に重要な役割を担っている。本研究では学術的には血液悪性腫瘍や自己免疫疾患に対する抗体を用いた新たな治療法の基礎的研究をその目的としており、また社会的な貢献としては本研究で得られた成果をより開発・応用的な段階へと進めていくことに重要性和意義を有している。

研究成果の概要（英文）：In the development of novel antibody-drug conjugates for hematological malignancies and autoimmune diseases, we obtained a new antibody and succeeded in creating a chimeric antibody for improvement of immunogenicity. We also developed antibody-drug conjugates by chemically modifying the antibodies with compounds that have already been utilized in actual antibody-drug conjugate. Analysis using cell lines and peripheral blood samples derived from patients with hematological malignancies suggested that the antibody-drug conjugates created in this study have the activity specifically on cells expressing the target antigen.

研究分野：抗体工学、血液内科学

キーワード：抗体薬物複合体 抗体工学 蛋白質間相互作用解析 成人T細胞白血病リンパ腫

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 (ATL) は HTLV-1 の感染を原因とする難治性の末梢性 T 細胞腫瘍である。その予後は極めて不良であり、抗 CCR4 抗体や EZH2 阻害剤などの新規治療薬開発が行われてきたが、依然として予後の改善には課題が残されている。造血幹細胞移植は、治癒が得られる可能性がある治療法であるが、発症年齢の中央値は 65 歳を超え年々増加傾向にあり、移植が適応となる症例は限定される現状がある。

抗体薬物複合体 (ADC: Antibody Drug Conjugate) は、モノクローナル抗体に細胞障害性薬剤を、合成リンカーで化学修飾した抗体医薬である。特に血液悪性腫瘍では、現在上市されているホジキンリンパ腫を標的とした brentuximab vedotin や急性リンパ性白血病を標的とした Inotuzumab Ozogamicin などの薬剤が果たす役割は大きく、未だ有効な治療がない難治性血液悪性腫瘍を対象とした新規 ADC 開発は今後も重要な課題と考える。

CADM1 は HTLV-1 感染 T 細胞と ATL 細胞 (腫瘍化 T 細胞) に過剰発現している Ca 非依存性の細胞接着分子であり、既に HAS-Flow 法などの臨床検査としてその有用性が認められている。CADM1 を標的とした抗体治療薬開発において高親和性の抗ヒト CADM1 モノクローナル抗体作製が非常に困難であり、HAS-Flow 法などでの検査ではニワトリ由来の IgY 抗体が用いられてきた。今回我々は、新規の CADM1 抗体を取得し、ATL を標的とした治療薬開発を試みた。

また、現在の ADC は癌治療領域での研究が主体であるが、抗体の標的特異性や血中での安定性や半減期の長さを利用して、将来的には癌以外の疾患群でも ADC のニーズが高まると考えられる。しかしながら癌治療領域以外へ ADC の応用についての報告は現在も非常に少なく十分な知見は得られていない状況にあった。

2. 研究の目的

本研究では、難治性血液悪性腫瘍を標的とした新規抗体薬物複合体開発と、その癌治療領域以外への応用を研究目的としている。

3. 研究の方法

1) 新規抗体クローンの取得とキメラ化抗体の作製

難治性の T 細胞腫瘍である、成人 T 細胞白血病リンパ腫 (Adult T-cell Leukemia/Lymphoma、ATLL: 以下 ATL) を標的として、新規抗体の取得とキメラ抗体を作製した。抗原の全長の細胞外ドメインではなく、ATL で発現するサブタイプを抗原として選択し、設計を行なった。

共同研究者のもとで動物に免疫後、ハイブリドーマ法を用いてシングルクローン化し、フローサイトメトリーを用いて細胞への結合活性を有するクローンを選別した。選別されたクローンは、可変領域の配列をクローニング後にリコンビナント発現精製を行なった。結合活性を確認した後に、キメラ抗体化を行なった。また、自己免疫疾患を標的とする ADC については、活性化リンパ球で発現する抗原を標的とした抗体クローンについてキメラ抗体化を試みた。

2) 取得したクローンの物理化学的な機能解析

表面プラズモン共鳴 SPR を用いた速度論パラメーターと結合親和性の詳細な解析や、示差走査熱量計 (DSC) を用いた熱安定性などの物理化学的性質を解析した。また結晶構造解析や水素重水素交換質量分析法などを用いたエピトープマッピングを試みた。

3) 細胞に対する結合活性と生物学的機能解析

HTLV-1 感染細胞株、ATL 細胞株を用いて、フローサイトメトリーや顕微鏡観察で抗体の細胞に対する結合活性と抗体の内在化、ADCC 活性などの生物学的な機能評価を共同研究者とともに行った。

4)抗体への細胞障害性薬剤の化学修飾と細胞レベルでの薬効評価

取得した抗体に、既に上市されている有効性が示されているマレイミドリンカー付き細胞障害性薬剤を化学修飾した。化学反応後の抗体薬物複合体は、サイズ排除クロマトグラフィーで未反応の化合物除去を行なった。HTLV-1 感染細胞株、ATLL 細胞株、血液悪性腫瘍患者由来の細胞を用いて、抗体薬物複合体の細胞増殖抑制効果を評価した。

5)抗体のヒト化

抗体のヒト化にあたり構造情報が必要となるため、Fab 抗体を作製し結晶構造解析を行なった。また CDR グラフティングによる抗体のヒト化のため、Protein Data Bank(PDB)に登録されている全ヒト抗体の配列から、今回取得した抗体クローンと配列の相溶性が高いヒト抗体の抽出とスコアリングを試みた。

4. 研究成果

これまでに CADM1 精製抗原に対して結合できる抗体は取得できていたが、標的細胞に高い親和性で結合できる抗体を取得することが非常に困難であった。今回、免疫抗原のデザインを細胞外ドメイン全長ではなく ATL で発現しているスプライスバリエーションのみを選択することで、動物免疫とハイブリドーマ法により ATLL に高親和性で結合する抗体の取得に成功した。可変領域をクローニングし、リコンビナント蛋白質として、哺乳動物細胞発現系を用いてキメラ抗体を大量に発現と精製が可能となった。また自己免疫疾患を標的とした抗体については、活性化リンパ球を標的とした抗原に対して高い結合活性を保持したキメラ化抗体の作製に成功した。

SPR や DSC を用いた物理化学的な抗体の機能解析において、新規取得した抗体クローンは高い結合親和性と熱安定性を有していた。また細胞株を用いた機能解析では低濃度で標的抗原を発現する細胞に結合し、さらに薬物デリバリーに重要な要素となる抗体の内在化機能を有していることが明らかになった。

既に市販されている抗体薬物複合体において有効性が示されている細胞障害性薬剤である VcMMAE を抗体のシステイン残基にマレイミドリンカーを介して化学修飾した。作製した抗体薬物複合体は標的とする CADM1 陽性細胞特異的に、細胞増殖抑制効果を示すことが明らかになった。また、血液悪性腫瘍患者由来の末梢血検体を用いて CADM1/CD7 の展開で正常リンパ球、HTLV-1 感染細胞、ATL 細胞を分画可能な HAS-Flow 法による解析を行い、抗体薬物複合体は ATL 細胞分画を減少させる傾向を示した。

検査応用だけでなく抗体医薬として臨床応用を指向した際に、齧歯類由来の抗体であるため、ヒト化が重要なプロセスとなる。今回はまず初期の抗体エンジニアリングであるヒトキメラ抗体化に成功し、キメラ抗体にした後も抗体は高い結合親和性と安定性を保持していることが明らかになった。ヒト化に既に着手しており、CDR グラフティングに向けたフレームワークの抽出を行なった。今後 CDR グラフティングと実際の抗体の発現精製・機能解析、さらなる抗体改変を行う予定である。

自己免疫疾患を標的とした抗体治療法の開発については、標的抗原に対するキメラ抗体を用いて、細胞障害性薬剤を化学修飾し、細胞内へ取り込まれ細胞増殖抑制効果を示すことが明らかになった。生物学的な活性が得られたことから、この抗体を用いた薬剤の細胞内デリバリーが可能であることが示唆された。しかしながら、抗体に化学修飾するためのリンカー付き化合物の取得が今後の課題となっている。

今回、新規に取得した抗体を用いて作製した抗体薬物複合体は細胞レベルにおいて、細胞増殖抑制効果を確認できた。今後はより詳細な生物学的効果について検討を行うとともに、動物レベルでの有効性と安全性について解析を行う。今回はモデルとして上市されている抗体薬物複合体の細胞障害性薬剤を用いているが ATL により最適な化合物探索も今後の重要な課題である。本研究における新規抗体取得とモデル化合物を修飾した抗体薬物複合体の活性に関する基礎的知見が、血液悪性腫瘍の新たな治療薬開発の基盤となることを期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Keisuke Kasahara, Daisuke Kuroda, Aki Tanabe, Raiji Kawade, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto	4. 巻 563
2. 論文標題 Anion solvation enhanced by positive supercharging mutations preserves thermal stability of an antibody in a wide pH range	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 54-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.05.053	査読の有無 有
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 Watanabe Y, Tanabe A, Hamakubo T, Nagatoishi S, Tsumoto K.	4. 巻 170
2. 論文標題 Development of biparatopic bispecific antibody possessing tetravalent scFv-Fc capable of binding to ROBO1 expressed in hepatocellular carcinoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 307 ~ 315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab049	査読の有無 有
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 Yokoo T, Tanabe A, Yoshida Y, Caaveiro JMM, Nakakido M, Ikeda Y, Fujimura Y, Matsumoto M, Entzinger K, Maruyama T, Okumura CJ, Nangaku M, Tsumoto K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Antibody recognition of complement Factor H reveals a flexible loop involved in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome pathogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101962 ~ 101962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.101962	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 Chiba S, Tanabe A, Nakakido M, Okuno Y, Tsumoto K, Ohta M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Structure-based design and discovery of novel anti-tissue factor antibodies with cooperative double-point mutations, using interaction analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19570(1-12)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74545-4.	査読の有無 有
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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 氏家寛, 田部亜季, 長門石暁, 津本浩平
2. 発表標題 抗OX40抗体の受容体機能制御に関わる分子メカニズム解明
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横尾尚典、田部亜季、中木戸誠、長門石暁、Martinez Caaveiro Jose Manuel、吉田瑤子、池田洋一郎、南学正臣、津本浩平
2. 発表標題 aHUSに関連する補体抑制因子CFHと診断薬取得に向けた特異的抗体の機能解析
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021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 機能化リンクモジュールの開発とECM模倣ハイドロゲルの創製
3. 学会等名 日本膜学会第43年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田部亜季、那須智博、高橋良明、田中勇悦、内丸薫、渡邊俊樹、津本浩平、中野和民
2. 発表標題 HTLV-1感染細胞とindolent ATLを標的とする抗OX40抗体薬物複合体開発
3. 学会等名 第7回HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aki Tanabe and Yoshiaki Takahashi, Tomohiro Nasu, Anna Yui, Makoto Nakakido, Kaoru Uchimaru, Toshiki Watanabe, Kouhei Tsumoto, Kazumi Nakano
2. 発表標題 Development of antibody-drug conjugate targeting adult T-cell leukemia/lymphoma cells with a new anti-CADM1 antibody
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 那須 智博、田部 亜季、渡邊 俊樹、内丸 薫、中野 和民
2. 発表標題 成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)細胞に対する新規治療薬Dar inaparsinの効果の検討とその作用機序解明の試み
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横尾尚典、田部亜季、中木戸誠、長門石暁、吉田瑤子、池田洋一郎、南学正臣、津本浩平
2. 発表標題 aHUSに関連する補体抑制因子CFHと特異的抗体の機能解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 氏家寛、田部亜季、伊村明浩、広瀬茂久、津本浩平
2. 発表標題 抗OX40抗体の受容体機能制御に関わる分子メカニズム解明
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年、オンライン開催、2020年12月2日-4日
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笠原慶亮、黒田大祐、河出来時、田部亜季、長門石暁、津本浩平
2. 発表標題 計算デザイン Supercharging 抗体の物性機能解析
3. 学会等名 第48回 構造活性相関シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗CADM1抗体	発明者 中野和民、高橋良明、田部亜季、津本浩平、渡邊俊樹	権利者 東京大学、琉球大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021- 80133	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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