

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16119

研究課題名（和文）CD47-SIRP 結合阻害特殊環状ペプチドによる革新的免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of immunotherapy using SIRPa-binding macrocyclic peptides

研究代表者

羽間 大祐（Hazama, Daisuke）

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30894604

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、まずCD47-SIRP 系阻害が免疫チェックポイント阻害剤（ICI）による抗体依存性細胞貪食（ADCP）を増強するのかを確認すべく、抗SIRP 抗体を用いて、抗PD-L1抗体による骨髄由来マクロファージの肺癌細胞に対するADCPが高まるのかを検証した。条件検討を重ねた結果、IFN を用いて腫瘍細胞表面のPD-L1発現を高めることによりADCPは増強されることが判明した。in vivoではin vitroと比較して腫瘍細胞表面のPD-L1発現が高まることが報告されており、現在腫瘍マウスモデルにてその有効性を確認すべく研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD47-SIRP 系を標的とした薬剤は、幅広いがん種に対する治療薬として期待されている。本研究では抗SIRP 抗体を用いて抗PD-L1抗体による肺癌細胞に対するマクロファージの抗体依存性細胞貪食が増強することを示した。今後腫瘍マウスモデルでの有効性の確認を行うとともに、SIRP 結合ペプチドの経気道投与でも同様の併用効果が見られるかを検証することで、これまで困難であった吸入免疫チェックポイント阻害剤の開発が可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated whether inhibition of the CD47-SIRP axis enhances immune checkpoint inhibitor (ICI)-induced antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP). We showed that IFN increased PD-L1 expression on the surface of lung cancer cells, and anti-SIRP antibody promoted macrophage-mediated ADCP of ICI-opsonized tumor cells under the conditions. It has been reported that PD-L1 expression on the surface of tumor cells is increased in vivo compared to in vitro. We are currently evaluating the efficacy of this combination therapy in mouse tumor models.

研究分野：医学

キーワード：抗体依存性細胞貪食 抗SIRP 抗体 SIRP 結合ペプチド CD47-SIRP 系 免疫チェックポイント阻害剤

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) Signal regulatory protein (SIRP) はマクロファージに豊富に存在し、CD47 と結合して細胞間シグナル CD47-SIRP 系を形成する[1]。CD47 や SIRP に対する抗体を用いてこの相互作用を阻害することで、腫瘍特異抗体によるマクロファージの ADCP を亢進させ、抗腫瘍効果が増強されることを我々はこれまでに報告してきた[2][3][4]。

(2) CD47-SIRP 系の阻害によるこのような抗腫瘍効果の増強は、腫瘍特異抗体のみならず、抗 PD-L1 抗体や抗 PD-1 抗体といった免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) との併用でも示され[4][5]、CD47-SIRP 系を標的とした薬剤は、幅広いがん種に対する治療薬として期待されているが、肺がんに対する有効性についてはまだ確立されていない。

(3) 我々は先行研究にて、CD47-SIRP 系を阻害する SIRP 結合特殊環状ペプチドの経静脈投与が悪性リンパ腫とメラノーマの腫瘍マウスモデルにおいて腫瘍特異抗体の抗腫瘍効果を増強することを示した[6]。中分子である特殊環状ペプチドは、抗体医薬と同等の高い特異性と強い結合活性を持ちながら、化学合成が可能のため製造コストを抑制でき、低分子量であるため薬剤自体の抗原性が低く、さらに速やかに排泄されるため正常組織への蓄積毒性が少ないなどの利点がある。そのため、SIRP 結合ペプチドと ICI の併用で優れた治療効果を示すことができれば、今後ヒト SIRP を標的とした特殊環状ペプチドを開発することにより、安価で副作用の少ない新たな ICI が得られる可能性がある。また、これまでに開発された ICI の多くは、抗体やリコンビナント蛋白といった高分子医薬であり、経気道的投与は困難であったが、多くの低・中分子医薬では吸入での投与が行われており、本研究を通じて、肺がんに対する吸入がん化学療法の可能性が広がると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 抗 SIRP 抗体および SIRP 結合ペプチドが、抗 PD-L1 抗体によるマクロファージの ADCP を増強するのかについて検討すること

(2) 抗 SIRP 抗体および SIRP 結合ペプチドが、腫瘍マウスモデルにおいて抗 PD-L1 抗体による抗腫瘍効果を増強するのかを検討すること。

(3) SIRP 結合ペプチドによる抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果増強作用が経気道投与でも得られるのかを検討すること。

(4) SIRP 結合ペプチドの経気道投与による薬物動態や副作用の解析を行うこと。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6 マウスの骨髄由来マクロファージを用い、抗 SIRP 抗体あるいは SIRP 結合ペプチドが、抗 PD-L1 抗体による LLC 細胞または CMT 167 細胞に対するマクロファージの ADCP 活性を増強するかを評価する。

(2) C57BL/6 マウスに LLC 細胞または CMT 167 細胞を皮下移植し、抗 PD-L1 抗体と抗 SIRP 抗体あるいは SIRP 結合ペプチドの併用が、それぞれの単独投与よりも強力な腫瘍排除を示すかを検討する。

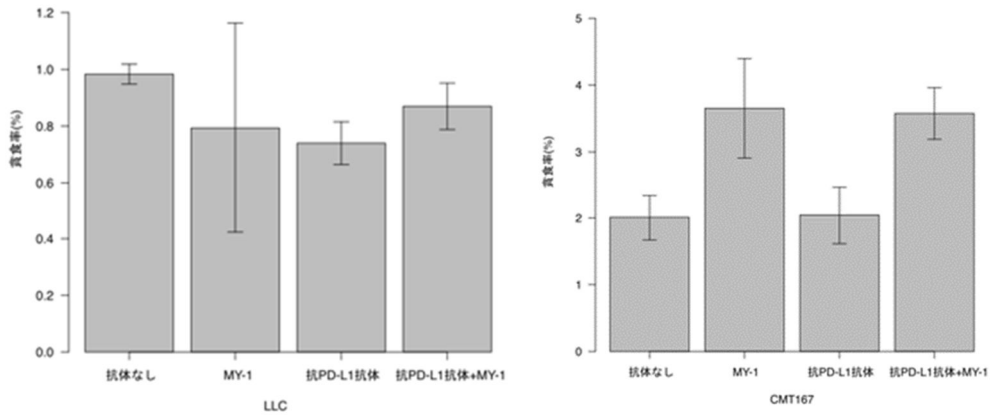
(3) C57BL/6 マウスに LLC 細胞または CMT 167 細胞を経静脈的に移植し、同様に抗 PD-L1 抗体と抗 SIRP 抗体あるいは SIRP 結合ペプチドの併用が、それぞれの単独投与よりも強力な腫瘍排除を示すかを検討する。

(4) C57BL/6 マウスに LLC 細胞または CMT 167 細胞を皮下移植あるいは経静脈移植し、抗 PD-L1 抗体腹腔内投与と SIRP 結合ペプチドの経気道投与による抗腫瘍効果を上記(2)(3)と比較する。

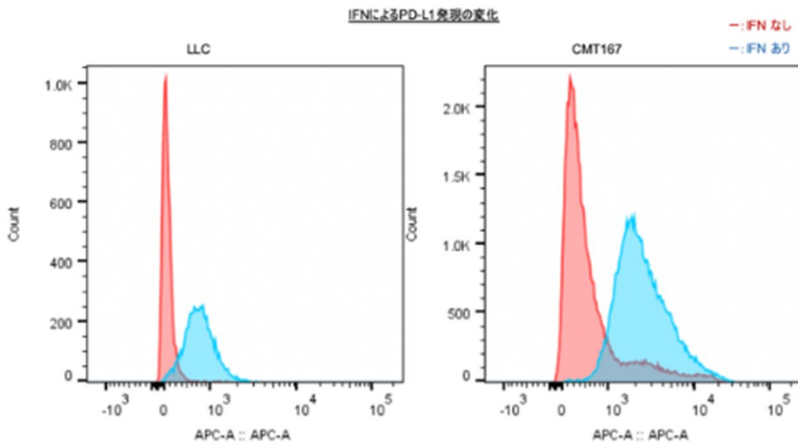
(5) 実験に使用したマウスから腫瘍や血液、各種臓器を採取し、フローサイトメーターを使用した免疫微小環境解析および、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置を用いた SIRP 結合ペプチドの血中及び腫瘍内濃度の測定を行う。

4. 研究成果

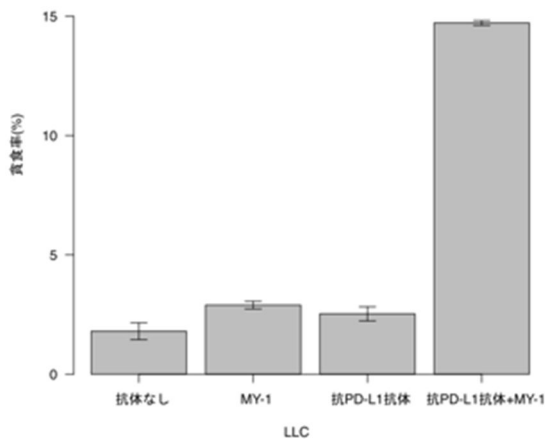
(1) LLC 細胞に対する C57BL/6 の骨髄由来マクロファージの ADCP を評価したが、抗 SIRP 抗体 (MY-1 10 µg/ml) 単剤群、抗 PD-L1 抗体 (10 µg/ml) 単剤群、併用群のいずれも貪食率は上昇しなかった。一方、CMT167 細胞を用いた実験では、MY-1 投与群においてわずかに貪食率の上昇を認めしたが、抗 PD-L1 抗体との併用による相乗効果は認めなかった。



(2) in vivo では in vitro と比較して腫瘍細胞表面の PD-L1 発現が高く、IFN 存在下に培養することで、PD-L1 発現が高まることが報告されている [7]。そこで、LLC 細胞および CMT 167 細胞を、IFN 10ng/ml または 100ng/ml の存在下で 48 時間または 72 時間培養を行ない、PD-L1 発現を評価した。いずれの条件でも PD-L1 発現は上昇し、特に 100ng/ml の濃度で 72 時間培養することで最も上昇することが確認された。

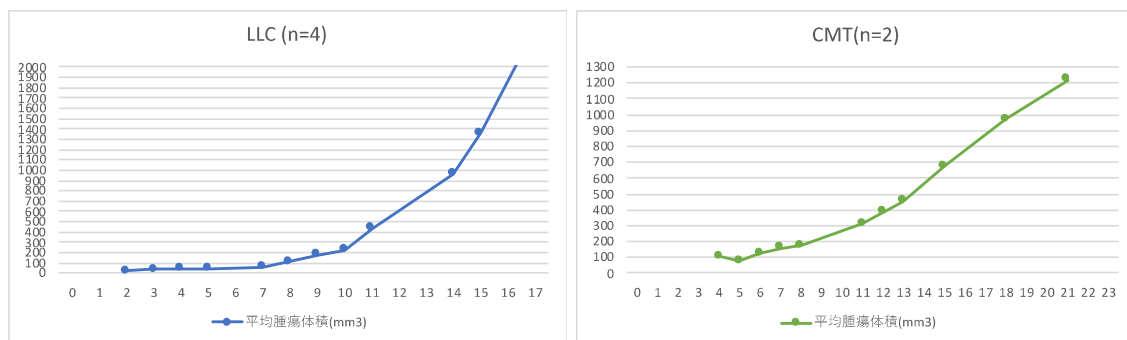


(3) 最も PD-L1 発現が促進された条件 (IFN : 100ng/ml、72 時間培養) で培養した LLC 細胞を用いて、上記(1)と同じように抗 PD-L1 抗体による ADCP を調べたところ、抗 SIRP 抗体 (MY-1) 単剤群、抗 PD-L1 抗体単剤群、併用群いずれにおいても抗体投与を行わなかった群と比較して食率の上昇を認め、特に併用群においては著明な食率の上昇を認めた。



(4) LLC 細胞を用いた皮下転移モデルの実験の既報では、腫瘍系が 50~100mm³ 前後に達した段階で抗 PD-L1/PD-1 抗体投与が開始されており [8] [9] [10]、本研究でも皮下転移モデルにおいて平均腫瘍体積が 100mm³ に達した段階で治療開始することとし、LLC 細胞および CMT167 細胞の自然経過を確認したところ LLC は移植後 7-8 日、CMT 167 は移植後 5-6 日で目標体積に達すること

が確認された。



(5) 腫瘍マウスモデルを行う上で、大量の抗体が必要であり、MY-1 を産生するハイブリドーマを濃縮培養し、得られた上清を CBB 染色することで純度と収量を確認した。現在精製中である。

<引用文献>

1. Matozaki, T.; Murata, Y.; Okazawa, H.; Ohnishi, H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRP signalling pathway. *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 72-80, doi:10.1016/j.tcb.2008.12.001.
2. Sakamoto, M.; Murata, Y.; Tanaka, D.; Kakuchi, Y.; Okamoto, T.; Hazama, D.; Saito, Y.; Kotani, T.; Ohnishi, H.; Miyasaka, M.; et al. Anticancer efficacy of monotherapy with antibodies to SIRP /SIRP 1 mediated by induction of antitumorigenic macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2022**, *119*, 1-10, doi:10.1073/pnas.2109923118.
3. Murata, Y.; Saito, Y.; Kotani, T.; Matozaki, T. CD47-signal regulatory protein signaling system and its application to cancer immunotherapy. *Cancer Sci.* **2018**, *109*, 2349-2357, doi:10.1111/cas.13663.
4. Yanagita, T.; Murata, Y.; Tanaka, D.; Motegi, S. ichiro; Arai, E.; Daniwijaya, E.W.; Hazama, D.; Washio, K.; Saito, Y.; Kotani, T.; et al. Anti-SIRP antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy. *JCI Insight* **2017**, *2*, 1-15, doi:10.1172/jci.insight.89140.
5. Sockolosky, J.T.; Dougan, M.; Ingram, J.R.; Ho, C.C.M.; Kauke, M.J.; Almo, S.C.; Ploegh, H.L.; Garciaa, K.C. Durable antitumor responses to CD47 blockade require adaptive immune stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, E2646-E2654, doi:10.1073/pnas.1604268113.
6. Hazama, D.; Yin, Y.; Murata, Y.; Matsuda, M.; Okamoto, T.; Tanaka, D.; Terasaka, N.; Zhao, J.; Sakamoto, M.; Kakuchi, Y.; et al. Macrocyclic Peptide-Mediated Blockade of the CD47-SIRP Interaction as a Potential Cancer Immunotherapy. *Cell Chem. Biol.* **2020**, *27*, 1181-1191.e7, doi:10.1016/j.chembiol.2020.06.008.
7. Li, H.Y.; McSharry, M.; Bullock, B.; Nguyen, T.T.; Kwak, J.; Poczobutt, J.M.; Sippel, T.R.; Heasley, L.E.; Weiser-Evans, M.C.; Clambey, E.T.; et al. The tumor microenvironment regulates sensitivity of murine lung tumors to PD-1/PD-L1 antibody blockade. *Cancer Immunol. Res.* **2017**, *5*, 767-777, doi:10.1158/2326-

6066.CIR-16-0365.

8. You, W.; Li, L.; Sun, D.; Liu, X.; Xia, Z.; Xue, S.; Chen, B.; Qin, H.; Ai, J.; Jiang, H. Farnesoid X receptor constructs an immunosuppressive microenvironment and sensitizes FXR^{high}PD-L1^{low} NSCLC to anti-PD-1 immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.* **2019**, *7*, 990-1000, doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0672.
9. Lei, M.; Liu, J.; Gao, Y.; Dai, W.; Huang, H.; Jiang, Q.; Liu, Z. DPP Inhibition Enhances the Efficacy of PD-1 Blockade by Remodeling the Tumor Microenvironment in Lewis Lung Carcinoma Model. *Biomolecules* **2024**, *14*, 391, doi:10.3390/biom14040391.
10. Liu, C.; Zheng, S.; Jin, R.; Wang, X.; Wang, F.; Zang, R.; Xu, H.; Lu, Z.; Huang, J.; Lei, Y.; et al. The superior efficacy of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in KRAS-mutant non-small cell lung cancer that correlates with an inflammatory phenotype and increased immunogenicity. *Cancer Lett.* **2020**, *470*, 95-105, doi:10.1016/j.canlet.2019.10.027.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------