

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19055

研究課題名(和文) 内在性抗体を用いる新規がん治療システム

研究課題名(英文) Novel cancer therapeutic system using endogenous antibody

研究代表者

片山 佳樹 (Katayama, Yoshiki)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：70284528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、固形がんの普遍的な性質であるpHの低下を利用して細胞膜に貫入し、血中の内在性抗体をがん細胞に集積させる分子の開発を目的としている。これにより、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)を活性化してがんを殺傷することを期待している。

そこで、pH低下に伴い細胞膜に勧誘する α -ヘリックスを形成するペプチド配列を種々設計し、抗体のFc部位と結合するペプチドを連結した分子を開発し、がん細胞に抗体を集積させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、がん化学療法の主流は抗体医薬であるが、製造、保存などに問題があり、薬価が極めて高い。このままでは財政破綻を引き起こすため、安価な薬剤で抗体と同じ活性を実現できれば、社会的意義が大きい。本研究で開発する分子は、固形がんの共通の性質であるpHの低下を利用して内在抗体をリクルートしてナチュラルキラー細胞を活性化してがんを治療できるため、一つの分子で種々のがんに適用可能であり、社会的意義は極めて大きい。また、エフェクター作用を抗体以外で実現できる分子として学術的にも価値が高い。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to develop a molecule that penetrates the cell membrane and accumulates endogenous antibodies in the blood to cancer by utilizing the pH lowering, which is a universal property of solid tumors. This is expected to activate natural killer cells (NK cells) to kill cancer. Therefore, we designed a variety of peptide sequences that form α -helices that recruit to the cell membrane as the pH drops, and developed molecules that link Fc binding peptide, and succeeded in accumulating antibodies in cancer cells. bottom.

研究分野：生体関連化学

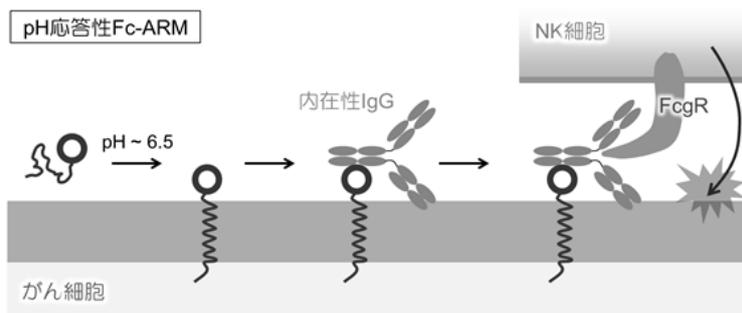
キーワード：がん免疫療法 抗体 エフェクター作用 ADCC ペプチド がん化学療法 抗体医薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景 がんの化学療法は、薬理活性の強い細胞殺傷能を有する薬剤が用いられるが、これは重篤な副作用を伴う。そこで、分子標的薬として抗体医薬が注目されている。しかし、抗体薬は極めて薬価が高く、保存安定性などに関しても問題がある。そこで、抗体を用いずに同様の効果を得られる手法があれば非常に高価的である。抗体は、標的分子を介してがん細胞に結合したのち、その Fc 領域を認識するナチュラルキラー細胞等の免疫細胞を活性化して元を殺傷するエフェクター作用を有する。しかし、このエフェクター作用は抗体独自の作用であり、これを安価な合成分子に置き換えることは非常に困難であると考えられていた。

2. 研究の目的 上記背景に対し、申請者らはがんの標的分子に結合するリガンドに、抗体の Fc 部分に結合するペプチドを開発し、これが血中に多量に存在する内在性抗体をがんのリクルートして、ナチュラルキラー細胞を活性化してがんを殺傷させる ADCC を惹起できることを見出していた。一方、がんは千差万別であり、この分子に利用するリガンドをその都度、変更、開発しなければならない問題があった。そこで、本研究では、固形がんの一般的性質である低 pH を利用して内在抗体をがんのリクルートすることを考えた。がんは、代謝系が異なり、乳酸を産生するので、がん組織近傍では pH が低下することが知られている。そこで、pH が低下すると α -ヘリックスを形成して細胞膜に

貫入するペプチドを、抗体の Fc 領域に結合するペプチドと連結した分子を開発し、低 pH 下でのみ細胞に内在抗体をリクルートできる分子の開発を目的とした。



3. 研究の方法 【pH 応答型抗体リクルート分子の設計と合成】 分子設計は基本的にすべてペプチド配列で行った。すなわち、抗体結合部位と pH 応答部位を連結するリンカー部位もペプチド配列とした。基本構造として左図のような抗体結合ドメインとして Protein A を一つ有するものと、下の図のように、Protein A を 2 つ連結した分子を設計した。いずれも、Protein G ドメイン配列の末端にオリゴヒスチジンタグを

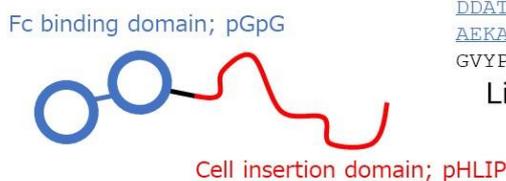
pH-ARM : pH responsive Antibody Recruiting Molecule



pHLIP : $\overset{+}{A}E\overset{-}{Q}N\overset{-}{P}I\overset{-}{Y}W\overset{-}{A}R\overset{-}{Y}A\overset{-}{D}W\overset{-}{L}F\overset{-}{T}T\overset{-}{P}L\overset{-}{L}L\overset{-}{L}D\overset{-}{L}A\overset{-}{L}L\overset{-}{V}D\overset{-}{A}D\overset{-}{E}G\overset{-}{T}$

Mw = 21612.70 Da

HHHHHHHTYKLVINGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWY
DDATKTFVTTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTPKAVDAET
AEKAFKQYANDNGVDGVWYDDATKTFVTESQTTAKNWELETASASHQPP
GVYPQGHSDTTGEQNPIYWARYADWLFTTPLL~~LDL~~LALLVDADEGT



導入し、これにより精製できるようにした。Protein G ドメインを 2 つ有する分子の全配列を全ページに記した。pH 応答ペプチドとしては、まず、報告例のある pHLIP (John F. Hunt et al.,

Biochemistry, 1997, **36**, 15177-15192)を用いた。合成は、大腸菌 (BL21) を用いてプラスミドからの発現を用いた。生成は、ニッケル担持 HIS Tag 精製カラムを用い、イミダゾールで溶出させて精製した。

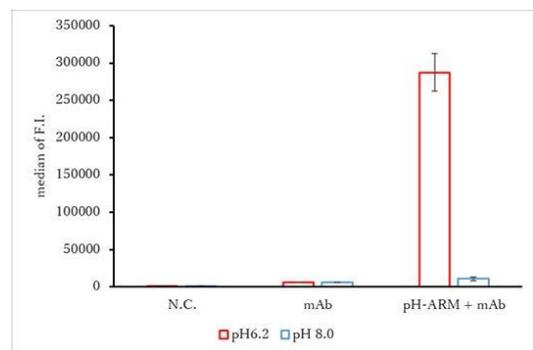
【pH によるリクルート分子、及び抗体分子のがん細胞へのリクルート評価】 リクルート分子のがん細胞への結合は、ローダミン標識して、蛍光顕微鏡、およびフローサイトメトリーにより評価した。また、リクルート分子を介した抗体のリクルートは、抗体をフルオレセイン (FITC) 標識して、どのように評価した。

【ADCC 誘導評価】 IGOVE-1(がん細胞・CD20(-)) 5×10^3 個にリクルート分子(800 nM)及び抗 CD20 抗体(500 nM)を添加し、KHYG-1 158V(ナチュラルキラー細胞 Fc γ IIIa 受容体(+))を $1 - 4 \times 10^4$ cells 添加して、37°C、16 時間インキュベート後に、破壊されたがん細胞を漏出する LDH 活性を計測することで評価した。

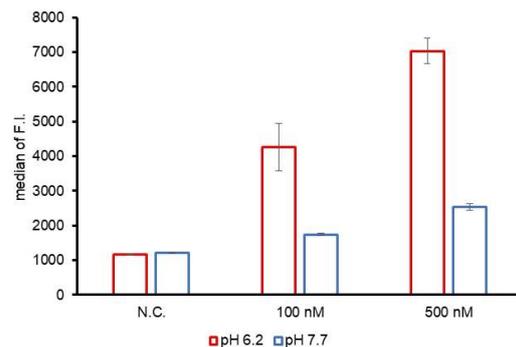
【pH 応答ペプチドの探索】 タンパク配列データベース (Uniprot) から、ヒト由来膜貫通タンパク質の膜貫通部分の配列を抽出し、条件を満足する配列を探索、さらに、荷電アミノ酸が多い配列を選択した。

【新規 pH 応答ペプチドの機能評価】 探索したペプチドのアミノ末端に蛍光たんぱく質 (Gamiillus) を連結した遺伝子を設計し、発現プラスミドに組み込んで上記と同じ手法で大腸菌から発現し、生成した。得られた蛍光性ペプチドを用い、がん細胞 (IGLOVE-1) への結合を pH 7.4 あるいは、6.0 で蛍光顕微鏡、およびフローサイトメトリーで評価した。

4. 研究成果 【pH 応答型抗体リクルート分子の設計と合成】 まず最初に既報の pH 応答型配列を用いた。これまでの研究で、ADCC の誘導には、リクルート分子の IgG 分子の Fc 部分への結合力が重要であることが分かっていたので、強い結合力を有する protein G を採用した。目的分子は大腸菌から得られ、ヒスチジンタグを利用した精製により、目的物を得ることができた。後述するように、protein G を 2 つ連結した分子と、一つだけ有する分子を合成し、何れも目的物を得ることができた。

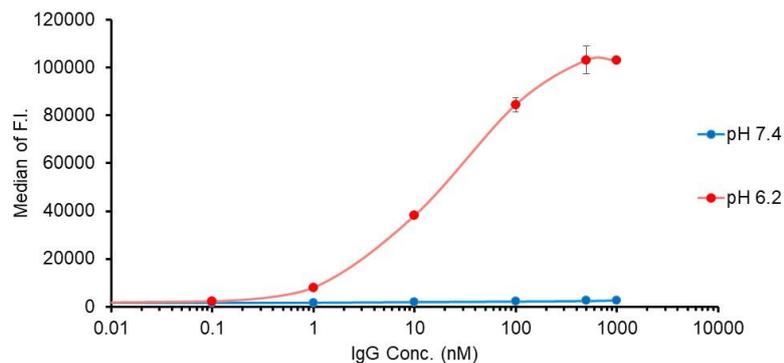


【pH によるリクルート分子、及び抗体分子のがん細胞へのリクルート評価】 まず、protein G ドメインを 2 つ連結させた分子にローダミン標識し、がん細胞 (IGLOVE-1) への結合を異なる pH で評価した。結果を右図に示す。pH 7.7 ではペプチドのがん細胞への結合は、分子濃度を増加させてもほとんど見られなかったが、pH 6.2 では、濃度依存的に現細胞への集積が観察された。



次に抗体のリクルートを評価した。蛍光標識抗体の結合を観察したところ、右図に示すように pH 7.7 では抗体はがん細胞にほとんど結合しないのに対し、pH 6.2 ではリクルート分子存在下でのみ堅調に細胞に結合した。このことは、本分子が抗体を pH 低下に伴ってがん細胞にリクルートできることを実証している。ただ、後述するように本分子は、ADCC を誘導できなかった。この理由として、分子が細胞表面に集積するものそこで凝集が生じていることが考えられた。これは、protein G ドメインを2つ導入したことにより、この分子が異なる抗体を架橋することによるものではないかと考えた。そこで、次に protein G を1つにした分子を設計し、同様に評価した。

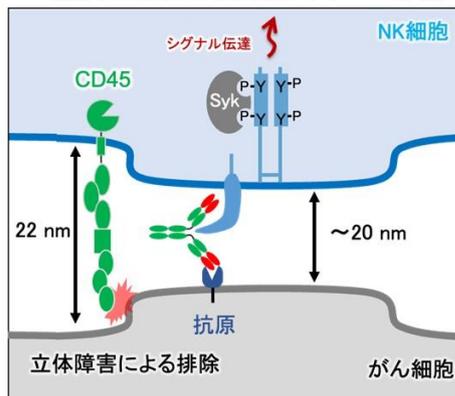
この分子も同様に、pH 6 においてのみ抗体を明確にがん細胞にリクルートできていた(下図)。



【ADCC 誘導評価】 ここまで protein G ドメインを2つ及び1つ有する分子を合成した。いずれの分子も、がん細胞に pH が低下したときのみ結合し、同時にその場合にのみ抗体を細胞表面にリクルートできることが示された。そこで、ADCC 活性を評価したが、いずれの分子においても明確な ADCC 活性は観察されなかった。Protein G を1つにした場合でも、細胞表面上に凝集が観察されており、ADCC 誘導能の低下の原因として、protein G による抗体の架橋ではなく、ペプチドそのものが pH の低下に伴い、細胞膜貫入以外にもペプチド同士凝集することが考えられた。それによる ADCC 阻害のマカニズムとして下図のようなことが考えられた。

ADCC の誘導

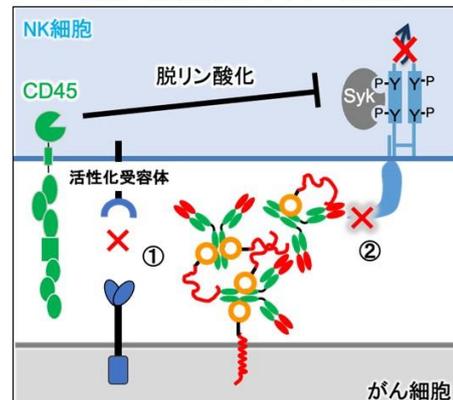
抗体医薬を介した免疫シナプスの形成



においては、
上図左のよう
に、ナチュラルキラー細胞
の受容体が細胞
表面に結合
した抗体に結
合するが、そ
れにより量細

胞の膜が引き寄せられ、ナチュラルキラー細胞の活性化を抑制する CD45 が立体的に排除されることが必要である。一方、今回の分子では、protein G ユニットを一つにしても右側のように凝集体が生じるために立体的に D45 が排除されないことが考えられた。

本法による免疫シナプスの形成

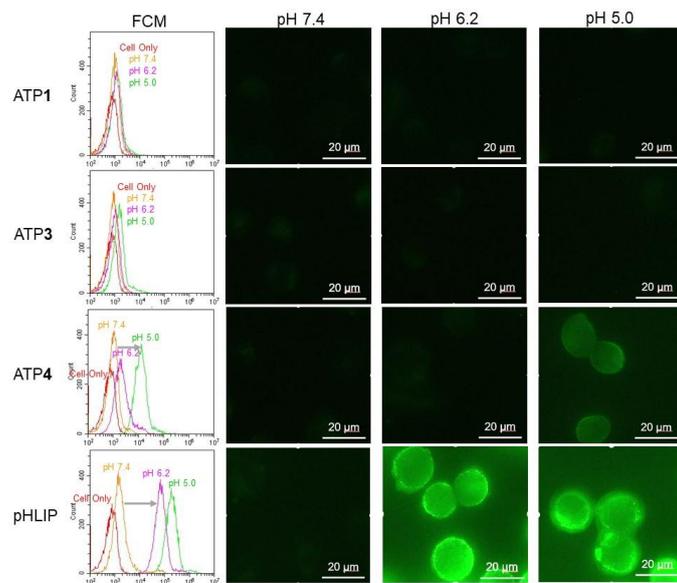


【pH 応答ペプチドの探索】 既知の pH 応答ペプチドは、低 pH で水溶性が低下しすぎて凝集も招くことが分かったため、新規のペプチド配列を探索することとした。データベースから 5185 種のヒト由来の膜たんぱく質の膜貫入部分の配列を抽出した。これらを用いて、pH 低下に伴うヘリックス形成部分に荷電残基としての Arg や Lys を含まず、膜貫入時のヘリックス形成部分に pH 応答性を持つ酸性残基として Asp か Glu を 2 つ以上もち、さらに、膜貫入後に膜から抜けないために、細胞内に入り込む部分にも酸性残基を 2 つ以上有する条件を満足し、ジスルフィド形成するシステイン残基も含まない配列を探索した。その結果、27 配列を条件を満足する配列として選択した。さらに、pH 低下による凝集を防げるように荷電残基を多く含む配列を選択して、最終的に以下の 4 つの配列を得た。最下段の配列 (pHLIP) は、これまで用いていた既報の配列である。

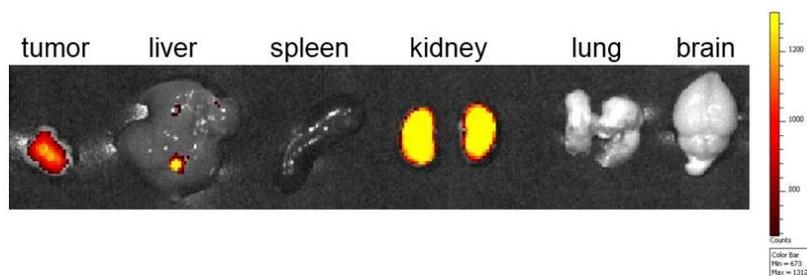
	アミノ酸配列	荷電アミノ酸 #	正味の電荷
ATP1	RRFFKDRWNQLDLAIVLLSLMGITL EEIEM	9	-1
ATP2	KARGYFGDPWNVFDFLIVIGSII DVILSEIDT	7	-3
ATP3	RLEFFHHK FEILD AVVVVVSFIL DIVLLFQEHQFEA	8	-4
ATP4	KPKGYFSD AWNTFDSL IVIGSII DVALSEADPTESEN	9	-5
pHLIP	AEQNPIYW ARYAD WLF TTPLLLLDLALLVDADEGT	7	-5

【新規 pH 応答ペプチドの機能評価】

以下に今回得た配列に Gamillus を連結した分子の pH7, 6 及び 5 でのがん細胞への結合を示す。ATP1 と 3 では pH によらず細胞への結合は観察されなかったが ATP4 は pH 5 で結合が確認された。また、pHLIP で見られた凝集は生じないようであった。そこで、この ATP4 を AF-546 で蛍光標識し、AT1 を播種した担癌マウスに 4 μmol 尾静脈投与して 24 時間後に観察したところ、腫瘍組織への明確な蓄積が観察できた(下図)。



このペプチドは、目的を達成するための有効なツールとなることを見出された。



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 K. Tanito, Y. Oshiro, H. Tagawa, A. Kishimura, T. Mori, Y. Katayama	4. 巻 37
2. 論文標題 Comparative evaluation of natural killer cell-mediated cell killing assay based on the leakage of an endogenous enzyme or a pre-loaded fluorophore	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anal. Sci.	6. 最初と最後の頁 1571-1575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.21P117	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 C. W. Kim, R. Toita, J.-H. Kang, T. Mori, A. Kishimura, Y. Katayama	4. 巻 7
2. 論文標題 Protein kinase C -responsive gene carrier for cancer-specific transgene expression and cancer therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Biomater. Sci. Eng.	6. 最初と最後の頁 2530-2537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbiomaterials.1c00213	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 K. Sasaki, K. Muguruma, R. Osawa, A. Fukuda, A. Taniguchi, A. Kishimura, Y. Hayashi, T. Mori, Y. Katayama	4. 巻 12
2. 論文標題 Synthesis and biological evaluation of a monocyclic Fc-binding antibody-recruiting molecule for cancer immunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Med. Chem.	6. 最初と最後の頁 406-409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0MD00337A	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 K. Sasaki, M. Harada, T. Yoshikawa, H. Tagawa, Y. Harada, Y. Yonemitsu, T. Ryujin, A. Kishimura, T. Mori, Y. Katayama	4. 巻 22
2. 論文標題 Fc-binding antibody-recruiting molecules targeting prostate-specific membrane antigen: defucosylation of antibody for efficacy improvement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 496-500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202000577	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 T. Hosokawa, S. Tanaka, T. Mori, Y. Baba, Y. Katayama	4. 巻 45
2. 論文標題 Quiescent B cells acquire sensitivity to cell cycle arresting agents by B cell receptor stimulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 847-850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00176	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 R. Saeki, S. Kobayashi, R. Shimazui, T. Nii, A. Kishimura, T. Mori, M. Tanaka, Y. Katayama	4. 巻 39
2. 論文標題 Characterization of polypropyleneimine as an alternative transfection reagent	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anal. Sci.	6. 最初と最後の頁 1015-1020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-023-00284-x	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 谷戸 謙太、田川 寛、新居輝樹、岸村 顕広、森 健、片山 佳樹
2. 発表標題 新規膜アンカーペプチド探索のためのGFP-pHLIPの腫瘍標的化
3. 学会等名 第31回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細川尊夏、新居輝樹、岸村 顕広、森 健、片山 佳樹
2. 発表標題 免疫寛容の誘導を目指したビタミン-ペプチドコンジュゲートの開発
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田川寛、岸村顕広、森健、片山佳樹
2. 発表標題 内在性抗体をがん細胞に集積させ細胞傷害を誘導するがん免疫治療薬の開発
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenta Tanito・Hiroshi Tagawa・Teruki Nii・Akihiro Kishimura・Takeshi Mori・Yoshiki Katayama
2. 発表標題 GFP-fusion method for screening new transmembrane peptides
3. 学会等名 第8回アジアバイオマテリアル学会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片山佳樹
2. 発表標題 免疫を標的とする診断法・治療法
3. 学会等名 第4回ナノ理工学情報交流会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片山佳樹
2. 発表標題 超清潔社会で急増する慢性炎症性疾患を標的とする免疫制御システム
3. 学会等名 アジア機構・ブラウンバックセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片山佳樹
2. 発表標題 性炎症疾患を対象とする免疫制御システム
3. 学会等名 未来医学研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷戸謙太、横山祐太、大石春陽、柴田真由香、肘井翔一、金子諒右、立石宙也、伊藤祥子、新居輝樹、岸村顕広、森健、片山佳樹
2. 発表標題 腫瘍組織を炎症性へ誘導する細胞医薬の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本智勇、佐々木光一、原田美乃里、宮下凱希、岸村顕広、森健、片山佳樹
2. 発表標題 内在性抗体を利用し抗腫瘍免疫応答を引き起こすペプチド医薬の開発
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会2022年度九州ブロック研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷戸謙太、宗川彰毅、田川寛、新居輝樹、岸村顕広、菊竹智恵、須山幹太、森健、片山佳樹
2. 発表標題 腫瘍の酸性環境を標的化するヒト・タンパク由来ペプチドの探索
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会2022年度九州ブロック研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宗川彰毅、佐々木光一、新居輝樹、岸村顕広、森健、片山佳樹
2. 発表標題 内在性抗体を利用し抗腫瘍免疫応答を引き起こすペプチド医薬の開発
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田川寛、佐々木光一、岸村顕広、森健、片山佳樹
2. 発表標題 内在性抗体とがん抗原を架橋しADCCを誘導する二価性分子の開発
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 片山佳樹(共著)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 10
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(第10節担当)	

1. 著者名 片山佳樹(共著)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 648
3. 書名 高分子材料の事典(2-13 ドラッグデリバリーシステム)	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 哺乳類直交性酵素群及びその利用	発明者 片山佳樹、森健	権利者 九州大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-084190	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
---------	---------