

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19190

研究課題名（和文）犬の悪性腫瘍に幅広く作用するユニバーサル抗体医薬の開発とその実証

研究課題名（英文）Development and demonstration of a universal antibody drug actively working against canine malignancies.

研究代表者

水野 拓也（Mizuno, Takuya）

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：90398826

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究から抗体クローン4G1-E3が様々な犬の腫瘍に特異的に反応する抗体であることが明らかとなった。また4G1-E3をベースに犬IgG-Bの定常領域と組換えることでキメラ抗体として使用できる形にした。一方で、4G1-E3キメラ抗体自体は、in vitroにおけるアッセイにおいて、残念ながら細胞傷害を持たない抗体であることが判明した。しかし、4G1-E3抗体が認識する分子について、CRISPRライブラシーを用いた検索から、クローン4G1-E3はCD99分子を認識することが明らかとなった。またこの抗体はヒトのCD99分子も同時に認識することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から得られた抗体クローン4G1-E3が様々な犬の腫瘍に特異的に反応する抗体であることが明らかとなったが、残念ながら、本抗体が直接細胞傷害を目的とした抗体薬として臨床的に使用することはできないことが判明した。しかし本抗体に薬物を結合させたADC抗体として用いることも可能であるし、また本抗体のscFvを使用して、CAR-T療法として、など、犬の幅広い腫瘍に反応する可能性がある治療法へ展開できるため、今後犬のがんの細胞傷害を目的とした治療法を開発するうえで非常に重要な知見となる。

研究成果の概要（英文）：The study revealed that antibody clone 4G1-E3 is an antibody that reacts specifically to a variety of canine tumors. In addition, 4G1-E3 was used to make a chimeric antibody by recombination with the constant region of canine IgG-B. On the other hand, the 4G1-E3 chimeric antibody itself was unfortunately found to be a non-cytotoxic antibody in in vitro assays. However, a CRISPR library search for molecules recognized by the 4G1-E3 antibody revealed that clone 4G1-E3 recognised canine CD99 molecule. The antibody was also found to simultaneously recognize human CD99 molecules.

研究分野：獣医腫瘍学

キーワード：犬 抗体薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は高齢犬の最も多い死因であり、約 1/3 の犬が悪性腫瘍で死亡する。罹患した犬は、外科手術、放射線、抗がん剤などで治療をうけるが、それら既存の治療では限界があり、新たなアプローチによる予後の改善が強く望まれている。そのなかで抗体薬は、新たな治療法として期待されている治療法である。腫瘍に対する抗体薬は大きく分けて、免疫チェックポイント分子阻害抗体に代表されるような免疫調節分子などの結合阻害を目的とした抗体薬と、腫瘍細胞の細胞表面に結合することで、腫瘍細胞に細胞死を誘導する細胞傷害活性をもつ抗体薬に分けられる。犬の抗体薬としては、前者も後者もこれまでに市販されているものは全く存在しない。申請者は、これまでに犬の B 細胞性リンパ腫の細胞傷害活性をもつ抗体薬として抗イヌ CD20 キメラ抗体を開発し (Mizuno et al., 2020)、現在臨床試験を実施しているが、そのほかの固形がんを対象とする細胞傷害活性をもつ抗体薬は全く知られていない。

2. 研究の目的

申請者は、これまでに犬の腫瘍に対する新しい治療アプローチの一つとして、世界で一つも小動物の悪性治療の治療薬として市販されていない抗体薬の開発に取り組んできた。そのなかで独自に確立した多重免疫法を用いて複数の犬悪性黒色腫腫瘍細胞株をラットに順番に免疫することでモノクローナル抗体 (クローン 4G1-E3) を新たに取得した。クローン 4G1-E3 は免疫に用いた細胞株だけではなく犬悪性黒色腫由来病理組織に対しても結合することが確認された。さらに意外なことにその他の様々な犬の腫瘍組織に対して幅広く結合する一方、犬の正常組織には反応しないことが明らかとなった。このことは 4G1-E3 が犬の様々な腫瘍に対して幅広く作用する腫瘍特異的抗体である可能性が期待される。本研究では、この 4G1-E3 が犬の様々な腫瘍に対するユニバーサルな抗体薬として臨床応用可能かどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

3-1 免疫組織のための材料

山口大学動物医療センターに腫瘍性疾患の診断または治療目的に来院した腫瘍を持つ犬より診断のために得た病理組織ブロックを免疫染色のための材料とした。

3-2 細胞培養

犬および人細胞株は過去の文献において用いられているものを常法に基づき、培養した。犬リンパ腫細胞株である CLC に pMx-IP-luc をレトロウイルスにより導入し、CLC/luc 細胞を作製した。

3-3 キメラ抗体の作製・大量精製

すでに単離済の 4G1-E3 の可変領域をコードする遺伝子と犬 IgG-B の Fc を組換えし、4G1-E3 キメラ抗体発現ベクターを作製した。Expi-CHO 発現システム (ThermoFisher) を用いた一過性発現系により 4G1-E3 キメラ抗体を大量作製し、protein G カラムで精製を行った。

3-4 直接の細胞傷害活性の測定

Mizuno らの報告 (Mizuno et al., 2021) をもとに、CLC/luc に、犬 IgG 抗体または 4G1-E3-B キメラ抗体を用量依存的に添加し、48 時間培養後、CCK-8 assay により細胞増殖率を測定した。

3-5 抗体依存性細胞傷害活性の測定

Mizuno らの報告 (Mizuno et al., 2021) にある犬ユニバーサル ADCC 測定系にしたがって、抗体依存性細胞傷害活性を測定した。すなわち CLC/luc に、犬 IgG 抗体または 4G1-E3-B キメラ抗体を用量依存的に添加し、さらにエフェクター細胞として NK92/cCD16 γ を決まった E/T 比で添加し、4 時間培養後、luciferase 活性を測定することにより、細胞傷害活性を測定した。

3-6 補体依存性細胞傷害活性の測定

Mizunoらの報告(Mizuno et al., 2021)をもとに、CLC/lucに、犬IgG抗体またた4G1-E3-Bキメラ抗体を用量依存的に添加し、さらにウサギ補体を添加し48時間培養後、CCK-8 assayにより細胞増殖率を測定した。

4. 研究成果

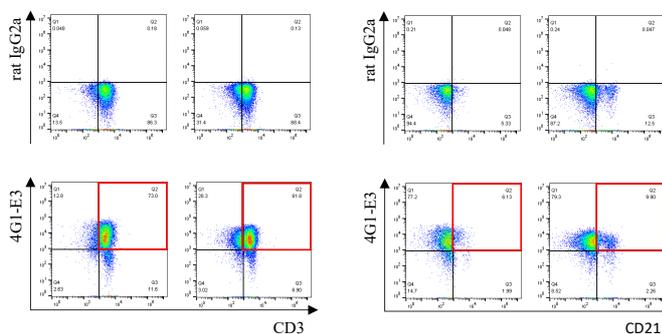
4-1 犬腫瘍組織を用いた抗体反応腫瘍の検索

これまでにクローン4G1-E3は正常犬組織にはまったく反応しないが、犬の口腔内メラノーマの組織に対しては反応することが確認できている。そのため犬のほかの腫瘍種に対する反応性を免疫染色により確認した。上表に示すとおり、様々な腫瘍種においてクローン4G1-E3は反応することが明らかとなった。そのため、本抗体は、抗体薬として使用する場合に多くの腫瘍種に応用できる可能性が示唆された。

腫瘍種	陽性症例数
悪性黒色腫	5/8
乳腺腫瘍	5/6
リンパ腫	2/6
肥満細胞腫	2/5
血管肉腫	4/5

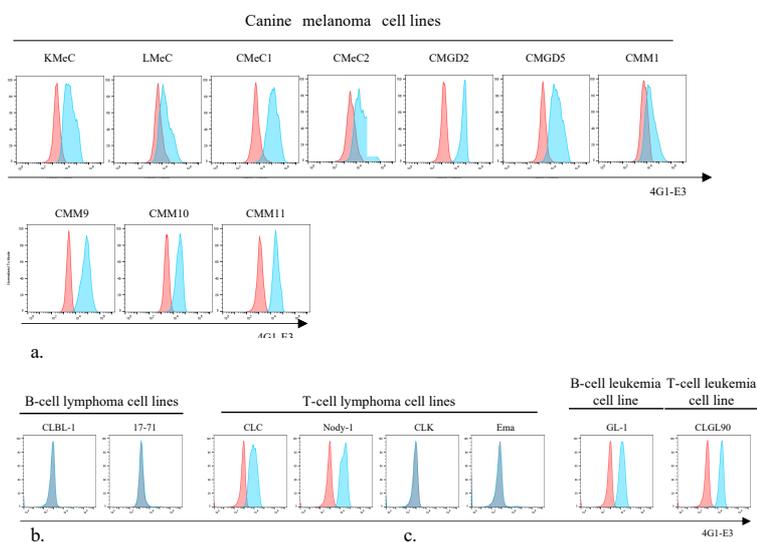
4-2 犬末梢血単核球を用いたクローン4G1-E3反応性の確認

上述のようにクローン4G1-E3は正常犬組織には免疫染色において反応がないことが確認されているが、末梢血リンパ球に対する反応性について明らかにするために、フローサイトメトリにより検討を行った。その結果、CD3陽性T細胞およびCD21陽性B細胞の両方の分画がクローン4G1-E3と結合することが明らかとなった(右図)。そのため、本抗体は、抗体薬として使用する場合には、末梢血リンパ球に対して反応してしまう可能性が示唆された。



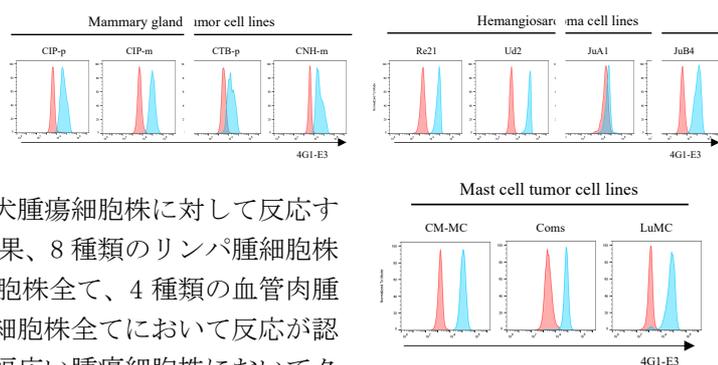
4-3 クローン4G1-E3の犬悪性黒色腫腫瘍細胞株に対する反応性

クローン4G1-E3は、犬悪性黒色腫症例のFFPE組織に対して反応することがわかっているため、次に犬悪性黒色腫細胞株に対する反応性について検討を行った。下図に示すとおり、用いた10種類のすべての悪性黒色腫細胞株に対して反応することがわかった。



4-4 クローン4G1-E3の犬悪性黒色腫以外の腫瘍細胞株に対する反応性

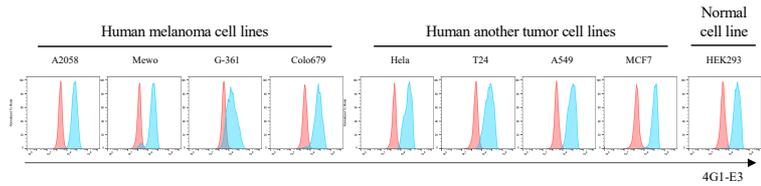
次にクローン4G1-E3が、幅広い種類の犬腫瘍組織に対して反応性を示したように、犬悪性黒色腫以外の犬腫瘍細胞株に対して反応するかについて検討を行った。その結果、8種類のリンパ腫細胞株のうち4種類、4種類の乳腺腫瘍細胞株全て、4種類の血管肉腫細胞株すべて、3種類の肥満細胞腫細胞株全てにおいて反応が認められ、腫瘍組織の免疫染色同様、幅広い腫瘍細胞株においてク



ローン 4G1-E3 に反応する抗原が発現していることが明らかとなった。

4-5 クローン 4G1-E3 の人細胞株に対する反応性

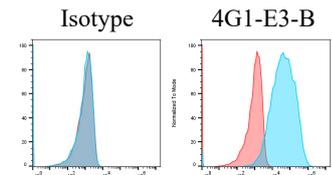
次にクローン 4G1-E3 が、人の細胞株に対しても同様に犬と同様幅広い種類の細胞株に対して反



応するかについて検討を行ったその結果、用いた 4 種類の人悪性黒色腫細胞株、そのほか Hela, T24, A549, MCF7 といった 4 種類の様々な腫瘍細胞株に対しても反応性を示しただけではなく、正常腎臓由来細胞株である HEK293 に対しても反応性を示した。

4-6 4G1-E3-B キメラ抗体の 4G1-E3 との同等性の比較

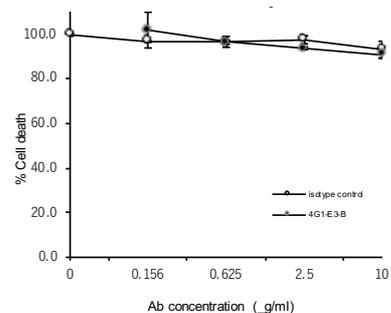
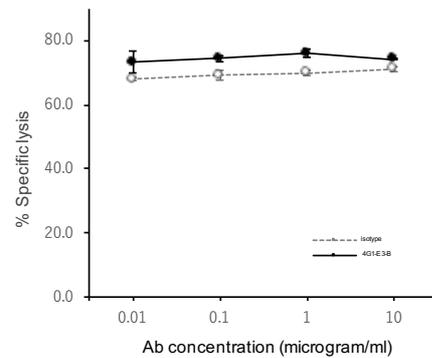
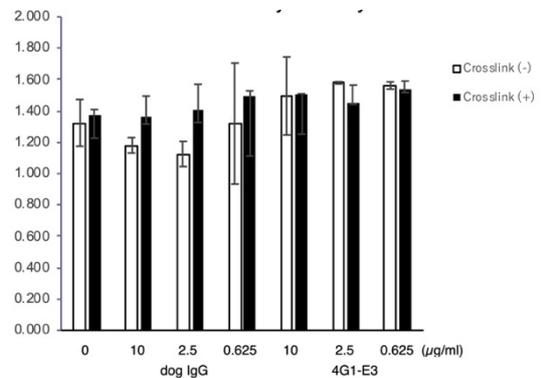
得られた 4G1-E3-B キメラ抗体を、そのもとになるモノクローナル抗体 4G1-E3 と、KMeC 細胞に対する反応性について比較したところ、右図に示すとおり、反応性については全く差がなかったため、キメラ抗体ももとの 4G1-E3 抗体と同様の反応性を示す抗体であることが明らかとなった。



4-7 4G1-E3-B キメラ抗体の *in vitro* における機能解析

4G1-E3-B キメラ抗体が細胞傷害性抗体として機能するかどうかを *in vitro* で検討するために、直接細胞傷害活性、抗体依存性細胞傷害活性、補体依存性細胞傷害活性について 4G1-E3-B キメラ抗体が結合する CLC/luc をターゲット細胞として測定を行った。直接細胞傷害活性については、4G1-E3-B キメラ抗体の添加はコントロールとしておいた犬 IgG と比較してとくに大きく細胞傷害を誘導することはできなかった。また抗犬 IgG 抗体によるクロスリンクを同時に行った場合でも、細胞傷害を誘導することはできなかった。このことから 4G1-E3-B キメラ抗体は、少なくとも直接の細胞障害活性を持つ抗体ではないことが明らかとなった。

つぎに NK92/cCD16 γ をエフェクター細胞と、CLC/luc をターゲット細胞とした抗体依存性細胞傷害活性について検討した。その結果、CLC/luc の細胞傷害活性は、コントロール IgG および 4G1-E3-B キメラ抗体の両方において強い細胞傷害活性が認められた。このことは、CLC/luc が NK92/cCD16 γ により直接の細胞傷害を受けていることを表しており、CLC/luc が、筆者が以前に樹立した犬のユニバーサルな ADCC を測定する系には不向きであることが明らかとなった。したがって本実験からは、4G1-E3-B キメラ抗体により ADCC 活性が認められるのかどうかについては結論を下すことはできないが、コントロール IgG による細胞傷害活性に対する 4G1-E3-B キメラ抗体の上乗せ効果もないことから、現時点では 4G1-E3-B キメラ抗体は抗体依存性細胞傷害活性はない抗体であると結論付けることができる。



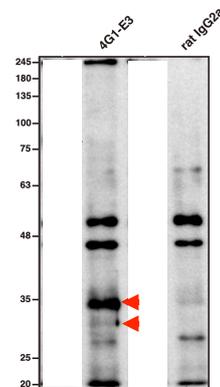
次に、補体を用いて 4G1-E3-B キメラ抗体による補体依存性細胞傷害活性について検討を行った。補体依存性細胞傷害活性についてもコントロール IgG と 4G1-E3-B キメラ抗体のどちらも、細胞

傷害は誘導されず、4G1-E3-B キメラ抗体は補体依存性細胞傷害活性を有しないことが明らかとなった。

以上のことより、4G1-E3-B キメラ抗体は残念ながら細胞傷害活性をもたない抗体であることがあきらかとなった。当初、本研究計画は、4G1-E3-B キメラ抗体による抗腫瘍効果について *in vivo* において検討する予定であったが、この *in vitro* の結果より、このままでは抗腫瘍効果を検討することはできないため、大幅な予定変更として、このユニバーサル抗体が認識する抗原を同定することにより、その分子から新たに抗体薬を作製する予定に切り替えた。

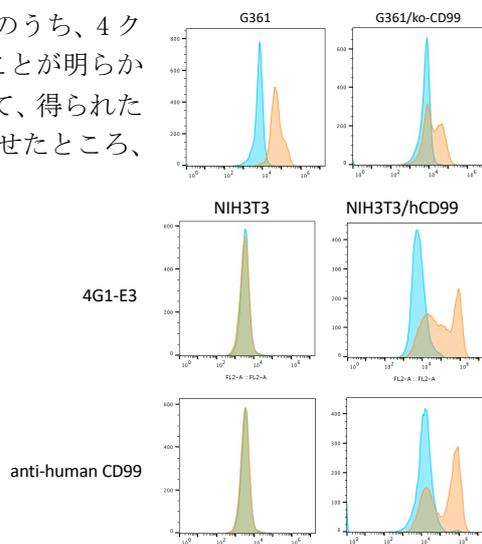
4-8 4G1-E3 が認識する抗原の同定

4G1-E3 抗体が認識する抗原を同定するために、4G1-E3 抗体が認識する犬メラノーマ細胞株 KMeC を用いて、4G1-E3 抗体が認識する分子の分子量を同定することにした。ビオチンによって細胞表面分子をラベルした KMeC 細胞を 4G1-E3 抗体で免疫沈降し、電気泳動後、Streptavidin-HRP で発色させたところ、35kDa およびその少し下の分子量にコントロールにはないバンドが検出され、4G1-E3 が認識する分子は 35kDa もしくはその下の分子である可能性が示唆された。



次に、4G1-E3 は、人メラノーマ細胞株 G361 細胞を認識するため、G361 細胞において 4G1-E3 の認識抗原が発現すると考えた。そのため、G361 細胞に人の CRISPR ノックアウトライブラリーをレンチウイルスにより遺伝子導入した。最初の cell sorting において、ノックアウトにより 4G1-E3 抗体が結合しなくなる分画 0.5% をセルソーターにより分離し、それら分画を拡大培養し、さらにもう一度 4G1-E3 抗体による染色に陰性分画 10% をセルソートした。それら細胞より抽出した DNA を用いて、knockout された遺伝子を同定するために、knockout 配列の前後にプライマーを設定し、PCR 反応を行い、さらにそこから得られた増幅産物の遺伝子配列をサンガー法により解析した。その結果、10 クローンのうち、4 クローンが人 CD99 をノックアウトする遺伝子配列であることが明らかとなった。その結果を確認するために、G361 細胞に対して、得られたノックアウト遺伝子を導入し、クローン 4G1-E3 を反応させたところ、CD99 ノックアウト細胞である G361/ko-CD99 に対して遺伝子導入された細胞において反応性が低下することが明らかとなった (右図)。

次に人 CD99 分子が本当に 4G1-E3 抗体によるターゲット分子であるかどうかを検討するために、人 CD99 遺伝子を NIH3T3 に過剰発現した細胞株 NIH3T3/cCD99 を作製した。フローサイトメトリーによる検討では、4G1-E3 抗体は NIH3T3/cCD99 に対して結合することが明らかとなった。また市販の抗ヒト CD99 抗体も同様に反応することが確認でき、クローン 4G1-E3 は CD99 分子を認識することが明らかとなった。これらをもとに、今後は、CD99 に対する細胞傷害活性を持つ抗体を新たに得る事により、様々な腫瘍に対して用いることができるユニバーサル抗体薬の開発につながると考えている。



参考文献

Mizuno T, Kato Y, Kaneko MK, Sakai Y, Shiga T et al. (2020) Generation of a canine anti-canine CD20 antibody for canine lymphoma treatment. *Scientific reports*, **10**, 11476.

Mizuno T, Takeda Y, Tsukui T, Igase M. (2021) Development of a cell line-based assay to measure the antibody-dependent cellular cytotoxicity of a canine therapeutic antibody. *Veterinary immunology and immunopathology*, **240**, 110315.

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
研究分担者	櫻井 優 (Sakurai Masashi) (00747967)	山口大学・共同獣医学部・准教授 (15501)	
研究分担者	伊賀瀬 雅也 (Igase Masaya) (70847110)	山口大学・共同獣医学部・助教 (15501)	

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