

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430166

研究課題名(和文)悪性グリオーマ由来がん性幹細胞を標的とした新規ヒト化抗体医薬の創製

研究課題名(英文)Development of novel human antibody against malignant glioma-derived stem cell

研究代表者

秋山 靖人(Akiyama, Yasuto)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：70222552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性グリオーマ幹細胞株に特異的に発現するYKL-40タンパクに対するヒトモノクローナル抗体を作製することを目的とする。YKL-40タンパクをヒト化NOG-IL-4トランスジェニックマウスに免疫し、抗体価の上昇を確認後、1,000万個のリンパ球より7個のYKL-40に対する抗体産生B細胞を1細胞レベルで同定した。続いて4個の細胞より抗体遺伝子のクローニングに成功した。組換え抗体を作製するため293細胞にYKL-40に対する抗体遺伝子(VHおよびVL)を導入・発現させ、最終的に3個のヒトモノクローナル抗体を取得している。今後ファージディスプレイ法を用いた抗体の機能的な改良を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：We aimed with developing human monoclonal antibody against YKL-40 protein, which is specifically expressed on malignant glioma-derived stem cell line established at Shizuoka Cancer Center, using humanized NOG-IL-4 transgenic (TG) mice. After immunization of recombinant human YKL-40 protein to humanized NOG-IL-4 TG mice and verification of antibody titer elevation, 7 anti-YKL-40 antibody-bearing single B cells out of ten million of lymphocytes were identified and subsequently 4 specific antibody cDNAs were successfully cloned. Finally, 3 human recombinant monoclonal antibodies against YKL-40 protein were obtained using expi293 cells transduced with antibody genes consisting of VH and VL gene. These antibodies have still weak binding affinity for YKL-40 protein, therefore affinity maturation process will be needed using a phage display system.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：抗体医薬 がん性幹細胞 悪性グリオーマ ヒト化マウス ヒトモノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマの中で膠芽腫の予後は、極めて悪性であり、2005年抗がん剤であるテモゾロミドの臨床応用後、生存期間の延長は認められるものの2年以上生存する症例はほとんどない。膠芽腫の症例は、手術後、テモゾロミドを含む放射線化学療法により一時的に腫瘍の縮小を認めるが、その後大部分の症例で再発を起こす。また耐性となった症例は、有効な治療の選択肢が限られており、腫瘍の再発を抑制し、生存期間の延長を期待できる次世代の新しいがんの維持療法が求められている。テモゾロミドに対する耐性化の克服とともに治療抵抗性を有するがん性幹細胞に対する多くの研究がなされており、新しいがん治療の標的として注目されている。また Pallini らによれば、腫瘍組織に含まれる幹細胞の比率が高いほど予後が悪いという成績を報告しており(Clin Cancer Res, 2008)、グリオーマの幹細胞の制御の有無が患者の予後に大きく影響することが推定される。さらにテモゾロミドに耐性化した腫瘍組織には、幹細胞マーカー陽性(CD133, CHI3L1など)の細胞の比率が増加しており、耐性化のメカニズムの1因子と考えられている。我々は、膠芽腫を中心とした悪性グリオーマの腫瘍組織から3株のがん性幹細胞株を樹立している。これらのがん性幹細胞株は、幹細胞用培地で低接着プレートにてスフェアを形成し、表面マーカーおよびリアルタイムPCR解析にて、幹細胞マーカーの強い発現が確認されている(CD133, c-Myc, Sox2, Oct3/4, KLF-4, MDR1, Nestin, VEGF etc.) また *in vivo* にて形成された幹細胞由来の腫瘍は、患者由来の切除腫瘍の病理組織像と同様の特徴を示した(図1参照)。

これらのがん性幹細胞株を利用してDNAマイクロアレイ解析にてがん性幹細胞に特異的に発現する14種類の遺伝子を同定している。またこれまでに静岡がんセンターでは、ヒト

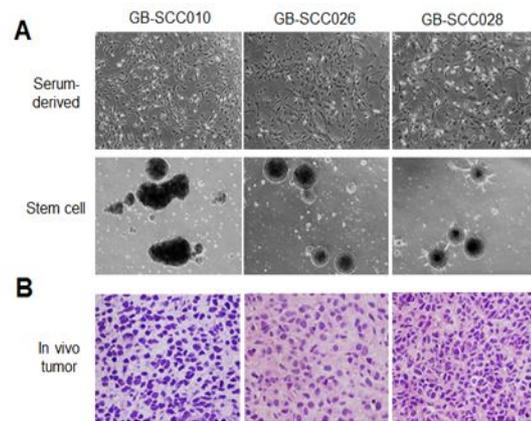


図1 グリオーマ患者由来の幹細胞培養細胞株(A)および腫瘍組織像(B)

化NOGマウスを利用することにより、完全ヒト型抗体の作製基盤を確立しており、これらの知見をもとにがん性幹細胞を標的とした膠芽腫の次世代の治療に使用可能な抗体医薬シーズを開発する研究体制が整っている。

2. 研究の目的

静岡がんセンターにて樹立したグリオーマがん性幹細胞培養株3株に特異的に発現する9種類の細胞外標的抗原に関して short hairpin (sh)RNA を用いた遺伝子発現抑制実験を行い、抗体作製対象となる標的抗原の絞り込みを行う。当初の2年間は、標的抗原の選別とNOGマウス等を利用したヒト化抗体の作製・*in vitro*での機能解析を施行する。3年目には、*in vivo*試験での抗腫瘍効果やイメージング技術を用いた抗体のさらなる機能解析を進める。

3. 研究の方法

(1) **研究計画の概要**: 初年度は、DNAマイクロアレイにて同定されたグリオーマ幹細胞培養株に特異的に発現する9種類の細胞外標的抗原に関して shRNA による発現抑制にて幹細胞の増殖抑制が認められる抗原を優先的に抗体作製の対象として選別する。最初の2年間には、実験動物中央研究所にて作製されたNOG-IL-4トランスジェニック(Tg)マウスを用いて、ヒト化抗体の作製を行う。

NOG-IL-4 トランスジェニックマウスに、2.5Gy の放射線を照射後、ヒト末梢血細胞を移植 (iv) し、その着生後抗原タンパクを免疫することによりヒト抗体産生モデルを構築する。抗体のスクリーニングは、*in vitro* 試験にて増殖抑制・ADCC 活性の評価を行う。最終年度は、*in vivo* 試験にて移植したグリオーマ幹細胞腫瘍に対する抗腫瘍効果やイメージング技術を用いた抗体の集積に関して解析を行う。3 年間でリード抗体を複数個同定することを目的とする。

(1) グリオーマ患者由来がん性幹細胞培養株に特異的に発現する標的抗原の選別：

グリオーマ細胞株 3 種類 (GB-SCC010, 026, 028) に関して血清培地で樹立した親株を対照として幹細胞用培地 (recombinant human EGF, FGF, LIF+B-27) にて樹立した幹細胞株に特異的に発現する (発現比 $\times 10$ 以上, $P < 0.01$) 遺伝子を DNA Gene Chip (Human Genome U133A 2.0 Array, Affimetrix) を用いて 14 種類同定している。このうち細胞外に局在する 9 個の遺伝子を選別している。

これらの遺伝子に対する shRNA 配列をレンチウイルス (Santa-Cruz Biotech) を用いてグリオーマ幹細胞株に遺伝子導入を行う。発現を抑制したクローンを薬剤にて選別を行い、コントロール用 shRNA を導入した細胞と比較して増殖抑制を示す遺伝子を同定する。shRNA 配列導入にて増殖制御が確認された候補遺伝子については、マウス免疫用の組換えタンパクの作製を expi293 細胞発現系を利用して行う。

(2) グリオーマ幹細胞培養株に特異的な標的抗原に対するヒト化抗体の作製：

ヒト化 NOG-IL-4 Tg マウスを用いたヒトモノクローナル抗体の作製：実中研にて作製された NOG-IL-4 Tg マウスにヒト末梢血細胞を移植し、ヒト抗体産生モデルを構築する。こ

れまでヒト造血器幹細胞 CD34⁺細胞を含む臍帯血細胞を NOG マウスに移植してヒト化 NOG マウスモデルを構築してきたが、細胞の着生および分化に 8-9 週以上の時間がかかっており、十分な免疫応答を再現することが難しいと思われる。すでに NOG-IL-4 Tg マウスにヒト末梢血単核細胞を移植したヒト化マウスモデルにおいて xeno-GVHD によるマウスの死亡も回避され、従来の NOG マウスでは達成できなかった末梢血細胞での免疫系の構築が可能となっている。以上の知見より以前の NOG マウスと比較して短時間でヒト抗体の産生誘導が可能となる。

4. 研究成果

(1) **グリオーマ幹細胞培養株に発現する特異的な標的抗原の同定：**グリオーマ患者腫瘍組織より幹細胞培地 (human EGF, FGF, LIF+B-27) にて樹立したがん性幹細胞株 3 種類 (GB-SCC010, 026, 028) に特異的に発現する遺伝子を DNA Gene Chip (human Genome U133A 2.0 Array, Affimetrix) を用いて 14 種類同定した。対照群は、同一腫瘍より血清培地で樹立した細胞株を使用した。同定された 14 個の遺伝子群は、すべて発現比が 10 倍以上亢進していた ($P < 0.01$)。これらのうちタンパク質の局在が細胞外であり、NCI の the Repository of Molecular Brain Neoplasia Data (REMBRANDT) データベース検索にて予後因子となるものを選別した結果、YKL-40, Clusterin, Periostin の 3 つの遺伝子に絞り込んだ。shRNA を用いた遺伝子制御の検討では、YKL-40 遺伝子の抑制が *in vitro* での幹細胞の増殖抑制を示した。これにより YKL-40 に対する NOG-IL-4 Tg マウスを利用したヒト抗体の作製に取り掛かることとした。

(2) **ヒト末梢血単核球を用いたヒト化 NOG-IL-4 Tg マウスモデルの作製：**実中研にて作製された NOG-IL-4 Tg マウスにヒト末梢血細胞を移植し、ヒト抗体産生モデルを構

築する。これまでに 2.5Gy 照射後、 1×10^7 個のヒト末梢血細胞を移植後、4 週で明らかな xeno-GVHD を惹起することなく末梢血単核球の生着を確認しており、脾臓にて human CD45⁺ 細胞を 60-70% に認めている。また移植後 4-6 週でマウス血液中に 1mg/ml 以上のヒト IgG 抗体の産生が確認されている。これらの結果より CD34⁺ 幹細胞にて構築したヒト化 NOG マウスに比較してより短時間でヒト IgG 抗体の産生が誘導可能となった。末梢血細胞の移植後 4 週よりヒト化 NOG-IL-4 Tg マウスに組換え YKL-40 タンパクを不完全アジュバントと共に 2 回免疫後、8 週で YKL-40 に対する抗体価の増加を確認した。抗体価の増加がみられたマウスより脾細胞を回収し、抗 YKL-40 抗体を産生する B 細胞の同定を行った。

(3) 1 細胞抗体遺伝子クローニング技術を利用した抗 YKL-40 ヒトモノクローナル抗体の作製:

抗体価の増加がみられたマウスより脾細胞を回収し、CD19⁺B 細胞の選別を行った。

単球細胞と死細胞を除外するため CD14 および PI 陰性細胞をさらに選別した。 1×10^7 個の選別された B 細胞より Alexa647 標識 YKL-40 タンパクと抗ヒト IgG 抗体が結合する細胞を 1 細胞レベルで single cell sorter (FACS Aria, BD science) を用いて同定および選別を行った。最終的に 7 個の抗 YKL-40 抗体を持つ B 細胞が取得された。

すべてのレパトワをカバーする抗体遺伝子用プライマーを用いて 1 細胞 RT-PCR を施行し、全細胞で beta-actin および IGHV 遺伝子の増幅に成功した。最終的に 4 個の細胞から IGHV と IGLV の抗体遺伝子 (cDNA) がペアでクローニングされた。サブタイプは、1 個が IgG で 3 個が IgM であった。IgG 抗体の使用するレパトワは、IGHV7-4-1*02 と IGLV1-51*01 (Lamda chain) であった。別々の発現ベクターに抗体遺伝子を組み込み、expi293 細胞にリポフェクション法を用いた遺伝子導入を

行った。培養上清中に産生された完全長の組換え抗体タンパクをプロテイン A カラムにて精製を行い、*in vitro* での機能解析に使用した。EIA 法では、YKL-40 に対する特異的な結合活性を認めたが、アフィニティはまだ低く表面プラズモン共鳴を用いたピアコア法では、有意な測定値は得られていない。このため抗体の affinity maturation を目指してファージディスプレイシステム等を利用した結合機能の改良を今後施行する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Akiyama Y, (ほか 9 名) Immunological effects of anti-programmed death-1 (PD-1) antibody on human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Oncol* (査読あり) 2016 (in press).

Akiyama Y, (ほか 12 名) Immune response-associated gene analysis of 1,000 cancer patients using whole-exome sequencing and gene expression profiling-Project HOPE-. *Biomed Res* (査読あり) 2016 Aug (in press).

Akiyama Y, (ほか 9 名) Effect of STAT3 inhibition on the metabolic switch in a highly STAT3-activated lymphoma cell line. *Cancer Genomics Proteomics* (査読あり) 2015 May-Jun;12(3): 133-42.

Inoue K, (ほか 12 名, **12 番目**) Immunologically augmented skin flap as a novel dendritic cell vaccine against head and neck cancer in a rat model. *Cancer Sci* (査読あり) 2015 Feb;106(2):143-50. doi:10.1111/cas.12586. Epub 2015 Feb 4.

Ashizawa T, Akiyama Y, (ほか 11 名) Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of temozolomide-resistant glioblastoma cell line. *Int J Oncol* (査読あり) 2014 Jul;45(1):411-8. doi:10.3892/ijo.2014.2439. Epub 2014 May 12.

Akiyama Y, (ほか 12 名) YKL-40 downregulation is key factor to overcome temozolomide resistance in a glioblastoma cell line. *Oncol Rep* (査

読あり) 2014 Jul;32(1):159-66. doi: 10.3892/or.2014.3195. Epub 2014 May 16. lizuka A, (ほか 10 名, **11 番目**) Anti-vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) 2 autoantibody identification in glioblastoma patient using single B cell-based antibody gene cloning. *Immunol Lett* (査読あり) 2014 May-Jun;159(1-2):15-22.http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2014.02.004 **Akiyama Y**, (ほか 15 名) Novel cancer-testis antigen expression on glioma cell lines derived from high-grade glioma patients. *Oncol Rep* (査読あり) 2014 Apr;31(4):1683-90. **Akiyama Y**, (ほか10名) The identification of affinity peptide ligands specific to the variable region of human antibodies. *Biomed Res* (査読あり) 2014;35(2):105-16. Ashizawa T, (ほか20名, **21番目**). Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of cancer stem cells derived from glioblastoma patients. *Int J Oncol* (査読あり) 2013, Apr;43(1):219-27.

〔学会発表〕(計 6 件)

芦澤 忠、**秋山靖人**、Anti-PD-1 antibody therapy using humanized MHC-dKO mouse. 74 回日本癌学会総会、2015 年 10 月 9 日、名古屋市
秋山靖人、Project HOPE (High-tech Omics-based Patient Evaluation) Immunosuppressive gene expression for 1,000 cancer patients. 74 回日本癌学会総会、2015 年 10 月 10 日、名古屋市
 飯塚 明、**秋山靖人**、Autoantibody identification in glioblastoma patient using B cell-based antibody gene cloning. 73 回日本癌学会総会、2014 年 9 月 27 日、横浜市
 芦澤 忠、**秋山靖人**、Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on in vitro and in vivo against temozolomide-resistant glioblastoma cell line. 73 回日本癌学会総会、2014 年 9 月 25 日、横浜市
秋山靖人、Project HOPE (High-tech Omics-based Patient Evaluation) for cancer clinics-Studies on glioblastoma cell lines. 第 73 回日本癌学会総会、2014 年 9 月 26 日、横浜市
 芦澤 忠、**秋山靖人**、Effect of STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of cancer stem cells derived from glioblastoma patients. 第 72 回日本癌学

会総会、2013 年 10 月 3 日、横浜市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
 出願状況(計 1 件)

名称: 抗蛍光色素モノクローナル抗体
 発明者: 秋山靖人、飯塚 明
 権利者: 静岡県
 種類: 特許
 番号: 特願 2013-248159
 出願年月日: 2013 年 11 月 29 日
 国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 靖人 (AKIYAMA Yasuto)
 静岡県立がんセンター研究所・免疫治療研究部・部長
 研究者番号: 1 0 4 4 3 4 4 1

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: