

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440019

研究課題名(和文) 血小板凝集因子ポドプラニンの腫瘍型糖鎖構造の徹底解明と抗体医薬開発

研究課題名(英文) Development and characterization of a cancer-specific monoclonal antibody (CasMab) against podoplanin

研究代表者

金子 美華 (Kaneko, Mika)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00323163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ポドプラニン(PDPN)は、種々の腫瘍に高発現しているムチン型糖タンパク質で、申請者らは腫瘍組織由来PDPN上に腫瘍特異的な糖鎖修飾の存在を示すデータを取得し、腫瘍型PDPNを認識する複数の新規抗体を樹立した。変異型PDPNを用い腫瘍型PDPN認識抗体の認識部位を特定する、代表的な糖鎖不全株を樹立し利用する、種々の細胞株の糖鎖関連遺伝子の網羅的解析を行い腫瘍型糖鎖構造を推定する等、様々な解析結果を総合して腫瘍型PDPNの実態を明らかにした。また腫瘍型PDPN抗体の抗体遺伝子からキメラ抗体を作製し、抗腫瘍効果を検証した。その結果、腫瘍型PDPN認識抗体が抗体医薬開発に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Podoplanin (PDPN) is a platelet aggregation-inducing mucin-like sialoglycoprotein that is highly expressed in many cancers and normal tissues. PDPN has also been reported to be a marker to enrich tumor-initiating cells. Recently, we established the platform to produce a cancer-specific mAb (CasMab) by combining glycobiology and cell engineering technologies. In this study, we also established glycan-deficient CHO-S and HEK-293T cell lines, using the CRISPR/Cas or TALEN. We investigate several novel cancer-specific anti-PDPN or anti-glycopeptide mAbs. Antitumor activity of chimeric anti-human PDPN antibodies were validated. The CasMab-producing platform could lead to establishment of the side effect-reducing mAbs.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：CasMab PDPN 腫瘍型糖鎖構造 糖転移酵素遺伝子 抗体医薬開発

## 1. 研究開始当初の背景

(1)ポドプラニン (PDPN) とは、癌細胞上に存在している血小板凝集因子 (Aggrus) として我々が遺伝子クローニングした。PDPN の血小板凝集活性中心 (PLAG domain) に付加された O 結合型糖鎖構造によって血小板凝集活性が惹起されることを明らかにした。

高内皮細静脈からのリンパ球遊出機構に PDPN が関与している事が示された。(Herzog et al, Nature 502(7469):105-109, 2013)

(2) 腫瘍型糖鎖構造について、

脳腫瘍の臨床的悪性度と相関して発現が上昇する糖鎖構造を発見した (Kato, Kaneko et al, BBRC 369(4):1041-1046, 2008)

腫瘍細胞株、腫瘍組織において、PDPN が腫瘍特異的糖鎖構造付加を受ける事を発見した。我々は腫瘍型 PDPN に対する抗体を新規に樹立した。

(3)抗体医薬開発について

現在、特に悪性腫瘍を対象として抗体医薬を開発する場合、抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) や補体依存性細胞障害活性 (CDC) といった機能を有する抗体が有望とされていた。

## 2. 研究の目的

ポドプラニン (PDPN) は、種々の腫瘍に高発現しているムチン型糖タンパク質で、リンパ管マーカーやがん幹細胞群マーカーとして使用されている。申請者らは腫瘍組織由来 PDPN 上に腫瘍特異的な糖鎖修飾の存在を示すデータを取得し、腫瘍型 PDPN を認識する複数の新規抗体を樹立した。

本研究では、これらの抗体を利用して PDPN 上の腫瘍型糖鎖構造とその生合成機序を徹底的に解明すること、さらに、PDPN 上の腫瘍特異的糖鎖構造のがん幹細胞形質への関与を調べることで、また、得られた腫瘍型糖鎖構造認識抗体の抗体医薬開発の可能性を検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)平成26年度は、腫瘍特異的糖鎖構造の付加部位の絞り込みとして、まず、欠損型 PDPN-Fc キメラタンパク質をほ乳類細胞に強制発現、精製し、種々の腫瘍型糖鎖構造認識抗体の反応性について ELISA 法を用いて糖鎖付加部位候補領域を特定した。糖鎖付加部位候補領域に存在するセリンとスレオニンのアラニンに置換し、抗体の反応性をフローサイトメトリー解析、ウェスタンブロット法にて解析した。さらに、特定された糖鎖付加部位周辺のアミノ酸配列もアラニン置換を行い、詳細な解析を行った。

また、腫瘍型糖鎖構造の生合成に関与する糖転移酵素関連遺伝子群の特定のため、独自に開発した 185 種類の糖鎖関連遺伝子に対する定量的 real-time PCR の系を用い、各種がん細胞株や正常細胞株の糖鎖遺伝子の網羅的解析を行い、神経膠腫の中で最悪性の神経膠芽腫と低悪性の神経膠腫を区別する糖転移酵素のプロファイリングを明らかにした。

以上の解析により明らかにされた腫瘍型糖鎖付加部位と周辺ペプチドについて、根元 1 糖だけを付加した糖ペプチドを化学合成し、それを基質として糖付加実験により伸長した糖鎖構造を持つ糖ペプチドを作製し、腫瘍型糖鎖構造認識抗体の反応性を確認した。

(2)平成27年度は、特定の付加部位に腫瘍特異的糖鎖構造を保持した腫瘍型タンパク質の安定供給源として、N 末端にタグを付加した複数種類の N 末端欠損 PDPN 安定発現株を樹立した。N 末端欠損 PDPN タンパク質の産生・精製等を行う過程で、意図した位置より C 末端側の、特定の部位で切断された PDPN 分子が一定量混入する現象が明らかとなった。

腫瘍型糖鎖構造の生合成に関与する候補糖転移酵素遺伝子のノックアウト (KO) 細胞株の樹立に先立って、GnTI-KO 細胞株、シア

ル酸トランスポーターK0細胞株、ガラクトーストランスポーターK0細胞株など、レクチンで表現型の変化を簡単に検出出来る株から着手し、K0細胞樹立のストラテジー確立に実施した。

さらに、本研究に用いている複数の腫瘍特異的糖鎖構造認識抗体について抗体遺伝子を取得し、ヒトもしくはマウスキメラ化抗体の作製を実施した。

(3)平成28本年度は、GnTI-K0細胞株、シアル酸トランスポーターK0細胞株、ガラクトーストランスポーターK0細胞株など、樹立した糖鎖不全細胞株に発現している強制発現ではないPDPN、もしくは強制発現したPDPNに対して、これまでに得られた複数の腫瘍型糖鎖構造認識抗体の反応性を解析した。

さらにヒトキメラ型に変換した腫瘍型糖鎖構造認識抗体を十分量産生、精製し、マウスにおける抗腫瘍実験を実施し、腫瘍特異的抗体の抗腫瘍効果を検証した。ヒトキメラ型に変換した際、活性が低くなってしまった抗体について、L鎖の改良など実施し、抗体結合活性が上昇する結果として抗腫瘍活性が上昇することを確認した。

#### 4. 研究成果

欠損型PDPN、アラニン置換PDPN、また、腫瘍型糖鎖構造合成関連する糖転移酵素の特定により予測された腫瘍型糖ペプチド合成などの詳細な解析の結果、腫瘍型糖鎖構造認識抗体は、通常は糖鎖付加の無かった(あるいは検出限界以下だった)部位に十分量付加された、通常と異なった状態の糖鎖構造と、かつ、糖鎖付加部位周辺のPDPN本体のアミノ酸配列の両方を認識することで、腫瘍に特異的な反応性を示す事が可能になったと推測された。

また、腫瘍型糖鎖構造認識抗体を含む種々の抗PDPN抗体のキメラ抗体について、マウ

スにおける抗腫瘍実験を実施し、抗腫瘍効果を確認した。

以上の結果から、腫瘍型糖鎖構造認識抗PDPN抗体が抗体医薬の開発に有効であることが示唆された。

#### 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27件)全て査読あり。
- 1: Kaneko MK, Yamada S, Nakamura T, Abe S, Nishioka Y, Kunita A, Fukayama M, Fujii Y, Ogasawara S, Kato Y. Antitumor activity of chLpMab-2, a human-mouse chimeric cancer-specific antihuman podoplanin antibody, via antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Med.* 2017 Mar 23. doi: 10.1002/cam4.1049.
  - 2: Kato Y, Kunita A, (他15名) Kaneko MK (18名中18番目). Antiglycopeptide Mouse Monoclonal Antibody LpMab-21 Exerts Antitumor Activity Against Human Podoplanin Through Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity and Complement-Dependent Cytotoxicity. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2017 Feb;36(1):20-24. doi: 10.1089/mab.2016.0045.
  - 3: Kaneko MK, 他9名. Chimeric Anti-Human Podoplanin Antibody NZ-12 of Lambda Light Chain Exerts Higher Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity and Complement-Dependent Cytotoxicity Compared with NZ-8 of Kappa Light Chain. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2017 Feb;36(1):25-29. doi: 10.1089/mab.2016.0047.
  - 4: Kaneko MK, 他10名. Development and characterization of anti-glycopeptide monoclonal antibodies against human podoplanin, using glycan-deficient cell lines generated by CRISPR/Cas9 and TALEN. *Cancer Med.* 2017 Feb;6(2):382-396. doi: 10.1002/cam4.954.
  - 5: Ogasawara S, Kaneko MK, Kato Y. LpMab-19 Recognizes Sialylated O-Glycan on Thr76 of Human Podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2016 October, 35(5):245-253. doi:10.1089/mab.2016.0031.
  - 6: Abe S, Kaneko MK, 他12名. Antitumor effect of novel anti-podoplanin antibody

NZ-12 against malignant pleural mesothelioma in an orthotopic xenograft model. *Cancer Sci.* 2016 Sep;107(9):1198-205. doi: 10.1111/cas.12985.

8: Kato Y, Ogasawara S, Oki H, Goichberg P, Honma R, Fujii Y, Kaneko MK. LpMab-12 Established by CasMab Technology Specifically Detects Sialylated O-Glycan on Thr52 of Platelet Aggregation-Stimulating Domain of Human Podoplanin. *PLoS One.* 2016 Mar 31;11(3):e0152912. doi: 10.1371/journal.pone.0152912.

9: Shiina S, Ohno M, Ohka F, Kuramitsu S, Yamamichi A, Kato A, Motomura K, Tanahashi K, Yamamoto T, Watanabe R, Ito I, Senga T, Hamaguchi M, Wakabayashi T, Kaneko MK, Kato Y, Chandramohan V, Bigner DD, Natsume A. CAR T Cells Targeting Podoplanin Reduce Orthotopic Glioblastomas in Mouse Brains. *Cancer Immunol Res.* 2016 Mar;4(3):259-68. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0060.

10: Ogasawara S, Oki H, Kaneko MK, Hozumi Y, Liu X, Honma R, Fujii Y, Nakamura T, Goto K, Takagi M, Kato Y. Development of Monoclonal Antibody LpMab-10 Recognizing Non-glycosylated PLAG1/2 Domain Including Thr34 of Human Podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2015 Oct;34(5):318-26. doi: 10.1089/mab.2015.0018.

11: Kaneko MK, Oki H, Hozumi Y, Liu X, Ogasawara S, Takagi M, Goto K, Kato Y. Monoclonal Antibody LpMab-9 Recognizes O-glycosylated N-Terminus of Human Podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2015 Oct;34(5):310-7. doi: 10.1089/mab.2015.0022.

12: Kato Y, Kunita A, Abe S, Ogasawara S, Fujii Y, Oki H, Fukayama M, Nishioka Y, Kaneko MK. The chimeric antibody chLpMab-7 targeting human podoplanin suppresses pulmonary metastasis via ADCC and CDC rather than via its neutralizing activity. *Oncotarget.* 2015 Nov 3;6(34):36003-18. doi: 10.18632/oncotarget.5339.

13: Ochoa-Alvarez JA, Krishnan H, Pastorino JG, Nevel E, Kephart D, Lee JJ, Retzbach EP, Shen Y, Fatahzadeh M, Baredes S, Kalyoussef E, Honma M, Adelson ME, Kaneko MK, Kato Y, Young MA, Deluca-Rapone L, Shienbaum AJ, Yin K, Jensen LD, Goldberg GS. Antibody and lectin target podoplanin

to inhibit oral squamous carcinoma cell migration and viability by distinct mechanisms. *Oncotarget.* 2015 Apr 20;6(11):9045-60.

14: Oki H, Ogasawara S, Kaneko MK, Takagi M, Yamauchi M, Kato Y. Characterization of monoclonal antibody LpMab-3 recognizing sialylated glycopeptide of podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2015 Feb;34(1):44-50. doi: 10.1089/mab.2014.0087.

15: Kato Y, Kaneko MK. A cancer-specific monoclonal antibody recognizes the aberrantly glycosylated podoplanin. *Sci Rep.* 2014 Aug 1;4:5924. doi: 10.1038/srep05924.

〔学会発表〕(計 14 件)

(1) Yukinari Kato, Satoshi Ogasawara, Yuki Fujii, Mika K. Kaneko A cancer-specific monoclonal antibody against podocalyxin developed by CasMab technology inhibited the tumor growth by antibody-dependent cellular cytotoxicity. AACR annual meeting 2016. 2016/4/19, ニューオリンズ、米国

(2) 金子美華、小笠原諭、藤井勇樹、加藤幸成、CasMab 法により樹立した LpMab-12 抗体はポドプラニンの活性中心の糖鎖構造を認識する。第 89 回日本生化学会大会 2016/9/27 仙台国際センター、仙台

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med-tohoku-antibody.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 美華 (KANEKO, Mika K.)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：00323163

(3) 連携研究者

国田 朱子 (KUNITA, Akiko)

東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：50608768