

令和元年6月18日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08375

研究課題名(和文)細胞外マトリックスCSPG4を分子標的としたがん治療戦略の構築

研究課題名(英文) Development of cancer therapeutic strategies targeting for extracellular matrix CSPG4.

研究代表者

伊藤 邦彦 (ITO, Kunihiko)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：90221770

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)：細胞外マトリックスCSPG4は多くのがん種で発現している一方で、正常部位での発現は限局的であり、がん治療標的として有望である。本研究では、申請者が単離した抗CSPG4rFabより作製した完全IgGが、CSPG4発現細胞に対してADCC活性を示すことを確認した。また、免疫組織化学により、悪性黒色腫および乳がん組織でCSPG4が高発現していることを見出した。特に乳がんでは、トリプルネガティブ乳がんにも高発現していることを見出した。エピトープペプチドによる抗CSPG4抗体誘導については期待された成果は得られなかったが、本研究によりCSPG4のがん診断・治療標的としての有用性を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者が単離した抗CSPG4rFabより作製した完全IgGが、CSPG4陽性細胞に対してADCC活性を示したことから、がん治療に有用な医薬品として開発可能であることが明らかとなった。また、CSPG4が、悪性黒色腫および乳がんの診断マーカーとして有用であり、治療抵抗性であるトリプルネガティブ乳がんにもCSPG4が高発現していることから治療標的としても有用であることを明らかにした。本研究の学術的意義は、CSPG4のがん診断や治療における有用性を新たに確認できた点にあり、社会的意義は、臨床における新たながん治療戦略としてのCSPG4分子標的治療を提案できた点にあると考えられる。

研究成果の概要(英文)：While extracellular matrix CSPG4 is expressed in many cancer types, its expression at normal sites is limited and promising as a cancer therapeutic target. In the present study, anti-CSPG4rFab isolated by the applicant was expressed as a complete IgG, and ADCC activity to CSPG4 expressing cancer cells was confirmed. In addition, immunohistochemistry revealed that CSPG4 is highly expressed in malignant melanoma and breast cancer tissues. Particularly in breast cancer, it was revealed that CSPG4 is highly expressed in also triple negative breast cancer. Although the expected results were not obtained for anti-CSPG4 antibody induction by the epitope peptide immunization, this study has shown the utility of CSPG4 as a tumor diagnostic and therapeutic targets.

研究分野：医療系薬学

キーワード：CSPG4 がん分子標的治療 抗体医薬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1)がん治療における抗体医薬

がん化学療法領域において抗体医薬は分子標的治療薬に分類され、抗 CD20 リツキシマブや抗 HER2 トラスツズマブを先駆けとして、抗 VEGF ベバシズマブ、抗 EGFR セツキシマブ、抗 CCR4 モガリムズマブ、近年では抗 PD-1 ニボルマブ、抗 CTLA-4 イピリムマブが上市されるなど、適応のがん種も多岐にわたり、また高い治療成績をあげている。しかしながら、抗体医薬の多くはマウスモノクローナル抗体を遺伝子改変したキメラ抗体やヒト化抗体である。その使用においては、抗体分子中に残存するマウス由来の抗原性に起因するアナフィラキシーショックなどの副作用やヒト抗マウス抗体の出現による治療効果の減弱などが懸念されている。それに対して完全ヒト型抗体は同種タンパク質であるので安全に使用可能である。現在、臨床で使われる完全ヒト型抗体医薬品は増加傾向にあるが、まだ主流となるには至っていない。

#### (2)抗 CSPG4 ヒト型 rFab の単離

申請者は、MALT リンパ腫患者の骨髄細胞から抗体遺伝子ライブラリーを構築し、HeLaS3 生細胞に対するパニングによって、細胞表面抗原と反応する rFab (AHSA : Antibody against HeLa Surface Antigen) を単離した。AHSA のエピトープ解析および免疫沈降物の LC-MS/MS 解析により、認識抗原が細胞外マトリックス CSPG4 と予想された。この仮説は、CSPG4 陽性 MDA-MB-435S 細胞(メラノーマ由来)を用いた AHSA とウサギ抗 CSPG4 抗体の二重蛍光免疫染色による染色部位の一致および同細胞への siRNA 導入による CSPG4 ノックダウンに伴う AHSA 反応性低下により証明した。

#### (3)がん標的分子としての CSPG4

CSPG4 は高分子量メラノーマ関連抗原として同定されたが、近年、多くのがん種で発現していることが報告された。CSPG4 の発現が確認されているがん種のうちで、メラノーマは有効な抗がん剤が少なく、生存期間を有意に延長させるほどの効果が期待できないといわれている。トリプルネガティブ乳がんは、標準化学療法に高反応性であるにもかかわらず予後不良となるといわれている。悪性中皮腫は十分な生存率や生存期間に寄与する治療方法が少なく、化学療法の標準治療は未だに確立されていない。これらにおいては CSPG4 を標的分子とした治療が奏功するものと考えられるが、国内および国外において、未だに検証がなされていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究は、AHSA を出発材料として抗 CSPG4 ヒト型 IgG およびエピトープペプチドワクチンを創製し、これらの CSPG4 陽性細胞に対する細胞障害活性を指標として CSPG4 のがん標的分子としての有用性を評価することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) AHSA-IgG 発現系の構築とリコンビナントタンパク質の発現と精製

AHSA の VH-CH1 および VL-CL 遺伝子断片を pIgG ベクターに組み込み、293T 細胞に遺伝子導入して AHSA-IgG を発現させる。そして、培養上清中から ProteinA を用いて AHSA-IgG を精製する。

#### (2) 各種がん組織における CSPG4 の発現スペクトルの確認

ヒトがん組織に対する AHSA-IgG の反応性を HRP-ABC 法による免疫組織化学により検討する。

#### (3) AHSA-IgG の in vitro 細胞障害活性の評価

CSPG4 陽性細胞に対する ADCC 活性を指標として検討する。

#### (4) AHSA エピトープの解析とエピトープペプチド誘導抗血清の生物活性の検討

AHSA エピトープの解析に基づきペプチド合成およびキャリアタンパク質との複合体を作製する。次にエピトープペプチドの抗 CSPG4 抗体誘導能について、免疫マウス血清の CSPG4 陽性 MDA-MB-435S に対する反応性を指標として評価する。

### 4. 研究成果

#### (1)AHSA-IgG 発現系の構築とリコンビナントタンパク質の発現と精製

完全ヒト型 IgG1 発現用ベクターとして pIgG を使用した。AHSA の VH-CH1 および VL-CL 領域を PCR により増幅のち制限酵素 (VH-CH1 は SacI/ApaI、VL-CL は HindIII/NotI) 処理し pIgG にクローニングした。構築した pIgG-AHSA は大腸菌に導入増幅後、プラスミドを回収しシークエンス解析により VH-CH1 および VL-CL フラグメントの挿入を確認した。pIgG-AHSA は大腸菌から精製キットを用いて回収し、293T 細胞に対して、Lipofectamine 3000 を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入 72 時間後に培養上清を回収し、AHSA-IgG を Protein A-セファロースを用いて精製した。SDS-PAGE によって精製度をチェックし、A280 の測定により収量を確認した。その結果、24 ウェルフォーマットの細胞導入により、培養上清 1mL あたり 20ug の AHSA-IgG を回収す

ることができた。さらに、AHSA-IgG は CSPG4 陽性 MDA-MB-435S 細胞と強く反応することを確認した。

#### (2)各種がん組織における CSPG4 の発現スペクトルの確認

検討対象として悪性黒色腫、悪性中皮腫、乳がんおよびすい臓がんを選択した。これらのイシユマイクロアレイ (US Biomax) における CSPG4 の発現について、AHSA-IgG に対する反応性を指標とした HRP-ABC 法による免疫組織化学により検討した。その結果、悪性黒色腫および乳がんにおいて、正常組織に比べて有意に強染されることを明らかとした。乳がんでは ER, PR, HER2 発現のないトリプルネガティブ乳がんにおいても他の乳がんと同様に CSPG4 が強発現していることを明らかにした。一方、悪性中皮腫やすい臓がんでは、正常組織に比べて染色強度に有意差が認められなかった。

#### (3)AHSA-IgG の in vitro 細胞障害活性の評価

AHSA-IgG の in vitro における細胞障害活性は ADCC Reporter Bioassay Kit (プロメガ) を用いて検討した。標的細胞として CSPG4 陽性 MDA-MB-435S 細胞を用いた。AHSA-IgG 量を 100ug/ml から 1ug/ml まで段階希釈して標的細胞と混合後、ACDD Bioassay Effector Cells を加えて 6 時間インキュベートしたのちに、Bio-Glo Luciferase Assay Reagent を加えて蛍光強度を測定した。その結果、AHSA-IgG 濃度に依存して蛍光強度が増加した。AHSA-IgG 量と ADCC 活性が正の相関を示すことが明らかとなった。

#### (4)AHSA エピトープの解析とエピトープペプチド誘導抗血清の生物活性の検討

AHSA rFab の認識するエピトープをファージディスプレイペプチドライブラリー (PhD-7:New England BioLabs) を用いて解析した結果、CSPG4 の 313-318 番に相当する LSYLEP であることを明らかにした。LSYLEP 配列の C 末端にリンカー配列 (GGGC) を付加したペプチドを合成し、マレイミド修飾キャリア蛋白質 (KLH あるいは BSA) を反応させ、ペプチド・キャリア蛋白質複合体を作製した。作製したペプチド・キャリア蛋白質複合体を BALB/c マウスに頻回免疫した。最終免疫はペプチド・キャリア蛋白質複合体溶液を静脈内に投与した。最終免疫 3 日後にマウスを脱血死させ、血液および脾臓を回収した。血清中の抗 CSPG4 活性を CSPG4 陽性 MDA-MB-435S を用いた間接蛍光抗体により検討した結果、反応性は非常に弱いものであった。一方、免疫に用いたペプチド・キャリア蛋白質に対しては高い反応性を示した。この結果は、エピトープに相当する鎖長 (6 アミノ酸) のペプチドの免疫ではネイティブ抗原を認識する抗体の誘導が困難であることを示唆するものであり、エピトープおよび近傍の配列を含む長鎖ペプチドを免疫に用いる必要があると考えられた。

#### 引用文献

Nat Rev Drug Discov, 2010; 9: 767-74  
Theranostics, 2015; 5: 530-44  
FASEB J, 2002; 16, 2000-2

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Egami Y, Narushima Y, Ohshima M, Yoshida A, Yoneta N, Masaki Y, Itoh K.  
Human recombinant Fab fragment from combinatorial libraries of a B-cell lymphoma patient recognizes core protein of chondroitin sulphate proteoglycan 4.  
J Biochem. 2018 Jan 1; 163(1): 61-68. doi: 10.1093/jb/mvx065. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

伊藤邦彦他  
抗 CSPG4 完全ヒト型抗体発現系の構築と評価  
日本薬学会第 138 年会 金沢 2018

伊藤邦彦他  
Establishment of complete human IgG antibody expression system from recombinant Fab against CSPG4 on tumor cells  
第 77 回日本癌学会学術総会 大阪 2018

伊藤邦彦他  
細胞外マトリックス CSPG4 の各種がん組織での発現  
日本薬学会第 139 年会 千葉 2019

伊藤邦彦他  
CSPG4 is a promising marker for immunohistochemical detection of breast

cancer, including triple negative breast cancer  
第 78 回日本癌学会学術総会 京都 2019

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/clinphar/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者(3名)

研究分担者氏名: 井上 和幸

ローマ字氏名: INOUE Kazuyuki

所属研究機関名: 静岡県立大学

部局名: 薬学部

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 90514589

研究分担者氏名: 辻 大樹

ローマ字氏名: TSUJI Daiki

所属研究機関名: 静岡県立大学

部局名: 薬学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 90565615

研究分担者氏名: 平井 啓太

ローマ字氏名: HIRAI Keita

所属研究機関名: 静岡県立大学

部局名: 薬学部

職名: 助教

研究者番号(8桁): 30740203

### (2) 研究協力者(なし)

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、研究者個人に帰属されます。