

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22361

研究課題名（和文）腫瘍特異的糖鎖修飾を標的とした腫瘍細胞と腫瘍関連線維芽細胞に対する新たな抗体療法

研究課題名（英文）Novel antibody therapy targeting tumor specific sugar-chain modification in tumor cells and cancer associated fibroblasts

研究代表者

西村 亮平（Nishimura, Ryohei）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：80172708

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）：固形腫瘍は腫瘍細胞のみでなく、血管や免疫細胞、腫瘍関連線維芽細胞(CAF)など多様な細胞により構成されているが、未だ、CAFを標的とした治療法は確立されていない。本研究では、CAFおよび腫瘍細胞に発現するポドプラニンと同時に標的とできる犬キメラ化細胞傷害抗体を作製し、犬腫瘍細胞株を用いた実験、犬腫瘍移植マウスモデルにおける投薬実験、担がん症例犬での臨床試験を行い、本抗体薬の有効性と安全性を示唆するデータが得られた。少数例を対象とした臨床試験において、重篤な副作用なく抗腫瘍効果を示唆する反応が認められ、今後さらなる大規模臨床試験による有効性の検証への研究拡大を後押しするデータが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍は、犬・猫・人において主要な死亡原因であり、その克服は社会的な重要課題である。本研究では、悪性腫瘍のなかでも固形腫瘍に特有の腫瘍関連線維芽細胞および腫瘍細胞を同時に標的にできる抗体療法の安全性および有効性を実証することで、腫瘍治療学の発展に大きく貢献した。また、本研究では症例犬の臨床試験にも成功し、臨床獣医学における新たな腫瘍治療法の基盤となる重要な成果を報告できた。

研究成果の概要（英文）：Solid tumors are composed of not only tumor cells but also various cells such as blood vessels, immune cells, and cancer-associated fibroblasts (CAF), but a therapy targeting CAF has not yet been established. In this study, we prepared a canine chimeric anti-podoplanin cytotoxic antibody that can simultaneously target CAF and tumor cells, and successfully demonstrated efficacy and safety of this antibody by experiments of canine tumor cell lines, canine tumor inoculated mouse models, and cancer-bearing dog cases. We conducted the clinical trial using this antibody and obtained data suggesting the efficacy and safety of this antibody. In clinical trials involving a small number of dog cases, reactions suggesting antitumor effects were observed without serious side effects, and these data support the further large-scale clinical trials in the future.

研究分野：獣医学

キーワード：犬 固形腫瘍 抗体療法 ポドプラニン 腫瘍関連線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) これまで、分子標的薬や抗体薬など腫瘍細胞を直接標的とした特定のがん腫に対する治療法が中心であったが、近年、血管新生阻害薬やがん免疫療法など腫瘍組織の間質を標的とした治療法が様々ながん種に明確な治療効果を示し、飛躍的に進歩してきている。

(2) 腫瘍組織は腫瘍細胞とそれらを支持する正常細胞の集合体であり、なかでも、腫瘍関連線維芽細胞(CAF)は、腫瘍微小環境を構成する細胞の中で最も多くを占める。

(3) CAFは腫瘍の液性因子により、正常な線維芽細胞が分化した細胞群であり、腫瘍細胞の生存ニッチ形成・悪性化、がん免疫抑制、血管新生を担い、腫瘍組織形成の鍵となる細胞群である。

(4) しかし、CAFを標的とした研究や治療法の開発は未だ進んでおらず、その主要な原因として、正常な線維芽細胞とCAFを識別できる適切な特異的抗原がないこと、CAFの研究を進める上で必要な腫瘍微小環境を再現できるモデルの作出が困難なことなどが挙げられる。

(5) 申請者らは、犬や人の腫瘍細胞およびCAFにおいて、高発現しているポドプラニン(PDPN)と呼ばれる糖蛋白が、腫瘍組織特異的な糖鎖修飾を受けていること、そして、犬腫瘍特異的 PDPN に対する抗体薬の作製に成功した。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍とCAFを同時に標的とした抗体療法という新規治療法検証のために、イヌ化 PMAb-38 を抗体薬としてイヌ腫瘍自然発症例に投与し、CAF傷害による腫瘍組織形成阻害作用、および臨床的抗腫瘍効果をイヌ腫瘍自然発症例を用いて検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 犬正常組織および犬腫瘍組織パラフィン包埋ブロックを用いて PMAb-38 抗体の特異性を免疫染色法により検証した。

(2) 各種犬腫瘍細胞株(犬悪性黒色腫、犬乳腺癌、犬膀胱癌、犬骨肉腫、犬肥満細胞腫)および正常犬腎臓尿管上皮細胞株を用いて、PDPNの遺伝子発現量をqPCR法にて解析した。

(3) 犬腫瘍細胞株および正常犬腎臓尿管上皮細胞株、犬PDPN強制発現CHO細胞株、CHO細胞株を用いて、PDPNの細胞表面における蛋白発現をフローサイトメトリー法にて解析した。

(4) 犬末梢血由来活性化NK細胞およびカルセインにて染色したPDPN陽性および陰性犬悪性黒

色腫細胞株、犬 PDPN 強制発現 CHO 細胞株、CHO 細胞株との共培養系に、イヌ化 PMab-38 抗体を添加し、上清中の蛍光をプレートリーダーで測定することで、in vitro 抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性を検証した。

(5) 免疫不全マウス(ヌードマウス)に、犬悪性黒色腫細胞株を皮下移植し生着を確認した後に、イヌ化 PMab-38 抗体またはイヌ IgG 抗体を腹腔内投与し、抗腫瘍効果を検証した。

(6) 実験犬 1 頭に、イヌ化 PMab-38 抗体(2 mg/kg, 2 週おき)を 4 回投与し、投与後 5 時間の副作用および投与期間中にわたる副作用、腫瘍径の変化を一般身体検査、血液検査、尿検査、画像検査、病理組織学的検査にて検証した。

(7) 既存治療が無効となり、本臨床試験への参加を承諾された犬悪性黒色腫症例犬 5 頭に、イヌ化 PMab-38 抗体(2 mg/kg, 2 週おき)を投与し、投与後 5 時間の副作用および投与期間中にわたる副作用、腫瘍径の変化を一般身体検査、血液検査、尿検査、画像検査にて検証した。

4 . 研究成果

(1) PMAB-38 抗体は、正常腎臓の糸球体にて、わずかな染色性を認めたが、その他の正常組織における明らかな染色性は認められなかった。一方、腫瘍組織においては、犬悪性黒色腫や扁平上皮癌、肺腺癌、乳腺癌、肛門嚢腺癌組織中の腫瘍細胞および CAF において、強い染色性を認めた。

(2) 犬悪性黒色腫細胞株において、正常犬腎臓尿管上皮細胞株を超える PDPN 遺伝子の高発現を認めた。

(3) 犬悪性黒色腫細胞株において、犬 PDPN 強制発現 CHO 細胞株と同様の、PDPN 蛋白の細胞膜上における高発現を認めた。

(4) PDPN を高発現する犬悪性黒色腫細胞株において、強い ADCC 活性を認めた。一方、PDPN 弱発現犬悪性黒色腫細胞株では、有意な ADCC 活性は認めず、イヌ化 PMab-38 抗体の特異的な細胞傷害活性が示唆された。

(5) イヌ化 PMab-38 抗体投与群において、イヌ IgG 抗体投与群に比べ、腫瘍の増殖抑制効果を認めた。

(6) イヌ化 PMab-38 抗体を投与した実験犬において、臨床学的および病理組織学的検査において、明らかな副作用は認められなかった。

(7) イヌ化 PMab-38 抗体を投与した 5 頭において、投与後 5 時間の体温・心拍数・呼吸数の異常は認められなかった。唯一、1 頭において、投与後に軽度の嘔吐を認めた。認められた嘔吐は、制吐薬によりコントロール可能なものであり、軽度な嘔吐は他の抗体療法においても一般的な

副作用の一つとして認められていることから、許容できるものと考えられた。長期的な有害事象としては、抗体を投与した全頭で、炎症マーカー(CRP; C-reactive protein)の上昇を認めたが、抗体投与による治療効果に伴う反応や抗体に対する異物反応、二次的な抗腫瘍免疫応答を反映した反応、抗体投与とは関係なく腫瘍そのものの増悪による反応など、様々な要因が考えられ、明確な原因は特定できなかった。うち1頭に関しては、治療反応と共に、CRPの上昇を認め、治療効果に関連したCRPの増加である可能性が示唆された。治療効果に関しては、1頭で腫瘍病変の維持(SD)、1頭で一部転移病変の縮小を認め、本抗体療法の有効性が示唆された。今回、臨床試験に組み込まれた症例は、いずれも既存治療抵抗性の末期症例であり、治療効果の観察においては制約のある集団であったので、今後、より早期ステージ症例の組み込みや治療効果と関連するバイオマーカーの同定により、さらに高い治療効果が期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shinada Masahiro, Kato Daiki, Kamoto Satoshi, Yoshimoto Sho, Tsuboi Masaya, Yoshitake Ryohei, Eto Shotaro, Ikeda Namiko, Saeki Kohei, Hashimoto Yuko, Takahashi Yosuke, Chambers James, Uchida Kazuyuki, Kaneko Mika K., Fujita Naoki, Nishimura Ryohei, Kato Yukinari, Nakagawa Takayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 PDPN Is Expressed in Various Types of Canine Tumors and Its Silencing Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Canine Malignant Melanoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1136 ~ 1136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9051136	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 Kamoto Satoshi, Shinada Masahiro, Kato Daiki, Yoshimoto Sho, Ikeda Namiko, Tsuboi Masaya, Yoshitake Ryohei, Eto Shotaro, Hashimoto Yuko, Takahashi Yosuke, Chambers James, Uchida Kazuyuki, Kaneko Mika K., Fujita Naoki, Nishimura Ryohei, Kato Yukinari, Nakagawa Takayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Phase I/II Clinical Trial of the Anti-Podoplanin Monoclonal Antibody Therapy in Dogs with Malignant Melanoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2529 ~ 2529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9112529	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 衛藤翔太郎, 佐伯巨平, 吉竹涼平, 加藤大貴, 坪井誠也, 吉本翔, 品田真央, 池田凡子, 嘉本諭, James Chambers, 内田和幸, 西村亮平, 中川貴之
2. 発表標題 犬移行上皮癌における腫瘍免疫微小環境の解析と関連因子の探索
3. 学会等名 第19回生命科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 品田真央, 嘉本諭, 加藤大貴, 坪井誠也, 吉本翔, チェンバースジェームズ, 内田和幸, 池田凡子, 佐伯巨平, 山田慎二, 金子美華, 西村亮平, 加藤幸成, 中川貴之
2. 発表標題 イヌ腫瘍組織におけるPodoplanin発現の解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato Daiki, , Nishimura Ryohei, Nakagawa Takayuki.
2. 発表標題 cancer immunotherapies targeting novel canine solid tumor antigens
3. 学会等名 The 1st ToBeST symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kamoto S, Kato D, Kiname K, Ikeda N, Yoshimoto S, Tsuboi M, Yoshitake R, Eto S, Shinada M, Uchida K, Yamada S, Kaneko M, Nishimura R, Kato Y, Nakagawa T
2. 発表標題 Evaluation for antitumor effect and safety of cancer specific anti-canine podoplanin monoclonal antibody.
3. 学会等名 The 6th Asian Meeting of Animal Medicine Specialties (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学 大学院農学生命科学研究科 獣医外科学研究室(研究紹介) http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/geka/</p>
--

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	加藤 幸成 (Kato Yukinari) (00571811)	東北大学・未来科学技術共同研究センター・教授 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	高橋 洋介 (Takahashi Yosuke)	東京大学・農学生命科学研究科・特任研究員 (12601)	
研究協力者	長久保 大 (Nagakubo Dai)	東京大学・農学生命科学研究科・特任助教 (12601)	
連携研究者	加藤 大貴 (Kato Daiki) (60843216)	東京大学・農学生命科学研究科・特定研究員 (12601)	
連携研究者	中川 貴之 (Nakagawa Takayuki) (40447363)	東京大学・農学生命科学研究科・准教授 (12601)	

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