

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07197

研究課題名(和文) 安全性と有効性を両立した悪性胸膜中皮腫に対するがん細胞選択的抗体医薬の開発

研究課題名(英文) Investigation of effective and safe cancer specific antibody therapy against malignant pleural mesothelioma

研究代表者

阿部 真治 (ABE, Shinji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授

研究者番号：00403717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：悪性胸膜中皮腫はアスベストにより誘発される難治性の胸部悪性腫瘍であり、有効性と安全性を両立した新規治療法の開発が求められている。本研究では、悪性胸膜中皮腫に高発現するポドプランンを標的とするがん特異的抗体(CasMab)の有効性について検討を行った。その結果、がん特異的抗ポドプランン抗体は、悪性胸膜中皮腫に発現するポドプランンを認識するが、腎細胞に発現するポドプランンは認識しないことが示された。また、*in vitro* および *in vivo* の検討により、がん特異的抗ポドプランン抗体は抗体依存性細胞障害(ADCC)を介して、悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果を誘導することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性胸膜中皮腫は既存療法で十分な治療効果をあげる事が非常に困難であり、新規機序の治療法開発が求められている。研究代表者はこれまでに悪性胸膜中皮腫に高発現するポドプランンを標的とした新規抗体医薬の開発研究を行ってきたが、ポドプランンは糸球体上皮などの正常組織にも発現するため、有効性と安全性を両立した抗体医薬の開発が必要である。本研究結果により、がん特異的抗ポドプランン抗体が、がん細胞に発現したポドプランンを認識し、ADCCを介して抗腫瘍効果を誘導することが明らかとなったことは、学術的にも意義あるものであり、今後の新規治療薬開発につながる社会的に意義ある成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Malignant pleural mesothelioma (MPM) caused by exposure to asbestos, is a refractory malignant tumor of the chest. Development of novel effective and safe therapies for MPM is needed. In this study, we investigated the anti-tumor effect of a cancer-specific monoclonal antibody (CasMab) that targets podoplanin, which is highly expressed in malignant pleural mesothelioma. Evaluated the podoplanin recognition of the anti-podoplanin CasMab, it was shown that the CasMab recognized podoplanin expressed in MPM cells, but did not recognize in renal cells. In addition, we demonstrated that the anti-podoplanin CasMab induced antitumor effects against malignant pleural mesothelioma via antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) *in vitro* and *in vivo*.

研究分野：医療薬学

キーワード：抗体医薬 ADCC 腫瘍特異的免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫はアスベストにより誘発される難治性の胸部悪性腫瘍であり、我が国ではアスベスト規制の遅れから、今後の症例数増加が予想されている。現在、悪性胸膜中皮腫に対する治療法としては、外科療法、化学療法、放射線療法などが行われているが、治療抵抗性を有するため、腫瘍特異的免疫療法などの新規治療法開発が求められている。

腫瘍特異的免疫療法の中でも抗体療法は臨床開発が積極的に進められており、すでに様々な悪性腫瘍に対して臨床応用されている。現在、抗体医薬は機能的観点から 3 クラスに分類されており、悪性腫瘍に対しては、抗体依存性細胞障害 (antibody-dependent cellular cytotoxicity:ADCC) 活性を有する抗体が最も有望なクラスに分類されている (Nat Drug Discov. 10:101-110, 2011.)。ADCC 活性は、がん細胞表面のがん抗原に結合した特異的抗体を免疫細胞 (主に NK 細胞) が認識することによって起こる選択的な細胞障害活性であり、直接的にがん細胞を傷害するため強い抗腫瘍効果が誘導される。

このような抗腫瘍効果誘導機序を有する抗体医薬の開発に当たっては、個々のがん患者において細胞表面に発現するがん抗原の種類が異なるため、治療標的の選択が最も重要である。ポドプラニン (Podoplanin) は、悪性胸膜中皮腫や神経膠芽腫などの様々な悪性腫瘍において高発現し、腫瘍の転移・浸潤に深く関与する型膜貫通糖タンパク質である。これまでに研究代表者の研究グループはポドプラニンに対する特異的抗体を開発し、その抗体が ADCC 活性の誘導を介して、強い抗腫瘍効果を発現することを明らかにしている (J Immunol. 190:6239-6249, 2013; Cancer Sci. 107:1198-1205, 2016.)。一方で、ポドプラニンは糸球体上皮細胞やリンパ管内皮細胞などの正常細胞にも発現することが知られている。ADCC を作用機序とする抗体は標的分子を発現した全ての細胞に対して細胞障害を引き起こす可能性があるため、既存の抗ポドプラニン抗体では腎臓やリンパ管などで有害事象が発生する恐れがある。したがって、ポドプラニンを標的とした抗体療法の開発を進めるためには、安全性を確保するための何らかの方策を検討する必要がある。

## 2. 研究の目的

がん組織だけでなく正常組織にも発現する抗原性タンパク質を標的とした抗体医薬は、安全性の観点から開発を進めることが難しく、高い有効性が認められても開発を断念せざるを得ないことがほとんどであった。しかし、研究代表者の研究グループの一員である加藤幸成 教授 (東北大学大学院医学系研究科) らは、同じタンパク質であっても細胞の種類によって付加される糖鎖に違いがあることに着目し、標的タンパク質のエピトープだけでなくがん細胞特異的な付加糖鎖の両方を認識することで、正常細胞には反応せず、がん細胞に発現したポドプラニンのみを選択的に認識するがん特異的抗体 (CasMab) の樹立に成功した (Sci Rep. 2014, doi: 10.1038/srep05924.)。さらに我々は、このがん特異的抗ポドプラニン抗体が悪性脳腫瘍の一種である神経膠芽腫に対して ADCC 活性を誘導することも明らかにした (Cancer Med. 6:768-777, 2017.)。一方で、この新たながん特異的抗体は、エピトープだけでなく付加糖鎖を認識することから、同じ標的分子を発現していてもがんの種類によって反応性が大きく異なることが考えられる。そのため、この新規抗体を臨床応用するためには、がん種ごとに詳細な検討を行う必要がある。したがって本研究では、悪性胸膜中皮腫に対する安全性と有効性を両立した新規抗体医薬の開発を目的として、がん特異的抗ポドプラニン抗体が悪性胸膜中皮腫に発現したポドプラニンを選択的に認識するか否か、また ADCC 活性を介した抗腫瘍効果を発現するか、について詳細な検討を行った。

## 3. 研究の方法

本研究では、(1) 悪性胸膜中皮腫に対するがん特異的抗体の選択性、(2) 悪性胸膜中皮腫細胞株に対するがん特異的抗体の ADCC 活性、(3) マウスモデルを用いたがん特異的抗体の抗腫瘍効果、の 3 点について、以下の方法で検討を行った。なお、がん特異的抗ポドプラニン抗体 (chLpMab-2f、chLpMab-23f) は、研究代表者の研究グループの一員である加藤幸成 教授 (東北大学) から供与いただいた。

### (1) 悪性胸膜中皮腫に対するがん特異的抗ポドプラニン抗体の選択性

悪性胸膜中皮腫に対するがん特異的抗ポドプラニン抗体の選択性を明らかにするため、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株およびヒト腎細胞株を用い、フローサイトメトリーにより評価を行った。

## (2) *In vitro* におけるがん特異的抗ポドプラニン抗体の ADCC 活性

がん特異的抗ポドプラニン抗体の *in vitro* における ADCC 活性について、<sup>51</sup>Cr 遊離試験法により細胞傷害活性を測定した。実験では健常成人の末梢血より単離した単核球をエフェクター細胞として用いた。採取したエフェクター細胞と、がん特異的抗ポドプラニン抗体を <sup>51</sup>Cr にて標識したヒト悪性胸膜中皮腫細胞と一定時間共培養し、腫瘍細胞の障害により上清中に放出された <sup>51</sup>Cr を  $\gamma$  カウンターにて測定した。

## (3) *In vivo* におけるがん特異的抗ポドプラニン抗体の 抗腫瘍効果

*In vitro* 実験での結果をもとに、悪性胸膜中皮腫移植マウスモデルを用い、*in vivo* におけるがん特異的抗ポドプラニン抗体の抗腫瘍効果について検討を行った。作成した悪性胸膜中皮腫皮下移植マウスモデルに、がん特異的抗ポドプラニン抗体とヒト免疫細胞を投与し、皮下腫瘍のサイズ変化を測定することで抗腫瘍効果を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 悪性胸膜中皮腫に対するがん特異的抗ポドプラニン抗体の選択性

がん特異的抗ポドプラニン抗体である chLpMab-2f および chLpMab-23f を用い、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株およびヒト腎細胞株における各抗体のポドプラニン認識能をフローサイトメトリーにより評価した。その結果、chLpMab-2f は 7 株のポドプラニン陽性ヒト MPM 細胞株中 6 株でポドプラニンを認識したが、ヒト腎細胞株に発現するポドプラニンは認識しなかった。また、chLpMab-23f も同様に、ポドプラニン陽性ヒト MPM 細胞株 8 株中 7 株でポドプラニンを認識したが、ヒト腎細胞株に発現するポドプラニンは認識しなかった。この結果より、がん特異的抗ポドプラニン抗体は、悪性胸膜中皮腫に発現したポドプラニンを選択的に認識することが示唆された。

### (2) *In vitro* におけるがん特異的抗ポドプラニン抗体の ADCC 活性

がん特異的抗ポドプラニン抗体である chLpMab-2f および chLpMab-23f の *in vitro* における ADCC 活性について、<sup>51</sup>Cr 遊離試験法により検討を行った。ポドプラニン陽性ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株を用い、ヒト末梢血単核球をエフェクター細胞として ADCC 活性を測定したところ、chLpMab-2f は、control 抗体に比べて有意に高い ADCC 活性を誘導した(図 1)。また、chLpMab-23f も同様にポドプラニン陽性ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株に対して ADCC 活性を誘導した。各抗体の ADCC 活性誘導について、さらに詳細な検討を行ったところ、chLpMab-2f および chLpMab-23f は、ポドプラニン陽性ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株に対して濃度および E/T ratio 依存的に ADCC 活性を誘導した。また、ADCC 活性を誘導するエフェクター細胞の詳細について明らかにするために、ヒト末梢血単核球から NK 細胞をマグネットビーズにより単離して実験を行った。その結果、chLpMab-2f および chLpMab-23f は、NK 細胞をエフェクター細胞としたときに、ポドプラニン陽性悪性胸膜中皮腫細胞株に対して、有意な ADCC 活性を誘導した。一方で、ヒト腎細胞株に対する chLpMab-2f および chLpMab-23f の ADCC 活性について検討した。その結果、どちらの抗体も ADCC 活性を誘導しなかった。以上の結果より、がん特異的抗ポドプラニン抗体である chLpMab-2f および chLpMab-23f は、*in vitro* においてポドプラニン陽性悪性胸膜中皮腫細胞株に対して ADCC 活性を誘導する一方で、ヒト腎細胞株に対しては ADCC 活性を誘導しないことが明らかとなった。

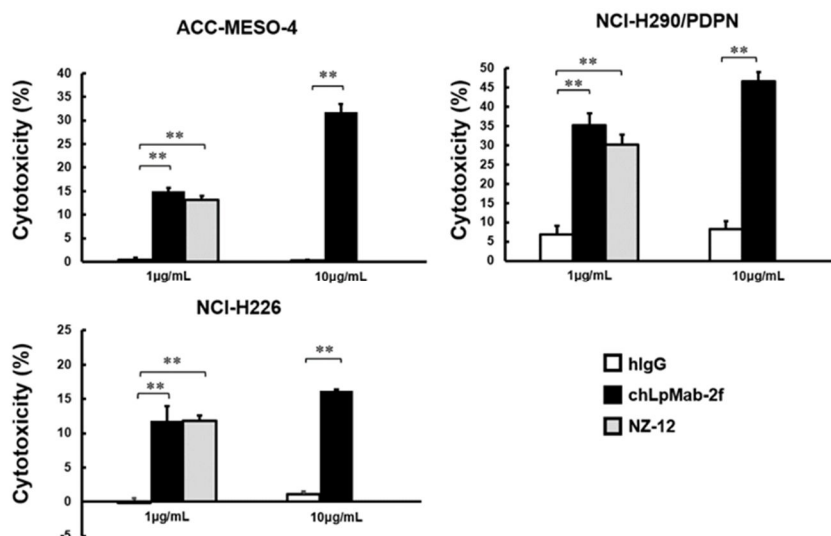


図 1 ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株に対する chLpMab-2f の ADCC 活性

(3) *In vivo* におけるがん特異的抗ポドプラニン抗体の抗腫瘍効果

*In vitro* における検討より、がん特異的抗ポドプラニン抗体が ADCC 活性を誘導することが明らかとなったため、悪性胸膜中皮腫皮下移植マウスモデルを用い、*in vivo* における抗腫瘍効果について検討を行った。ポドプラニン陽性悪性胸膜中皮腫細胞株の ACC-MESO-4 を皮下移植した SCID マウスに対して、ヒト NK 細胞を週 1 回、2 週間、腫瘍近傍皮下に投与した。また、がん特異的抗ポドプラニン抗体である chLpMab-2f または control 抗体 (human IgG) を週 2 回、2 週間、腹腔内に投与し、腫瘍体積の変化を測定した。その結果、control 群と比較して、chLpMab-2f 投与群では、ヒト NK 細胞との併用により有意な腫瘍増殖の抑制が認められた (図 2)。この結果より、がん特異的抗ポドプラニン抗体は、*in vivo* においても ADCC 活性を介した抗腫瘍効果を発現することが示された。

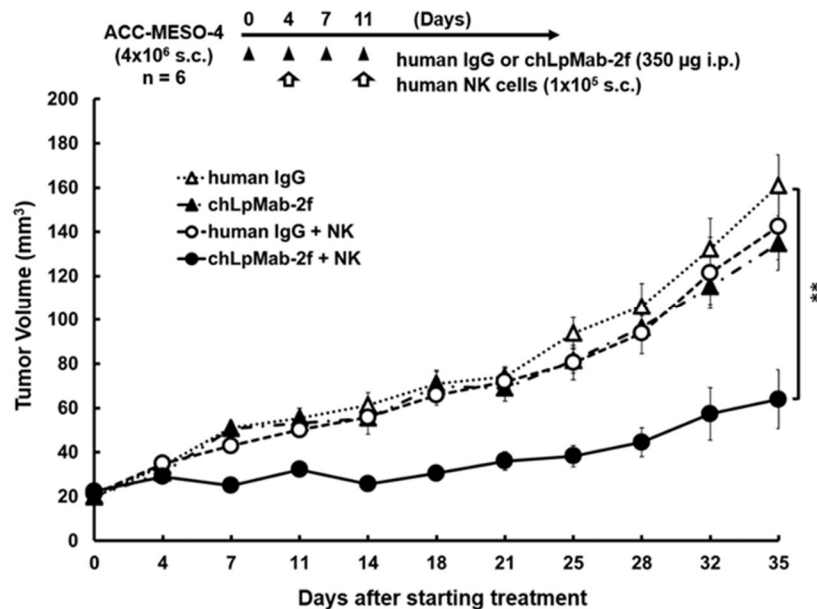


図 2 悪性胸膜中皮腫皮下移植マウスモデルにおける chLpMab-2f の抗腫瘍効果

本研究で得られた結果より、がん特異的抗ポドプラニン抗体は、悪性胸膜中皮腫に対する安全で効果的な新規抗体医薬の開発につながる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田曜, 吉田碧人, 佐藤智恵美, 金子美華, 加藤幸成, 西岡安彦, 阿部真治
2. 発表標題 コアフコース除去による抗ポドプラニン抗体の FcR 及び C1q 結合性の変化と細胞傷害活性への影響の検討
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 四宮花奈, 和田拓也, 佐藤智恵美, 金子美華, 加藤幸成, 西岡安彦, 阿部真治
2. 発表標題 がん特異的ヒト化抗ポドプラニン抗体 humLpMab-23f のADCC 及び CDC に関する検討
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田圭一郎, 和泉俊尋, 板倉智史, 佐藤智恵美, 金子美華, 加藤幸成, 西岡安彦, 阿部真治
2. 発表標題 がん特異的抗ポドプラニン抗体 chLpMab-2f の in vitro 及び in vivo における抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川原 一輝, 和泉 俊尋, 四宮 花奈, 山田 圭一郎, 和田 拓也, 板倉 智史, 佐藤 智恵美, 金子 美華, 加藤 幸成, 西岡 安彦, 阿部 真治
2. 発表標題 がん特異的抗podoplanin抗体chLpMab-23fによる悪性胸膜中皮腫に対する抗体依存性細胞障害の検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田 曜, 吉田 碧人, 和泉 俊尋, 古謝 景斗, 佐藤 智恵美, 金子 美華, 加藤 幸成, 西岡 安彦, 阿部 真治
2. 発表標題 抗ポドoplanin抗体NZ-12のコアフコース除去によるFcR及びC1q結合性への影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川原一輝, 阿部真治, 加藤幸成, 西岡安彦
2. 発表標題 悪性胸膜中皮腫に対するがん特異的抗 podoplanin 抗体chLpMab-23fのin vitroにおける抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔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	西岡 安彦  (NISHIOKA Yasuhiko)  (70274199)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授    (16101)	

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
---------	---------