

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06876

研究課題名(和文)高性能イミュノトキシンによるEGFR阻害薬耐性肺腺癌に対する標的化治療の開発

研究課題名(英文) Generation of immunotoxins with super-targeting mAb in the EGFR-mutant lung adenocarcinoma

研究代表者

山口 美樹 (YAMAGUCHI, MIKI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：10530454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：私たちはジフテリア毒素(DT)とプロテインG(3C)を含むリコンビナントタンパクであるDT3Cを開発した。この系を応用した選択法でEGFR阻害薬耐性肺腺癌に特異的なMoAbを187個樹立した。これらのMoAbはいずれも高いイミュノトキシン活性を示し、抗体薬候補抗体が含まれており、ADC型抗体薬として開発中の抗原分子が多く含まれていた。以上から、この方法が抗体薬の選別法として優れていることが示された。この研究において、私たちはCD98hc, CD155, CD224, ACE2, EGFR, ICAM1などのADC候補抗体を樹立した。これらの抗体は今後臨床応用へ進めたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We generated a recombinant fusion protein DT3C, which contained the catalytic and translocation domain of the truncated diphtheria toxin (DT) as well as the three IgG-binding C domains of streptococcal protein G (3C). Fc of MoAb binds with DT3C, resulting in a MoAb-DT3C complex. The MoAb-DT3C complex binds with the surface Ag, being followed by internalization and translocation into the cytoplasm, leads to the cytotoxic effect by protein synthesis inhibition of DT. By using these, we developed a unique screening system to establish cancer-targetable antigens/antibodies sets. In total 187 MoAb clones were obtained which performed immunotoxin cytotoxic on EGFR-mutant lung adenocarcinomas. Our method provide an excellent way to obtain promising superior mAbs for antibodies drug conjugation(ADC) therapy. In this study, we established adc candidate antibodies such as CD98hc, CD155, CD224, ACE2, EGFR, ICAM1. We intend to advance these antibodies to clinical applications in the future.

研究分野：腫瘍学分野

キーワード：EGFR阻害薬耐性細胞株 ADC型抗体薬 モノクローナル抗体 抗体スクリーニング 内在化

## 1. 研究開始当初の背景

抗癌剤療法には血球減少症、下痢、皮膚潰瘍など様々な副作用が認められることが多い。これは抗癌剤が本来の標的ではない正常細胞に作用するためであり、癌細胞選択的に抗癌剤を届ける抗体薬の開発が求められている。私たちは、これまでに癌に対する遺伝子治療目的に抗体のFc部分に特異的に結合可能な変異型アデノウイルス(Adv-FZ33)を開発し、この変異型ベクターを効率的に癌細胞に運びうる抗体の開発と抗原同定を進めた。結果として603個のモノクローナル抗体を樹立し422個の抗体が認識する抗原を同定した(その種類は62)。この抗原の中にはCD20, CD44, CD47, CD81, CD155, CD276, CEACAMs, EGFR, EpCAM, EphA2, IGF1R, IL13Ra2, L1CAM, CSPG4, PSMAなどの腫瘍標的候補として注目されている分子が多数含まれていた。癌標的化抗体2種類(TROP2)については、それぞれ別の国内大手製薬会社との共同研究にて、カニクイザルでの毒性試験を通過しヒト型化抗体による臨床試験の開始に向け準備を進めている。

近年、モノクローナル抗体に抗癌剤を結合することで直接的に癌細胞殺傷効果を示すADCが注目され開発が進められている。ADC抗体薬は抗体が細胞膜表面抗原と結合し内在化して抗癌剤を細胞内に届けるいわゆるイミュノトキシンである。しかしながら、抗体の内在化能を簡便に評価できるツールは存在しない。そこで私たちはモノクローナル抗体の内在化能を安定かつ簡便に評価できる独自のツールを新たに開発した。このツールはCatalytic domain およびTranslocation domain を含むジフテリア毒素と連鎖球菌プロテインGのC1,C2,およびC3の3つのドメイン(3C)を含むリコンビナント複合タンパク質でありDT3Cと名付けた。DT3Cは抗体と混ぜるだけで抗体-DT3C結合体を簡便に形成できる。この結合体を癌細胞に作用させた場合、抗体が内在化能を有する場合に限り細胞死が誘導される。私たちは癌細胞に対する抗体ライブラリーを作製し、DT3Cと結合することで癌細胞殺傷効果を指標に、内在化能を有するモノクローナル抗体を効率的にスクリーニングする独自の方法を開発した。

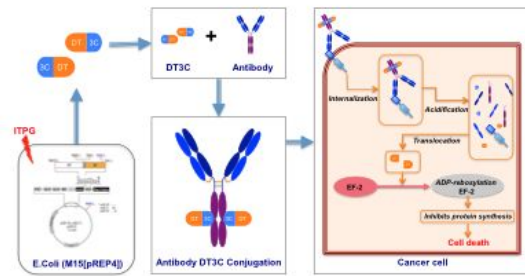


図1. イミュノキシンの概念図

## 2. 研究の目的

日本人の肺腺癌の約半数はEGFR遺伝子に機能獲得性突然変異が認められる。EGFR遺伝子変異陽性肺腺癌は恒常的に活性化したEGFR signaling依存性に増殖していると考えられる。その多くはgefitinib等のEGFR阻害薬剤に高感受性を示し一旦は縮小するが、その治療効果は通常1年前後しか持続せず、最終的にはほぼ全例が薬剤耐性を獲得し再増大することが知られている。私たちはEGFR mutant肺腺癌にはEGFR非依存性のsubpopulationが内在していることを確認済である(Sakuma Y, et al. Lab Invest 2013)。この細胞の存在がEGFR阻害薬単剤で癌を根治させることができない根本的な原因と考えられることから本研究ではこれらの癌細胞を効果的に治療しうる新規標的化療法を開発することを目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、私たちが開発した抗体探索ツールを用いて、EGFR阻害薬耐性の肺腺癌におけるイミュノトキシン治療のために格段に有用性の高い標的化抗体を探索樹立し、臨床医薬への実用化を目指す。具体的には、(1)EGFR阻害薬耐性の肺腺癌細胞株でマウスを免疫し、これらの肺腺癌に対するモノクローナル抗体のライブラリーを作製する。(2)私たちが開発したリコンビナント複合タンパクであるDT3Cを用いて抗体-DT3C結合体を作製し、この結合体を用いた選別法で癌細胞殺傷効果の高い抗体を選び出す。(3)免疫沈降・質量分析により、選別された抗原分子を同定する。(4)癌細胞に対して選択的治療効果が期待できる標的化分子の候補に関して、実用化に必要な解析を進める。

## 4. 研究成果

EGFR 阻害薬耐性細胞を効果的に細胞死に

誘導させうる抗体をハイブリドーマ細胞株として 19,290 クローンをスクリーニングして 187 クローンの独立したハイブリドーマ株を樹立できた。この 187 クローンのハイブリドーマ株は、さらに ADC 型抗体薬として不向きな抗原 (CD59, CD71, ITGA2, ITGA3, ITGB1, CD147, HMC-ClassI および ClassII など) を ELISA で選択し排除した。これらの方法で選択されたハイブリドーマ株は現時点で 72 クローン (72/19,290; 0.37%) が樹立できている。これらの樹立されたモノクローナル抗体は内在化能に優れており、全ての抗体が新規 ADC 型抗体薬の候補といえる。この抗体スクリーニングで EGFR, ICAM1, ITGB4, ACE2, CD276, CD98hc などの ADC 型抗体薬として有望なモノクローナル抗体が得られた。今後、これらの抗体を用いた ADC 型抗体薬の開発に進めたい。TROP2 を標的にする ADC 型抗体薬については国内大手製薬会社との共同で国内および米国における特許が取得され、現在第 1 相臨床試験が進められている。

## 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)

- 1) Sumi T, Hirai S, Yamaguchi M, Tanaka Y, Tada M, Niki T, Takahashi H, Sakuma Y. Trametinib downregulates survivin expression in RB1-positive KRAS-mutant lung adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 May 1. in press. 査読あり
- 2) Sumi T, Hirai S, Yamaguchi M, Tanaka Y, Tada M, Yamada G, Hasegawa T, Miyagi Y, Niki T, Watanabe A, Takahashi H, Sakuma Y. Survivin knockdown induces senescence in TTF-1-expressing, KRAS-mutant lung adenocarcinomas. *Int J Oncol*. 2018 Apr 11. in press. 査読あり
- 3) Wanibuchi M, Kataoka-Sasaki Y, Sasaki M, Oka S, Otsuka Y, Yamaguchi M, Ohnishi H, Ohtaki S, Noshiro S, Ookawa S, Mikami T, Mikuni N, Honmou O. Interleukin-13 Receptor Alpha 2 as a Marker of Poorer Prognosis in High-Grade Astrocytomas. *Journal of Neurosurgical Sciences*. 2017 Jan 12. 査読あり
- 4) Yamaguchi M, Hirai S, Sumi T, Tanaka Y, Tada M, Nishii Y, Hasegawa T, Uchida H, Yamada G, Watanabe A, Takahashi H, Sakuma Y. Angiotensin-converting enzyme 2 is a potential therapeutic target for EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jun 3;487(3):613-618. 査読あり
- 5) Yamaguchi M, Hirai S, Tanaka Y, Sumi T, Miyajima M, Mishina T, Yamada G, Otsuka M, Hasegawa T, Kojima T, Niki T, Watanabe A, Takahashi H, Sakuma Y. Fibroblastic foci, covered with alveolar epithelia exhibiting epithelial-mesenchymal transition, destroy alveolar septa by disrupting blood flow in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lab Invest*. 2017 Mar;97(3):232-242.
- 6) Okubo Y, Uchida H, Wakata A, Suzuki T, Shibata T, Ikeda H, Yamaguchi M, Cohen JB, Glorioso JC, Tagaya M, Hamada H, Tahara H. Syncytial Mutations Do Not Impair the Specificity of Entry and Spread of a Glycoprotein D Receptor-Retargeted Herpes Simplex Virus. *J Virol*. 2016 Nov 28;90(24):11096-11105. 査読あり
- 7) Ikeda M, Kato K, Yamaguchi M, Hamada H, Nakamura K, Sugimoto Y. Cell Surface Antibody Retention Influences In Vivo Antitumor Activity Mediated by Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity. *Anticancer Res*. 2016 Nov;36(11):5937-5944. 査読あり
- 8) Shibata T, Uchida H, Shiroyama T, Okubo Y, Suzuki T, Ikeda H, Yamaguchi M, Miyagawa Y, Fukuhara T, Cohen JB, Glorioso JC, Watabe T, Hamada H, Tahara H. Development of an oncolytic HSV vector fully retargeted specifically to cellular EpCAM for virus entry and cell-to-cell spread. *Gene Ther*. 2016 Jun;23(6):479-488. 査読あり
- 9) Sakuma Y, Nishikiori H, Hirai S, Yamaguchi M, Yamada G, Watanabe A, Hasegawa T, Kojima T, Niki T, Takahashi H. Prolyl isomerase Pin1 promotes survival in EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells with an

epithelial-mesenchymal transition phenotype. *Lab Invest.* 2016 Apr;96(4):391-398. 査読あり

- 10) Ikeda M, Yamaguchi M, Kato K, Nakamura K, Shiina S, Ichikawa-Ando T, Misaka H, Myojo K, Nakamura K, Sugimoto Y, Hamada H. Pr1E11, a novel anti-TROP-2 antibody isolated by adenovirus-based antibody screening, recognizes a unique epitope. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Mar 20;458(4):877-882. 査読あり

〔図書〕(計 1 件)

山口美樹  
抗体薬物複合体 (ADC) の設計開発  
第 5 章 抗体結合性毒素タンパク質の作  
製と抗体スクリーニング  
ISBN コード : 978-4-7813-1159-3  
シーエムシー出版 2016 年 5 月 20 日  
査読なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 1 件)

名称 : 抗 TROP2 抗体-薬物コンジュゲ  
ト  
発明者 : 我妻利紀、高橋秀、長谷川淳、  
岡蔦大祐、濱田洋文、山口美樹、  
他  
権利者 : 第一三共株式会社、  
公立学校法人札幌医科大学  
番号 : 特許第 6130517 号  
取得年月日 : 平成 29 年 4 月 21 日  
国内外の別 : 日本

名称 : Anti-TROP2 ANTIBODY-DRUG  
CONJUGATE  
発明者 : Toshinori Agatsuma, Shu  
Takahashi, Jun Hasegawa,  
Daisuke Okajima, Hirofumi

Hamada, Miki Yamaguchi  
権利者 : DAIICHI SANKYO  
COMPANY, LIMITED; SAPPORO  
MEDICAL UNIVERSITY

番号 : US 9,850,312 B2  
取得年月日 : Dec. 26, 2017  
国内外の別 : アメリカ合衆国

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://web.sapmed.ac.jp/molm/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山口美樹 (YAMAGUCHI MIKI )  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 10530454

(2) 研究分担者

佐久間裕司 (SAKUMA YUJI )  
札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 10364514

西井ゆかり (NISHII YUKARI )  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号 : 10619505

内田宏昭 (UCHIDA HIROAKI )  
東京大学・医科学研究所・准教授  
研究者番号 : 20401250

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

( )