

平成 30 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06880

研究課題名(和文)新規抗悪性リンパ腫抗体の樹立方法の確立と臨床応用への研究

研究課題名(英文) Establishment of therapeutic mAbs for malignant lymphoma

研究代表者

松岡 周二 (MATSUOKA, Shuji)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20286743

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)：mAb4713抗体は悪性リンパ腫細胞及び成人T細胞白血病細胞を短時間で補体、ADCC非依存性に大きな穴を細胞表面に開けて殺し、この特異な細胞死をapoptosis(アポトーシス)と名付けた。日本と米国で特許が成立した。論文を発表したで当時はリンパ腫細胞株を障害することが証明されただけだったが、さらに、DLBCLの患者の血液中のDLBCL細胞をフラスコ内で1時間以内に1/4に減少させ、正常細胞は傷害しなかった。現在この抗体の臨床応用を目指した開発のため大和証券グループと日生キャピタルが12億円出資して日本抗体医薬株式会社が設立され抗体のヒト化とその生産が始まっている。

研究成果の概要(英文)：To develop a new therapeutic monoclonal Antibody (mAb) for Hodgkin lymphoma (HL), we immunized a mouse with live HL cell lines. After hybridization, we screened the hybridoma clones by assessing direct cytotoxicity against a HL cell line not used for immunization. A newly established mouse anti-human mAb (4713) triggered cytoskeleton-dependent, but complement- and caspase-independent, cell death in HL cell lines, Burkitt lymphoma cell lines, and advanced adult T-cell leukemia cell lines. mAb 4713 was revealed to be a mouse anti-human pan-HLA class II mAb. Treatment with this mAb induced the formation of large pores on the surface of target lymphoma cells within 30 min. This finding suggests that the cell death process induced by this anti-pan HLA-class II mAb may involve the same death signals stimulated by a cytolytic anti-pan MHC class I mAb that also induces large pore formation.

研究分野：免疫学

キーワード：アポトーシス 治療 モノクローナル抗体 細胞死 汎HLA- class II 細胞骨格 悪性リンパ腫 成人T細胞白血病

1. 研究開始当初の背景

モノクローナル抗体は癌治療において、最小限の細胞毒性、副作用で治療効果が得られるとして、最も効果的な分子標的薬の1つとして用いられている。悪性リンパ腫、白血病に対しては抗 CD20 抗体や抗 CCR-4 抗体が臨床応用され、その他の多くの抗体も治療薬として研究されているが、例えばホジキン病に適用される治療抗体は未だ存在せず、NK リンフォーマにいたっては抗がん剤、放射線をはじめ如何なる治療も奏功していないので更なる開発が必要である。

治療抗体の腫瘍細胞に対する細胞傷害の機序としては (1) マクロファージや NK 細胞を介した抗体依存性細胞傷害 ADCC (Antibody-dependent-cellular-cytotoxicity) や (2) 補体を介した補体依存性細胞傷害 CDC (Complement dependent cytotoxicity) とともに (3) 抗体が標的細胞に結合するだけで傷害する直接細胞死 Direct Cell Death が知られている。

特に Direct Cell Death としては Fas によるアポトーシスとともに非アポトーシスの存在も知られている。癌患者は癌そのもの、もしくは化学療法などによって免疫不全状態となっている場合も多く、其のため、抗体の抗腫瘍効果としては ADCC, 補体非依存性の Direct cell death が最も望ましい。

本研究申請者は、この非アポトーシスの Direct cell death について

Matsuoka S, et al. A novel type of cell death of lymphocytes induced by a mAb without participation of complement. *J. Exp. Med.* 1995; 181:2007.

Matsuoka S, et al. A mAb to the alpha 2 domain of murine MHC class I that specifically kills activated lymphocytes and blocks liver damage in the Con A hepatitis. *J. Exp. Med.* 2003; 198:497

などの論文で最初に抗体による補体非依存性、カスパーズ非依存性、つまりアポトーシス非依存性のリンパ球の細胞死について報告して来た。報告してきた抗体は MHC class I を認識してマウスのリンフォーマ細胞や活性化リンパ球を直接傷害することから、このたび、この研究を応用してヒトのリンフォーマ (まずはホジキンリンパ腫) を直接傷害する抗体の樹立を試みた。

2. 研究の目的

新規抗体医薬を創薬する。

特に造血器腫瘍に対して今までの常識的手法と全く異なる方法で治療抗体を樹立する。結果的に分子標的薬でなく、エピトープ標的薬としての治療抗体を樹立し臨床に供する。

そして抗体の導く非アポトーシス細胞死の機序を解明する

最初の試みとして Hodgkin Disease の治療抗体の樹立を目指した。Non-Hodgkin の B cell 系のリンフォーマに対しては、すでに抗 CD20 抗体が臨床応用されているが、ホジキン病 (H.D) に対する治療抗体はまだ実用化されていない状況にあったからである。樹立した抗 H.D. 傷害抗体は結果的には、H.D. ばかりでなくパーキットリンパ腫をはじめとする様々な悪性リンパ腫を直接傷害する抗体 (4713mAb と命名) を樹立することができた。しかも正常細胞 (B リンパ球やマクロファージなど) には結合するものの細胞傷害は起こさなかった。この抗体は pan MHC class II (HLA-DP, DQ, DR) を認識する抗体であることが判った。国際特許申請を大学と理化学研究所で共同申請しているが、まだ工業化には至っておらず、臨床に応用されるべく、まだまだ研究データを積増さなければならない。特に導く直接細胞死の機序については、まだ多くが不明である。これを明確にしていくことを第一の目的とする。

3. 研究の方法

(抗ホジキンリンパ腫抗体の樹立方法)

ホジキンリンパ腫 cell line の L428 細胞株と KM-H2 細胞株を細胞を生きたままの状態であジュバンなしに 2 週間おきに交互に BALB/c マウスに免疫した。3 ヶ月後このマウスの脾臓細胞とミエローマ細胞 P3U1 を PEG4000 を用いて細胞融合を行い、96well plate 60 枚に細胞を蒔いた。スクリーニングは免疫に使わなかった第 3 のホジキンリンパ腫細胞 L540 を傷害するかどうかを dye exclusion tested で行なった。具体的には 96 well plate に L540 細胞を蒔いておいてハイブリドーマの培養上清と trypan blue を添加して光学顕微鏡で細胞死を確認した。

(細胞傷害活性の測定)

細胞死はその後、FACS や走査型電子顕微鏡、多次元顕微鏡 (蛍光多重染色) を駆使して確認した。In vivo における細胞傷害活性は免疫不全マウスにパーキットリンパ腫を植えた担癌マウスに対する治療効果により判定した。

(細胞死の機序も解明機構)

カスパーズ、PI-3 kinase、ネクローシスなどの阻害剤、細胞骨格関連薬剤などを添加して解析した。この抗体の認識する分子の探索には peptide mass fingerprinting 解析で判定し、候補標的分子のトランスフェクタントとの結合をウエスタンブロットや FACS で確認した。

4713mAb のホジキンリンフォーマに導く細胞死においては走査型電子顕微鏡、多次元顕微鏡 (蛍光多重染色) なども駆使して観察し Deth Mechanism の解析の助けとした。ミトコンドリアの脱分極、カスパーズ、細胞骨格 ROS の細胞死への関与などを各種阻害剤を添加した細胞障害活性の測定、FACS、Western

Blottingなどで判定した。

4. 研究成果

[細胞傷害活性]

(in vitro)

こうして得られた抗体 4713mAb は結果的に免疫に用いた L428, KM-H2, とスクリーニングに用いた L540 などのホジキンリンフォーマのみならずパーキットリンパ腫や IL-2 independent で悪性度の高い成人 T 細胞白血病細胞に対して細胞障害活性を持つことを Dye exclusion test、FACS 解析で 2 時間で 40~90% 傷害することを確認した。NK リンフォーマ細胞に対しては結合するにも関わらず細胞傷害活性を全く有しなかった。Jurkat や MOLT-4 などの T 細胞系リンパ腫には結合せず、したがって細胞傷害活性は無かった。

Cytotoxic effect of 4713mAb on lymphoma/leukemia

Cell line	Cell type	%Cytotoxicity
L428	Hodgkin	92%/h
L540	Hodgkin	40%/h
KMH-2	Hodgkin	32%/12h
RAJI	Burkitt	51%/h
Daudi	Burkitt	56%/h
HT	B lymphoblast	68%/h
Jurkat	T lymphoma	0%/h
MOLT-4	ALL	0%/h
ED40815	ATL	69%/2h
ATL26c	ATL	0%
ATL 72/2	ATL	0%
ATL-55T	ATL	32%/2h
ATL-2	ATL	73%/2h

(ex vivo)

日本人に最も多い悪性リンパ腫である Difuse Large B cell lymphoma 患者の末梢血に 4713 抗体を添加し 20 分後に FACS 解析したところ少なくとも腫瘍細胞の 80% を傷害していることが判った。また健常人の末梢血の解析では、抗体はリンパ球に結合するものの全く細胞傷害活性を持っていないことが確認された。

(in vivo)

C.B-17/ICR-SCID マウスに Burkitt リンパ腫細胞を静脈注射し、5 日後に 1 回、もしくは 5 日後、12 日後の 2 回 4713 抗体を投与したところ、コントロール抗体投与群が 1 ヶ月前後で全て死滅したのに対し、4713 抗体投与群は長期生存することを Kaplan-Meier 生存曲線で示した。

(抗体の標的分子)

293T 細胞に HLA class II 分子である HLA-DP, DQ, DR をそれぞれトランスフェクトすると 4713 抗体と結合するようになることを FACS 解析で確認した。標的分子が pan HLA class II であることが判った。

[細胞傷害の機序]

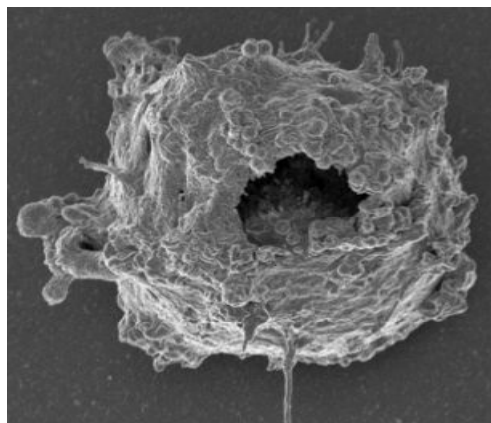
補体、ADCC、カスベース、ROS 非依存性であり、ミトコンドリアの脱分極も認められなかった。細胞傷害活性はサイトカラシン B、D およびラトウルンクリン B によってのみ阻止できたことから細胞骨格が細胞死に大きく寄与していることが判った。走査型電顕写真による観察から、細胞傷害において標的細胞表面上に巨大な穴が形成されていることが判り、この補体、カスベース、ROS 非依存性の細胞死を **アナポコーシス (Anapocosis)** と命名した。(Plos one 2016 11(3)).

またこのような抗体による直接細胞死においては Honey Church らが標的細胞の凝集が必須であるとしているが、single cell も細胞死に陥ることを光学顕微鏡で確認し、かつ、96 well 平底 plate に標的細胞を 0.3 個/well で蒔き、標的細胞が凝集し得ない状況で細胞死を確認したところ、傷害活性は全く毀損されることが無いことを確認した。標的細胞の凝集は細胞傷害活性の実験でしばしば観察されることではあるが、細胞傷害に必須の事象では無いことが判明した。

[形態学的観察]

[Large Pore Formation.]

ホジキンリンフォーマ細胞 L428 に 4713 mAb (mouse anti-pan HLA class II mAb) を加えて 20 分の電顕写真



補体やパーフォリンのあける穴の約 200 倍の径の穴が細胞表面に形成されている。穴の数は 1 個のこともあれば複数個のこともある。Rat anti-mouse Pan MHC class I mAb (RE2 mAb) がマウスのリンパ腫細胞や活性化リンパ球を補体、ADCC、カスベース非依存性に同様の巨大な穴をあけることによって傷害することを以前に発表している。

(Matsuoka S, et al. A novel type of cell death of lymphocytes induced by a monoclonal antibody without participation of complement. *J Exp Med.* 1995; 181: 2007-2015. PMID: 7759995)

Matsuoka S, et al. A monoclonal antibody to the alpha2 domain of murine major

histocompatibility complex class I that specifically kills activated lymphocytes and blocks liver damage in the concanavalin A hepatitis model. **J Exp Med.** 2003; 198: 497-503. PMID: 12885869)

かくして今回の研究で得た mouse anti-pan HLA class II mAb (4713 mAb)と以前に発表した Rat anti-mouse pan MHC class I mAb (RE2 mAb)は同様の機序で、同様な巨大な穴を標的細胞にあけることによってリンパ腫細胞を傷害することが示唆された。MHC 分子は抗原提示能が知られているが、Death Receptor でもあることが理解された。

なぜこれらアナポコーシス導入抗体がリンパ腫、白血病細胞を特異的に傷害し、結合するにもかかわらず、正常細胞、resting の細胞を傷害しないのかは今回も解明できなかった。

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Matsuoka S, Ishii Y, Nakao A, Abe M, Ohtsuji N, Momose S, Jin H, Arase H, Sugimoto K, Nakauchi Y, Masutani H, Maeda M, Yagita H, Komatsu N, Hino O. Establishment of a Therapeutic Anti-Pan HLA-Class II Monoclonal Antibody That Directly Induces Lymphoma Cell Death via Large Pore Formation. **PLoS One.**11(3):e0150496. doi: 10.1371/journal.pone.0150496. eCollection 2016. IF:2.806 CI:1 査読有り

2. Mizutani N, Abe M, Matsuoka S, Kajino K, Wakiya M, Ohtsuji N, Hatano R, Morimoto C, Hino O.: Establishment of anti-mesothelioma monoclonal antibodies. **BMC Res Notes.** 9:324. doi: 10.1186/s13104-016-2128-x. 2016 TF: 1.39 CI: 0 査読有り

5

〔学会発表〕(計 16 件)

1. Shuji Matsuoka, HOKIO Hino Cytolytic Anti-pan MHC class I and Class II mAbs Directly Induce Lymphoma Cell Death via Large Pore Formation without Complement The 5th JCA-AACR Special Joint Conference July 13-15, 2016 Mihama
2. Shuji Matsuoka et al. Establishment of a therapeutic anti-pan HLA-class II monoclonal antibody that directly induces lymphoma cell death via large pore formation. ICI 2016 International Congress of Immunology Melbourne Australia 2016 26 August
3. 松岡周二 抗汎 HLA class II 抗体はリン

パ腫細胞、ATL 細胞、患者 DLBCL 細胞をアナポコーシスで殺す 第 23 回福岡血液研究会 (招待講演) 2016 年 11 月 11 日

4. 松岡周二 Cell Death of activated lymphocytes and lymphoma/leukemia cells induced by MHC class I and II mAbs (Anapocosis) 抗体医薬開発の新しい戦略(シンポジウム)第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 19 日
5. Matsuoka Shuji, etc. Anapocosis : Direct cell death of lymphoma cells induced by mAbs 第 46 回日本免疫学会 仙台 2017 年 12 月 12 日~14 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 抗 CD 10 抗体
発明者: 水谷、安部、松岡、大辻、羽多野、樋野
権利者: 順天堂大学、日本抗体医薬株式会社
種類: PCT
番号: /JP2017/023104
出願年月日: 2017 年 6 月 22 日
国内外の別: 米国

取得状況(計 1 件)

名称: MHC クラス II を発現する悪性腫瘍の治療薬
発明者: 松岡周二、石井保之
権利者: 順天堂大学、理化学研究所
番号: 第 5884139 号(日本出願番号: 特願 2012-537723)
取得年月日: 2016 年 2 月 19 日
米国出願番号: 13 / 87784
取得年月日: 2016 年 4 月 5 日 Therapeutic agent for malignant tumor expressing MHC class II
国内外の別: 上記日米の特許は同じもの

〔その他〕

新聞など掲載 34
1 新規作用機序による悪性リンパ腫治療抗体樹立 順天堂大学 がん細胞に穴を開けて破壊 効果的な治療薬開発に期待 科学新聞社 2016 年 4 月 15 日 科学新聞 4 面
2 順天堂大学 悪性リンパ腫の治療抗体を樹立 がん細胞に大きな穴をあけて破壊する 旺文社 大学受験パスナビ 2016 年 5 月 10 日
3 お役立ち 押さえておきたい今週の医療系 ニュースベスト 5! 順天堂大、血液がん細胞に穴をあけて死滅させる抗体を樹立 マイナビ マイナビ RESIDENT (2016 年 4 月 6 日 ~ 4 月 12 日)

4 順天堂大学 悪性リンパ腫の治療抗体を樹立 がん細胞に大きな穴をあけて破壊する
順天堂大学研究推進センター、順天堂大学文書広報課 順天堂大学プレスリリース
新規の作用機序による悪性リンパ腫治療抗体の樹立 産経新聞産経新聞 4月6日 SankeiBiz

5 血液がん、薬の開発加速 順天堂大・理研 白血病向け化合物 2016年4月15日 日経産業新聞

製薬開発

大和証券系ファンド、日生キャピタルなどの出資により日本抗体医薬株式会社が 2016年に設立され、4713 mAb をはじめとするアナポコーシス抗体の製薬化を目指して開発を進めている。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松岡 周二 (MATSUOKA, Shuji)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20286743

(2)研究分担者

小松 則夫 (KOMATSU, Norio)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：50186798

(3)研究協力者

安部雅明 (ABE, Masaaki)

順天堂大学・医学部・技師

豊田 穠子 (TOYOTA, Tokuko)

順天堂大学・医学部・協力研究員