

令和元年6月5日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04714

研究課題名(和文) ヒト化抗体とCD26の核内移行によるRNAポリメラーゼII標的抗がん療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapy against human cancers using intra-nuclear transportable humanized monoclonal antibody against CD26.

研究代表者

山田 健人 (YAMADA, TAKETO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：60230463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：CD26は多種類のヒトがんにおいて高発現している。これまでに開発したがん細胞の核内へ移行可能なヒト化抗CD26モノクローナル抗体を用いて、RNAポリメラーゼII阻害分子を結合することで、Antibody-Drug Conjugate (ADC) の合成し、その抗がん活性を明らかにした。本ADCは通常の免疫機構を介した抗がん作用のみならず、増直接的な抗がん作用を介することで相加・相乗的な効果が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの分子標的療法では、少ない副作用で高い抗がん効果を発揮することが期待される。本研究では、がん細胞核内へ移行可能なヒト化抗体に、これまで毒性が強く使用不可であった抗がん剤を結合させた抗体-薬剤複合体の合成に成功した。がんには多様性があり薬剤耐性や治療抵抗性の原因と考えられているが、本分子は、複数の抗がん分子機構を介して効果を発揮するため、薬剤耐性や治療抵抗性を乗り越える抗腫瘍効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel Antibody-Drug Conjugate (ADC), Y-TR-1, with the humanized anti-CD26 monoclonal antibody YS110 and triptolide (TR-1), an inhibitor for TFIIH (a general transcription factors for RNA polymerase II (Pol II)). YS110 has an inhibitory activity against CD26-positive tumor growth via immunological and direct pathway, such as an induction of intra-nuclear transportation of CD26 and YS110, and a suppressed transcription of Pol II subunit POLR2A by nuclear CD26. Y-TR1 showed significant cytotoxicity against CD26-positive cell lines but not CD26-negative cell lines in a dose-dependent manner via significant suppression of mRNA synthesis caused by impairment of RNA polymerase II activity. The tumors in xenografted mice administered Y-TR1 was smaller than that of mice treated with unconjugated YS110 without severe toxicity. In conclusion, the novel compound Y-TR1 showed antitumor properties against CD26-positive cancer cell lines both in vitro and in vivo without toxicity.

研究分野：病理学

キーワード：抗体療法 Antibody-Drug Conjugate CD26 核移行 RNAポリメラーゼII

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

1. 研究開始当初の背景

これまでに広汎なヒトがんにおいて、CD26 が細胞表面に高発現していることを報告してきた()。特に肺腺癌、中皮腫、前立腺癌、肝癌、腎癌、大腸癌では、それぞれ 80, 85, 95, 88, 70, 45%の症例で CD26 が陽性である。CD26 は正常組織では一部の T リンパ球や血管内皮細胞、メラノサイトなどで発現が見られるが、がんの場合、より広汎に高い発現が認められる。そこで、これまでにヒト化抗 CD26 モノクローナル抗体を開発し、この抗体が CD26 陽性がん細胞に対して、in vitro/in vivo において抗がん作用を発揮することを明らかにしてきた()。また本抗体は、フランスにて第 I 相臨床試験が 2015 年に終了しており、安全性が確認され、中皮腫症例 23 例中 11 例で stable disease が最長 6 ヶ月間得られている()。

またヒトがん細胞において CD26 が核内に存在していることを見出し()、この CD26 と抗 CD26 ヒト化モノクローナル抗体が、がん細胞の膜表面において抗原・抗体複合体を形成後に、カベオリン系エンドサイトーシスにより細胞質に移動し、さらにこの複合体が 1 時間以内に核内に移行することを明らかにした。さらに核輸送された CD26 は、RNA ポリメラーゼ II のサブユニット A の一つである POLR2A の転写抑制を通じて、がん細胞の増殖抑制を引き起こすことを報告した()。一方、正常ヒト T リンパ球や血管内皮細胞にも CD26 発現はあるが、抗体による増殖抑制はなく、CD26 と抗体の核移行も認められないことから、この核内移行は、がん細胞特異的と考えられた()。最近、本抗体に数種類のリンカーを介して抗がん分子を結合させることで、抗がん分子を核内で効率よく作用させ、がん細胞の増殖を抑制する方法の開発に成功した。一方、Liu らは、ヒトがんにおいて、がん抑制遺伝子 p53 近傍に存在する RNA ポリメラーゼ II のサブユニット A の一つ POLR2A 遺伝子がヘテロ欠失することを示し、これらの欠失を持つがん細胞では POLR2A 阻害剤に約 10 倍も高感受性であることを明らかにし、RNA ポリメラーゼ II が新たながんの分子標的療法のターゲットとなることを報告して注目を集めている()。しかし RNA ポリメラーゼ II は全てのヒト細胞で発現があり、mRNA を合成するのに必須なため、amanitin 等の RNA ポリメラーゼ II 阻害剤は、極めて毒性が強く、化学療法には用いることができなかった。そこで本研究では、多種類のがん細胞に広く高発現している CD26 を細胞表面での第一の標的として捉え、さらに核内 RNA ポリメラーゼ II を第二の標的として、本抗体と RNA ポリメラーゼ II 阻害剤の結合分子の核内移行による新規 Antibody-Drug Conjugate (ADC) 分子標的療法を開発することとなった。

2. 研究の目的

がん細胞に広く発現する CD26 が抗 CD26 ヒト化モノクローナル抗体とともに細胞膜から核内に輸送されること、CD26 が RNA ポリメラーゼ II のサブユニット A の一つである POLR2A の転写抑制をすることから、がん細胞における CD26 および抗体の核輸送と POLR2A 転写抑制のメカニズムを明らかにするとともに、POLR2A 遺伝子欠失のあるがん組織を簡便にスクリーニングするバイオマーカーを探索し、最終的に RNA ポリメラーゼ II 阻害分子を本抗体に結合させた ADC を開発し、CD26 を介してがん細胞の核へ移行し安全で高効率な分子標的療法を開発した。実際には以下 1) ~ 3) を行った。

- (1) がん細胞における CD26 と抗体の核輸送と POLR2A 転写抑制の分子機構の解明
- (2) がん組織検体における POLR2A 遺伝子欠失と相関するバイオマーカーの開発
- (3) 本抗体と RNA ポリメラーゼ II 阻害剤の結合による分子標的療法の開発

3. 研究の方法

- (1) がん細胞における CD26 と抗体の核輸送と POLR2A 転写抑制の分子機構の解明

a. がん細胞の核抽出成分・細胞質成分から CD26 の免疫沈降を行い、CD26 と結合している蛋白質を単離し、質量分析およびアミノ酸配列決定し、核移行シグナルを有するものを候補として、免疫沈降により CD26 との会合を検証した。この際、核輸送されない欠失型 CD26 分子のみを発現する細胞抽出成分での免疫沈降の結果と比較し、核輸送される CD26 と共沈する分子を最終候補とした。

b. CD26 / 抗体複合体とがん細胞核内で会合する分子を同定するために、CD26 をベイトとして two-hybrid 法にて探索した。ライブラリーは、CD26 / 抗体の核輸送効率が高いヒト中皮腫細胞株 JMN と CD26 / 抗体の核輸送が見られないヒト血管内皮細胞の 2 つを用いた。候補分子について、免疫沈降法により CD26 との会合を検証した。

- (2) がん組織検体における POLR2A 遺伝子欠失と相関するバイオマーカーの開発

p53・POLR2A 遺伝子ともに野生型と両遺伝子ヘテロ欠失型の大腸癌細胞株を免疫不全マウスへ移植し形成された腫瘍を用いて、RNA ポリメラーゼ II 構成分子群(RBP1(POLR2A), RBP2 - 12) および基本転写因子群(TFIIA, B, D, F, H)の免疫染色を行い、p53・POLR2A ヘテロ欠失がん組織における POLR2A 遺伝子欠失のマーカーを検討した。

- (3) 本抗体と RNA ポリメラーゼ II 阻害剤の結合による分子標的療法の開発

a. RNA ポリメラーゼ II 阻害を目的として、基本転写因子阻害分子(triptolide) () をヒト化抗 CD26 モノクローナル抗体へ結合させ ADC を開発した。抗体に結合しうる SH 基を付加する

ために SMCC, GMBC, SPDP などをもとに改変したリンカーを用いた。得られた結合分子は、アフィニティカラムにて精製し、精製した結合分子について安定性を試験管内およびマウス体内で検討した。

b. 精製結合体 ADC について、質量分析により抗体 1 分子あたりの阻害剤の結合数を測定するとともに、抗体価をフローサイトメーターで検討した。

c. 肝癌細胞株 Li-7 (CD26 陰性) とそのヒト CD26 発現ベクター導入 Li-7 (CD26 陽性)、中皮腫細胞株 JMN (CD26 陽性)、中皮腫細胞株 MSTO (CD26 陰性) とそのヒト CD26 発現ベクター導入 MSTO (CD26 陽性)、T 細胞白血病細胞株 Jurkat (CD26 陰性) とそのヒト CD26 発現ベクター導入 Jurkat (CD26 陽性) を用い、正常ヒト細胞としては、市販のヒト臍帯静脈内皮細胞 (CD26 陽性)、線維芽細胞 (CD26 陰性) および申請者の末梢血 T リンパ球 (CD26 陽性あるいは陰性分画) を用いて ADC の活性を WST-1 アッセイにて検討した。

d. 免疫不全 NOG マウスの皮下組織へのヒトがん細胞異種移植系において、ADC の抗腫瘍効果を細胞増殖能や細胞死について定量解析した。

4. 研究成果

(1) がん細胞における CD26 と抗体の核輸送と POLR2A 転写抑制の分子機構の解明

ヒト肝癌細胞株 HCC-1 およびヒト肺腺癌細胞株 A549 の核抽出成分・細胞質成分から CD26 の免疫沈降を行い、CD26 と結合している蛋白質を単離し、質量分析およびアミノ酸配列決定した。その中から核移行シグナルを有するものを候補として、免疫沈降により CD26 との会合を検証し、Transportin 1、Importin 7、NUP214 を見出した。また POLR2A 転写調節領域で CD26 と会合する分子として RanBP1 を見出した。

(2) がん組織検体における POLR2A 遺伝子欠失と相関するバイオマーカーの開発

p53・POLR2A 遺伝子ともに野生型と両遺伝子ヘテロ欠失型大腸癌細胞株由来腫瘍で、RNA ポリメラーゼ II 構成分子群 (RBP1 (POLR2A), RBP2 - 12) および基本転写因子群 (TFIIA, B, D, F, H) に対する抗体を用いた免疫染色を行い、p53・POLR2A ヘテロ欠失がん組織における POLR2A 遺伝子欠失のマーカーを検討した。その結果、TFIIH など候補分子を選別した。現在、これらの分子群が、バイオマーカーとなりうるか、検討している。

(3) 本抗体と RNA ポリメラーゼ II 阻害剤の結合による分子標的療法の開発

RNA ポリメラーゼ II 阻害を目的として、基本転写因子阻害分子 (triptolide 誘導体 TR-1)

をヒト化抗 CD26 モノクローナル抗体へ結合

させ ADC を合成した (図 1)。精製 ADC について、

質量分析により抗体 1 分子あたりの阻害剤の結合数を測定するとともに、抗体価をフローサイトメーターで検討した。その結果、抗体 1 分子あたり、TR-16-7 分子が結合していること、CD26 への結合活性は YS110 とほぼ同程度であった。

この ADC の試験管内での抗がん作用を観察したところ、CD26 発現に依存性に細胞殺傷作用が認められ、その効果は量依存性が明らかであった (図 2)。

一方、正常ヒト細胞 (ヒト臍帯静脈内皮細胞 (CD26 陽性)、線維芽細胞 (CD26 陰性) およ

び末梢血 T リンパ球 (CD26 陽性あるいは陰性分画)) では、CD26 発現細胞においても細胞殺傷作用は認められなかった。

またこの Y-TR1 のがん細胞への抗増殖作用は、熱刺激後の HSP70 mRNA 発現誘導を指標としたアッセイにより、RNA ポリメラーゼ II 発現阻害によるものであることが判明した。本 ADC の生体内での抗腫瘍効果を明らかにするために、ヒトがん細胞の免疫不全マウスへの異種移植系を用い検討したところ、CD26 発現に依存して Y-TR1 投与群で有意な腫瘍の縮小が認められ、その腫瘍組織における MIB-1 index の減少が認められた (図 3)。なおこれらのマウスでは、全身臓器を組織学的に観察したが、臓器障害が明らかでなかった。

これまでのがん細胞特異的に細胞表面から核内に効率よく分子を輸送するシステムはない。本ヒト化抗体は、細胞表面 CD26 に反応してから 1 時間で 5-20% が CD26 と伴に核内へ移行するため、細胞外部から核へ物質を輸送しうる。またヒト内皮細胞や T リンパ球等の正常細胞では、CD26 と抗体の細胞質への移行はあるものの、核への移行は見られないことから、がん細胞特異的に抗がん剤等の分子を核内へ輸送できる利点がある。さらに本抗体は CD26 の核移行と核内での CD26 による POLR2A 転写抑制だけでなく、p21/CIP1 や p27/KIP1 発現を抑制し、がん細胞増殖を直接抑制するとともに、抗体・補体依存性細胞傷害を介した免疫学的な抗がん作用があり、これらの多種多段階での効果が相乗・相加作用となることが期待される () (図 4)。

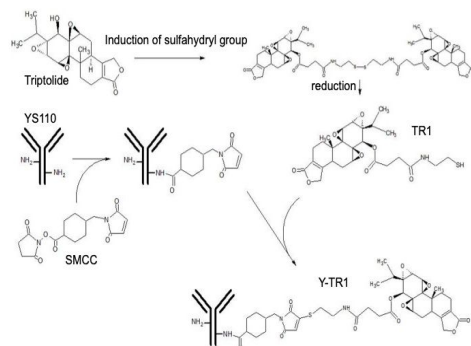


図1 YS110と基本転写因子阻害分子(triptolide)の結合

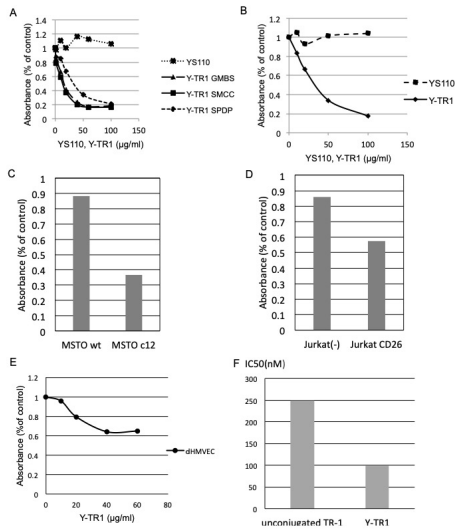


図2 Y-TR1の細胞殺傷作用(WST-1 assay)

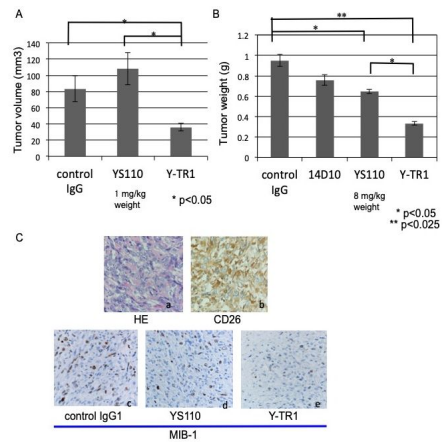


図3 Y-TR1のin vivo抗腫瘍作用

さらに本抗体は CD26 の核移行と核内での CD26 による POLR2A 転写抑制だけでなく、既に報告してきたように p21/CIP1 や p27/KIP1 発現を抑制し、がん細胞増殖を直接抑制するとともに、抗体・補体依存性細胞傷害を介した免疫学的な抗がん作用があり、これらの多種多段階での効果が相乗・相加作用となることが期待される() (図 4)。RNA ポリメラーゼ II は、ヒト細胞での mRNA 合成に必須で、その阻害剤 α -amanitin は毒性が強く使用は難しいと考えられてきた。一方、ヒトがんにおいて、p53 遺伝子近傍の RNA ポリメラーゼ II サブユニット POLR2A 遺伝子が p53 遺伝子とともにヘテロ欠失し、これらのがん細胞では α -amanitin に約 10 倍高感受性であることが報告された()。本ヒト化抗 CD26 抗体は細胞膜 CD26 を核へ移行させ、POLR2A 転写抑制をすることから、RNA ポリメラーゼ II 阻害剤を本抗体へ結合させた ADC は、転写と蛋白質機能の両面で RNA ポリメラーゼ II 機能を低下させる。また HER2 等の細胞膜分子抗体を基盤とした ADC とは異なり、本 ADC が細胞内のみならず核内へ輸送されるため、より低い阻害剤濃度での治療が可能となる点で優れている(図 4)。

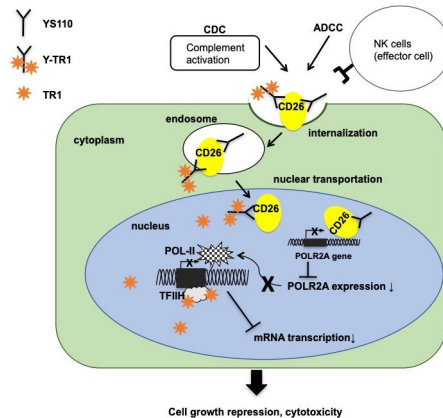


図4 Y-TR1のCD26・POL IIを標的とした抗腫瘍作用機序

5. 引用文献

- Havre PA, Abe M, Urasaki Y. et al. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front Biosci.* 2008; 13: 1634-1645.
- Inamoto T, Yamada T, Ohnuma K. et al. Humanized anti-CD26 monoclonal antibody as a treatment for malignant mesothelioma tumors. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 4191-4200.
- Aoe K, Amatya VJ, Fujimoto N. et al. CD26 overexpression is associated with prolonged survival and enhanced chemosensitivity in malignant pleural mesothelioma. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18: 1447-1456.
- Amatya VJ, Takeshima Y, Kushitani K. et al. Overexpression of CD26/DPPIV in mesothelioma tissue and mesothelioma cell lines. *Oncol. Rep.* 2011; 26: 1369-1375.
- Inamoto T, Yamochi T, Ohnuma K. et al. Anti-CD26 monoclonal antibody-mediated G1-S arrest of human renal clear cell carcinoma Caki-2 is associated with retinoblastoma substrate dephosphorylation, cyclin-dependent kinase 2 reduction, p27(kip1) enhancement, and disruption of binding to the extracellular matrix. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 3470-3477.

Yamada K, Hayashi M, Du W. et al. Localization of CD26/DPPIV in nucleus and its nuclear translocation enhanced by anti-CD26 monoclonal antibody with anti-tumor effect. *Cancer Cell Int.* 2009; 9:17. doi: 10.1186/1475-2867-9-17.

Yamada K, Hayashi M, Madokoro H. et al. Nuclear Localization of CD26 Induced by a Humanized Monoclonal Antibody Inhibits Tumor Cell Growth by Modulating of POLR2A Transcription. *PLoS One* 2013; 8(4):e62304. doi: 10.1371/journal.pone.0062304.

Angevin E, Spitaleri G, Rodon J. et al. First-in-human phase 1 of YS110, a monoclonal antibody directed against CD26 in advanced CD26-expressing cancers. *British Journal of Cancer* 2017; 116: 1126-1134.

Liu Y, Zhang X, Han C, Wan G, Huang X, Ivan C, et al. TP53 loss creates therapeutic vulnerability in colorectal cancer. *Nature* 2015; 520 (7549): 697-701.

Titov DV, Gilman B, He QL. et al. XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide. *Nat Chem Biol.* 2011; 7 (3): 182-188.

Hayashi M, Madokoro H, Yamada K. et al. A humanized anti-CD26 monoclonal antibody inhibits cell growth of malignant mesothelioma via retarded G2/M cell cycle transition. *Cancer Cell Int.* 2016; 16:35.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Nishida H, Hayashi M, Morimoto C, Sakamoto M, Yamada T. CD26 is a potential therapeutic target by humanized monoclonal antibody for the treatment of multiple myeloma. *Blood Cancer Journal* 8:99, 2018 DOI:10.1038/s41408-018-0127-y 査読有

Okamoto T, Yamazaki H, Hatano R, Yamada T, Kaneko Y, Morimoto C, Ohnuma K. Targeting CD26 suppresses proliferation of malignant mesothelioma cell via downmodulation of ubiquitin-specific protease 22. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 504(2):491-498, 2018 doi:10.1016/j.bbrc.2018.08.193. 査読有

Komiya E, Hatano R, Otsuka H, Itoh T, Yamazaki H, Yamada T, Dang NH, Tominaga M, Suga Y, Kimura U, Takamori K, Morimoto C, Ohnuma K. A possible role for CD26/DPPIV enzyme activity in the regulation of psoriatic pruritus. *Journal of Dermatological Science* 86(3):212-221, 2017 doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.03.005. 査読有

Angevin E, Isambert N, Trillet-Lenoir V, You B, Alexandre J, Zalzman G, Vielh P, Farace F, Valleix F, Podoll T, Kuramochi Y, Miyashita I, Hosono O, Dang NH, Ohnuma K, Yamada T, Kaneko Y, Morimoto C. First-in-human phase 1 of YS110, a monoclonal antibody directed against CD26 in advanced CD26-expressing cancers. *British Journal of Cancer* 116:1126-1134, 2017 doi: 10.1038/bjc.2017.62 査読有

Hayashi M, Madokoro H, Yamada K, Nishida H, Morimoto C, Sakamoto M, Yamada T. A humanized anti-CD26 monoclonal antibody inhibits cell growth of malignant mesothelioma via retarded G2/M cell cycle transition. *Cancer Cell Int.* 16:35, 2016 doi: 10.1186/s12935-016-0310-9. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

Yamada T, Madokoro H, Yamada K, Nishida H, Morimoto C, Sakamoto M, Hayashi M. Anti-CD26 Humanized Monoclonal Antibody Conjugated To Triptolide Inhibits Mesothelioma Cell Growth Via Transportation Into Nucleus And Impaired RNA Polymerase II. The 6th JCA-AACR Special Joint Conference, The Latest Advances in Lung Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics, July 10-12, 2018 (Kyoto Tokyu Hotel, Kyoto, Japan)

Yamada T, Madokoro H, Yamada K, Nishida H, Morimoto C, Sakamoto M, Hayashi M. Anti-CD26 humanized antibody-triptolide conjugate moves into nucleus and impairs RNA polymerase II. 第107回日本病理学会総会 札幌・ロイトン札幌 2018年6月21日

(木) ~ 23日(土)

Nishida H, Hayashi M, Morimoto C, Sakamoto M, Yamada T. Humanized anti-CD26 monoclonal antibody, YS110, has anti-myeloma efficacy for the treatment of high-risk multiple myeloma. The 59th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. Atlanta, GA, USA, December 9-12, 2017

Yamada T, Madokoro H, Nishida H, Morimoto C, Sakamoto M, Hayashi M. Anti-CD26 humanized monoclonal antibody conjugated to triptolide is transported into nucleus and impairs RNA polymerase II. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日(水) ~ 9日(土) 神戸ポートアイランド (神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場、神戸商工会議所)

Yamada T, Madokoro H, Yamada K, Nishida H, Morimoto C, Sakamoto M, Hayashi M. Anti-tumor effects of humanized anti-CD26 monoclonal antibody against hepatocellular carcinoma. 第106回日本病理学会総会 東京・新宿プラザホテル 2017年4月27日(木) ~ 29日(土)

〔図書〕(計2件)

Ohnuma K, Hatano R, Komiya E, Ito T, Iwao N, Kaneko Y, Yamada T, Dang NH, Morimoto C. A NOVEL ROLE OF CD26/DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV IN THERAPEUTIC TARGET ON IMMUNE DISORDERS AND CANCERS. Front Biosci. 23:1754-1779, 2018 PMID:29772527 査読有
Hatano R, Ohnuma K, Yamada T, Okamoto T, Komiya E, Otsuka H, Itoh T, Yamazaki H, Iwao N, Kaneko Y, Dang NH, Morimoto C. The Use of the Humanized Anti-CD26 Monoclonal Antibody YS110 as a Novel Targeted Therapy for Refractory Cancers and Immune Disorders. Advances in medicine and biology Vol.129, pp1-45, 2018 Ed. Berhardt LV, Nova biomedical, New York, Nova Science Publishers 査読有

〔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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 林 睦

ローマ字氏名: (HAYASHI, mutsumi)

所属研究機関名: 慶應義塾大学

部局名: 医学部病理学教室

職名: 助教

研究者番号(8桁): 60327575

研究分担者氏名: 西田浩子

ローマ字氏名: (NISHIDA, hiroko)

所属研究機関名: 慶應義塾大学

部局名: 医学部病理学教室

職名: 助教

研究者番号(8桁): 80317130

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 山田幸司

ローマ字氏名: (YAMADA, koji)