

令和 3 年 10 月 18 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07193

研究課題名(和文) Glypican-1を標的とした抗体薬物複合体による食道癌新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development antibody-drug conjugate targeting glypican-1 for novel therapy of esophageal squamous cell carcinoma.

研究代表者

世良田 聡 (SERADA, Satoshi)

高知大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：50463302

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)：食道癌など難治性癌の新規癌抗原としてGlypican-1(GPC1)を同定し、細胞内侵入活性の高い抗GPC1モノクローナル抗体を作成した。本抗体にチューブリン重合阻害剤を結合した抗体薬物複合体(ADC)を作成し、その有用性を解析した。GPC1-ADCはGPC1陽性の食道癌細胞株に対して細胞増殖阻害活性を示したが、GPC1ノックアウト細胞株に対しては発揮しなかった。GPC1陽性の食道癌PDXを用いてin vivoでの薬効を解析した結果、GPC1-ADCは投与量依存的な抗腫瘍効果を発揮し、体重減少も認められなかったことから、GPC1-ADCの有効性と安全性が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者らのこれまでの研究によりGlypican-1を高発現する食道癌は有意に予後不良であることが確認されていた。本研究によりGlypican-1を標的とした抗体薬物複合体が食道癌モデルマウスに対して優れた有効性と安全性を示し、in vitroでGPC1発現特異的な薬効を確認したことから、進行期や再発などの難治性食道癌に対してGPC1-ADCが有効な新規治療法となり得ることが示唆された。Glypican-1を発現する食道癌以外の様々な癌に対しても有効性を示す可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Glypican-1(GPC1) was identified as a novel cancer antigen of intractable cancer including esophageal cancer by our group. We successfully developed anti-GPC1 monoclonal antibody with high intracellular internalizing activity specific to GPC1 expressing cells (Matsuzaki S, Naka T et al., IJC 2018). We conjugated anti-GPC1 monoclonal antibody with potent tubulin polymerization inhibitor and investigated the usefulness of antibody-drug conjugate (ADC) recognizing GPC1. GPC1-ADC inhibited the growth of GPC1 positive esophageal cancer cell lines, however, failed to inhibit GPC1 knockout esophageal cancer cell lines. We successfully developed GPC1 positive esophageal cancer PDX mice. GPC1-ADC dose dependently showed anti-tumor effect to esophageal cancer PDX mice with no weight loss. Our data suggest the efficacy and safety of GPC1-ADC to esophageal cancer.

研究分野：分子生物学

キーワード：抗体療法 食道癌

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

食道癌の治療成績は手術手技等の向上に加え、化学療法の進歩により改善しつつあるものの、Stage II・IIIの食道癌に術前化学療法を施行し切除した症例でも5年生存率はわずか55%であり、進行食道癌の治療成績は未だ低いというのが現状である(Ando *et al.* Ann Surg Oncol. 2012)。そのため、食道癌の治療成績の向上には新規治療法の開発が急務である。近年、癌に対する分子標的治療薬の開発が著しく、癌抗原を特異的に標的とする抗体医薬品の開発も積極的に進められている。乳癌や胃癌のような難治性の固形腫瘍においても Her2 を標的とする Herceptin などが開発され、優れた治療成績を示し、実用化されている(Slamon, *et al.*, N Engl J Med 2001)。さらに、抗体医薬の薬効と安全性を高める方法として癌抗原を認識するモノクローナル抗体にリンカーを介して抗癌剤をコンジュゲートした抗体薬物複合体(antibody-drug conjugate; ADC)の開発も進んでいる。ADC はモノクローナル抗体により抗癌剤を癌組織に特異的に輸送することで、抗癌剤の有効性と安全性を向上させることが期待されている。

上記背景より、研究代表者は食道癌の新規治療法を開発するため、細胞膜タンパク質を定量的プロテオーム解析することで、食道癌の新規癌抗原を探索し、食道癌抗原候補分子として Glypican-1(GPC-1)を同定した(Hara *et al.*, BrJC 2016)。GPC-1 は膜結合型ヘパリン硫酸プロテオグリカン的一种であり、ヘパリン結合増殖因子に分類される増殖因子を細胞膜に濃縮し各種リガンドによる特異的な受容体への刺激を増強する共役受容体として機能する(Häcker *et al.*, Nat Rev Mol Cell Biol. 2005)。免疫組織化学染色の結果、GPC-1 は正常食道組織では発現が低く、食道癌原発組織に高発現するだけでなく、リンパ節転移部位においても GPC-1 の高発現が認められた。そのため、GPC-1 を標的とした抗体医薬は原発腫瘍のみならず、転移組織での GPC-1 に対しても抗腫瘍効果が期待される。本研究では、食道癌に対する GPC1 を標的とした抗体薬物複合体を開発し、その有効性を解明することとした。

### 2. 研究の目的

すでに研究代表者は独自に開発した Glypican-1 に対するモノクローナル抗体を開発済みである。本研究の目的は、抗 GPC1 抗体医薬品の薬効増強を目指して ADC を作成し、食道癌に対する有効性の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞株

食道癌細胞株(TE8 細胞、TE14 細胞)は RIKEN BRC より入手した。TE8-GPC1 ノックアウト(TE8-GPC1 KO)株は Sigma 社 HS000025842, GPC1CMVCas9GFP を用いて作成した。これらの細胞は RPMI1640 + 10% FBS + 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin を用いて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で培養した。

#### (2) FACS による GPC1 発現解析

細胞は PBS(-) (Nacalai Tesque) で 2 回洗浄し、0.02% EDTA 溶液(Nacalai Tesque)でディッシュからのはがした。細胞を FACS staining buffer (PBS(-) + 1% FBS + 0.1% sodium azide) で 2 回洗浄し、GPC1 に対する特異的抗体で染色し、続いて 200 倍希釈した Goat Anti-Mouse IgG (H+L chain specific, southernbiotech 社)で染色した。染色した細胞は FACS Canto II cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)で測定し、FlowJo software (Tree Star, Stanford, CA, USA)を用いてデータ解析した。

#### (3) GPC1-ADC の作成

C3H マウスに市販のリコンビナントヒト GPC1 タンパク質を免疫し、マウス抗 GPC1 モノクローナル抗体を樹立した。得られた抗体が GPC1 と反応する事を FACS により確認し、インタナライズ活性の高いクローン(01a033)を得た(Matsuzaki *et al.*, IJC, 2018)。抗 GPC1 抗体(clone 01a033)およびアイソタイプコントロール抗体(mouse IgG2a, clone MOPC-173, BioLegend)を用いて ADC の作成を行った。還元剤として TCEP を用いて抗体を部分的に還元し、チューブリン重合阻害剤を、切断型リンカーを介して抗体にコンジュゲートし、GPC1-ADC および control-ADC を製造した。薬物抗体比 (DAR) は GPC1-ADC は 3.4、control-ADC は 3.5 であった。

#### (4) *in vitro* ADC アッセイ

*in vitro* ADC アッセイは 96 ウェルホワイトプレート (Thermo Fisher Scientific 社)を用いて実施した。細胞を 10% FBS 含有培地で 1,500 あるいは 2,000 cells/well(90 µl/well)で播種した。翌日、ADC を 10 µl 添加し、144 時間、37 度、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、CellTiter-Glo® Luminescence Cell Viability Assay 試薬(promega)を用いて細胞増殖阻害性を評価した。

#### (5) 食道癌 PDX マウスを用いた GPC1-ADC の *in vivo* での薬効解析

食道癌手術組織を超免疫不全マウス(NOG)の皮下に移植することで、食道癌 PDX マウスを開発した。腫瘍組織における GPC1 の発現が陽性であることを免疫組織化学染色法にて確認した。腫瘍組織を NOG マウスに移植することで継代し、腫瘍組織が 100mm<sup>3</sup>に達した時点で 3 群に分け、

PBS、3mg/kg GPC1-ADC、10 mg/kg GPC1-ADC の3種類の投与群に分け、4日おきに計4回、静脈内投与した。腫瘍体積(長径 x 短径 x 短径 x 0.5)とマウスの体重を計測した。

#### 4. 研究成果

##### (1) GPC1 の発現解析

食道癌細胞株 TE8 および TE14 における GPC1 の発現を FACS により解析した。その結果、TE8、TE14 いずれも GPC1 の発現が陽性であった(図 1)。また、CRISPR/Cas9 システムを用いて作成した TE8-GPC1 KO 細胞は GPC1 発現が陰性であることが確認された(図 1)。

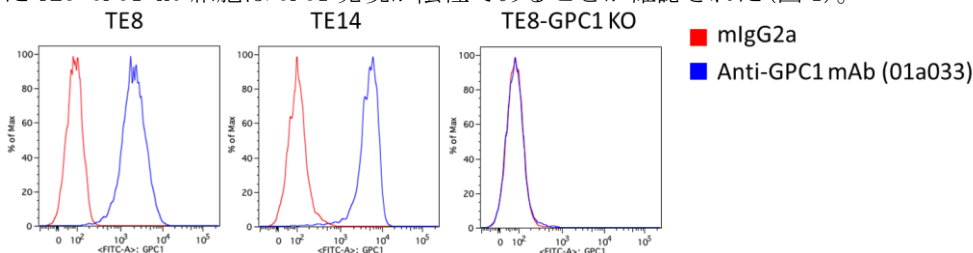


図.1 FACS による食道癌細胞株における GPC1 の発現解析

##### (2) *in vitro* ADC assay

TE8、TE14、TE8-GPC1 KO を用いて GPC1-ADC を用いた *in vitro* ADC assay を実施した。その結果、GPC1 陽性の TE8、TE14 細胞に対して GPC1-ADC は  $IC_{50}$  値で 1 nM 以下の細胞増殖阻害活性を発揮したが、GPC1 陰性の TE8-GPC1 KO 細胞に対して細胞増殖阻害活性を全く示さなかった。これらの結果、GPC1-ADC は GPC1 発現特異性を示すことが確認された。

##### (3) *in vivo* における GPC1-ADC の薬効解析

*in vivo* での薬効試験として、独自に開発した食道癌 PDX マウスを用いて検討した。食道癌 PDX を用いて、PBS(-)、GPC1-ADC (3mg/kg, 10mg/kg) の3群に分けて試験を行った。その結果、薬効試験では、PBS(-)投与群と比較して、GPC1-ADC は投与量を 3mg/kg、10mg/kg と増量すると薬効も強く見られたため、投与量依存的な抗腫瘍効果が確認された。GPC1-ADC 投与による体重減少も認められなかったことから、GPC1-ADC の有効性と安全性が確認された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Anti-glypican-1 antibody-drug conjugate exhibits potent preclinical antitumor activity against glypican-1 positive uterine cervical cancer.

Matsuzaki S, Serada S, Hiramatsu K, Nojima S, Matsuzaki S, Ueda Y, Ohkawara T, Mabuchi S, Fujimoto M, Morii E, Yoshino K, Kimura T, Naka T.

*Int J Cancer*. 2018 Mar 1;142(5):1056-1066. doi: 10.1002/ijc.31124. Epub 2017 Oct 31. 査読有

(2) Glypican-1 targeted antibody-based therapy induces preclinical antitumor activity against esophageal squamous cell carcinoma.

Harada E, Serada S, Fujimoto M, Takahashi Y, Takahashi T, Hara H, Nakatsuka R, Sugase T, Nishigaki T, Saito Y, Hiramatsu K, Nojima S, Mitsuo R, Ohkawara T, Morii E, Mori M, Doki Y, Kaneda Y, Naka T.

*Oncotarget*. 2017 Apr 11;8(15):24741-24752. doi: 10.18632/oncotarget.15799. 査読有

(3) Overexpression of glypican-1 implicates poor prognosis and their chemoresistance in oesophageal squamous cell carcinoma.

Hara H, Takahashi T, Serada S, Fujimoto M, Ohkawara T, Nakatsuka R, Harada E, Nishigaki T, Takahashi Y, Nojima S, Miyazaki Y, Makino T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Morii E, Mori M, Doki Y, Naka T.

*Br J Cancer*. 2016 Jun 28;115(1):66-75. doi: 10.1038/bjc.2016.183. Epub 2016 Jun 16. 査読有

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗GPC-1抗体

発明者: 仲哲治、世良田聡、藤本穰

権利者: 国立大学法人高知大学

種類: 特許

番号： PCT/JP2018/017291

出願年：2018年4月27日

国内外の別： 国外

○取得状況（計2件）

名称：食道がんのマーカーおよびその利用

発明者：仲哲治、世良田聡、藤本穰、豊浦雅義、庄屋雄二

権利者：国立大学法人高知大学

種類：特許

番号：特許第6500933号

取得年：2019年3月29日

国内外の別： 国内

名称：食道がんのマーカーおよびその利用

発明者：仲哲治、世良田聡、藤本穰、豊浦雅義、庄屋雄二

権利者：国立大学法人高知大学

種類：特許

番号：10,077,316

取得年：2018年9月18日

国内外の別： 国外(米国)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：高橋剛

ローマ字氏名：TAKAHASHI, Tsuyoshi

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：50452389

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：辻井 茂宏

ローマ字氏名：TSUJII, Shigehiro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。