

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07235

研究課題名(和文)免疫制御分子B7-H4を標的とした二重特異性抗体の開発

研究課題名(英文)Bispesific-antibody targeting B7-H4

研究代表者

飯塚 明 (Iizuka, Akira)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：00463183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：静岡がんセンターで行われた包括的な遺伝子発現解析により、肺がん、乳がん、卵巣がんなどで免疫制御分子B7-H4の高い発現が見つかった。本研究では、B7-H4を発現した癌細胞と免疫抑制性腫瘍浸潤マクロファージを細胞障害性T細胞に認識させるために、抗B7-H4、抗CD3二重特異性抗体を新たに設計し作製した。この二重特異性抗体は1ng/mL以下の濃度でT細胞によるB7-H4陽性癌細胞の傷害が可能であった。また、ヒト免疫細胞とヒト癌細胞を移植したマウスに当該二重特異性抗体を投与する実験モデルにおいて、B7-H4陽性乳癌を退縮させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年登場した免疫チェックポイント阻害剤の使用により変異負荷量(変異蓄積量)の多い癌で高い奏効率が得られることが明らかとなり、人体に備わる免疫システムを利用した癌治療が新たな方法論として社会的認知を受けることとなったが、変異負荷量の少ない癌種に対しては、別のアプローチが必要とされている。すでに一部の固形癌や白血病などに対して抗体医薬品の使用が行われているが、その適応を広げるため、或はその効果を強めるための研究開発が広く行われており、本研究は固形癌の治療に新たな標的、新たな手法を提供するものとなる。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive gene mutation and gene expression analysis performed at Shizuoka Cancer Center revealed high expression of immunoregulatory molecule B7-H4 in lung cancer, breast cancer and ovarian cancers. In this study, we designed and constructed anti-B7-H4 and anti-CD3 bispecific antibodies in order to make cytotoxic T cells recognize B7-H4 expressing cancer cells and immunosuppressive tumor-infiltrating macrophages. This bispecific antibody was able to killing B7-H4 positive cancer cells by T cells in vitro at a concentration of less than 1 ng/mL, and we succeeded in regressing B7-H4 positive cancers by the bispecific antibody administrations in a model of mice transplanted with human immune cells and human breast cancer cells.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 B7-H4 二重特異性抗体 マウスモデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍免疫治療研究分野では、免疫チェックポイント阻害剤が臨床的な成功を収め、癌変異抗原の蓄積量の多い悪性黒色腫、肺腺がん、抗がん剤治療後の再発腫瘍などで効果が示されているが、癌患者全体の比率から見ると治療対象者はさほど多くないことも明らかとなってきた。他方で、組織特異性の高い癌細胞表面上の分化抗原を標的とした抗体治療や遺伝子改変 T 細胞の開発も様々な形で行われているが、まだ限定的な使用にとどまっている。我々は手術切除した腫瘍部位と正常部位の網羅的遺伝子発現比較の中で、乳がんなどの腫瘍検体で B7-H4 の発現が相対的に高いことを見出し、モノクローナル抗体を作製し検討をおこなったが、免疫制御に対する生理的寄与度は PD-1 や CTLA-4 ほどではないと思われ、また、絶対的発現量が低く抗体依存性の癌細胞傷害を誘導することも困難であると思われた。しかしながら、新規に作製した抗 B7-H4 抗体クローンの中に、T 細胞受容体に間接的に架橋させることで癌細胞傷害を誘導できるクローンを見出した。

2. 研究の目的

本研究では免疫制御系の B7-H4 分子を標的とするが、阻害剤の標的としてではなく、癌細胞および腫瘍内浸潤マクロファージを T 細胞に認識させることで癌細胞に与える殺細胞効果と抑制性マクロファージによる腫瘍免疫応答抑制の解除の二つを同時に起こさせることを目的としている。具体的には、B7-H4 および T 細胞受容体複合体の CD3 に対する二重特異性抗体を作製し、体外実験により殺細胞効果および作用濃度帯を明らかにする。次に、マウスを用いて体内での二重特異性抗体の動態を調べ、B7-H4 を標的とするために効果的な二重特異性抗体の形態について検討をおこなう。

3. 研究の方法

既にクローニング済みの抗 B7-H4 抗体遺伝子および人工合成した抗 CD3 抗体遺伝子を用いた設計の異なる二重特異性抗体を複数構築する。次にヒト末梢血リンパ球とヒト乳癌細胞株 MDA-MB-468 等を用いて 4 時間から 24 時間の範囲で細胞傷害活性の測定を行い、作用濃度帯を明らかにする。また各種癌細胞株に対する傷害作用も検証する。

次に、マウスを用いて二重特異性抗体の投与後の体内動態を測定し、さらに高度免疫不全マウスである MHC ダブルノックアウト NOG マウス (NOG-IA β 、 β 2M double KO) にヒト末梢血単核球細胞と癌細胞株を移植したモデルを用いて投与量、投与間隔と腫瘍増殖に及ぼす影響についての検討をおこなう。

4. 研究成果

(1) まず当二重特異性抗体を作製し癌細胞株に対する効果を確認した。本研究所内で樹立された抗 B7-H4 抗体及び抗体医薬品として実績のある抗 CD3 抗体の遺伝子配列を基に、構造の異なる 2 種類の二重特異性抗体 (Fab-scFv、scFv-scFv) を作製し、B7-H4 発現癌細胞、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞のいずれにも結合することを確認した。体外実験での検討では、二重特異性抗体依存的にヒト末梢血リンパ球による乳癌細胞株 MDA-MB-468 に対する傷害作用が確認され、24 時間の培養下では 50% 最大作用濃度 (EC50) が 0.23ng/ml と極めて低い濃度で T 細胞による細胞性細胞傷害作用を引き出せることを明らかとした。B7-H4 を発現する他の乳癌細胞株に対しても二重特異性抗体依存的傷害作用が確認されたが、B7-H4 を発現しないヒト乳管上皮細胞に対する作用は見られなかった。また、抗体濃度が濃くなりすぎると作用が減弱するという現象も確認され、飽和による細胞間の架橋の減少は二重特異性抗体の効果を損なうものであると示唆される。

複数の健康人及び癌患者末梢血単核球細胞を用いた検討を追加に行ったが、当該二重特異性抗体の EC50 値は両者の間で明確な差は観られず、また、白血球中に含まれる CD3 陽性 T 細胞の割合 (数) とは相関関係は観られず、CD8 陽性 T 細胞の割合と逆相関が観られた。

リンパ球を分画し検討した結果、当該二重特異性抗体による標的癌細胞の傷害は体外実験では CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞のどちらにも見られたが、ヒト化マウスを用いた体内実験での癌細胞傷害は主に CD8 陽性 T 細胞 (キラー T 細胞) の存在に依存しており、CD4 陽性 T 細胞の介在は不要と思われた。

(2) 次に当該二重特異性抗体による免疫細胞に対する副次的な作用を観た。免疫担当細胞の一部で B7-H4 が発現することが報告されているが、我々の検討では二重特異性抗体による T 細胞同士あるいは活性化 T 細胞同士の傷害作用は確認されなかった。また、B7-H4 を発現したマクロファージ様の活性化 U937 細胞株を用いた検討では、インターフェロンの添加により U937 株の PD-L1、B7-H4 の発現上昇が共にみられ、U937 株に対するナチュラルキラー活性の消失が起きたが、二重特異性抗体による U937 株への傷害活性は逆に上昇傾向がみられ、免疫抑制的な環境下でも B7-H4 を介してキラー T 細胞による癌細胞の傷害を誘導可能なことが示唆された。

(3) マウス体内での二重特異性抗体の動態を測定した。近交系 BALB/c マウスに二重特異性抗体を投与し、B7-H4 融合タンパクと抗ヒト IgG 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法でマウス血清中の二重特異性抗体濃度を測定し半減期を算出した。体内半減期を反映する終末相の半減期

は 8.5 時間で通常の抗体と比べてかなり短い体内残留時間となった。また、腫瘍移植マウスモデルへの蛍光標識二重特異性抗体の投与では腫瘍部位での蛍光集積が投与後 4 週間後でも観察され、殺細胞効果をもたらす薬物としては望ましい結果となった。

(4) 腫瘍形成された乳癌細胞株に対する当該二重特異性抗体の効果を検討した。MHC ダブルノックアウト NOG マウス (NOG-IA β 、 β 2M double KO) は MHC-class I が欠損しており、移植したヒト末梢血単核球中のキラー T 細胞によるマウス細胞への攻撃がなく、ヒト免疫細胞とヒト癌細胞の直接的な反応をマウス体内で見るためには現時点では最も理想的なマウスモデルであるといえる。このマウスを用い、3 種類の B7-H4 陽性ヒト乳癌細胞株 MDA-MB468、HCC-1954、HCC-1569 に対する効果を検討したところ、いずれも当該二重特異性抗体による腫瘍の拒絶が可能であることが明らかとなった。また、免疫応答抑制分子 PD-L1 陽性の HCC1954 株に対しても腫瘍の拒絶が可能であることが明らかとなった。その一方で抗 B7-H4 抗体または抗 CD3 抗体の単独投与による腫瘍の拒絶は起こらなかった。

(5) 免疫組織染色による B7-H4 の発現確認を行った。二重特異性抗体構築に使用された抗 B7-H4 抗体クローンによる正常組織及び腫瘍組織の B7-H4 の染色性・反応性について免疫組織化学染色による検討を行った。正常組織アレイでは扁桃腺のみで染色が観られ、腫瘍組織アレイでは乳癌以外のいくつかの組織でも癌細胞膜上に染色像が観られた。既存の抗体医薬品の標的となり得る HER2 抗原、PD-L1 抗原との明確な発現相関は観られず、またエストロゲン受容体やプロゲステロン受容体との発現相関も観られなかった。過去の文献上で正常膵臓細胞の細胞質での B7-H4 発現が示されており、我々も膵臓正常組織、膵臓組織に加えて膵臓癌株 23 株の染色を行ったがいずれも B7-H4 の発現は確認できず、膵臓は当該抗体二重特異性抗体の標的とはなりえないことも明らかとなった。

本研究期間内において、当該二重特異性抗体を用いることで、ヒト CD8 陽性 T 細胞による乳癌細胞株の傷害、およびヒト化マウスモデルでのヒト癌細胞株移植腫瘍の退縮、除去が可能であることを示した。抗体クローンと新規二重特異性抗体に関する国際特許を出願中であり臨床開発に向け協力相手を求めている。

図1 抗B7-H4、抗CD3 二重特異性抗体

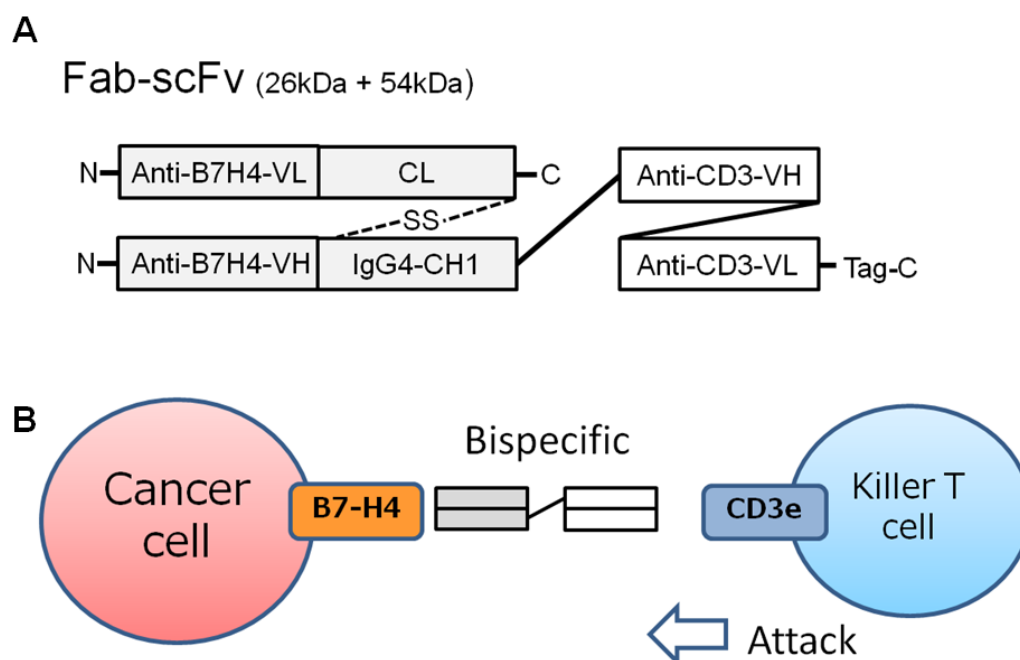


図2 抗B7-H4 二重特異性抗体による抗腫瘍効果

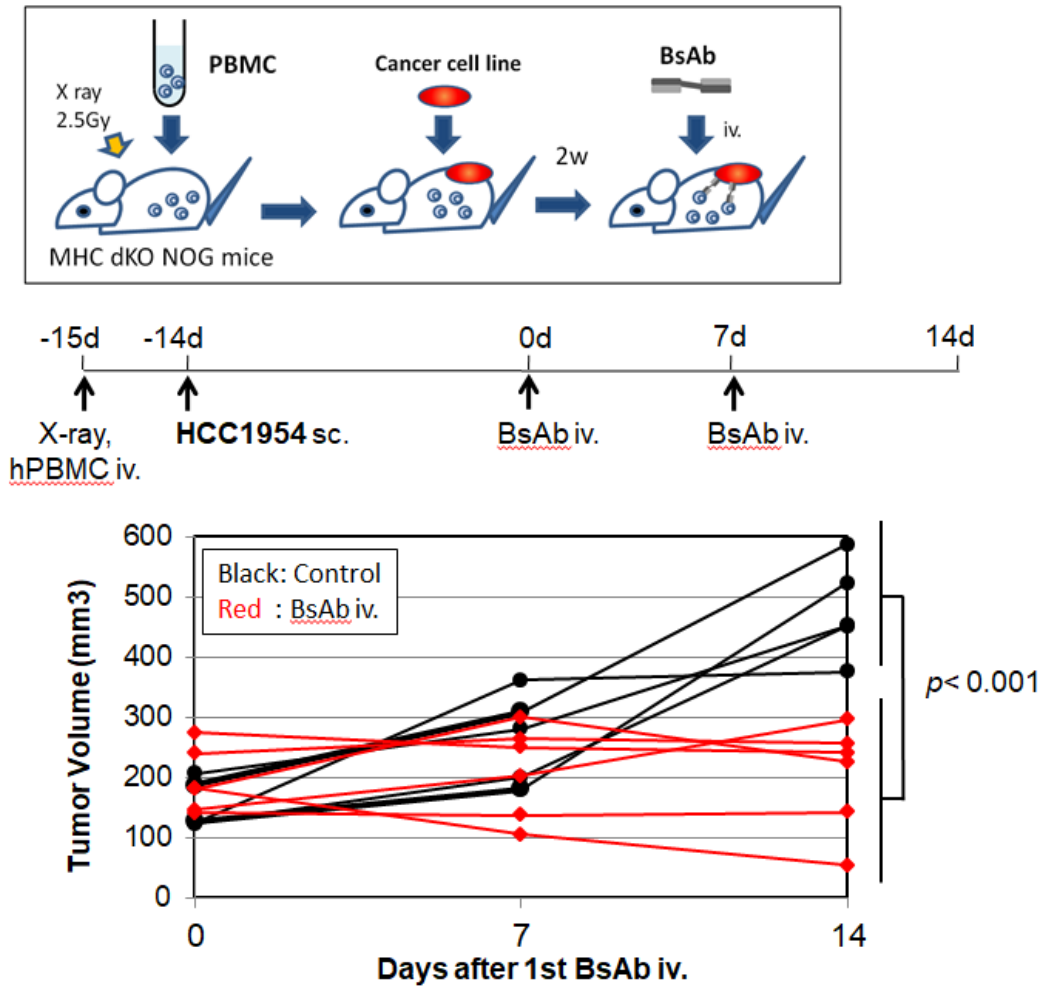
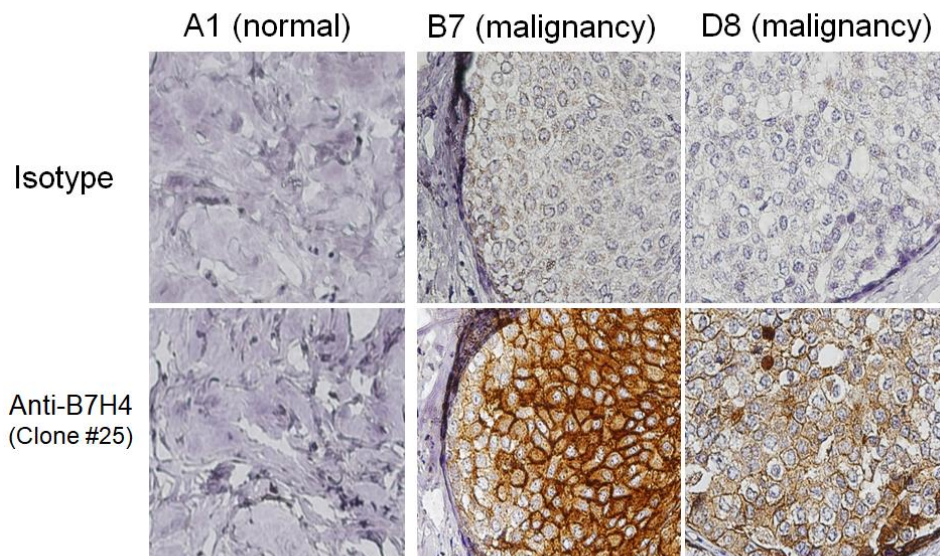


図3 乳癌組織アレイ、免疫組織化学染色



• FFPE normal tissue array (US Biomax, Inc. Cat#. BR1503f)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iizuka Akira, Nonomura Chizu, Ashizawa Tadashi, Kondou Ryota, Ohshima Keiichi, Sugino Takashi, Mitsuya Koichi, Hayashi Nakamasa, Nakasu Yoko, Maruyama Kouji, Yamaguchi Ken, Akiyama Yasuto	4. 巻 25
2. 論文標題 A T-cell-engaging B7-H4/CD3-bispecific Fab-scFv Antibody Targets Human Breast Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2925 ~ 2934
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-17-3123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akira Iizuka, Tadashi Ashizawa, Emiko Tanaka, Keiichi Ohshima, Ken Yamaguchi, Yasuto Akiyama
2. 発表標題 Anti-B7-H4 bispecific antibody targets human breast cancers
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Iizuka, Tadashi Ashizawa, Keiichi Ohshima, Masatoshi Kusahara, Ken Yamaguchi, Yasuto Akiyama
2. 発表標題 T-cell-engaging B7-H4/CD3 bispecific Fab-scFv antibody targeting human breast cancer
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 国際特許、優先権	発明者 AKIYAMA Yasuto; IIZUKA Akira	権利者 Shizuoka prefecture
産業財産権の種類、番号 特許、整理番号SCC1602PCT	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

