

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07299

研究課題名(和文) 腫瘍型糖鎖構造を保持する膜タンパク質の糖鎖構造解析と抗体医薬開発

研究課題名(英文) Development and characterization of a cancer-specific monoclonal antibody against a tumor-associated sialoglycoprotein.

研究代表者

金子 美華 (Kaneko, Mika)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00323163

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)：腎系球体の上皮細胞で発見されたI型膜貫通タンパク質ポドカリキシン(PODXL)は、膵がん、精巣腫瘍、大腸がん、乳がん、脳腫瘍など、種々のがんを高発現しており、悪性度や予後不良のマーカーである。一方、全身の血管内皮細胞などの正常組織にも比較的高発現しているため、抗体医薬の標的としては不適切とされていた。研究代表者らが開発したCasMab法を用い、PODXLに対し腫瘍特異的な反応性を示す抗体を取得した。本研究において、これらの抗体を利用して、腫瘍型PODXLの実態を解明し、腫瘍型PODXLのがん細胞形質への関与を解析すること、また、腫瘍型PODXL抗体の抗体医薬開発の可能性を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、モノクローナル抗体をキメラ抗原受容体T細胞(CART)療法や二重特異的抗体によるT細胞やNK細胞誘導療法(BiTEなど)と組み合わせる治療法の開発が盛んである。これら新しい免疫療法における副作用(毒性)は、これまでの治療法に比べ、影響が甚大であることが懸念されており、いかに特異性の高い抗体を樹立するかが重要な課題となっている。本研究課題においても検討したCasMab法は、非常に高いがん特異性抗体を作製できることが特徴であり、社会的に意義ある成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Podocalyxin (PODXL), a CD34-related sialomucin, is expressed not only in many tumors but also in normal cells such as epithelial cells and endothelial cells; therefore, PODXL could not be a target of antibody therapy. We recently established cancer-specific anti-PODXL mAb (ex.clone: PcMab-6), which could target only cancer cells although PODXL is highly expressed in both cancer and normal cells. PcMab-6 reacted with PODXL-expressing many cancer cell lines whereas it did not bind to vascular endothelial cells (VECs) in flow cytometry. Furthermore, PcMab-6 reacted only with PODXL-expressing cancer cells, not with VECs in breast and oral cancer tissues using immunohistochemistry. We have further constructed chPcMab-6, a mouse-human chimeric mAb from the PcMab-6, which also responds with only podocalyxin-expressing cancer cells. chPcMab-6 has ADCC activity in vitro and anti-tumor effect in vivo.

研究分野：抗体創薬

キーワード：CasMab 抗体創薬 PODXL 腫瘍特異的

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

1. 研究開始当初の背景

(1) PODXL とは、幹細胞マーカーである CD34 ファミリーの膜蛋白質である。細胞外は高度な糖鎖修飾を受け、発現細胞特異的な翻訳後修飾により約 160 から 250 kDa の分子として検出される。細胞外領域は細胞の接着制御に関与することが報告されている。PODXL の細胞内領域は細胞骨格タンパク質と相互作用し、細胞の突起形成や、増殖、移動に関与することが報告されている。PODXL は正常組織では造血幹細胞、血管内皮細胞、糸球体上皮細胞、血小板等で発現が認められる。また脳腫瘍、乳癌、肝癌、膵癌、腎癌、前立腺癌、精巣腫瘍、胎児性癌、白血病等の多くの癌組織で高発現していることが報告されている。

(2) 我々は近年、がん細胞に特異的な反応性を示すモノクローナル抗体作製技術 (CasMab 法) を開発し、がん細胞と正常細胞に同一のアミノ酸配列の膜タンパク質が発現している場合、糖鎖などの翻訳後修飾の違いを利用し、がん細胞のみを攻撃する抗体医薬品を作製することが可能となった (Kato Y and Kaneko MK., Sci Rep., 4, 5924, 2014)。

(3) 腫瘍型膜タンパク質への修飾について、我々は、脳腫瘍の臨床的悪性度と相関して発現が上昇する糖鎖構造を発見した (Kato et al, BBRC 369(4):1041-1046, 2008)。

2. 研究の目的

腎糸球体の上皮細胞で発見された I 型膜貫通タンパク質ポドカリキシン (PODXL) は、乳がん、前立腺がん、大腸がん、膵がん、精巣腫瘍、卵巣がん、脳腫瘍などにおいて高発現しており、悪性度や予後不良のマーカーである。一方、全身の血管内皮細胞などの正常組織にも比較的高発現しているため、抗体医薬の標的としては不適切とされていた。我々は、近年、自らが開発した CasMab 法を用い、PODXL に対し腫瘍特異的な反応性を示す抗体を取得した。本研究課題では、これらの抗体を利用して、腫瘍型 PODXL の実態を解明し、さらに腫瘍型 PODXL のがん細胞形質への関与を解析することを目的とした。また、腫瘍型 PODXL 認識抗体の抗体医薬開発の可能性を検証することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) PODXL における腫瘍特異的糖鎖構造の付加部位の絞り込みを実施した。種々の腫瘍細胞株に N 末端側 / C 末端側から削り込んでいった PODXL 遺伝子を発現させ、腫瘍型 PODXL 抗体の反応性から抗原認識部位を同定し、腫瘍型糖鎖付加部位を推定した。

(2) 腫瘍型糖鎖の生合成に関与する糖転移酵素遺伝子群の特定を実施した。種々の PODXL 発現腫瘍細胞株に対する腫瘍型 PODXL 抗体の反応性プロファイルと、申請者がこれまでに構築してきた糖転移酵素遺伝子発現プロファイルを比較し、腫瘍型糖鎖付加に関与する糖転移酵素遺伝子候補を選定した。選定された糖転移酵素遺伝子群について、腫瘍特異性に関与する遺伝子群を絞り込みに取り組んだ。候補糖転移酵素遺伝子群から逆に腫瘍型 PODXL 抗体が認識している PODXL 上の腫瘍型糖鎖が推定可能となることが想定された。

(3) 腫瘍特異的糖鎖構造付加は「がん細胞」の形質 (転移能や浸潤能など) に関与しているかどうか検証した。本研究を通して推定された腫瘍型糖鎖構造付加について、腫瘍に特異的な糖付加なのか、未分化細胞などにも存在するのか、等について検討した。また、PODXL の生理活性への関与等を解明に取り組んだ。

(4) 本研究に用いた新規抗体群も抗体医薬開発に適する可能性が高く、抗体の抗腫瘍機能などを解析した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍型糖鎖構造付加部位決定実験を実施した。腫瘍型糖鎖構造付加を解明するため、まずは目的の糖鎖付加部位を特定する実験を行った。N 末端側もしくは C 末端側から削り込んだ deletion 型 PODXL 分子を腫瘍細胞株に強制発現し、腫瘍型 PODXL 抗体の反応性から PODXL 分子のどの領域に糖鎖構造が付加されているかを解析した。

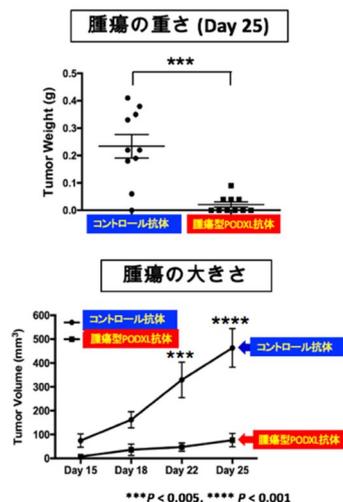
また、研究代表者らが Talen を用いて作成した N 結合型糖鎖不全細胞株に、最小単位の PODXL 分子を大量発現するための発現細胞樹立に取り組んだ。また、腫瘍型糖鎖構造の生合成に関与する糖転移酵素遺伝子群の特定に取り組んだ。腫瘍細胞株を用い、腫瘍型 PODXL 抗体の反応性プロファイルを作成した。抗体反応性プロファイルと遺伝子発現プロファイル、両方の結果を比較検討して抗体の認識する腫瘍型糖鎖構造付加に関与する糖転移酵素遺伝子候補を推定した。

(2) 腫瘍型糖鎖付加ポドカリキシンのがん細胞におけるの性質への関与を解明するため、種々の口腔扁平上皮癌細胞株において、PODXL ノックアウト細胞を作成し、PODXL 分子のがん細胞における機能的関与 (運動能 (migration assay), 浸潤能 (invasion assay), 増殖能 (growth assay), 腫瘍形成能 (in vivo assay)) の解析を行った。その結果、運動能、浸潤能においては親株とノックアウト細胞で差は確認されなかったが、増殖能と腫瘍形成能で差が確認された。

(3) マウスモデルにおいて抗 PODXL 抗体の抗腫瘍効果を確認するため、mG2a タイプの抗 PODXL キメラ抗体、さらに、コアフコース欠損 mG2a タイプ抗 PODXL キメラ抗体を産生した。それぞれの抗体について、in vitro の系における ADCC/CDC 活性を測定したところ、両抗体とも ADCC 活性のみが確認され、コアフコース欠損抗体の方が活性は強かった。さらに in vivo の系における抗腫瘍効果を確認した。

(4) マウスモデルにおいて腫瘍型 PODXL 認識抗体の抗腫瘍効果を確認するため、mG2a タイプの抗腫瘍型 PODXL キメラ抗体、さらに、コアフコース欠損 mG2a タイプの抗腫瘍型 PODXL キメラ抗体の産生に着手した。それぞれの抗体について、in vitro の系における活性を評価したところ、両抗体とも腫瘍特異的な腫瘍型 PODXL に対する活性が確認された。改変したキメラ型抗体の方がオリジナル抗体よりやや活性が高い傾向にあった。さらに in vivo の系における抗腫瘍効果の検討を実施している。

マウスモデルにおける腫瘍型PODXL抗体の抗腫瘍効果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Itai S, Ohishi T, Kaneko MK, Yamada S, Abe S, Nakamura T, Yanaka M, Chang YW, Ohba SI, Nishioka Y, Kawada M, Harada H, Kato Y	4. 巻 Vol.9, No. 32
2. 論文標題 Anti-podocalyxin antibody exerts antitumor effects via antibody-dependent cellular cytotoxicity in mouse xenograft models of oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 22480-22497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25132	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Itai S, Yamada S, Kaneko MK, Kato Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Determination of critical epitope of PcMab-47 against human podocalyxin.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	6. 最初と最後の頁 78-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2018.04.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Itai S, Yamada S, Kaneko MK, Sano M, Nakamura T, Yanaka M, Handa S, Hisamatsu K, Nakamura Y, Furusawa Y, Fukui M, Ohishi T, Kawada M, Harada H, Kato Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Podocalyxin is crucial for the growth of oral squamous cell carcinoma cell line HSC-2.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	6. 最初と最後の頁 93-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2018.07.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ogasawara S, Kaneko MK, Yamada S, Honma R, Nakamura T, Saidoh N, Yanaka M, Yoshida K, Fujii Y, Kato Y.	4. 巻 36(2)
2. 論文標題 PcMab-47: Novel Antihuman Podocalyxin Monoclonal Antibody for Immunohistochemistry.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.	6. 最初と最後の頁 50-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1089/mab.2017.0008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko MK, Kunita A, Yamada S, Nakamura T, Yanaka M, Saidoh N, Chang YW, Handa S, Ogasawara S, Ohishi T, Abe S, Itai S, Harada H, Kawada M, Nishioka Y, Fukayama M, Kato Y.	4. 巻 36(4)
2. 論文標題 Antipodocalyxin Antibody chPcMab-47 Exerts Antitumor Activity in Mouse Xenograft Models of Colorectal Adenocarcinomas.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.	6. 最初と最後の頁 157-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1089/mab.2017.0020.	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 -

1. 著者名 Yamada S, Itai S, Kaneko MK, Kato Y.	4. 巻 37(2)
2. 論文標題 Anti-Podocalyxin Monoclonal Antibody 47-mG(2a) Detects Lung Cancers by Immunohistochemistry.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.	6. 最初と最後の頁 91-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1089/mab.2018.0002.	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 -

1. 著者名 Kaneko MK, Itai S, Yamada S, Kato Y.	4. 巻 37(3)
2. 論文標題 47-mG(2a): A Mouse IgG(2a)-Type of PcMab-47 Useful for Detecting Podocalyxin in Esophageal Cancers by Immunohistochemistry.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.	6. 最初と最後の頁 158-161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1089/mab.2018.0003.	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 -

1. 著者名 Itai S, Yamada S, Kaneko MK, Harada H, Kato Y.	4. 巻 36(5)
2. 論文標題 Immunohistochemical Analysis Using Antipodocalyxin Monoclonal Antibody PcMab-47 Demonstrates Podocalyxin Expression in Oral Squamous Cell Carcinomas.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.	6. 最初と最後の頁 220-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1089/mab.2017.0030.	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 1件）

1. 発表者名 板井俊介、大石智一、金子美華、山田慎二、阿部真治、西岡安彦、川田学、原田浩之、加藤幸成
2. 発表標題 Antitumor activity by ADCC against oral squamous cell carcinomas by anti-podocalyxin antibody
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shunsuke Itai, Mika K. Kaneko, Shinji Yamada, Yukinari Kato
2. 発表標題 A core fucose-deficient anti-podocalyxin antibody exhibits anti-tumor activity via augmented antibody-dependent cellular cytotoxicity in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 AACR2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----