

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03750

研究課題名(和文) CHRN2を標的とした革新的がん抗体医薬とコンパニオン診断技術の創出研究

研究課題名(英文) Development of monoclonal antibody targeting CHRN2 to treat gastric cancer

研究代表者

神田 光郎 (KANDA, Mitsuro)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00644668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,320,000円

研究成果の概要(和文)：CHRN2を阻害する抗体医薬創製、抗体-薬物複合体開発、作用機序明瞭化、コンパニオン診断開発を目的とした。CHRN2喪失によりPI3K-Akt系の抑制を介して胃癌細胞悪性度が低下した。CHRN2モノクローナル抗体は*in vitro*および*in vivo*で胃癌細胞増殖阻害効果を示した。CHRN2欠損マウスに異常を認めなかった。抗体は細胞膜上のCHRN2に特異的結合していた。ヒアコア解析では抗体KD値は5.0 nMであった。CHRN2抗体-DM1複合体は*in vitro*、*in vivo*でnaked抗体を超える胃癌細胞増殖能阻害活性を示した。免疫染色による発現症例選別が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌は全世界で癌関連死亡数3位であり、特に本邦では罹患率の高い重大な疾患である。切除不能・再発胃癌は依然として予後不良であり更なる治療開発が求められているが、多くの開発治験にもかかわらず、多様性の大きいことが特徴であるこの疾患には未だ有効性を示す分子標的治療薬は少ない。本研究結果から、全く新しい作用機序を有する抗体-化合物複合体開発と、高い治療効果が期待できる患者を選別するコンパニオン診断技術開発の道筋が示された。さらに、抗CHRN2抗体が膀胱癌、乳癌、大腸癌、食道癌細胞株の増殖抑制能を有することも確認されており、幅広い癌腫へ応用可能である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to discover antibody drugs that inhibit Cholinergic Receptor Nicotinic Beta 2 Subunit (CHRN2), develop antibody-drug conjugates, clarify the mechanism of action, and develop companion diagnostics. No abnormalities were observed in CHRN2-deficient mice. The antibody specifically binds to CHRN2 protein on the cell membrane. The birecore analysis revealed that KD value of the monoclonal antibody was 5.0 nM. CHRN2 antibody-DM1 complex showed *in vitro* and *in vivo* inhibitory effect on cell proliferation ability of gastric cancer cells beyond that of the naked monoclonal antibodies. Immunostaining of CHRN2 protein in the clinical gastric cancer tissues is found to be usable for selection of patients who have CHRN2 expression.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌 分子標的治療薬 がん抗体医薬 CHRN2 コンパニオン診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌は全世界で癌関連死亡数3位であり、罹患率の高い本邦では優先的に克服すべき重要な疾患である。とくに切除不能・再発胃癌は依然として予後不良であり更なる治療開発が求められているが、多くの開発治験にもかかわらず、多様性の大きいことが特徴であるこの疾患には未だ有効性を示す分子標的治療薬は少ない。治療成績改善のためには、これまで知られていない作用機序から胃癌細胞を制御する薬剤の開発が必要である。

研究代表者は網羅的発現解析を糸口に、アセチルコリン受容体サブユニットである cholinergic receptor nicotinic beta 2 subunit (CHRN2) が遠隔転移再発症例群の胃癌原発巣組織中で有意な発現増加を認めることを発見した。ゲノム編集技術を応用した CHRN2 安定的ノックアウトにより胃癌細胞の悪性度と抗腫瘍薬 (5-FU) 抵抗性が低下し、マウス皮下腫瘍モデルで有意な造腫瘍能が低下することを明らかにした。これらの結果から、CHRN2 の活性を阻害する抗体医薬による創薬コンセプトを立案した。蛍光細胞染色により CHRN2 の抗体付加後内在化を観察したため、Naked な抗体の薬効をさらに増強するモダリティとして抗体-薬物複合体が有望と考え、名古屋大学大学院創薬科学研究科・創薬有機化学講座との共同研究体制を構築した。また、研究成果を実用化へと進めるためには、CHRN2 抗体の作用機序の明瞭化とヒト化モノクローナル抗体の取得が必要である。

2. 研究の目的

胃癌は依然として罹患率が高く、多様性の大きいこの疾患の治療成績を改善するには、病態解明と新規分子標的治療薬の開発が望まれる。研究代表者らはこれまで胃癌転移の分子生物学的機序に関する基礎実験を重ね、ポリクローナル抗体での標的エピトープのスクリーニングを経て抗 CHRN2 モノクローナル抗体を取得するに至った。本研究の目的は、胃癌における CHRN2 の機能と signaling pathway への干渉を明らかにし、これを標的とした全く新しい作用機序を有する抗体医薬を開発することである。さらに、CHRN2 の内在化する特性を活かし、抗体-薬物複合体の開発も名古屋大学大学院創薬科学研究科・創薬有機化学講座と共同して進めた。個別化医療を推進するために、治療の奏効度を予測するコンパニオン診断法開発の基盤となるデータも並行して得ていくことも目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、CHRN2 を標的とした新たな胃癌分子標的治療薬およびコンパニオン診断技術開発を目指して、以下を実施した。

(1) メカニズム解明

KO マウス解析: ゲノム編集技術により CHRN2-KO マウスを樹立した。既存情報の少ない CHRN2 の生態・恒常性維持における役割を調べるため、WT/ヘテロ/ホモ KO マウスで胎生死の有無、生態、成長、行動、代謝 (血液検査を含む) および生殖を経時的に観察し、CHRN2 喪失の生体への影響を調べ、HE 染色により主要臓器の発生・構造を確認した。CHRN2 は中枢神経系組織中に比較的発現が多いとの報告もあるため、名古屋大学神経内科学教室の協力のもと、KO マウスの認知行動障害の有無をローターロード試験にて評価した。

機能解析: ノックアウトによる喪失と外的・後天的な阻害は異なる状態であるため、安定的 CHRN2 ノックアウト細胞株と、CHRN2 抗体の癌細胞への投与の両方で *in vitro* 細胞増殖能を評価した。CHRN2 の KO 細胞株で得られた知見のレスキュー実験として発現ベクターによる CHRN2 強制発現を行い、細胞機能を評価した。

シグナル解析: 予備データから CHRN2 の胃癌細胞における役割は徐々に明らかになりつつあるが、さらに薬効メカニズムを明確にするために細胞膜上レセプターである CHRN2 の下流の細胞内シグナルを調べる。CHRN2 の上流刺激因子検索は、足場蛋白からのシグナル伝達系を網羅的に調査可能な PTM Scan (Cell Signaling Technology) を用いて抗 CHRN2 抗体投与前後の細胞内シグナルの変化を調査した。PTM Scan で抽出された候補シグナル系に着目して個々に Simple Western 法で検討した。

(2) ヒト化抗 CHRN2 抗体

ヒト化抗体合成: 研究開始時にマウスモノクローナル抗体のキメラ化は完了している。大量精製したキメラ化抗体の胃癌細胞増殖阻害能を *in vitro* で評価し、ヒト化抗体を合成した。

ヒト化抗体の薬効評価: *in vitro* 細胞増殖能阻害効果を3段階の投与濃度を設定して評価し

た。

(3) 抗体の profiling

アフィニティ測定: CHRN2 モノクローナル抗体の標的抗原へのアフィニティをピアコアで測定する。

(4) 抗体-化合物複合体

化合物スクリーニング: 候補化合物として lomaiviticin A/B、Maytansine 類似化合物を取得し、単体での濃度依存性の胃癌細胞増殖阻害効果を調べた。

薬効評価: モノクローナル抗体とスクリーニングを経た化合物を用いて複合体を合成し、胃癌細胞増殖阻害活性を in vitro で濃度依存性に評価した。naked のヒト化抗体との薬効比較も行った。さらに、抗体-化合物複合体の薬効を in vivo で評価した。

(5) コンパニオン診断

臨床検体での発現解析: 300 症例の胃癌切除組織を用いて CHRN2 発現解析を行い、各種臨床病理学的因子との相関を解析した。

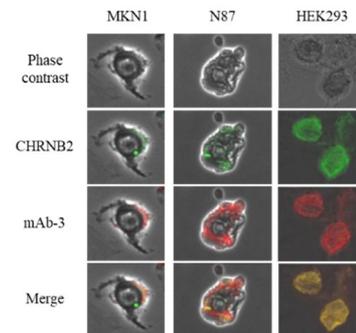
免疫染色: 手術標本組織を対象に免疫染色法を実施し、CHRN2 発現症例が選別可能かを調べた。

4. 研究成果

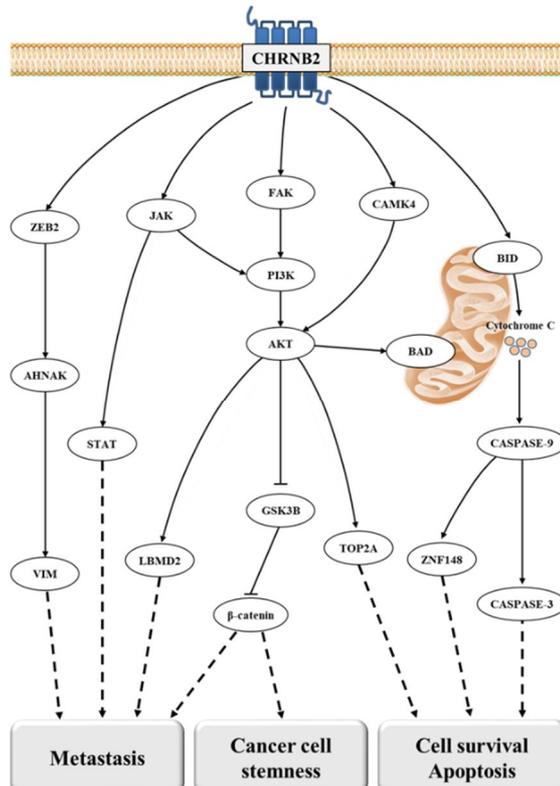
(1) メカニズム解明

KO マウス解析: ゲノム編集技術により CHRN2-KO マウスを樹立した。WT/ヘテロ/ホモ KO マウスで胎生死の有無、生態、主要臓器の発生、成長、行動、代謝および生殖を経時的に観察したが、CHRN2 喪失による悪影響はみられなかった。

機能解析: ゲノム編集技術を応用した CHRN2 安定的なノックアウトにより胃癌細胞の悪性度と抗腫瘍薬抵抗性が低下し、マウス皮下腫瘍モデルで有意な造腫瘍能が低下することを明らかにした。反対に、低発現胃癌細胞株にウイルスベクターによって CHRN2 を強制発現させるところ細胞増殖能が亢進した。蛍光細胞染色を行うと、このモノクローナル抗体はがん細胞の膜上に発現する CHRN2 タンパクおよび、293 細胞に強制発現させた CHRN2 タンパクに特異的結合していることが示された (右図)。



シグナル解析: 細胞内 signal の網羅的解析では、上皮間葉移行を通じて癌細胞の転移に関与する ZEB2 および JAK-STAT シグナル STAT3、PI3K-Akt の発現もしくはリン酸化に CHRN2 が干渉することが示唆された (右図)。



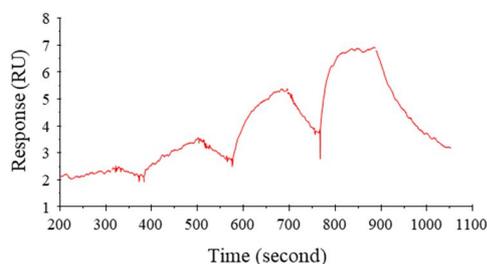
(2) ヒト化抗 CHRN2 抗体

ヒト化抗体合成: ポリクローナル抗体での標的エピトープのスクリーニングを経て抗 CHRN2 モノクローナル抗体を合成した。同抗体は in vitro および in vivo で胃癌細胞増殖阻害効果を示した。キメラ化抗体を精製し、ほぼ同等の胃癌細胞増殖阻害効果を有することを確認した。しかし、抗体合成のノウハウを有する企業と協議を重ねた結果、取得したハイブリドーマから産生される IgM 抗体をヒト化することは技術的に困難であるという結論に至った。

(3) 抗体の profiling

アフィニティ測定: マウスモノクローナル抗体のアフィニティ解析をピアコアにて実施

した(右図)。ペプチド CTFLHSDHSAPSSK に対して sensorgram を作成し、KD 値が 5.0 nM であることが判明した。



(4) 抗体-化合物複合体

化合物スクリーニング：候補化合物として Iomaiviticin A/B、Maytansine 類似化合物を取得し、単体での胃癌細胞株に対する濃度依存性細胞増殖抑制効果を確認した。活性、IC50 を比較し、低濃度域で濃度依存性活性を示す DM1 を複合体用の化合物に選抜した。

薬効評価：CHRN2 モノクローナル抗体と Maytansine 類 DM1 の抗体・化合物複合体を合成した。5 量体である IgM 抗体に DM1 および oYo リンカーを結合させたが、十分な活性が得られなかった。そこで、IgM をペプシンで断片化し、抗原認識部位=F(ab)' に DM1 を LC-SPDP で架橋させることとした。UV 照射、分解、脱塩カラムでの濾過の作業を経て抗体・化合物複合体を合成した。in vitro 細胞増殖能の解析では、CHRN2 抗体-DM1 複合体が、抗体単独・DM1 単独と比較して、最も強い細胞増殖能阻害活性を示した。CHRN2 抗体-DM1 複合体と naked の抗体の in vivo 活性評価(週 1 回、4 週投与)をマウス腹膜播種モデルで行ったところ、CHRN2 抗体-DM1 複合体で 25%の腫瘍抑制活性増強効果が示された。

(5) コンパニオン診断

臨床検体での発現解析：CHRN2 mRNA の胃癌組織中発現レベルは、非癌部、I/II 期胃癌、III/IV 期胃癌と段階的に上昇していた。高 CHRN2 発現群では、腫瘍サイズが有意に大きく、腫瘍の病期も進行していた。組織中高 CHRN2 発現は多変量解析において胃癌治療切除後の独立した予後因子として同定された。

免疫染色：免疫染色では評価した 80 人の胃癌患者のうち、54 人が胃癌原発巣で CHRN2 タンパク質を発現しており、CHRN2 陽性の患者では有意に術後再発頻度が高かった。

【得られた成果の位置づけとインパクト、今後の展望】

胃癌に対する分子標的治療薬のラインナップは徐々に増え、いずれも一定の効果を示しているものの不応例が多いことや、抵抗性の獲得が問題となっており、全く別の標的に対するアプローチが望まれている。本研究の成果である抗 CHRN2 モノクローナル抗体は以下の優位性を有している。

- 新規標的を阻害するため、現行の分子標的治療薬に不応の固形癌治療の新たな治療オプションとなる。
- 多くの固形癌における Key drug である 5-FU やシスプラチン抵抗性を低下させる可能性がある。
- 抗体-化合物複合体により Naked の抗体の効果に制癌作用を上乗せできる可能性がある。
- 抗 CHRN2 治療対象患者を選別するコンパニオン診断法の道筋を得ている。
- 抗 CHRN2 抗体が膵癌、乳癌、大腸癌、食道癌細胞株の増殖抑制能を有することが確認されており、幅広い癌腫へ応用可能である。

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 Kanda Mitsuro, Shimizu Dai, Nakamura Shunsuke, Sawaki Koichi, Umeda Shinichi, Miwa Takashi, Tanaka Haruyoshi, Inokawa Yoshikuni, Hattori Norifumi, Hayashi Masamichi, Tanaka Chie, Nakayama Goro, Iguchi Yohei, Katsuno Masahisa, Kodera Yasuhiro | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Blockade of CHRN2 signaling with a therapeutic monoclonal antibody attenuates the aggressiveness of gastric cancer cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Oncogene | 6. 最初と最後の頁 5495 ~ 5504 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-021-01945-9 | 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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 神田光郎, 田中千恵, 清水 大, 中西香企, 梅田晋一, 高見秀樹, 猪川祥邦, 服部憲史, 林 真路, 中山吾郎, 藤原道隆, 小寺泰弘 |
| 2. 発表標題 胃癌転移形式特異的バイオマーカーの同定と創薬への展開 |
| 3. 学会等名 第96回日本胃癌学会総会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 神田光郎, 清水 大, 田中千恵, 林 真路, 服部憲史, 猪川祥邦, 高見秀樹, 中山吾郎, 小池聖彦, 藤原道隆, 小寺泰弘 |
| 2. 発表標題 CHRN2を標的としたモノクローナル抗体による新規胃癌分子標的治療の開発 |
| 3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 神田光郎, 清水 大, 中西香企, 田中千恵, 猪川祥邦, 高見秀樹, 服部憲史, 林真路, 中山吾郎, 藤原道隆, 小寺泰弘 |
| 2. 発表標題 外科臨床検体を用いたトランスクリプトーム解析からの癌治療抗体医薬開発研究 |
| 3. 学会等名 第47回日本外科系連合学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 神田光郎, 清水 大, 中西香企, 田中千恵, 服部憲史, 林 真路, 高見秀樹, 中山吾郎, 小池聖彦, 藤原道隆, 小寺泰弘 |
| 2. 発表標題 トランスクリプトーム解析を切り口とした新規癌治療抗体医薬の開発研究 |
| 3. 学会等名 第54回制癌剤適応研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mitsuro Kanda, Dai Shimizu, Chie Tanaka, Masamichi Hayashi, Norifumi Hattori, Yoshikuni Inokawa, Hideki Takami, Goro Nakayama, Masahiko Koike, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera |
| 2. 発表標題 Blockade of CHRNB2 signaling attenuates the aggressiveness of gastric cancer cells |
| 3. 学会等名 第94回日本胃癌学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| 名古屋大学 消化器・腫瘍外科 ホームページ (https://surgery-nagoya-u.jp/research/) |
|---|

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 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 小寺 泰弘 (KODERA Yasuhiro) (10345879) | 名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|---|--|---------------|
| 研究分担者 | 横島 聡 (YOKOSHIMA Satoshi) (10376593) | 名古屋大学・創薬科学研究科・教授 (13901) | |
| 研究分担者 | 田中 千恵 (TANAKA Chie) (50589786) | 名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授 (13901) | |
| 研究分担者 | 清水 大 (SHIMIZU Dai) (50723037) | 名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901) | |
| 研究分担者 | 山口 繭美 (YAMAGUCHI Mayumi) (80822345) | 名古屋大学・創薬科学研究科・特任助教 (13901) | 削除：2020年12月2日 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |