

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08729

研究課題名（和文）血小板活性化受容体CLEC-2を標的とした抗体医薬の開発とその薬理作用の解明

研究課題名（英文）Development of antibody drugs targeting platelet activating receptor CLEC-2 and elucidation of the pharmacological actions

研究代表者

佐々木 知幸（Sasaki, Tomoyuki）

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：40739124

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、臨床応用可能な抗CLEC-2薬の開発を目指し、すでに見出した抗体を基盤に、近年の抗体改変技術を応用して血小板活性化能の欠失やフラグメント化などにより血小板減少などの副作用の問題を解決することである。そのために、既存の抗体（クローン名：2A2B10）の機能改変を可能にするために、遺伝子組換え抗体化し、さらに、マウスキメラ抗体化も実施し、その機能が同等であることを確認した。また、遺伝子導入方法の見直しにより、収量の増加とランニングコストを抑えることができた。しかしながら、エピトープ解析が難航したこともあり、抗体医薬を目指した抗体の改変に着手する段階まで到達できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血小板CLEC-2の病態生理学的意義は、血小板血栓の形成に留まらず、血栓の安定化、癌の転移、肺発生、横紋筋融解症の重症化に寄与することが報告されている。血小板CLEC-2が治療標的となる疾患は拡大しており、有望な標的である。抗CLEC-2抗体のエピトープが判明したことは、今後の抗体医薬開発のための重要な情報である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop a clinically applicable anti-CLEC-2 drug, and to solve the problem of side effects such as thrombocytopenia caused by deletion or fragmentation of platelet activation ability by applying recent antibody modification technology based on the antibody already discovered. For this purpose, to enable functional modification of an existing antibody (clone name: 2A2B10), we have genetically modified it into a recombinant antibody and also into a mouse chimeric antibody, and have confirmed that the functions of the antibodies are equivalent. In addition, the yield was increased and the running cost was reduced by revising the gene transfer method. However, due to difficulties in epitope analysis, we were unable to reach the stage where we could begin modifying the antibody for use as an antibody drug.

研究分野：血栓止血学

キーワード：CLEC-2 血小板 抗体医薬

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1 . 研究開始当初の背景

我々は血小板活性化蛇毒ロドサイチンの受容体として CLEC-2 を同定した (Blood, 2006) . さらに CLEC-2 の生体内リガンドとして , ある種の癌細胞に高発現する膜タンパク質ポドブラニンも同定した (JBC, 2007) . CLEC-2 の発見以降 , その役割は血小板の活性化のみならず , 血栓の安定化 (JBC, 2010) , 癌転移の促進 (JBC, 2007) , 胎生期の静脈・リンパ管の分離促進 (JBC, 2012) , 巨核球造血の促進 (Blood, 2016) , 肺発生 (Blood, 2018) に関わることを報告した .

CLEC-2 は , その多彩な役割を基盤として , 特に抗血小板薬や抗癌転移薬の有望な 標的である . さらに , 術後リンパ浮腫の予防 , リウマチなどの慢性炎症性疾患 , 悪液質そして敗血症の治療にも適用できる可能性がある .

我々は , 世界に先駆けて抗 CLEC-2 薬となり得る CLEC-2 結合化合物の検索と開発を進め , 低分子化合物 Co-HP (Sasaki et al. , Blood Adv, 2018) と蛇毒ロドサイチンの機能抑制型遺伝子組換え体 (Sasaki et al. , JTH, 2018) を見出した . これらは , CLEC-2 依存性の血小板凝集を抑制し , マウスモデルではポドブラニン陽性癌細胞の肺転移を極めて効率的に抑制することを報告した . しかしながら , 特異性と抗原性の問題から臨床応用には困難が予想された . 海外の研究グループも含め , 現状では , CLEC-2 は創薬ターゲットとして有望であるにも関わらず , 特異性が高く , 免疫原性が低い抗 CLEC-2 薬候補は発見されていない .

そこで , 新たな CLEC-2 薬の開発アプローチとして現在もっとも隆盛を誇り , 方法論が確立しつつある創薬手法である『抗体医薬』に着目した . 既に我々は , 特異な作用を有する抗マウス CLEC-2 抗体 (クローン名 : 2A2B10 , 以降 2A2B10 抗体と表記する) を所持しており , この抗体が本研究における抗体医薬の開発基盤になり得ると考えた . その作用とは , 2A2B10 抗体をマウスに投与すると , 数日で回復する一過性の血小板減少の後 , 血小板上の CLEC-2 が 7-10 日間消失することである (JTH, 2016) . 1987 年に Sugiyama らにより特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 患者でコラーゲン受容体である血小板 GPVI に対する自己抗体を有し , 血小板 GPVI を欠損した患者が見出されていた . 2001 年に Nieswandt らは , マウスに抗マウス GPVI 抗体 (クローン名 : JAQ1) を投与すると血小板の GPVI が消失することを報告している . この抗体投与による CLEC-2 の消失は , この GPVI の現象と類似している .

抗体投与による血小板 CLEC-2 の欠損メカニズムは , 血小板の活性化に伴う CLEC-2 の細胞外領域の切断 , および , CLEC-2/抗 CLEC-2 抗体複合体の内在化 (細胞内への取り込み) が推定されているが , その詳細は不明である . さらに , 抗体による血小板 CLEC-2 の欠損が , 巨核球成熟-血小板産生のどの段階で起こるのかも不明である .

2 . 研究の目的

本研究の目的は , 抗血栓症及び抗癌転移作用等を期待できる CLEC-2 を標的とした抗体医薬 (抗 CLEC-2 抗体医薬) の開発とその抗体の作用メカニズムを含めた薬理作用の解明である . 我々が目指す抗 CLEC-2 抗体医薬は , メカニズムに不明な点を残している特異な作用 : 『抗 CLEC-2 抗体が血小板 CLEC-2 を欠損させる作用』に基づいており , その不明点の解明と同時に開発研究を進めるため , その独自性は高いと考える . 将来的な患者への適用における安全性を担保するためには , 作用の不明点を解明することは大変重要である .

3 . 研究の方法

(1) 2A2B10 の遺伝子組換え抗体化とマウスキメラ化

本研究において抗体医薬開発の基盤となる複数の抗マウス及びヒト CLEC-2 抗体 (2A2B10 や 4A10 など) とその抗体産生ハイブリドーマをすでに保有している . 抗体産生ハイブリドーマの大

量培養からの抗体精製システムも構築済である。

オリジナルの 2A2B10 抗体（ラットモノクローナル抗体）の重鎖と軽鎖遺伝子をクローニングするために、2A2B10 産生細胞（Hybridoma）由来 RNA から cDNA を合成し、サブクラスを推定したプライマーを用いて PCR によって重鎖と軽鎖遺伝子を増幅した。さらに、発現ベクターに挿入し、発現の確認や大量合成には CHO 細胞を用いた。構築した遺伝子組換え 2A2B10 の機能は、血小板凝集能とマウス投与による血小板 CLEC-2 の欠損維持期間で評価した。また、遺伝子組換え 2A2B10 をマウスキメラ抗体に改変するために、マウスより IgG 抗体遺伝子の遺伝子配列を得た。具体的には、マウス脾臓より RNA を抽出し、cDNA を合成し、マウス IgG の重鎖と軽鎖の定常領域を PCR で増幅し、発現ベクターを構築した。

（2）2A2B10 のエピトープ解析

受容体を標的とした抗体創薬では、エピトープの特定は抗体機能を理解するために大変有用な情報である。また、2A2B10 抗体による CLEC-2 の内在化は、そのエピトープに依存した機能である可能性が高いため、2A2B10 抗体のエピトープ解析は必須である。既に、N 末に細胞外分泌シグナルと C 末にウサギ IgG の Fc 領域を付置したマウス CLEC-2 の細胞外ドメイン（180 アミノ酸）を含む発現ベクターを所持している。それを基に、6 領域（各 30 アミノ酸程度）に分割して、それぞれに Fc を付置した発現ベクター構築する。CHO 細胞に遺伝子導入し強制発現させ、分泌された CLEC-2 断片-Fc 融合タンパク質を Protein G カラムで精製する。それを SDS-PAGE 及び 2A2B10 抗体を用いたウエスタンブロットに供し、どの CLEC-2 断片-Fc 融合タンパク質が検出されるかにより、エピトープを特定する。

4．研究成果

（1）2A2B10 の遺伝子組換え抗体化とマウスキメラ化

2A2B10 抗体はラットモノクローナル抗体であるので、マウスに継続投与すると、抗ラット IgG 抗体を産生し、およそ 1 か月で、抗体投与による血小板 CLEC-2 の欠損状態は無効となる。さらなる、長期欠損状態を実現するため、免疫原性を抑える 2A2B10 抗体のマウスキメラ抗体への改変を行ってきた。

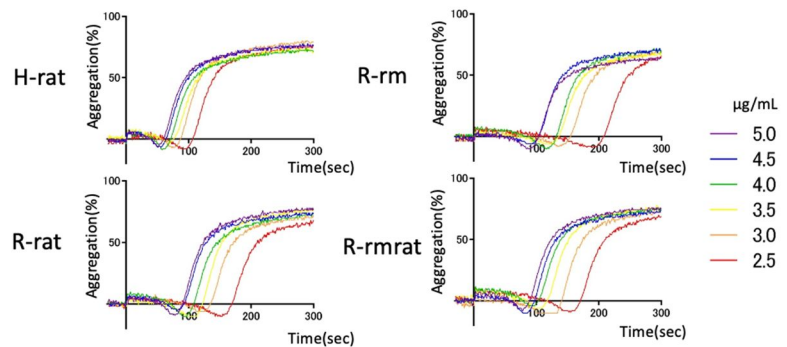


図1. 各種抵CLEC-2抗体によるマウス血小板凝集

遺伝子組換え 2A2B10 は現時点で、3 種類作製している。オリジナルのラットモノクローナル抗体 2A2B10 の遺伝子組換え体（R-rat2A2B10）、マウスキメラ抗体化 2A2B10（R-rm2A2B10）（重鎖と軽鎖はともにマウス由来）、そして、軽鎖をラット由来に戻したマウスキメラ抗体化 2A2B10（R-rmrat2A2B10）（重鎖はマウスと軽鎖はラット由来）において、それぞれの血小板凝集能は概ね同等であったが（図1）、オリジナルのハイブリドーマが産生した 2A2B10 に比べて弱い傾向があった。

また、これらの 3 種類の遺伝子組換え抗体の複数回投与による血小板 CLEC-2 欠損の有効期間には有意な差はなかった（各投与回の有効期間も全有効期間も）（図2）。マウスキメラ化することで免疫原性の問題が解消され、全有効期間は延長すると考えたが、ほぼ同等であった。エピトープ以外を全てマウス化した抗体で検証したいと考えている。

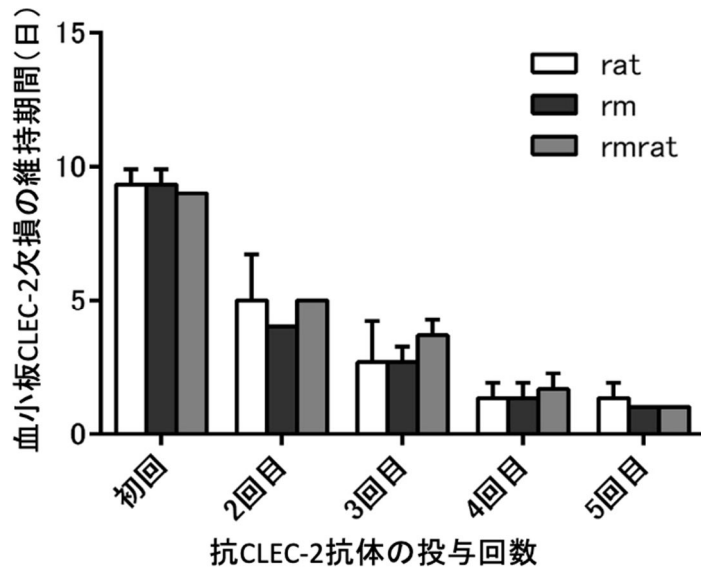


図2. 血小板CLEC-2欠損の維持期間と投与回数

(2) 2A2B10のエピトープ解析

発現ベクターの構築は順調だったものの、各種の部分欠損変異タンパク質の発現量が、全長（膜貫通領域は除いている）タンパク質と比較して、極端に少なかったり、全く無かったりと様々であった。そのため、タグとしてC末端に付置していたウサギ IgG の Fc 領域を N 末端側に変更したが、根本的な解決にはならなかった。タグを Flag（8 つアミノ酸配列で構成される）に変更したりするなどして検証中である。タグに用いた Fc 領域が 2A2B10 抗体によって交差反応している可能性があったからである。現時点では、消去法で推定された部位であるが、アミノ酸 140～194 番目あるいは 194 番目付近が有力である。過去の構造解析結果を参照して、アラニン置換に基づくエピトープ解析（アラニンスキニング解析）の手法によって、解析を進める予定である。

遺伝子組換えタンパク質の合成方法について、細胞への遺伝子導入法をエレクトロポレーションから PEI（ポリエチレンジイミン）法に変更するなどして、収量の増加とランニングコストを抑えることが可能となった。しかしながら、抗体医薬を目指した抗体の改変に着手する段階まで到達できなかった。今後、この研究を継続したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Sasaki Tomoyuki, Inoue Osamu, Ogihara Shinji, Kubokawa Kayo, Oishi Saori, Shirai Toshiaki, Iwabuchi Keisuke, Suzuki-Inoue Katsue	4. 巻 75
2. 論文標題 Detection of SARS-CoV-2 RNA Using RT-qPCR in Saliva Samples and Nasopharyngeal, Lingual, and Buccal Mucosal Swabs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 102 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2021.091	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 Otake Shimon, Sasaki Tomoyuki, Shirai Toshiaki, Tsukiji Nagaharu, Tamura Shogo, Takano Katsuhiko, Ozaki Yukio, Suzuki Inoue Katsue	4. 巻 19
2. 論文標題 CLEC 2 stimulates IGF 1 secretion from podoplanin positive stromal cells and positively regulates erythropoiesis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 1572 ~ 1584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.15317	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 Oishi Saori, Tsukiji Nagaharu, Otake Shimon, Oishi Naoki, Sasaki Tomoyuki, Shirai Toshiaki, Yoshikawa Yuri, Takano Katsuhiko, Shinmori Hideyuki, Inukai Takeshi, Kondo Tetsuo, Suzuki-Inoue Katsue	4. 巻 5
2. 論文標題 Heme activates platelets and exacerbates rhabdomyolysis-induced acute kidney injury via CLEC-2 and GPVI/FcR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 2017 ~ 2026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020001698	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 Ichikawa Jiro, Ando Takashi, Kawasaki Tomonori, Sasaki Tomoyuki, Shirai Toshiaki, Tsukiji Nagaharu, Kimura Yujiro, Aoki Kaoru, Hayakawa Keiko, Suzuki Inoue Katsue, Saitoh Masao, Haro Hirotaka	4. 巻 35
2. 論文標題 Role of Platelet C Type Lectin Like Receptor 2 in Promoting Lung Metastasis in Osteosarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 1738 ~ 1750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.4045	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 Sano Fumikazu, Yagasaki Hideaki, Kojika Satoru, Toda Takako, Kono Yosuke, Suzuki-Inoue Katsue, Sasaki Tomoyuki, Ogihara Shinji, Matsuno Towa, Inoue Osamu, Moriguchi Takeshi, Harii Norikazu, Goto Junko, Shimizu Tatsuya, Inukai Takeshi	4. 巻 online
2. 論文標題 Severe Apparent Life-threatening Event (ALTE) in an Infant with SARS-CoV 2 Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2020.572	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 Moriguchi T, Harii N, Goto J, Harada D, Sugawara H, Takamino J, Ueno M, Sakata H, Kondo K, Myose N, Nakao A, Takeda M, Haro H, Inoue O, Suzuki-Inoue K, Kubokawa K, Ogihara S, Sasaki T, Kinouchi H, Kojin H, Ito M, Onishi H, Shimizu T, Sasaki Y, Enomoto N, Ishihara H, Furuya S, Yamamoto T, Shimada S	4. 巻 94
2. 論文標題 A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 55 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijid.2020.03.062	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大竹 志門, 佐々木 知幸, 白井 俊光, 築地 長治, 高野 勝弘, 田村 彰吾, 尾崎 由基男, 井上 克枝
2. 発表標題 CLEC-2はPDPN発現間質細胞からのIGF-1分泌を促進し、赤血球造血を正に制御する
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoyuki Sasaki
2. 発表標題 Functional characterization of recombinant snake venom rhodocytin: rhodocytin mutant blocks CLEC-2/podoplanin-dependent platelet aggregation and lung metastasis.
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石沙織, 築地長治, 大竹志門, 大石直輝, 佐々木知幸, 白井俊光, 吉河佑莉, 高野勝弘, 新森英之, 犬飼岳史, 近藤哲夫, 井上克枝
2. 発表標題 横紋筋融解症に併発する腎障害における血小板CLEC-2及びGPVIの役割
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 S. Oishi, N. Tsukiji, S. Otake, N. Oishi, T. Sasaki, T. Shirai, Y. Yoshikawa, K. Takano, T. Kondo, K. Suzuki-Inoue
2. 発表標題 Heme Activates Platelets and Exacerbates Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury via CLEC-2 and GPVI/FcR
3. 学会等名 ISTH 2020 Congress(2020.07.12) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木知幸, 白井俊光, 築地長治, 小山賢介, 田村彰吾, 大竹志門, 高野勝弘, 長田誠, 佐藤金夫, 波呂浩孝, 尾崎由基男, 井上克枝
2. 発表標題 血小板受容体CLEC-2による関節リウマチの病態形成への関与
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会(2020.06.18)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大石沙織, 築地長治, 大竹志門, 大石直輝, 佐々木知幸, 白井俊光, 吉河佑莉, 高野勝弘, 近藤哲夫, 井上克枝
2. 発表標題 横紋筋融解症に併発する腎障害における血小板CLEC-2およびGPVIの役割
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会(2020.06.18)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大竹志門, 白井俊光, 築地長治, 佐々木知幸, 田村彰吾, 高野勝弘, 尾崎由基男, 井上克枝
2. 発表標題 巨核球・血小板上C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2)の赤血球造血における役割
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会(2020.06.18)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学医学部附属病院検査部、輸血細胞治療部、大学院臨床検査医学講座のホームページ https://c1nlabmed.yamanashi.ac.jp/
--

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	井上 克枝 (Inoue Katsue) (10324211)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	
研究分担者	築地 長治 (Tsukiji Nagaharu) (20710362)	山梨大学・大学院総合研究部・講師 (13501)	
研究分担者	白井 俊光 (Shirai Toshiaki) (50710381)	山梨大学・大学院総合研究部・助教 (13501)	

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	大竹 志門 (Otake Shimon) (50813060)	山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員 (13501)	

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