

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02779

研究課題名(和文) 進行がんの次世代 Antibody Drug Conjugate 治療薬の創成

研究課題名(英文) Creation of Next Generation Antibody Drug Conjugate Therapeutics for Advanced Cancer

研究代表者

杉山 暁 (Sugiyama, Akira)

東京大学・アイソトープ総合センター・助教

研究者番号：40562715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗HER2 affibodyと改変ストレプトアビジン(Cupid)との融合タンパク質の製造方法を確立し、光増感剤Psyche Ax-SiPcをペイロードとして、HER2陽性細胞に薬物を送達でき、濃度・光照射依存的な細胞傷害性と動物モデルでの治療効果を実証した。次に、抗HER2 VHH抗体と改変ストレプトアビジン(Cupid)との融合タンパク質の製造方法を確立し、制がん剤Duocarmycin-PsycheをペイロードとしてHER2陽性細胞に薬物を送達でき、細胞内在化により細胞内への薬物送達が可能でありその細胞傷害効果を細胞レベルで、また治療効果を動物レベルで示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

計算機の進歩により、VHH抗体やaffibodyなどの分子量の小さなタンパク質バインダーの計算設計が可能となってきた。本研究成果により、今後、計算設計されたタンパク質バインダーについて各種ペイロードを用い迅速に評価できることが可能であることが示された。また、多種の標的に対し多種のペイロードを送達できるシステムは、今後の精密医療の社会実装にとって重要な役割を果たすと考えられる。また、精密医療が医療経済に大きな影響を与えるのと同様にCupid-Psycheシステムの社会実装も医療経済に大きな影響を与えると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We established a method for producing a fusion protein of anti-HER2 affibody and modified streptavidin (Cupid) and demonstrated that the drug could be delivered to HER2-positive cells using the photosensitizer Psyche Ax-SiPc as payload, with concentration- and light-radiation dependent cytotoxicity and therapeutic effects in animal models. Next, we established a method to produce a fusion protein of anti-HER2 VHH antibody and modified streptavidin (Cupid), which can deliver drugs to HER2-positive cells as a payload of Duocarmycin-Psyche, an anti-cancer drug. We demonstrated its cytotoxic effect at the cellular level and its therapeutic effect by internalization of the drug into the cells. The cytotoxic effect of Duocarmycin-Psyche was demonstrated at the cellular level, and the therapeutic effect was demonstrated at the animal level.

研究分野：抗体工学

キーワード：ドラッグデリバリー VHH抗体 光増感剤 デュオカルマイシン 巻き戻し 抗体ミメティクス affibody Cupid-Psyche

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

再発や転移を伴う進行がんに対する副作用の少ない治療薬の開発は重要な課題である。がんの分子標的は明らかになりつつあるが、がん細胞は表現型を変化させるため、根治させる効果的な治療が難しい。従来の抗がん剤は副作用が多く、抗体医薬品はコストに対する効果が限定的だったため、新しい治療法が求められていた。そのため、既存の抗体医薬品に代わるものとして、抗体薬物複合体(antibody drug conjugate; ADC)が開発され一定の治療効果を示している。

我々は、がん細胞へ的確に薬物を送達するために、ストレプトアビジン-ビオチン系をベースにした Cupid-Psyche システムを開発した。Cupid は、免疫原性が低く、天然ビオチンとの親和性がない改変ストレプトアビジンで、ビオチン改変体である Psyche 化合物と非共有結合による高い親和性を持つ。Psyche には、放射性同位元素、光増感剤、制がん剤を化学的に結合できる。がん細胞表面抗原を認識する部位を持つ Cupid に Psyche ペイロード化合物を非共有結合で結合し薬物をがん細胞に送達する仕組みである (文献 1 参照)。

Cupid には IgG 抗体由来の一本鎖抗体 (single chain Fv; scFv) を融合させて大腸菌で製造していたが収量の低さが問題であった。このことから、分子量が大きいかつ構造が複雑な scFv でなく、分子量が小さく構造が複雑でない VHH 抗体や affibody などの抗体ミメティクスを利用し大腸菌での製造方法の研究を行なった。

2. 研究の目的

本研究は HER2 を高発現しているがん細胞への薬剤送達方法の設計し、合成方法を確立する。同時にこれらを用いた治療効果の検討をする。

(1) 抗体-Cupid の低分子化：現行の Herceptin 由来の scFv (26 kDa) よりも分子量が小さい、HER2 を認識する nanobody (12 kDa) や affibody (6 kDa) との Cupid 融合体の製造方法の検証を大腸菌やその他の宿主を用いて行い、より安定的に大量の抗 HER2-Cupid を製造する方法の開発を進める。

(2) 光増感剤-Psyche の至適化：すでに得られている分子モデル計算の結果をもとにフタロシアンニンに含まれるベンゼン環に修飾基をつけることや、リンカーの電気的な性質を変えることにより、独自開発したフタロシアンニン誘導体の改良を進め、光エネルギーをより効率よく殺細胞効果に変換できる分子の設計と合成を行う。

(3) 抗がん剤-Psyche の至適化：デュオカルマイシンのプロドラッグ化をすすめ、プロプロデュオカルマイシンのどの位置にリンカーを結合することで細胞内での切断を効率よく起こせるかの検討を進め、より少ない分子数高殺細胞活性高殺細胞効果を出せるような分子の選択を進める。

(4) 細胞レベル POC、動物レベル POC の取得：合成された抗 HER2-Cupid と各種 Psyche 化合物を組み合わせて細胞レベル (NCI-N87, KPL-4, SK-BR-3 細胞などを使用) での PoC の取得を進める。その後、HER2 発現細胞を皮下に移植したモデルマウスでの増殖抑制試験を行う。

3. 研究の方法

(1) 抗体-Cupid の低分子化は、HER2 を認識する affibody (6 kDa) と VHH 抗体 (12 kDa) を遺伝子的に Cupid と融合した。融合タンパク質は大腸菌で封入体として発現、精製した後に変性、巻き戻しによる活性タンパク質の製造方法の研究を実施した。

(2) 抗 HER2 affibody と Cupid の融合タンパク質を用い、ペイロードは光増感剤 Psyche Ax-SiPc を用い、細胞レベル、動物レベルでの細胞殺傷効果を明らかにする研究を行なった。抗 HER2 affibody-Cupid と Psyche Ax-SiPc は事前にチューブ内で混合して複合体形成をさせた。この複合体を培地に加え希釈系列を調製、細胞へ添加し 690nm の光照射の有無で細胞傷害性の解析を実施した。また、HER2 高発現乳がん細胞株 KPL-4 を皮下移植したゼノグラフトモデルマウスに事前に体外で調製した複合体 150 マイクログラムを尾静脈投与し光照射による治療効果の検証を実施した。

(3) 抗 HER2 VHH 抗体と Cupid の融合タンパク質を用い、ペイロードは光増感剤 Duocarmycin-

Psyche を用い、細胞レベル、動物レベルでの細胞殺傷効果を明らかにする研究を行なった。抗HER2 VHH-Cupid と Ducarmycin-Psyche は事前にチューブ内で混合して複合体形成をさせた。この複合体を培地に加え希釈系列を調製、細胞へ添加し6日間の培養の後に細胞傷害性の解析を実施した。また、HER2 高発現乳がん細胞株 KPL-4 を皮下移植したゼノグラフトモデルマウスに事前に体外で調製した複合体 200 マイクログラムを尾静脈投与し治療効果の検証を実施した。

4. 研究成果

(1) 抗HER2 affibody-Cupid は、大腸菌の封入体を変性し、希釈し変性剤の濃度を下げることで簡単に巻き戻ることが確認された。巻き戻しで得られたタンパク質は Biacore T200 によるカイネティクス解析により、HER2 細胞膜ドメインと Psyche Ax-SiPc に対し、安定した結合活性を有しており、それぞれの KD 値は 256 pM と 569 pM となった(図1)。

次に、HER2 を高発現している細胞を用いた細胞傷害性アッセイにより、あらかじめチューブ内で調製した複合体の希釈系列は、濃度依存的かつ光照射依存的に細胞障害性があることが確認された(図2)。また、FITC-Psyche を用いた複合体の内在化は24時間後も細胞膜上での滞留が確認された。

ゼノグラフトモデルマウスの治療実験では、病理解析の結果、2匹の個体(G17, G18)において腫瘍の消失が確認された、少しの腫瘍の残存が確認された個体(G14)を含め3個体とも目視において臓器は正常であり、さらに肝臓、腎臓、肺については病理切片による解析にて正常に保たれていることが確認された(図3D)。詳細は引用文献2として論文化済みである。

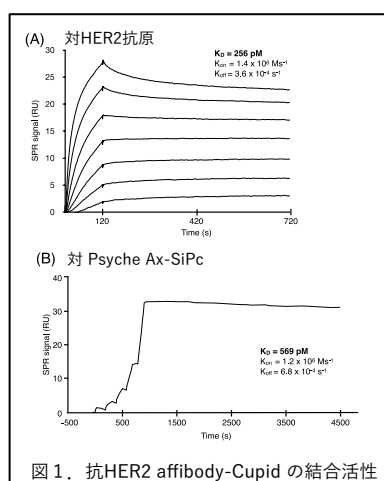


図1. 抗HER2 affibody-Cupid の結合活性

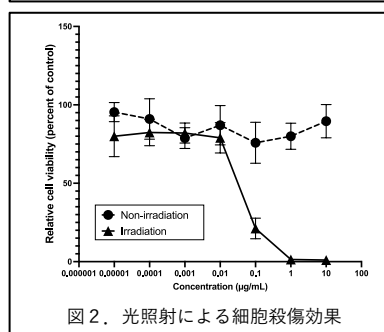


図2. 光照射による細胞殺傷効果

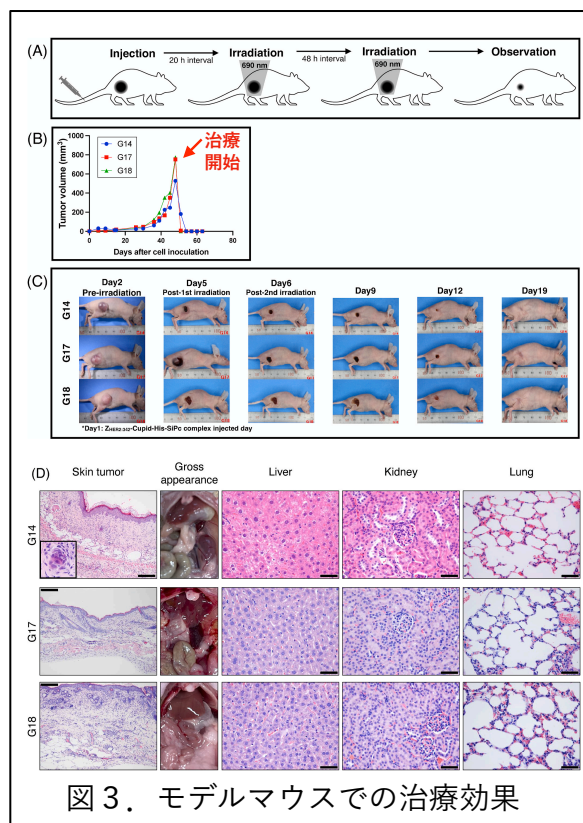


図3. モデルマウスでの治療効果

また、図3の再現性の検証をゼノグラフトモデルマウス (n=10) で実施した。10匹のうち5匹は1回の治療で約100日間、腫瘍の再燃は見られなかった。しかし、残りの5匹は1回目の治療、約30日後から腫瘍の再燃が見られたため、初回治療から63日目に2回目の治療を実施した。2回目の治療後、約30日の観察の間には再燃は見られなかった(図4)。これらの個体は、病理解析により全ての個体で腫瘍が消失していることが確認された。一方、その他の組織は正常に保たれていることが確認された。詳細は引用文献3として論文化済みである。

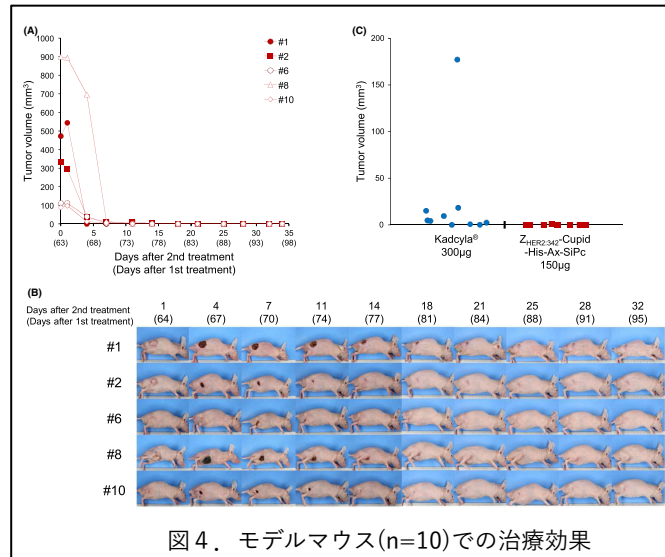


図4. モデルマウス(n=10)での治療効果

(2) 抗HER2 VHH-Cupidは、VHH分子内にジスルフィド結合を有するため、大腸菌の封入体を還元剤入りのバッファーで変性したのち、酸化型グルタチンオンとアルギニンの入ったバッファーで2段階希釈することで正しい分子量を持つHER2 VHH-Cupid融合体が形成されることがSDS-PAGE電気泳動にて確認された。

次に、巻き戻しで得られたタンパク質はBiacore T200によるカイネティクス解析により、Duocarmycin-PsycheとHER2細胞膜ドメイン対し、安定した結合活性が確認され、それぞれのKD値は886 pM (図5A)と1.44 pM (図5B)となった。

また、FITC-Psycheを用いた複合体の内在化評価は、1時間後から内在化の傾向が見られ、24時間後には細胞膜上の滞留がほとんど観察されないことが確認された。

HER2高発現乳がん細胞株KPL-4を皮下移植したゼノグラフトモデルマウス動物モデル(n=2)に対し、2回の投与による腫瘍縮小効果の観察を実施した。投与間隔16日で2回の投与を行ない治療開始、約100日後に病理解析を行なった結果、免疫細胞の浸潤やコレステロールの沈着がある腫瘍の存在が確認されたが、その中には生きたがん細胞は確認されなかった。(図6)。その他の正常組織についても病理学的解析を行い以上のないことが確認された。詳細は引用文献4として論文化済みである。

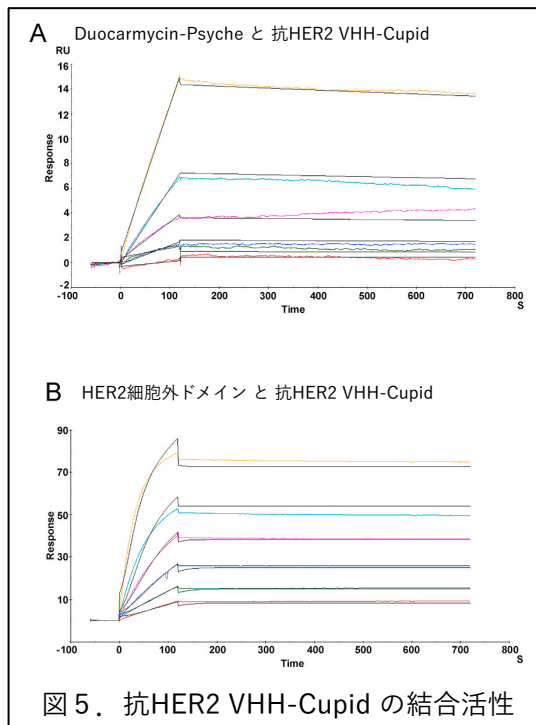


図5. 抗HER2 VHH-Cupidの結合活性

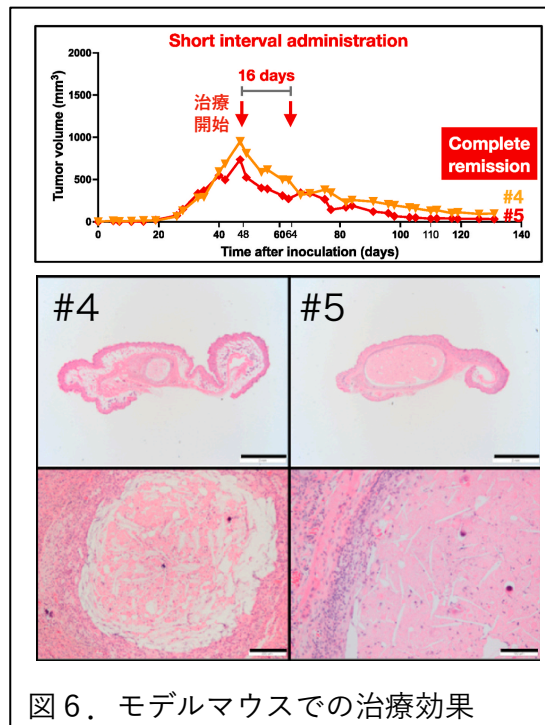


図6. モデルマウスでの治療効果

<引用文献>

1. Sugiyama A, Kawamura T, Tanaka T, Doi H, Yamashita T, Shinoda K, Fujitani H, Yamatsugu K, Shimizu Y, Tatsumi T, Takahashi K, Kanai M, Mizohata E, Kawato T, Doi T, Inoue T, Kodama T, Cupid and Psyche system for the diagnosis and treatment of advanced cancer, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* **95**: 602-611, 2019.
2. Yamatsugu K, Katoh H, Yamashita T, Takahashi K, Aki S, Tatsumi T, Kaneko Y, Kawamura T, Miura M, Ishii M, Ohkubo K, Osawa T, Kodama T, Ishikawa S, Kanai M, Sugiyama A*, Antibody mimetic drug conjugate manufactured by high-yield Escherichia coli expression and non-covalent binding system, *Protein Expr Purif.* **192**: 106043, 2022.
3. Kaneko Y, Yamatsugu K, Yamashita T, Takahashi K, Tanaka T, Aki S, Tatsumi T, Kawamura T, Miura M, Ishii M, Ohkubo K, Osawa T, Kodama T, Ishikawa S, Tsukagoshi M, Chansler M, Sugiyama A*, Kanai M, Katoh H, Pathological complete remission of relapsed tumor by photo-activating antibody-mimetic drug conjugate treatment, *Cancer Sci.* **113**: 4350-4362, 2022.
4. Sakata J, Tatsumi T, Sugiyama A*, Shimizu A, Inagaki Y, Katoh H, Yamashita T, Takahashi K, Aki S, Kaneko Y, Kawamura T, Miura M, Ishii M, Osawa T, Tanaka T, Ishikawa S, Tsukagoshi M, Chansler M, Kodama T, Kanai M, Tokuyama H, Yamatsugu K, Antibody-mimetic drug conjugate with efficient internalization activity using anti-HER2 VHH and duocarmycin, *Protein Expr Purif.* 106375, 2023.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kaneko Yudai, Yamatsugu Kenzo, Yamashita Takefumi, Takahashi Kazuki, Tanaka Toshiya, Aki Sho, Tatsumi Toshifumi, Kawamura Takeshi, Miura Mai, Ishii Masazumi, Ohkubo Kei, Osawa Tsuyoshi, Kodama Tatsuhiko, Ishikawa Shumpei, Tsukagoshi Masanobu, Chansler Michael, Sugiyama Akira, Kanai Motomu, Katoh Hiroto	4. 巻 113
2. 論文標題 Pathological complete remission of relapsed tumor by antibody mimetic drug conjugate treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4350 ~ 4362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15565	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 Yamatsugu Kenzo, Katoh Hiroto, Yamashita Takefumi, Takahashi Kazuki, Aki Sho, Tatsumi Toshifumi, Kaneko Yudai, Kawamura Takeshi, Miura Mai, Ishii Masazumi, Ohkubo Kei, Osawa Tsuyoshi, Kodama Tatsuhiko, Ishikawa Shumpei, Kanai Motomu, Sugiyama Akira	4. 巻 192
2. 論文標題 Antibody mimetic drug conjugate manufactured by high-yield Escherichia coli expression and non-covalent binding system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 106043 ~ 106043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pep.2021.106043	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 Sakata Juri, Tatsumi Toshifumi, Sugiyama Akira, その他	4. 巻 214
2. 論文標題 Antibody-mimetic drug conjugate with efficient internalization activity using anti-HER2 VHH and duocarmycin	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 106375 ~ 106375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pep.2023.106375	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山次健三、高橋和希、加藤洋人、山下雄史、安藝翔、巽俊文、金子雄大、川村猛、三浦麻衣、石井正純、大久保敬、大澤 毅、児玉龍彦、石川俊平、杉山 暁、金井求
2. 発表標題 改変ストレプトアビジン - イミノピオチンを用いた抗体ミメティクス薬物複合体と近赤外治療法への展開
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山次健三、高橋和希、加藤洋人、山下雄史、安藝翔、巽俊文、金子雄大、川村猛、三浦麻衣、石井正純、大久保敬、大澤 毅、児玉龍彦、石川俊平、杉山 暁、金井求
2. 発表標題 改変ストレプトアビジン-イミノビオチンを用いた抗体ミメティクス薬物複合体と近赤外治療法への展開
3. 学会等名 第39回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山次 健三、加藤 洋人、山下 雄史、安藝 翔、巽 俊文、高橋 和希、金子雄大、三浦 麻衣、石井 正純、大久保 敬、大澤 毅、児玉 龍彦、石川俊平、金井 求、杉山 暁
2. 発表標題 改変ストレプトアビジン イミノビオチン薬物送達システムを用いた近赤外治療法の開発(Near-infrared Phototherapy Using Modified Streptavidin-iminobiotin drug delivery system.)
3. 学会等名 日本薬学会第142回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂田樹里、巽俊文、山次健三、児玉龍彦、金井求、徳山英利、杉山暁
2. 発表標題 Antibody Mimetic Drug Conjugateによるがん治療法開発
3. 学会等名 第2回日本抗体学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山次 健三、杉山 暁
2. 発表標題 改変ストレプトアビジン・改変ピオチンを利用した抗がん薬物送達システムの開発
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 V H H抗体とストレプトアビジン変異体との融合タンパク質	発明者 杉山暁、田中十志也、児玉龍彦、その他	権利者 国立大学法人東京大学、その他
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-053049	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	田中 十志也 (Tanaka Toshiya) (20396930)	東京大学・先端科学技術研究センター・特任教授 (12601)	
研究分担者	坂田 樹理 (Sakata Juri) (20772700)	東北大学・薬学研究科・助教 (11301)	
研究分担者	巽 俊文 (Tatsumi Toshifumi) (80868232)	東京大学・アイソトープ総合センター・特任助教 (12601)	

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
---------	---------