

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19401

研究課題名（和文）RANKL逆シグナル遮断薬の新規抗腫瘍薬としての有用性の検証

研究課題名（英文）Evaluation of anti-cancer potential of a novel RANKL reverse signaling inhibitor

研究代表者

本間 雅（Honma, Masashi）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60401072

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々は最近、RANKL逆シグナル経路が骨芽細胞分化および骨形成促進に寄与することを見出したが、免疫系における逆シグナルの役割は未解明である。本研究ではまず、RANKL逆シグナルが選択的に抑制されている変異マウスに対してB16-F10あるいはMC38細胞を皮下移入した場合、腫瘍組織の増大が野生型マウスと比較して遅延することを見出した。また、RANKL逆シグナルを抑制する抗体改変分子を取得し、MC38皮下移入モデルに投与したところ、同様に腫瘍組織の増大が抑制される事が明らかとなった。一方、抗PD-1抗体と併用した場合の上乗せ効果は認められなかった。今後も、作用機構を特定するための検討を継続する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、PD-1やCTLA-4などの免疫チェックポイント分子に対する中和抗体が、種々の癌種の治療に応用されているが、治療効果には大きな個人差があり、また応答性の低い癌種も残されている。そのため、癌免疫療法の効果を増強できる新規治療法が期待されている。本研究によって、RANKL逆シグナルの抑制が、腫瘍組織の増大を抑制できる事が見出された。今後、その作用メカニズムの詳細を明らかにする事で、新規の薬理作用を有する癌免疫療法の開発に繋がる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：We recently found that the RANKL reverse signaling pathway contributes to osteoblast differentiation and bone formation, but the role of RANKL reverse signaling in the immune system remains to be elucidated. In this study, we first found that subcutaneous inoculation of B16-F10 or MC38 cells into RANKL mutant mice, in which RANKL reverse signaling is selectively suppressed, delayed tumor growth compared to wild-type mice. In addition, we obtained modified antibody-like molecules that inhibit RANKL reverse signaling. Administration of the construct inhibiting RANKL reverse signaling to the MC38 subcutaneously-inoculated model suppressed tumor growth as observed in the mutant mice. On the other hand, no additive effect was observed when the antibody-like molecule was used in combination with anti-PD-1 antibody. Further studies will be continued to identify the mechanism of action of inhibiting RANKL reverse signaling.

研究分野：癌免疫療法

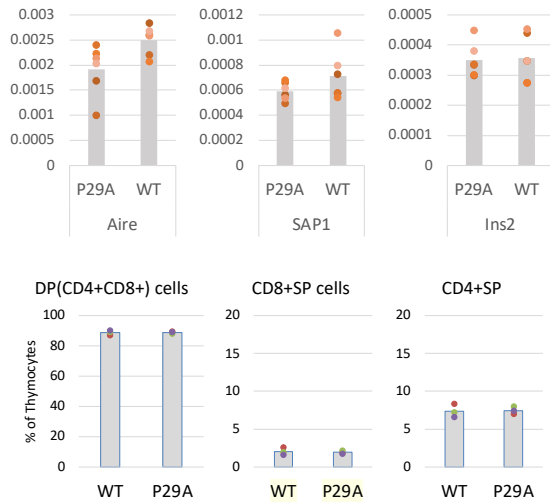
キーワード：RANKL逆シグナル 癌免疫応答 シグナル修飾抗体

## 1. 研究開始当初の背景

RANKL は TNF スーパーファミリーに属する膜貫通タンパク質であり、活性化した T 細胞や骨芽細胞系譜に発現が認められる。RANKL 欠損マウスでは、成熟破骨細胞の消失に伴う骨表現型が顕著であるが、免疫組織の構成細胞でも複数の分化異常が観察される。これらの細胞には、TNF 受容体スーパーファミリーに属する RANK が発現しており、RANKL 刺激を受容することで下流シグナルが活性化され、細胞の分化誘導に至ることが知られている (順シグナル)。

一方、TNF スーパーファミリーに関しては、対応する受容体と結合した際に自身を発現する細胞内でもシグナル経路の活性化が生じるケースが知られている (逆シグナル)。最近になって我々は、RANKL に関しても生体レベルで逆シグナル経路が機能していることを見出した。細胞内ドメインに P29A 点変異を導入することで、RANKL 逆シグナル経路の活性化のみを選択的に抑制したマウスを用いることで、骨芽細胞に発現する RANKL が、破骨細胞由来の細胞外膜小胞に含まれる RANK を受容することで逆シグナル経路が活性化され、骨芽細胞分化が促進されることで骨吸収と骨形成の共役に寄与することが明らかとなった。

しかしながら、免疫系における RANKL 逆シグナルの役割に着目した研究は *in vitro* の解析結果が少数報告されているのみであり、生体レベルの解析は全く進んでいなかった。そこで本研究の計画段階において我々は、P29A 変異導入マウスにおける免疫系の変化に着目した種々の予検討を実施した。RANKL の遺伝子欠損マウスにおいては、腸管膜リンパ節の形成が失われており、胸腺上皮細胞の分化が抑制されていることが報告されている。P29A 変異導入マウスではリンパ節の形成に明確な影響は認められなかった。また、14 日齢の若齢マウスより胸腺を単離し、胸腺上皮細胞のマーカー遺伝子の mRNA 発現量を測定した結果、胸腺上皮細胞の分化と自己抗原の異所性発現を制御する転写因子である Aire の発現量が若干低下している事が確認されたものの、Aire で転写制御されている各種抗原の発現量には影響が認められなかった (右図・上)。加えて、5 週齢のマウスより単離した胸腺において、分化段階の胸腺細胞の割合をフローサイトメトリー手法で評価したが、DP 細胞および SP 細胞いずれの割合に関しても、変異導入マウスと野生型マウスの間で差は認められなかった (右図・下)。さらに、脾臓中の CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 細胞および Treg 細胞についても測定を行ったが、同様に変異導入マウスと野生型マウスの間で差異は認められなかった。



これらの予検討の結果を踏まえると、T 細胞の分化や末梢への供給過程において RANKL 逆シグナル経路が果たす役割は大きくないと推測された。そこで、末梢に局在する T 細胞の機能に対して RANKL 逆シグナルが影響を与える可能性も考慮し、疾患モデルを用いた検討も試みた。その中で、P29A 変異型および野生型マウスに対して B16-F10 メラノーマ細胞を皮下移植し、腫瘍サイズの経時的な変化を追跡した検討では、P29A 変異型で腫瘍サイズの増大が遅延する傾向が観察された。そのため、腫瘍免疫応答で中心的な役割を果たす CD8<sup>+</sup> T 細胞の応答性に RANKL 逆シグナルが関与している可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

上述したような背景を踏まえて本研究では、RANKL 逆シグナルが CD8<sup>+</sup> T 細胞による腫瘍免疫応答に対して抑制的な作用を有している可能性を想定し、RANKL 逆シグナルを遮断する薬剤は腫瘍免疫応答を増強できるか、という点を検証することを目標とした。

近年、PD-1 や CTLA-4 などの免疫チェックポイント分子に対する中和抗体が、種々の癌種の治療に応用されているが、治療効果には大きな個人差があり、また応答性の低い癌種も残されている。そのため、癌免疫療法の効果を増強できる新規治療法が期待されている。もし RANKL 逆シグナル経路を遮断する薬剤が腫瘍免疫応答を増強し、免疫チェックポイント阻害剤との併用効果が得られる事が示されれば、臨床応用に直結する可能性があると考えられた。

## 3. 研究の方法

### (1) RANKL 逆シグナルの抑制が腫瘍組織の増大に与える影響の評価

B16-F10 メラノーマ細胞を用いた予検討で、RANKL 逆シグナルの選択的な抑制が、腫瘍組織

の増大を抑制する可能性が示唆された。そこで、これが B16-F10 特有の現象であるかを確認することも兼ねて、免疫チェックポイント阻害剤への応答性が良好であることが知られている MC38 大腸癌細胞を、P29A 変異導入マウスおよび野生型マウスに皮下移入した上で、腫瘍サイズの変化を経時的に評価した。さらに、腫瘍組織に浸潤するリンパ球 (TIL) に変化が生じているかを検証するために、摘出した腫瘍組織に対して TTDR 試薬を用いて細胞分散処理を行った後、フローサイトメトリー手法で分析した。

### (2) RANKL 逆シグナルの活性を修飾する抗体改変分子の取得

過去の検討から、RANKL 分子が細胞表面で架橋・集積することが、RANKL 逆シグナル経路の活性化をトリガーすることが明らかとなっている。そのため、RANKL 細胞外ドメインに結合する単鎖化抗体可変領域 (scFv) を連結し、RANKL との結合点を多価で有する分子構造を採用すれば、逆シグナルの活性化に有利であると想定された。また一般的に、IgG 抗体 Fc 領域との融合タンパク質とすることで血中滞留性およびタンパク質の産生効率の向上が期待できることが知られているため、Fc 融合タンパク質の構造を採用することとした。一方、分子サイズの増大は骨髄などへの組織移行性の点で不利になると考えられたため、臨床的に骨髄に移行して薬効を発現することが確認されている抗体の分子サイズ (150kDa) を分子量上限として設定した。

以上の点を踏まえ、約 25kDa の scFv を 4 価で有する Fc 融合タンパク質の候補構造を探索することとした。構造が過剰に複雑化することを避けるため、基本骨格としては 2 組の scFv を連結して 2 価の diabody 構造としたもの (scDb) を Fc ヒンジ領域の N 末端側に配置することで、4 価の結合部位を近接した位置関係にまとめて配置した構造 (Type A)、および scFv を Fc 領域の両側に配置することで、4 価の結合部位間に一定の距離を与えて配置した構造 (Type B) の 2 種類を採用した。これらの基本構造を維持した上で、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> の結合順序、Fc サブクラス (IgG1 または IgG2)、およびリンカー長を変更したコンストラクトを多数作成し、タンパク質としての安定性や産生効率、RANKL 逆シグナルへの影響などを評価した。

### (3) RANKL 逆シグナルを遮断する薬剤が腫瘍組織の増大に与える影響の評価

上記で取得した RANKL 逆シグナルの活性を修飾する抗体改変分子を投与することで、P29A 変異導入マウスにおける腫瘍増殖に対する抑制作用がミミックできるかを検証した。野生型マウスに MC38 細胞を皮下移入した担癌マウスモデルに対し、H-L 型および L-H 型の Type A コンストラクトを投与し、腫瘍サイズの経時的な変化を計測した。さらに、腫瘍組織に浸潤するリンパ球 (TIL) に変化が生じているかを検証するために、摘出した腫瘍組織に対して TTDR 試薬を用いて細胞分散処理を行った後、フローサイトメトリー手法で分析した。

## 4. 研究成果

### (1) RANKL 逆シグナルの抑制が腫瘍組織の増大に与える影響の評価

MC38 大腸癌細胞に関しても、B16-F10 メラノーマ細胞の担癌モデルと同様に、P29A 変異導入マウスにおいて、野生型と比較して腫瘍サイズの増大が遅延する傾向が観察された。この結果から、RANKL 逆シグナルの選択的な抑制が腫瘍組織の増大を抑制する作用は、B16-F10 メラノーマ細胞に限定された現象ではなく、他の癌細胞に関しても機能している可能性が示唆された。一方で、腫瘍組織に浸潤している CD4<sup>+</sup>あるいは CD8<sup>+</sup> T 細胞の数をフローサイトメトリー手法で計測したところ、群間で顕著な差異は認められなかった。

### (2) RANKL 逆シグナルの活性を修飾する抗体改変分子の取得

RANKL 逆シグナルを活性化する作用に関しては、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> の結合順序を H-L の順にすることが必須であることが判明した。また特に Type B のコンストラクトに関しては、Fc-scFv 間のリンカー長が短いほど逆シグナル入力能が強い傾向が認められた。一方、タンパク質の産生効率や分解安定性に関しては、Fc-scFv 間のリンカー長を短縮する、あるいは IgG2 由来の Fc 領域を採用するなど、分子の可動性を制限した場合に不利である事が明らかとなった (右表)。

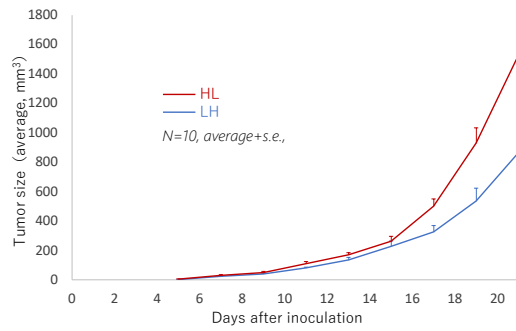
| 基本骨格                                  | Type A |     |     |     | Type B |
|---------------------------------------|--------|-----|-----|-----|--------|
|                                       | H-L型   |     |     |     |        |
| ① V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> 連結順序 |        |     |     |     |        |
| ② Fc 領域 IgG サブクラス                     | 1      | 2   |     | 1   |        |
| ③ Fc-scFv間リンカー長 (残基数)                 | N/A    |     |     |     | 15     |
| ④ Fc 領域ヒンジ部位 N末端側リンカー挿入               | -      | +   | -   | +   | -      |
| a. 分解安定性                              | ○      | ○   | ○   | ○   | ○      |
| b. 凝集性                                | ○      | ○   | ○   | ○   | ○      |
| c. 産生効率                               | ○      | ○   | △   | ○   | ○      |
| e. 分子量分布 (重合体確認)                      | ○      | ○   |     | ×   | ○      |
| d. 逆シグナル入力能 (マウス/ヒト)                  | ++/++  | N/D | N/D | N/D | ++/++  |

さらに、マウスに静脈内投与した際の血中滞留性、および破骨細胞分化抑制活性を指標とした RANKL 順シグナルの遮断活性などを評価し、以降の検討では IgG1 の Fc 領域を用いた Type A のコンストラクトを採用し、L-H 連結順を逆シグナルの抑制コンストラクト、H-L 連結順を逆シグナル活性化コンストラクトとして採用した。

### (3) RANKL 逆シグナルを遮断する薬剤が腫瘍組織の増大に与える影響の評価

MC-38 大腸癌細胞を皮下移入した担癌マウスモデルに対して、逆シグナルを活性化する H-L 型コンストラクトおよび逆シグナルを遮断する L-H 型のコンストラクトを投与したところ、L-

H型のコンストラクトを投与した群において、腫瘍組織の増大が遅延する傾向が認められた(右図)。しかしながら、皮下移入後15, 17, 19日の各時点において、腫瘍組織に浸潤しているCD4<sup>+</sup>あるいはCD8<sup>+</sup>T細胞の数をフローサイトメトリー手法で計測したが、いずれの時点においても群間で差異は認められなかった。加えて、PD-1, Tim-3などのT細胞疲弊マーカーを用いてCD8<sup>+</sup>T細胞の分画も分析したが、いずれの分画に関しても、群間で顕著な差異は認められなかった。



また、抗PD-1抗体とL-H型の抗RANKL抗体改変分子を併用投与した場合の腫瘍サイズの経時的な変動に関しても、同様に評価を行った。しかしながら、L-H型のコンストラクトを単独で投与した場合の腫瘍増大の抑制作用は観察されたものの、抗PD-1抗体の投与群で認められる顕著な腫瘍増大の抑制作用に対して、併用による乗せ効果は検出されなかった。フローサイトメトリーの解析結果と併せると、RANKL逆シグナルの抑制に伴う腫瘍増大の抑制作用は、免疫チェックポイント阻害剤のような、腫瘍組織に浸潤したCD8<sup>+</sup>T細胞の活性化を介したものではない可能性が考えられた。今後、RANKL逆シグナルによって活性が制御されている免疫系細胞を特定し、より効果的に抗腫瘍活性を発揮させる方法論の確立に繋げる必要があると考えて探索を継続している。現在のところ、自然免疫系の細胞の中に、RANKL逆シグナルによって応答性が制御を受けている可能性がある集団が見出されており、この分子機構に関する確認を進めると共に、免疫チェックポイント阻害剤以外の抗腫瘍薬としての応用性が想定できないか検討を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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<br>Honma Masashi                      | 4. 巻<br>158             |
| 2. 論文標題<br>RANKL逆シグナルの新規薬理標的としての可能性          | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Folia Pharmacologica Japonica      | 6. 最初と最後の頁<br>253 ~ 257 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1254/fpj.22145 | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>本間 雅、中村 圭佑、池淵 祐樹、苅谷 嘉顕、鈴木 洋史 |
| 2. 発表標題<br>RANKL分子を標的とした創薬の可能性          |
| 3. 学会等名<br>第95回日本薬理学会年会                 |
| 4. 発表年<br>2022年                         |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

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

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|