

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20789

研究課題名(和文) がん特異的糖鎖修飾を標的とするモノクローナル抗体の開発と抗体医薬品への応用

研究課題名(英文) Development of cancer specific monoclonal antibody for antibody drug

研究代表者

田中 智大 (Tanaka, Tomohiro)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60906634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞においてtrophoblast cell surface antigen 2 (TROP2) の過剰発現が確認されている。我々は、CBIS法を用いて独自の抗TROP2抗体、TrMab-6を開発した。TrMab-6はフローサイトメトリーやウェスタンブロット、免疫組織染色といった様々な実験に使用可能である。TrMab-6は、乳がん細胞株に対し、in vitroでの抗体依存性細胞障害(ADCC)活性、補体依存性細胞障害(CDC)活性を発揮した。さらに、それら乳がん細胞のマウスゼノグラフトモデルに対し、TrMab-6を腹腔内投与することによって腫瘍増殖が抑制され、抗腫瘍効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TROP2に対する抗体は世界的に開発が進んでおり、医薬品としても用いられている。がん治療の標的となる一方で、TROP2の分子制御メカニズムはほとんど明らかになっていない。開発したTrMab-6は様々な実験でTROP2を検出できるため、今後の研究の発展に貢献できる。また、TrMab-6は乳がんモデルに対して抗腫瘍効果も有しているが、TROP2は肺がん、脳腫瘍、前立腺がんなど様々ながん種で高発現しているため、抗体薬物複合体やキメラ抗原受容体療法などへの応用も含め、TrMab-6が今後のがん治療戦略の1つとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Trophoblast cell surface antigen 2 (TROP2) is reported to be overexpressed in several types of cancer. A novel anti-TROP2 monoclonal antibody (clone TrMab-6) was developed using a Cell-Based Immunization and Screening (CBIS) method. TrMab-6 was useful for investigations using flow cytometry, western blot, and immunohistochemistry. TrMab-6 possesses in vitro antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) or complement-dependent cytotoxicity (CDC) activities or in vivo antitumor activities using mouse xenograft breast cancer models by intraperitoneally treatment. TrMab-6 is also expected to have antitumor activity against other cancer types. TrMab-6 could become one of the cancer treatment strategies, including its application to antibody-drug conjugate and chimeric antigen receptor-T therapy.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：モノクローナル抗体 フローサイトメトリー ウェスタンブロット 免疫組織化学染色 がん TROP2  
抗腫瘍 CBIS法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで CasMab 法を用いて、がん悪性化と深くかかわるポドプラニンやポドカリキシンに対するがん特異的抗体を開発し、臨床応用に向けて企業との共同研究も行ってきた。しかし、これらのタンパク質が発現しているがん種は限定的であり、革新的な治療薬の開発にはより汎用性の高い標的に対するがん特異的抗体を開発する必要があった。分子標的薬のターゲットが枯渇しつつある今、新しい治療ターゲットとして trophoblast cell surface antigen 2 (TROP2)への注目は増しており、抗体医薬品の開発が活発化している。TROP2 は上皮細胞接着分子 (EpCAM) ファミリーに属する1回膜貫通タンパク質で、乳がん、肺がん、脳腫瘍、前立腺がん、卵巣がんなど様々ながん種で高発現しているためターゲットとしては理想的であり、TROP2 に対する新規抗体の開発は今後のがん治療戦略に大きな変革をもたらす可能性がある。しかし、臨床応用実現のために最大の問題となるのは、TROP2 が多くの正常組織にも発現していることによる副作用である。副作用のリスクが予想される場合、臨床応用へ向けた企業との連携は不可能となる。そこで、通常の抗体作製法では実現困難な、がん細胞型 TROP2 に対する世界初のがん特異的抗体樹立へ CasMab 法を用いて挑戦する考えに至った。また、がん細胞型 TROP2 のがん病態における機能的役割を解析することで、治療と分子レベルで新しい学術的知見を提供できると考えた。

がんに対する抗体医薬品を開発する場合、抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) や補体依存性細胞障害活性 (CDC) といった機能を有する抗体が有望視されてきたが、抗体医薬品はその強力な特異的結合から正常組織への影響が常に高いリスクとされる。がん特異的抗体はそのリスクを低減できるだけでなく、近年その応用が進みつつあり、光吸収体 (IR700) の複合体に近赤外線を当てることでがん細胞を死滅させる近赤外光線免疫療法、抗体医薬と低分子医薬品とをリンカーで組み合わせた抗体薬物複合体 (ADC) などの、抗体を標的部位に送り込むための案内役として効果を発揮する抗体医薬品の開発が活発化している。また、がん特異的抗体の変換領域の軽鎖と重鎖からなる一本鎖抗体、膜貫通領域と T 細胞受容体の鎖とを組み合わせるキメラ抗原受容体を発現させた T 細胞 (CAR-T 細胞) によるがん治療法が構築されている。そのため、抗原特異性を決定する重鎖や軽鎖の遺伝子情報を基に作製されたがん治療薬も大きな役割を果たしている。がん特異的抗体はがんに対しての特異性が高いため、抗体を応用した医薬品開発と相性が良く、従来の治療に抵抗性のがんについても有効な治療法となる可能性がある。

TROP2-ADC については転移性乳がん、非小細胞肺癌んについて治療効果をあげており、がん治療ターゲットとして適していることが示されている。がん特異的抗 TROP2 抗体の開発により、他の製剤への応用も可能であり、がん治療戦略の拡充が期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、がん細胞型 TROP2 に特異的な新規抗 TROP2 抗体を CasMab 法により樹立する。また、*in vitro* と *in vivo* の両方において新規抗 TROP2 抗体による抗腫瘍効果を検討し、その作用メカニズムを解明し、臨床への応用を目指す。さらに、新規抗 TROP2 抗体の詳細なエピソード解析を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) CasMab 法を用いた TROP2 に対する特異的抗体の樹立

乳がんや膵臓がん、肺がん、脳腫瘍などのがん細胞株に TROP2 を強制発現させた細胞をマウスに腹腔内投与にて免疫し、ハイブリドーマ法によって多数の候補抗体を取得する。抗体のスクリーニングは細胞を基盤とし、TROP2 発現細胞を用いて親株と発現株に対する反応性の違いをフローサイトメトリーで検出する。

#### (2) CasMab 法で樹立した抗体の各種解析

樹立した抗 TROP2 抗体のウェスタンブロット、フローサイトメトリーでの検出を様々な細胞株に対して実施する。

#### (3) CasMab 法で樹立した抗体の抗腫瘍効果の検討

樹立した抗 TROP2 抗体の ADCC・CDC 活性の評価や、マウス担がんモデルを用いて、抗腫瘍効果を検討する。

#### (4) がん細胞型 TROP2 を認識する抗 TROP2 抗体クローンの選択

CasMab 法によって樹立した複数の抗 TROP2 抗体のクローンから、がん細胞の TROP2 にのみ反応し、正常細胞の TROP2 には反応しないクローンを評価する。そのために TROP2 を発現す

るがん細胞株と、正常細胞株への反応性をフローサイトメトリーで検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) TROP2 に対する特異的抗体の作製

乳がんや膵臓がん、肺がん、脳腫瘍などの細胞株に TROP2 を強制発現させた細胞株を樹立した。これら細胞株をそれぞれ常法に従いマウスに腹腔内投与にて免疫し、マウスの脾細胞とミエローム細胞 (P3U1) との細胞融合を行った。得られたハイブリドーマの培養上清をフローサイトメトリーでスクリーニングし、TROP2 を特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別した。さらに限界希釈法によってシングルクローン化し、TrMab-6 (mouse IgG<sub>2b</sub>, kappa) を樹立した。

##### (2) ウェスタンブロットとフローサイトメトリーによる TrMab-6 の反応性確認

TROP2 を強制発現した細胞株 (CHO/TROP2) 乳がん細胞株 (MCF7) およびトリプルネガティブ乳がん細胞株 (MDA-MB-231, MDA-MB-468) の乳がん細胞モデルに対する TrMab-6 の反応性をウェスタンブロットおよびフローサイトメトリーで調べた。結果、ウェスタンブロットで、いずれの細胞についても TROP2 特異的なバンドが認められた。さらに、フローサイトメトリー解析についてもいずれの細胞株に対しても TrMab-6 は高い反応性を示した。

##### (3) ADCC 活性および CDC 活性の評価

乳がん細胞モデルに対し、TrMab-6 が ADCC 活性および CDC 活性を示すか検討を行った。結果、CHO/TROP2、MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-468 のいずれの乳がん細胞モデルに対しても有意に ADCC 活性および CDC 活性を示した。

##### (4) 抗腫瘍効果の検討

TrMab-6 が乳がん細胞モデルに対して抗腫瘍効果を示すか検討を行った。CHO/TROP2、MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-468 の細胞株をヌードマウスの皮下に移植し、その7日後に TrMab-6 およびコントロール抗体をマウス1匹あたり 100 µg で腹腔内投与した。抗体は観察期間中2回追加投与 (計3回) を行った。腫瘍の大きさの測定を適宜実施、観察最終日にマウスの解剖を行い、皮下腫瘍の重量を測定した。マウスの体重変化についても期間中モニターした。その結果、CHO/TROP2、MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-468 のいずれの乳がん細胞モデルに対しても有意に腫瘍の縮小効果を示した。TrMab-6 の投与によるマウスの体重変化への影響や、毒性などは観察されなかった。

以上のことから、TrMab-6 は様々な実験において TROP2 を検出可能であることが明らかとなった。さらに、TrMab-6 が TROP2 を発現する乳がん細胞に対し治療効果をもたらす可能性が示唆された。

##### (5) がん特異的抗 TROP2 抗体の樹立

CasMab 法によって樹立された 200 クローン以上の抗 TROP2 抗体から、がん細胞の TROP2 にのみ反応し、正常細胞の TROP2 には反応しないクローンのスクリーニングを行った。結果、いくつかのがん特異的抗 TROP2 抗体クローンが確認された。これらのクローンの特性やエピトープなどは解析途中であるが、乳がん細胞株 (MDA-MB-157 および MDA-MB-361) ならびに膵臓がん細胞株 (PANC-1) に TROP2 を強制発現させた細胞株を免疫したマウス由来のクローンであった。

がん特異的抗 TROP2 抗体は、今後の抗腫瘍活性や特性解析を進めることで、新たな治療戦略の1つとなる可能性があり、ADC やキメラ抗原受容体療法への応用も期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Tanaka Tomohiro, Ohishi Tomokazu, Saito Masaki, Kawada Manabu, Kaneko Mika K., Kato Yukinari	4. 巻 41
2. 論文標題 TrMab-6 Exerts Antitumor Activity in Mouse Xenograft Models of Breast Cancers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 32 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2021.0056	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 Tanaka Tomohiro, Ohishi Tomokazu, Asano Teizo, Takei Junko, Nanamiya Ren, Hosono Hideki, Sano Masato, Harada Hiroyuki, Kawada Manabu, Kaneko Mika, Kato Yukinari	4. 巻 46
2. 論文標題 An anti-TROP2 monoclonal antibody TrMab-6 exerts antitumor activity in breast cancer mouse xenograft models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2021.8083	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中智大、大石智一、川田学、加藤幸成
2. 発表標題 Anti-TROP2 monoclonal antibody TrMab-6 exerts antitumor activity in breast cancer model
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中智大、大石智一、浅野禎三、佐野雅人、斎藤将樹、鈴木裕之、金子美華、川田学、加藤幸成
2. 発表標題 ヒト乳がんのマウス移植片モデルにおける抗TROP2抗体の抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第72回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中智大、大石智一、川田学、金子美華、加藤幸成
2. 発表標題 抗TROP2モノクローナル抗体TrMab-6の乳がんモデルに対する抗腫瘍効果
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中智大、鈴木裕之、大石智一、川田学、金子美華、加藤幸成
2. 発表標題 A novel anti-TROP2 monoclonal antibody TrMab-6 possesses antitumor activity in breast cancer models
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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