

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501309

研究課題名(和文)高性能イミュノトキシンを用いた急性骨髄性白血病の標的化治療

研究課題名(英文)Generation of immunotoxins with super-targeting mAb in the acute myelocytic leukemia

研究代表者

山口 美樹 (YAMAGUCHI, MIKI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：10530454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：私たちはジフテリア毒素(DT)とプロテインG(3C)を含むリコンビナントタンパクであるDT3Cを開発した。DT3Cとモノクローナル抗体(MoAb)の結合は容易でありMoAb-DT3C結合体は表面抗原に結合し細胞内へ移行することで殺細胞効果を示す。この系を応用した選択法で腫瘍細胞に特異的なMoAbの樹立が可能であり、私たちは224個のMoAbを樹立した。これらのMoAbはいずれも高いイミュノトキシン活性を示し、抗体薬候補分子に対する抗体が多く含まれていた。また、現在標的治療薬として開発中の抗体が多く含まれており、この方法が抗体薬物複合体(ADC)治療に有効な抗体の選別法であることが示された。

研究成果の概要(英文)：We generated a recombinant fusion protein DT3C, which contained the catalytic and translocation domain of the truncated diphtheria toxin (DT) as well as the three IgG-binding C domains of streptococcal protein G (3C). Fc of MoAb binds with DT3C, resulting in a MoAb-DT3C complex (two DT3C molecules conjugated with one IgG molecule). The MoAb-DT3C complex binds with the surface Ag, being followed by internalization and translocation into the cytoplasm, leads to the cytotoxic effect by protein synthesis inhibition of DT. By using these, we developed a unique screening system to establish cancer-targetable antigens/antibodies sets. In total 224 MoAb clones were obtained which performed immunotoxin cytotoxic on leukemic cells. Our method provide an excellent way to obtain promising superior mAbs for antibodies drug conjugation(ADC) therapy.

研究分野：総合領域

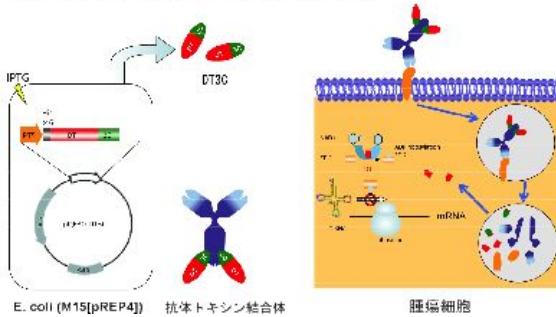
科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：AML 標的治療 イミュノトキシン モノクローナル抗体 DT3C ADC

1. 研究開始当初の背景

AMLの分子標的化薬は、マウス抗CD33抗体とカリケアマイシンの結合体であるゲムツズマブオゾガマイシン、および抗CD22抗体とカリケアマイシンの結合体であるイノツズマブオゾガマイシンが認可を受け使用されている。これらの結合体は造血器腫瘍の治療に対して有効性が証明されている反面、薬剤やトキシンと抗体の結合に必須であるリンカーの不安定性、トキシン自体の高免疫原性や腫瘍細胞への低い取り込み能などが問題となり、臨床的に有益な抗体の開発が困難な側面を持っている。申請者らが開発したDT3C(図1)は、ジフテリア毒素(DT)のA領域とプロテインGの領域を3個(3C)兼ね備えた融合タンパクである。DT3Cは細胞内へ取り込まれることで、タンパク合成阻害により細胞死を誘導する(図1)。

図1 抗体トキシン結合体および作用機序



DT3Cは抗体のFc部分に特異的に結合し安定である。このことにより、抗体スクリーニングが容易に行うことが可能になっている。このスクリーニングで得られた抗体の特徴は、抗体の細胞内への内部移行を直接的に観ていることから、薬剤(あるいは毒素)を細胞内へ効率よく運ぶことが出来る。したがって、DT3Cを用いた抗体スクリーニングは、抗体と薬剤(および毒素)結合体(ADC)を用いた治療薬の開発に最も適した方法と考えられる。

2. 研究の目的

近年、急性骨髄性白血病(AML)の治療成績は、化学療法・分化誘導療法の開発あるいは移植治療の充実により向上してきた。しかしながら、未だに難治性のAML症例が多く存在している。本研究の目的は、これらの難治性AMLに対し直接的に作用する免疫トキシンを用いた分子標的治療の開発である。申請者らはジフテリア毒素とプロテインGのC領域を兼ね備えたりコンビナント

DT3Cの開発に成功した(図1)。DT3Cは抗体への結合が容易であり、抗体とDT3Cの結合体が細胞内へ内部移行すると強力な殺細胞効果を示す。このDT3Cを用いたユニークなスクリーニング法を用いて、殺細胞効果の優れた標的抗原と抗体を同時に樹立し、難治性AMLに対する新たな分子標的療法の開発を目指すものである。

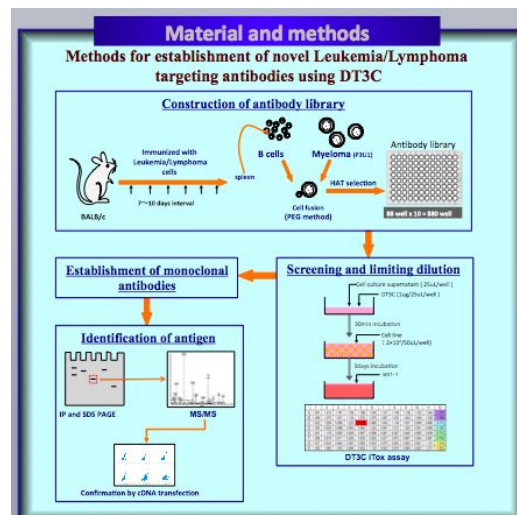
3. 研究の方法

本研究計画では、AMLを対象として、免疫トキシンとして効果の高い抗原および抗体を探索樹立し、臨床医薬への実用化を目指すものである。

具体的には、

- a) AML細胞株をマウスに免疫して抗体ライブラリーを作製する。
- b) DT3Cを用いた独特なスクリーニング法でAMLに対して高い殺細胞効果を示す抗体を樹立する。
- c) 免疫沈降および質量分析により、抗体で認識される抗原分子の同定を行う(図2)。
- d) AMLに対して選択的治療効果が期待できる標的化分子に関して、実用化に必要な解析を進める。

図2 腫瘍細胞に対する標的化モノクローナル抗体の樹立



4. 研究成果

本研究は平成23年から平成25年度までの3年計画で進められてきた。この研究の目的は難治性AMLに対する抗体薬物結合体(ADC)治療薬の開発である。申請者はモノクローナル抗体と混合するだけで簡単に免疫トキシンを形成できるリコンビナントタンパク質(DT3C)の作製に

成功した。DT3C はモノクローナル抗体との結合体形成 (モノクローナル抗体-DT3C 結合体: MoAb-DT3C) が容易であり、MoAb-DT3C を腫瘍細胞に作用することで細胞内へ移行されタンパク合成阻害により強力な殺細胞効果を示す。この DT3C を用いた抗体スクリーニングに利用することで ADC 治療薬に適したモノクローナル抗体を得ることが可能である。申請者は急性骨髄性白血病およびその他の白血病細胞株である TF1, MY, KG1, SKM1, HL60, MEG01 などを Balb/c マウスに免疫し抗体ライブラリーを作製、DT3C を用いた抗体スクリーニングを利用してモノクローナル抗体を樹立した。現在までに 224 個のモノクローナル抗体が樹立され 135 抗体の標的分子が同定された。同定された標的分子は CD71, CD47, CD99, CD317, CD30, CD43, CD38, CD147, CD4, CD44, CD321, CD98hc, CD107a, CD151, CD224, CD59, CD81, ICAM2, MHC ClassI, MHC ClassII など 20 種類である。これらの抗体は強い殺細胞効果を示すことからいずれも治療薬の候補抗体といえる。しかしながら、正常主要臓器 (特に腎臓、肝臓、脳、心臓など) での発現は副作用のリスクを高めることが示唆される。このことから、これらの標的分子の正常主要臓器における発現は低いことが条件となる。申請者らは BioGPS などのデータベースを活用して主要正常臓器での発現が低い標的分子について検索した。この条件をクリアした標的分子は CD30, CD38, CD43, CD47, CD71 である。これらについて ADC 治療薬としての有用性について検討を進める。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) Wang PY, Currier MA, Hansford L, Kaplan D, Chiocca EA, Uchida H, Goins WF, Cohen JB, Glorioso JC, van Kuppevelt TH, Mo X, Cripe TP. Expression of HSV-1 receptors in EBV-associated lymphoproliferative disease determines susceptibility to oncolytic HSV. *Gene Ther.* 2013 Jul;20(7):761-9. 査読あり
PMCID: PMC3609913
NIHMSID: NIHMS421745

- 2) Uchida H, Marzulli M, Nakano K, Goins WF, Chan J, Hong CH, Mazzacurati L, Yoo JY, Haseley A, Nakashima H, Baek H, Kwon H, Kumagai I, Kuroki M, Kaur B, Chiocca EA, Grandi P, Cohen JB, Glorioso JC. Effective treatment of an orthotopic xenograft model of human glioblastoma using an EGFR-retargeted oncolytic herpes simplex virus. *Mol Ther.* 2013 Mar;21(3):561-9. 査読あり
PMCID: PMC3589172
- 3) Uchida H, Chan J, Shrivastava I, Reinhart B, Grandi P, Glorioso JC, Cohen JB. Novel mutations in gB and gH circumvent the requirement for known gD receptors in HSV-1 entry and cell-to-cell spread. *J Virol.* 2013 Feb;87(3):1430-42 査読あり
PMCID: PMC3554156
- 4) Takenouchi M, Hirai S, Sakuragi N, Yagita H, Hamada H, Kato K. Epigenetic modulation enhances the therapeutic effect of anti-IL-13R(alpha)2 antibody in human mesothelioma xenografts. *Clin Cancer Res.* 2011 May 1;17(9):2819-29. 査読あり
PMID: 21357681

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) 山口美樹、西井ゆかり、濱田洋文 「急性骨髄性白血病に対するスーパー標的化抗体を用いたイミュノトキシンの開発」第 75 回日本血液学会学術集会、平成 25 年 10 月 12 日、札幌
- 2) 西井ゆかり、山口美樹、平井幸恵、内田宏昭、濱田洋文 「白血病/リンパ腫に対するスーパー標的化抗体を用いたイミュノトキシンの開発」第 72 回日本癌学会学術総会、平成 25 年 10 月 3 日、横浜
- 3) 西井ゆかり、山口美樹、平井幸恵、濱田洋文 「スーパー標的化抗体を用いた immunotoxin の開発: AML に対する抗 CD71 抗体を用いた抗腫瘍活性」第 71 回日本癌学会学術総会、平成 24 年 9 月 20 日、札幌
- 4) 平井幸恵、山口美樹、濱田洋文 「メラ

ノーマ標的化新規モノクローナル抗体の網羅的解析」第71回日本癌学会学術総会、平成24年9月19日、札幌

- 5) 平井幸恵、山口美樹、濱田洋文「メラノーマに対する新規標的化抗体の樹立と機能解析」第70回日本癌学会学術総会、平成23年10月5日、名古屋
- 6) 山口美樹、西井ゆかり、平井幸恵、濱田洋文「スーパー標的化抗体を用いたImmunotoxinの開発：非小細胞肺癌に対するCD59抗体を用いた抗腫瘍活性」第70回日本癌学会学術総会、平成23年10月5日、名古屋

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：抗Trop-2抗体
発明者：山口美樹、加藤和則、濱田洋文、他
権利者：札幌医科大学
種類：特許
番号：PCT/2011/063294, US20120237518
出願年月日：平成23年6月9日
国内外の別：国内、US

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sapmed.ac.jp/molm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口美樹 (YAMAGUCHI MIKI)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：10530454

(2) 研究分担者

濱田洋文 (HAMADA HIROFUMI)
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号：00189614

平井幸恵 (HIRAI SACHIE)
札幌医科大学・医学部・助手
研究者番号：20218754

内田宏昭 (UCHIDA HIROAKI)
東京薬科大学・生命科学部・准教授
研究者番号：20401250

(3) 連携研究者
なし