

先端のがん特異的抗体創製基盤技術開発とその臨床応用

加藤 幸成^{1,2}

がん細胞に対する抗体医薬開発を行う場合、がん細胞に特異的な抗体でなければ正常組織への毒性が常に懸念される。過去の抗体医薬開発の戦略を振り返ると、オミックス解析を用いてがん／正常比が高い抗原を狙うことが多く、がん細胞に高発現の膜タンパク質であったとしても、正常組織にも高発現している場合は標的候補分子から外されてきた。がん／正常比が高く、かつ正常組織の発現レベルが低い新規標的分子は現在枯渇しており、新たな抗体医薬を開発するのが困難な状況が続いている。そこで製薬会社を中心として、すでに抗体医薬が存在する標的分子に対し、抗腫瘍効果のさらに高い抗体医薬開発や、抗体薬物複合体 (ADC)、キメラ型抗原受容体発現 T 細胞 (CAR-T) 療法、二重特異的抗体を用いた T 細胞誘導療法など、種々のモダリティへの応用研究が活発化している。この現状を開拓するためには、標的分子ががん細胞と正常細胞に同等に発現していたとしても、がん細胞の標的分子のみに特異的に反応するモノクローナル抗体を樹立する技術が必要である。我々はこれまで、がん特異的糖鎖を発現する細胞株や独自開発のアフィニティタグシステムを駆使することにより、がん特異的抗原を大量に作製するプラットフォームを開発した。フローサイトメトリーや免疫組織染色のスクリーニング法を最適化することにより、がん特異的抗体の樹立法 (CasMab 法) を確立した。また、免疫やスクリーニングに細胞株のみを使った細胞基盤免疫選択法 (CBIS 法) を開発し、精製が困難なタンパク質に対する抗体を迅速に作製できるようになってきた。がん特異的抗体の開発は、がん患者に対する副作用を限りなく低減させるだけでなく、抗体医薬を開発する企業にとってもリスクが少なく、今後のバイオ医薬品の開発にとって重要な課題である。本稿では、がん特異的抗体開発の戦略を、いくつかの実施例を使って紹介する。

キーワード：モノクローナル抗体、がん特異的抗体、CasMab

1. はじめに

タンパク質・糖鎖・脂質を、高感度かつ特異的に検出できる実験手法を考えると、必ず抗体が必要となる。抗体 (IgG) は分子量が約 15 万の大きなタンパク質であるが、感度・特異度の両方において、抗体を上回るものはない¹⁾。抗体に種々の酵素や蛍光色素を付加することで、flow cytometry (FCM)、Western blot (WB)、immunohistochemistry (IHC) などの様々な実験系に使われる。モノクローナル抗体は単一のエピトープを持ち、実験的ツールとしてだけでなく、免疫疾患やがんなどのあらゆる病気の診断や治療に活用されている。古くから腫瘍マーカーと呼ばれているものは、糖鎖に対する抗体が使用されている²⁾。2017 年度の統計によると、年間 1000 億円以上を売り上げる医薬品 (ブロッバスター) として、46 品目の生物学的製剤があり、そのうち抗体医薬品は 23 品目となっている。最近、生

体で産生されるような IgG だけでなく、抗体工学技術の発展により様々な小分子化抗体 (scFv や nanobody など) が開発されている³⁾。さらに、抗体薬物複合体 (antibody drug conjugate : ADC)、二重特異性抗体 (bispecific T-cell engager : BiTE)、キメラ型抗原受容体発現 T 細胞 (CAR-T) 療法などの新しいモダリティが開発され、国内外の製薬企業を中心に、抗体の治療への応用が活発化している。

2. がん特異的抗体の開発の歴史と課題

がん細胞を標的として抗体医薬を開発する場合、どんなに抗体を改変しても、あるいは、どんなに強力な抗がん剤付加や免疫細胞誘導を行ったとしても、がん細胞に特異的な抗体でなければ常に正常組織への毒性が懸念され、臨床応用は困難である。特に、抗体医薬などのバイオ医薬に対し製薬会社が投資する開発費は膨大であり、臨床試験で患者への有害事象が起こる可能性が少しでもあれば、製薬会

¹ 東北大学 未来科学技術共同研究センター、² 東北大学大学院 医学系研究科 抗体創薬研究分野
(〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町 2-1)

E-mail: yukinarikato@med.tohoku.ac.jp 原稿受領日：2020 年 1 月 9 日、依頼原稿



社が開発に乗り出すことはできない。しかし、がん細胞のみに高発現している分子は限られており、理想的な新規標的分子は枯渇したと言われている。過去の抗体医薬開発の戦略を振り返ると、DNA マイクロアレイやプロテオミクス解析により、がん／正常比が高い抗原を狙うことが多く、がん細胞に高発現の膜タンパク質であったとしても、正常組織にも高発現している場合は標的候補分子から外されてきた。次に注目され始めたのが、糖鎖を対象としたグライコミクスや糖ペプチドを対象としたグライコプロテオミクスである²⁾。CA19-9などの腫瘍マーカーは、糖鎖に対する抗体が使われており、様々ながんの診断に役立っている。同様に抗体医薬の標的としても糖鎖や糖ペプチドが候補にあがってきているが、糖鎖に対する抗体は、一般的にがん細胞に対する特異性が乏しい。そこで、ある膜タンパク質について、がん細胞と正常細胞の糖鎖構造付加の差を、質量分析計やレクチンマイクロアレイなどによって検出しようとする研究が様々な国家プロジェクトで実施されてきた。しかし、膜タンパク質への糖鎖付加は不均一性があることが原因となり、がん特異的糖鎖構造が膜タンパク質に付加されているという明確な結論はほとんど出ていない。O型糖鎖の場合は、セリンあるいはスレオニンに糖鎖が付加されることがわかっているが、ムチン型タンパク質の複数のセリンやスレオニンのどこにどの程度、がん特異的な糖鎖が付加されているかを決定することは、今でも非常に難しい作業である。仮にがん特異的糖鎖構造やその付加位置が決定されたとしても、免疫原として糖ペプチドの合成を高純度に大量に行うことは、通常のアカデミアの研究室では不可能であり、ペプチド合成のように受託企業で合成をしてもらうことも予算的に困難である。以上のことから、がん細胞と正常細胞から精製した各膜タンパク質に付加した糖鎖などの翻訳後修飾の違いを発見し、その違いに対してがん細胞に特異的な抗体を作製する戦略は理解しやすいが、上述の通り、実際の作業として実施するのは困難である。

3. ポドプラニンの発見と高機能抗体の開発

過去の多くの研究において、がん細胞による血小板凝集と血行性転移に相関があることは報告された。がん細胞による血小板凝集を阻害することによりがんの転移を抑制しようという治療戦略も世界中で考案されてきたが、臨床応用はされていない。gp44という血小板凝集因子は、マウス大腸がん細胞に高発現しており、がんの転移と相関がある分子として注目された⁴⁾。gp44はムチン型タンパク質であり、多くのO型糖鎖が付加され血小板凝集に重要な役割を果たしていることがわかった⁵⁾。gp44に対する特異的抗体(8F11)が作製され、過剰発現したgp44によって引き起こされるがん転移が8F11によって有意に抑制された⁶⁾。2003年になり、我々はgp44の遺伝子がポドプラニン(podoplanin/PDPN)であることを発見した⁷⁾。PDPNはC末端に膜貫通部位を有したI型膜貫通タンパク質であり、リンパ管マーカーとして病理診断に活用されている。また、

8F11のエピトープ解析や詳細な変異実験を実施し、PDPNのN末端にEDxxVTPGの3回繰り返し配列(PLAG domain)を発見した。PDPNにはPLAG domainの類似配列が存在することもわかり、それをPLAG-like domain (PLD)と名付けた。PLAG domainやPLD中のスレオニンがPDPNによる血小板凝集の活性中心であり、種を超えて保存されていることがわかった⁸⁾。PDPNはその分子量の約半分がO型糖鎖であり、血小板凝集活性には糖鎖が重要であることが示唆されていた。我々は、糖鎖合成不全の変異CHO細胞株を用いることにより、PLAG domainのスレオニンに付加されているO型糖鎖のシアル酸が血小板凝集の活性中心であることを解明した⁹⁾。質量分析計を用いてPDPNの糖鎖構造を解析した結果、PDPNには4つの単糖からなる糖鎖(disialyl-core1)が付加されていた。このように、一つの分子の一方所の糖鎖を決めるために、かなりの時間と労力を費やしたが、このdisialyl-core1は比較的どこにでも存在する糖鎖であり、がんの血小板凝集能に特徴的ではなかったため、この糖鎖を狙った医薬品開発は困難であった。

上述した通り、血小板凝集に重要な糖鎖(disialyl-core1)はあらゆるタンパク質に付加されているため、この糖鎖を狙った中和抗体は、特異的な転移阻害薬にはならない。そこで、がん細胞に高発現したPDPNによる血小板凝集を特異的に抑制する抗体を作製することでPDPNによるがん転移を抑制でき、さらには抗腫瘍効果も高い抗体を樹立するという治療戦略を考案した。筆者らは2006年に、ヒトPDPNのPLAG domainに対し感度・特異度・親和性の高いモノクローナル抗体(NZ-1)を開発し、PDPNによる血小板凝集やがん転移を有意に抑制できることを証明した¹⁰⁾。カニクイザルを用いた安全性試験によって、NZ-1のヒト化抗体には毒性が全くないことも確認した。

これまでの多くの研究において、PDPNはリンパ管内皮細胞、I型肺胞上皮細胞、腎ポドサイト、皮膚基底層など、複数の正常細胞に高発現していることがわかっている¹¹⁾。また、PDPNによる血小板凝集は、リンパ管の発生などの正常の機能にも重要であることが報告され¹²⁾、PLAG domainやPLDを狙うことも、がん特異性がないことがわかってきた。既述の通り、NZ-1のように正常細胞に反応し、少しでも副作用が懸念されるモノクローナル抗体は、製薬企業は開発しようとしにくい。これはすべての標的分子についても該当することであり、医薬品開発を目標とした場合には、分子の機能解析や構造解析をもとにしたモノクローナル抗体の開発には限界があった。一方、NZ-1抗体の開発をきっかけとして、PDPNの機能解明や糖鎖構造解析が飛躍的に進んだことは特筆すべきことであり、基礎研究においてモノクローナル抗体を樹立することの重要性に変わりはない。我々は、NZ-1抗体を他の分子の高精度精製にも応用するため、NZ-1の認識ペプチドをペプチドタグとし、PDPN/Aggrus(PA)タグというペプチドタグシステムを確立した(Aggrusとは、血小板をアグらせる(aggregateさせる)ということから命名した造語)¹³⁾。PAタグシステムを用いて、これまで多くのタンパク質の高難度精製に成功している¹⁴⁾。

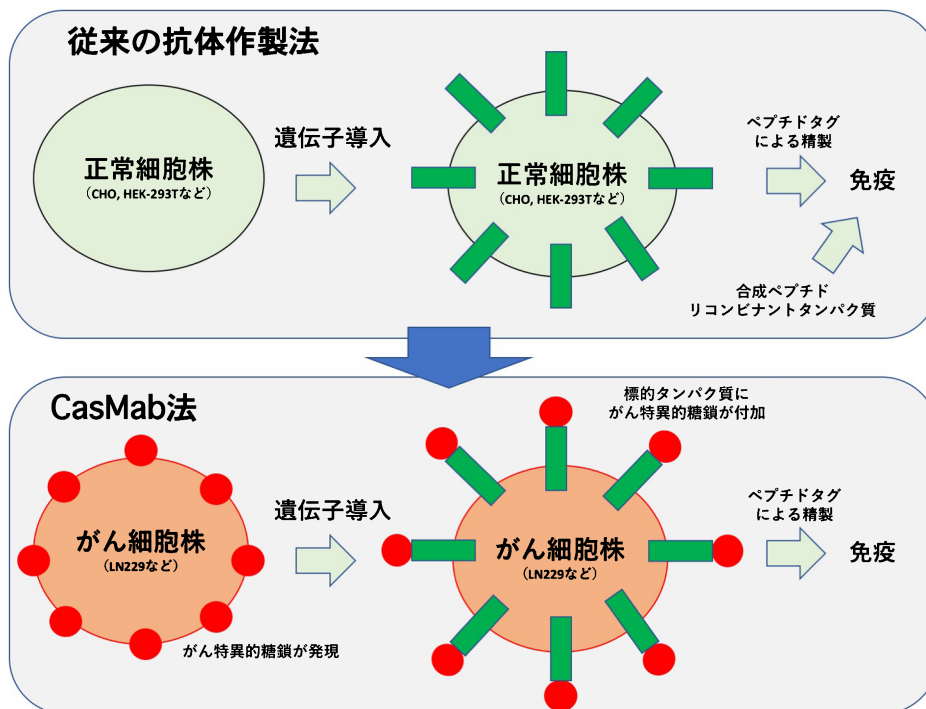


図1 従来の抗体作製法と CasMab 法の比較

4. がん特異的抗体作製法（CasMab 法）の開発

がん細胞と正常細胞に発現しているPDPNのアミノ酸配列は全く同じであるため、がん特異的抗体を樹立するためには、糖鎖付加などの翻訳後修飾を狙う必要がある。既述の通り、質量分析計などの最新機器を駆使しても、PDPNの糖鎖についてがんと正常の差を発見することができなかったため、逆の戦略を立てることにした。すなわち、がん型PDPNが存在するという仮説を立て、まず抗体を先に作ってから、がん特異的糖鎖付加を証明しようと考えた。

LN229という脳腫瘍細胞株にPDPNを発現すると、正常細胞のPDPNには付加されない糖鎖が付加されていることがわかったが、どこにどれだけ付加されているかは証明できなかった。そこで、PDPNの高発現株であるLN229/hPDPNをマウスに複数回免疫し、FCMやIHCにより、がん特異的抗体をスクリーニングした。このように、免疫原の作製に、がん細胞株を使用する方法を、cancer-specific mAb (CasMab)法と命名した(図1)。この方法論により、PDPNに対するがん特異的抗体(LpMab-2)の樹立に成功した¹⁵⁾。がん特異的抗体は、糖鎖をエピトープに含むことがわかった。ヒトキメラ型抗体による抗腫瘍効果が高いことを証明し、カニクイザルを用いた毒性試験も行った結果、全く毒性がないことが判明し、ついに製薬企業への導出に成功した。今回は、免疫原としてLN229/hPDPNを用いており、精製したタンパク質を免疫原として用いていないことも、がん特異的抗体樹立に成功した理由だと考えている。

最初に掲げた戦略の通り、樹立したLpMab-2のエピトープ解析を行った。LpMab-2が認識するエピ

トープが、PDPNのがん型糖ペプチドとなる。常法に従い、PDPNのdeletion mutantやpoint mutantを複数作製しエピトープ解析を行なった結果、LpMab-2はThr55/Ser56を含む糖ペプチドを認識することがわかった¹⁵⁾。すなわち、Thr55/Ser56に付加するO型糖鎖が、PDPNのがん特異的糖鎖であることが示された。その後、PDPNのThr55/Ser56をエピトープに含む別のがん特異的抗体(LpMab-23)を樹立し、CasMab法に再現性があることを示した¹⁶⁾。また、Thr55/Ser56以外にも、Thr52やThr85にがん特異的糖鎖が付加しており、それぞれのがん特異的抗体の開発に成功している。このように、ひとつの分子にも複数のがん型糖鎖が付加していることから、CasMab法により網羅的にがん特異的抗体を作製することの意義を示すことができた。がん細胞への糖鎖付加には不均一性があり、糖鎖や糖ペプチドを標的としても十分な効果が得られないのではないかという意見も聞かれるが、PDPNの複数のがん特異的糖鎖を標的として抗体医薬開発を行うことにより、糖鎖付加の不均一性の問題を解決できると考えている。

5. 細胞基盤免疫選択法（CBIS 法）の開発

通常の抗体作製には、精製したタンパク質が必要であるが、必ずしも容易にタンパク質が精製できるわけではない。上述の通り、精製の難易度の高い膜タンパク質、例えばGPCRの場合には、我々が開発したPAタグやMAPタグ¹⁷⁾を使用することにより解決する場合もあるが、それでも精製が困難なタンパク質は多く存在する。そこで我々は、免疫原として強制発現株を使用し、ハイスループットスクリーニングにも細胞株のみを使用するという細胞基盤免疫

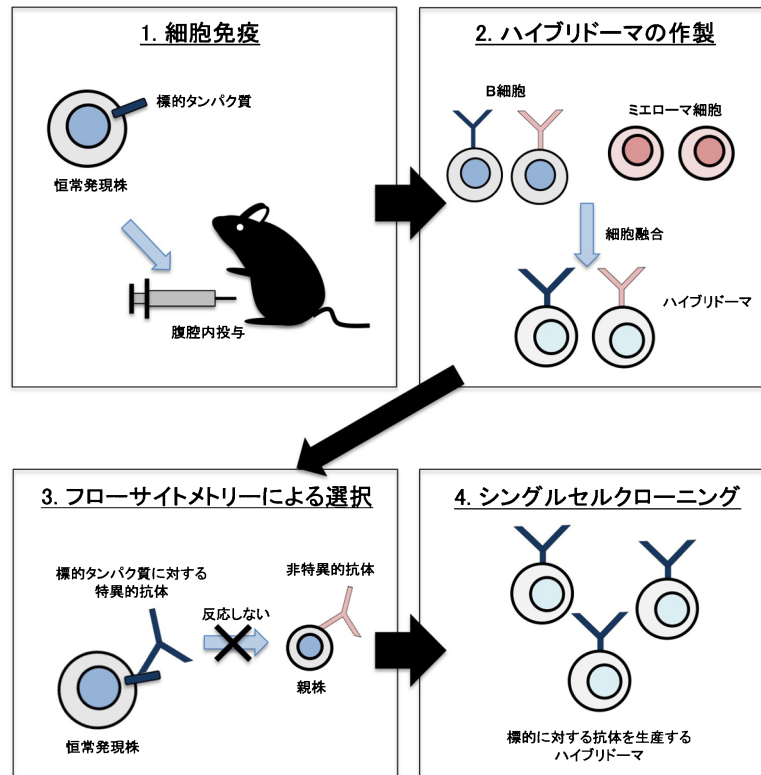


図2 CBIS 法の流れ

選択法 (cell-based immunization and screening : CBIS 法) の開発を行った (図 2)。強制発現株に使用する細胞株は、CHO-K1 や HEK-293T などのタンパク質発現用の細胞や、各種がん細胞を用いる。またハイスループットスクリーニングには、5～10 枚の 96 well plate を半日で処理する必要があるため、高速フローサイトメーターが必要となる。我々はラボ内に 4 台の高速フローサイトメーター (Sony 製) を完備し、これを実現した。この CBIS 法により、どのような複雑な構造を持つタンパク質に対しても、迅速に高効率に抗体を樹立することが可能となった。具体例として、5 回膜貫通タンパク質の CD133⁽¹⁸⁾ に対し、FCM, WB, IHC に有用な抗体を短期間に樹立することができた。この CBIS 法と CasMab 法を組み合わせることにより、効率よくがん特異的抗体が樹立できることもわかってきており、さらに複数の新規標的に対するがん特異的抗体を樹立していく予定である。

6. おわりに

PDPN に対するがん特異的抗体の作製をきっかけとして、我々は複数のプロジェクトにおいてがん特異的抗体の作製に取り組んでいる。既述の通り、低分子化抗体や二重特異性抗体などの新しいタイプの抗体が国内外の研究機関や製薬企業で開発され、さらに ADC や CAR-T のようなモダリティとの組み合わせも多数存在する。しかし、がん細胞を狙う際に忘れてはいけないのが、がんに対する特異性である。これまで紹介してきたように、がん特異的抗体の作製には新規の技術は必要なく、古典的な技術を工夫していく

ことが重要である。こうして作製したがん特異的抗体は、様々な新規モダリティと結びつくことにより、がん患者の QOL を重視した真の先端の抗体医薬へつながらと我々は考えている。

著者の利益相反：加藤 幸成 (小野薬品工業株式会社, ゼノアックリソース株式会社, 日本全薬工業株式会社, 扶桑薬品工業株式会社)。

文 献

- 1) 谷口 克. 実験医学増刊. 1998;6:1-174.
- 2) 植田幸嗣. 実験医学. 2017;35:1-141.
- 3) 津本浩平. 実験医学. 2018;36:1818-1874.
- 4) Watanabe M, et al. Cancer Res. 1988;48:6411-6416.
- 5) Toyoshima M, et al. Cancer Res. 1995;55:767-773.
- 6) Sugimoto Y, et al. Cancer Res. 1991;51:921-925.
- 7) Kato Y, et al. J Biol Chem. 2003;278:51599-51605.
- 8) Kaneko MK, et al. Gene. 2006;378:52-57.
- 9) Kaneko MK, et al. FEBS Lett. 2007;581:331-336.
- 10) Kato Y, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2006;349:1301-1307.
- 11) Breiteneder-Geleff S, et al. Am J Pathol. 1999;154:385-394.
- 12) Bertozzi CC, et al. Blood. 2010;116:661-670.
- 13) Fujii Y, et al. Protein Expr Purif. 2014;95:240-247.
- 14) Inoue M, et al. Cell Rep. 2019;27:1221-1230 e1223.
- 15) Kato Y, et al. Sci Rep. 2014;4:5924.
- 16) Yamada S, et al. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 2017;36:72-76.
- 17) Fujii Y, et al. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 2016;35:293-299.
- 18) Itai S, et al. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 2017;36:231-235.

Development of cancer-specific monoclonal antibodies against glycoproteins

Yukinari Kato^{1,2}

¹*New Industry Creation Hatchery Center, Tohoku University*

²*Department of Antibody Drug Development, Tohoku University Graduate School of Medicine*

Abstract. Many strategies have been tried to produce monoclonal antibodies (mAbs); however, there have been several problems about focusing on molecular targets and screening methods. For instance, the high tumor/normal ratio of antigen expression using DNA microarray has been thought to be important when we determine the molecular targets for antibody-drug. Although many antigens are expressed highly in tumors, those antigens have been removed from the candidates of antibody-drug targets because they were also expressed in normal tissues. We recently established a novel technology to produce a cancer-specific monoclonal antibody (CasMab). The post-translational difference such as glycans can be utilized to produce the CasMab, although the protein possesses the same amino acid sequence in both cancer and normal cells. We have already produced CasMabs against several glycoproteins such as podoplanin, which is expressed in both cancer and normal cells. Those CasMabs possess antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) or complement-dependent cytotoxicity (CDC) in vitro and anti-tumor effect in xenograft models in vivo. In conclusion, the CasMab technology is the platform to develop cancer-specific mAbs, which could attack only cancer cells without side effects.
