

# 革新的がん特異的抗体の開発の現状と展望

アカデミア発の抗体医薬開発を目指して

加藤幸成

Yukinari KATO

東北大学未来科学技術共同研究センター、東北大学大学院医学系研究科教授

1995年東京大学薬学部卒業、1997年東京大学大学院薬学系研究科修士課程卒業後、2004年山形大学医学部医学科在学中に東京大学大学院薬学系研究科にて博士(薬学)を取得、2005年山形大学医学部卒業後、2006年学術振興会特別研究員(PD)、2010年山形大学医学部准教授、2012年東北大学大学院医学系研究科教授となる。2015年山形大学大学院医学系研究科にて博士(医学)を取得。2017年より現職、現在に至る。

## 1 モノクローナル抗体開発における課題

モノクローナル抗体は、実験的ツールとしてだけでなく、がんや免疫疾患を中心としたあらゆる病気の診断や治療に活用されている。近年、生体で産生されるイムノグロブリン(IgGなど)だけでなく、抗体遺伝子の高度な改変により、低分子化抗体や二重特異性抗体など、あらゆるフォーマットが開発されており、その開発の勢いは凄まじいものがある。<sup>1)</sup> さらに、抗体薬物複合体(antibody-drug conjugate: ADC)・T細胞誘導療法(BiTE<sup>®</sup>など)・キメラ型抗原受容体発現T細胞(CAR-T)療法など、抗体の治療への応用が活発化している。

一方、がん細胞を狙う場合、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る。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、そのような標的分子はもはや枯渇したと言われて久しい。本コラムにおいては、この標的の枯渇を打開するための独自技術であるがん特異的抗体作製法(cancer-specific mAb法: CasMab<sup>®</sup>法)について紹介する。

## 2 がん細胞に高発現する血小板凝集因子の発見

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、多くの研究で報告されてきた。<sup>2,3)</sup> よって、がん細胞による血小板凝集を阻害すれば、がんの転移を抑制できるという治療戦略も世界中で

考えられていた。筆者が大学院生時代に出会った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った。<sup>2)</sup> このgp44は糖鎖が多く付加しており、血小板凝集に重要な役割を果たしていることが示された。<sup>4)</sup> またgp44に対する特異的抗体により、gp44による血小板凝集やがん転移は見事に抑制された。<sup>3)</sup> 長年、このgp44の遺伝子が不明であったが、ついに2003年、筆者らはポドプラニン(podoplanin)がその遺伝子であることを突き止めた。<sup>5,6)</sup> 一方、欧州の研究グループは既に、腎系球体のポドサイト(podocyte、たこ足細胞)で本分子を発見し、さらにリンパ管内皮細胞に特異的に発現していることを報告していた。<sup>7,8)</sup> ここからポドプラニンに対するがん特異的抗体の開発へ向けて、苦労の連続であった。

## 3 ポドプラニンの機能部位解析

ポドプラニンはC末端に膜貫通部位を有したI型膜貫通型タンパク質である。以前、鶴尾らによって開発された、マウスポドプラニンに対する中和抗体のエピトープ解析や、詳細な変異実験を実施し、筆者らはポドプラニンのEDxxVTPGという共通配列(PLAGドメイン)を発見した。<sup>5)</sup> さらに、PLAGドメイン中のスレオニン(Thr)がポドプラニン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分かった。ポドプラニン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。<sup>4)</sup> 筆者らは、糖鎖合成不全の変異CHO細胞株を用いるこ

とにより、PLAG ドメインの Thr 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。<sup>9)</sup> 次に、質量分析計を用いてポドプラニンの糖鎖構造を解析した結果、ポドプラニンには4つの単糖からなる糖鎖が付加されていた。<sup>10)</sup> 残念ながら、この糖鎖は一般的にどこにでも存在するものであり、がんの血小板凝集に特徴のあるものではなかったため、この糖鎖を狙った医薬品開発は不可能であった。一方、これらの発見は、その後の糖鎖の機能解析を大きく発展させた。近年筆者らは、CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術により種々の糖鎖合成不全株 (AMED 創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業 (PDIS) シリーズ, 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) シリーズ) を作製した。<sup>11)</sup> これらの細胞株を活用することにより、ポドプラニンのような糖タンパク質の機能解析が行えるだけでなく、抗体のエピトープ解析も可能となった。ポドプラニンを狙った抗体医薬品開発を続ける中で、多くの技術やシーズを産み出すことができた。東北大学で樹立した細胞株については、BINDS の支援<sup>12)</sup> として無償譲渡しており、興味のある方は細胞バンク<sup>13)</sup> を参照して頂きたい。

### 4 ヒトポドプラニンに対するモノクローナル抗体の開発の歴史

上述した通り、血小板凝集に重要な糖鎖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、特異的な転移阻害剤にはならない。そこで、がん細胞に高発現したポドプラニン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、ポドプラニンによるがん転移を抑制できるという治療戦略を考案した。筆者らは2006年に、ヒトポドプラニンに感度・特異度の高いモノクローナル抗体 (クローン NZ-1) を開発した。<sup>14)</sup> これまでヒトポドプラニンに対する多くのモノクローナル抗体が開発されているが、NZ-1 の親和性はどの抗体よりも高い。<sup>15)</sup> さらに、NZ-1 は感度・特異度・親和性が高いだけでなく、ポドプラニンによる血小板凝集やがん転移を有意に抑制した。<sup>14, 16, 17)</sup> カニクイザルを用いた安全性試験によって、毒性がないことも確認済みである。

一方、ポドプラニンはリンパ管内皮細胞、I 型肺上皮細胞、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。<sup>18)</sup> 残念ながら、NZ-1 のように少しでも副作用が懸念されるモノクローナル抗体は、製薬企業との交渉も進まなかった。これは全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。そこで筆者らは、2010年に研究室を立ち上げるタイミングで、独自の方法でがん特異的抗体を開発することとなった。

### 5 ヒトポドプラニンに対するがん特異的抗体の作製法の開発

がん細胞と正常細胞のポドプラニンは、アミノ酸配列が全く同じであるため、糖鎖付加やリン酸化などの翻訳後修飾を狙う必要がある。しかしながら、質量分析計などの最新機器を駆使しても、がんと正常の差を発見することができなかったため、がん細胞型ポドプラニン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するという逆の戦略を立てた。はじめに、様々ながん細胞株の糖鎖遺伝子を、リアルタイム PCR により定量し、プロファイリングを行った。<sup>19)</sup> 各種がん細胞株と患者由来がん組織の糖鎖遺伝子プロファイリングを詳細に比較検討した結果、LN229 という脳腫瘍細胞株が、ポドプラニンの発現に適していることを見いだした。すなわち、LN229 にポドプラニンを発現すると、正常細胞では付加されない糖鎖が付加されることが分かった。ポドプラニンの高発現株である LN229/hPDPN をマウスに複数回免疫し、LN229/hPDPN に高い反応性を示す抗体を樹立した (図 1)。さらに、ポドプラニンを内在性に高発現するがん細胞株と、正常細胞株との差をフローサイトメトリーで検出した。また、ポドプラニンを高発現するがん細胞と正常細胞の両方が1つの切片に含まれているがん組織切片に対し、免疫組織染色を実施した。これらの複数のスクリーニングは、一見とても単純な作業のように見えるが、全てのステップが重要なノウハウである。これが、がん特異的抗体 (CasMab<sup>®</sup>) を樹立するための標準的方法と

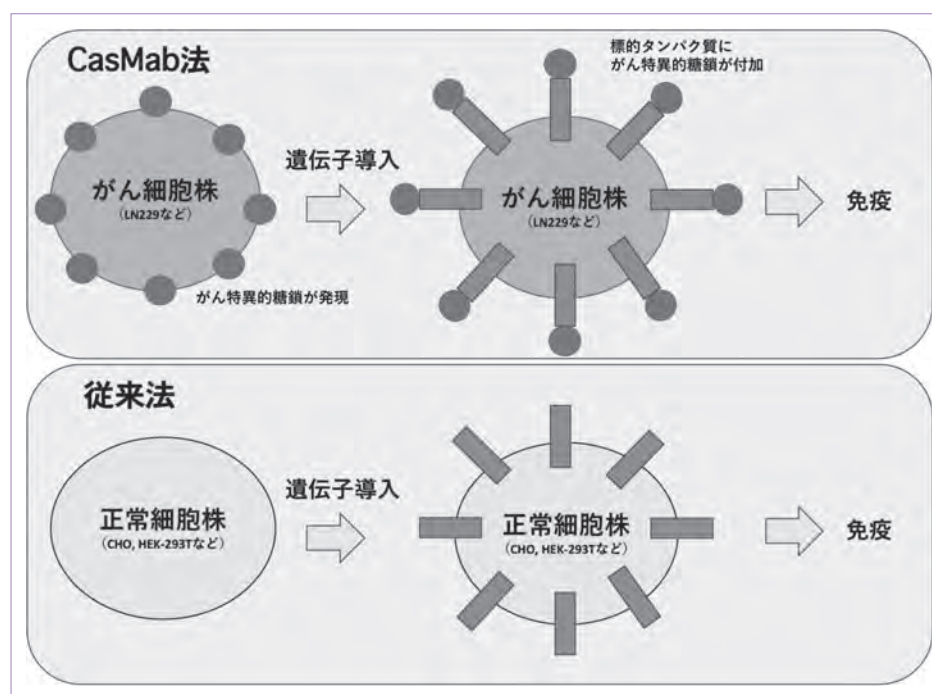


図1 CasMab法と従来法の比較

なった。この方法論により、ポドプラニンに対するがん特異的抗体(クローン LpMab-2<sup>19)</sup>やクローン LpMab-23<sup>20)</sup>の樹立に成功した。これらのがん特異的抗体は、抗腫瘍効果も高いことを証明し、<sup>21, 22)</sup> ついに製薬企業への導出にも成功した。

## 6 アカデミア発の抗体医薬開発を目指して

ポドプラニンに対する CasMab<sup>®</sup> 作製をきっかけとして、筆者は AMED の複数のプロジェクトにおいて、CasMab<sup>®</sup> の作製に取り組んでいる。現在、低分子化抗体や二重特異性抗体など、あらゆるフォーマットの抗体が世界中で開発され、もはや抗体と言えば、通常の IgG という時代ではない。さらに、ADC や CAR-T の技術だけを見ても、世界の多くの企業が新規開発にしのぎを削っている。一方、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。CasMab<sup>®</sup> 作製では、必ずしも派手な新規技術は必要なく、古典的な技術を大切にすることが重要であることを示してきた。こうして作製した CasMab<sup>®</sup> は、様々な新規技術と結びつくことにより、がん患者の QOL を重視した真の革新的抗体医薬へつながらと筆者は考えている。

## 参考文献

- 1) 津本浩平編, 実験医学, 36, 1818-1874(2018).
- 2) Watanabe M. *et al.*, *Cancer Res.*, 48, 6411-6416(1988).
- 3) Sugimoto Y. *et al.*, *Cancer Res.*, 51, 921-925(1991).
- 4) Toyoshima M. *et al.*, *Cancer Res.*, 55, 767-773(1995).
- 5) Kato Y. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 27, 51599-51605(2003).
- 6) 藤田直也ほか, 実験医学, 23, 353-358(2005).
- 7) Breiteneder-Geleff S. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 151, 1141-1152(1997).
- 8) Retzbach E. P., *Oral Oncology*, 78, 126-136(2018).
- 9) Kaneko M. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 279, 38838-38843(2004).
- 10) Kaneko M. K. *et al.*, *FEBS Lett.*, 581, 331-336(2007).
- 11) Kaneko M. K. *et al.*, *Cancer Med.*, 6, 768-777(2017)
- 12) 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS), <https://www.binds.jp/>
- 13) 東北大学・加藤研究室・細胞バンク, [http://www.med-tohoku-antibody.com/topics/001\\_paper\\_cell.htm](http://www.med-tohoku-antibody.com/topics/001_paper_cell.htm)
- 14) Kato Y. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 349, 1301-1307(2006).
- 15) Kato Y. *et al.*, *Nucl. Med. Biol.*, 37, 785-794(2010).
- 16) Kato Y. *et al.*, *Cancer Sci.*, 99, 54-61(2008).
- 17) Abe S. *et al.*, *Cancer Sci.*, 107, 1198-1205(2016).
- 18) Breiteneder-Geleff S. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 154, 385-394(1999).
- 19) Kato Y., Kaneko M. K., *Sci. Rep.*, 4, 5924(2014).
- 20) Yamada S. *et al.*, *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36, 72-76(2017).
- 21) Kaneko M. K. *et al.*, *Cancer Med.*, 6, 768-777(2017).
- 22) Kaneko M. K. *et al.*, *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 36, 104-112(2017).

## キーワード

モノクローナル抗体, がん特異的抗体, 抗体医薬, 糖鎖, ポドプラニン