

I. がん

1. がん特異的抗体の開発とその臨床応用
—副作用のない抗体医薬品をめざして

加藤幸成, 金子美華

2014年にわれわれががん特異的抗体 (cancer-specific mAb : CasMab) を発表してからすでに8年が経過した。当初は、抗体の認識部位には糖鎖とペプチドの両方が入っていること (anti-glycopeptide mAb : GpMab) が重要であると考えていたが、最近では、必ずしも糖鎖がエピトープに必須ではないことがわかってきた。また、抗体医薬をはじめとする分子標的薬にはコンパニオン診断薬が必須となるため、CasMabの機能として免疫組織染色にも使える抗体であることも以前は要求されたが、抗体医薬の開発の過程において重要なのは、毒性評価と薬理活性評価であり、そのためには高感度なフローサイトメトリーでの評価がより重要であることがわかってきた。本稿では、産学連携をスムーズに進めるためにアカデミアとして何が必要であるか、筆者の現在の考えを紹介する。

はじめに

生命科学分野の研究者は、タンパク質などの分子を高感度かつ特異的に検出するために抗体を使用する。抗体は免疫グロブリンともよばれ、感染防御のために体内でたくさんつくられている。新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に対するワクチンも複数開発されているが、ワクチン投与後に体内で抗体ができることによって、SARS-CoV-2による新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の発症や重症化を防ぐ。また、COVID-19を治療するための抗体医薬品も次々に開発された。さらに、重症患者の体内では、免疫細胞がウ

イルスと戦うためにつくるサイトカインが制御不能となって放出され続ける“サイトカインストーム”という現象が起こり、自分の細胞まで傷つけてしまうが、これを治療する目的でトシリズマブ (商品名: アクテムラ) も使用されている。未知のウイルスは今後も出てくる可能性があるが、そのたびに抗体医薬が活躍するだろう。2018年ノーベル賞の受賞内容に抗体に関するものが2つもあるが、日本人の先生が受賞された研究成果が、がんに対する画期的な免疫療法につながった。その免疫療法に使われているのが、ニボルマブ (商品名: オプジーボ) である。筆者の研究室では、がんに対する抗体医薬品を開発しているが、単にがん細胞

【略語】

CBIS : Cell-Based Immunization and Screening
(細胞基盤免疫選択法)

CDR : complementarity determining region (相補性決定領域)

PDPN : podoplanin (ポドプラニン)

PLD : PLAG-like domain

PODXL : podocalyxin (ポドカリキシン)

Development of cancer-specific monoclonal antibodies and its clinical application

Yukinari Kato/Mika K. Kaneko : Tohoku University Graduate School of Medicine (東北大学大学院医学系研究科)

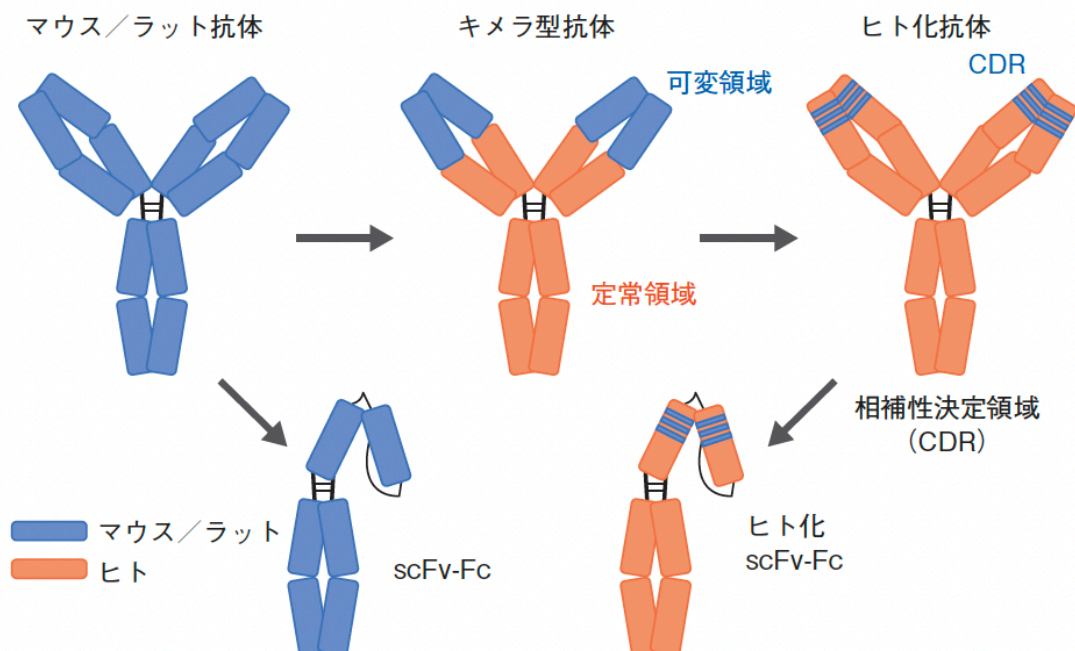


図1 マウスやラットなどの動物に抗原を免疫して抗体を作製する。抗体遺伝子をクローニングし、ヒトキメラ型抗体やヒト化抗体に改変する。また、scFvという小型抗体に改変し、CAR-Tなどのモダリティへの応用も行う。

を殺せばよいということではなく、患者さんに優しい、副作用のない抗体医薬品の開発をめざしている。

1 抗体について

抗体は分子量が約15万、サイズが約15 nmのタンパク質だが(図1)、利便性という観点や、感度や特異度において、抗体を超えるものはない¹⁾。抗体に種々の蛍光色素や酵素を付加することで、細胞を解析するフローサイトメトリー法、タンパク質を解析するウエスタンブロット法、組織を解析する免疫組織染色法などのさまざまな実験系に使われている。医療分野においては、抗体検査という検査薬として、あるいは抗体医薬という医薬品として、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。抗体医薬にするためには、キメラ型抗体(chimeric antibody)やヒト化抗体(humanized antibody)に改変する(図1)。古くから腫瘍マーカーとよばれているものは、糖鎖に対する抗体が使用されている。このように、抗体という分子は、私たちの生活や医療にも密接にかかわっている分子である。

2 抗体医薬開発の歴史と課題

抗体医薬開発においては、遺伝子工学技術を使い、本来の抗体とは違う形状に改変したり(scFvなど:図1)、強力な抗がん剤を抗体に付けたりする(抗体薬物複合体:ADC)¹⁾(1章-9)。また、免疫細胞に抗体分子を発現させて免疫細胞を武装化する技術(キメラ抗原受容体T細胞:CAR-T)や、がん細胞と免疫細胞を架橋する技術(二重特異性抗体:BiTE)(1章-5)もさかんに開発されている。これらの抗体医薬の形は新しいモダリティと言われ、オリジナル抗体よりも何倍も強力になっている。これまでの抗体医薬は、体の中にあるものを利用しているということで、副作用の少ない医薬品として考えられていた。しかし、前述のような強力な抗体のモダリティとなると、副作用は高くなる。

抗体医薬などのバイオ医薬の開発については、製薬会社が投資する開発費は膨大であり、臨床試験で患者さんへの有害事象が起こる可能性が少しでもあれば、製薬会社が開発に乗り出すことは決してない。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久しい。アカデミアにおいては、抗体医薬品のシーズをつくる

ことはできるが、医薬品としての開発（サルを用いた毒性試験やその後の臨床開発）を行うことが困難である。よって、製薬会社へ医薬品シーズを導出できなければ、基礎研究で終わってしまう。がん細胞にはこれまで以上に強い傷害活性がありながら、正常細胞にはより毒性が少ないという、一見矛盾した方向性が求められているが、そのような理想的な抗体医薬品およびそのモダリティを提案しなければならない。

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（cancer-testis antigen という言葉が流行った時期もある）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。次に注目されはじめたのが、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。現在も臨床で使われている 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、さまざま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ことがわかっている。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さまざま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（heterogeneity）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（Ser）あるいはスレオニン（Thr）に糖鎖が付加されるが、ムチン型タンパク質の複数の Ser や Thr 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困難である。以上の理由から、がん細胞と正常細胞の違いを発見し、その違いを狙って抗体を作製する戦略は理解しやすいが、実際にはその方向性では理想的な抗体医薬品は開発でき

ないというのが筆者の結論となった。

3 ポドプラニンの発見と高機能抗体の開発

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が、これまで多くの研究で報告されている²⁾。がん細胞による血小板凝集を阻害することによって、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。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³⁾。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。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。2003 年になり、筆者らは gp44 の遺伝子がポドプラニン（podoplanin/PDPN）であることを発見した^{4) 5)}。PDPN は特異性の高いリンパ管マーカーとして病理診断に活用されている（図 2）。PDPN が発見されるまでは、病理診断において血管とリンパ管を簡単に区別する方法がなく、PDPN に対する特異的抗体は病理診断の精度を格段に上げた。

PDPN の分子構造を詳しく解析していくと、PDPN の N 末端に EDxxVTPG の 3 回くり返し配列（PLAG domain）がある⁶⁾。さらに、PDPN には PLAG domain の類似配列が複数存在することもわかり、PLAG-like domain（PLD）と名付けた。PLAG domain や PLD 中の Thr が PDPN による血小板凝集の活性中心であり、さまざまな動物種に保存されていることがわかってきた。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³⁾。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 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⁷⁾。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、一つの分子の一カ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、がん細胞による血小板

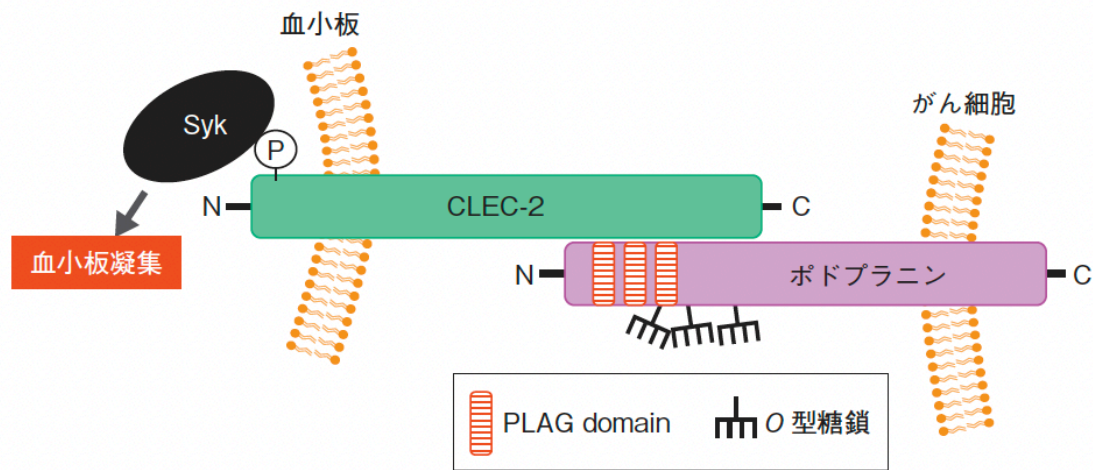


図2 血小板凝集因子PDPNはがん転移を促進する

CLEC-2はPDPNの内在性レセプターであり、血小板凝集に関与する。PDPNの発現は、脳腫瘍、肺がん、食道がん、悪性中皮腫などの多くの悪性腫瘍に発現し、がん転移や悪性化に関与する。一方、PDPNはリンパ管内皮細胞、I型肺胞上皮細胞、腎上皮細胞などの正常細胞にも発現する。

凝集能に特徴的ではなかったため（リンパ管内皮細胞上のPDPNによる血小板凝集にも disialyl-core1が必須）、この糖鎖を狙った抗体開発を断念した。

一方、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、腎上皮細胞、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（図2）⁸⁾。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、PLAG domainやPLDを狙うことも、CasMabを開発する方法としては不適切であることがわかってきた。既述の通り、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、製薬企業は開発しない。

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CasMabの開発には限界があった。

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、CasMabを樹立するために、糖鎖付加などの翻訳後修飾を狙うことを考えた。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、まず抗体を先につくってから、がん特異的糖鎖付加を証明しようと考えた。

これまでの筆者の基礎研究において、LN229という脳腫瘍細胞株に発現する膜タンパク質には、正常組織には存在しない糖鎖が付加されることがわかっていた。実際、LN229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た⁹⁾。これをがん型PDPNだという“仮説”をつくった。PDPNの高発現株であるLN229/hPDPNをマウスに複数回免疫し、フローサイトメトリー法や免疫組織化学法により、CasMabをスクリーニングした。このように、免疫原にがん細胞株を使用する方法を、cancer-specific mAb (CasMab) 法（商標第5690178号）と命名した（図3）。この方法論により、世界ではじめて、PDPNに対するCasMabの樹立に成功した（図4）^{9) 10)}。予想通り、PDPNに対するCasMabは、糖鎖を認識部位に含むことがわかった。その後、ヒトキメラ型抗体やヒト化抗体（図1）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（前臨床試験）を行った結果、全く毒性がないことも判明した。前臨床試験のためには、g単位の抗体が必要となるが、研究室で抗体の大量生産のシステムも確立した。

さらにCasMab法を用いて、血管内皮細胞や上皮細胞などの正常細胞に高発現しているポドカリキシン

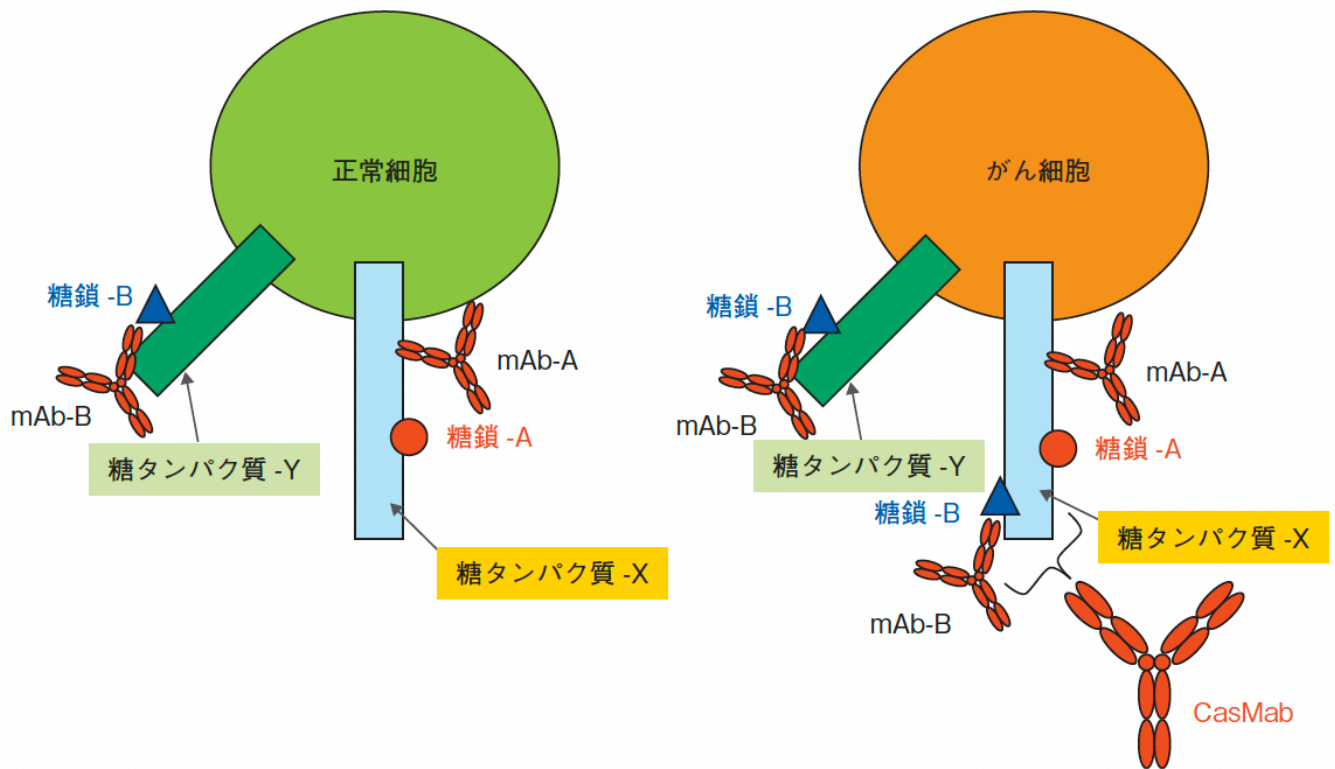


図3 がん特異的抗体作製法 (CasMab法)

がん細胞と正常細胞に同程度に発現している膜タンパク質に対して、構造認識抗体を取得する方法である。

(PODXL) に対する CasMab を開発した¹¹⁾。CasMab の1つである PcMab-60 は、血管内皮細胞に発現する PODXL には全く反応しないのに対し、膵がん細胞株 (MIA PaCa-2) には高い反応性を示すことがわかった (図5)。さらに、MIA PaCa-2 のマウス移植片モデルにおいて、改変型 PcMab-60 (60-mG_{2a}-f; サブクラスを改変し、コアフコース除去したタイプ) によって抗腫瘍活性がみられた。

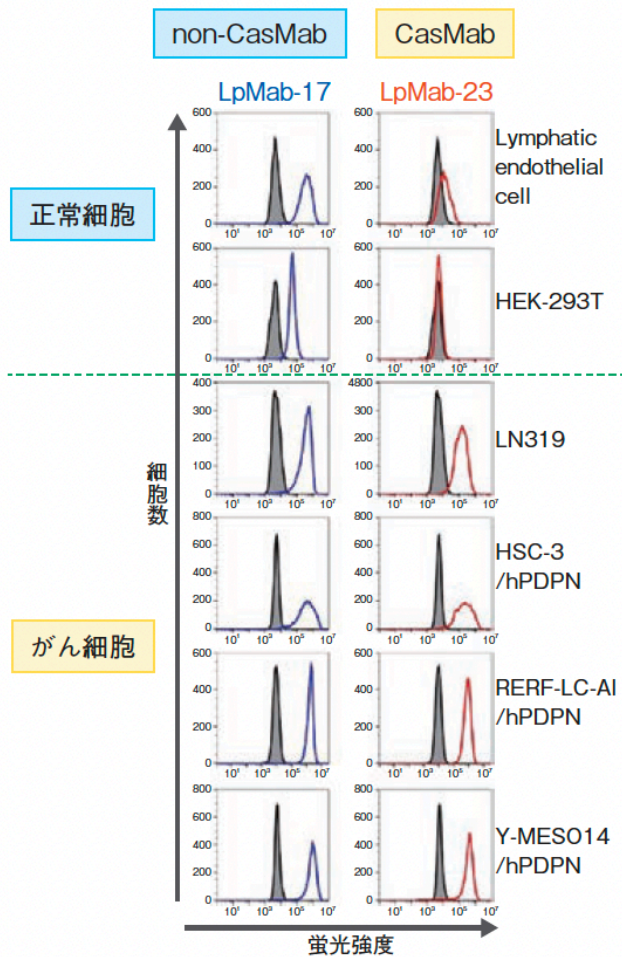
5 細胞基盤免疫選択法 (CBIS法) の開発

通常の抗体作製には、精製したタンパク質が必要だが、必ずしも容易にタンパク質が精製できるわけではない。私たちは、免疫原として標的タンパク質の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選択法 (Cell-Based Immunization and Screening: CBIS法) の開発を行った (図6)。CBIS法は筆者の研究室に限定した特別な方法ではなく、どの研究室でも実施可能な方法である。強制発現株に使用する細胞株は、CHO-K1 などのタンパク質発現用の細胞や、各種がん

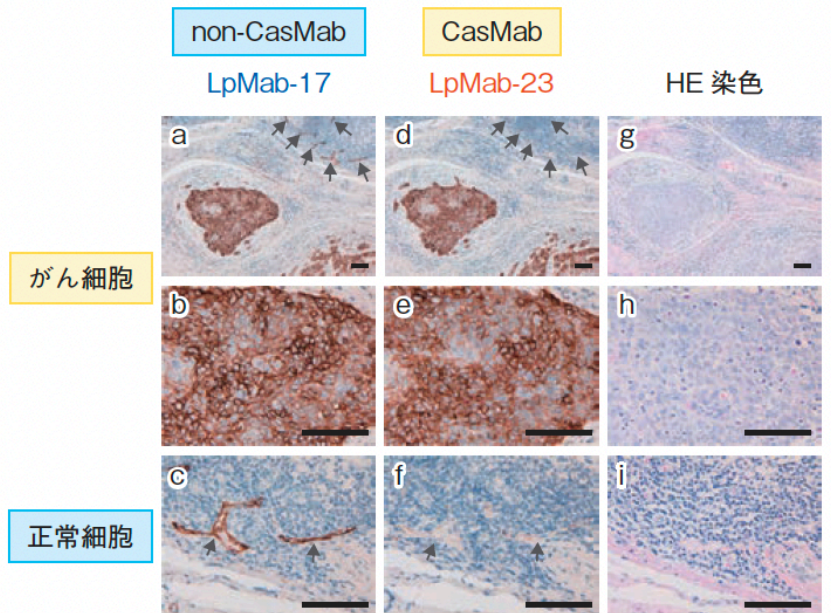
細胞を用いる。ただし、ハイスループットスクリーニングには、5~10枚の96 well plate を半日で処理する必要があるため、高速フローサイトメーターが必要となる。筆者の研究室には、7台の高速フローサイトメーター (アナライザー) を完備しており、この作業を可能とした。このCBIS法により、どのような複雑な構造をもつタンパク質に対しても、迅速に高効率に抗体を樹立することが可能となった。具体例として、CD20 (4回膜貫通型タンパク質)、CD133 (5回膜貫通型タンパク質)、ケモカインレセプター (7回膜貫通型タンパク質) に対し、実験に有用な抗体を短期間に樹立することができた^{12) 13)}。このCBIS法と CasMab 法を組み合わせることにより (CC法と命名)、効率よく CasMab が樹立できることもわかってきた。

筆者の研究室では、CasMab 法やCBIS法を使って、多くの抗体作製を行ってきた。これらの抗体を世界中の研究者に使ってもらうため、独自の抗体バンク¹⁴⁾ を運営している。また、世の中によい抗体がない場合には、研究者や企業のニーズを集め、新たに抗体を作製している。それらの抗体も抗体バンクに掲載し、さらに多くの方々に使っていただけるような循環システムをつくった。

A



B



C

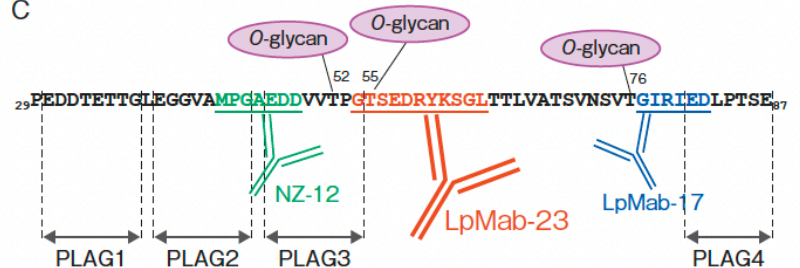


図4 フローサイトメトリー (FCM) や免疫染色 (IHC) におけるがん特異性の確認

A) FCMにおいて、non-CasMabのLpMab-17は正常細胞に反応するのに対し、CasMabのLpMab-23は正常細胞には反応しない。B) 口腔がん組織に対するIHCにおいて、CasMab(e)もnon-CasMab(b)も、がん細胞に対して反応性を示す。一方、non-CasMab(c)はリンパ管に反応するが、CasMab(f)はリンパ管には反応しない(矢印)。C) CasMabのエピトープ解析結果を示す。LpMab-23はCasMab、NZ-12とLpMab-17はNon-CasMabである。Bは文献10より引用。

6 糖鎖とペプチドの両方を認識する抗体 (GpMab) の解析

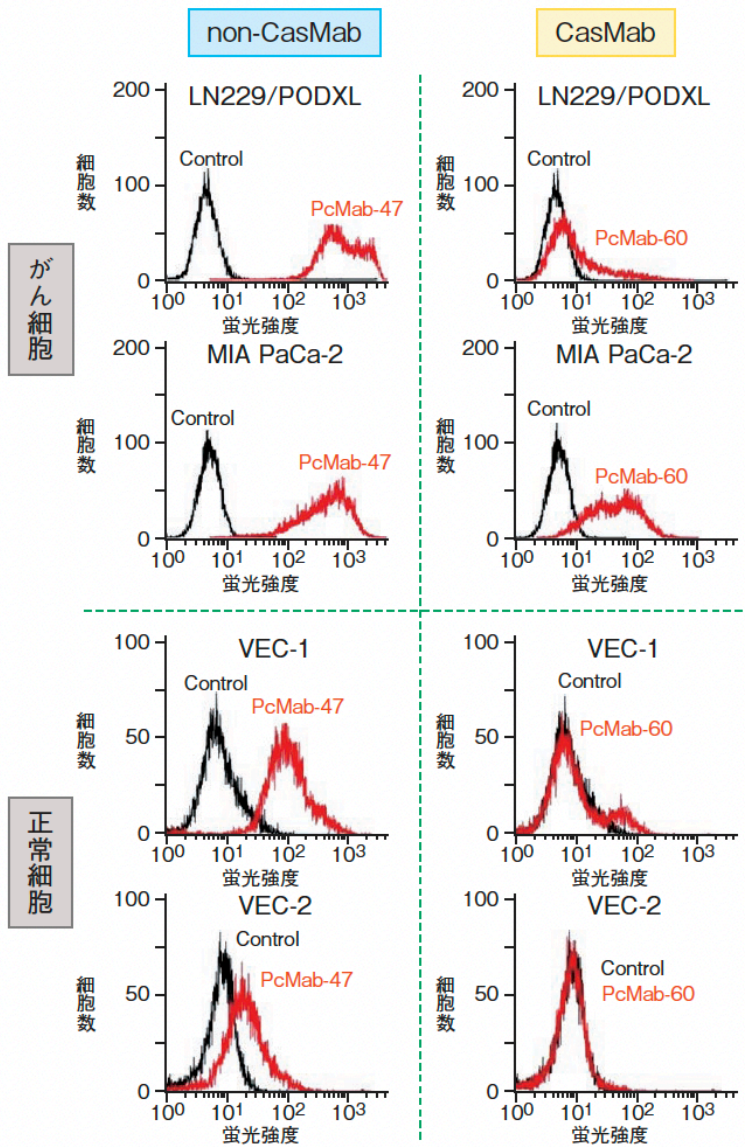
近年筆者らは、PDPNに対する抗体(クローン:LpMab-3)が、糖鎖とペプチドの両方を認識することをX線構造解析により明らかにした¹⁵⁾。これまで、糖鎖不全株でLpMab-3の反応性が落ちることで、糖鎖がLpMab-3のエピトープに入っていることを説明し、アラニンスキャンによりLpMab-3の反応性が落ちることで、ペプチド部分がLpMab-3のエピトープに入っていることを説明した¹⁶⁾。他の研究室からも、抗糖ペプチド抗体〔筆者はanti-glycopeptide mAb; GpMab(商標第5931194号)と名付けた〕と言われる抗体が複数発表されているが、実際に証明は十分になされていない。X線構造解析により、LpMab-3のH鎖のCDRが

ペプチド部分を認識し、L鎖のCDR(特にCDR3)が糖鎖部分を認識していることが明確となり(図7)、これまでに筆者の研究室で開発したCasMab⁹⁾についても、同様に糖鎖とペプチドの両方を認識していることが示唆された。

7 CasMabのエピトープには糖鎖が含まれていない?

近年、PDPNやPODXLに対し、がん特異的糖鎖付加によって構造が変化したペプチド部分を認識しているのではないかと考えられる抗体を樹立した。それらのCasMab(LpMab-23, PcMab-60)は、フローサイトメトリーや免疫組織染色でがん特異性を示す^{10) 11)}。しかし複数の糖鎖不全株を用いた解析により、LpMab-

A



B

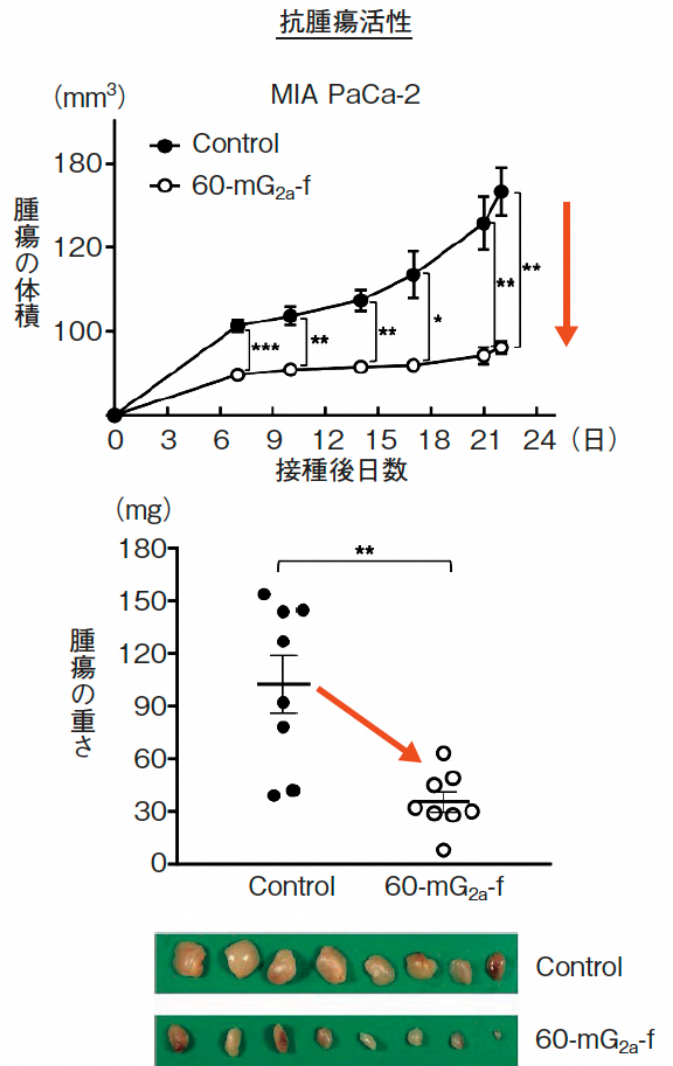


図5 フローサイトメトリーにおけるがん特異性の確認と抗腫瘍効果

A) PODXLを発現した正常細胞およびがん細胞に対するフローサイトメトリーにおいて、non-CasMabのPcMab-47は正常内皮細胞(VEC)に反応するのに対し、CasMabのPcMab-60(mouse IgM)はVECには反応しない。B) PcMab-60をIgG_{2a}に改変し、さらにコアフォースを除去してADCC活性を高めると(60-mG_{2a}-f), MIA PaCa-2(膵がん細胞株)のマウス移植片モデルにおいて、有意に抗腫瘍効果をもたらした。A, Bは文献11より引用

23, PcMab-60のエピトープには糖鎖が含まれていないことが明らかとなった。さらに、CasMab法によってHER2に対するCasMabを複数樹立したが、これらの抗体が認識するエピトープにも糖鎖が含まれていないことが判明した¹⁷⁾。このエピトープは正常組織のHER2にも100%同じアミノ酸配列として存在しており、なぜCasMabが取得できたのか、そのメカニズムは不明である。他の膜タンパク質に対しても同様にCasMabが次々に取れており、糖鎖がエピトープに含まれないことが多い。そのような“構造認識抗体”のがん特異性を証明することは、さらに難易度の高い仕事であり、

今後の課題となっている。

8 CasMabのスクリーニングに最適なスクリーニング法

2014年にCasMab法⁹⁾を発表してからすでに8年が経過した。その間、さまざまな標的に対してCasMabの作製を試みた。臨床においては、抗体医薬をはじめとする分子標的薬にはコンパニオン診断薬が必須となる。また、CasMabのエピトープには糖鎖が含まれると考えていた頃、糖鎖には不均一性があるため、その

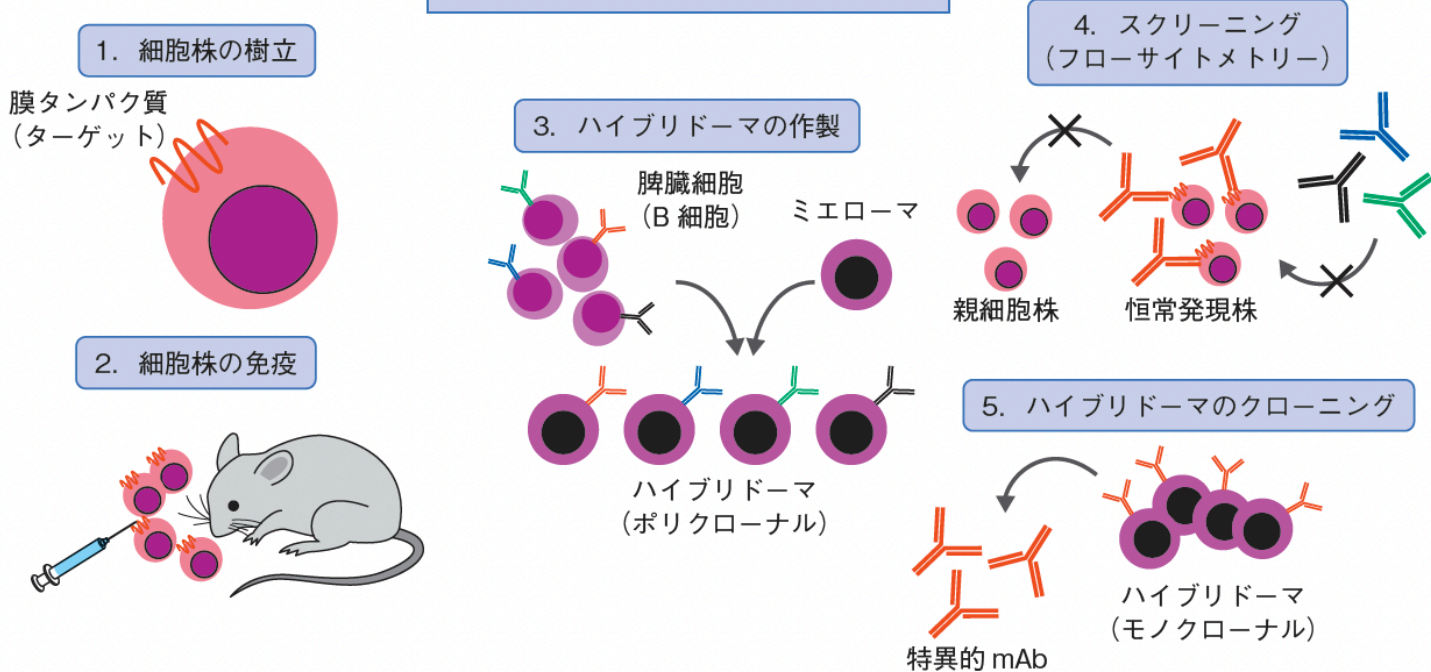


図6 細胞基盤免疫選択法 (CBIS法) の流れ

免疫からスクリーニングに至るまで、細胞だけを使用するため、煩雑なタンパク質の精製作業などが必要ないのが特徴である。

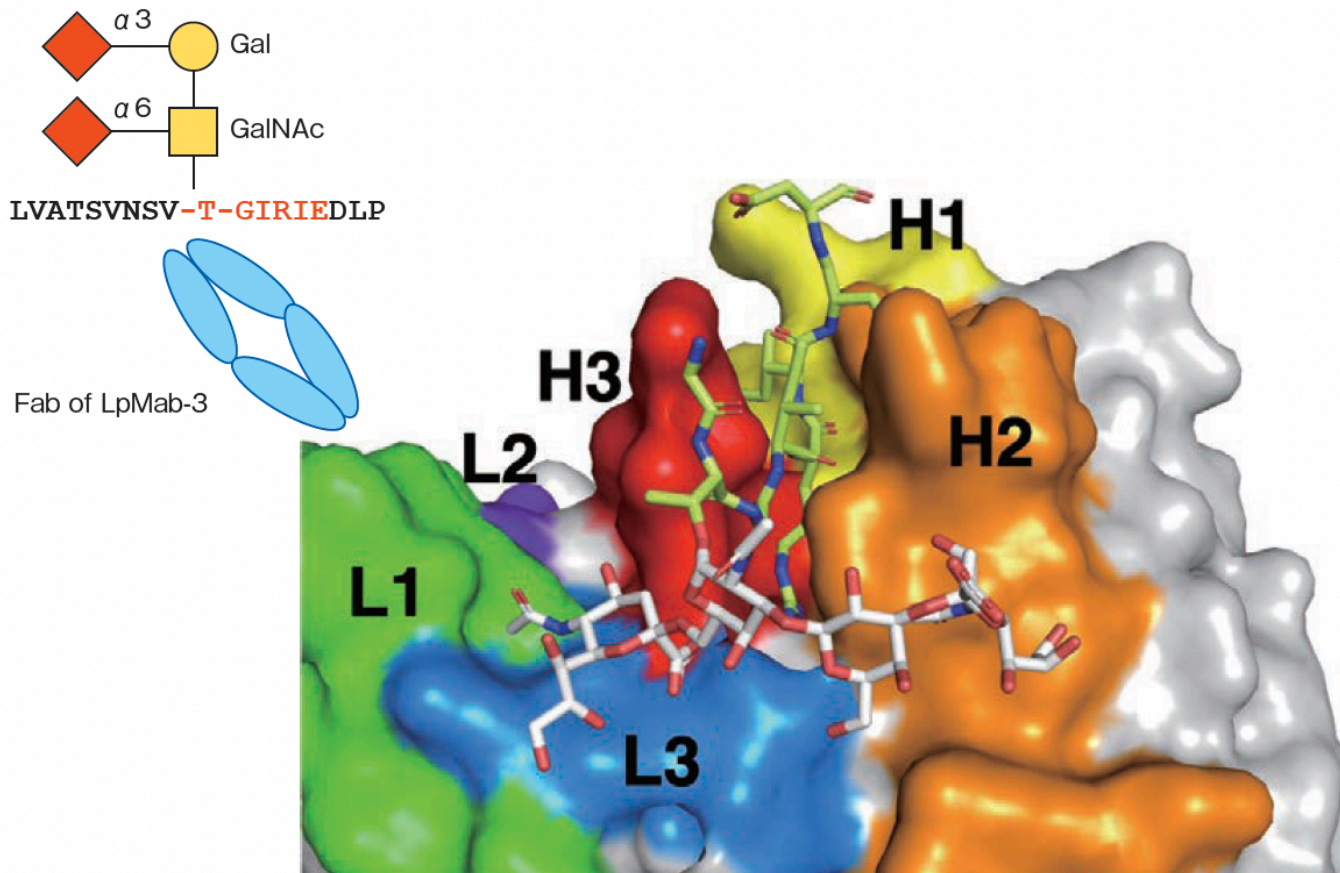


図7 抗糖ペプチド抗体 (GpMab) による認識機構の解明

PDPNに対する抗体 (LpMab-3) のFabとPDPNの糖ペプチドを共結晶化し、X線構造解析によりLpMab-3による認識機構を解明した。PDPNのペプチド部分がLpMab-3のH鎖により認識され、PDPNの糖鎖部分がLpMab-3のL鎖により認識されている。

認識抗体にも不均一性があることの懸念があり、免疫組織染色に利用可能な抗体であることが求められた。一方、免疫組織染色については、その感度はあまり高くなく、がん細胞に高発現している標的分子の場合には、抗体濃度も低めに条件が設定され、正常細胞には反応しないことが多い。そのような抗体がCasMabと言えるのかどうかについては、常に議論が行われてきた。実際に、免疫組織染色のみでがん特異性を示している論文が多数みられる。

あらためて述べるまでもなく、抗体医薬の開発の過程において重要なのは、毒性評価と薬理活性評価である。免疫組織染色やウエスタンブロットでは、それらの評価を行うことは不可能である。よって、CasMabの評価には、高感度なフローサイトメトリーでの評価がより重要であることがわかってきた。前述のHER2については、トラスツズマブ（商品名：ハーセプチン）は、高感度のフローサイトメトリーで解析すると、かなり多くの正常細胞に反応することが筆者の研究で判明している。実際、トラスツズマブによって、一定の割合で心毒性が起こることも臨床現場では有名である。筆者らが開発したHER2に対するCasMabは、高感度のフローサイトメトリーでも全く正常細胞に反応せず、今後、さまざまなモダリティでの応用が期待される。

おわりに

PDPNに対するCasMabの作製をきっかけとして、筆者は複数のAMEDプロジェクトにおいてCasMabの作製に取り組んでいる。前述の通り、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のような新規モダリティとの組み合わせも多数存在している。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、CasMab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だと考えている。こうして作製したCasMabは、さまざまな新規モダリティと結びつくことにより、がん患者さんの生活の質（QOL）を重視した真の革新的抗体医薬へつながると筆者は考えている。

文献

- 1) 「次世代抗体医薬の衝撃」(津本浩平/企画). 実験医学, 36 : 1818-1874, 2018
- 2) Watanabe M, et al : Cancer Res, 48 : 6411-6416, 1988
- 3) Toyoshima M, et al : Cancer Res, 55 : 767-773, 1995
- 4) Kato Y, et al : J Biol Chem, 278 : 51599-51605, 2003
- 5) Suzuki H, et al : Cells, 11 : doi:10.3390/cells11030575, 2022
- 6) Kaneko MK, et al : Gene, 378 : 52-57, 2006
- 7) Kaneko MK, et al : FEBS Lett, 581 : 331-336, 2007
- 8) Breiteneder-Geleff S, et al : Am J Pathol, 154 : 385-394, 1999
- 9) Kato Y & Kaneko MK : Sci Rep, 4 : 5924, 2014
- 10) Yamada S, et al : Monoclon Antib Immunodiagn Immunother, 36 : 72-76, 2017
- 11) Kaneko MK, et al : Biochem Biophys Res Commun, 24 : 100826, 2020
- 12) Furusawa Y, et al : Oncol Lett, 20 : 1961-1967, 2020
- 13) Itai S, et al : Monoclon Antib Immunodiagn Immunother, 36 : 231-235, 2017
- 14) 東北大学・加藤研究室・抗体バンク. http://www.med-tohoku-antibody.com/topics/001_paper_antibody_PDIS.htm (閲覧2022年6月)
- 15) Ogasawara S, et al : Biochem Biophys Res Commun, 533 : 57-63, 2020
- 16) Oki H, et al : Monoclon Antib Immunodiagn Immunother, 34 : 44-50, 2015
- 17) 加藤幸成. HER2標的化剤. https://patentscope2.wipo.int/search/ja/detail.jsf?docId=WO2022114163&_cid=-JP2-L3WY7M-35048-1 (閲覧2022年6月)

<筆者著者プロフィール>

加藤幸成：博士（医学），博士（薬学），医師，薬剤師。1995年，東京大学薬学部卒業。'97年，東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了。2005年，山形大学医学部卒業。'06年，日本学術振興会特別研究員（PD）。'08年，Duke大学メディカルセンターSenior Research Associate。'10年，山形大学医学部准教授。'12年，東北大学大学院医学系研究科教授。