

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業 事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）LSR を標的とした新規作用機序（脂質代謝制御）を有する画期的抗癌抗体療法による卵巣癌治療法の開発

（英語）Development of LSR targeted innovative anti-tumor antibody therapy with unique mechanism (regulation of lipid metabolism)

研究開発実施期間：2016年10月13日～2018年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）仲 哲治

（英語）Naka Tetsuji

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

（日本語）国立大学法人高知大学 教育研究部医療学系臨床医学部門 教授

（英語）Kochi University, Research and Education Faculty, Medical Sciences Cluster,
Clinical Medicine Unit Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等 和文：2 ページ以上 英文：1 ページ程度

和文

研究開発代表者の仲らが卵巣癌に高発現する分子として同定した lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) はリポタンパク質受容体として機能する。LSR を高発現する卵巣癌患者は低発現患者と比較して予後不良であるため、LSR は卵巣癌の病態に関わる可能性が示唆される。すでに、研究開発代表者等は LSR に対するモノクローナル抗体の開発に成功している (Hiramatsu K, Naka T *et al.*, *Cancer Res* 2018)。LSR を標的とする抗 LSR 抗体は、卵巣癌の脂質取り込みおよび脂質代謝を制御することで抗腫瘍効果を発揮していることが推測される。これまでに脂質代謝を制御とした抗癌剤は開発されておらず、LSR を標的とした抗体医薬は脂質代謝制御を介する新たな作用機序を有する世界初の抗癌剤となり得る。本研究では、LSR を標的とした脂質代謝を制御することによる新規な作用機序を有する卵巣癌に対する抗癌剤の開発を目的とし、以下の 5 つの項目を実施した。

(1) 改変型抗 LSR モノクローナル抗体の創出：抗 LSR モノクローナル抗体による抗腫瘍効果に脂質代謝の制御を介していることを証明するために、2016 年度においては研究開発代表者等が開発済みのニワトリ・マウスキメラ抗 LSR モノクローナル抗体を本研究課題のセットアップ企業である中外製薬株式会社に提供し、中外製薬株式会社が有する抗体工学技術により非臨床研究で適切に使用できるように本抗体を改良（細胞傷害活性の除去など）した。LSR の受容体機能を中和することを適切に評価できるように改良した抗 LSR 抗体クローン 27-6-mF18 を大量精製し、2017 年度にかけて抗 LSR 抗体クローン 27-6-mF18 の薬効機序の解明 (*in vitro*, *in vivo*) と安全性の検証を実施した。

(2) LSR を介した脂質と卵巣癌の増殖との関係の解明：LSR の発現が陽性である 6 種類の卵巣癌細胞株 (OVCAR3, RMG-I, SW626, KURAMOCHI, OV90, OVISe) に対して、グルコース、および、血清を含まない培地条件で、VLDL を添加し、細胞増殖能への影響を細胞増殖アッセイにより解析した。その結果、6 種類の細胞株すべてにおいて VLDL 添加により細胞増殖・生存の促進作用が認められた。さらに、VLDL 添加により促進された細胞増殖・生存作用については、コントロール抗体添加群と比較して、抗 LSR 抗体クローン 27-6-mF18 添加群において有意に阻害効果が認められた。これらの結果、LSR は VLDL を介して細胞増殖・生存が促進され、抗 LSR 抗体クローン 27-6-mF18 は LSR のリポタンパク質受容体に対して阻害活性を有することが明らかとなった。

(3) LSR 陽性卵巣癌 PDX マウスの開発：抗 LSR モノクローナル抗体が卵巣癌に対して血中の脂質の取り込みを遮断することで抗腫瘍効果を発揮することを証明するには、卵巣癌細胞株のゼノグラフトモデルだけでなく、LSR 陽性の卵巣癌組織を超免疫不全マウス (NOG マウス) の皮下に移植した patient tumor-derived xenograft (PDX) モデルも用いて証明する必要がある。そこで、大阪大学医学部産婦人科教室にて手術時に得られた卵巣癌腫瘍組織を NOG マウスの皮下に移植し、卵巣癌 PDX 作成を試みた。その結果、2016 年度において、PDX マウスを独自に 3 系統樹立することに成功した。このうち、2 系統 (0vx4, 0vx6) が高異型度漿液性卵巣癌であり、腹腔から腫瘍を採取した 1 系統 (0vx2) の最終診断は高異型度漿液性腹膜癌であった。高異型度漿液性腹膜癌は、高異型度漿液性卵巣癌と組織学的特徴および臨床的性質が極めて近く、腹腔内に播種性に進展することから、腹膜播種に対する抗 LSR モノクローナル抗体の薬効を検証する目的で使用することとした。さらに、樹立した PDX マウス腫瘍組織に対して、免疫組織化学的染色法により LSR の発現を評価した結果、3 系統とも全て LSR 陽性であることが判明した。2017 年度には新たに 2 系統の卵巣癌 PDX マウスの樹立を試みた。その結果、0vx3 および 0vx5 の樹立に成功し、LSR の発現が免疫組織化学染色法により確認された。0vx3 の手術摘出標本の病理組織診断は mixed carcinoma (serous 70%, endometrioid 30%)、0vx5 の病理診断が明細胞癌であることが PDX 作製着手後に診断された。したがって、我々の当初の対象である高異型度漿液性癌ではなかったことから、今回の抗 LSR モノクローナル抗体クローン 27-6-mF18 による薬

効評価に 0vx3 と 0vx5 は使用せず、0vx2, 0vx4, 0vx6 を使用した。

(4) 抗 LSR 抗体を用いた脂質代謝制御と卵巣癌治療法の開発：LSR 陽性の卵巣癌細胞株ゼノグラフトモデルおよび卵巣癌 PDX マウスを活用して抗 LSR モノクローナル抗体による *in vivo* での卵巣癌増殖抑制の機序に脂質代謝制御が関係することの実証を試みた。ゼノグラフトモデルとしては、LSR 陽性の卵巣癌細胞株である OVCAR-3 と RMG-I を用いた。また、研究開発分担者の大阪大学医学部産婦人科教室、木村正教授の研究室にて手術時に得られた卵巣癌腫瘍組織を NOG マウスの皮下に移植することで樹立した 3 系統の卵巣癌 PDX マウスを用いた。これらの 3 系統の PDX マウスは、免疫組織化学染色法により LSR が陽性であることを確認済みである。2 種類の卵巣癌ゼノグラフトモデル(OVCAR-3、RMG-I)、高異型度漿液性卵巣癌 PDX2 系統(0vx4, 0vx6)および高異型度漿液性腹膜癌 1 系統(0vx2)に対して、コントロール抗体投与群と比較して、抗 LSR モノクローナル抗体クローン 27-6-mF18 投与群では有意な抗腫瘍効果が認められた。さらに、LSR 陽性卵巣癌 PDX マウスの腫瘍組織中の脂肪滴を電子顕微鏡で観察した結果、コントロール抗体投与群と比較して、抗 LSR モノクローナル抗体クローン 27-6-mF18 投与群では腫瘍組織中の脂肪滴の蓄積の減少が観察された。これらの結果より、抗 LSR モノクローナル抗体クローン 27-6-mF18 は卵巣癌ゼノグラフトモデル以外に、卵巣癌 PDX マウスに対しても、脂質代謝制御を介して抗腫瘍効果を発揮することが示された。

(5) 抗 LSR モノクローナル抗体の安全性の評価：研究開発代表者らが開発した抗 LSR モノクローナル抗体はヒト LSR 以外に、マウス LSR にも交叉反応を示すことを確認している。そこで、C57BL/6J マウスに抗 LSR 抗体クローン 27-6-mF18 を投与し、正常組織への毒性の評価を実施した。2016 年度においては、C57BL/6J マウスを用いて血液生化学的検査より抗 LSR 抗体クローン 27-6-mF18 が毒性を示さないことを明らかにした。2017 年度においては、血液脂質検査、および、LSR が弱く発現する肝臓への毒性を病理学的検査により解析した。その結果、コントロール抗体と比較して抗 LSR 抗体クローン 27-6-mF18 はトータルコレステロール、トリグリセリドおよび HDL 濃度に有意な影響を示さなかった。また、病理学的検査からも、コントロール抗体と比較して抗 LSR 抗体クローン 27-6-mF18 に有意な毒性所見は認められなかったため、抗 LSR 抗体クローン 27-6-mF18 の安全性が示された。

以上より、抗 LSR 抗体 27-6-mF18 が卵巣癌における脂質取り込み阻害活性を持つことを明確にすることに成功した。すなわち、LSR を標的とし、脂質代謝制御作用を有する新規抗癌剤のコンセプトが本研究によって確立できた。さらに *in vivo* では、複数の細胞株を用いた LSR 陽性卵巣癌ゼノグラフトモデルや独自に開発した LSR 陽性卵巣癌 PDX マウスを用いて、抗 LSR モノクローナル抗体クローン 27-6-mF18 が抗腫瘍効果を発揮することを明らかにした。特に後者の結果は、LSR に対する中和抗体が、免疫学的機序に依存することなく、ヒト由来の卵巣癌に著明な抗腫瘍効果を発揮することを示したもので、臨床応用に向けて非常に意義のある成果と考えられる。また、本研究では、抗体クローン 27-6-mF18 について、動物に対する安全性も明らかにすることが出来た。

今後、抗 LSR モノクローナル抗体をヒト化し、実用化に向けた試験（非臨床試験と医師主導治験など）を進めると同時に、抗 LSR モノクローナル抗体による脂質代謝制御がどのように抗腫瘍効果を発揮するのか、さらに詳細な作用機序解明を推進する。

英文

Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR), which identified as a novel ovarian cancer antigen by the principal investigator (PI) Naka, is known to be lipoprotein receptor. Because patients with ovarian cancer expressing high levels of LSR associated with poor prognosis compared to LSR low expressing patients, expression of LSR has a potential to be involved in the progression of ovarian cancer. PI Naka has already successfully developed anti-LSR monoclonal antibodies (Hiramatsu K, Naka T *et al.*, *Cancer Res* 2018). In this study, we aimed to develop novel anti-cancer drug targeting LSR *via* regulating lipid metabolism.

(1) Development of modified anti-LSR antibody without ADCC activity.

To evaluate mode of action of anti-LSR antibody by neutralizing receptor activity of LSR, anti-LSR antibody clone 27-6 mF18 without ADCC activity was provided by Chugai Pharmaceutical Company Ltd, a set-up company of this project, modifying anti-LSR antibody clone 27-6 originally developed by PI Naka.

(2) Demonstration of the relation between LSR-mediated lipid metabolism and growth of ovarian cancer.

We demonstrated that VLDL increased growth of LSR positive ovarian cancer cell lines (OVCAR3, RMG-I, SW626, KURAMOCHI, OV90, OVISE) in medium without containing glucose and serum. We also demonstrated that anti-LSR antibody clone 27-6 mF18 inhibited the uptake of VLDL into the LSR positive ovarian cancer cell lines compared to control antibody by cell growth assay.

(3) Development of LSR positive ovarian cancer PDX models

To demonstrate the anti-tumor effect of anti-LSR antibody against LSR positive ovarian cancer by blocking uptake of blood lipid, it is necessary to demonstrate using not only LSR positive ovarian cancer xenograft models but also using LSR positive ovarian cancer PDX models implanting dissected ovarian cancer at surgery into the super immune-deficient (NOG) mice. We successfully developed five strains of ovarian cancer PDX and all of these PDX models were confirmed LSR positive by immunohistochemistry (Ovx2, Ovx3, Ovx4, Ovx5, Ovx6). Among these PDX models, Ovx2, Ovx4, Ovx6 were used to evaluate the drug efficacy of anti-LSR antibody clone 27-6 mF18 by blocking lipid uptake.

(4) Development of novel ovarian cancer therapy by anti-LSR antibody targeting lipid metabolism

We demonstrated that anti-LSR antibody clone 27-6 mF18 inhibited the growth of RMG-I xenograft and OVCAR3 xenograft mice. We also demonstrated that anti-LSR antibody clone 27-6 mF18 inhibited the tumor growth of Ovx2, Ovx4, Ovx6 PDX mice. By electron microscopical analysis, accumulation of lipid droplets were inhibited in anti-LSR antibody clone 27-6 mF18 treated group compared with control antibody treated group.

(5) Safety evaluation of anti-LSR antibody

We found that anti-LSR antibody cross-reacted with mouse LSR. Therefore, we evaluated the safety of anti-LSR antibody clone 27-6 mF18 against mice. One milligram of anti-LSR antibody clone 27-6 mF18 or control IgG was intraperitoneally injected to C57BL/6 mice and blood were collected on day 7. By serum chemistry studies, serious toxicities were not observed in measured inspection items. In addition, serious toxicities were not observed by pathological analysis.

In the Next step, we will humanize anti-LSR antibody and perform non-clinical study and also perform clinical study to evaluate the safety and efficacy of anti-LSR antibody in LSR positive cancer to develop innovative therapy with unique mechanism, regulation of lipid metabolism.