

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

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) AYA世代の希少がんである骨肉腫の増殖・転移を促進するポドプラニンを標的としたヒト化中和抗体の実用化
(英語) Development of the humanized anti-podoplanin antibody to inhibit proliferation and metastasis of osteosarcoma that occurred in the AYA generation.

研究開発実施期間：2016年10月1日～2018年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 藤田直也
(英語) Naoya Fujita, Ph.D.

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター・所長
(英語) Japanese Foundation for Cancer Research・The Cancer Chemotherapy Center・Center Director

II 研究開発の概要

骨肉腫は50万人から100万人に1人が罹患する希少がんの1つであり、AYA世代(15～29歳)を好発年齢として我が国では年間約200人ほどが発症しているとされる。骨肉腫の治療成績は、30年ほど前までは原発部位の切除後の5年生存率が1割以下という極めて予後不良であったが、化学療法の導入により向上し、術前化学療法が奏功する症例の5年生存率は現在では8割にも達している。一方で、術前化学療法が奏功しない症例の5年生存率は現在でも3割程度にとどまっている。骨肉腫の治療薬はここ30年ほど新薬が出ておらず、従来型の抗がん剤と手術が治療の基本となっていることから、新薬の登場が切望されている。特に、骨肉腫患者の多くを占めるAYA世代の患者に対しても血行性転移などの抑制を目的に大量抗がん剤治療が術前・術後に行われていることから、AYA世代特有の問題である妊孕性、晩期合併症、発育や教育等への大量抗がん剤治療の影響が懸念されており、この点からも新薬登場への期待は高い。

そこで本研究開発課題では、骨肉腫の9割強に発現亢進が認められるポドプラニンを標的にしたヒト化中和抗体の抗腫瘍効果を検証し、ポドプラニン中和抗体を骨肉腫に対する新たな治療薬として臨床開発することを目標とした。なお、ポドプラニンはリンパ管内皮細胞・肺胞上皮細胞・中皮細胞などの正常細胞・組織にも発現していることから、ポドプラニンを標的にした治療の安全性に懸念があることは否めない。そこで、ポドプラニンを標的とした治療の安全性評価も本研究開発では実施した。

研究開発代表者らは、がん細胞依存的に生じる血小板凝集の責任分子の1つとしてポドプラニンを世界で初めて同定するとともに、血小板上の受容体CLEC-2との相互作用に関わるポドプラニン上の責任部位として、世界で初めてPLAG4ドメインの関与を明らかにした。このPLAG4ドメインは、研究開発代表者らが先に同定していたPLAG3ドメインと比較した場合、CLEC-2との相互作用への関与の割合はより大きく、ポドプラニンの血小板凝集促進活性には必要不可欠な部位であることが明らかとなっている。実際、PLAG4ドメイ

ンを欠損すると CLEC-2 への結合能が失われ、ポドプラニンが持つ血小板凝集促進活性が喪失する。そこでこの PLAG4 ドメインを認識するマウス中和抗体の作製に取り組み、ポドプラニンの血小板凝集促進活性を阻害可能な PG4D2 中和抗体を樹立することに成功した。PG4D2 中和抗体は、ポドプラニン依存的な血小板凝集を抑制することで、ポドプラニン発現腫瘍の原発巣における増殖を阻害するとともに、骨肉腫で高頻度に認められる肺など遠隔臓器への転移を抑制した。そこで、セットアップ企業であるアピ株式会社とともに、PG4D2 抗体の相補性決定領域 (CDR) およびフレームワーク領域を決定し、PG4D2 抗体のヒト化を行った。さらに、ヒト化抗体の臨床応用可能性を検証するために、骨肉腫患者検体由来の細胞株樹立とゼノグラフトモデルの構築、サルを用いた信頼性基準下での安全性試験を実施した。

(公財) がん研究会有明病院にて生検あるいは手術を行う際に IC を取得できた 21 症例の日本人骨肉腫患者組織検体を用いて、細胞株の樹立と免疫不全マウスに直接検体を移植したゼノグラフトモデルの構築を目指した。細胞株の樹立とゼノグラフトモデルの樹立は、想定以上に樹立効率が低く困難を極めたが、最終的にポドプラニン陽性の 2 細胞株の樹立と 2 系統のゼノグラフトモデルの樹立に成功した。また、公的細胞バンクなどから骨肉腫細胞 8 株を入手した検討を並行して進めた結果、5 株でポドプラニン発現の亢進が確認された。これら細胞株のうち 1 株は重度免疫不全マウスに移植可能であった。重度免疫不全マウスに移植可能な臨床検体由来細胞株のうちの 1 株と公的細胞バンクから入手した細胞株のうちの 1 株は、尾静脈移植すると肺に転移する高転移株であった。また、これら細胞株をマウスに移植した際に生じる腫瘍増殖と肺転移結節の形成は、PG4D2 中和抗体を投与することで抑制された。本結果は、これまでにポドプラニンを遺伝子導入した CHO 細胞株やポドプラニン陽性のヒト肺扁平上皮がん細胞株で得られていた結果と同様であり、ポドプラニンの血小板凝集促進活性が骨肉腫の増殖と転移に関わっていることを示している。また、ヒト化抗ポドプラニン中和抗体が骨肉腫治療薬として臨床応用できる可能性を強く示唆する成果でもあった。

次に、PG4D2 中和抗体ならびに PG4D2 中和抗体を基にして作製された AP201 ヒト化抗体を投与した際に生じる正常細胞・組織への毒性を検討するために、サルを用いた安全性検討を実施した。まず、PG4D2 中和抗体ならびに AP201 ヒト化抗体のサルポドプラニンへの反応性を検証した。その結果、PG4D2 中和抗体ならびに AP201 ヒト化抗体は、ヒトポドプラニンほど強くサルポドプラニンを認識できないこと、サルポドプラニンと CLEC-2 の相互作用を抑制できないことが明らかとなった。PG4D2 中和抗体ならびに AP201 ヒト化抗体が認識するヒトポドプラニン上の配列は、サルポドプラニンの相同部位とは一部異なっており、そのことが原因でサルポドプラニンを認識できない可能性が示唆された。よって、サルに PG4D2 中和抗体ならびに AP201 ヒト化抗体を投与しても、サルポドプラニンの機能を投与抗体が十分に阻害できず、ポドプラニンの機能阻害に伴う副作用を検証できない可能性が示唆された。そこで、サルを用いた安全性試験を適切に実施するためには、サルポドプラニンと CLEC-2 の結合を PG4D2 中和抗体と同等レベルで阻害するサロゲート抗体を樹立し、そのサロゲート抗体を用いて安全性試験を実施する必要性が示唆された。そこで、サルポドプラニンの PLAG4 ドメインを含む 14 アミノ酸をタンデムに 21 回つないだペプチドを準備し、常法に従ってマウスに免疫した。脾臓の細胞をミエローマ細胞と融合し、免疫したペプチドを認識する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。サルポドプラニンと CLEC-2 との結合を阻害する活性を指標に選別することで、PG4D2 中和抗体と同等な血小板凝集阻害活性を示すサロゲート抗体 (クローン 2F7) を産生するハイブリドーマを得ることに成功した。2F7 中和抗体はマウス IgG1 サブクラスであり、サルポドプラニン上の PLAG4 ドメイン近傍を認識していた。2F7 中和抗体産生ハイブリドーマをマウス 100 匹以上に移植し、マウスの腹水から 2F7 中和抗体を精製した。なおコントロール抗体としては、同じマウス IgG1 サブクラスである抗ジゴキシン抗体を選択し、同様にマウス 100 匹以上に移植し、生じた腹水から抗体の精製を行った。精製抗体をサル 2 匹ずつに単回投与した後、一般状態の観察、血液学・血液化学検査を実施するとともに、病理剖検を行って各臓器の重量測定と病理組織学検査を実施した。その結果、2F7 中和抗体を投与しても、コントロールの抗ジゴキシン抗体投与群のサルと比較して検査値や病理的所見に変化はなく、急性毒性は生じていない

との結論に達した。この単回投与安全性試験の結果から、ポドプラニンを標的とした治療の安全性が強く示唆された。

本研究開発事業のセットアップ企業であるアピ株式会社では、標準物質として扱うマウス中和抗体 PG4D2 ならびにキメラ型 PG4D2 抗体の精製を担当し、精製された抗体を用いて純度試験や長期安定性試験を実施した。また、PG4D2 抗体の相補性決定領域 (CDR) およびフレームワーク領域を決定し、ヒト抗体配列に移植したヒト化抗体候補配列を複数設計した。ヒト化抗ポドプラニン抗体発現プラスミドを CHO 細胞に遺伝子導入し、抗体高産生株を選択した。この抗体高産生株を実験的スケールで発現培養し、精製されたヒト化抗体の品質評価や特性解析の試験を実施するとともに、ヒト化抗体は長期安定性試験に供されている。なお、精製された原薬の一部は (公財) がん研究会に提供され、上記の非臨床試験での確認実験に供され、元の PG4D2 抗体と同様にヒトポドプラニンを認識することが (公財) がん研究会でも確認された。

アピ株式会社ではまた、将来的な AP201 ヒト化抗体の治療における対象骨肉腫患者の抽出や市販後の臨床診断サポートを目的に、ポドプラニンを定量する高感度 ELISA キットの構築に取り組んだ。(公財) がん研究会で樹立されていた様々なポドプラニン部位を認識する抗ポドプラニンモノクローナル抗体を精製し、規格化と安定性評価を実施した。サンドイッチ ELISA 法を用いた高感度 ELISA キットの構築のため、(公財) がん研究会で樹立されていた様々な抗体の組み合わせをまず検討し、最適な抗体の組み合わせを見出した。構築された高感度 ELISA キットでは、数十ピコグラムオーダーの可溶性ポドプラニンを検出することができた。

以上のように、セットアップ企業であるアピ株式会社ではヒト化抗体の作製とコンパニオン診断薬の構築、(公財) がん研究会では非臨床試験と安全性試験の実施といった協業体制で本研究開発事業を実施した。その結果、ヒト化抗体の作製に成功するとともに、可溶性ポドプラニンの定量系を構築することに成功した。さらに、POC の確認に必須である骨肉腫患者由来の細胞株とゼノグラフトモデルの構築に成功し、ポドプラニンを阻害することによる骨肉腫の増殖と転移の抑制といったコンセプトの証明がなされた。さらに、以前から懸念されていたポドプラニンの機能阻害に伴う毒性発現に関して、サルのパドプラニンを認識するサロゲート抗体を樹立してサルに投与する安全性試験を実施することで、ポドプラニンの機能を阻害しても急性毒性は認められないというポドプラニン標的治療の安全性を示すという大きな成果が得られた。新薬の登場が切望されている AYA 世代の希少がんである骨肉腫の治療に、ポドプラニンを標的とした治療が副作用もなく有効である可能性が示されたことはヒト化中和抗体の臨床開発に向けた大きな一歩となったと考えている。

Osteosarcoma is a rare cancer occurring at the rate of one person in about one million people, and frequently occurred in adolescent and young adult generation (AYA generation: from 15 to 29 years old). Surgical resection and chemotherapeutic drug treatment are the main strategy for osteosarcoma treatment. Because aggressive multiagent chemotherapy was frequently applied before and after surgery, the influence of fertilization, physical development and intellectual growth to the patients in AYA generation is concerned. So, the development of new therapeutic drugs for osteosarcoma is desired. From this reason, we tried to develop the humanized anti-podoplanin neutralizing antibody as a therapeutic antibody for osteosarcomas because more than 90% of osteosarcoma expressed podoplanin on their surface. To confirm the safety of podoplanin targeting, we performed the toxicity testing using monkey. To confirm the Proof-of-Concept of the podoplanin targeting, we tried to establish osteosarcoma patient-derived cell (PDC) lines and patient-derived xenograft (PDX) models, and then examined the anti-tumor and anti-metastatic activities of the antibody. We also tried to develop the diagnostic ELISA kits for selecting podoplanin-positive osteosarcoma patients.

Podoplanin is a transmembrane glycoprotein and is involved in tumor growth and metastasis by inducing platelet aggregation via its interaction with platelet surface protein CLEC-2. Podoplanin expression is observed in many types of cancers including osteosarcomas. We previously identified that podoplanin contains four functional domains, called PLAG1 to PLAG4 domains, that are critical for podoplanin-mediated platelet aggregation. We recently identified the fourth PLAG domain (PLAG4) and the PLAG4 domain was found to be essential for podoplanin binding to CLEC-2. To interfere the podoplanin-CLEC-2 interaction, we thus established mouse antibody recognizing PLAG4 domain (clone PG4D2) that can neutralize the platelet aggregation-stimulating activity of podoplanin.

In this project, we have established two PDC lines and two PDX models from 21 surgical specimens obtained after informed patient consent. Western blot analyses revealed that one PDC line and one PDX model overexpressed podoplanin on their cell surface. We also collected eight osteosarcoma cell lines from public cell banks and found five cell lines expressed podoplanin on their cell surface. Among the podoplanin-expressing osteosarcomas, we found that two cell lines (one is derived from osteosarcoma patient-derived cell line and the other is derived from cell bank) could form tumors and distant metastatic foci after injection into highly immunodeficient mice. Since PG4D2 antibody could suppress the tumor growth at primary site and decrease the number of metastasis foci in lungs, podoplanin seemed to be a promising target for the treatment of osteosarcomas.

We then investigated the side effects of anti-podoplanin neutralizing antibodies in monkey model. Unfortunately, anti-podoplanin neutralizing antibody PG4D2 could rarely recognize monkey podoplanin, we tried to establish neutralizing anti-monkey podoplanin antibody by immunizing mice with tandemly connected monkey PLAG4 domains as the antigen. After screening the hybridoma supernatants, we succeeded to establish a neutralizing anti-monkey podoplanin antibodies (clone 2F7) that recognizes PLAG4 domain and can suppress monkey podoplanin binding to CLEC-2. So, we purified the antibody from ascites fluid and conducted acute toxicity testing using cynomolgus monkeys given excess amounts of the 2F7 antibody. The toxicity testing did not reveal significant differences in hematology and biochemistry data between the control group and the group receiving the 2F7 antibody. This result clearly indicates that inhibiting podoplanin function exhibits no acute toxicity in monkeys.

In collaboration with the partner company, Api Co. Ltd., we did our best to establish the humanized anti-PLAG4 antibody (code name AP201) from the sequence of the CDR domain of mouse anti-podoplanin neutralizing antibody PG4D2. The purified AP201 antibody is now under stability testing. In collaborating with

Api, Co. Ltd., we also succeeded to generate a highly-sensitive sandwich ELISA procedure for selecting the podoplanin-positive osteosarcoma patients.

By promoting this research project, we obtained strong indications to promote the development of the humanized anti-podoplanin antibody for clinical trials.

[ここまでを総括報告としてAMEDのホームページに掲載](#)