

【報告様式A】

課題管理番号:20ae0101073h0005 作成／更新日:令和3年5月26日

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(糖鎖利用による革新的創薬技術開発事業)
事後報告書



I 基本情報

研究開発課題名：

(日本語) IgSF 膜タンパク質の糖鎖の構造、機能解析と、がんにおける治療標的の確立

(英語) Structural and functional analyses of IgSF membrane glycoproteins and its application to develop therapeutic targets for cancer

研究開発実施期間：平成30年11月15日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 村上 善則

(英語) Yoshinori Murakami

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

(日本語) 国立大学法人東京大学・医科学研究所 人癌病因遺伝子分野・教授

(英語) Professor, Division of Molecular Pathology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

II 研究開発の概要

糖鎖は多様性に富み、腫瘍の診断、治療の有望な標的となるものが多い。本課題では、N-型、O-型糖鎖修飾を受ける免疫グロブリン・スーパーファミリー (IgSF) 膜タンパク質 CADM1 が、小細胞肺癌(SCLC)では特異的バリエーション v8/9 を発現し、成人 T 細胞白血病(ATLL)では過剰発現し、各々悪性を促進することに注目した。SCLC, ATLL は日本で年間各々約 1.1 万人、約 1 千人が死亡する難治性腫瘍で、SCLC の新規血清診断マーカー、SCLC, ATLL の新規治療法の開発が強く望まれる。そこで、本研究では SCLC の疾患に特徴的な CADM1 糖鎖の構造、機能を同定し、診断用高特異性抗体と治療用高親和性抗体を作成し、SCLC, ATLL の新規診断、治療法確立の基盤シーズを得ることを目指した。また、免疫グロブリン・スーパーファミリー分子群の糖鎖を介した細胞間接着、細胞間相互作用により惹起される腫瘍免疫、がん転移に関わる鍵となる結合分子の同定を目指した。具体的には、以下の 4 課題を遂行した。

1. SCLC, ATLL の治療標的となる CADM1 糖鎖の質量分析による解析 (村上、伊東、北爪) :
2. CADM1 糖鎖の機能解析 (伊東、村上、北爪) :
3. SCLC の抗 CADM1 診断・治療用抗体の作成 (伊東、村上、浜窪) :
4. がんや各種病態に関わる IgSF 分子群の機能解析 (伊東、村上、北爪) :

1. SCLC, ATLL の治療標的となる CADM1 糖鎖の質量分析による解析 (村上、伊東、北爪) :

SCLC, ATLL に特徴的な CADM1 の N-型糖鎖、SCLC に特徴的な CADM1 の O-型糖鎖構造を質量分析により同定することを目的とした。即ち、神経内分泌型 SCLC 細胞である NCI-H69, NCI-H446、非神経内分泌型 SCLC 細胞である SBC5、ATLL 細胞である ATN-1, HTLV-1 感染細胞 MT2、並びに他の上皮由来がん細胞数種について、島津製作所質量分析研究所と共同で CADM1 の N-型、O-型糖鎖と付加部位を MALDI-DIT-MS により解析した。N-型糖鎖の解析では、他の上皮細胞と比較して、神経内分泌型 SCLC 細胞で特徴的な分岐鎖糖鎖構造が認められた。一方 ATLL 細胞でも上皮細胞と比較して、特定の分岐型糖鎖構造が多い傾向が示された。

また、SCLC 細胞に特異的なスプライシング・バリエーション CADM1v8/9、上皮型の CADM1v8 について、各々 O-型糖鎖を解析し、CADM1v8/9、CADM1v8 においては O-型糖鎖付加部位が各々 21 か所、17 か所推定され、シアル酸を含む糖鎖構造が特徴的に認められることを見出した。さらに、エクソン 8, 9 に相当す 21 アミノ酸中のスレオニン残基の中での O-型糖鎖付加部位を、予測プログラムを用いて検討し、O-型糖鎖付加部位を予測した。

2. CADM1 糖鎖の機能解析 (伊東、村上、北爪) :

SCLC の高転移性、ATLL の高浸潤性(infiltration) に、CADM1 の各々特徴的な糖鎖修飾が関与するかどうかを解明することを目的とした。具体的には、CADM1 の 6 か所の N-型糖鎖付加部位の各々に対する NQ 変異体や全 NQ 変異体、部分 NQ 変異体、また、CADM1 の O-型糖鎖付加部位数がそれぞれ異なるバリエーション体 CADM1v8/9 (21 か所), v8 (17 か所), v(-) (0 か所) を用いた *in vitro* の細胞接着評価系を構築した。具体

的には、CADM1 タンパク質を固相化し、上記の NQ 変異体や各バリエーション体を発現する細胞を重層して、その細胞接着能や細胞伸長能を比較した。この結果、細胞接着に対して CADM1 の N-型糖鎖、O-型糖鎖は各々特徴的な機能修飾を示すことを見出した。従って、CADM1 の糖鎖を含む経路の修飾が、SCLC, ATLL の悪性形質の抑制をもたらす可能性が示された。

3. SCLC の抗 CADM1 診断・治療用抗体の作成 (伊東、村上、浜窪) :

SCLC の高特異度血清診断のために、O-型糖鎖付加 CADM1v8/9 を標的とした新規モノクローナル抗体を作成する。また、SCLC の抗体治療開発のために、N-型糖鎖修飾 CADM1 を標的として SCLC 細胞を高い親和性で認識するモノクローナル抗体を得て、ADC などを用いた抗体療法の基礎的検証を行うことを目的とした。具体的には、SCLC の血清診断を目的として、村上、伊東、浜窪らが AMED の先行研究にて実施した研究により、患者血清を用いて SCLC を一定程度の感度、特異度で検出できる診断用抗体を得ていた。しかし、これらは糖鎖のない CADM1v8/9 ペプチドを免疫した抗体であったこともあり、複数の非腫瘍性肺疾患で偽陽性に出る難点が明らかになった。そこで、より特異性の高い抗体を取得する目的で、1 項にて得られた知見に基づき、特徴的な糖鎖を付加した断片をエピトープとしマウスに免疫することにより、新たな抗体を作成した (特許出願準備中)。この抗体を検出抗体、糖鎖修飾 CADM1 細胞外断片を高親和性で認識する抗体を補足抗体として用いたサンドイッチ ELISA 法により、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、非腫瘍性肺疾患、合計 200 例以上の患者血清を検討する後ろ向き体外診断薬試験を実施し、ProGRP, NSE に匹敵する、または上回る高い感度、特異度、AUC で小細胞肺癌を検出できることを示した。これにより、非糖鎖 CADM1v8/9 断片を免疫して得た抗体を用いたアッセイにおける、上述の非腫瘍性疾患での偽陽性の問題を克服することができた。さらに本診断法により、SCLC 初診時に CADM1v8/9 陽性を示した症例では、進行型である例が有意に高く ($p<0.05$)、また、その後の治療経過における転移の成立 ($p<0.05$) が有意差をもって認められた。また、症例数が十分でなく現時点で有意ではないが、予後不良との相関も示唆され、CADM1v8/9 陽性例に対する治療・対策にも重要な情報を付与することが示された。

一方、SCLC の治療薬開発については、小細胞肺癌症例の約 80% を占める神経内分泌型腫瘍で 100% 高発現する CADM1 を、細胞表面で強く認識するモノクローナル抗体を取得した。すなわち、N-型、O-型糖鎖修飾のある CADM1 細胞外断片をエピトープとして baculovirus に発現させ、マウスに免疫することにより、高い親和性を示す抗 CADM1 抗体を 2 分子種取得した。この抗体を用いて、SCLC 組織切片に対して免疫染色を行ったところ、SCLC で非常に強い染色シグナルが認められ、一方正常肺上皮などでは極めて弱いシグナルしか得られず、治療薬の標的として利用可能となる顕著な発現量の差であると考えられた。また、正常脳、精巣でも弱い CADM1 発現が認められるが、各々血液脳関門、血液精巣関門が存在し、通常の抗 CADM1 抗体は脳、精巣には到達しないと考えられる。次に、この抗体を培養 SCLC 細胞に添加し、サポリン毒素標識 2 次抗体を追加添加する実験を進めた。また、放射性同位元素 ^{65}Cu を抗体に直接標識する技術を開発した理化学研究所との共同研究により、 ^{65}Cu 標識抗 CADM1 抗体が SCLC 細胞上に集積することを確認した。以上の結果は、作成した CADM1 糖鎖抗体が SCLC を高い親和性で認識し、ADC を介した治療法開発の基盤と

なる抗体となり得ることを示している。

4. がんや各種病態に関わる IgSF 分子群の機能解析 (伊東、村上、北爪) :

ヒトの IgSF 分子を多数クローン化し、物理化学的手法により新規結合 IgSF 分子対を同定し、腫瘍免疫やがん転移に関与する IgSF 分子間結合を同定することを目的とした。IgSF 分子群の約半数は糖鎖修飾を受け、IgSF 分子群どうし、あるいはインテグリン分子群と結合し、各々細胞・細胞間接着、細胞・基質間接着に関わり、多様な生理的、病的機能を果たす。そこで本研究では、がん細胞の多段階の転移過程、またがん細胞と免疫細胞との相互作用を介する免疫チェックポイント機能に関与する新規 IgSF – IgSF 分子間結合を同定し、当該 IgSF 分子対の新規機能を解明し、同時にその相互作用の修飾による治療開発を目指した。この目的で、細胞表面に発現する、あるいは分泌するヒト IgSF 分子の細胞外断片を多数クローン化した。これらの IgSF 分子種の結合を、Alpha 法 や SPRi 法などの物理化学的手法により同定することを試みた。この結果、CADM1 と CADM1, 2, 3, 4, CRTAM との特異的結合を確認、同定した。次に、CADM1 とこれら結合タンパク質の相互作用による細胞接着能を *in vitro* の固相タンパク質–細胞重層培養法を用いて検討し、CADM1 を含む一部の分子が CADM1 を介する細胞接着能を亢進することを示した。そこで、マウス T 細胞リンパ腫細胞 EL4 のマウスでの尾静脈注入–肝臓転移系を用いて CADM1 の意義を検討した。その結果、EL4 細胞では CADM1 依存的に肝転移の亢進が観察された。また、宿主細胞側の CADM1 結合分子の一部との相互作用ががんの転移に関わる可能性が示唆された。また、腫瘍免疫に関しては、種々のがん細胞に発現する免疫チェックポイント受容体の一つ VISTA タンパク質が、IGSF11 タンパク質と特異的に結合すること(既報)を Alpha にて見出し、本手法が有効に機能していることを確認した。

英文

Glycosylation causes structural and functional heterogeneity of cell surface proteins, which often provide ideal markers for diagnosis and treatment of specific cancer. CADM1 (Cell adhesion molecule 1) is a membrane glycoprotein whose expression is frequently down-regulated during the progression of various cancers derived from epithelial cells. On the other hand, CADM1 is over-expressed in adult T-cell leukemia (ATL) and small cell lung cancer (SCLC) and promotes their invasion/metastasis. Different glycosylation patterns of CADM1 could cause distinct roles of CADM1 in tumorigenesis and possible molecular targets for the diagnosis and treatment of ATL and SCLC. In the extracellular domain (EC) of CADM1, 6 predicted N-glycosylation sites are present in 3 immunoglobulin (Ig)-like loops (N1-N6), while variable numbers of possible O-glycosylation sites are found in several splicing variants: 17 threonine sites in a variant with exon 8 (v8), 21 threonine sites in a variant with exons 8 and 9 (v8/9), and no threonine site in a variant lacking exons 8 and 9 (v(-)). Both epithelial and ATL cells express a variant, CADM1v8, whereas SCLC and normal testis express a variant, CADM1v8/9. Here, we analyzed the precise structures of N- and O-glycan of CADM1 expressed in epithelial cells, generated antibodies against cancer-type specific CADM1, and examined their significance in diagnosis and treatment of ATL and SCLC paying special attention to the N- and O-glycosylation state of CADM1 protein as follows.

1. Mass spectrometry analysis of CADM1 glycosylation specific to SCLC and ATL.

N- and O-glycosylation state of CADM1 protein in SCLC, ATL and other cell lines were analyzed and characteristic features were identified. Variant specific difference in O-glycosylation of CADM1 was demonstrated.

2. Functional analysis of N- and O-glycosylation of CADM1 protein.

Cell adhesion and elongation activities *in vitro* were analyzed by culturing cells expressing CADM1 on the solid-phase of glycosylated CADM1 proteins on the glass.

3. Generation of antibody against glycosylated CADM1 protein for diagnosis and treatment of SCLC.

Diagnostic antibodies against O-glycosylated v8/9 of CADM1 were generated for detecting serum fragments of CADM1 v8/9, which was released from cell membrane by proteases. A sandwich assay using these antibodies could detect SCLC patients with high sensitivity and specificity. Then, therapeutic antibodies against N-glycosylated CADM1 were generated, which provide promising therapeutic approaches based on the antigen-drug conjugate technology.

4. Functional analysis of the molecular pairs of IgSFs involved in tumor immune response and metastasis.

Over 200 IgSF molecules were cloned and specific binding proteins with biological active IgSFs were identified by ALPHA and SPRi technologies and their biological and pathological significances were examined.