

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム 基本スキーム (ACT-M)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 脂質代謝を標的とした新規癌治療法の開発
(英語) Development of an Innovative Antibody Therapy for Cancers by Targeting
Lipid Metabolism

研究開発実施期間: 平成30年9月18日～令和3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

【研究の目的】

卵巣癌は難治性癌の一つであり、抗癌剤に対する耐性化や自然耐性により治療抵抗性を示す。卵巣癌の予後改善のために新しい作用機序を有する抗癌剤を開発することが必須かつ急務である。研究開発代表者等は卵巣癌の新規標的抗原として Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) を世界に先駆けて同定した (Hiramatsu K, Serada S, Naka T, et al. Cancer Res. 2018)。LSR は脂質代謝においてリポタンパク質の細胞内取り込みに関わる受容体である (Curr Opin Lipidol. 1998)。近年、脂質代謝は癌の増殖・生存・転移に重要であるという興味深い報告が発表されており、癌の新たな治療標的として着目されている (Nat Med. 2011, Clin Cancer Res. 2015)。しかし、脂質代謝制御による癌治療法はまだ実用化されていない。研究開発代表者等の解析では LSR 高発現卵巣癌患者群は低発現群と比べて有意に予後不良であり、LSR が癌の進展に関与していることが示唆された。そこで研究開発代表者等は新規な作用機序を有する癌治療法として脂質代謝阻害が卵巣癌、胃癌および膵臓癌などの難治性癌の増殖を抑制できると考え、LSR を標的とした脂質代謝制御による革新的抗体療法の非臨床試験を行い、非臨床 POC を取得することを目的とした。

【研究の成果】

研究開発代表者等が保有する抗 LSR モノクローナル抗体を用いた脂質代謝制御による難治性癌に対する治療薬を開発するために、研究開発代表者等は研究開発分担者と役割分担することで以下の項目を実施した。

(1) ヒト化抗 LSR モノクローナル抗体の製造およびそのための予備的薬効試験（高知大学、中外製薬）
研究開発代表者が独自に開発した LSR を標的とするニワトリ・マウスキメラ抗 LSR モノクローナル抗体について、ヒト化抗体の作製に着手するか否かを判断する必要がある。そこで、(i) 高知大学の論文で使用した市販ヒト卵巣癌 PDX モデル (TM00324; Jackson Laboratory) の同一 Lot を中外製薬と高知大学で購入し、同時に同じ実験方法で改変型キメラ抗 LSR 抗体の明確な薬効を確認する、(ii) ヒト化抗 LSR 抗体を作製し、動態、物性、薬効、及び単回投与安全性を評価する、(iii) ヒト化抗体の最適化に着手する、以上の 3 点であった。しかし、倫理審査と COVID-19 の影響で当該 PDX マウスの入手に半年以上を要したため、令和 2 年 9 月に両施設で薬効試験を開始した。腫瘍体積が 60 - 120 mm³ の範囲に入り次第、順次マウスをコントロール抗体群と抗 LSR 抗体群の 2 群にランダムに割り付けし、抗体の抗腫瘍効果を検証した。その結果、高知大学では抗 LSR 抗体の薬効が確認されたのに対し（抗腫瘍効果：42.5%； $p < 0.01$ ）、中外製薬では有意な薬効が認められなかった（同：6.4%）。高知大学および中外製薬で行った同時薬効試験で効果に乖離が生じ、両施設での薬効の合致が十分であることが示されなかったため、抗体のヒト化には進まず、抗 LSR 抗体の作用機序解明を進めた上で、再検討することとなった。

(2) ニワトリ・マウスキメラ抗 LSR モノクローナル抗体による薬効の作用機序解析（高知大学、中外製薬）

a) 脂質代謝との関連

LSR のリガンドとしてこれまで VLDL を使用していたが、LSR 陽性細胞が必要とする脂質分子を明らかにするために各種遊離脂肪酸を LSR 陽性細胞に投与しスクリーニングを行った。予備実験で、細胞の脂質代謝への依存度は低栄養条件で高まることが判明したため、この実験は低グルコース、無血清培地条件で行った。LSR 陽性細胞に各種脂肪酸を投与し細胞増殖アッセイを行った。その結果オレイン酸 (OA) とエライジン酸 (EA) は LSR 陽性細胞の増殖を促進した。続いて LSR siRNA を卵巣癌細胞株に導入することで LSR の発現をノックダウンした細胞に OA と EA を投与した。その結果 OA は LSR ノックダウン後も LSR 陽性細胞の増殖を促進したが、EA は促進しなかった。このことから EA は LSR を介して細胞増殖を促進することが判明した。さらに抗 LSR 抗体は EA による増殖促進効果を抑制することを証明した。以上のことから LSR のリガンドの 1 つとして脂肪酸の一種であるエライジン酸が考えられた。続いて、LSR 陽性細胞に EA を投与し BODIPY で細胞を染色すると、細胞内脂質が増加し、この効果は抗 LSR 抗体により抑制された。また、LSR 陽性細胞に EA を投与すると濃度依存性に ATP 産生が増加するが、抗 LSR 抗体は ATP 産生を抑制した。その結果、LSR 陽性細胞は遊離脂肪酸を細胞内に取り込み、細胞内脂質の増加、ATP 産生の増加、細胞増殖を促進させ、抗 LSR 抗体はこれらの経路を阻害することが明らかとなった。

b) MAPK 経路から apoptosis 誘導

一方で、抗 LSR 抗体は LSR 陽性卵巣癌 PDX マウスに対して強力な抗腫瘍効果を示すことから、脂質代謝以外のパスウェイを抑制あるいは促進している可能性も考えられた。そこで、コントロール抗体および抗 LSR 抗体を投与した卵巣癌 PDX マウスの腫瘍組織より RNA を精製し、次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析を行った。その結果、コントロール抗体投与群と比較して抗 LSR 抗体投与群において有意な発現変動を示す遺伝子を 3,400 種同定した。これらの遺伝子を用いてパスウェイ解析を行い、抗 LSR 抗体投与群で有意に変動を示すパスウェイを同定した。この結果から、抗 LSR 抗体が apoptosis を誘導している可能性が示唆されたため、細胞株による検証実験を行った。LSR 陽性卵巣癌細胞株 (RMG-I) に LSR siRNA をトランスフェクシ

ョンし LSR をノックダウンした細胞株を作成しタンパクを抽出の後、apoptosis に関連する重要なタンパクの発現をウェスタンブロット法で解析した。その結果、B-RAF→MEK→ERK→p90RSK→BAD に至る apoptosis に関連する重要な経路が抑制されていることを発見した。さらに LSR siRNA トランスフェクション後に Caspase 3/7 が活性化していることを発見した。これらの結果から LSR は脂質代謝の他に apoptosis に関連していることが強く示唆されたため、次に抗 LSR 抗体を用いて同様の検証を行った。卵巣癌細胞株に抗 LSR 抗体を投与し、タンパクを抽出の後、apoptosis 関連タンパクの発現をウェスタンブロット法で解析した。その結果、LSR siRNA を導入した時と同様に MAPK 経路から p90RSK、BAD に至る経路が抑制されていることを証明した。さらに抗 LSR 抗体が Caspase 3/7 を活性化させていることも証明した。以上の結果は他の LSR 陽性卵巣癌細胞株 (KURAMOCHI) でも確認された。

c) MAPK 経路から細胞浸潤の阻害

卵巣癌と同じ婦人科癌である子宮体癌では、早期癌は比較的予後良好であるものの、進行癌は卵巣癌同様予後不良であり効果的な治療が存在しない。子宮体癌のリスク因子として肥満が知られていることから、脂質代謝に関わる LSR が子宮体癌の治療標的になりうると考え、子宮体癌における LSR の機能解析を行った。まず臨床検体用いて LSR の発現を確認すると、原発巣で LSR 高発現の症例では転移巣でも LSR は高発現であった。続いて LSR の発現と子宮体癌の予後の関連を解析するため、228 例の子宮体癌患者の臨床検体を用いて予後解析と予後規定因子の解析を行った。以上の結果から、LSR は子宮体癌でも癌の増殖、浸潤、転移に関連すると考え、LSR 陽性子宮体癌細胞株 (HEC1、HEC108) に LSR-siRNA を導入し、LSR 発現抑制後の増殖を評価した。LSR の下流を探索するために、95 例の子宮体癌患者組織のタンパク発現解析データ (Dou Y, Cell. 2020) を入手し、LSR 高発現症例で活性化している Pathway を検索した。その内、細胞増殖に関連する経路として MAPK signaling pathway を同定した。MAPK pathway は卵巣癌でも LSR の下流として同定されており、それを裏付ける解析結果となった。続いて発現変動の確認のため、子宮体癌細胞株に LSR siRNA を導入し、LSR knock-down 後の MAPK pathway 関連タンパクの発現変動を評価した。その結果、MEK/ERK/p90RSK のリン酸化の抑制、Cyclin D1、CDK4 の発現低下を認めた。この結果から子宮体癌でも LSR の下流に MAPK pathway が存在し、細胞周期を調節していることが証明された。臨床検体を用いた予後解析では LSR の高発現は腫瘍の浸潤に関連していたため、腫瘍浸潤に関連するタンパクである MMP2 の発現を免疫組織学的染色で評価した。LSR 高発現症例では MMP2 の発現も高値であり、その部位は一致していた。続いて LSR 発現抑制による腫瘍浸潤の変化を invasion assay を用いて評価した。LSR を knock-down すると腫瘍の浸潤は有意に抑制された。

これまで未解明であった抗 LSR 抗体の作用機序が(1) 脂質代謝阻害: 脂質の取り込み→細胞内脂質の増加→β酸化、TCA サイクルの活性化から ATP 産生増加という一連の流れを阻害、(2) apoptosis 誘導: MAPK 経路の活性化を阻害し、caspase 3/7 活性を高め apoptosis を誘導、(3) 細胞浸潤の阻害: MAPK 経路から MMP-2 に至る経路を阻害、の少なくとも 3 経路であることが証明された。卵巣癌のみならず子宮体癌でも同様の結果を得られたことは抗 LSR 抗体の抗腫瘍効果が卵巣癌に限定されたものではなく、多癌種に適応可能なことを示している。

(3) 難治性癌 PDX マウスの開発 (高知大学、大阪大学)

抗 LSR 抗体の薬効とその作用機序を評価するには、臨床により近いマウスモデルとして癌組織を超免疫不全マウス (NOG マウス) の皮下に移植した PDX マウスを用いて証明する必要がある。そこで、研究開発代表者は研究開発分担者の高知大学医学部外科 1 教室、花崎和弘教授等のグループにて手術時に得られた膵臓癌組織を用いて PDX マウスの開発を試み、膵臓癌 PDX マウスを新規に 1 系統樹立することに成功しており、免疫組織化学染色による解析の結果、LSR の発現が陽性であることを確認した。この樹立した膵臓癌 PDX モデル

(KPK1) に抗 LSR 抗体を投与すると有意な抗腫瘍効果を示した。さらに、胃癌 PDX マウスの樹立にも成功した。また、研究開発分担者の大阪大学大学院医学系研究科、木村正教授等のグループにおいても、手術時に得られた卵巣癌組織を用いて PDX マウスの開発を試み、4 系統の卵巣癌 PDX マウスを樹立し、薬効試験のために継代維持を行っている。

当初、抗 LSR 抗体のヒト化の後に (4) ヒト化抗 LSR モノクローナル抗体の非臨床試験、(5) 治験準備開始、(6) 薬事対応を予定していた。本研究期間内に抗体のヒト化が達成出来なかったため、これらの項目を実施しなかったが、今後、抗 LSR 抗体の作用機序を解明し、抗体のヒト化を行った後に着手する。

Epithelial ovarian cancer (EOC) is known as an intractable cancer with poor prognosis, due to the fact that it is naturally resistant or acquire resistance to chemotherapeutic agents. To improve prognosis of EOC, development of therapy with novel mechanism of action is urgently required. Principal investigator (PI) 's group has identified lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) as a new cancer antigen of EOC (Hiramatsu K, Sarada S, Naka T, et al., Cancer Res. 2018). LSR is a receptor for lipoprotein including VLDL and is involved in intracellular lipid uptake. PI 's group found that the prognosis of patients with LSR-high EOC is significantly poorer than that of patients with LSR-low EOC. In addition, VLDL treatment could enhance survival/proliferation of LSR-positive EOC cells in vitro. These results suggest that LSR is implicated in the pathogenesis of EOC. Increasing evidence indicates that lipid metabolism is important for the proliferation, survival and/or metastasis of cancers (Nieman KM et al., Nat Med. 2011, Kobayashi Y et al., Clinical Cancer Research. 2015). Whereas lipid metabolism is a promising target for cancer therapy, there is no anti-cancer agents that regulate lipid metabolism at present. PI 's group expects that targeting LSR is an attractive strategy to treat cancers by inhibiting lipid metabolism.

PI 's group together with Professor Kimura (Osaka University) and Dr. Tsunoda (Chugai Pharmaceutical) newly developed a monoclonal antibody against human LSR and indicated that this antibody has a marked anti-tumor effect on LSR-positive EOC cell lines in vitro and in vivo and also on patient-derived EOC xenografts in vivo. In addition, data indicated that the effect of this antibody is attributable to inhibition of lipid uptake in cancer cells.

To proceed to the clinical trial, this study is aimed to modify current anti-LSR antibody into humanized one and generate GMP-based anti-LSR antibody to achieve the nonclinical test in animals under GLP regulation. Given that our recent data indicates high LSR expression in other cancers including pancreatic cancers, the potential importance of this study is not only that it leads to development of an innovative therapy against cancers but also that it provides compelling evidence for the critical role of lipid metabolism in carcinogenic process.

To elucidate the mechanisms of the anti-tumor effect of anti-LSR monoclonal antibody, we focused on the regulation of lipid metabolism by anti-LSR monoclonal antibody. Treatment with various kinds of free fatty acid (FFA) to LSR positive cancer cells induced internalization of FFA into cancer cells. In addition, increased production of ATP and enhanced proliferation of cancer cells were confirmed. These effects were inhibited by the treatment with anti-LSR antibody or transfection with LSR-siRNA. Furthermore, tumor tissues obtained from LSR positive ovarian cancer PDX treated with anti-LSR monoclonal antibody or control antibody were analyzed by NGS analysis.

By NGS analysis, induction of apoptosis was detected by treatment with anti-LSR antibody in vivo. We also confirmed the induction of apoptosis by anti-LSR antibody in vitro. However, we could not obtain enough levels of tumor growth inhibitory effect, when in vivo efficacy study was conducted using same lot of LSR positive ovarian cancer PDX model in the Kochi university and Chugai pharmaceuticals at the same time. Therefore, humanization of anti-LSR monoclonal antibody was not conducted, and will be performed after mode of action of anti-LSR monoclonal antibody was revealed.

III 事後評価総合所見

本課題は、ACT-MS の成果をベースに、ACT-M にステージアップした課題だが、ヒト化抗体作製前に実施したいくつかのモデル動物における抗 LSR 抗体の抗腫瘍活性に、高知大学と中外製薬株式会社の結果に乖離が認められたと共に、開発に十分な薬効が確認できず、本課題の主要目標であるヒト化抗体の作製とそれを用いた非臨床試験が実施されず、当初目標の達成は未達と判断せざるを得ない。

一方、臨床検体を用いた卵巣がん、胃がん、膵臓がんの PDX モデルマウスの作成に成功したことは、今後の抗癌剤開発に資する成果と評価された。

また、キメラ抗 LSR 抗体の抗腫瘍作用の機序解明には一定の成果が認められ、脂質代謝を標的とした抗癌剤開発の可能性が示された。今後は、LSR の下流のシグナル伝達分子を直接的に同定するなど、より詳細な基礎的検討を踏まえた更なる研究の進展が望まれる。