

# 日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業 事後評価報告書



## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 難治性がんを標的とした先端的がん特異的抗体創製基盤技術開発とその医療応用  
(英語) Development of cancer-specific antibodies for refractory cancers and its clinical application

研究開発実施期間: 令和元年10月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 加藤幸成  
(英語) Yukinari Kato

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立大学法人東北大学・大学院医学系研究科・教授  
(英語) Tohoku University Graduate School of Medicine, Professor

## II 研究開発の概要

抗体医薬はCD20やHER2を標的としてがん治療に実用化されてきたが、固形がんを標的とする場合には大きな課題が存在する。すなわち、naked抗体だけでは抗腫瘍効果が小さく、国外製薬企業を中心に抗体薬物複合体(ADC)やキメラ型抗原受容体発現T細胞(CAR-T)療法などの抗腫瘍効果の高いモダリティが盛んに開発され、国内外の研究機関ではヒト抗体作製技術や抗体の小分子化等の最適化研究の競争が激化している。悪性中皮腫や膵がんなどの難治性がんに対しては、未だに有効な抗体を取得できていない。がん細胞だけに高発現する標的分子が枯渇した現状を踏まえ、安全性を確認済みの既存標的に対して抗腫瘍効果のより高い抗体医薬やモダリティの創製が世界的に進められているが、正常組織への副作用があり、抜本的な解決は期待できない。したがって、がん特異的抗体作製のための基盤技術が必要とされている。

東北大学ではこれまで、乳がんや肺がんを対象にがん組織にのみ結合するがん特異的抗体の作製技術(CasMab法)を開発した。本課題では、難治性がんに対する副作用のない抗体医薬開発を最重要課題とし、難治性がんの新規標的に対するがん特異的抗体創製のための基盤技術開発を行った。世界で開発が盛んなADCやCAR-Tに最適かつ安全に使用できるがん特異的抗体を開発し、企業導出のみならず企業との融合的共同開発を実現させることを目標とした。正常組織に大量に発現しているような膜タンパク質に対しても、翻訳後修飾の差を利用して難治性がん特異的抗体の作製を行った。また、AMED糖鎖創薬事業で開発した抗糖ペプチド抗体作製技術(GpMab法)や、BINDS事業で開発中の細胞基盤免疫法(CBIS法)と高度に連携し、難治性がん特異的抗体創製基盤技術の最適化および飛躍的迅速化、さらにノウハウやシーズの企業導出を実現することを目標とした。世界で開発が盛んなADCやCAR-Tに最適かつ安全に使用できるがん特異的抗体を開発し、企業導出のみならず企業との融合的共同

開発を実現させ、難治性がん撲滅を目指した先端的抗体医薬のための複合的基盤技術開発を最終目標とした。

本課題では、難治性がんに対するがん特異的抗体の開発を集中的に行った。本課題での標的分子は、正常組織に高発現しているが、がんの悪性化にも関与している分子である。このような分子は、製薬企業も標的として設定しにくく、本課題で積極的に狙ってきた。精製した膜タンパク質の免疫は CasMab 法の基本的手技であるが、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細胞株のみを使用するという CBIS 法との組み合わせは、本プロジェクトの開発項目として重要である。また、糖鎖とペプチドを両方認識する抗体を作製する技術である GpMab 法と CasMab 法を組み合わせることにより、エピトープに糖鎖が含まれる抗体を取得可能である。この3つの抗体作製技術を組み合わせ、がん特異的抗体を飛躍的に効率良く作製する先端的 CasMab 技術の開発を目指してきた。

まず、GpMab 法を取り入れることにより、CasMab+GpMab の先端的 CasMab 法 (CG 法) の開発を開始した。免疫原として膜タンパク質の膜外領域にペプチドタグ (PAtag, MAPtag, RAPtag) を付加し、精製を行った。精製したタンパク質をマウスに免疫し、抗体作製を開始した。GpMab 法の特徴である糖鎖不全株を平行して作製し、スクリーニングに用いた。革新的バイオから継続の標的 A については、企業導出に成功した。これが、先端バイオにおける企業導出第 1 号案件と正式に認定された。標的 A の点突然変異体に対する CasMab の結合親和性解析を精密かつ迅速に BIAcore で実施し、PCT 出願を行った。標的 A に対する抗体作製については、製薬会社との共同研究に移行したため、先端的バイオにおける実施は終了となった。革新的バイオからの継続シーズ B については、20 種類のがん特異的抗体の独占的実施許諾契約締結を製薬会社と結び、導出に成功した。標的 C に対する CasMab については、抗腫瘍効果の評価を行った。その結果を論文に投稿した結果、特許データと論文データをバイオ系企業が高く評価し、特許権譲渡契約を締結し、企業との共同研究に移行した。製薬会社からは、標的 D に対するがん特異的抗体作製の依頼があり、CG 法および CC 法 (CasMab+CBIS) を適用した結果、複数の抗 D 抗体が樹立でき、製薬会社に導出を行なうことに成功した。

がん特異的抗体開発のためのヒトがん細胞株の樹立については、脳腫瘍以外の 6 種類の細胞株を検討した。まず、高い細胞増殖能や高い遺伝子導入効率の細胞株を各腫瘍別に集め、Real-time PCR 法により 185 種類の糖鎖遺伝子の発現解析を行った。その結果、各がん種から 1 種類ずつの細胞株を決定した。令和 2 年度には、令和元年度に選んだ細胞株に E の遺伝子導入を行い、高発現株を樹立した。令和 3 年度には、これらの E 発現株をマウスに免疫し、免疫原性の確認を実施した。令和 4 年度には、令和元年度に選んだ細胞株に、F の遺伝子導入を行い、高発現株を樹立した。

膜タンパク質精製のための新規タグシステムの開発も進めた。東北大学が開発した PA tag、MAP tag、RAP tag は 12 アミノ酸のペプチドの長さが必要であるが、今回は 5 アミノ酸のタグシステムの確立を目指した。精製度が高くなるだけでなく、免疫原性が限りなく少なくなり、抗体作製効率の飛躍的な向上が期待できる。まず、5 種類のモノクローナル抗体のエピトープ検索を実施した。その結果、RIEDL をエピトープに持つ LpMab-7 を発見し、RIEDL tag と命名した。RIEDL tag を膜タンパク質に組み込み、CD20 等の膜タンパク質の検出や精製に成功し論文に発表した。RIEDL tag が今後の抗原作製にも有用であることがわかった。さらに RIEDL tag を膜タンパク質に導入後、EGFR や CD44 に対する抗体のエピトープを検索し、複数の論文発表を行った (REMAP 法)。4~5 アミノ酸の His (4 x His, 5 x His) を認識可能な抗 His tag 抗体も開発し、企業に導出した

(HisMAP 法)。また、PA tag、MAP tag を改良し、複数の論文発表を行うことにより、PA tag、MAP tag に対する抗体を企業導出した。本課題においては、合計 40 件の企業導出に成功し、先端的バイオの成果として 152 件の原著論文を執筆した。

最終的に薬を生産し、患者のもとへ届けられるのは製薬企業のみであることを念頭に置いた知財戦略は重要である。それぞれの製薬企業は、特定の疾患を標的にしていることが多い。企業が必要とする知財を完成させる努力が必要である。がん領域においても、ねらう臓器がある程度決まっていることがある。例えば、悪性中皮腫の治療を目指す場合には、CasMab 法において、免疫原作製のために悪性中皮腫の細胞株を活用するのが得

策となる。さらに、同じ標的分子が他のがん種にも発現している場合には、そのがん細胞を早い段階のスクリーニングに活用することが必要となる。企業導出や実用化をスムーズに目指すためには、企業がねらう疾患に対し、標的分子を定め、それに合わせた抗体作製法の考案も含めた知財戦略が重要である。これらの戦略を先端的バイオで実行し、企業導出後に共同で特許出願を行った。さらに、米国での臨床治験を開始することができ、アカデミアシーズの社会実装という大きな目標に近づくことができた。

In this project, we aimed to develop cancer-specific monoclonal antibodies (mAbs) using our original technology, the CasMab method. We planned to transfer the developed mAbs immediately to pharmaceutical companies. Antibody drugs have been used for cancer therapy; however, the toxicity against normal cells is always worried when non-cancer-specific mAbs are used in clinical studies. Because cancer-specific antigens are known to be limited, it might be difficult to develop mAbs for novel molecular targets. For the conventional production of mAbs, synthetic peptides or recombinant proteins using *E. coli* and mammalian cells such as CHO-K1 or HEK-293T. In this study, we used cancer cell lines, which could produce cancer-specific glycans. We combined the CasMab method with GpMab method to develop anti-glycopeptide mAbs and Cell-Based Immunization and Screening (CBIS) method to produce mAbs using target-overexpressed cell lines. Recently, antibody-drug conjugate (ADC), radioimmunotherapy (RIT), and chimeric antigen receptor T (CAR-T) therapy have been developed for novel modalities of antibody therapies and immunotherapies. We planned to utilize these technologies for our original cancer-specific mAbs. The final goal of this proposal is the development of cancer-specific antibody drugs or immunotherapies without side effects for refractory cancers such as mesotheliomas or brain tumors.

Overexpression of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in breast and gastric cancers is an important target for monoclonal antibody (mAb) therapy. All therapeutic mAbs, including anti-HER2 mAbs, exhibit adverse effects probably due to the recognition of antigens expressed in normal cells. Therefore, tumor-selective or specific mAbs can be beneficial in reducing the adverse effects. In this study, we established a novel cancer-specific anti-HER2 antibody, named H<sub>2</sub>Mab-250/H<sub>2</sub>CasMab-2 (IgG<sub>1</sub>, kappa). H<sub>2</sub>Mab-250 reacted with HER2-positive breast cancer BT-474 and SK-BR-3 cells. Importantly, H<sub>2</sub>Mab-250 did not react with non-transformed normal epithelial cells (HaCaT and MCF 10A) and immortalized normal epithelial cells in flow cytometry. In contrast, most anti-HER2 mAbs, such as H<sub>2</sub>Mab-119 and trastuzumab reacted with both cancer and normal epithelial cells. Immunohistochemical analysis demonstrated that H<sub>2</sub>Mab-250 possesses much higher reactivity to the HER2-positive breast cancer tissues compared to H<sub>2</sub>Mab-119, and did not react with normal tissues, including heart, breast, stomach, lung, colon, kidney, and esophagus. The epitope mapping demonstrated that the Trp614 of HER2 domain IV mainly contributes to the recognition by H<sub>2</sub>Mab-250. We further compared the affinity, effector activation, and antitumor effect of H<sub>2</sub>Mab-250 with trastuzumab. Results showed that H<sub>2</sub>Mab-250 possesses a comparable *in vivo* antitumor effect using BT-474 and SK-BR-3 with trastuzumab despite the lower affinity and effector activation than trastuzumab *in vitro*. H<sub>2</sub>Mab-250 could contribute to the development of chimeric antigen receptor-T or antibody-drug conjugates without adverse effects for breast cancer therapy.