

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  
(国際競争力のある次世代抗体医薬品製造技術開発)  
事後成果報告書

## I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 抗腫瘍免疫を活性化する次世代型高機能化抗糖鎖抗体の開発  
(英語) Development of next-generation highly functional anti-glycan antibodies  
that activate anti-tumor immunity

研究開発実施期間：令和3年7月1日～令和8年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 川島 博人  
(英語) Hiroto Kawashima

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 国立大学法人千葉大学・大学院薬学研究院・教授  
(英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

## II 研究開発の概要

和文：

### (1) 研究開発の概要・目的

抗体医薬は、有効性の高い代表的なバイオ医薬品であり、世界各地で研究開発が進められているが、創薬標的の枯渇が近年の抗体医薬開発のボトルネックとなっている。一方糖鎖は、炎症やがん化・がん進展に伴い、ダイナミックに構造を変化させることから、病態バイオマーカーとして有用であるとともに、新規創薬標的として有望である。しかし、糖鎖に対する抗体作製は困難であり、抗糖鎖抗体医薬の開発は十分に進んでない。

このような状況のもと我々は、AMED 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：H28～R2 年度)において、糖鎖合成酵素欠損マウスを同酵素の過剰発現細胞で免疫することにより、効率良く特異性の高い抗糖鎖抗体を作製する革新的な方法論を開発した。さらに同方法論を用いて、免疫疾患治療効果を持つヒト化抗糖鎖抗体の作製に成功し、令和 3 年に PCT 出願をするとともに、糖鎖を標的とする新規抗体医薬の開発を目指した研究開発を推進している。

本研究において我々は、独自に開発した抗糖鎖抗体がリンパ節高内皮細静脈(high endothelial venule, HEV)と特異的に結合することに着目し、リンパ節を起点とする抗腫瘍免疫の効率的な誘導を可能とする新規高機能化抗糖鎖抗体の開発を目指す。具体的には、(1) 同抗体と特定のケモカインと連結した高機能化抗糖鎖抗体を作製し、抗腫瘍活性を持つエフェクター細胞である Natural killer (NK)細胞のリンパ節への遊走を促進させるとともに、(2) 同抗体を免疫細胞活性化作用を持つサイトカインと連結した高機能化抗糖鎖抗体を作製し、リンパ節内における抗腫瘍免疫の選択的活性化を目指す。近年、免疫チェックポイント分子に対する抗体医薬が、がん免疫療法に活用されているが、T 細胞応答の起こらないがんには効果が見られない。一方、本研究で開発を目指す高機能化抗糖鎖抗体は、NK 細胞の遊走・活性化をもたらすものである。

本研究の最終目標は、本研究で開発する NK 細胞の遊走・活性化作用を持つ高機能化抗糖鎖抗体と、T 細胞応答を亢進させる免疫チェックポイント阻害剤との併用による相乗的な抗腫瘍免疫の活性化を達成することである。本研究の成果は、腫瘍に対する自然免疫と獲得免疫の両者の活性化に基づく有効ながん治療につながることを期待される。

### (2) 研究開発達成状況

研究開発代表者らが独自に開発した抗糖鎖モノクローナル抗体作製法を用いて開発した抗糖鎖抗体を活用して、新規高機能化抗糖鎖抗体を作製し、抗腫瘍免疫を活性化の技術基盤を開発する。具体的には、二種類の高機能化抗糖鎖抗体を作製した。研究開発項目 1 においてケモカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体を作製し、NK 細胞の所属リンパ節への選択的な遊走を誘導するとともに、研究開発項目 2 においてサイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体を作製し、NK 細胞の所属リンパ節における選択的活性化を誘導し、抗腫瘍免疫の活性化を目指した。各研究開発項目の達成状況は以下の通りである。

#### 【研究開発項目 1】 ケモカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体の作製

はじめに Natural killer (NK)細胞の選択的な遊走を引き起こす活性を持つ特定のケモカインを抗糖鎖一本鎖抗体と連結させたケモカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体を作製し、ケモカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体の糖結合特異性を、特定の等転移酵素遺伝子欠損マウスを用いた免疫蛍光染色により決定した。次に、NK 細胞株を用いた細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を指標とした細胞内シグナル伝達の解析を行った。その結果、ケモカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体は、NK 細胞株のケモカインレセプターに結合し、シグナル伝達を引き起こすことが確認された。

次に、ケモタキシスアッセイにより、ケモカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体の生理活性を解析した。その結果、ケモカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体は、抗糖鎖抗体を融合していない元のケモカインと同等の NK 細胞遊走促進活性を示した。この NK 細胞遊走促進は、ケモカインレセプターに対する抗体で阻害されたことから、レセプ

ターを介する特異的なものであることが確認された。その後、PSPO のアドバイスに基づいて、より顕著な活性の認められた研究開発項目 2 のサイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体の研究に注力することになった。

### 【研究開発項目 2】 サイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体の作製と抗腫瘍免疫の活性化

はじめに、独自に樹立した抗糖鎖抗体の配列情報に基づいて設計した一本鎖抗体と、NK 細胞の増殖・活性化作用を持つ特定のサイトカインを連結したサイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体を作製した。次に、サイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体の糖結合特異性を、元の抗糖鎖抗体の認識糖鎖の合成に関わる糖転移酵素遺伝子導入株との反応性解析により解析した。その結果、サイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体は、元の抗糖鎖抗体と同様の結合特異性を保持することが確認された。

次に、抗腫瘍活性を保持した NK 細胞株を用いて、同高機能化抗糖鎖抗体の生理活性を、細胞増殖誘導活性およびがん細胞に対する *ex vivo* 細胞傷害アッセイにより評価した。その結果、サイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体が、濃度依存的に NK 細胞株の増殖を誘導することが明らかとなった。また、*ex vivo* 細胞傷害アッセイにおいて、がん細胞をターゲットとし、PBS 添加群およびサイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体添加群に関し、NK 細胞によるがん細胞の傷害率を解析した結果、サイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体の添加により、PBS 添加と比較して、抗腫瘍活性が亢進することが分かった。また、サイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体および抗糖鎖抗体部分を欠くサイトカイン融合型抗体の NK 細胞遊走活性を評価した。その結果、サイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体の方がより顕著に NK 細胞の遊走を引き起こすことを見出した。

サイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体は NK 細胞を介するがんに対する自然免疫を活性化し、免疫チェックポイント阻害剤は CD8T 細胞を介するがんに対する獲得免疫を活性化することから、両者の併用により、より効果的な抗腫瘍免疫の活性化が起こることが期待される。そこで、マウス大腸がん細胞株の皮下移植モデルを用いて、サイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体および免疫チェックポイント阻害剤の単独投与および併用投与を実施し、皮下腫瘍の増殖を解析した。その結果、サイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体と免疫チェックポイント阻害剤の併用による顕著な抗腫瘍免疫活性の亢進を見出した。この際に、サイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体投与群および併用投与群において NK 細胞の集積が認められた。以上より、NK 細胞の集積と活性化をもたらすサイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体は、免疫チェックポイント阻害剤との併用によって、顕著な抗腫瘍免疫の活性化を引き起こすことが示された。

### (3) 研究開発成果と今後の見通し

抗体医薬の創薬標的の枯渇が認識される中、本研究は、新たな創薬ターゲットとして糖鎖に着目し、抗腫瘍免疫を活性化する独自性のある機能化抗糖鎖抗体の開発に繋げようとするものであり、国際的にも競争力のある技術である。

本研究で開発したサイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体は、がんに対する自然免疫応答に関わる NK 細胞の遊走・活性化作用を示すとともに、CD8T 細胞を介する獲得免疫応答を亢進させる免疫チェックポイント阻害剤との併用によって、顕著な抗腫瘍免疫の活性化作用を示した。このことから本研究の成果は、腫瘍に対する NK 細胞を介する自然免疫と CD8T 細胞を介する獲得免疫の両者の活性化に基づく有効ながん治療につながることを期待されるものであり、成果は医療分野の進展に資するもの考えられる。具体的には、免疫チェックポイント阻害剤は著効を示す症例がある一方で、奏効率は 2~3 割程度であることが課題となっている。本研究で開発したサイトカイン融合型高機能化抗糖鎖抗体は、免疫チェックポイント阻害剤単独で十分な効果の見られなかった症例で併用することによって、奏効率の向上につながることを期待され、社会的なニーズに対応するものである。本研究により、近年注目されている免疫抑制シグナルの解除にベースをおく免疫チェックポイント阻害剤を用いたがん免疫療法を補完する抗腫瘍免疫活性化療法の新基盤技術の確立が期待される。

## (1) Research and Development Overview and Objectives

Glycans undergo dynamic structural changes associated with inflammation, carcinogenesis, and cancer progression, making them useful pathological biomarkers and promising new drug discovery targets. However, producing antibodies against glycans is difficult, and the development of anti-glycan antibody drugs has not sufficiently progressed. In light of this situation, we developed an innovative methodology for efficiently generating highly specific anti-glycan antibodies by immunizing glycosyltransferase-deficient mice with cells overexpressing the missing enzyme as part of the AMED Drug Discovery Platform Technology Development Project for Next-Generation Treatment and Diagnosis (FY2016-FY2020).

In this study, we aimed to develop a novel, highly functionalized anti-glycan antibody that could efficiently induce anti-tumor immunity. Specifically, we conjugated the antibody to a cytokine with NK cell activation properties to create a highly functionalized anti-glycan antibody, which would selectively activate anti-tumor immunity. In recent years, antibody drugs targeting immune checkpoint molecules have been used in cancer immunotherapy, but they have not been effective against cancers that do not elicit a T cell response. The ultimate goal of this research is to achieve synergistic activation of anti-tumor immunity by combining the highly functionalized anti-glycan antibodies developed in this research, which have the effect of activating and stimulating NK cell migration, with immune checkpoint inhibitors that enhance T cell responses.

## (2) Research and Development Status

First, we constructed cytokine-fused, highly functionalized anti-glycan antibodies by linking a single-chain antibody designed based on the sequence information of an anti-glycan antibody with a specific cytokine that stimulates NK cell proliferation and activation. Next, the carbohydrate-binding specificity of the cytokine-fused, highly functionalized anti-glycan antibody was analyzed by flow cytometry using a cell line expressing the glycan epitope recognized by the anti-glycan antibody. The results confirmed that the cytokine-fused, highly functionalized anti-glycan antibody retained the same binding specificity as the original anti-glycan antibody.

Next, using an NK cell line that retained anti-tumor activity, the physiological activity of the highly functionalized anti-glycan antibody was evaluated by cell proliferation induction and *ex vivo* cytotoxicity assays against cancer cells. The results showed that cytokine-fused, highly functionalized anti-glycan antibodies induced the proliferation of NK cell lines in a concentration-dependent manner. Furthermore, in an *ex vivo* cytotoxicity assay, cancer cells were targeted and the NK cell cytotoxicity rate was analyzed. The results showed that the addition of cytokine-fused, highly functionalized anti-glycan antibodies enhanced antitumor activity compared to PBS treatment. Furthermore, the NK cell migration activity of cytokine-fused, highly functionalized anti-glycan antibodies and cytokine-fused antibodies lacking the anti-glycan antibody moiety was evaluated. The results showed that cytokine-fused, highly functionalized anti-glycan antibodies induced more significant NK cell migration.

Since cytokine-fused, highly functionalized anti-glycan antibodies activate innate immunity against cancer via NK cells, and immune checkpoint inhibitors activate adaptive immunity against cancer via CD8 T cells, the combination of the two is expected to result in more effective activation of antitumor immunity. Therefore, using a subcutaneously xenografted mouse colon cancer cell line model, we administered cytokine-fused, highly functionalized anti-glycan antibodies and immune checkpoint inhibitors alone and in combination, and analyzed subcutaneous tumor growth. We found that the combination of cytokine-fused, highly functionalized anti-glycan antibodies and immune checkpoint inhibitors significantly enhanced anti-tumor immune activity. NK cell accumulation was observed in both the cytokine-fused, highly functionalized anti-glycan antibody and the combined treatment groups. These findings demonstrate that the cytokine-fused, highly functionalized anti-glycan antibody, which promotes NK cell accumulation and activation, significantly activates anti-tumor immunity when combined with immune checkpoint inhibitors.