

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業  
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) 貪食細胞-がん細胞相互作用を制御する新たながん免疫療法の開発  
(英語) Development of a novel cancer immunotherapy regulating the interaction between phagocytes and cancer cells
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人神戸大学 大学院医学研究科 生化学・分子生物学講座 シグナル統合学分野 教授 的崎 尚
- 所属 役職 氏名： (英語) Kobe University Graduate School of Medicine, Professor, Takashi Matozaki
- 実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) SIRP $\alpha$  に作用とする薬剤単独使用による抗腫瘍効果の有効性とその作用機序の解明
- 開発課題名： (英語) Evaluation of the efficacy of a drug targeting SIRP $\alpha$  as monotherapy and understanding of mechanisms underlying its antitumor effect
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人神戸大学 大学院医学研究科 生化学・分子生物学講座 シグナル統合学分野 教授 的崎 尚
- 所属 役職 氏名： (英語) Kobe University Graduate School of Medicine, Professor, Takashi Matozaki
- 分担研究 (日本語) SIRP $\alpha$  を標的とする薬剤と他の抗腫瘍剤との併用の有効性とその作用機序の解明
- 開発課題名： (英語) Evaluation of the efficacy of an drug targeting SIRP $\alpha$  in combination with other antitumor drugs and understanding of mechanisms underlying its antitumor effect

- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人神戸大学 大学院医学研究科 生化学・分子生物学講座 シグナル統合学分野 准教授 村田 陽二
- 所属 役職 氏名: (英 語) Kobe University Graduate School of Medicine, Associate Professor, Yoji Murata
- 分担研究 (日本語) SIRP $\alpha$  を標的として抗腫瘍効果を示す新規化合物の開発
- 開発課題名: (英 語) Development of novel chemical compounds targeting SIRP $\alpha$ , which induce antitumor effects
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人神戸大学 大学院医学研究科 生化学・分子生物学講座 シグナル統合学分野 助教 小谷 武徳
- 所属 役職 氏名: (英 語) Kobe University Graduate School of Medicine, Assistant Professor, Takenori Kotani
- 分担研究 (日本語) 免疫細胞ヒト化マウスを用いた抗腫瘍薬剤の in vivo 評価系の開発
- 開発課題名: (英 語) Development of an in vivo evaluation system for an antitumor agent using an immune cell-humanized mouse model
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人神戸大学 大学院医学研究科 生化学・分子生物学講座 シグナル統合学分野 講師 齊藤 泰之
- 所属 役職 氏名: (英 語) Kobe University Graduate School of Medicine, Associate Professor, Yasuyuki Saito

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### 和文

これまでに、開発研究代表者は、貪食細胞とがん細胞間で形成される細胞間シグナル CD47-SIRP $\alpha$  系が貪食細胞によるがん細胞の貪食排除制御に関与することを見出していた。そこで、平成 28 年度において本研究開発では、SIRP $\alpha$  に作用する薬剤単独使用 (項目①) または他の抗腫瘍剤との併用 (項目②) による抗腫瘍効果の有効性とその作用機序の解析、SIRP $\alpha$  に作用して抗腫瘍効果を示す新規化合物の作出 (項目③)、免疫細胞ヒト化マウスを用いた抗腫瘍薬剤の in vivo 評価系の開発 (項目④) について研究開発を進め、以下の研究開発成果を得た。

項目①: SIRP $\alpha$  発現もしくは非発現の 3 種の異なるマウス由来がん細胞を皮下移植した腫瘍モデルマウスを作製し、SIRP $\alpha$  に作用する薬剤単独使用による抗腫瘍効果について検証したところ、SIRP $\alpha$  非発現がん細胞に比べ SIRP $\alpha$  発現がん細胞を移植したマウスにおいて薬剤単独使用での抗腫瘍効果が強く認められることが確認された。また、強い抗腫瘍効果が認められたマウス由来がん細胞を皮下移植したマウスを用いた解析から、SIRP $\alpha$  に作用する薬剤単独使用による抗腫瘍効果には CD4 陽性ではなく CD8 陽性 T 細胞が関与することを見出した。

項目②: SIRP $\alpha$  発現もしくは非発現の 2 種のマウス由来腫瘍細胞を皮下移植したマウスを用いた解析から、SIRP $\alpha$  に作用する薬剤または特定の抗腫瘍剤の単独投与に比べ、両薬剤の併用がどちらの腫瘍モデ

ルマウスにおいてもより強い抗腫瘍効果を示すことを見出した。また、両薬剤の投与により強い抗腫瘍効果を認めた SIRP $\alpha$ 非発現がん細胞を移植したマウスを用いた解析から、その抗腫瘍効果にはマクロファージの関与が低いものと考えられた。さらに、両薬剤のマウスへの投与によって、著明な体重減少や行動異常は認められず、マウスにおいて両薬剤投与による致命的な副作用は生じないものと考えられた。項目③：すでに取得していたヒト SIRP $\alpha$  もしくはヒト CD47 に結合すると考えられる化合物が CD47-SIRP $\alpha$  結合阻害能を有するかについて *in vitro* で検証したが、阻害活性を認めなかった。一方、ヒト SIRP $\alpha$  に対する化合物が培養細胞上に発現するヒト SIRP $\alpha$  に対して結合能を有することは確認できた。そこで、新規の SIRP $\alpha$  の組換え蛋白質を作製し、新たに CD47-SIRP $\alpha$  結合を阻害する化合物のスクリーニングを行うに至った。

項目④：さい帯血よりヒト造血幹細胞を高度に含む CD34 陽性分画の単離、保存を開始した。続いて、免疫不全マウスに単離したヒトさい帯血由来 CD34 陽性細胞を移植し、免疫細胞ヒト化マウスを作製した。これらのマウスでは全身においてヒト血球細胞を高度に有することが確認できた。さらにヒト由来腫瘍細胞を免疫細胞ヒト化マウスに皮下投与したヒト腫瘍モデルマウスを作製し、腫瘍の生着や増殖、免疫細胞の浸潤有無につき検討を行なった。

## 英文

We have recently demonstrated that the interaction of the membrane proteins CD47 (on tumor cells) and SIRP $\alpha$  (on phagocytes) plays a crucial role in the elimination of tumors by phagocytes *in vivo*. In the project “Development of a novel cancer immunotherapy regulating the interaction between phagocytes and cancer cells”, we examined the following four subjects: 1. Evaluation of the efficacy of a drug targeting SIRP $\alpha$  as monotherapy and understanding of mechanisms underlying its antitumor effect, 2. Evaluation of the efficacy of a drug targeting SIRP $\alpha$  in combination with other antitumor drugs and understanding of mechanisms underlying its antitumor effect, 3. Development of novel chemical compounds targeting SIRP $\alpha$ , which induce antitumor effects, and 4. Development of an *in vivo* evaluation system for antitumor drugs using an immune cell-humanized mouse model. We achieved the following research and development results.

1. We examined the impact of an SIRP $\alpha$ -targeting drug on the growth of tumors formed by three murine tumor cell lines (one SIRP $\alpha$ -expressing tumor cell line and two SIRP $\alpha$ -nonexpressing tumor cell lines) injected into syngeneic mice. We found that an SIRP $\alpha$ -targeting drug was likely to induce antitumor effect against SIRP $\alpha$ -expressing tumors rather than SIRP $\alpha$ -nonexpressing tumors. We also found that CD8<sup>+</sup> T cells, but not CD4<sup>+</sup> T cells, contributed to the antitumor effect of the drug in mice subcutaneously injected with syngeneic SIRP $\alpha$ -expressing tumor cells.

2. We examined the effect of an SIRP $\alpha$ -targeting drug in combination with other antitumor drugs on tumor formation by two murine tumor cell lines (SIRP $\alpha$ -expressing and -nonexpressing tumor cell lines) injected into syngeneic mice. We found that compared with an SIRP $\alpha$ -targeting drug alone or another antitumor drug alone, combination therapy with these drugs induced the more potent suppression of tumor growth in mice subcutaneously transplanted with SIRP $\alpha$ -expressing or -nonexpressing syngeneic tumor cells. Moreover, the antitumor effect of such combination therapy in SIRP $\alpha$ -nonexpressing tumor-bearing mice was unlikely to be attributable to the function of macrophages. We also found that the combination therapy did not cause body weight loss and abnormal behavior in mice. Adverse effects of the combination therapy were thus likely to be minimal.

3. We previously obtained chemical compounds, which can interact with the extracellular domain of SIRP $\alpha$  that contains the binding site for CD47, a ligand of SIRP $\alpha$ . So we evaluated whether these compounds could inhibit the CD47-SIRP $\alpha$  interaction in vitro. However, these compounds failed to prevent the CD47-SIRP $\alpha$  interaction, although they bound to the intact SIRP $\alpha$  protein on the cell surface of cultured cells expressing SIRP $\alpha$ . To efficiently obtain new chemical compounds, which react with SIRP $\alpha$  and are capable of inhibiting the CD47-SIRP $\alpha$  interaction, we have generated a recombinant protein composed of the Fc domain of human IgG1 fused to the domain of SIRP $\alpha$  that mediates the interaction with CD47. We are now searching chemical compounds using the recombinant protein.

4. We started to isolate and store CD34<sup>+</sup> cells, which highly contain human hematopoietic stem cells from cord blood cells. We next transplanted these cord blood-derived CD34<sup>+</sup> cells into immuno-deficient mice to generate immune cell-humanized mice. We observed the high engraftment of human hematopoietic cells throughout the body after transplantation. Moreover, we generated a tumor-bearing mouse model in immune cell-humanized mice, which were inoculated with human-derived tumor cells, and evaluated tumor engraftment and progression as well as infiltration of immune cells into tumors.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

YANAGITA T, MURATA Y, TANAKA D, MOTEGI SI, ARAI E, DANIWIJAYA EW, HAZAMA D, WASHIO K, SAITO Y, KOTANI T, OHNISHI H, OLDENBORG PA, GARCIA NV, MIYASAKA M, ISHIKAWA O, KANAI Y, KOMORI T, MATUZAKI T. Anti-SIRP $\alpha$  antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy. JCI Insight. 2017, 2, e8914.

SAITO Y, ELLEGAST JM, RAFIEI A, SONG Y, KULL D, HEIKENWALDER M, RONGVAUX A, HALENE S, FLAVELL RA, MANZ MG. Peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells efficiently engraft human cytokine knock-in mice. Blood. 2016, 128, 1829-33.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

Therapeutic application of anti-SIRP $\alpha$  antibody in cancer treatment, ポスター, Tadahiko Yanagita, Yoji Murata, Daisuke Tanaka, Yasuyuki Saito, Takenori Kotani, Takahide Komori, Takashi Matozaki, 第12回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス & 革新がんゲノム国際シンポジウム, 2016/10/28, 国内.

Human hemato-lymphoid system development in human cytokine knock-in mice engrafted with adult donor-derived CD34<sup>+</sup> cells, 口頭, Yasuyuki Saito, Takashi Matozaki, Richard A. Flavell, Markus G. Manz, 第12回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス & 革新がんゲノム国際シンポジウム, 2016/10/28, 国内.

Development of novel cancer immunotherapy targeting tumor microenvironment, 口頭, 的崎尚,  
第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/8, 国内.

抗 SIRP  $\alpha$  抗体を用いた新たながん治療法, 口頭, 柳田匡彦, 村田陽二, 田中大介, 齊藤泰之, 小谷  
武徳, 古森孝英, 的崎尚, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6, 国内.

細胞間シグナル CD47-SIRP  $\alpha$  系の生理機能とその臨床応用, 口頭, 的崎尚, 村田陽二, 齊藤泰之,  
小谷武徳, 柳田匡彦, 田中大介, 大西浩史, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/25, 国内.

細胞間シグナル CD47-SIRP  $\alpha$  系の生理機能と臨床応用, 口頭, 的崎尚, 第 1 回徳島大学・神戸大学連  
携シンポジウム, 2016/9/6, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし