

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) 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
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology
Transfer
Acceleration Transformative Research for Medical Innovation (ACT-MS)

研究開発課題名： (日本語) AYA世代の希少がんである骨肉腫の増殖・転移を促進するポドプラニンを標的としたヒト化中和抗体の実用化
(英語) Development of the humanized anti-podoplanin antibody to inhibit proliferation and metastasis of osteosarcoma that occurred in the AYA generation.

研究開発担当者 (日本語) 公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター 所長 藤田直也
所属 役職 氏名： (英語) Japanese Foundation for Cancer Research, The Cancer Chemotherapy Center, Center Director, Naoya Fujita, Ph.D.

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

骨肉腫は約 100 万人に 1 人という割合でしか発生しない希少がんであり、AYA 世代 (15～29 歳) に多く発症することが知られている。抗がん剤治療と手術が現在の治療の基本となっているが、大量抗がん剤治療が手術後に行われるため、AYA 世代特有の妊孕性への影響が懸念されており、新治療法の開発が望まれている。そこで本研究開発課題では、骨肉腫の 9 割強に発現が認められるポドプラニンを標的にしたヒト化中和抗体の抗腫瘍効果を検証する。

(公財) がん研究会有明病院にて生検あるいは手術を行った骨肉腫患者組織より、細胞株 (PDC) の樹立を進めるとともに、一部は組織検体を直接に免疫不全マウスに移植してマウス個体内で増殖するヒト骨肉腫 (PDX) モデル系の樹立を試みた。これまでに、PDC を 2 細胞株樹立することに成功するとともに、PDX として 2 系統樹立することに成功した。またこれらの PDC と PDX の骨肉腫細胞株のポドプラニン発現を WB 法で検証した結果、PDC ならびに PDX の 1 種類ずつに発現が認められており、ポドプラニン陽性で可移植性の骨肉腫細胞株を 1 種類以上同定するとのマイルストーンは達成

された。

本委託研究事業にて開発予定の PG4D2 抗体を基にしたヒト化抗体は、ヒトポドプラニンに強く反応するが、サルポドプラニンへの結合活性は弱い。そのため、サルポドプラニンの機能を阻害した際に生じる副作用を適切に評価するためには、サルポドプラニンへの結合活性が高く、サルポドプラニンと CLEC-2 の結合を阻害する中和抗体を樹立したうえで、サルでの毒性試験を実施する必要がある。そこで、サルポドプラニンの PLAG4 ドメインをタンデムにつないだペプチドを作製し、BALB/c マウスに免疫し、常法に従ってマウス脾臓細胞をミエローマ細胞と融合することで抗サルポドプラニン抗体産生ハイブリドーマを樹立した。また、抗体産生ハイブリドーマをマウス腹腔内にて増殖させ、その腹水内に含まれる抗サルポドプラニン抗体を精製した。これまでに、3 種類の抗サルポドプラニン抗体の樹立に成功した。これら 3 種類の抗体のサブクラスはどれもマウス IgG1 であり、サルポドプラニンの PLAG4 ドメイン近傍を認識していた。しかし、2 種類の抗体はサルポドプラニンへの強い反応は認めたが、ヒトポドプラニンへの結合活性はほとんど認められなかった。残りの 1 種類の抗サルポドプラニン抗体 (クローン 2F7) はサルポドプラニンとヒトポドプラニンに対してほぼ同等な結合活性を示した。またこのヒトポドプラニンをも認識する抗体は、サルポドプラニンとヒト CLEC-2 分子との結合を阻害する中和抗体であることが確認された。よって、サルポドプラニンを認識する抗体を 1 種類以上樹立するとのマイルストーンは達成された。

Osteosarcoma is a rare cancer occurring at the rate of one person in about one million people, and frequently occurred in the adolescent and young adult generation (AYA generation: from 15 to 29 years old). Surgical resection and chemotherapeutic drug treatment are the main strategy for osteosarcoma treatment. Because aggressive multiagent chemotherapy was frequently applied after surgery, the influence of fertilization to the patients in AYA generation is concerned. So, development of new therapies for osteosarcoma treatment is desired. From this reason, we investigated the anti-tumor activity of our developing humanized antibody recognizing podoplanin in which more than 90% of osteosarcoma expressed.

We firstly tried to establish patient-derived cell lines and patient-derived xenograft models using osteosarcoma specimens that were resected in our Institute JFCR Ariake hospital. Until now, we succeeded to establish two patient-derived cell (PDC) lines and two patient-derived xenograft (PDX) models. Western blot analyses revealed that one PDC line and one PDX model overexpressed podoplanin on their cell surface. So, the milestone to establish one or more transplantable podoplanin-positive osteosarcoma cells was achieved.

Our goal in this project is to establish humanized anti-human podoplanin antibody from our previously established neutralizing mouse antibody PG4D2 and to estimate its side effects in animal models. Unfortunately, PG4D2 recognition to monkey podoplanin is weak when compared to its recognition to human podoplanin. In order to adequately evaluate the side effects occurring when inhibiting podoplanin function in monkey, it is necessary to establish a neutralizing antibody that has high affinity to monkey podoplanin and inhibits the binding between monkey podoplanin

and CLEC-2. So, we tried to establish neutralizing anti-monkey podoplanin antibodies by immunizing mice with tandemly connected monkey PLAG4 domains as the antigen. After screening of the binding capabilities to monkey podoplanin, we purified antibodies from ascites fluid that were collected from hybridoma-injected BALB/c-nu mice. Until now, we succeeded to establish three anti-monkey podoplanin antibodies of mouse IgG1 subclass that had high affinity to monkey podoplanin. Interestingly, two antibodies exhibited no or low binding capabilities to human podoplanin, though they had high affinity to monkey podoplanin. The remaining one antibody 2F7 exhibited high affinity to both human and monkey podoplanin. Moreover, 2F7 antibody could inhibit monkey podoplanin binding to CLEC-2. Thus, the milestone to establish one or more anti-monkey podoplanin antibodies was achieved.

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 0 件）

該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ポドプランインの新規血小板結合部位の阻害は血小板凝集とがん転移を抑制する, 口頭, 関口貴哉, 竹本愛, 藤田直也, 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/07, 国内.
2. Podoplanin を介した血小板凝集による腫瘍の増大, 口頭, 宮田憲一, 竹本愛, 藤田直也, 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/06, 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