



Anti-SIRP α antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy

Yanagita, Tadahiko

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6779号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006779>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Anti-SIRP α antibodies as a potential new tool for
cancer immunotherapy

がん免疫治療における新たな治療薬としての
抗 SIRP α 抗体

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
口腔外科学
(指導教員: 古森孝英教授)

柳田匡彦

(目的)

膜型分子である SIRP α は同じく膜型分子の CD47 と互いの細胞外領域を介して相互作用し、細胞間シグナル伝達システム CD47-SIRP α 系を構成する。これまでに私が所属する研究室では、がん細胞上に発現する CD47 と食食細胞上に発現する SIRP α との相互作用により形成される CD47-SIRP α 系が食食細胞によるがん細胞の食食を抑制的に制御することを見出している。そこで本研究では、CD47-SIRP α 結合を阻害する抗 SIRP α 抗体が食食細胞によるがん細胞の食食排除を増強もしくは誘導し得るかについて腫瘍モデルマウス等を用いて解析し、がん免疫療法における新たな治療薬としての抗 SIRP α 抗体の有効性について検討した。

(方法、結果及び考察)

抗 SIRP α 抗体がヒトがん細胞に対して抗腫瘍効果を有する可能性を検討する目的で、ヒトがん細胞における SIRP α の発現についてデータベース (Human protein atlas, Cancer Cell Line Encyclopedia) を用いて解析したところ、腎がんおよびメラノーマで SIRP α が高発現する可能性が示唆された。そこで、ヒト腎がん組織における SIRP α の発現を検討するため、正常組織とがん組織で SIRP α mRNA の発現量をマイクロアレー解析により比較検討した。95 人の淡明細胞がん患者のサンプルでは、正常組織と比較してがん組織において SIRP α mRNA の有意な発現量の増加を認めた。また、抗 SIRP α 抗体を用いた免疫組織染色からも、がん組織における SIRP α の顕著な発現が確認された。同様に、ヒトメラノーマの免疫組織染色の解析においても、がん組織では SIRP α の強い染色像を認め、腫瘍マーカーである MART-1 との共局在が確認された。さらに、ウエスタンプロット法による解析から複数のヒト腎がん又はメラノーマ由来株化細胞、マウス腎がん由来株化細胞 (RENCA 細胞)、マウスマラノーマ由来株化細胞 (B16BL6

細胞)において、顕著な SIRP α の発現が確認された。これらより、腎がんおよびメラノーマ細胞では SIRP α が高度に発現していると考えられた。

そこで、野生型 BALB/c マウスへの RENCA 細胞の皮下移植モデル又は野生型 C57BL/6 マウスへの B16BL6 細胞の尾静脈投与によるメラノーマ実験的肺転移モデルを作製し、抗 SIRP α 抗体が SIRP α 発現がん細胞に対して抗腫瘍効果を示すかについて検討した。RENCA 細胞を皮下移植 (5×10^5 cells) 後直ちに、コントロール抗体、CD47-SIRP α 結合阻害能を有する抗 SIRP α 抗体 (MY-1) および CD47-SIRP α 結合阻害能をもたない抗 SIRP α 抗体 (P84) の投与 (各 $200 \mu\text{g}/\text{匹}$ 、3 回/週) を開始したところ、コントロール抗体、P84 投与に比べ、MY-1 投与群では有意な腫瘍増殖の抑制と生存率の上昇を認めた。また、皮下移植後、腫瘍体積が約 100 mm^3 に到達した時点より、各抗体の投与 ($400 \mu\text{g}/\text{匹}$ 、3 回/週) を開始した際にも、MY-1 投与群では有意な腫瘍増殖抑制と生存率の上昇が確認された。さらに、B16BL6 細胞の尾静脈投与 (5×10^4 cells) による実験的肺転移モデルにおいても、コントロール抗体や P84 に比べ MY-1 投与群 ($200 \mu\text{g}/\text{匹}$ 、3 回/週) では、肺に形成された腫瘍結節数の有意な減少を認め、他の抗体に比べて強い抗腫瘍効果を有することが明らかとなった。また、MY-1 の継続投与群では、血液学的な検査において抗体投与による重篤な副作用は認めなかった。

上記の MY-1 抗体投与による抗腫瘍効果が食食細胞であるマクロファージに依存的であるかを検討するため、クロドロン酸内包リポソームを尾静脈よりマウスに投与 (RENCA 細胞皮下移植 2 日前から 2 日毎) し、マクロファージの枯渇を行った際の MY-1 の抗腫瘍効果を検討した。その結果、マクロファージ枯渇群では、MY-1 投与による腫瘍増殖抑制効果の減弱を認めたことから、MY-1 の抗腫瘍効果にはマクロファージが重要であると考えられた。さらに、この MY-1 の抗腫瘍効果がマクロファージによる RENCA 細胞の食食に依存的であるかについて評価するため、*in vitro* にて骨髄細胞由来マクロファージと CFSE 蛍光ラベルを行った RENCA 細胞を MY-1、コントロール抗体又は P84

存在下で共培養し、マクロファージによる RENCA 細胞の食食率を評価した。その結果、MY-1 存在下では P84 やコントロール抗体と比較して、マクロファージによる有意な RENCA 細胞の食食促進を認めた。一方、siRNA により SIRP α 発現をノックダウンさせた RENCA 細胞を用いた場合には、コントロールの RENCA 細胞と比べ、MY-1 存在下でのマクロファージによる食食の有意な減少を認めた。これらより、抗 SIRP α 抗体の SIRP α 発現細胞に対する抗腫瘍効果は、抗 SIRP α 抗体によるがん細胞のオプソニン化を介したマクロファージの食食誘導と CD47-SIRP α 結合阻害によるその食食促進の 2 重効果によるものであると考えられた。

マウス個体内にはマクロファージ以外にも腫瘍免疫を担当する免疫細胞が存在する。そこで、いかなる免疫細胞が MY-1 の抗腫瘍効果に関与しているかを検討するため、MY-1 またはコントロール抗体を投与した RENCA 細胞皮下移植マウスから腫瘍を回収し、腫瘍内に浸潤している免疫細胞の存在比を検討したところ、NK 細胞や CD8 陽性 T 細胞の割合がコントロール投与群に比べ MY-1 投与群で増加していた。さらに、抗アシクロ GM1 抗体または抗 CD8 抗体の投与により、それぞれの免疫細胞をマウス個体内から枯渇させた状態で MY-1 の抗腫瘍効果について評価したところ、いずれの場合においても、MY-1 の腫瘍増殖抑制効果の有意な減弱を認めた。すなわち、MY-1 の抗腫瘍効果には、マクロファージの他に NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞も関与していることが強く示唆された。

一方、私の所属する研究室では、既存の抗体医薬が有する抗体依存性細胞食食活性に対して CD47-SIRP α 系が抑制的に作用することを見出していた。そこで、CD47-SIRP α 結合を阻害する MY-1 抗体が、抗体依存性細胞食食活性の誘導能を有する既存の抗体医薬の抗腫瘍効果を増強し得るかについて検討を進めた。免疫不全マウスである NOD/SCID マウスにヒト B 細胞リンパ腫由来株化細胞 (Raji 細胞) の皮下移植 (3×10^6 cells/匹) を行い、B 細胞リンパ腫の抗体医薬であるリツキシマブ (抗 CD20 モノクロ

ナル抗体)と MY-1 抗体との併用効果を評価した。Raji 細胞皮下移植後、腫瘍体積が 150～200 mm³に達した時点より抗体投与を開始したところ、コントロール抗体 (200 μg/匹、2 回/週)、リツキシマブ (150 μg/匹、2 回/週)、P84 (200 μg/匹、2 回/週)、MY-1 (200 μg/匹、2 回/週) の各単独投与およびリツキシマブと P84 との併用に比べ、リツキシマブと MY-1 の併用群では腫瘍増殖の有意な抑制効果が認められた。

また、in vitro でのマクロファージによる Raji 細胞の食食実験からも、リツキシマブと MY-1 の併用では、MY-1、P84、コントロール抗体、リツキシマブの単独およびリツキシマブと P84 の併用に比べ有意なマクロファージによるがん細胞の食食促進効果を認めた。これらの結果より、CD47-SIRPα 結合の阻害能を有する MY-1 は抗体依存性細胞食食活性を有する抗体医薬の抗腫瘍効果を増強し得ることが示唆された。

最後に、幅広いがん腫に対して腫瘍免疫を担う T 細胞の細胞傷害活性を増強し、強力な抗腫瘍効果を惹起するとされている免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1 抗体と MY-1 との併用効果について、SIRPα 非発現がん細胞であるマウス大腸癌由来株化細胞 (CT26 細胞) を野生型 BALB/c マウスに皮下移植 (5×10^5 cells) し、腫瘍モデルマウスを用いた解析を行った。その結果、MY-1 の単独投与群 (100 μg/匹、週 2 回) では、腫瘍増殖の抑制効果はほぼ認められなかつたが、抗 PD-1 抗体との併用 (各 100 μg/匹、週 2 回) では、抗 PD-1 抗体単独 (100 μg/匹、週 2 回) 投与群に比べ有意な腫瘍増殖抑制効果の増強を認めた。すなわち、SIRPα 非発現がん細胞に対して抗 PD-1 抗体と MY-1 抗体の併用により抗 PD-1 抗体の腫瘍増殖抑制効果の増強が得られると考えられた。

(結論)

本研究により、CD47-SIRPα 結合を阻害する抗 SIRPα 抗体は、SIRPα 発現がん細胞に対して単独でマクロファージによるがん細胞の食食誘導と CD47-SIRPα 結合阻害に

よるその食食の増強の 2 重効果により強力な抗腫瘍効果を示し、一方で、SIRPα 非発現がん細胞に対してはリツキシマブなどの抗体依存性細胞食食活性の誘導能を有する抗体医薬や抗 PD-1 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤と併用することにより、その作用を増強し、強力な抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された。これらの結果より、抗 SIRPα 抗体は幅広いがん腫に対する新たな治療薬となり得ることが期待される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2640 号	氏名	柳田 匡彦
論文題目 Title of Dissertation	Anti-SIRP α antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy がん免疫治療における新たな治療薬としての 抗 SIRP α 抗体		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 副査 Vice-examiner 副査 Vice-examiner	南 康博 錦織千佳子 丹生健一	

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【研究目的】

膜型分子であるSIRP α は膜型分子のCD47と細胞間シグナル伝達システムCD47-SIRP α 系を構成する。本研究者の研究室では、がん細胞上のCD47と食食細胞上のSIRP α により構成されるCD47-SIRP α 系が食食細胞によるがん細胞の食食を抑制的に制御することを見出している。本研究では、CD47-SIRP α 結合を阻害する抗SIRP α 抗体が食食細胞によるがん細胞の食食排除を増強もしくは誘導し得るかについて解析し、抗SIRP α 抗体の有効性を検討した。

【研究方法及び結果、考察】

公共のデータベースを用いたヒトがん細胞におけるSIRP α 発現解析から、腎がんとメラノーマでSIRP α の高発現が示唆されたことから、腎がん手術検体でSIRP α mRNAの発現量を検討したところ、がん組織では正常組織と比較して発現量の増加を認めた。この解析結果と一致し、免疫組織染色では腎がん組織においてSIRP α の顕著な発現が確認された。同様に、メラノーマの免疫組織染色でも、がん組織ではSIRP α の強い染色像を認めた。また、複数のヒト腎がんおよびメラノーマ細胞株、マウス腎がん(RENCA細胞)又はメラノーマ細胞株(B16BL6細胞)でもSIRP α の高発現が確認された。

そこで、RENCA細胞の皮下移植モデル又はB16BL6細胞の実験的肺転移モデルを用い、抗SIRP α 抗体のSIRP α 発現がん細胞に対する抗腫瘍効果を検討した。RENCA細胞を皮下移植後、CD47-SIRP α 結合の阻害能を有する抗SIRP α 抗体であるMY-1投与群では腫瘍増殖の抑制と生存率の上昇を認めた。さらに、B16BL6細胞の実験的肺転移モデルでも、MY-1投与群では、肺転移結節数の減少を認めた。一方、MY-1の継続投与では、血液学的検査に重篤な副作用は認めなかった。

上記の抗腫瘍効果がマクロファージ(Mφ)依存的であるかを検討するため、Mφを枯渇させたRENCA細胞皮下移植モデルでのMY-1の抗腫瘍効果を検討した。枯渇群では、その効果の減弱を認め、Mφが重要であると考えられた。さらに、MφとRENCA細胞を抗体の存在下で共培養し、MφによるRENCA細胞の食食率を評価したところ、MY-1抗体存在下では食食促進を認めた。一方、SIRP α をノックダウンさせたRENCA細胞を用いた場合には、Mφによる食食は減少した。すなわち、抗SIRP α 抗体のSIRP α 発現がん細胞に対する抗腫瘍効果は、オプソニン化によるMφの食食誘導とCD47-SIRP α 結合阻害によるその食食促進の2重効果によると考えられた。

さらに、他の免疫細胞の関与を検討するため、抗体投与後の腫瘍モデルマウスの腫瘍内に存在する免疫細胞を解析したところ、NK細胞やCD8陽性T細胞の割合がMY-1投与群では増加を認めた。それぞれの細胞を枯渇させると、いずれの場合も、MY-1抗体による抗腫瘍効果が減弱したことから、MY-1の効果には、Mφに加え、NK細胞およびCD8 $^{+}$ T細胞も関与すると考えられた。

一方、本研究者の研究室では既存の抗体医薬の抗体依存性細胞食食活性に対してCD47-SIRP α 系が抑制的に作用することを見出していたことから、MY-1が抗体医薬の効果を増強し得るかについて検討を進めた。免疫不全マウスにヒトB細胞リンパ腫細胞株(Raji細胞)を皮下移植し、リツキシマブとMY-1の併用効果を評価したところ、それぞれの単独使用に比べ、併用群ではより強い抗腫瘍効果を認めた。また、Mφの食食実験でも、併用ではMφによる食食促進効果を認めた。これらより、MY-1は抗体依存性細胞食食活性を有する抗体医薬の効果を増強し得ることが示唆された。

近年、その抗腫瘍効果が注目されている免疫チェックポイント阻害剤である抗PD-1抗体とMY-1の併用効果について、SIRP α 非発現がん細胞であるマウス大腸癌細胞株(CT26細胞)を皮下移植し評価したところ、併用群では、単独群に比べ腫瘍増殖抑制効果の増強を認めた。すなわち、SIRP α 非発現がん細胞では抗PD-1抗体とMY-1の併用により腫瘍増殖抑制効果の増強が得られると考えられた。

【結論】

本研究により、CD47-SIRP α 結合の阻害能を有する抗SIRP α 抗体は、SIRP α 発現がん細胞に対して単独でMφの食食誘導と結合阻害によるその食食の増強の2重効果により強力な抗腫瘍効果を示し、一方で、SIRP α 非発現がん細胞に対しては抗体依存性細胞食食活性の誘導能を有する抗体医薬や免疫チェックポイント阻害剤と併用することで、抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された。本研究は、抗SIRP α 抗体を用いた新たながん免疫療法について重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。