Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Macrocyclic Peptide-Mediated Blockade of the CD47-SIRPα Interaction as a Potential Cancer Immunotherapy

Hazama, Daisuke

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2020-09-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第7864号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007864

※ 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

Macrocyclic Peptide-Mediated Blockade of the CD47-SIRPα Interaction as a Potential Cancer Immunotherapy

CD47-SIRPα 系を阻害する環状ペプチドを用いた新規がん免疫療法

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
内科学講座　呼吸器内科学分野
（指導教員：西村 善博 教授）

羽間　大祐

（目的）

膜型分子である SIRPα は、細胞外領域に 3 つの免疫グロブリン（Ig）様ドメインを持ち、同じく膜型分子の CD47 と両者の細胞外領域の N 末端にある IgV 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-SIRPα 系を構成する。これまでに我々は、がん細胞上の CD47 とマクロファージ上の SIRPα との相互作用が、リツキシマブやトラスツズマブといった腫瘍特異抗体によりオプソニン化されたがん細胞に対するマクロファージの貪食作用（抗体依存性細胞貪食（ADCP））を負に制御することを見出し、CD47 あるいは SIRPα に対する抗体を用いてこの相互作用を阻害することでマクロファージの ADCP を亢進させ、腫瘍特異抗体による抗腫瘍効果を増幅できることを明らかにしてきた。一方、抗 CD47 抗体を用いた第 I b 相試験では重度の貧血を含む副作用が報告されており、また抗体医薬には高い製造コストなどの問題がある。1~5kDa 程度の分子量を持つ中分子である環状ペプチドは、抗体医薬と同等の高い特異性と強い結合活性を持ちながら、比較的容易に化学合成が可能なため製造コストを抑制でき、低分子量であるため薬剤自体の免疫原性が低いなどの利点があるため、既存の低分子医薬や高分子医薬を代替し得るモダリティとして注目されている。そこで本研究では、マウス SIRPα の IgV 領域に結合し、CD47-SIRPα 結合を阻害する環状ペプチドの探索に Random nonstandard Peptides Integrated Discovery（RaPID）システムを用い、取得したペプチドがマクロファージによるがん細胞の貪食排除を増強し得るかについて解析し、がん免疫療法における新たな治療薬としての有効性について検討した。

（方法、結果及び考察）

本研究で用いた RaPID システムとは、人工合成された 1 兆種類以上ものペプチドライブラリーの中から、標的となる分子に高い親和性と特異性をもつペプチドを迅速

かつ安価に同定できる実験系である。まず標的となる野生型C57BL/6マウスのSIRPαのIgV領域（IgV-B6 SIRPα）のFc融合タンパク質（IgV-B6 SIRPα-Fc）を作製し、IgV-B6 SIRPα-Fcに結合し、Fcには結合しない環状ペプチドを同定した。得られた12種類のペプチドのIgV-B6 SIRPα-Fcに対する親和性を表面プラズモン共鳴にて評価したところ、L4-4と名付けた環状ペプチドが最も高い親和性を持ち（K_D = 5.97 nM）、その他にD4-1、D4-2、D4-4と名付けたペプチドもK_D = 10 nM程度の高い親和性を示した。

*Sirpa*遺伝子は、IgV領域をコードする領域においてマウス系統間で遺伝子多型がある。そのため、non-obese diabetic（NOD）マウスのSIRPαのIgV領域（IgV-NOD SIRPα）に対する親和性も測定した。その結果、D4-2がK_D = 8.22 nMと最も高い親和性を持ち、一方L4-4やD4-1はK_D = 148 nM、42.8 nMと親和性が低かった。これらの結果から、以下の実験にはD4-2を用いることとした。

D4-2が、生細胞に発現するSIRPαのIgV領域に結合するかを評価するため、B6 SIRPα、NOD SIRPα、あるいはIgV領域を欠失させたNOD SIRPα（ΔIgV-NOD SIRPα）をそれぞれCOS7細胞に発現させ、免疫染色を行った。B6あるいはNOD SIRPαを発現させたCOS7細胞では、マウスSIRPα抗体（P84）と同様の局在でAlexa Fluor 488色素で標識したD4-2（Alexa488-D4-2）による蛍光が確認されたが、ΔIgV-NOD SIRPαを発現させた細胞では、Alexa488-D4-2による蛍光を認めなかった。この結果から、D4-2は生細胞に発現するマウスSIRPαのIgV領域に結合することが明らかとなった。また、表面プラズモン共鳴や免疫染色にて、D4-2はヒトSIRPαやマウスSIRPβといったマウスSIRPαと高い相同性を持つ他のタンパク質にはほとんど結合を示さず、マウスSIRPαのIgV領域に対する高い特異性を持つことも示唆された。既存のCD47-SIRPα結合を阻害する抗体の大半がSIRPαのファミリー分子であるSIRPβやSIRPγに対する交叉反応性を持つことを考慮すると、D4-2の特異性の高さは特筆すべきものであり、標的以外のタンパク質に結合することで起こる影響を最小限にすることができると考えられる。

次に、D4-2がCD47とSIRPαの結合に及ぼす影響を検討した。B6あるいはNODのSIRPαを発現させたHEK293A細胞へのマウスCD47の細胞外領域のFc融合タンパク質（mCD47-Fc）の結合の程度を評価したところ、D4-2は濃度依存的に両者の結合を阻害することが明らかとなった。NOD SIRPαはヒトCD47とも強く結合することが知られており、ヒトCD47の細胞外領域のFc融合タンパク質を用いて同様の実験を行ったところ、やはりD4-2はその結合を濃度依存的に阻害した。また、その阻害機構をより詳細に知るため、mCD47-Fc濃度を変化させて同様の阻害実験を行ったところ、mCD47-Fc濃度を高くしても阻害が解消されないことから、D4-2によるCD47-SIRPα結合阻害作用は非拮抗阻害である可能性が示唆された。

この阻害作用における分子構造学的機序を明らかにするために、IgV-NOD SIRPαとD4-2の複合体のX線結晶構造解析を行い、1.36Åという高い分解能でその構造を明らかにした。その結果、IgV-NOD SIRPαはA、A'、B、B、C、C'、E、F、G、Gの10個のβストランドとそれらつなぐ9個のループ構造で構成されており、D4-2はC'、EのβストランドおよびC'E、EFループに主に結合していることが明らかとなった。IgV-NOD SIRPαと高い相同性を持つ129マウスのSIRPαのIgV領域の構造が既に明らかとなっており、今回得られた複合体の構造と比較したところ、マウスCD47との結合に重要なF56とA65のアミノ酸が含まれるC'Eループに大きな差異を認めた。以上の結果から、D4-2が結合することで起こるIgV-NOD SIRPαのC'Eループにおける構造変化が、CD47との結合阻害に寄与していると考えられた。既に明らかになっているヒトSIRPαとヒトCD47の複合体のX線結晶構造から類推すると、D4-2の結合部位は両者の相互作用部位とは異なっており、前述の生化学実験と合わせて考えると、D4-2はCD47-SIRPα結合のアロステリック阻害剤であると考えられた。

我々は先行研究にて、抗 SIRPα 抗体を用いて CD47-SIRPα 結合を阻害することでがん細胞に対するマクロファージの ADCP が増強されることを明らかにした。そこで、D4-2 においても同様の ADCP 増強作用が見られるかを検討した。骨髄細胞由来マクロファージと CFSE（carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester）蛍光ラベルを行ったがん細胞を腫瘍特異抗体及び D4-2 の存在/非存在下に共培養し、マクロファージによるがん細胞の貪食率を評価したところ、D4-2 のみではがん細胞に対するマクロファージの貪食作用は亢進しなかったが、腫瘍特異抗体と併用するとその ADCP を有意に増強した。この貪食増強効果はヒト B 細胞リンパ腫由来株化細胞（Raji 細胞）、ヒト乳癌由来株化細胞（BT474 細胞）、ヒト胃癌由来株化細胞（NCI-N87 細胞）、マウスメラノーマ由来株化細胞（B16BL6 細胞）で確認された。

生体内での効果を確認するために、NOD/severe combined immunodeficient (SCID) マウスへの Raji 細胞の皮下移植モデル、及び野生型 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、腫瘍特異抗体による抗腫瘍効果を D4-2 が増強するかについて検討した。Raji 細胞を皮下移植（3×10^6 cells）後、腫瘍体積が約 280 mm^3 に到達した時点より投薬を開始したところ、リツキシマブ腹腔内投与（150 μg/匹、2 回/週）と D4-2 経静脈投与（500 μg/匹、2 回/週）の併用はそれぞれの単独投与に比べて有意な腫瘍増殖の抑制を示した。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、TA-99 腹腔内投与（2 μg/匹、隔日）と D4-2 経静脈投与（500 μg/匹、連日）の併用はそれぞれの単独投与に比べて肺に形成された腫瘍結節数の有意な減少を認め、強い抗腫瘍効果を有することが明らかとなった。また、野生型 C57BL/6 マウスに 6 日間の D4-2 連日経静脈投与を行ったが、血液学的及び血液生化学的検査において投与による重篤な副作用は認めなかった。

（結論）

本研究により、CD47-SIRPα 結合を阻害する環状ペプチドは、リツキシマブなどの ADCP 活性の誘導能を有する抗体医薬と併用することでその作用を増強し、強力な抗腫瘍効果を示す可能性が示唆され、がん免疫療法における新たな治療薬となることが期待される。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2996 号	氏　名	羽間 大祐
論文題目 Title of Dissertation	Macrocyclic Peptide-Mediated Blockade of the CD47-SIRPα Interaction as a Potential Cancer Immunotherapy CD47-SIRPα系を阻害する環状ペプチドを用いた新規がん免疫療法		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	南 康博 横崎 宏 南 博信	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

（目的）

膜型分子であるSIRPαは、同じく膜型分子のCD47と両者の細胞外領域のN末端にあるIgV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-SIRPα系を構成する。これまでに我々は、がん細胞上のCD47とマクロファージ（Mφ）上のSIRPαとの相互作用が、抗体によりオプソニン化されたがん細胞に対するMφの貪食作用（抗体依存性細胞貪食（ADCP））を抑制することを見出し、抗体を用いてこの結合を阻害することでMφのADCPを亢進させ、腫瘍特異抗体による抗腫瘍効果を増幅できることを明らかにしてきた。一方、抗体医薬には高い製造コストなどの問題がある。環状ペプチドは、抗体医薬と同等の高い特異性と強い結合活性を持ちながら、比較的容易に化学合成が可能なため製造コストを抑制でき、低分子量であるため薬剤自体の抗原性が低いなどの利点があり、近年抗体医薬を代替し得るモダリティとして注目されている。そこで本研究では、マウスSIRPαのIgV領域に結合し、CD47-SIRPα結合を阻害する環状ペプチドの探索にRandom nonstandard Peptides Integrated Discovery（RaPID）システムを用い、取得したペプチドのがん免疫療法における新たな治療薬としての有効性について検討した。

（方法、結果及び考察）

本研究で用いたRaPIDシステムとは、人工合成された1兆種類以上ものペプチドライブラリーの中から、標的となる分子に高い親和性と特異性をもつペプチドを迅速かつ安価に同定できる実験系である。このシステムを用い、得られたペプチドのSIRPαに対する親和性を表面プラズモン共鳴にて評価したところ、D4-2と名付けた環状ペプチドでK_D = 8.22 nMと高い親和性を認めた。

そこで、野生型マウスSIRPα、あるいはIgV領域を欠失させたSIRPαを発現させた細胞を用い免疫染色を行ったところ、野生型マウスSIRPα発現細胞では、マウスSIRPα抗体と同様の局在でAlexa488色素で標識したD4-2による蛍光が確認されたが、IgV領域を欠

失させたSIRPαを発現させた細胞では、ペプチドによる蛍光を認めなかった。この結果から、D4-2はマウスSIRPαのIgV領域に結合することが確認された。

次に、マウスSIRPα発現細胞に対するCD47の結合の程度を評価したところ、D4-2は濃度依存的に両者の結合を阻害することが明らかとなった。この阻害作用における分子構造学的機序を明らかにするために、マウスSIRPαのIgV領域とD4-2の複合体のX線結晶構造解析を行った。その結果、D4-2の結合部位はCD47とSIRPαの相互作用部位とは異なっていると考えられ、D4-2はCD47-SIRPα結合のアロステリック阻害剤であることが示唆された。

さらに、ヒトB細胞リンパ腫由来株化細胞（Raji細胞）及びマウスメラノーマ由来株化細胞（B16BL6細胞）を用い、D4-2のADCP増強作用について検討したところ、D4-2のみではがん細胞に対するMφの貪食作用は亢進しなかったが、腫瘍特異抗体と併用するとそのADCPを有意に増強することが明らかとなった。

最後に、Raji細胞の皮下移植モデル、及びB16BL6細胞によるメラノーマ実験的肺転移モデルを作製し、腫瘍特異抗体による抗腫瘍効果をD4-2が増強するかについて検討した。いずれのモデルでも腫瘍特異抗体とD4-2の併用はそれぞれの単独投与に比べて強い抗腫瘍効果を有することが示された。

本研究は、マウスSIRPαのIgV領域に特異的に結合する環状ペプチドD4-2をRaPIDシステムを用いて取得し、腫瘍特異的抗体による抗腫瘍効果をD4-2が顕著に増強することを明らかにしたもので、価値ある業績であると認める。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。