

「新機能抗体創製技術開発」

事業原簿(公開版)

担当部	新エネルギー・産業技術総合開発機構 バイオテクノロジー・医療技術部
-----	--------------------------------------

— 目次 —

概要	概要1
用語集	用語集1
I. 事業の位置付け・必要性について	I-1
1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性	I-1
1.1 NEDOが関与することの意義	I-1
1.2 実施の効果(費用対効果)	I-1
2. 事業の背景・目的・位置付け	I-2
2.1 事業の背景と目的	I-2
2.2 政策の位置づけ	I-3
II. 研究開発マネジメントについて	II-1
1. 事業の目標	II-1
2. 事業の計画内容	II-1
2.1 研究開発の内容	II-1
2.2 研究開発の実施体制	II-2
2.3 研究の運営管理	II-9
3. 情勢変化への対応	II-13
4. 知的財産の管理体制	II-14
5. 中間評価結果への対応	II-14
6. 評価に関する事項	II-16
III. 研究開発成果について	III-1
1. 事業全体の成果	III-1
2. 研究開発項目毎の成果	III-5
IV. 実用化の見通しについて	IV-1
1. 実用化の見通し	IV-1
2. 実用化までのシナリオ	IV-4
<別添資料>	
・健康安心イノベーションプロジェクト基本計画	プログラム基本計画-1
・プロジェクト基本計画	プロジェクト基本計画-1
・技術戦略マップ(分野別技術ロードマップ)	技術戦略マップ-1
・事前評価関連資料(事前評価書、パブリックコメント募集の結果)	事前評価関連資料-1
・特許論文リスト	特許論文リスト-1

概要

作成日 平成23年 5月30日

制度・施策(プログラム)名	健康安心イノベーションプログラム							
事業(プロジェクト)名	新機能抗体創製技術開発	プロジェクト番号	P06009					
担当推進部/担当者	バイオテクノロジー・医療技術部 担当者 田伏 洋(平成23年4月現在) バイオテクノロジー・医療技術部 担当者 佐野 亨(平成19年4月～23年3月) バイオテクノロジー・医療技術開発部 担当者平井良彦(平成18年4月～19年3月)							
0. 事業の概要	本事業は、系統的な高特異性抗体創製技術及び高効率な抗体分離精製技術であり、具体的には、前者は(1)膜タンパク質及びその複合体等の機能を有した抗原の系統的な産生技術開発(2)高特異性・高親和性・高機能性を有する抗体の効率的な創製技術開発(3)抗体を系統的に創製するための基盤技術及び創製された抗体の評価、後者は(1)タンパク質分子リガンド技術開発(2)高効率クロマト担体技術開発(3)溶出工程技術開発を行う。							
I. 事業の位置付け・必要性について	近年、抗体はポストゲノム研究に重要であるとともに、創薬や診断等への応用が期待されることから、幅広い産業利用が期待されるため、極めて重要なものとなっており、世界的にも研究競争が激化している。しかし、産業上有用と考えられるタンパク質やその複合体を特異的に認識する抗体を創製する際、抗原の産生が困難なことや、抗体の創製が免疫寛容等により困難であることが技術課題となっている。このため、こうした課題に対応し、創薬上重要なタンパク質やその複合体等の機能を有した抗原を系統的に産生する技術や、様々な膜タンパク質等を抗原として特異性が高く、機能性の高い抗体を創製する技術の革新が必要である。また、抗体の産業利用を促進するには、その高い製造コストが大きな課題となっていることから、抗体創製の基盤技術の開発に加えて、ダウンストリームにあたる抗体製造プロセスにおける技術革新も同時に必要となる。具体的には、抗体の製造コストの低減を図るべく、抗体の分離・精製技術について高純度精製化、高機能化、低コスト化の技術革新が必要である。これらの技術革新により抗体を活用した研究や創薬、診断を加速し、ポストゲノム研究の産業化を促進することが重要である。 そこで、本研究開発は、創薬等のポストゲノム研究の産業化において重要と考えられるタンパク質やその複合体等について、タンパク質を抗原として特異性の高い抗体を系統的に創製するための抗原産生技術、抗原提示増強や免疫寛容回避等の基盤技術の開発及び抗体の分離・精製を効率化するための技術を開発することを目的とする。 これら一連の技術を開発し、統合的に利用することは広く国民の利益に資する基盤的研究であり、国(NEDO)の積極的な関与が必要なものと考えられることから、今後、世界に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題であり、個の医療を通じて健康寿命の延伸、QOL(Quality of Life: 生活の質)の向上を図る目的で行われる「健康安心イノベーションプログラム」の一環として本プロジェクトを実施する。							
II. 研究開発マネジメントについて								
事業の目標	産業利用上重要なタンパク質やその複合体等を特異的に認識できる抗体を系統的に創製するための技術を開発し、産業上有用なタンパク質を生体内における機能を有した状態で500程度産生する。さらに、これを抗原として産業上有用な機能を有する抗体を50程度取得することで、技術の有用性を評価する。また、抗体の製造コスト低減に向けた抗体の分離・精製等を高効率に行う技術を開発し、既存の Protein A クロマト担体の適用が困難な抗体(回収率 50%以下)の抗体回収率を70%以上に向上する技術を開発する。							
事業の計画内容	主な実施事項		H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy	
	系統的な高特異性抗体創製技術	①膜タンパク質及びその複合体等の機能を有した抗原の系統的な産生技術						→
		②高特異性・高親和性・高機能性を有する抗体の効率的な創製技術						→
		③抗体を系統的に創製するための基盤技術及び創製された抗体の評価						→
		④ICOS法を用いた癌治療用ヒト抗体単離技術開発						→
		⑤オリゴクローナル抗体創製技術開発						→
	①タンパク質分子リガンド技術開発						→	

	体分離精製	②高効率クロマト担体技術開発								
		③溶出工程技術開発								
開発予算 (会計・勘定別に事業費の実績額を記載)(単位:百万円) 契約種類: ○をつける (委託(○) 助成() 共同研究 (負担率 ()	会計・勘定	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy	総額			
	一般会計	1235	1128	948	854	408	4573			
	特別会計									
	総予算額	1235	1128	948	854	408	4573			
	(委託)									
	(助成) :助成率									
	(共同研究) :負担率									
開発体制	経産省担当原課	経済産業省産業技術環境局研究開発課 経済産業省製造産業局生物化学産業課								
	プロジェクトリーダー	18年度より21年度までは国立大学法人東京大学先端科学技術研究センター 児玉龍彦教授 22年度は独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター第六事業所 生物機能工学研究部門 巖倉 正寛 部門長 サブプロジェクトリーダー 藤田保健衛生大学 黒澤 良和 学長								
	委託先(*委託先が管理法人の場合は参加企業数も記載)	<ul style="list-style-type: none"> ・独立行政法人産業技術総合研究所 ・学校法人藤田学園(藤田保健衛生大学) ・協和発酵キリン株式会社 ・財団法人バイオインダストリー協会 (参加機関:15社):(株)特殊免疫研究所、(株)ペルセウスプロテオミクス、(株)カイオム・バイオサイエンス、(株)島津製作所、(株)京都モノテック、あすか製薬(株)、興和(株)、中外製薬(株)、富士フィルム(株)、横河電機(株)、帝人ファーマ(株)、JSR(株)、AGCエスアイテック(株)、東洋紡績(株)、東洋紡バイオロジックス(株) (共同実施先):(財)癌研究会、東京大学先端科学技術研究センター、東京大学大学院新領域創成科学研究科分子医科学、東京大学大学院新領域創成科学研究科生命分子解析学、東京大学医科学研究所プロテオミクス研究部、京都大学再生医科学研究所、東京理科大学薬学部、東京理科大学基礎工学部、岡山大学工学部、広島大学大学院生物圏科学、広島大学大学院医歯薬学総合、国立循環器病センター、東北大学大学院工学研究科、大阪大学大学院工学研究科、徳島大学ソシオテクノサイエンス研究部、山口大学工学部								

<p>情勢変化への対応</p>	<p>ターゲットの枯渇等立案時に予想されなかった状況への対応を検討している。本プロジェクトで作製した抗体を厚生労働省のプロジェクトで診断、治療へ向けた研究材料とした研究を開始。独立行政法人への移行に伴い新設された、著しい成果を挙げているプロジェクトに対してプロジェクト予算とは別に追加的な資金を投入する「加速財源制度」を用いて、東京大学先端科学技術研究センターに対し追加資金の配分を行った。また平成20年度予算では、抗原の修飾を解析するために必須である高精度質量分析計を集中研に導入し、プロジェクトメンバーが使用できるようにした。平成18年度から19年度の2年間の契約であったが、20年度まで契約を延長し、さらに、22年度まで延長した。</p>	
<p>中間評価結果への対応</p>	<p>(1) 中間評価での主な指摘事項 ①総合評価 本事業は、我が国の抗体医薬の国際競争力をリードしようとするものであり、医薬品産業、生命科学産業の発展に貢献する重要なテーマである。プロジェクトリーダーの卓越した指導力のもと、適切なマネジメントが行われ、ほぼ目標を達成する成果が得られている。抗体創製技術開発においては、省庁間連携による in vivo イメージング開発など新たな展開もある。一部の抗体では参加企業による抗体治療の治験が始まるなど、すでに実用化に近いものもある。抗体分離精製技術開発においては、中間目標を超える成果が得られており、要素技術の融合で実用化が見通される段階に達している。 一方で、(指摘事項1) 本事業では様々な技術開発を同時進行的に行っているが、多くの抗体創製基盤技術の相互関係や抗体分離精製技術との関連などに不明確なところがあり、標的をしぼるとともにより効果的な連携を検討する必要がある。(指摘事項2) また、国内外の抗体医薬の開発と関連の知的財産など周辺状況も踏まえてプロジェクトを推進し、知財に配慮しつつ成果をより積極的に公開することが望まれる。 (2) 指摘事項への対応 ①指摘事項1への対応 a) プレターゲティング技術を最先端研究へスピンアウトするとともに開発項目の絞り込みを行い、効率的な基盤技術の開発を推進。 ・抗体を認識分子として用いるプレターゲティング技術については、プロジェクトの設定課題と異なる技術開発が重要であることから、最先端研究開発支援プログラム (FIRST プログラム) へ技術開発をスピンアウト。 ・バキュロウィルスを用いた抗体創製技術については、創製した抗体の製薬企業等への導出実績を生み出したことから、基盤技術としての開発はほぼ完了、4年度目をもって開発を終了。まだ製薬企業への導出実績のないファージやニワトリ系の抗体創製技術の開発に焦点を絞り、相互連携体制を強化し、基盤技術の開発を推進した。具体的には、癌研のゲノミクス的手法により見出された癌組織特異的に発現する細胞膜タンパクに対する抗体作製を ADLib® axCELL システムにより行い、ELISA レベルで反応性を示したクローンを200個以上得ることに成功した。現在その他の手法により、ターゲットへの反応性の検証を続けている。 b) 抗体創製技術開発と分離精製技術開発を連携し、効率的な基盤技術の開発を推進。 ・22種類のニワトリ及びファージを用いて創製したヒト型化モノクローナル抗体を精製技術検証用パイプラインとして用いそれを発現する CHO 細胞培養液から精製を行い、開発した精製技術の検証を行い、技術の有用性を確認した。 ②指摘事項2への対応 a) 生産実証を行なった抗体のプロジェクト参加企業以外での試用制度の創出・運用。 ・生産実証の結果として得られたニワトリ及びファージを用いて創製した抗体について、その有用性の検討を製薬企業等が無償で試用する仕組みを構築し、抗体の提供を行なった。有用性の早期見極めに繋げるとともに、開発経験の浅いタイプの抗体創製技術の実用化促進への寄与を期待。 b) プロジェクトで構築した抗体産生細胞を公的機関へ寄託し、研究資源へのアクセシビリティの確保と成果の積極的な公開を行なった。</p>	
<p>評価に関する事項</p>	<p>事前評価</p>	<p>平成17年度実施 担当部 バイオテクノロジー・医療技術開発部</p>
<p></p>	<p>中間評価</p>	<p>平成20年度 中間評価実施</p>
<p></p>	<p>事後評価</p>	<p>平成23年度 事後評価実施</p>

Ⅲ. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

1.1 系統的な高特異性抗体創製技術

①膜タンパク質及びその複合体等の機能を有した抗原の系統的な産生技術

GPCR を含む癌表面マーカータンパク質およびその関連タンパク質に対する抗体作製のため、抗原発現バキュロウイルス、定常発現細胞等を作製した。疾病のマーカー候補として癌、心血管疾患、精神神経疾患、骨運動器疾患、糖尿病等、計 165 種類 244 抗原を作製した。うち取得抗体数は 130 項目 558 クローンである。うち治療用抗体候補 6 種類、診断用抗体候補 6 種類を取得した。

G タンパク質共役型受容体(GPCR)に対するモノクローナル抗体(mAb)を効率的に作製するための大腸菌由来 Gro-EL を分子アジュバントとした改良 DNA 免疫法を確立し、機能性抗体を含む 10 種類の抗 GPCR mAb を作製した。

②高特異性・高親和性・高機能性を有する抗体の効率的な創製技術

末梢性免疫寛容の打破を目的として制御性 T 細胞(Treg)を除去した細胞を移入したマウスを免疫動物として、2 種類の自己抗原に対する抗体作製に成功した。B 細胞活性化促進作用を持つ蛋白質と目的抗原膜蛋白質を共発現するバキュロウイルスを免疫源として、2 種類の膜蛋白質に対する抗体作製に成功した。*in vivo*で Treg を特異的に除去できるモノクローナル抗体を樹立し、認識抗原を同定した。

抗 CD20 抗体の Fab 下流に Fc を 2 個ないし 3 個タンデムに連結した改変抗体を作製した。このタンデム Fc 型改変抗体は、天然型抗体よりも Fc 受容体に強い親和性をもち、CD20 発現細胞に対して天然型抗体より約 100 倍強い ADCC 活性を発揮した。*in vivo*でも制がん活性は評価を開始したばかりであるが、低い投与量で治療効果を示した。

TNF α に対する受容体 TNFRII に Fc をタンデムに連結した受容体-Fc 融合タンパク質(TNFRII-Fc-Fc)を作製し、TNFRII-Fc(Enbrel)と比較した。TNFRII-Fc-Fc は、TNFRII-Fc に比べて、Fc 受容体に対して強い親和性を示し、細胞膜上に TNF α を発現した細胞に強い ADCC 活性を発揮した。さらに、大腸炎モデルマウスにおいて、TNFRII-Fc-Fc は TNFRII-Fc の数十倍強い治療効果を示した。

再構築型無細胞蛋白質合成系 PURE system による高効率リボソームディスプレイ(PURE RD)を確立した。このシステムにより、scFv、Fab、スキヤフォールドの選抜系を開発した。また、抗原の調製法として、脂質を共存させた PURE system による膜蛋白質合成システムを構築した。

界面活性剤にはアミノ酸系界面活性剤である C12-Glu、希釈時における凝集抑制剤として Arg-HCl を添加すること、希釈方法を多段階とすることにより、顕著な巻き戻し効率を得た。これらは、アミノ酸自身が持つ蛋白質水和構造の安定化作用と、界面活性剤が持つ吸着能、蛋白質の折り畳みにより自発的に脱離する活性剤の選択が鍵となった。本手法により、scFv はもとより、Fab、scFv-SA、scFv-SAc core、scFv-Fc の巻き戻しが可能となった。

抗原 A 発現バキュロウイルスを用いた ADLib システムによって抗原 A に対して特異的に反応する抗体の作製に成功した。最終年度は癌研究会との共同研究を進め、癌研究所で見出された癌特異的発現抗原 RCAA-01 に対する抗体作製を ADLib システムによって実施し、特異的に反応する抗体が得られ、現在、癌研究所において免疫組織染色による抗体の反応性を検証中である。

変異機能の ON/OFF 制御可能なニワトリ B 細胞株 DT40-SW を用いて、効率的な抗体作製システムを開発することに成功した。このシステムは抗体の取得のみならず、任意の抗体の遺伝子を導入して機能改変するのにも応用可能である。

ニワトリモノクローナル抗体作製技術の高度化と複数の有用抗原に対する抗体作製、ニワトリ抗体のキメラ抗体化、ヒト抗体化などの実験を行い、優れた抗体の作製・改変に成功した。

③抗体を系統的に創製するための基盤技術及び創製された抗体の評価

新たな標的分子探索のため、従来蓄積してきた長鎖オリゴアレイによる遺伝子発現プロファイルデータからの抗体候補遺伝子抽出システムの構築を行い、12 種のがんの解析から 85 個、がん幹細胞から 15 個、合計 100 個の新規抗体候補分子を同定した。乳がんと膵がんにおいて 9 個のエクススキップと 6 個のがん特異的融合遺伝子を同定した。抗体作製のマウスは 6 種を作製した。さらに合計 39 株の膵がんまたは乳がんのジェノグラフトを樹立し、新規抗体の体系的評価システムを構築した。

1.2 高効率な抗体分離精製技術

下記の成果を統合化することにより、抗体の製造コスト低減に大きく寄与でき、且つ、既存の Protein A クロマト担体の適用が困難な抗体(回収率 50%以下)の抗体回収率を 70%以上に向上する技術を開発した。

抗体結合性を有する新規タンパク質の設計・創製技術の開発、多品種の抗体分子に対

応可能で、結合・解離特性の優れたタンパク質分子リガンドを迅速・安価に提供するための設計技術、合成技術、評価技術の観点から行き、低コストで且つ効率の良い配向制御固定化を可能にするアフィニティリガンドの基本配列様式を開発し、これをプラットフォームとし、各種抗体に対応できる骨格配列を収集することにより、一次ライブラリーを作製した。一次ライブラリーの中から高親和性を示した 3 種類の骨格配列について、網羅的アミノ酸置換を行い、2 次ライブラリーを作製した。

多数のリガンド IgG 結合特性を同時に評価できる固定化リガンドのハイスループット分析装置と、多数の溶媒に対する特定のリガンドからの IgG 溶出パターンを順次測定できる装置を開発した。凝集検出技術に関し、抗体試料の FTIR スペクトルを、新規方法を使用して統計学的に分析した。

商業スケールでモノクローナル抗体を高効率に精製するため、化学的安定性を有するシリカ担体を開発し、cGMP 準拠の製法を確立した。リガンド評価装置用として、ガラス板上薄層モノリスシリカゲル、およびマイクロサイズモノリスカラムを開発し、品質の安定した製造技術を確立した。

IgG 様抗体を生産する 3 種類の CHO 細胞ラインを構築し、無血清培地で培養した。また、動力学的パラメータと抗体多様性を、構築したレクチン結合アッセイを使用して小規模フェドバッチ培養で評価した。

24 種類の人もしくは人型化モノクローナル抗体を精製技術検証用パイプラインとして用いそれを発現する CHO 細胞培養液から精製を行い、開発した精製技術の検証を行い、技術の有用性を確認した。

1. 3 ICOS 法を用いた癌治療用ヒト抗体単離技術開発

本研究開発は、創薬等のポストゲノム研究の産業化において重要と考えられるタンパク質やその複合体等を抗原として、高特異性・高親和性・高機能性を有する抗体を系統的・効率的に創製するための基盤技術を開発することを目的としている。我々は、ファージディスプレイ技術を用いて巨大なヒト抗体ライブラリーを作製し、そのスクリーニング法を開発してきた。我々の作製した AIMS ライブラリーは、臍帯血、扁桃、骨髓細胞、末梢血由来の B 細胞を用いて、さらにライブラリー作製に際しては H 鎖ライブラリーの大きさが独立したクローン数にして 10^8 以上、L 鎖のライブラリーサイズが 10^6 、それを組み合わせて 10^{11} の巨大抗体ライブラリーからなる。これより巨大な抗体ライブラリー作製は、その多様性を保ったまま操作できないという点で、現実的方針とはなり得ない。そこで多様性という点ではほぼ理想的なナイーブヒト抗体ライブラリーである。有用な抗体を単離する目的を達成するために、いかにして抗体ライブラリーを作製するかと並んで重要な点は、どのように目的とする抗原に特異的に結合するクローンを単離するかであり、ライブラリーのスクリーニング法である。本プロジェクトで対象としている癌特異抗原は細胞膜タンパク質なので、様々な抗体を含むファージ抗体ライブラリーと生きた癌細胞株を混合してしばらく放置すれば、細胞膜上で抗原抗体複合体ができるはずである。そこでそれを遠心して細胞を集めれば、細胞膜上のタンパク質に結合する様々な抗体が網羅的に回収できると期待される。我々を含めて、この操作により抗体単離を多くのグループが行った。結果は極めて不満足なものであった。得られる抗体は、特定のクローンに偏っており、さらにその抗体の抗原結合力は一般的に低かった。我々が本プロジェクトに採用された時、すでに ICOS (isolation of antigen/antibody complexes through organic solvent) 法の開発に成功していた。ICOS 法の開発は、生きた細胞の膜上に存在する様々な膜タンパク質分子に対して、それぞれ特異的に結合する抗体を多数かつ網羅的に単離することを可能にした。その結果、従来抗体単離に用いられる研究戦略とは逆の研究方針が可能となった。たとえば癌治療用抗体を開発する目的で研究を開始するグループは、まず標的分子を選択する。その次にモノクローン抗体単離を実施する。我々は、最初に癌細胞膜上に存在する様々なタンパク質に対する抗体を多数単離する。その次に手術で摘出した癌組織を用いて個々の抗体について免疫組織染色 (IHC) を行い、癌特異的染色像を与えるクローンを選別する、そのうち癌特異的染色像を与えた抗体が認識する抗原を決定する。本プロジェクトはこの研究戦略に基づき、体系的かつ大規模に実施された。

我々の作製した AIMS ライブラリーを用いて癌細胞と混合し ICOS 法でスクリーニングすると、一種類の癌特異抗原に対して 10 種類以上の様々な部位に特異的に結合するモノクローン抗体を単離できる。本研究で対象とした癌特異抗原は、癌細胞膜上に癌特異的に大量に発現している分子を同定すること、それと同時に抗体を単離することを目的としたので、ICOS 法は大きな威力を発揮した。

1.4 オリゴクローナル抗体創製技術開発

抗原 A モノクローナル抗体のパネルを作製し、抗体を混合した場合、どのような活性が増強されるか調べた。抗原 A については、特に CDC 活性が顕著に増強された。ヒト・マウスキメラ抗原を用いた解析から、抗体が結合するエピトープが重要であることが示唆さ

れた。一方で、最も CDC 活性を増強する抗体の組み合わせは、たとえば、ADCC 活性や細胞増殖抑制活性においても最強であるわけではなく、発揮したい活性によって組み合わせを検討する必要があることが分かった。さらに、抗原 A に対する抗体は 1/3 がアゴニスト抗体を示すことがわかったが、たとえば癌の治療を考慮し、オリゴクローナル抗体技術を用いた場合、いかにこのような活性を持たない抗体の組み合わせにより最大の薬効を発揮するかが重要となる。抗原 A の場合、アゴニスト活性の発揮による副作用を考慮した場合、3 種類のモノクローナル抗体を組み合わせることによって、抗腫瘍活性の効率的誘導と増殖促進抑制能を併せ持つ、オリゴクローナル抗体の作製が可能になると考えられた。

CDC 活性増強の作用機構を調べるため、結晶構造解析を行った。CDC 活性増強する Fab 単独、もしくは Fab と抗原複合体の結晶化条件を検討した。Fab については、結晶化に成功した。一方で、Fab と抗原の複合体の結晶化については、結晶は得られたものの解像度が低く、必要な情報を得ることができなかった。キメラ抗原への結合性から、エピトープは分かっているため、Fab の結合領域の構造から、蛋白質結合モデリングにより、抗原への結合様式を推定したところ、CDC の状況には、Fab の向き、距離、抗原の構造が関与することが示唆された。

抗原 A 以外に活性増強が観察されるか調べるため、抗原 A を含め計 10 種の抗原を免疫した。モノクローナル抗体を複数個取得できたもののうち、抗原 B, E, F については抗原 A と同様に CDC 活性の増強が観察されたが、抗原 A と同様に多数のマウスを免疫し、抗体のパネルを作製した。抗原 C については CDC 活性の増強は観察されなかった。抗原 A, B, E, F と抗原 C との違いから、CDC 活性増強には、抗原が持つドメイン構造が重要であることが示唆された。

本研究により、抗体を混合することにより活性が著しく増強する場合があることがわかり、その活性は、エピトープや抗原の構造的長に依存する可能性が示唆され、医薬品としてオリゴクローナル抗体を開発する上で重要な知見を得ることが出来た。

2. 研究開発項目毎の成果

2. 1. 系統的な高特異性抗体創製技術

① 膜タンパク質及びその複合体等の機能を有した抗原の系統的な産生技術

①-1 抗体創製のためのバキュロウイルスを用いた膜タンパク質及びその複合体の発現技術開発

がん表面マーカー候補を含む 8 種類の GPCR についてリコンビナント BV (buddedvirus; 発芽型バキュロウイルス) を作製し発現を確認した。心血管疾患および骨代謝等に関与する GPCR の stable 発現系細胞 4 種類を樹立した。また GPCR 4 種類について KO マウスを入手し、gp64 トランスジェニックマウスと交配し、免疫のための KO/gp64Tg マウスを作製した。細胞接着および修飾に関与する膜タンパク質の発現ウイルス 10 種類を作製した。

様々な疾病のマーカー候補として、癌関連 (54 種類)、心血管系疾患 (45 種類)、糖尿病 (29 種類)、精神神経疾患 (17 種類)、骨運動器疾患 (10 種類) その他核内タンパク質あるいはシグナル伝達複合体あわせて 165 種類 244 抗原で BV および gp64 フュージョン BV を作製した。

ウイルスの作製を Bac-to-bac 法に変えたことで BV 調製に要する過程を平均 3 ヶ月から 1 ヶ月半に短縮できた。また、この方法では、トランスフォーメーション後 10 日前後で発現チェックができることから、発現のよくない抗原について、迅速に対応できるようになった。また、抗原タンパク質の発現が悪いものについて、抗原の長さを 30 アミノ酸まで短くすることで発現を上げることができ、抗体の作製にも問題が無いことを確かめた。

修飾を受けたケモカイン受容体を認識する抗体を作製する方法として、修飾されていない受容体を発現した BV と修飾された受容体を発現した BV を ELISA プレートに固相した ELISA 法を確立し、これをスクリーニングに用いた。その結果、受容体の修飾部位を特異的に認識するモノクローナル抗体が得られた。

①-2 DNA 免疫法による GPCR など細胞膜タンパク質に対する抗体の作製法の開発

開発した分子アジュバントを用いた DNA 免疫法によって、GPCR のクラス A とクラス C に対する抗体を作製した。

1 回膜貫通型細胞膜タンパク質であるヒトの erb-B2 に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製した。また、機能未知の 2 回膜貫通型細胞膜タンパク質に対するポリクローナル抗体を作製した。

KO マウスを用いて、我々の確立した DNA 免疫を行うことでホモロジーが 99% であるラットの AT2R に対するマウスモノクローナル抗体を作製することができた。この抗体はヒトとマウスの AT2R を認識できる。

② 高特異性、高親和性、高機能性を有する抗体の効率的な創製技術

②-1-1 免疫寛容の打破とアフィニティーマチュレーションの促進による抗体産生能の増強

1) Treg 機能不活化作用を持つ抗 GITR アゴニスト抗体投与効果の検討

Treg 機能不活化作用を持つ膜タンパク質抗 GITR アゴニスト抗体投与群では、コントロール抗体投与群と比較して、血中抗体価の上昇が認められた。

Treg 除去細胞移入マウスに免疫することにより、従来は抗体作製が困難であった自己蛋白質抗原や自己蛋白質と相同性の高い抗原に対しても、抗体を作製可能であることが示された。

2) アフィニティーマチュレーションの促進による高親和性抗体作製技術の開発

B 細胞共刺激分子を介するシグナル増強の抗体産生反応への効果の検討: ROBO1 ディスプレイウイルスと B 細胞共刺激分子発現ウイルスを共免疫したマウスより得られたモノクローナル抗体は細胞上に発現するがん特異抗原蛋白と結合した。得られた抗体は、抗原ディスプレイウイルスのみを免疫して得られた抗体と比較して、より低濃度で癌抗原発現細胞に結合した。すなわち、native な構造の抗原を認識し、なおかつ抗原に対する親和性が高い抗体が得られた。

B 細胞活性化分子 BCSM ディスプレイウイルスの作製と、抗体作製への効果の検討: B 細胞活性化分子 BCSM の cDNA をマウス肝 cDNA ライブラリーよりクローニングし、バキュロウイルスエンベロープタンパク質 gp64 の膜貫通・細胞内ドメインと融合させて、BCSM をディスプレイする組み換えバキュロウイルスを作製した。ウイルス上にディスプレイされた BCSM が受容体結合活性を有することを、BCSM 受容体発現 B 細胞株を用いた FACS により確認した。BCSM と標的抗原膜蛋白質を共発現するバキュロウイルスをマウスに免疫した。2 種類の膜蛋白質に関して検討を行ったところ、いずれの場合にも抗体産生ハイブリドーマ形成数の顕著な増加がみられた。

②-1-2 外来抗原に対する特異的免疫応答の増強

1) 制御性 T 細胞を効率的かつ特異的に除去する方法の開発

免疫応答において、抗原特異的 Treg 細胞の抑制活性はより強化され、FR4 を標的にして、この強化された Treg 細胞を活性化 T 細胞と区別して除いたり抽出したりすることで免疫応答をコントロールすることができることが分かった。このように Treg 細胞を操作することにより、自己抗原もしくは種間で相同性が高い抗原に対しても抗体産生を効率よく誘導できる可能性が示唆された。

2) 制御性 T 細胞の機能をつかさどる転写因子に介入することで免疫抑制機能を解除する方法の開発

AML1/CBF β 複合体の Treg における重要性を示すと同時に、これら Treg 細胞で重要な役割を担う転写因子群を標的にすることが、新規の抗体産生誘導の手法となりうることを示した。

3) 胸腺と末梢での免疫自己寛容を操作したマウスの作製

Treg 細胞を除去するかその機能を阻害すること、さらに、胸腺での負の選択に異常のあるマウスを組み合わせることで、免疫自己寛容を打破することが可能であった。自己抗原と相同性が高いために従来法では作製が困難であった抗体の作製が容易になる可能性を示した。

②-2-1 抗体工学

②-2-1-1 PURE SYSTEM による小分子化抗体の改良と創製

1) PURE Ribosome Display の確立: 因子の調製法、特にリボソーム調製法の改良や、RD 反応条件の検討を行なった。その結果、大腸菌 S30 抽出液を使用した従来法に比べ、mRNA の回収率が 2 桁高い反応系の構築に成功し、PURE Ribosome Display (PRD) と名付けた。

2) PURE system を生かした scFv 選択系の確立: マウスナイーブ scFv ライブラリーから特異的な scFv の選択を行なった。その結果、1 回の選択で、DHFR 特異的な scFv を取得することに成功した。これにより、抗原調製から抗体選択まで PURE system を用いて迅速に行なう系が確立できた。

3) PRD を用いた無細胞エピトープマッピング法の開発および改良: 東京理科大学の増保教授のグループで取得されたモノクローナル抗体の提供を受け、PURE system を用いたエピトープマッピング法の開発を行い、リボソームディスプレイ法により抗体のエピトープを決定することが可能であることが示された。従来法と比較し、より迅速かつ簡便にモノクローナル抗体のエピトープマッピングができる方法へ改良することが出来た。このことにより、配列認識の抗体についてリボソームディスプレイ法によるエピトープマッピングが可能であることが示されたと言える。

4) 膜タンパク質合成系の確立: 通常の PURE system 反応液に NLP を添加して合成する

だけで、合成されたモデル膜タンパク質が NLP に埋め込まれ、可溶性分子として存在できることを確認した。

②-2-1-2 変異導入と物理生物化学解析

児玉・浜窪グループで調製・構築される抗体の中で特にその医療への展開が期待され科学的に重要であると考えられる分子種 4 種類(抗体クローン#1、クローン#2、クローン#3、クローン#4)について、焦点を絞り、研究を進めた。

1)ターゲット抗体クローン#1について:抗体クローン#1はCDR配列依存的に多量体化する傾向を有することが示唆された。また、ヒト型化 scFv-Fcでも大腸菌を用いた発現システムによる調製方法を検討したところ、やはり得られる分子種は多量体が優勢であった。

2)新規ターゲット抗体クローン#2について:マウス由来モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから遺伝子を増幅、可変領域配列を決定し、FvならびにscFvについて大腸菌を用いた調製システムを構築した。Fvは菌体内で封入体として発現し、一方、scFvは培地上清中に可溶性分子として発現した。scFvは、1.58 mg/1L培地の高収率で均一分子種の単量体を得ることができた。

②-2-2 高特異性、高親和性、高機能性を有する抗体を用いた生体分子の細胞内局在解析

高特異性、高親和性、高機能性を有する抗体を用いた生体分子の細胞内局在解析を行うために、引き続き抗体の作製を継続した。抗原として gp64 融合タンパクをウイルス表面上に発現させたバキュロウイルスを用いた。得られた複数タンパクの複数エピトープに対する各クローンの評価を Western blot、細胞免疫染色によって実施し、各用途に最適なクローンを絞り込んだ上で、ハイブリドーマのクローニングと抗体の精製を実施した。

選択した抗体を用いて、内因性タンパクの局在が、成長因子刺激、細胞接着、細胞周期などに伴い変化するかを検討した。これらの中には、細胞周期特異的に細胞内局在を変化させるタンパク質が認められた。また解析したタンパク質の中には、プラスミドやアデノウイルスを用いた強制発現系による細胞内局在と内因性タンパク質の局在が異なるものが認められ、高特異性の抗体を作製した上で生体分子の機能解析を行うことの重要性が示された。

プロテオミクスへの着手:細胞内局在や分子の修飾を受けるタンパクについては、そのような変化が他のタンパクとの相互作用によって生じていると考えられ、このようなタンパクについては、内因性結合タンパクを検討するために、磁気ビーズと共有結合させた抗体による免疫沈降と免疫沈降物の LC-MS で解析することとした。複数エピトープに対して抗体が得られている分子については、特異性および免疫沈降効率が最も高い抗体を比較検討して選択し、実験に用いる抗体を精製した。

②-2-3 強力なエフェクター活性または天然にないエフェクター機能を有する超活性抗体

抗 CD20 抗体の Fab 下流に Fc を 2 個ないし 3 個タンデムに連結した改変抗体を作製した。このタンデム Fc 型改変抗体は、天然型抗体よりも Fc 受容体に強い親和性を持ち、CD20 発現細胞に対して天然型抗体より約 100 倍強い ADCC 活性を発揮した。*in vivo*でも制がん活性は評価を開始したばかりであるが、低い投与量で治療効果を示した。

TNF α に対する受容体 TNFR II に Fc をタンデムに連結した受容体-Fc 融合タンパク質 (TNFR II -Fc-Fc) を作製し、TNFR II -Fc (Enbrel $^{\text{®}}$) と比較した。TNFR II -Fc-Fc は、TNFR II -Fc に比べて、Fc 受容体に対して強い親和性を示し、細胞膜上に TNF α を発現した細胞に強い ADCC 活性を発揮した。さらに、大腸炎モデルマウスにおいて、TNFR II -Fc-Fc は TNFR II -Fc の数十倍強い治療効果を示した。

②-2-4 新規非免疫法による抗体作製

発芽バキュロウイルス発現系と ADLib $^{\text{®}}$ システムを組み合わせた膜タンパクに対する新規抗体作製法の開発

MACS $^{\text{®}}$ システムと FACS システムの組み合わせによるバキュロウイルスと DT40 細胞の相互作用の観察の系の確立を行った。その結果、バキュロウイルスと特異的に相互作用する DT40 細胞クローンの単離に成功し、これを用いたバキュロウイルスに反応する DT40 細胞を濃縮する系の確立に成功した。

浜窪グループより提供の細胞内因子 A の gp64 フュージョン型タンパクを発現するバキュロウイルスを用い、開発した磁気カラムおよびセルソーティングを組み合わせさせたセレクション系を用いて因子 A に対する特異的な抗体の作製を試みた。因子 A 発現バキュロウイルスと野生型バキュロウイルスを同時に用いて細胞染色する系を用いることで、因子 A に対して特異的に反応する抗体の単離に成功した。

癌研のゲノミクスの手法により見出された癌組織特異的に発現する細胞膜タンパクに対する抗体作製を ADLib $^{\text{®}}$ axCELL システムにより行い、ELISA レベルで反応性を示したクローンを 200 個以上得ることに成功した。現在その他の手法により、ターゲットへの反応

性の検証を続けている。

②-3 DT40細胞を中心とした抗体創製技術開発

変異機能の可逆的 ON/OFF 制御が可能な DT40-SW 株を用いて、免疫寛容の制限の少ない抗体ライブラリーを構築した。

DT40-SW のライブラリーから、迅速に目的抗体産生クローンを単離する方法を確立し、AID 発現を OFF にすることにより、単離したクローンの抗原特異性を安定化できることを確認した。また変異機能の ON/OFF 制御と選択によって、親和性成熟による抗体の改良を行うことができることを確認した。

遺伝子変換、点突然変異の両変異機構を、XRCC3 の発現スイッチによって必要に応じて転換し、より効率的に親和性成熟を実施できる条件を確立した。内因性 XRCC3 遺伝子座の片方だけをノックアウトすることにより、親和性成熟に適した点突然変異型が得られることが分かった。

遺伝子ターゲティングにより、Pax5 の一方の遺伝子座をノックアウトし発現を低下させることで、形質細胞に特有の転写因子 Blimp-1、XBP-1 の発現が上昇し、抗体産生が約 2 倍に増加することを確認した。この方法は、一般にマウスハイブリドーマよりも抗体産生能の低い DT40 の抗体分泌量を増加させる技術として有用である。

②-4 ニワトリモノクローナル抗体作製技術を活用した免疫寛容回避等の基盤技術の開発

1) トリナイーブ抗体ライブラリー作製と既知の細胞融合用ニワトリ細胞株の改変

ニワトリナイーブファージ抗体ライブラリー(ライブラリーサイズは約 1.3×10^9 CFU) の作製に成功した。このライブラリーから種々の抗体クローンの作製が可能であった。

既知細胞株に IL-6 産生能を付加することで、融合効率の大幅な改善が達成されるとともに、従来法よりも安定して陽性ハイブリドーマを維持できるようになった。

2) トリ抗体可変領域のアミノ酸変異による親和性拡大技術の開発

ニワトリ抗体可変領域のある特定領域に変異導入することによって、抗体の親和性を高めることが明らかになった。この変異は調べた限りの全ての抗体において親和性拡大に関与していた。

3) インテグリンおよび関連リガンド特異的ニワトリモノクローナル抗体の作製

種々のヒトインテグリンに特異的なニワトリモノクローナル抗体を樹立するとともに、これらの抗体のニワトリ・マウスキメラ抗体、ニワトリ・ヒトキメラ抗体およびヒト化抗体を作製した。併せて、ヒトインテグリン発現ニワトリまたはヒト細胞株の樹立に成功した。

4) 性のあるアポB特異的モノクローナル抗体および酸化LDL受容体(LOX-1)特異的モノクローナル抗体の作製

アポB特異的ニワトリモノクローナル抗体の作製に成功した。

5) トリ・マウスキメラ抗体の作製とその安全性評価

304個の抗体を作製し、そのうちの幾つかについてはニワトリ・マウスキメラ抗体作製用ベクターを用いてニワトリ・マウスキメラ抗体を作製し、マウスへの投与実験を行い、マウスに対する免疫原性が極めて低いことを確認した。

③ 抗体を系統的に創製するための基盤技術及び創製された抗体の評価

③-1-1 機能ゲノム解析による標的探索技術の開発

1) 全エクソン発現データベースの構築とデータマイニング手法の開発

候補遺伝子に対して RACE(Rapid Amplification of cDNA End)法により変異転写産物の融合遺伝子の同定を進めており、2遺伝子について転座が確認されている。

2) 癌特異的発現遺伝子および癌特異的エピトープ候補の同定

いわゆる“トリプルネガティブ”乳癌(エストロゲン受容体陰性、Her-2 陰性)23 例、スキルス胃癌 23 例、正常組織 38 検体を解析した。特異的発現遺伝子を探索した結果、腫瘍において高発現する新規分子を数種同定し、抗体作製に着手した。

③-1-2 有効な高機能医薬抗体作製システムの開発

高機能抗体の標的となる候補分子を同定する目的で、従来蓄積してきた各種ヒトがんサンプルに対してカスタムアレイ、U133P2 アレイ、エクソンアレイによる遺伝子発現解析を行い、これを既に蓄積されている癌研がんゲノムデータベース中の発現プロファイルデータと併せて解析することにより抗体医薬標的分子候補の抽出システムを構築し、12 種のがん(乳がん、大腸がん、大腸がん肝転移、食道がん、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、膵がん、肺がん、子宮体がん、卵巣がん、MFH、トリプルネガティブ乳がん)に関して先進的発現プロファイリングによる標的分子探索を行い、新規医薬抗体標的分子 85 分子を同定した。最も優位性の高い9分子に関しては抗体作製分子と決定し、乳がんまたは大腸がんに関する 3 分子については東京大学先端科学技術研究センターに遺伝子情報の提供を行った。残る 6 分子については遺伝子情報に加え当該分子のタンパク発現ベクターの構築を行いカイオム社に情報を提供し、カイオム社で抗体を作製した。

先進的発現プロファイリングにより医薬抗体標的分子候補を探索するため、エクソアレイ(GeneChip Human Exon 1.0 ST array)を用いて、既に 100 例を超える数の発現解析を行った。また、解析と並行して臨床腫瘍検体の収集は 16 種のがんに対して継続中であり、このうち 11 種のがんについては、各 100 症例を超える数の検体の収集を終え、収集された総検体数は 8948 例にのぼる。

種を越えて広く保存されている標的候補分子については免疫寛容を回避するためにマウス発生工学を用いてこれらの標的候補分子を欠失したノックアウトマウスを作製し、このマウスを用いて標的候補分子に対する抗体作製を行う必要がある。そこで我々は、PCR法を用いて迅速にターゲティングベクターを作製するシステムを開発し、さらに、連続的に体外受精を繰り返すことにより迅速にノックアウトマウスを作製するシステムを開発した。このシステムを用いて、9 種類の抗体標的候補分子についてノックアウトマウスの作製に着手し、現在までに 6 種類の抗体標的候補分子のノックアウトマウスを開発した。さらに、バキュロウイルス抗原発現系を用いた高機能抗体の作製を効率的に行うために、gp64 トランスジーンを導入したノックアウトマウスの作製を 3 種類の抗体標的候補分子について完了した。

③-2-1 高親和性抗体を用いたターゲットプロテオミクスによる複合体解析

核内受容体に結合するコファクターの同定の手段として、培養細胞中で発現している内在性のタンパク質複合体を抗体を結合した磁性ビーズで免疫精製し、得られた複合体をショットガン法を用いた質量分析の手法で同定している。JSR 社の開発した非特異的タンパク質低吸着磁性ビーズと本プロジェクトで作製した高親和性抗体を用いることで内在性タンパク質を 1 万倍以上濃縮することが可能になり 10cm dish1 枚程度の細胞から複合体を同定している。

複数回のプロテオミクスにより測定したデータにより、同定ペプチドの上位 3 個の定量値(レファレンスを HNF4α で求めた)を平均したものが免疫沈降でもとめた蛋白量とよく相関することから、ノンラベルの MS 定量法として使用できることを示した。これにより、仮説として相互作用すると考えられている転写コアクチベーターやコリプレッサーの複合体を同定することができた。また、新規のコアクチベーター候補分子を複数同定した。

アルツハイマー症に深く関連すると考えられている γ セクレターゼ複合体は、プレセニン、APH1、PEN2、ニカストリンの 4 種類の膜タンパク質によって構成される複合体タンパク質で、アミロイド前駆体タンパク質や Notch タンパク質等を基質として、膜貫通領域にあるペプチド結合を切断するカルボキシルプロテアーゼである。 γ -セクレターゼ複合体の構成成分の一つであるニカストリンの解析で γ -セクレターゼ複合体のプレセニン、APH1 が同定された。

③-2-2 同定された標的タンパク質に対する系統的抗体作製技術の開発

1) 抗体作製

転写因子およびその構成するコファクター、あるいは癌・代謝性疾患にかかる関連タンパク質等プロファイリングされたターゲットタンパク質およびその部位特異的エピトープについて、130 項目で抗体を樹立した。バキュロウイルス発現系によるタンパク抗原として癌関連 55 項目、血管新生関連 28 項目、糖尿病関連 27 項目、骨運動器疾患関連 3 項目、筋萎縮症関連 10 項目、炎症関連 3 項目の計 130 項目樹立クローン数 538 クローンについて抗体作製に至った。

2) 抗体の寄託について

本新機能抗体作製プロジェクトにて作製した抗体および先行する FOCUS プロジェクトと NEDO タンパクチッププロジェクトにおいて作製した抗体については、参加企業の要請により製品化されているものあるいは今後製品化の予定のあるもの、特許の範囲にあるものを除いて、広く一般の研究者および抗体製品開発企業に活用されることを目的としてパブリックのリソースセンターに寄託することとした。理研バイオリソースセンターへの寄託を予定しており、まず前提条件のマイコプラズマ感染について、貯蔵窒素タンク別のチェックを行い、感染フリーであることを確認した。

2. 2 高効率な分離精製技術

2. 2-1 ステップ I (培養)における技術融合の進捗と成果

ステップ I(培養)は、新たな技術開発を行うのではなく、内外の大学、公的機関および製薬メーカー・創業ベンチャーに対し、本プロジェクトの意義を説明し、医薬候補であるヒト型モノクローナル抗体の提供を頂き、提供を受けた遺伝子または抗体産生細胞を元に、抗体産生細胞の調製を行い、以降のステップ II,III において検証可能な抗体培養液をすみやかに供給することを主眼とするステップである。供給を受けた遺伝子または抗体産生細胞より、最終的に 3 種類(IgG1、IgG3、ならびに scDb-Fc (IgG1 型次世代抗体)のヒト型抗体を生産する CHO(Chinese Hamster Ovary)細胞を調製した。

現在上市されている抗体医薬にはサブクラス IgG の違いがあるが、IgG1 が最も数多く

市販されている抗体医薬である。そこで、要素技術検証用標準プロセス／標準パイプラインとして成立しうるヒト型 IgG1 抗体として、組換えヒト抗 IL-8 IgG1 を選択し、この生産株について、工業生産に用いるレベルの抗体生産細胞調製に必要な安定株を得るための、細胞株のクローニング、高生産性候補株取得、さらには無血清馴化ステップまでの調製を行い、マスターセルバンク、ワーキングセルバンクを構築し、さらに小スケールでの培地最適化を行い、30L 培養槽にて培養を行い、培養上清を 2 回作製し提供した。

次に、次世代型抗体として、東北大学が構築、調製したリンパ球をがん細胞に標的化できる様な二重特異性を有している scDb-Fc (IgG1)抗体発現 CHO 細胞について、工業生産に用いるレベルの抗体生産細胞調製に必要な無血清培地への馴化、ならびに浮遊培養系への馴化を行い、マスターセルバンク、ワーキングセルバンクを構築し、さらに小スケールでの培地最適化を行い、30L 培養槽にて培養を行い、次世代型抗体を含む培養上清を 2 回作製し提供した。

さらにまた、3番目のパイプラインとして、通常の条件では ProteinA への結合が弱い IgG3 タイプを選択した。製薬会社から提供された IgG3タイプ医薬品候補のヒト IgG3 抗体遺伝子を元に、2種類の発現ベクターを構築し、これを CHO 細胞に形質転換を行い、IgG3 抗体生産細胞株を構築した。構築した細胞株のクローニング、培地選択、無血清馴化を完了し、実際の工業生産に用いるレベルの抗体産生細胞の候補株を調製し、マスターセルバンク、ワーキングセルバンクを構築し、30L 培養槽にて培養を行い、培養上清を 1 回作製し提供した。

以上の 3 種類のパイプラインについては、CTD-品質に関する概括資料：新規生物薬品（原薬）のモックアップに準じて分離精製プロセスに至る前段階までの工程において、供給方法の標準化を行った。

さらに、「系統的な高特異性抗体創製技術開発」チームから提供される医薬候補のヒト型モノクローナル抗体 (IgG1 生産株) について、発現ベクター構築、CHO 細胞へのトランスフェクションならびに、無血清培地への馴化、ならびに培養条件の検討を行い、そのうち、1 種類について 1L リアクタースケールでの回分培養を用いた培養原液の供給方法を確立し、これについてもモックアップに準じた標準化を行った。

2. 2-2 ステップⅡ (精製)における技術融合の進捗と成果

ステップⅡ (精製)における技術融合は、アフィニティリガンドのライブラリー構築、リガンド・ライブラリーのハイスループットスクリーニング技術の開発、計算機を利用したリガンドの論理的改変、流動特性の優れた次世代型クロマト担体基材の開発、効率的リガンド固定化反応の開発、リガンドタンパク質およびクロマト担体基材の商業規模生産技術等の各要素技術開発の成果を受けて、(1)高性能な抗体精製用アフィニティクロマトグラフィー担体を開発し、それを用いて培養原液から医薬候補のヒト型モノクローナル抗体の精製を行い、実用化に向けた必要性能を評価するとともに、新たな開発指針を得て、各要素技術開発にフィードバックし、持続的な性能改良に資すること、(2)開発した精製技術の特性をより解析し、開発した技術の適用分野をさらに広げることにも貢献できるものと考えられる。

技術融合の成果のうち主なものとしては、アフィニティ担体構築のために、リガンド開発のハイスループット化に向けたリガンドアレイとその検出装置の開発、そこで得られた成果としてのプロトタイプリガンドである AIST-2、更にその改良型リガンドである AIST-3 の開発、プロトタイプリガンドである AIST-2 を用いた各種シリカ担体の開発、開発したアフィニティ担体を利用した実証パイプラインの構築などがあげられる。

アフィニティ担体を構成する要素としては、担体基材、固体化反応及びタンパク質リガンドの 3 通の要素があり、それらの要素技術を集合することにより、優れたアフィニティ担体を構築することができる。このうち、タンパク質リガンドの再デザイン技術については、新たな基本フレームを創出し、これをプラットフォームとし技術開発を行った。なお、このプラットフォームについては、本プロジェクト終了時点で、5 社に特許ライセンス(実施契約)という形で技術移転が行われた。

リガンド機能を担うタンパク質部分として、IgG 結合を示す各種タンパク質ドメインを公知データベースやコンピュータデザイン等により探索し、これをシステム且つリジンフリー化し、それぞれ基本フレームに組み込み、これをタンパク質として発現生産することにより、一次ライブラリーを作製した。この一次ライブラリーを構成中に、すでに優れたアフィニティリガンド機能を発揮するものが見つかり、これをプロトタイプリガンド AIST-2 と命名し、その後の担体開発に用いた。一次ライブラリーに構成要素について、リガンド機能を発揮する部分について網羅的アミノ酸置換を施したものを作製し、これを二次ライブラリーと称した。作製した二次ライブラリーから、温和な条件でのモノクローナル抗体の溶出・回収特性に優れた性能を発揮できる改良型リガンド AIST-3 を見出すことに成功した。

二次ライブラリーを構成する各変異体タンパク質のリガンド機能を効率よく測定するために、アレイ解析装置を開発し、また、2 次ライブラリーを構成する各変異体タンパク質をアレ

イ化することによりリガンドアレイライブラリーを作製した。

開発したリガンドアレイライブラリーをアレイ解析装置で開発することにより、その特性を効率よく測定できた。この測定そのものは、原理的にはクロマトグラフィーを並列化(アレイ化)したものと考えられ、アレイ化したリガンドが示すアフィニティクロマトグラフィーとしての特性と効率よく測定できるものであった。この測定で得られた特性をパラメータ化し、中性における各リガンドが示す IgG との結合の強さ(Kd)と温和な条件である pH5 での溶出回収のしやすさを示す指標としての T0.5 の値とをプロットした結果、プロトタイプリガンドである AIST-2 の改良リガンドとして AIST-3 が得られた。

得られた AIST-3 をシリカモノリスに導入して作製したアフィニティカラムを用いて抗 IL8 モノクローナル抗体を発現する CHO 細胞の培養液を用いてクロマトグラフィーを行い、AIST-2 カラムと比較した。その結果、AIST-2 では溶出回収できない pH4.5 において容易に溶出回収できること、また、より温和な酸性である pH5.0 においても、定量的に溶出回収できることが示された。

プロトタイプリガンドである AIST-2 リガンドを用いて、多孔質性能の高度に制御したシリカ担体、固定化反応の高度制御技術の確立、担体基材上の未反応官能基の効率的マスク条件開発などの技術集積を行うことにより、プロトタイプではあるが、静的結合特性(80mg-IgG1/mL-bed 以上)および動的結合特性(保持時間 1 分未満の高条件において 40mg-IgG1/mL-bed 以上)としては世界トップの特性を発揮できる IgG 精製用アフィニティ担体(AIST-2 と名づけた)の開発に成功した。

この AIST-2 担体を用いて、実証パイプラインの構築を行った。実証パイプラインとしては、ステップ I において作製したモデルパイプラインと、A-チームで開発した高親和で今後医薬候補品として期待が持てるものを選び、約 100mg の精製スケールを念頭に置き、培養液 2 から 3L を一度に処理することを行った。この際、プロトタイプ担体の大量供給に制限により、1mL サイズのカラムを有効に活用することを試み、連続試料注入クロマトグラフィーの開発を行った。開発した装置を用い、アフィニティクロマトグラフィーとそれに引き続くポリッシングのためのクロマトグラフィーを組み合わせることで、高度に精製されたモノクローナル抗体を得ることができた。

結果的に、25種類の実証パイプラインを設定し、いずれも有効に精製を行うことができると確認した。このようにして精製したモノクローナル抗体は、試用モニタリング用サンプルとして、希望する製薬企業等に提供した。

シリカモノリス基材は、超高速領域での流動特性に優れていることから、この特性を利用することにより、多くの抗体を迅速に精製できる精製システムとして活用できるようにすることを試み、婚ことを実現する担体として、スピнкаラムに組み込むことを行った。このことにより、迅速に実用化更に商品化が行われた。AIST-2 を導入したシリカモノリス担体をスピнкаラムに組み込むことにより、たった数分でサブミリグラム程度の抗体が高度に精製できる。

このように、開発した各種技術を融合することにより、実用化に向けた多くの成果が得られた。

2. 2-3 ステップⅢ(品質管理)における技術融合の成果

プロジェクト全体におけるステップⅢの役割は、「品質分析」のための技術開発と、精製抗体の「品質評価」による精製システムの検証である。「品質分析」に関しては、「抗体の分子多様性」と「変性・凝集による劣化」に焦点をあて、主に各機関が独立に要素技術を開発することで進めた。抗体の分子多様性に関しては、大阪大学が分析手法の高度化を、大津(TBI)分室(嵯東洋紡バイオロジックス)が実用的な評価系の改善を主に担当した。抗体の変性・凝集に関しては、東京大学が原理・機構の解明を、産業技術総合研究所が分析手法の高度化を、大津(TBI)分室(嵯東洋紡バイオロジックス)が実用的な評価系の改善を主に担当した。一方、「品質評価」に関しては、「実証パイプライン」として設定した医薬候補のモノクローナル抗体(研究開発項目①「系統的な高特異性抗体の創製技術開発」にて開発した新規抗体を含む)に関して、ステップ I で調整した培養原液をステップ II で精製することで得られた精製抗体の品質を評価することで、プロジェクトで開発した精製システムの性能を評価した。主に産業技術総合研究所が精製抗体の物理化学特性解析を主に東北大学が精製抗体の生物活性と保存安定性を評価した。また、それらの評価結果をステップ I またはステップ II にフィードバックすることで、「培養時の分子多様性の恒常化」と「分離精製時の変性・凝集の低減化」を目指した。以下のそれらの成果と進捗の概略を列挙する。

抗体の分子多様性の品質分析に関しては、大阪大学を中心として、シアル酸糖鎖付加による抗体糖鎖の多様性を分析する手法の高感度化を進めた。Lectin Binding Assay を基盤とする微量分析法を構築し、100 μ L のサンプル量にて抗体糖鎖のシアル酸、フコース、ガラクトース修飾を定量的に評価可能な系を開発した。抗体の変性・凝集の品質分析

に関しては、東京大学を中心として、酸性暴露と pH 滴定における凝集形成に関する基礎的な知見を蓄積した。酸処理後の抗体分子の変性・凝集化は、pH2.7 の酸処理の場合、劣化の程度が顕著であるのに対し、pH3.5 の酸処理ではそのダメージが大きく軽減することを明らかにした。アルギニンによる凝集抑制法の開発を行い、濃度、温度、pH、あるいはサブクラスに応じた凝集抑制条件を検討した。さらに、各種クロマトグラフィーの展開・溶出溶媒にアルギニンを用いた、効率的かつ定量性の方法を開拓した。また、抗体の変性・凝集の品質分析に関しては、産業技術総合研究所を中心として、赤外スペクトルを利用した分析手法の高度化を進め、50 μ L のサンプル量にて抗体溶液内の凝集の存在量を評価する系を構築した。これを用いて、28 種類の異なる溶媒に溶解した抗体の凝集性について解析し、最適な溶媒を探索するためのシステム開発の基礎とした。さらに、大津(TBI)分室(株)東洋紡バイオロジックスを中心として、サイズ排除クロマトグラフィーによる抗体の凝集評価の精度の向上を進めた。移動層の組成が変化するとクロマトグラムが変化することを明らかにし、ついで、実験計画法の一種である応答曲面法を利用して、もっとも鋭敏な応答を示す移動層の組成を決定した。

精製システムの検証としては、産業技術総合研究所が、「実証パイプライン」として得た 20 種以上の精製抗体の物理化学特性解析を行った。マイクロチップ電気泳動法により純度を、赤外スペクトル法により構造安定性を、動的光散乱法により凝集性を評価した。また、ELISA 法により精製時にアフィニティクロマト担体からの脱離が危惧されるプロテイン A リガンドのリーク試験もあわせて行った。精製抗体の純度は大部分が 99% 以上で、開発した精製システムの高い性能が実証された。

また、リガンド・リーク試験により、測定したすべてのケースで自主的に設定したプロジェクト基準値(88ng/mg-IgG)を下回ることが確認され、開発したリガンド固定化技術と担体基材の有効性が実証された。構造安定性と凝集性の解析からは、分子のコンパクトさと微視的不均一性と構造安定性の 3 特性が相関することが示された。東北大学では、精製抗体の生物活性と保存安定性を評価した。その結果、次世代型抗体 scDb-Fc (IgG1) は、パイロットスケールで培養、精製されたものでも、その特徴的な二重特異性を定量的に保持していることが確認され、また、サイズ排除クロマトグラフィーにより、6ヶ月以上の長期保存安定性も確認され、開発した精製システムが精製抗体に対して好ましからざるストレスを与えるものでないことが証明された。

回収率の改善に関しては、産業技術総合研究所で開発に成功した温和な条件で抗体を効率よくできるアフィニティリガンドを組み込んだアフィニティカラムを利用することにより、抗体タンパク質にダメージを与えることの少ない温和な条件である pH5.0 で定量的溶出を達成し、従来ほとんど回収できなかった条件で 90% 以上の回収率を達成した。また、プロテイン A 型プロトタイプアフィニティ担体を用いて、「実証パイプライン」のパイロットスケールの培養液を系統的に精製したところ、用いた 24 種類のモノクローナル抗体のうち 19 種類に関して、80% 以上回収率でアフィニティ精製が実施できることを確認した。

以上は、本プロジェクトの成果の顕著な技術優位性を表すものであり、先行技術に対して十分な市場競争力を有していることを示している。

2. 3 ICOS 法を用いた癌治療用ヒト抗体単離技術開発

① 抗原同定技術

我々の研究戦略は、「抗体の網羅的単離クローンの選別—選ばれた抗体が認識する抗原の同定」と進む。すべての段階がある限られた時間で終了できる方法を開発してはじめて成立する研究戦略である。その様な目標を達成する技術開発および、その開発した方法を用いた研究の推進が本プロジェクトに課せられた任務である。本プロジェクトでは癌種を限定せずに、すべての固形癌を対象とすることとした。そこで最初は 7 種類の固形癌(肝癌、腎癌、膵癌、肺癌、大腸癌、胃癌、卵巣癌)を対象とし、途中から更に 4 種類(乳癌、前立腺癌、メラノーマ、グリオブラストーマ)を加えた。この癌種だけで、白血病を除く癌患者の 90% を超える。49 種類の癌細胞株を抗原として ICOS 法で総数 67 回のスクリーニングを実施した。1 回のスクリーニングで約 200 個のクローンを単離したので結果として約 13,000 個のクローンを回収した。個々のクローンについては VH 鎖について塩基配列を決定し分類した。それをすべてデータベース化し詳細に解析すると、独立したスクリーニングで単離されたクローン間で、まったく同じ配列のものが頻繁に見出され、結局数千数百種類の異なる抗体が単離されたことになった。第二段階はクローンの選別である。この段階は藤田保健衛生大学病院で癌治療を実施している多くの外科教室が本プロジェクトに全面的に協力・参加していることにより可能になった。癌標本の染色像は、次の 4 パターンに分類された。1. 癌特異的染色像、2. 正常細胞もある程度染色されるが、癌細胞膜の染色が際立っている例、3. 癌細胞も正常細胞も類似の染色像を与える、4. 癌細胞も正常細胞も全く染色されない例。癌特異的抗原を厳格に定義するならば、1 のカテゴリーがそれに相当するが、1 及び 2 も含めると、単離された抗体の約 3 分の 1 が、癌特異的発現を

している可能性が示唆された。個々の抗体が結合する抗原が判明したのち、多数の肺癌組織を用いて極めて体系的に免疫組織染色を実施したが、上記の分類でカテゴリ-1と2は、大きく二群に分かれることと対応していた(後述)。ここからが第三段階となるが、癌特異的染色像を与える 800 種類を超えるモノクローン抗体が認識する抗原を同定するステップである。モノクローン抗体を有しており、その標的抗原が大量に発現している癌細胞株が分かっているので、抗体を用いた免疫沈降(IP)もしくはアフィニティークロマトグラフィーで抗原を精製すれば、後はマス(MS)解析で抗原を決定できるはずだとかかなり安易に考えていた。研究を進める上で明確になってきたことは、マス解析でタンパク質を同定していると主張しているグループは多く存在するが、グループごとに決定できているタンパク質の使用量が、何桁ものレベルで相互に全く異なっていることであった。我々の大学では、多くの努力により 500 fmol あれば、対象が何であるか決定できる段階までマス解析の精度が高まった。その結果、次のようなステップを経ることにより抗原決定が可能となった。1. 様々な細胞株に対してフローサイトメトリー(FCM)を行って、対象抗原を大量に発現した細胞株を探す。2. 細胞膜上のタンパク質をビオチン化する。3. detergent を用いて細胞膜を溶かして、膜タンパク質を可溶化する。4. 抗体を用いてIPLし、標的抗原を回収する。5. サンプルを二つに分けて、SDSゲル電気泳動(SDS-PAGE)によりタンパク質を分離する。6. 一方は、銀染色し、もう一方はストレプトアビジンを用いたウエスタンブロットを行う。以上の操作により、ウエスタンブロットで一本のバンドが得られて、そこに相当する場所に銀染色でバンドが見られればそれがマス解析の対象となる。ゲル内で直接トリプシン処理をして、ペプチドを溶出しマス解析でタンパク質を決定する。この一連のプロセスは、完全に確立した。ウエスタンブロットでバンドが数本検出される場合は、そのすべてについて解析した。マス解析の結果得られる抗原候補は複数であることも多く、更なる確認実験が必要であった。そのために候補膜タンパク質の膜外部分をポリペプチド鎖として組換え DNA 技術により調製し、それと抗体の反応性を確認した。一部については標的タンパク質を膜上に強制発現して抗体との反応性を確認した。更に siRNA 技術を用いて抗体との反応性の消失も調べた。本プロジェクトで同定された癌特異抗原は、すべてこの手続きを経て同定・確認されたものである。

我々は、800 種類を超える抗体を有している。その一つ一つについてこのような操作を行っていけばいくら時間があっても足りない。この状況を打破するために二種類の技術開発に成功した。上記したように多くの抗原について、様々な細胞株を用いた FCM を実施する中で、そのパターンが相互に似ているケースが数多く存在することに気がついた。これは同じ抗原に結合している、もしくは同じ複合体を構成している成分を認識していることを意味するのではないかと推定された。このことにより FCM により多くの抗体を分類する方法 GFC (grouping of clones by flow cytometry)の開発につながった。これは多数のクローンのマス解析を効率化するのにつながった。つまりこの方法の開発により、同一の抗原を認識する可能性の高い抗体を一度に処理することが可能になった。更に大量処理をより可能にしたのは、抗原確認のため調製したすでに同定された癌特異抗原の膜外部分に相当するポリペプチド鎖を用いた ELISA による各抗体の抗原決定である。上記した癌特異的染色像を与えなかったクローンも含めて、ICOS 法で単離されたすべてのクローン二千数百種類を対象に ELISA で標的抗原と結合するクローンを選び出した。この際にすべてのクローンを個別に ELISA すれば大量の精製抗原がブローブとして必要となる。それを96穴プレートにストックしたクローンを3種類の方法(三次元的に組み合わせる)で混合したサンプルに対して ELISA を行うことにより、限られた量の抗原でクローンを見つけ出す方法 SITE(simultaneous identification through three dimensional ELISA)法の開発に成功した。この方法が成功した理由は、混合した数十種類の抗体の中に一種類のポジティブクローンがあるか正確に判断できたことに基づいており、我々の単離した抗体の高い特異性及び強い結合力の裏付けがあったことから可能となった。

以上の三段階 抗体単離-抗体の選別-抗原決定、から成るプロセスが完全にシステムティックに機能することにより、表2に示すように、32種類の癌特異抗原の同定と555種類のヒトモノクローン抗体の単離に成功した。

② 機能制御抗体単離技術

動物を抗原で免疫することにより動物体内へ抗体産生を誘導させる従来法と異なり、ファージ抗体ライブラリーから特定の機能を有するクローンを単離するには、二つの条件を考える必要がある。1000 億種類のクローンから成るといってもライブラリーに含まれる抗体には限度があり、その中に入っていない抗体はいかなる方法を駆使しても得られない。ライブラリーをスクリーニングして抗体を回収する作業は、使用した抗原分子とファージ粒子上に存在する抗体分子の立体的相補性を基盤とした相互作用に基づく結合力で複合体が形成されるかどうかによって、クローンとして得られるかどうかが決まる。我々の場合は、癌治療用抗体単離を目標としており、抗原は生きた細胞上に存在する分子なので、

結局は、前章に記した抗体単離により、いかに多数かつ多種類の抗体を得るかに始まり、単離した抗体群から、いかにして使用目的に合致したクローンを選び出すかが高機能性抗体を得るかの課題となる。我々の採用した研究戦略の有用性を示す例を先に示す。CADM1/IGSF4分子は癌抑制遺伝子として注目されていたが、我々の本プロジェクトによりこの分子が癌で大量発現している例も相当高頻度に存在することが判明し、その分子がヘテロな機能を担っていることが強く示唆されている。この分子に結合する様々な抗体が単離されているが、それを用いていくつかの細胞株に対するFCMおよび多くの肺癌組織に対するIHCを実施した。その結果特定の抗体によって認識されるが他の抗体によっては全く認識されない CADM1/IGSF4分子が癌組織で見いだされた(文献3)。なぜこのようなことが起こるのかについて、CADM1/IGSF4がいくつかの異なる分子複合体を形成していると考えるのが一番理解しやすいが、これに類似した現象は他のタンパク質でも見いだされており、特定のタンパク質に関して癌特異的複合体を見つけ出すことができるとすれば治療用抗体創薬にとっては大きなブレークスルーとなる可能性がある。

この章では、同定した32種類の癌特異抗原と単離した数百種類の抗体の中から、いかにして癌治療用抗体を選び出すかについての戦略と実験結果を報告する。そのためには、癌細胞膜上に存在するタンパク質に特異的に結合する抗体を用いていかに癌細胞を殺傷するかにより戦略が異なる。成功例が多いのはIgG型(とりわけIgG1)抗体である。この抗体が癌細胞を殺す機構は、1. まずは抗体が細胞膜上の抗原分子に結合することによりその分子が果たしていた機能を阻害し、細胞が生存できない、もしくはアポトーシスを起こして死滅する、2. その抗原の分子の性質によっては、抗体の結合によりアポトーシスを誘発する、3. 細胞膜上での抗原抗体複合体の存在がナチュラルキラー細胞等によるADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) や補体経路を刺激しCDC(complement-dependent cytotoxicity) を引き起こす、が示されている。とりわけ成功例では、抗原分子の機能を抑えるという内容が、細胞の存続自身を不可能にするほどに多岐にわたった影響を与えることが判明している。EGFR に対するエルピタックス、HER2 に対するハーセプチン、CD20 に対するリツキサンがこれに相当する。癌化において重要な機能を担っていても抗体が結合しただけではその機能に影響を与えない抗原や、元来、癌が artifact として発現している癌特異抗原の場合は、上記機構3のみで癌を殺そうという試みもなされているが成功例は未だない。それ以外については、抗体分子のVDメインの抗原結合力を生かして、さらに別の機能を付与して癌を殺す戦略は各種存在するが、その場合は抗体を、癌細胞への運搬手段(delivery system)と考えている。具体的には、放射性同位元素を付加する例(CD20に対する抗体ゼバリン)と毒素を付加する例が考えられている。毒素は細胞質まで運搬されて効果があるので、抗原と結合して抗体が細胞質へ入り込む(internalization)が必要となる。キラーT細胞(cytotoxic T cell)やナチュラルキラー細胞の強い細胞殺傷力を使って、その際、癌細胞を認識させるために抗体を使うというアイデアに基づき研究が進められているが、まだ成功例はない。さらに抗体が二価であることを利用して、二重に抗原識別能力(bi-specific Ab)を持たせて癌細胞とキラーT細胞を近傍に引き寄せるアイデアも採用されている。我々は、本プロジェクトでは、IgG1型ヒト抗体を用いて癌治療薬とすることを基本に考えて研究を進めた。

いずれの場合でも抗体を用いて癌治療薬とする場合に、標的抗原として求められる性質がある。1. 癌細胞膜上に存在し、抗体がその分子にアクセスできる。2. 癌は決して一様ではなくヘテロな集団になっているが、できる限りすべての癌細胞で発現している。3. 正常細胞では一切発現していないことがベストだが、少なくとも vital organ(心臓、肺、肝臓、膵臓、消化器、泌尿器等)では発現していないか発現していてもごく微量である。しかし現実には、我々が本プロジェクトで同定した癌特異抗原はすべて正常な状態にある健康人の体内で機能している分子であり、これらを標的とする抗体治療が成立するかどうかは、癌細胞をいかなる方法で殺傷するか、その際、副次的に損傷を受ける正常細胞(副作用)のレベルが許容範囲にあるかの兼ね合いによる。癌特異抗原として成功例である EGFR や HER2 にしても、明らかに様々な正常組織で発現している。更に癌特異抗原ですらない CD20 や VEGF が、なぜ癌治療用抗体の標的になり得たかは、それぞれ特別な理由づけ(rationale)がある。そこでまず発現レベルを知るために、我々の単離した抗体を用いて肺癌を例に体系的に免疫組織染色を実施した。染色結果は7種類のパターンに分類された。A, 癌細胞膜のみが染色される; B, 癌細胞と気管支上皮の細胞膜が染色される; C, 正常細胞膜も含めて染色される; D, 癌細胞特異的染色だが細胞質が染色される; E, 癌細胞の細胞質以外に正常細胞が染色される; F, 正常細胞しか染色されない; G, 染色像はどこにも見えない。結果は大きくカテゴリー(I)多くが A か G に分類される、とカテゴリー(II) IHC の結果が C に分類されたものが多い、のどちらかのカテゴリーに分類された。

さて現在、製薬会社が治療用抗体候補クローンを入手した際に、臨床試験を実施するかどうかをいかなる基準で判断するかについて考えてみる。1. 抗体が ADCC 活性もしく

は CDC 活性を示すか、2. 標的抗原の機能としてその活性が測定できる場合は、抗原機能の抑制能力があるか、3. In vitro で細胞増殖抑制効果を示すか、4. 主として xenograft モデルを用いて、抗腫瘍効果の有無。結果は all-or-none で得られるわけではないが、すべてがポジティブであった場合は、あとは成功確率の判断となる。臨床試験を実施することになると、最初抗体を調製することとなる。一度選んだ抗体は、途中で変更できないためにその選択は慎重になる。GMP(good manufacturing practice)レベルの規格に合格する必要がある元となる抗体産生細胞株をマスターセルバンクとして確立するところから始まる。行く先のことを考えて、動物内での体内動態(基本的には、体内半減期が長いほうが良いと判断される)、動物とりわけサルを用いた安全性試験を目的とした前臨床試験実施のために、標的であるヒトタンパク質と同時に、同等のサルタンパク質とも結合することが求められる(ヒトサル間のアミノ酸の相違はわずかであるためにほとんどがOK)、これをクリアすると抗体の調製が始まる。この段階で約百億円程度の出費が最低限必要と言われている。

我々の場合も、条件検討のために上記1-4の検討を行った。ファージ抗体は、最初 single chain Fv 型抗体が cp3 タンパクに融合した形で調製される。そこでクローンごとに IgG₁に変換する必要がある。最初 IgG₁に変換したのち ADCC 活性を解析したが、多くのモノクローン抗体が ADCC 活性を示した。ナチュラルキラー細胞が示す ADCC 活性の場合、Fc に対するレセプターが抗原抗体複合体を認識して細胞殺傷能力のある分子を分泌することにより癌細胞を殺す。そこで、本プロジェクトで同定した癌特異抗原のように癌細胞で大量発現の見られる分子が標的である場合は、解析した中で約半数の抗体が ADCC 活性を示したというのが結論である。

上記2と3は表裏一体の関係にある。分泌された分子 EGF がリガンドとなってその受容体である EGFR に結合し、それがシグナルとなって細胞増殖が起こる例では、抗体が EGF と EGFR の相互作用を阻害することにより細胞分裂を阻害するという極めてわかりやすくまた測定し易い系である。一方、CD44 に抗体が結合して細胞増殖が阻害される例では、CD44 の機能が判明しておらず、どのようにその機能に関係した活性を測定するかの手がかりがない。結果として、体系的に解析が可能なことは、抗体存在下で細胞を増殖させて、増殖速度に変化があるかどうかを解析する、さらに xenograft モデルでの抗腫瘍効果の測定となる。結局、28 種類の癌特異抗原に対する 87 種類の IgG₁ を調製し、in vitro での細胞増殖速度への影響、xenograft モデルでの抗腫瘍効果の測定を行った。

抗 EGFR 抗体はすでに治療薬として抗体が市販されているが、我々の単離した抗 EGFR 抗体を例にそれぞれのクローンの EGFR に対する生物学的効果を解析した。たとえば図1に示すように、cetuximab と同等レベルの抗腫瘍活性を持ち、059-152 の場合は作用がすでに報告されているクローンとはまったく異なる機構で抗腫瘍活性を示すことが示されている。さらに様々な癌細胞株に対して xenograft モデルで抗体腫瘍効果を解析した結果では、市販されているエルピタックスやベクテビックスに対して、我々のクローンが抗腫瘍効果を示す例も見つかるとある。世界中で癌治療用抗体の開発が進められているが、実際に標的とされている抗原の種類は思いの外少ない。更に癌治療薬として認可され、その標的が癌特異抗原である例は、未だに EGFR と HER2 に限られている。本プロジェクトのように癌で異常に大量発現している様々な性質をした癌特異抗原を標的にしようとする場合、更なる独自の工夫が必要となる。この解析を通して得られたことである重要な点は、癌がきわめてヘテロな原因に基づく疾患である点である。更に状況を複雑にするのは、同じ癌細胞に対する同じ抗体の及ぼす効果についても細胞の培養条件が異なると異なる結果をもたらすことすらある。

我々が同定した 32 種類の癌特異抗原の場合、EGFR や HER2 そのもの及びそれに類似の細胞増殖因子受容体も含まれているが、CAM(cell adhesion molecule)に分類される分子を含めて様々な機能を示す分子群である。このような分子の機能を抗体の投与により抑制するには、その機能の実体を明らかにする必要がある。そこで本研究では同定された抗原に対して、全て siRNA によるノックダウンを実施してその表現型を解析することとした。その結果、程度の差はあれ、かなりの頻度で増殖抑制が観察され、更にアポトーシスが誘導される例も見出された。その中には従来知られている性質からは、この現象は全く予想できない例もある。それぞれの抗原ごとに平均 10 種類ほどのモノクローン抗体が既に単離されているので、その中から siRNA と同様の効果をもたらすものを選び出すことも可能かもしれない。ファージディスプレイ抗体では最初利用可能なものが scFv 型抗体であるために、一価の抗体である。抗腫瘍効果を示すには二価であることが条件となる例も予想され、その場合には IgG 型抗体への変換が必要となる。ADCC 活性についても、大量の抗原を発現した癌細胞について ADCC 活性のある抗体と無い抗体があり、それが、認識するエピトープの差なのか抗体の結合力の差の結果なのかを判定する必要がある。

ファージ抗体ライブラリーから得られた抗体にとって癌特異抗原はナীব抗原であると推定される。そのためにここで単離された抗体の多くは抗原に対して強い結合力を示さずに治療用抗体としては作り直す必要があると当初予想されていた。しかし ICOS 法が我々の期待するように”平衡反応である抗原抗体複合体形成反応を忠実に反映した結果に基づき抗体を単離している”とすれば、抗原に対して結合力の高い抗体が選択的に濃縮されていることを期待できる。今までに得られたデータは、この期待を支持するものが多い。その顕著な例が抗 EGFR 抗体である。Kd 値が 0.1nM 以下であり、ヌードマウス中で育つヒト癌組織に対して、抗体単独投与で、既に市販されているエルビタックスと同様の効果もしくはより低濃度で強い抗腫瘍効果を示す。このクローンの場合、肝癌、腎癌、膀胱癌、肺癌から全く独立に単離され、独立に癌特異抗体であると判定されていた。同様に EpCAM に対する抗体は pM オーダーの濃度ですら ADCC 活性を示し、また担癌マウス中で強力な抗腫瘍活性を示した。抗体を投与することより癌治療に役立つ例が、抗 EGFR 抗体や抗 HER2 抗体以外でもありうるとすれば、我々がすでに単離したクローンの中に含まれているに違いないと確信している。そこで次の最大の課題は、それをいかに見出して臨床試験を実施するかである。

2.4 オリゴクローナル抗体創製技術開発

1) モデル抗原 A に対する抗体の取得と評価

市販マウスと、弊社所有のヒト抗体産生マウスを 100 匹程度免疫し、抗体価が上昇したもののうち 12 匹を細胞融合に使用した。抗体を 40 個程度の抗体を取得した。マウス・ヒトキメラ抗原を用いて結合領域を分類し、29 個の抗体を選択した。

オリゴクローナル抗体作製のため、互いに競合しない clone を選抜する目的で、同一ドメイン認識抗体間の競合試験を Biacore 2000 を用いて行った。

その結果、同時に抗原 A 分子に結合できるモノクローナル抗体は、6 クローンが選抜された。この 6 クローンについて競合試験を実施したところ、6 クローンのうち、AC と AB は、結合ドメインは異なるものの、弱いながら競合することがわかった。

2) 抗原 A に対するオリゴクローナル抗体の活性評価

最初に抗原 A を中程度発現する Colo205 細胞を用いて、6 種類の抗体を単独、2 種、3 種、4 種、5 種、6 種混合した場合の ADCC 活性を調べた。それぞれの抗体単独では、ADCC 活性の強弱は観察されたが、混合する抗体の数が増えるにしたがって、ADCC 活性が上昇する傾向が見られた。Colo205 においては、3-4 個程度の抗体数で活性がほぼ飽和しており、抗体のエピトープ依存性は低いと考えられた。

一方、抗原 A を高発現している、A431 細胞を用いて、ADCC 活性を測定したところ、Colo205 の場合と異なる挙動が観察された。A431 の場合は、抗体単独と 6 つの抗体すべてを混合した場合でも、ADCC 活性に差が観察されなかった。ADCC 活性は、標的細胞に結合した抗体の Fc 領域を、NK 細胞などのエフェクター細胞が認識し、活性化することにより、細胞死を誘導する。この作用機構から類推すると、抗原が高発現している場合は、すでに過剰量の Fc が存在することにより、エフェクター細胞の活性が飽和しているためであると考えられる。したがって、抗体を混合することにより、ADCC 活性を増強する技術は、比較的発現量が低い抗原において有効であることが示唆された。A431 細胞を用いて、抗体の組み合わせによる影響を調べた。ADCC 活性とは異なり、CDC 活性は 1 個の抗体のみでは活性を検出することができなかった。しかしながら、2 つ以上の抗体を組み合わせることにより、活性を検出することができた。CDC 活性の場合、ADCC とは異なり、抗体の数が増加すれば、抗体の種類に関係なく活性が増強するというわけではなく、どの抗体を混合するかが重要であり、エピトープ依存性が示唆された。図9に示すように、AA と AD という 2 つの抗体を混合した場合、6 個の抗体を混合した場合と、ほぼ同程度の活性を示していることから、CDC 活性の場合、選抜した 2 個の抗体により最大限の効果を発揮できると考えられた。抗体 AA は強度の違いはあるが、残りの 5 個の抗体のうち、4 個の抗体と組み合わせることにより、CDC 活性が検出できる程度に増強することができている。一方、AA との組み合わせで最大の効果を生み出す、AD 抗体も 4 個の抗体との組み合わせで増強効果を確認できている。AB, AC, AE は、AA, AD 以外の抗体との組み合わせでは CDC 活性は観察されない。また、AF は AA, AD の両方の抗体との組み合わせにおいても、CDC 活性が観察されていない。これらのことから、CDC 活性増強のため抗体を混合する場合は、抗体のそれぞれの特性が寄与することが分かった。

3) 結晶構造解析によるオリゴクローナル抗体活性増強機構の解明

オリゴクローナル抗体を構成する各抗体由来 Fab の結晶構造解析

PEG を沈殿剤とした条件で結晶を取得することができた。得られた結晶を用いて、X 線回折データを収集し、引き続き分子置換法による位相決定と精密化により結晶構造解析を実施した。

Fab/抗原 A 複合体の結晶化

	<p>Fabと抗原Aとの複合体の構造解析に向けた結晶作製においては、大きく分けて2つアプローチをとった。一つは、①: 抗原A全長に対して1分子あるいは複数のFabを結合させた複合体の結晶化実験、もう一つは、②: ドメイン分割した抗原Aに対し1分子のFabを結合させた複合体の結晶化実験である。①の方法からは、Fab間の相対配置やFabが結合したときの抗原A全体構造を直接得られるが、結晶化の難易度は高い。一方、②の方法は、分子が小さくなるため結晶を取得できる可能性が高まると考えられるが、各1:1構造データ取得後に、抗原A全体構造構築のためのモデリングが必要になる。</p> <p>①抗原Aに対して1分子あるいは複数のFabを結合させた複合体の結晶化実験 結晶化スクリーニングの結果、1:1および1:1複合体については、数条件において結晶を取得し、X線回折実験をしたが、いずれも立体構造解析に十分な回折データ収集するには至らなかった。</p> <p>②については、マウス/ヒトキメラ抗体由来Fabとドメイン分割した抗原Aとの複合体の結晶化を試みた。エピトープ解析の結果に基づき、Fabとドメイン分割した抗原Aを混合し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによってその結合を確認した。</p> <p>以上の点から、オリゴクローナル抗体による細胞障害活性の増大機構について、次のように考察した。オリゴクローナル抗体におけるCDC活性上昇には、(1)抗体の結合方向(FcのC末端が細胞膜から見て上を向いている)、(2)1つの抗原に対して相対的に離れたエピトープを認識する抗体の組み合わせが効果的であること、(3)オリゴクローナル抗体が同一の抗原に対して生成されているのであれば、作用する抗原Aの細胞外ドメインの構造は活性型であると考えられる。</p> <p>他抗原への応用の可能性 市販マウスを20匹程度免疫し、抗体価が上昇したもののうち数匹を細胞融合に使用した。抗抗原E抗体については、1クローンのみ取得できた。抗原Fについては、3クローン取得できた。CDC活性の評価のため、可変領域をクローニングし、キメラ抗体を発現・精製し、活性の評価を行った。抗抗原E、F抗体についても、単独ではCDC活性を発揮しなかったものの、抗抗原E抗体と抗抗原F抗体を混合することにより、CDC活性を検出することができるようになった。</p> <table border="1" data-bbox="501 1032 1415 1193"> <tr> <td>投稿論文</td> <td>「査読付き」288件、「学会発表」333件、「総説」23件</td> </tr> <tr> <td>特許</td> <td>「出願済」51件</td> </tr> <tr> <td>その他の外部発表 (プレス発表等)</td> <td>プレス発表45件</td> </tr> </table>	投稿論文	「査読付き」288件、「学会発表」333件、「総説」23件	特許	「出願済」51件	その他の外部発表 (プレス発表等)	プレス発表45件
投稿論文	「査読付き」288件、「学会発表」333件、「総説」23件						
特許	「出願済」51件						
その他の外部発表 (プレス発表等)	プレス発表45件						
IV. 実用化の見通しについて	<p>1. 実用化の見通し</p> <p>1.1 系統的な高特異性抗体創製技術</p> <p>既に実用化されているものとしてはヒトゲノム上の48種の全ての核内受容体抗体を作製し、そのうち24種は免疫染色可能である。その中から、診断薬が認可され臨床応用され厚生省の認可をうけ診断薬として市販されている(平成18年から)、核内受容体研究用抗体は世界のスタンダード化し、市販額だけで年間5000万円となっている。</p> <p>実用化の見通しとしては下記のことが考えられる。</p> <p>治療薬として肝臓がん治療薬、グリピカン3がヒト型化されP1臨床試験を終了し、P2臨床試験に入っている。肺がん治療薬として抗CDH3抗体、膵がん治療薬としてAMIGO2抗体がそれぞれ前臨床試験に向け製造段階あるいは候補抗体絞込みに入っている。実用化候補として、γセクレターゼ阻害抗体、HIV感染阻害抗体を取得した。肝がんおよび扁平上皮がんのターゲットとしてのROBO1抗体を取得して、放射線治療およびイメージング試薬としてPETIによる肝臓がんイメージングの動物実験に成功した。さらにscFv化とプレターゲッティングへの分子デザインを最先端プロジェクトに移行して継続しており、4年後の前臨床試験に向けて開発中である。リボゾーマルディスプレイによる改変抗体のエピトープマッピング技術や膜タンパク質合成技術を開発し、2年後のキット発売を予定している。診断試薬は新規炎症マーカーのPTX3について大規模な臨床サンプルで炎症性疾患マーカーとしての有用性検定に入っている。同様に、パーキンソン病診断薬としてのDJ-1および白血病治療マーカーとしての抗体が検定に入っている。その他、これまでに難治性疾患に関わるタンパク質に対する抗体が種々得られており、数年後に疾患マーカーとして診断および研究試薬として実用化されると考えられる。また抗体を用いる複合体プロテオミクス解析技術を確認し、細胞の分化および癌化に関与するヒストンの修飾因子に対する抗体や転写因子およびコファクター等の抗体が、新規創薬ターゲット探索に強力なツールを提供するものであることが明らかになった。今後世界的な規模で進むと考えられる高速シーケンサーを用いるゲノムワイドの治療ターゲット探索や新規バイオマーカーの探索にも重要であると期待される。また同技術は、前身プロジェクトのチップ技術開発の延長にあ</p>						

り、高感度診断法としての分子標的医薬のコンパニオン血清診断を可能とするもので、実用化に向け開発を行っている。

免疫寛容を破る、制御性 T 細胞除去モデルマウスあるいは欠損マウスを作製し、自己抗原に対する抗体作製または自己免疫疾患のモデル動物として使用可能であることが明らかになった。細胞障害機能をあげるため、タンデム Fc 型融合タンパク質を開発し、既存の Fc 融合タンパク質に対する優位性を明らかにし、実用化に向けて企業との共同研究を進めていく。

循環器系疾患の治療用シーズ抗体に関して、ApoB、LOX1 他2種のニワトリ抗体を1～2年で研究用試薬としてキット販売を予定している。また、LOX1、インテグリン抗体について前臨床試験実施を予定している。ADLib システムによるがん特異的抗原に対する抗体をがん研究会で評価し2年後の臨床試験を目指して開発している。

1. 2 高効率な抗体分離精製技術

実用化を強く意識し、研究開発成果の知的財産権の確保、およびその技術移転を積極的に進めてきた。この目的で、種々の業種の企業等からの要望・期待・実情を集約し、研究開発のベクトルをより現実性の高い方向に修正することなどを目的のひとつとした「バイオロジカルズ(タンパク医薬)製造技術研究会」を、JBA と産業技術総合研究所との協力で開催し、当該分野の連携を深めることで、実用化、実用化に向けた取り組みを積極的に進めてきた。以下に、現時点で進行している技術移転の概要を記す。

本プロジェクトの成果として、既存品に比べて性能的に優れており、競争力の高いアフィニティリガンド及びアフィニティ担体の開発に成功したが、それらアフィニティリガンド、アフィニティリガンドの配向制御固定化方法、およびアフィニティ担体に関する特許群(産業技術総合研究所保有)に関しては、タンパク質製造を業とする企業及びクロマトカラムなどの実用化を希望する企業5社とライセンス契約を締結した。現在、ライセンスを受けた企業において市場への供給が準備されつつある。特に、抗体医薬品開発・製造目的に本技術が使用されるためには、cGMP 準拠でアフィニティリガンド及びアフィニティ担体の製造が必要であるが、すでに、cGMP 適合製造施設を有している企業にもライセンスが付与されており、実用化・製品化の実現が近い。

アフィニティリガンド開発のハイスループット化を目指したタンパク質アレイ基板技術に関しては、基本特許(産業技術総合研究所保有)のライセンスを受けた企業において、その技術を元にしたアレイ検出機器等の開発が進んでおり、今後製品化が期待される。

シリカモノリスを利用したアフィニティ新素材については、スピカラムとして、製品化された。この製品は、研究開発向けの簡易抗体精製に便利であるが、そのような利用だけでなく、今後、製造プロセス分析、培養細胞開発、臨床検査用キット開発等幅広い利用が考えられ、このような利用開発がすすめられている。

小さいカラムを並列に設置し、大量の試料を連続的に処理・精製できる連続精製装置については、平成 22 年度戦略的基盤技術高度化支援事業において、3 社の中小企業の連携で製品化を目指した研究開発が行われており、平成 23 年度内の上市が期待される。

本プロジェクトで開発した 24 種類の人もしくは人型化モノクローナル抗体を用いた精製技術実証の結果得られた精製抗体の性能モニタリング活動により、抗体開発技術及び抗体精製技術に関して、医薬品製造企業への成果普及活動を行った結果、成果利用に関する問い合わせがあり、連携が進んでいる。

1. 3 ICOS 法を用いた癌治療用ヒト抗体単離技術開発

本プロジェクトは、癌治療用ヒトモノクローナル抗体を開発することを目指しており、我々が単離した多くのヒトモノクローナル抗体の中から、具体的に薬が作られ医療現場に出回ることがなければ、プロジェクトが成功したとは考えない。そこで、どのような問題が存在し、どのように解決しようとしているかを報告する。1997年の非ホジキン型リンパ腫に対する抗 CD20抗体であるリツキサンの FDA による認可、および翌年の乳癌に対する抗 HER2 抗体であるハーセプチンの認可は、製薬業界にきわめて大きなインパクトを与えた。1975年 Keller と Milstein による細胞融合法を用いたモノクローナル抗体作製法の開発により、その直後から癌に対するモノクローナル抗体を治療薬とする“ミサイル療法”の可能性が叫ばれ始め、癌治療抗体開発競争が世界中で起こった。その後約 20 年間にわたる研究の歴史は、“ジェットコースター”に例えられる期待に基づく昂揚感と挫折の繰り返しであった。この間、マウスモノクローナル抗体をヒト・マウスキメラ抗体に変換する技術開発、CDR 部分のみをマウス由来とするヒト化抗体とする技術、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスの開発及びファージディスプレイ技術によるヒト抗体ライブラリー技術の開発で完全ヒト抗体の作製も可能となり、遺伝子操作による抗体の改編はほぼ完成の域に到達した。しかし2006年のベクテビックスを最後に、ここ数年間新しい癌治療用抗体の認可が止まっている。更によく見れば、癌特異抗原に結合する抗体で成功しているのは、EGFR と HER2 だけであるのが実態である。その抗 EGFR 抗体についても、エルビタックスとベ

クチビックスの成功例以外にも強力な数グループが独立して開発に取り組んでいるにもかかわらず認可まで到達していない。抗 HER2 抗体についても、ハーセプチンの開発に成功した Genentech 自身がハーセプチンとは作用が異なると期待される抗体を薬として開発中だが未だ成功していない。それ以外の世界中で異なる数グループが独立して取り組んでいる標的について、たとえば抗 EpCAM 抗体の場合、1995 年に一度認可されたが、そののち開発企業自身が販売を取り消した。しかし我々自身も経験しているが、EpCAM の癌での発現は極めて impressive なほど強烈であり、また抗体が示す ADCC 活性が極めて強いために、未だに数グループが開発をあきらめずに取り組んでいる。MUC1, CEA, PSMA などの癌抗原は診断マーカーとして実用化しており、様々な形で抗体治療薬の標的となっている。

我々はエルビタックスやベクテビックスは抗腫瘍効果を示さないが我々の抗体が強い抗腫瘍効果を示す例に数多く遭遇している。このことは実際のヒト癌患者の中に、この観察を生かせる対象がいることを示しているのか、そのことをどのようにして臨床試験の初期段階で知ることが可能か。実施されている臨床試験の報告を読むと、結局課題は、次の二点に集約される。課題 1. 副作用の強さと抗腫瘍効果の強さの兼ね合いで、後者が強いものは前者も強く、前者が許容範囲のものは後者も十分でない。このジレンマをいかに突破するかである。課題 2. フェーズ 3 まで到達した例でも、抗腫瘍効果がある患者とない患者の相違を生み出す原因が定かでない段階で、対象となる数多くの患者をランダム化して二群にわけ、現在行われている最も優れた治療法と比較して、延命効果(平均生存日数)の点で著しく改善した結果が得られるかという評価基準から見て良好な成績を得られない。もし抗腫瘍効果が期待できる患者の選別法が分かっている(薬使用に関する rationale が確立している)なら、そのような患者を対象とする臨床試験実施が可能となり、成績もずっと良くなるはずである。腫瘍効果の有無を作り出している背景にある真の原因の探索を地道に続けることが、臨床試験の成功率を高める近道と考えている。

1.4 オリゴクローナル抗体創製技術開発

抗 EGFR モノクローナル抗体を 2 種類混合することによって CDC 活性が誘導されることは以前から知られていたが、本研究によって CDC 活性を効率的に誘導するためのエピトープが解明された。また、EGFR をターゲットとした抗体医薬において、アゴニスト抗体によるリン酸化シグナルは細胞増殖を引き起こす危険性が大きく、オリゴクローナル抗体の作製には不適であると考えるのが一般的であるが、本研究によってアゴニスト抗体による EGFR リン酸化を完全に抑制できるアンタゴニスト抗体が取得され、さらにその認識部位が解明された。即ち、これら 3 種類のモノクローナル抗体を組み合わせることによって、抗腫瘍活性の効率的誘導と増殖促進抑制能を併せ持つ、抗 EGFR オリゴクローナル抗体の作製が可能になると考えられる。さらに、これら 3 種類のモノクローナル抗体に ADCC 活性増強技術を組み合わせることによって、既存の抗体医薬品を越える抗腫瘍効果を発揮する新たなオリゴクローナル抗体医薬品として期待できるのではないかと考えられる。以上のオリゴクローナル抗体の結果より、より多くのエピトープを認識する抗体を含むと思われるマウスポリクローナル抗体においても同様の活性を期待したが、明確な活性は認められなかった。即ち、ポリクロには 153 のようなアゴニスト抗体も、695 のようなリン酸化阻害抗体も含まれていると思われるが、活性を評価するために十分な抗体価に達していないなど、lot による活性の差があると思われる。本研究で見出された EGFR をターゲットとしたオリゴクローナル抗体の知見は、ポリクローナル抗体においても応用が可能であると考えられる。即ち、ポリクローナル抗体においても、これら 3 種類のエピトープを認識する抗体が確実に含まれていることが重要であり、そのためにこれらのエピトープ認識抗体の抗体価が上昇しやすいような抗原による免疫の工夫が必要であると考えられる。

オリゴクローナル抗体を作製するにあたり、副作用の危険性や製造コストの側面から、最大の抗腫瘍活性を有するための過不足ないモノクローナル抗体を選抜することが重要である。そのために不可欠なのは、ターゲット分子に対してなるべく多くの種類のモノクローナル抗体を取得・解析することである。本研究においても、上記のような抗体の組み合わせの知見が得られた最大の要因は、最初のステップであるモノクローナル抗体のパネルの作製にあった。EGFR 細胞表面をほぼ網羅できるだけのモノクローナル抗体が取得でき、個々のモノクローナル抗体の認識部位が解析できた。現時点で、これら 3 種類の抗体と hEGFR との結晶構造解析は解かれていないが、構造が解かれれば活性強化のメカニズム解明の足掛かりになるのではないかと期待される。今後、他の ErbB family をはじめとする RTK などについても同様の解析が行われ、情報が蓄積されていけば、ターゲット分子の立体構造情報や発現パターンなどを基に、バイオインフォマティクスによってオリゴクローナル抗体に最適な抗体の数や組み合わせが予測できるようになり、将来的にはピンポイントでモノクローナル抗体を取得できるようになるように期待する。

2. 実用化までのシナリオ

2.1 系統的な高特異性抗体創製技術

肺がん治療薬として抗 CDH3抗体が24年度前臨床試験入りを計画し、製造段階(1年程度)に入っている。また膵がん治療薬として AMIGO 2 抗体が25年度前臨床試験入りを計画している。それぞれ、1年後程度に P1 臨床試験、その1年後に P2 臨床試験にはいる予定である。その他、実用化候補として、 γ セクレターゼ阻害抗体、HIV 感染阻害抗体については導出も含め実用化への検討を行う。肝がんおよび扁平上皮がんのターゲットの ROBO1 抗体は、現在 FIRST プログラムでコンピュータデザインを行っており、scFv 改変とプレターゲット技術の開発により、4年後の診断用および治療用抗体医薬として前臨床試験を予定している。

新 PURE システムを今年度夏にキット発売予定であり、リボゾーマルディスプレイによるエピトープマッピングおよび膜タンパク質合成について2年後キット発売を予定している。診断試薬は新規炎症マーカーの PTX3 について大規模な臨床サンプルで炎症性疾患マーカーとしての有用性検定に入っている。パーキンソン病診断薬としての DJ-1 に対する抗体が検定に入っている。DJ-1 抗体はマイケルフォックス財団の研究課題に選定されており、抗体の性能の検定後製品化する見込みである。その他、これまでに難治性疾患に関わるタンパク質に対する抗体が種々得られており、数年後に疾患マーカーとして、診断および研究試薬として実用化されると期待される。現在、本プロジェクトにおいて直近の製品化のメドのない抗体クローンについては、公的細胞バンクに寄託し、研究および医薬開発に広く公共に提供できるようにした。

抗体を用いる複合体プロテオミクス解析技術と並行して、抗体磁気ビーズの性能を高め、高感度検出が可能となった。抗体医薬の適応や治療効果を検査するためのコンパニオン血清診断を可能とするもので、数年後に実用化される見込みである。制御性 T 細胞除去モデルマウスあるいは欠損マウスを作製し、自己抗原に対する抗体作製または自己免疫疾患のモデル動物として使用可能である。

ApoB ニワトリモノクローナル抗体については、本年度研究用試薬として販売予定であり、酸化 LDL 検出抗体としてキット製造予定である。LOX1 抗体は本年国外製薬企業にサンプル提供し、前臨床試験前段階の ex vivo 実験実施予定。また、国内製薬企業でも前臨床実験実施予定である。抗インテグリン抗体については、国内製薬企業にサンプル提供を行った。

2.2 高効率な抗体分離精製技術

精製を含む製造技術の実用化における大きな障壁の一つに、技術ユーザー側の保守性があげられる。近年製造者責任が厳しくなってきたことから、この傾向は顕著になってきていると考えられる。また、医薬品の特徴として、一度認可を受けた製造方法を変更することは大変な労力とコストが必要であることがあげられる。従って、実用化までのシナリオ構築においては、ユーザー側の保守性を打破して、新規技術の導入を歓迎する素地を如何に作るか？という観点での検討が必要である。すなわち、「優秀な技術が必ずしも利用されるとは限らない」、という現実があることをまず理解する必要がある。

実用化までのシナリオの前提としては、本プロジェクトで開発した各技術それらを集積化した成果物は、真に、従来の物に比べて優れているということである。特に、アフィニティ担体としては、動的結合容量、処理速度(接触時間)、温和な溶出において、他の追従を許さない性能が発揮できる。一方、唯一、アフィニティ担体のアルカリ耐性についてのみ、従来品に一步及ばない可能性がある。

ユーザー側の保守性を打破する事柄としては、性能が優れていることに加えて、コストメリットと使い勝手、それに、安心感が大きなファクターである。

コストメリットに関しては、アフィニティ担体のうち大きな割合を占めるリガンドタンパク質の製造コストがあげられる。リガンドタンパク質の製造については、本技術をライセンスしている企業において、独自に製造工程の見直しを行うとともに、本技術の特徴であるリガンドタンパク質がタグタンパク質であることから、タグ精製のコストダウンについて検討を行っており、1から2年後には、現在の製造コストの数分の1(目標5分の1)にまでコストを下げるができるものと考えられる。このことにより、担体そのものの提供価格を大幅に引き下げることにより、本技術を使用することによるコストメリットが達成されるものと期待される。一方、よりコストを引き下げするためには、高価なアフィニティ担体の使用量を減らすことが考えられる。この観点では、本プロジェクトの成果である、並列カラムを用いた連続精製装置を組み込むことにより、使用担体量を数分の1以下に減らすことが可能となる。連続精製装置については、平成 23 年度に上市される見込みが高いため、上記アフィニティ担体の製造コストの引き下げ効果と合わせて、大幅な製造コストの低下が、ここ1から2年で実現できることになる。

ユーザーの使い勝手については、プレパックカラムとシングルユーステクノロジーの開

発を行い、製造現場における洗浄バリデーションの苦労を少なくするという観点でのメリットを実現することを計画している。カラムコストの引き下げと連続精製プロセスの実現により、従来の製造コストを引き下げながら、精製のシングルユーステクノロジーの実現は可能であり、本技術をライセンスしている企業を中心に、数年以内にその実現を目指している。

安心感については、ライセンスしている企業にcGMP 製造に実績がある企業があることから、医薬品製造に適用可能な製品を随時提供できる環境が整っており、この点での実用化を早期に行うことができるものと期待される。

本プロジェクトの成果は、小スケールから巨大スケールまで適用可能であるが、今すぐ現在稼働中の製造プロセスに組み込まれることは、製造承認変更の観点で困難であると考えられることから、小スケール精製についての各種デバイスを商品化し、抗体開発の現場においての活用を目指す。この観点で、すでに、96 穴タイプの並列カラム等の開発がおこなわれており、試供品としての提供が行われている。抗体開発段階での利用から開始して、大スケールの製造工程にまで至るには、5 年ないし 10 年ぐらいの時を要することから、本成果の本格的な実用化は、5 年ないし 10 年後ということになる。この間、各種製造スケールに対応した製品及びその使用法(いわゆる使用コンテンツ)開発をこまめに行うことが重要であると考えられる。

2.3 ICOS 法を用いた癌治療用ヒト抗体単離技術開発

本プロジェクトの最終年度である平成 22 年度には産総研巖倉博士のグループと我々が協力して表 3 に示す 20 種類の抗体を大量調製/精製し、それを希望する国内の製薬メーカーに 1mg ずつ配布し、活性等のモニタリングをお願いする企画を実施した。この企画に答えた企業が、ここで記述した我々の持つ抗体の可能性について追認し、創薬への高い成功確率を確信する例が生まれることを期待している。我々自身は次のように研究を進める。

(i)すでに単離した抗体を対象にハイスループットに行なっている方針は、1. ヌードマウス中で、抗腫瘍活性を示す細胞株とモノクローン抗体の組み合わせの探索(臨床試験開始に必要な最低限の条件)、及び 2. 担癌モデルマウス中での癌集積性の検討(集積性の高いクローンについては、IgG1 以外で癌細胞を殺す方針も検討する)。

(ii)すでに治療用抗体が開発されている例、とりわけ抗 EGFR 抗体について、市販されている抗体との差別化をはかるため、エピトープの同定(これについては、抗原抗体複合体の結晶解析がベスト)及び担癌マウス中での抗腫瘍効果について新規性のある組み合わせの例を探索している。

(iii)CD44 を代表例として、分子としては同じ抗原を認識するが、結合するエピトープは相互に大きく異なるクローンが見出されており、その中で特定のクローンが癌特異的染色像を与える。これは癌特異抗原について、新しい概念を提起しており、このような例についてその実体を明らかにすることが重要と考えている。

(iv)本研究で対象としている肝癌、及び肺癌についてはほとんど全ての症例で血液も保存されている。そこで、発現している癌特異抗原の種類と血液中に含まれる成分更には DNA に導入された変異との間の規則性を見出すハイスループットな解析を開始した。

(v)我々が単離した多くの抗体の中で癌特異的染色像を与える抗体が認識する抗原の同定については、容易でないもののみが未同定のまま残っており、その標的抗原についても更に新しい方法を開発して同定を進める。

以上のような研究の展開の中から、臨床現場にまで到達する抗体を作り出すべく今後も努力を続ける。

2.4 オリゴクローナル抗体創製技術開発

弊社内で検討を行い、医薬品としての可能性を検証する。

V. 評価に関する事項	評価履歴	平成 20 年度 中間評価実施
	評価予定	平成 23 年度 事後評価実施予定
VI. 基本計画に関する事項	作成時期	平成 18 年 1 月制定
	変更履歴	平成 20 年 3 月改訂。プロジェクトリーダー名の記載

用語集プロジェクト用語集

用語	用語の解説
ICOS 法	(Isolation of antigen-antibody Complexes through Organic Solvent) 疾病(とりわけ固形癌)に関連する抗原に対し、特異的に結合する人工ヒト抗体を単離する技術。抗原-抗体結合複合体が有機相に、非結合体が水相に分配されることを利用する方法。従来の組織染色法に比べ、多様な抗体の取得が可能。
GFC法	(Grouping of clones by FlowCytometry) 抗体ライブラリーに含まれる抗体を、同じエピトープを認識すると考えられる抗体ごとにグルーピングする新しい技術。性質の異なる複数の細胞株に対するフローサイトメトリーのパターンを比較する方法。
SITE法	(Simultaneous Identification of antigens by Three-dimensional ELISA) 抗体ライブラリーに含まれる抗体の中から、特定の抗原と結合できる抗体全てを網羅的に選択する新しい技術。数が多く全ての抗体との総当たり結合実験が困難な場合に、あらかじめ3次元でアドレッシングしておいた抗体の混合物に対する少数回の結合実験で代替できる方法。
ADCC	(antibody-dependent cellular cytotoxicity) ヒトが持っている免疫機能のひとつ。ナチュラルキラー細胞や単球などの白血球が抗体を介して癌細胞などの標的細胞を殺傷する活性のこと。
CDC	(Complement-Dependent Cytotoxicity) 補体を介して標的細胞を殺傷する活性のこと。(補体: 多細胞生物が異物に対し生体を守るため獲得した防御機構。抗原と抗体との複合体や病原微生物に結合すると活性化し、抗体の働きを補助したり、貪食細胞による捕食促進作用や溶菌作用を示す)
ファージディスプレイ	ファージとは微生物を宿主とするウィルスのことで、抗体など目的とする蛋白質の遺伝子をファージの蛋白質と融合させることで、ファージの表面に目的蛋白質を発現させることができます。このようにすることで、ファージ表面に目的蛋白質を“提示”し、内部にその目的蛋白質の遺伝子情報を有した、蛋白質-遺伝子一対のシステムが可能となります
免疫寛容	免疫寛容(めんえきかんよう、immune tolerance)とは、特定抗原に対する特異的免疫反応の欠如あるいは抑制状態のことを示し、自己体組織成分に対する免疫無反応性はこれに由来する。
バキュロウイルス	バキュロウイルスは昆虫など節足動物に感染するウイルスである。ウイルスゲノム中に目的蛋白質遺伝子を挿入し、Sf9昆虫細胞に感染させると、昆虫細胞により、目的蛋白質が大量に産生される。
ノックアウトマウス	一部の遺伝子を破壊(ノックアウト)した実験用マウスのこと。
PET	ポジトロン断層撮影検査
分子イメージング	生体内での分子プロセスの可視化に関する基礎的・臨床的研究、および開発された可視化手法を利用する応用研究およびそれらの方法の総称。新しいイメージング技術によって生命体を明らかにしていこうとするものである。
ジーンチップ	アフィメトリクス社が開発したDNAチップは『ジーンチップ』と呼ばれ、DNAチップ業界のデファクトスタンダードを確立している。
エクソンアレイ	エクソンアレイは、実験的に確認されている転写配列と予測される転写配列を含む極めて包括的なゲノムのカバーを提供するものであり、これまで未確認であった新たな現象の発見をも可能とします。
制御性T細胞	内在性CD25+CD4+ 制御性T細胞は、胸腺で産生され、試験管内での抗原刺激に対して、自らは低反応であり、他のT細胞の増殖を抑制する。
Pax5	PAX5遺伝子は《転写因子》のpaired box(PAX)《ファミリー》に属する。この《遺伝子族》の中心の特徴は、paired boxとして知られている、新しく、高度に保存されたDNA結合モチーフである。PAXタンパク質は発生初期における重要な調節因子で、それらの遺伝子《発現》における変調が《異常増殖形質転換》の原因となると考えられる。PAX5遺伝子は《B細胞》《分化》初期段階で発現されるB細胞系列特異的《活性化タンパク質》(BSAP)を指令するが、これは後期段階では発現されない。

diabody	diabodyはリンパ球と癌細胞を一分子で同時に認識する人工抗体であり、低分子であるがゆえに、ヒトに対する副作用が弱い(低免疫原性といいます)、腫瘍への浸潤性の向上などが期待されます。
ヒト化抗体	抗体を遺伝子操作で人のものに近い形にしたもの。副作用の少ない治療薬、効果的な免疫抑制剤などとして期待を集めている。
proteinA	天然型プロテインAは黄色ブドウ球菌(S.aureus)細胞壁由来の1本鎖のポリペプチドで、数種のIgG抗体のFc部位を介して分子内の4つの結合サイトで特異的に結合します。熱に耐性があり、4M尿素や6Mグアニジン塩酸塩に曝された後でもネイティブな立体構造を維持することが出来ます。
PAT	(Process Analysis Technology: 工程分析技術) 医薬業界において製品の品質保証・工程管理に関わる技術。製造工程においてリアルタイムモニタリング、分析および管理を通してプロセス性能および品質を最適化することを可能にする。
QbD	(Quality by Design) 医薬品の品質保証について、品質は製品になってから検証するのではなく、目的の品質のものが製造されるように製造プロセスから目的のものが製造されるように保証すべきであらうという考え方。
DNA免疫	通常の抗体作製はペプチドや精製されたタンパク質を用いて動物に免疫して作製しますが、DNA免疫は目的タンパク質の遺伝子を発現ベクターの形で動物に導入して動物の体内で発現した目的タンパク質に対する抗体を回収する技術です。
GPCR	(G-protein coupled receptor) G蛋白質共役型受容体
アジュバント	抗原(ワクチン)の免疫原性を高める目的で抗原と共に生体に投与される試薬のことである。免疫賦活剤、あるいは免疫増強剤の一種とも考えられる。作用機構は様々で不明なものも多いが、抗原の投与局所への貯留性を高めるエマルジョンや沈降物を形成するものが多く、それらは抗原と免疫細胞が接触する機会を増やすことで、免疫増強作用を発揮する。

I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性

1.1 NEDOが関与することの意義

抗体医薬は従来の医薬品と比較すると、生体防御反応を利用していることから治療効果が高く、また標的分子が特定されるため副作用が低い傾向にある。このため、創薬においても市場においても抗体医薬は主流になろうとしている。世界中で抗体医薬の開発競争が起こっており、約 20 品目の上市が行われている(2006 年 9 月)。しかし日本発の抗体医薬上市品は少なく、このままでは欧米のビッグファーマが市場を席卷する可能性があり、我が国の医薬品産業にとって大きな脅威である。抗体医薬を開発するには大きく 2 つの課題が存在する。1つは抗体自体に関することであり、エビデンスが豊富で創薬の可能性が高い抗原が枯渇気味のためその探索を行わなければならないこと、さらに細胞膜表面に主として存在する候補抗原が見つかったとしても、その膜タンパク質(抗原)の形状を保ちつつ大量発現させることや、その免疫が困難であることである。2つめは製造コストの高いことであり、その製造コストは30%に達するとも言われる。抗体医薬は低分子医薬と比較し数百倍の投与量が必要なため、このままでは奏功が期待される患者全員に投与することが困難な状況となる。

今後の抗体医薬分野において、我が国が世界のビッグファーマと戦うためには、これらの技術課題を克服し強固な基盤技術確立すると共に、それらを保護する特許権等の知的財産権を保有することが重要である。しかしリード抗体の創出から工業生産までの幅広い技術確立する必要があり、企業単独、あるいは企業連合のみで研究開発を進めることは非常に困難であると考えられる。特にがんなどの疾患をもつ方々から同意を得て血液や組織のサンプルを提供いただく必要があることから、製薬企業単独で研究を進めることには困難が伴い、幅広く大学病院、専門病院等との連携が不可避である。また創出した新機能抗体について、医療品に駒を進めるためには、厚生労働省プロジェクトとの連携も必要となる。このため、国が主導して産官学の英知を結集して集約的に研究を進めることが望ましい。EU では既に抗体の製造技術の開発等を国が推進しており、我が国でも主体的な関与が必要である。そこで、NEDOが関与し産学官をまたぐプロジェクトとして、抗体医薬創出に関連する技術を持つ機関を集めて本プロジェクトを実施することには大きな意義がある。このような認識のもと、本プロジェクトにおいては、複数の手法を組み合わせることにより抗体医薬候補となる大量の新機能抗体を取得し、それらの中から有望な物を選択し医薬品化を検討すると共に、その抗体の生産コストを下げるといふ国家的課題のための技術開発を行うこととした。

1.2 実施の効果(費用対効果)

本プロジェクトでは、高アフィニティー抗体と機能抗体の組み合わせによる新機能抗体システムや小分子抗体の開発を中心に据えている。これらの技術により、高確率で効果を発揮する抗体を取得することが期待される。また少量で効果を現すことや、小分子抗体を大腸菌で生産することが期待され、本基盤技術がトータルのコスト低減効果に寄与する可能性が高い。さらに、オリゴクロー

ナル抗体やファージ抗体についても並行して研究開発することにより、候補抗体の取得確率を上げるとともに、それ自身が高い傷害活性を持つ抗体の取得も期待される。

一方、抗体を発現する動物細胞の培養液から医薬用抗体を精製する過程において、最も高価な工程はアフィニティー精製である。抗体ごとに個性があるため、本プロジェクトでは精製効率を上げるために各々の抗体に適した精製用カラムを短期間で作製するとともに、溶出条件を最適化する方法を開発する。次いで品質上の問題でコストを押し上げる原因となっている、抗体のアグリゲーションに対する技術にも取り組む。これらの基盤技術によりダウンストリーム工程のコストを数分の1に下げることができると期待される。

創薬研究開発には時間を要する。前身プロジェクトの「タンパク質相互作用解析ナノバイオチッププロジェクト」から開発を進めてきた複数の取得抗体について、診断薬として臨床入り認可、あるいは治験に入る物が出てきている。本プロジェクトにおいても、すでに多数の候補抗体の作製に成功しており、また多くのファージ抗体からのアプローチも進んでおり、今後の新薬が誕生する可能性が高いと考えられる。またここで開発する新機能抗体創出のための基盤技術は、我が国が世界に対し大きなアドバンテージを持ちうると期待している。例えば肝癌治療用抗体の製品化では、年間100億円を越える市場が予想される中であって、費用対効果は大変大きいと期待され、抗体医薬の製造コスト減までも視野に入れた計画により、費用対効果を上げている。

2. 事業の背景・目的・位置付け

2.1 事業の背景と目的

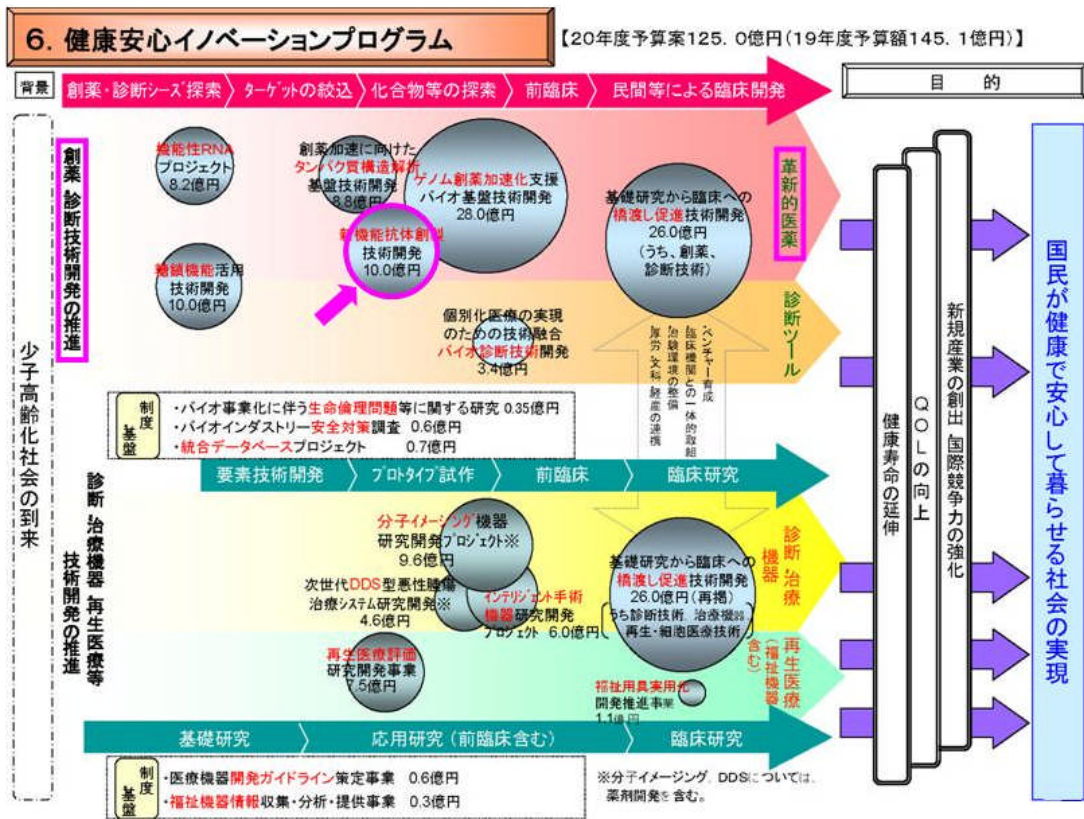
近年、抗体はポストゲノム研究に重要であるとともに、創薬や診断等への応用が期待されることから、幅広い産業利用が期待されるため、極めて重要なものとなっており、世界的にも研究競争が激化している。しかし、産業上有用と考えられるタンパク質やその複合体を特異的に認識する抗体を創製する際、抗原の産生が困難なことや、抗体の創製が免疫寛容等により困難であることが技術課題となっている。このため、こうした課題に対応し、創薬上重要なタンパク質やその複合体等の機能を有した抗原を系統的に産生する技術や、様々な膜タンパク質等を抗原として特異性が高く、機能性の高い抗体を創製する技術の革新が必要である。また、抗体の産業利用を促進するには、その高い製造コストが大きな課題となっていることから、抗体創製の基盤技術の開発に加えて、ダウンストリームにあたる抗体製造プロセスにおける技術革新も同時に必要となる。具体的には、抗体の製造コストの低減を図るべく、抗体の分離・精製技術について高純度精製化、高機能化、低コスト化の技術革新が必要である。これらの技術革新により抗体を活用した研究や創薬、診断を加速し、ポストゲノム研究の産業化を促進することが重要である。

そこで、本研究開発は、創薬等のポストゲノム研究の産業化において重要と考えられるタンパク質やその複合体等について、タンパク質を抗原として特異性の高い抗体を系統的に創製するための抗原産生技術、抗原提示増強や免疫寛容回避等の基盤技術の開発及び抗体の分離・精製を効率化するための技術を開発することを目的とする。

2.2 政策の位置づけ

今後、世界に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題である。具体的には、個の医療を通じて健康寿命の延伸、QOL(Quality of Life:生活の質)の向上を図ることが求められている。

本研究開発は、この目的を達成するため、創薬に資する基盤技術の開発、再生医療の確立、医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の提供を実現するほか、関連産業の競争力強化・ベンチャー企業の創出を図るための「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施されるものである。「健康安心イノベーションプログラム」において、「創薬・診断技術開発」の推進における「革新的医薬品の創出」を目指すプロジェクトに位置づけられている。



II. 研究開発のマネジメントについて

1. 事業の目標

1.1 事業の全体目標

・最終目標(平成22年度末)

産業利用上重要なタンパク質やその複合体等を特異的に認識できる抗体を系統的に創製するための技術を開発し、産業上有用なタンパク質を生体内における機能を有した状態で500程度産生する。さらに、これを抗原として産業上有用な機能を有する抗体を50程度取得することで、技術の有用性を評価する。また、抗体の製造コスト低減に向けた抗体の分離・精製等を高効率に行う技術を開発し、既存の Protein A クロマト担体の適用が困難な抗体(回収率 50%以下)の抗体回収率を70%以上に向上する技術を開発する。

・中間目標(平成20年度末)

産業利用上有用なタンパク質やその複合体等を特異的に認識できる抗体を系統的に創製する基盤技術として、系統的な抗原の産生技術、高特異性抗体を創製する技術、抗体の機能向上の基盤技術を構築する。これらの技術を用いて、産業上有用なタンパク質を生体内における機能を有した状態で250程度産生し、これを抗原として産業上有用な機能を有する抗体を25程度取得する。また、抗体の製造コスト低減に向けた分離・精製等を効率的に行うための基盤技術を開発し、既存の Protein A クロマト担体の適用が困難な抗体(回収率 50%以下)の抗体回収率を60%以上に向上する技術を開発する。

1.2 目標設定の理由

2つの研究開発項目である、①系統的な高特異性抗体創製技術の開発、②高効率な抗体分離精製技術の開発、に沿った目標設定がなされており、世界的に競争の激しい本分野において、リード抗体創製と抗体製造コスト低減のための基盤技術構築を目指すとともに、産業化を強く意識した目標となっている。

2. 事業の計画内容

2.1 研究開発の内容

目標を達成するために、①②の研究開発項目について次の研究開発を実施する。

2.1.1. ①系統的な高特異性抗体創製技術

(1)膜タンパク質及びその複合体等の機能を有した抗原の系統的な産生技術

創薬標的となりうる産生が困難な膜タンパク質やその複合体等(G蛋白質共役型受容体等)を、生体内における機能を有した状態で、系統的に産生する技術開発を行う。特に、高い特異性を有する抗体の創製に適した抗原産生技術を開発する。

(2)高特異性・高親和性・高機能性を有する抗体の効率的な創製技術

抗原提示増強、免疫寛容の抑制等により、抗体が出来にくい標的に対する高特異性抗体(人工抗体を含む)の創製技術の開発を行う。さらに、系統的に創製された抗体の特異性・高親和性等の機能を高める抗体の改変技術の開発を行う。

(3)抗体を系統的に創製するための基盤技術及び創製された抗体の評価

(1),(2)で得られる技術を活用し、産業上有用な標的候補となるタンパク質やその複合体を同定して得られた標的タンパク質に対して系統的に抗体を創製することで、抗原の系統的産生技術及び抗体の出来にくい標的に対し高特異性抗体を創製する技術の検証及び実証を行い、その有用性を評価する。さらに、創製した抗体の創薬標的に対する特異性や機能を検証する技術を開発し、系統的に創製された抗体の特異性や機能の評価を行う。

2.1.2. ②高効率な抗体分離精製技術

分子特性の異なる個々の抗体の分離・精製工程に対応するアフィニティー・クロマトを中心とした製造技術の技術革新を行い、抗体分離・精製工程の最適化に係る設計時間の大幅短縮化により、抗体製造の低コスト化を実現するため、以下の技術開発を行う。また、技術開発を行うにあたり、抗体の実用化レベルの生産に適用可能な技術開発を目指し、得られた技術を実際の製造システムへ適用することで、技術の検証及び実証を行い、その有効性を評価する。

(1)タンパク質分子リガンド技術開発

多品種の抗体分子に対応する結合・解離特性の最適なアフィニティー・リガンド分子の設計・創製技術の開発を行う。特に、迅速な分子設計のための多様なアフィニティー・リガンド分子からなるライブラリの創製、部分構造最適化によるリガンドと抗体の結合・解離特性・安定性向上技術開発、及び、アフィニティー・リガンド分子の迅速選別技術開発等を行う。

(2)高効率クロマト担体技術開発

精製操作時等にリガンド脱落が少なく、かつ、結合量を最大化するリガンド-担体結合技術(固定化技術)を開発する。また、高効率固定化のクロマト担体表面修飾技術開発、及び、スケールアップに必要なクロマトの動的特性改良技術開発等を行う。

(3)溶出工程技術開発

溶媒工学を基盤として、溶出工程における抗体の不可逆的な会合凝集・変性を抑制するための支援技術を開発する。

2.1.3 実施期間

研究開発期間：平成18～22年度(5年間)

2.2 研究開発の実施体制

研究開発の実施にあたっては、策定した基本計画に対する具体的な提案を公募により募り、①外部有識者から構成され NEDO 内に設置される採択審査委員会による主に技術的な視点からの事前評価、及び、②事前評価結果を踏まえ、技術的な視点に加え財務面等、総合的な視点から契約・助成審査委員会による審議により、最終的な採否を決定し、研究開発体制を構築することとしている。

本プロジェクトでは、研究開発開始時に行った公募に対し、応募があった 24 件の提案の中から選定した5件の提案により研究開発体制を構築した。

その後、当該プロジェクトの開発テーマの一つとして進めてきた抗体の新たな治療応用法である「プレターゲット法」についてプロジェクトから切出し、平成 21 年度補正予算を用いて新規に創設された「最先端研究開発支援プログラム(FIRST プログラム)」として実施することとし、これに併せて中間評価での指摘事項の反映とプロジェクトの進展状況を踏まえた「選択と集中」により、これまでに得られた成果を取りまとめ着実な進展を図るべく実施体制の刷新を行い、平成 22 年 4 月 1 日より新体制にてプロジェクトを実施した。

2. 2. 1 研究開発の実施体制

(1) 平成 18 年度～平成 21 年度(4 年間)までの研究開発の実施体制

平成 17 年 12 月 19 日に公募の予告を行い、平成 18 年 1 月 20 日～2 月 20 日に公募を実施した。応募のあった 24 件の提案について、NEDO内に設置した 6 名の学識経験者等から構成される採択審査委員会において、書面審査及びその結果を踏まえて選考した 11 件の提案を対象としたヒアリング審査を行い、採択候補を選考した。その後、採択審査委員会の選考結果を踏まえ、NEDO内の契約・助成審査委員会により、財団法人バイオインダストリー協会(共同提案者:産業技術総合研究所)からの全体提案および広島大学、岡山大学(共同提案者:帝人ファーマ株式会社)、麒麟麦酒株式会社、学校法人藤田学園からの部分提案の計 5 件を採択とした。学校法人藤田学園からの提案については、部分採択とした。実施にあたっては、国立大学法人東京大学先端科学技術研究センター システム生物医学分野教授 児玉龍彦氏をプロジェクトリーダーとして、平成 18 年 4 月より研究開発を開始した。

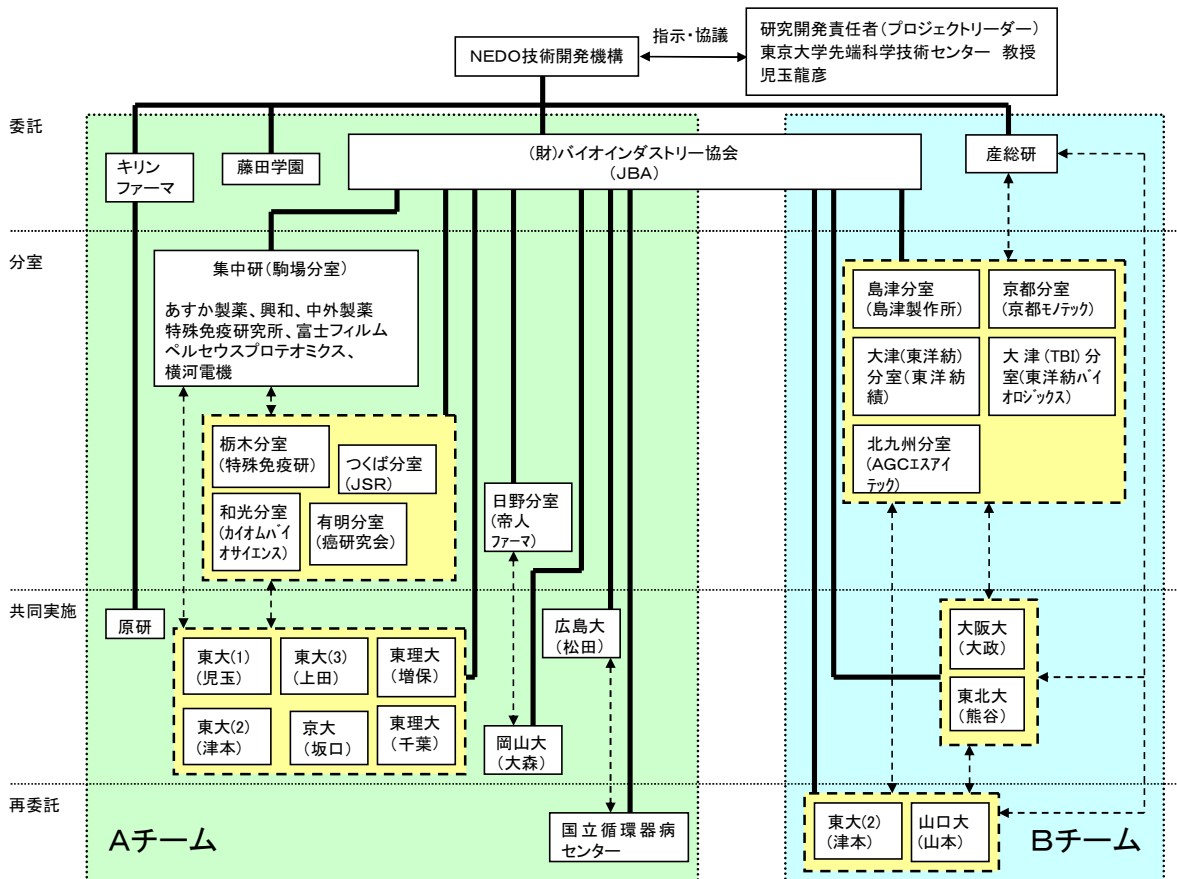
(公募プロセス)

①	ワークショップ開催	発明会館において開催	平成 17 年 12 月 27 日
②	公募開始	NEDO ホームページによる公募	平成 18 年 1 月 20 日
③	公募説明会	24 企業・団体, 32 名が参加	平成 18 年 1 月 31 日
④	公募〆切	提案件数:24 件	平成 18 年 2 月 20 日
⑤	採択審査委員会	書面審査	書面による技術審査の実施 平成 18 年 2 月 22 日～ 平成 18 年 3 月 2 日
		ヒアリング審査	書面審査の結果を踏まえ、11 件の提案を対象にヒアリングを行った後審査を行い、委託予定先の選考案を決定。 平成 18 年 3 月 6 日
⑥	契約・助成審査委員会	採択審査委員会の選考結果を踏まえ、採択(5件)・不採択(19件)を決定。	平成 18 年 3 月 28 日

(採択審査委員)

委員長	宮島 篤	東京大学 分子細胞生物学研究所 所長
委員	加藤 滋雄	神戸大学大学院 自然科学研究科 教授
	高柳 広	東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 分子情報伝達学 教授
	中村 聡	東京工業大学 大学院生命理工学研究科 教授
	西 義介	長浜バイオ大学 バイオサイエンス学部 教授
	米原 伸	京都大学大学院 生命科学研究科 教授

研究実施体制(平成 18～20 年度)



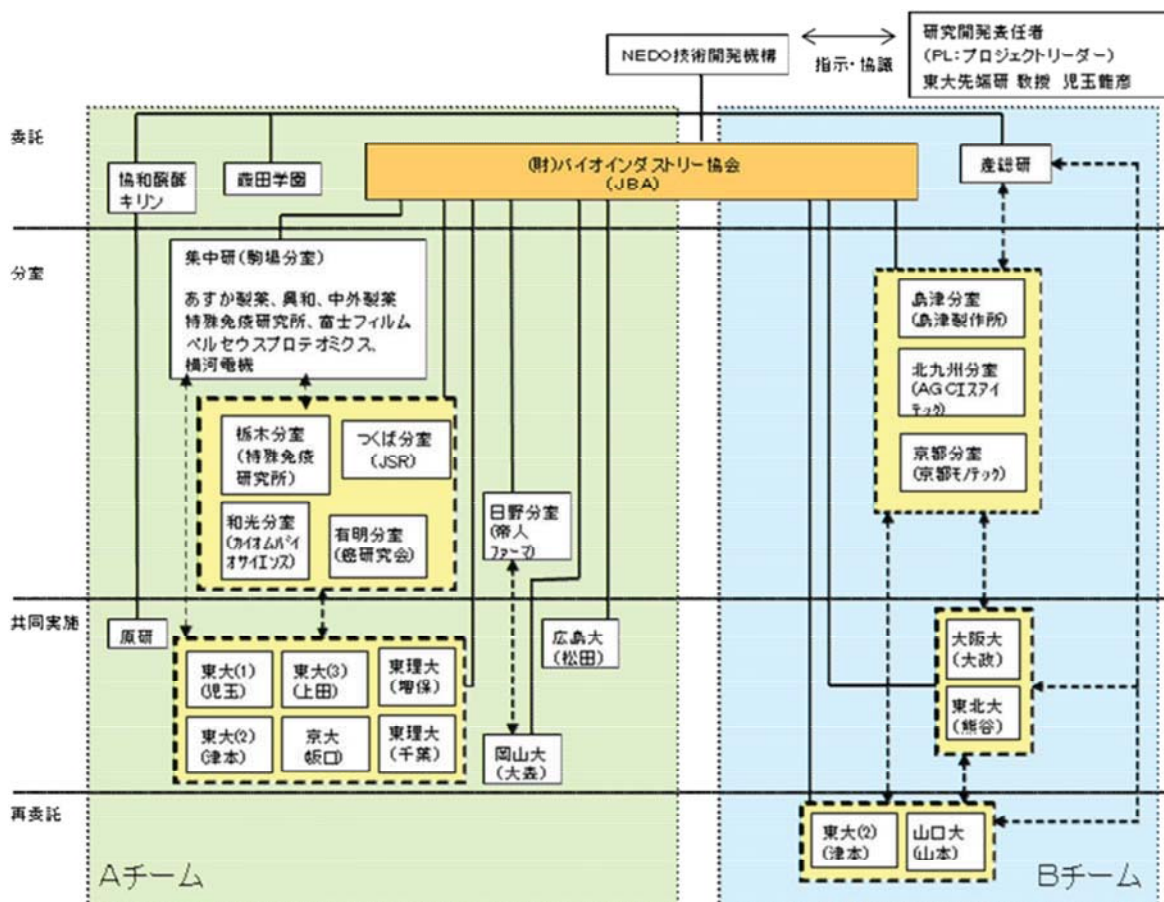
実施にあたり、部分提案された広島大学と岡山大学を財団法人バイオインダストリー協会のグループに統合し、財団法人バイオインダストリー協会が管理することとした。

実施後の社名変更と分社化により、採択時の株式会社パシフィックバイオロジクスが東洋紡バイオロジクスに(平成 19 年4月1日)、麒麟麦酒株式会社がキリンファーマ株式会社(平成 19 年7月1日～平成 20 年9月30日)、さらに協和発酵キリン(平成 20 年10月1日～)へ、旭硝子エスアイテック株式会社がAGCエスアイテック株式会社(平成 19 年7月1日)に、それぞれ社名変更された。

(2) 平成 21 年度(1 年間)の研究開発の実施体制

大津(東洋紡)分室と大津(TBI)分室は 20 年度終了時点で、本プロジェクトにおける最終目標を達成し、本プロジェクトで果たすべき役割終了に伴い実施体制から外れ、下記研究実施体制によりプロジェクトを実施した。

研究実施体制(平成21年度)



(3) 平成 22 年度(最終年度(1 年間))の研究開発の実施体制

世界のトップを目指した先端的研究を推進し、日本の国際的競争力の強化と、研究成果の社会還元を図ることを目的とし、平成 21 年度補正予算を用いて「最先端研究開発支援プログラム(FIRST プログラム)」創設された。

当該プロジェクトの中心的な課題は、特異性の高い抗体を用いてシグナルの遮断や ADCC、CDC 活性によって薬効をもたらす、いわゆる免疫学的なメカニズムを用いた抗体医薬の開発を進めてきた。他方、抗体を特異的な認識プローブとして用い、前もって投与して腫瘍に集積した抗体に対してアビジン-ビオチン反応を用いて放射性アイソトープを集積させ腫瘍をイメージングまたは治療する「プレターゲティング法」の可能性についても同時に開発を進めてきた。しかし、研究の進展に伴って、プレターゲティング法の実現のためには「大規模な抗体改変産物を設計して製剤化する技術」、すなわち、診断と治療に役立つヒト型の scFv をマウス抗体遺伝子からいかに迅速に開発できるかが重要な開発課題であり、プロジェクトの設定課題と異なる技術開発を進めることの重要性が明らかとなった。

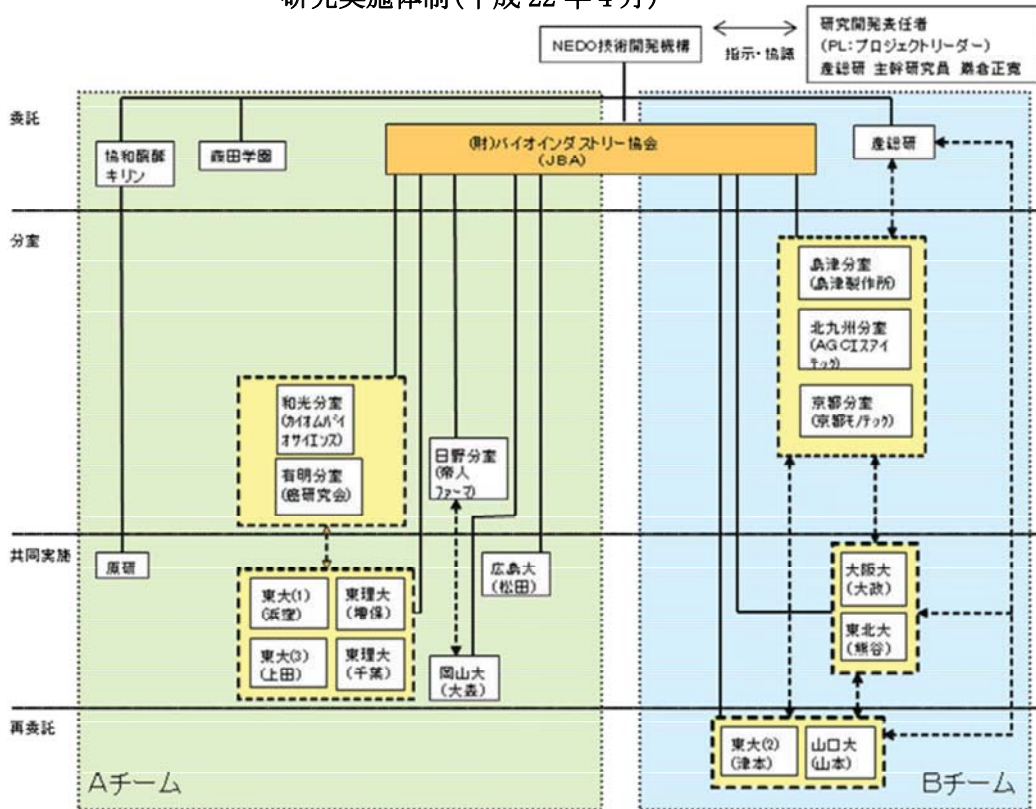
このため、当該技術開発をプロジェクトから切出し、新規に創設された FIRST プログラムへ応募することとし、「がんの再発・転移を治療する多機能な分子設計抗体の実用化」と題し、東京大学先端科学技術研究センター/児玉達彦教授を中心研究者として提案を行なった。厳正なる審査の結果、第 84 回総合科学技術会議(平成 21 年 9 月 4 日)において採択 30 課題の一つとして採択されることが決定した。その後、研究規模等に関する精査が行なわれ、第 89 回総合科学技術会議(平成 22 年 3 月 9 日)において、最先端研究開発支援プログラムの中心研究者、研究課題、研究支援担当機関及び研究計

画が決定された。

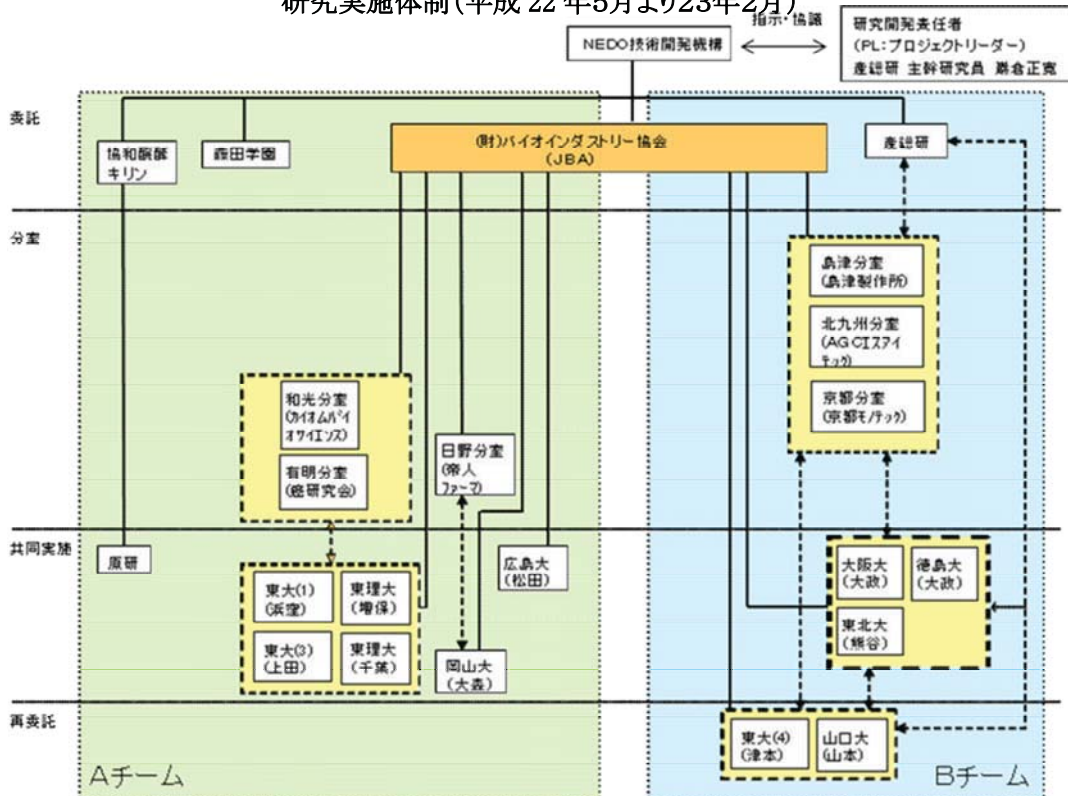
FIRST プログラムでの採択結果を受け、FIRST プログラムに専任義務があること、また、4年間のNEDOプロジェクトの進展状況に鑑み、最終年度である平成22年度の研究体制を抜本的に見直した。即ち、4年間の技術開発によって、先端研を中心に進めてきた「バキュロウィルスを用いる系統的な高特異性抗体の創製技術」については一通りの目途がついたことから、中間評価の指摘事項であった「早期に参画企業以外にも導出し、限られた人員・研究費をより効率的に基盤技術の開発に振り分けることが望ましい」に基づき、①開発課題を「バキュロウィルスを用いる系統的な高特異性抗体の創製技術」を除く系統的な創製技術の開発および抗体分離精製技術に絞り込むとともに、②有用抗体の生産実証によるAチームとBチームの相互連携、③国内製薬企業を中心とし、プロジェクトで構築した有用抗体の試用システムを構築するなど、選択と集中による体制変更を行なった。また、これに伴いプロジェクトリーダーを産業技術総合研究所生物機能工学研究部門／巖倉正寛部門長に、サブプロジェクトリーダーを藤田保健衛生大学／黒澤良和教授とし、マネジメント体制を刷新した。

最終年度の途中で、大阪大学大政准教授が徳島大学教授として5月1日付けで異動され、大阪大学の招へい教授を兼任され、両大学で研究を実施することになったため、および東京大学大学院新領域創成科学研究科準教授から東京大学医科学研究所・疾患プロテオミクスラボラトリー教授として5月1日付けで異動され、4月と5月では研究実施体制に変化があったので、下記に研究実施体制を示した。

研究実施体制(平成 22 年 4 月)



研究実施体制(平成 22 年5月より23年2月)



2.3 研究の運営管理

2.3.1 平成18年度～平成21年度(4年間)までの研究の運営管理

(1) 運営管理

開発項目が2つあり、各実施者がどちらか一方、もしくは両方に属して開発を推進する。便宜上これらをAチーム、Bチームと称し、Aチームは新機能抗体創製技術開発、Bチームは高効率な抗体分離精製技術の開発を行う。全体の取り纏めとAチームの推進をプロジェクトリーダーである児玉龍彦氏が、Bチームの推進をサブプロジェクトリーダーの巖倉正寛氏が担当する。

原則として、半期に一度の割合で AB両チーム合同の研究開発推進委員会を開催する。上半期の研究開発推進委員会においては、研究成果の報告と今後の研究計画について検討を行う。下半期の研究開発推進委員会は、1年間の研究成果報告と次年度の研究計画について報告を受けた後、実績とプロジェクト全体目標に照らした役割期待を加味し、次年度以降の研究計画と予算の配分決定を目的として開催する。この他、Aチーム、Bチームごとの研究開発小委員会等を随時実施し、成果のチェックと問題点の早期発見・解決等による研究計画の円滑な推進を図っている。

平成18年度(初年度)は、部分提案として採択した広島大学、岡山大学、藤田学園、麒麟麦酒の提案と全体採択の財団法人バイオインダストリー協会、産業総合研究所の提案とのマッチングを行い、円滑な研究の実施に向けた研究計画の摺り合わせを行うとともに、東京大学先端科学技術研究センター内に設置した集中研究拠点の立ち上げに注力した。

本プロジェクトは、平成15年度～平成17年度に実施された「タンパク質相互作用解析ナノバイオチッププロジェクト」(児玉龍彦プロジェクトリーダー)と密接に関連した内容であり、供用替え等の手続きをスムーズに進め、本プロジェクトでの使用に有効に供するよう心がけた。また集中研究拠点以外の研究場所については速やかな研究開始を行った。

NEDOにおいては、直接委託先の他、財団法人バイオインダストリー協会からの再委託先や共同研究先も含めた全活動拠点を訪問し、活動環境の確認と、必要があれば改善の指導を行った。本プロジェクトにおいては、スタート時より最初の3年間は体制の変化がなく、平成19年度(2年目)と20年度(3年目)においては、さらに研究スピードを加速し、中間目標の達成へ向けた活動を行った。

プロジェクトに参加する各機関の研究内容と研究計画の共有を第1の目的として、全員が会しての第1回研究開発推進委員会を、平成18年9月7日に東京大学先端科学技術研究センター(駒場)に於いて実施した。毎回の研究開発推進委員会には、この項の最後に示す各委員、経済産業省担当者等も出席し活発な議論を行った。

平成19年3月14日には、東京大学先端科学技術研究センター(駒場)に於いて第2回研究開発推進委員会を実施し、これまでの研究成果と今後の研究計画についてディスカッションを行い、平成19年度研究計画を策定するとともに、予算配分の決定を行った。各々の結果を相互に秘匿とするため、Aチームについては5つの部会に分けて実施した。

平成19年8月22日には、東京大学先端科学技術研究センター(駒場)に於いて第3回研究開発推進委員会を実施した。プロジェクト活動開始から1年以上経過したため、全拠点での進捗をお互いに知ることが、今後のプロジェクト成果に重要と考え、一堂に会する形で実施した。テーマグループの代表がそれぞれ発表を行った。

平成20年1月31日には、東京大学先端科学技術研究センター(駒場)に於いて第4回研究開発推進委員会を実施した。これまでの研究成果と今後の研究計画についてディスカッションを行い、平成20年度研

究計画を策定するとともに、予算配分の決定を行った。より細かい議論を行うため、小テーマごとに代表者が成果発表した。以上のように、回を追うごとに細かい粒度の議論へと駒を進めてきた。

平成 20 年 9 月 25 日には、東京大学先端科学技術研究センター（駒場）に於いて第 5 回研究開発推進委員会を実施した。研究成果と今後の研究計画について活発なディスカッションが行われたが、委員の先生より、当日の発表だけでは内容を理解しにくいので、事前に資料を配布して欲しいとの意見があり、次回より事前に委員の先生方に配布することにした。6 月 4 日に中間評価があり、高評価であったことが報告された。しかし、評価委員から「選択と集中」等、幾つかの指摘があり、これらに対する対応に関しては次年度の研究計画を立てる段階で、検討することになった。

平成 21 年 1 月 29 日には、東京大学先端科学技術研究センター（駒場）に於いて第 6 回研究開発推進委員会を実施した。委員の先生方から発表データに対する意見、コメント等をよりの確に頂くために、委員会の数日前に委員の先生方に発表内容の要約をお配りした。研究成果と今後の研究計画について各研究機関から発表され、これらに対して活発なディスカッションが行われた。

平成 21 年 7 月 2 日には、東京大学先端科学技術研究センター（駒場）に於いて第 6 回研究開発推進委員会を実施した。研究成果と今後の研究計画について活発なディスカッションが行われた。3 年間の経過し、順調に研究が進捗しており、A,B 両グループともほぼ目標に達していた。

平成 22 年 1 月 21 日には、東京大学先端科学技術研究センター（駒場）に於いて第 8 回研究開発推進委員会を実施した。児玉龍彦プロジェクトリーダーが FIRST プログラムでの採択結果を受け、FIRST プログラムに専任義務があること、また、4 年間の NEDO プロジェクトの進展状況に鑑み、最終年度である平成 22 年度の研究体制を抜本的に見直した。即ち、4 年間の技術開発によって、先端研を中心に進めてきた「バキュロウイルスを用いる系統的な高特異性抗体の創製技術」については一通りの目途がついたことから、今年度を以って児玉龍彦プロジェクトリーダーが退任されることになった。これに伴い、集中研（先端研）および集中研と共同研究を行っていた京都大学坂口教授、東京大学新領域津本教授（A グループ）も本プロジェクトから離脱されることになった。但し、浜窪教授は作製した成果である抗体を委託するための作業を行なうことになった。他のグループについては、これまでの研究成果と今後の研究計画についてディスカッションを行い、平成 22 年度研究計画を策定するとともに、最終年度の予算配分決定のための討議を行った。

研究開発推進委員会登録委員は下記の通りである。

氏名	所属・役職
児玉龍彦（委員長）	東京大学先端科学技術研究センター・教授（PL）
巖倉正寛（副委員長）	産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・部門長（SPL）
河上裕（AB共通委員）	慶應大学・医学部・先端医科学研究所・教授
西義介（AB共通委員）	長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授
土井健史（A委員）	大阪大学・薬学部・教授
二木鋭雄（A委員）	産業技術総合研究所・ヒューマンストレスシグナル研究センター
加藤滋雄（B委員）	神戸大学大学院・自然科学研究科・教授
杉本俊二郎（B委員）	財団法人・化学及血清療法研究所・研究開発戦室長 (平成20年度まで)
高木 睦（B委員）	北海道大学大学院・工学研究科・教授 (平成21年度より杉本俊二郎委員と交代)

(2) 小委員会等の開催

(1)に記した研究開発推進委員会とは別に、Aグループ、Bグループそれぞれにおいてチーム内の打ち合わせを実施した。この会議で討論された結果は、各チームにおける実施計画の微修正等に反映された。ここに記載した以外に、個別の会合が随時開催された。

Aグループ

・抗体ミーティング

2007.01.22	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)
2007.02.26	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)
2007.03.12	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)
2007.04.09	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)
2007.04.23	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)
2007.05.14	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)
2007.05.25	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)
2007.06.11	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)
2007.06.25	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)
2007.07.09	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)
2007.08.27	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)
2007.09.10	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)
2007.10.15	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)
2007.11.12	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)
2007.12.10	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)
2008.01.25	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)
2008.02.27	抗体ミーティング(東大先端研—東大新領域)

2008.03.17	抗体ミーティング(東大先端研―東大新領域)
2008.04.21	抗体ミーティング(東大先端研―東大新領域)
2008.06.23	抗体ミーティング(東大先端研―東大新領域)
2008.07.28	抗体ミーティング(東大先端研―東大新領域)
2008.10.20	抗体ミーティング(東大先端研―東大新領域)
2008.12.15	抗体ミーティング(東大先端研―東大新領域)
2009.02.16	抗体ミーティング(東大先端研―東大新領域)
2009.03.23	抗体ミーティング(東大先端研―東大新領域)
2009.04.20	抗体ミーティング(東大先端研―東大新領域)
2009.06.22	抗体ミーティング(東大先端研―東大新領域)
2009.07.27	抗体ミーティング(東大先端研―東大新領域)
2009.09.14	抗体ミーティング(東大先端研―東大新領域)

Bグループ

・研究開発小委員会

2006.06.09	B-チーム第1回研究開発小委員会(全メンバー)
2006.10.06	B-チーム第2回研究開発小委員会(全メンバー)
2007.02.09	B-チーム第3回研究開発小委員会(全メンバー)
2007.06.01	B-チーム第4回研究開発小委員会(全メンバー)
2007.11.01-02	B-チーム第5回研究開発小委員会(全メンバー)
2008.02.08	B-チーム第6回研究開発小委員会(全メンバー)
2008.06.20	B-チーム第7回研究開発小委員会(全メンバー)
2008.11.01	B-チーム第8回研究開発小委員会(全メンバー)
2009.02.06	B-チーム第9回研究開発小委員会(全メンバー)
2009.06.26	B-チーム第10回研究開発小委員会(全メンバー)
2009.11.04	B-チーム第11回研究開発小委員会(全メンバー)
2010.02.05	B-チーム第12回研究開発小委員会(全メンバー)

2.3.2 平成22年度(最終年度)の研究の運営管理

(1) 運営管理

「最先端研究開発支援プログラム(FIRST プログラム)」への一部テーマ切り出しに伴い、Aチームの実施体制を大きく変更。プロジェクトリーダーを児玉龍彦氏から巖倉正寛氏に、Aチームの推進を担うサブプロジェクトリーダーを児玉達彦氏から黒澤良和氏へ、Bチームの推進を担うサブプロジェクトリーダーを巖倉正寛氏が担当する運営管理体制へと刷新した。

半期に一度の割合でAB両チーム合同の研究開発推進委員会を開催した。上半期の研究開発推進委員会においては、和光分室(カイオムバイオサイエンス)と有明分室(癌研究会)の連携による新たな取り組みである GPCR を対象とした抗体創製技術の進展状況や、AチームとBチームの連携による有用抗体の生産実証の進展状況などに関する研究成果の報告と、研究成果の総まとめに向けた下半期の研究計画について検討を行なった。下半期の研究開発推進委員会では、5年間の総まとめとしての研究成果報告と目標

に対する達成度の自己評価、プロジェクト終了後に残される課題とそれへの取り組みについて検討を行なった。この他、Aチーム、Bチームごとの研究開発小委員会等を随時実施し、成果のチェックと問題点の早期発見・解決等による研究計画の円滑な推進を図っている。

研究開発推進委員会登録委員は下記の通りである。

氏名	所属・役職
巖倉正寛（委員長）	産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主幹研究員（PL）
黒澤良和（副委員長）	藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・所長・教授（SPL）
河上裕（AB共通委員）	慶應大学・医学部・先端医科学研究所・教授
西義介（AB共通委員）	長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授
土井健史（A委員）	大阪大学・理事・副学長・薬学研究科・教授
二木鋭雄（A委員）	産業技術総合研究所・健康工学研究センター 顧問
加藤滋雄（B委員）	神戸大学・名誉教授
高木 睦（B委員）	北海道大学大学院・工学研究科・教授

(2) 小委員会等の開催

(1)に記した研究開発推進委員会とは別に、Aグループ、Bグループそれぞれにおいてチーム内の打ち合わせを実施した。この会議で討論された結果は、各チームにおける実施計画の微修正等に反映された。ここに記載した以外に、個別の会合が随時開催された。

Bグループ

・研究開発小委員会

2010.06. 12 B-チーム第13回研究開発小委員会（全メンバー）

2011.02. 14 B-チーム第14回 研究開発小委員会（全メンバー）

3. 情勢変化への対応

ターゲットの枯渇等、立案時に予想されなかった状況へ対応すべく、独立行政法人への移行に伴い新設された、著しい成果を挙げているプロジェクトに対してプロジェクト予算とは別に追加的な資金を投入する「加速財源制度」を用いて、東京大学大学院新領域創成科学研究科生命分子解析学のグループに対し、小分子化抗体の研究を加速するため追加資金の配分を行った。本加速財源の投入は極めて意義が高く効果的であった。「最先端研究開発支援プログラム(FIRST プログラム)」へ切り出し、展開することとなった「ブレタージェティング法」の重要な要素技術である「コンピュータシミュレーション技術を駆使して高機能な分子設計抗体を開発する技術」の開発に大きな効果を発揮した。

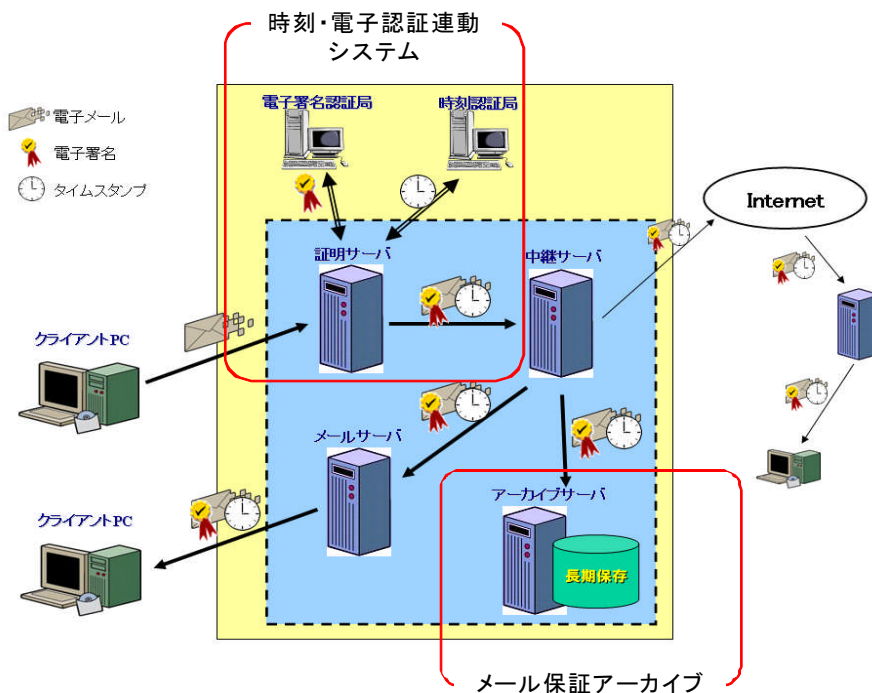
また平成 20 年度予算では、抗原の修飾を解析するために必須である高精度質量分析計(オービトラップ)を集中研に導入し、プロジェクトメンバーが使用できるよう整備を行なった。

FIRST プログラムへのプロジェクトテーマの切り出しに伴う体制変更を実施。4年間の開発成果、目標達成率、産業有用性の実証プラン等を踏まえた自主評価による「選択と集中」により研究開発体制を刷新するとともに、中間評価での指摘事項に対応するための仕組みを具現化し、成果の実用化へ繋げるべく、より強

固な体制へと変更を行なった。

4. 知的財産の管理体制

研究開発成果の市場価値が非常に高くなる研究を、競合する複数の関連企業と産学連携プロジェクトの体制で行う場合、成果の発端となるアイデアを「いつ」「(どこの)誰」が出したのかを公正に記録し、後に明示できるようにしておくことが、素早い知財の出願を実現するうえで重要である。このことを実行可能にするために、電子署名と時刻認証を併用した電子メール技術を用いた、先端科学技術情報保護を目的とする新しい知的財産管理支援技術システムを平成 18 年度に開発した(下図)。本システムは平成 19 年度よりプロジェクトにおいて運用を開始し、時刻認証(タイムスタンプ)により「いつ」が、また電子署名により「誰」が、の2点を同時に特定することによってアイデアの優先権を明確化し、円滑な知財管理を可能にした。



知的財産管理支援技術システムの概要

5. 中間評価への対応

中間評価での主な指摘事項とそれへの対応は次のとおり。

(1)中間評価での主な指摘事項

①総合評価

本事業は、我が国の抗体医薬の国際競争力をリードしようとするものであり、医薬品産業、生命科学産業の発展に貢献する重要なテーマである。プロジェクトリーダーの卓越した指導力のもと、適切なマネジメントが行われ、ほぼ目標を達成する成果が得られている。抗体創製技術開発においては、省庁間連携による in vivo イメージング開発など新たな展開もある。一部の抗体では参加企業による抗体治療の治験が始まるなど、すでに実用化に近いものもある。抗体分離精製技術開発においては、中間目標を超える成果が得られており、要素技術の融合で実用化が見通される段階に達している。

一方で、(指摘事項1)本事業では様々な技術開発を同時進行的に行っているが、多くの抗体創製基盤

技術の相互関係や抗体分離精製技術との関連などに不明確なところがあり、標的をしぼるとともにより効果的な連携を検討する必要がある。(指摘事項2)また、国内外の抗体医薬の開発と関連の知的財産など周辺状況も踏まえてプロジェクトを推進し、知財に配慮しつつ成果をより積極的に公開することが望まれる。

③今後に対する提言

(指摘事項2)抗体創製技術開発においては、がん抗原に対する抗体作製は継続すべきだが、すでに見出した候補のうち数種の抗体については有用性の検討を行っているものの、他の抗体に関しても早期に診断治療抗体としての有用性を見極める必要がある。多数の候補を得たことは大きな成果ではあるが、全ての候補をこのグループ内の企業で開発することは現実的ではないであろう。候補となる抗原・抗体については早期に参加企業以外の企業への導出なども考慮して実用化を推進することが望まれる。

(指摘事項1)本事業の主要目的は抗体に関する基盤技術の開発であり、多くの技術の相互関係を明確にし、抗体創製技術開発と分離精製技術開発の技術交流を加速し効率的に基盤技術の開発を推進することが望まれる。

(2)指摘事項への対応

①指摘事項1への対応

a)プレターゲットング技術を最先端研究へスピンアウトするとともに開発項目の絞り込みを行い、効率的な基盤技術の開発を推進。

・抗体を認識分子として用いるプレターゲットング技術については、プロジェクトの設定課題と異なる技術開発が重要であることから、最先端研究開発支援プログラム(FIRSTプログラム)へ技術開発をスピンアウト。

・バキュロウィルスを用いた抗体創製技術については、創製した抗体の製薬企業等への導出実績を生み出したことから、基盤技術としての開発はほぼ完了、4年度目をもって開発を終了。まだ製薬企業への導出実績のないフェージやニワトリ系の抗体創製技術の開発に焦点を絞り、相互連携体制を強化し、基盤技術の開発を推進した。具体的には、癌研のゲノミクス的手法により見出された癌組織特異的に発現する細胞膜タンパクに対する抗体作製を ADLib® axCELL システムにより行い、ELISA レベルで反応性を示したクローンを 200 個以上得ることに成功した。現在その他の手法により、ターゲットへの反応性の検証を続けている。

b)抗体創製技術開発と分離精製技術開発を連携し、効率的な基盤技術の開発を推進。

・22 種類のニワトリ及びフェージを用いて創製したヒト型化モノクローナル抗体を精製技術検証用パイプラインとして用いそれを発現する CHO 細胞培養液から精製を行い、開発した精製技術の検証を行い、技術の有用性を確認した。

②指摘事項2への対応

a)生産実証を行なった抗体のプロジェクト参加企業以外での試用制度の創出・運用。

・生産実証の結果として得られたニワトリ及びフェージを用いて創製した抗体について、その有用性の検討を製薬企業等が無償で試用する仕組みを構築し、抗体の提供を行なった。有用性の早期見極めに繋げるとともに、開発経験の浅いタイプの抗体創製技術の実用化促進への寄与を期待。

b)プロジェクトで構築した抗体産生細胞を公的機関へ寄託し、研究資源へのアクセシビリティの確保と成果の積極的な公開を行なった。

6. 評価に関する事項

中間評価を平成 20 年度、事後評価を平成 23 年度に実施する。

Ⅲ. 研究開発の成果と達成状況

1. 事業全体の成果

A) 系統的な高特異性抗体創製技術の開発

① 膜タンパク質及びその複合体等の機能を有した抗原の系統的な産生技術

GPCR を含む癌表面マーカータンパク質およびその関連タンパク質に対する抗体作製のため、抗原発現バキュロウイルス、定常発現細胞等を作製した。疾病のマーカー候補として癌、心血管疾患、精神神経疾患、骨運動器疾患、糖尿病等、計 165 種類 244 抗原を作製した。うち取得抗体数は 130 項目 558 クローンである。うち治療用抗体候補 6 種類、診断用抗体候補 6 種類を取得した。

G タンパク質共役型受容体(GPCR)に対するモノクローナル抗体(mAb)を効率的に作製するための大腸菌由来 Gro-EL を分子アジュバントとした改良 DNA 免疫法を確立し、機能性抗体を含む 10 種類の抗 GPCR mAb を作製した。

② 高特異性・高親和性・高機能性を有する抗体の効率的な創製技術

末梢性免疫寛容の打破を目的として制御性 T 細胞(Treg)を除去した細胞を移入したマウスを免疫動物として、2 種類の自己抗原に対する抗体作製に成功した。B 細胞活性化促進作用を持つ蛋白質と目的抗原膜蛋白質を共発現するバキュロウイルスを免疫源として、2 種類の膜蛋白質に対する抗体作製に成功した。*in vivo* で Treg を特異的に除去できるモノクローナル抗体を樹立し、認識抗原を同定した。

抗 CD20 抗体の Fab 下流に Fc を 2 個ないし 3 個タンデムに連結した改変抗体を作製した。このタンデム Fc 型改変抗体は、天然型抗体よりも Fc 受容体に強い親和性を持ち、CD20 発現細胞に対して天然型抗体より約 100 倍強い ADCC 活性を発揮した。*in vivo* でも制がん活性は評価を開始したばかりであるが、低い投与量で治療効果を示した。

TNF α に対する受容体 TNFRII に Fc をタンデムに連結した受容体-Fc 融合タンパク質 (TNFRII-Fc-Fc) を作製し、TNFRII-Fc(Enbrel)と比較した。TNFRII-Fc-Fc は、TNFRII-Fc に比べて、Fc 受容体に対して強い親和性を示し、細胞膜上に TNF α を発現した細胞に強い ADCC 活性を発揮した。さらに、大腸炎モデルマウスにおいて、TNFRII-Fc-Fc は TNFRII-Fc の数十倍強い治療効果を示した。

再構築型無細胞蛋白質合成系 PURE system による高効率リボソームディスプレイ (PURE RD) を確立した。このシステムにより、scFv、Fab、スキャフォールドの選抜系を開発した。また、抗原の調製法として、脂質を共存させた PURE system による膜蛋白質合成システムを構築した。

界面活性剤にはアミノ酸系界面活性剤である C12-Glu、希釈時における凝集抑制剤として Arg-HCl を添加すること、希釈方法を多段階とすること、により、顕著な巻き戻し効率を得た。これらは、アミノ酸自身が持つ蛋白質水和構造の安定化作用と、界面活性剤が持つ吸着能、蛋白質の折り畳みにより自発的に脱離する活性剤の選択が鍵となった。本手法により、scFv はもとより、Fab、scFv-SA、scFv-SAc core、scFv-Fc の巻き戻しが可能となった。

抗原A 発現バキュロウイルスを用いた ADLib システムによって抗原A に対して特異的に反応する抗体の作製に成功した。最終年度は癌研究会との共同研究を進め、癌研究所で見出された癌特異的発現抗原 RCAA-01 に対する抗体作製を ADLib システムによって実施し、特異的に反応する抗体が得られ、現在、癌研究所において免疫組織染色による抗体の反応性を検証中である。

変異機能の ON/OFF 制御可能なニワトリ B 細胞株 DT40-SW を用いて、効率的な抗体作製システムを開発することに成功した。このシステムは抗体の取得のみならず、任意の抗体の遺伝子を導入して機能改変するのにも応用可能である。

ニワトリモノクローナル抗体作製技術の高度化と複数の有用抗原に対する抗体作製、ニワトリ抗体のキメラ抗体化、ヒト抗体化などの実験を行い、優れた抗体の作製・改変に成功した。

③抗体を系統的に創製するための基盤技術及び創製された抗体の評価

新たな標的分子探索のため、従来蓄積してきた長鎖オリゴアレイによる遺伝子発現プロファイルデータからの抗体候補遺伝子抽出システムの構築を行い、12 種のがんの解析から 85 個、がん幹細胞から 15 個、合計 100 個の新規抗体候補分子を同定した。乳がんと膵がんにおいて 9 個のエクソンスキップと 6 個のがん特異的融合遺伝子を同定した。抗体作製のマウスは 6 種を作製した。さらに合計 39 株の膵がんまたは乳がんのジェノグラフトを樹立し、新規抗体の体系的評価システムを構築した。

B)高効率な抗体分離精製技術の開発

多数のリガンド IgG 結合特性を同時に評価できる固定化リガンドのハイスループット分析装置と、多数の溶媒に対する特定のリガンドからの IgG 溶出パターンを順次測定できる装置を開発した。凝集検出技術に関し、抗体試料の FTIR スペクトルを、新規方法を使用して統計学的に分析した。

商業スケールでモノクローナル抗体を高効率に精製するため、化学的安定性を有するシリカ担体を開発し、cGMP 準拠の製法を確立した。リガンド評価装置用として、ガラス板上薄層モノリスシリカゲル、およびマイクロサイズモノリスカラムを開発し、品質の安定した製造技術を確立した。

3 種類の IgG 様抗体生産無血清培地馴化 CHO 細胞を構築し、抗体培養液供給方法を標準化した。さらに、構築した高感度アッセイ法を用いて細胞培養槽スケールにて分子多様性を評価した。

3 種類の CHO 細胞ラインのスケールアップ培養試験を実施した。

新規精製リガンドとしての抗ヒト IgG1 一本鎖抗体を構築し、機能的な固定化条件を決定した。IgG 様抗体産生 CHO 細胞株を樹立して、ダウンストリーム開発のモデル抗体として提供した。

アルギニンがタンパク質高次構造に及ぼす効果について、その作用機序を考察し、その

ユニークな性質を明らかにした。FFFを用いた抗体の凝集分析に関して、分離条件の最適化を図り、定量分析への礎を築いた。アルギニンが示す特徴的な作用機序に関して、新しい概念を提案し、その抗体溶出技術における安全性の物性基盤を築いた。

1mL 程度の小型カラムおよび 96 穴マイクロプレートを用いるアフィニティクロマトグラフィの迅速なプロセス設計方法を確立した。この方法によりスケールアップ時の動的吸着量を推定できる。

C) ICOS法を用いた癌治療用ヒト抗体単離技術開発

本研究開発は、創薬等のポストゲノム研究の産業化において重要と考えられるタンパク質やその複合体等を抗原として、高特異性・高親和性・高機能性を有する抗体を系統的・効率的に創製するための基盤技術を開発することを目的としている。我々は、ファージディスプレイ技術を用いて巨大なヒト抗体ライブラリーを作製し、そのスクリーニング法を開発してきた。我々の作製した AIMS ライブラリーは、臍帯血、扁桃、骨髓細胞、末梢血由来のB細胞を用いて、さらにライブラリー作製に際しては H 鎖ライブラリーの大きさが独立したクローン数にして 10^8 以上、L 鎖のライブラリーサイズが 10^6 、それを組み合わせて 10^{11} の巨大抗体ライブラリーからなる。これより巨大な抗体ライブラリー作製は、その多様性を保ったまま操作できないという点で、現実的方針とはなり得ない。そこで多様性という点ではほぼ理想的なナイーブヒト抗体ライブラリーである。有用な抗体を単離する目的を達成するために、いかにして抗体ライブラリーを作製するかと並んで重要な点は、どのように目的とする抗原に特異的に結合するクローンを単離するかであり、ライブラリーのスクリーニング法である。本プロジェクトで対象としている癌特異抗原は細胞膜タンパク質なので、様々な抗体を含むファージ抗体ライブラリーと生きた癌細胞株を混合してしばらく放置すれば、細胞膜上で抗原抗体複合体ができるはずである。そこでそれを遠心して細胞を集めれば、細胞膜上のタンパク質に結合する様々な抗体が網羅的に回収できると期待される。我々を含めて、この操作により抗体単離を多くのグループが行った。結果は極めて不満足なものであった。得られる抗体は、特定のクローンに偏っており、さらにその抗体の抗原結合力は一般的に低かった。我々が本プロジェクトに採用された時、すでに ICOS (isolation of antigen/antibody complexes through organic solvent) 法の開発に成功していた。ICOS 法の開発は、生きた細胞の膜上に存在する様々な膜タンパク質分子に対して、それぞれ特異的に結合する抗体を多数かつ網羅的に単離することを可能にした。その結果、従来抗体単離に用いられる研究戦略とは逆の研究方針が可能となった。たとえば癌治療用抗体を開発する目的で研究を開始するグループは、まず標的分子を選択する。その次にモノクローン抗体単離を実施する。我々は、最初に癌細胞膜上に存在する様々なタンパク質に対する抗体を多数単離する。その次に手術で摘出した癌組織を用いて個々の抗体について免疫組織染色 (IHC) を行い、癌特異的染色像を与えるクローンを選別する、そのうち癌特異的染色像を与えた抗体が認識する抗原を決定する。本プロジェクトはこの

研究戦略に基づき、体系的かつ大規模に実施された。

我々の作製した AIMS ライブラリーを用いて癌細胞と混合し ICOS 法でスクリーニングすると、一種類の癌特異抗原に対して 10 種類以上の様々な部位に特異的に結合するモノクローナル抗体を単離できる。本研究で対象とした癌特異抗原は、癌細胞膜上に癌特異的に大量に発現している分子を同定すること、それと同時に抗体を単離することを目的としたので、ICOS 法は大きな威力を発揮した。

D) オリゴクローナル抗体創製技術開発

抗抗原 A モノクローナル抗体のパネルを作製し、抗体を混合した場合、どのような活性が増強されるか調べた。抗原 A については、特に CDC 活性が顕著に増強された。ヒト・マウスキメラ抗原を用いた解析から、抗体が結合するエピトープが重要であることが示唆された。一方で、最も CDC 活性を増強する抗体の組み合わせは、たとえば、ADCC 活性や細胞増殖抑制活性においても最強であるわけではなく、発揮したい活性によって組み合わせを検討する必要があることが分かった。さらに、抗原 A に対する抗体は 1/3 がアゴニスト抗体を示すことがわかったが、たとえば癌の治療を考慮し、オリゴクローナル抗体技術を用いた場合、いかにこのような活性を持たない抗体の組み合わせにより最大の薬効を発揮するかが重要となる。抗原 A の場合、アゴニスト活性の発揮による副作用を考慮した場合、3 種類のモノクローナル抗体を組み合わせることによって、抗腫瘍活性の効率的誘導と増殖促進抑制能を併せ持つ、オリゴクローナル抗体の作製が可能になると考えられた。

CDC 活性増強の作用機構を調べるため、結晶構造解析を行った。CDC 活性増強する Fab 単独、もしくは Fab と抗原複合体の結晶化条件を検討した。Fab については、結晶化に成功した。一方で、Fab と抗原の複合体の結晶化については、結晶は得られたものの解像度が低く、必要な情報を得ることができなかった。キメラ抗原への結合性から、エピトープは分かっているため、Fab の結合領域の構造から、蛋白質結合モデリングにより、抗原への結合様式を推定したところ、CDC の状況には、Fab の向き、距離、抗原の構造が関与することが示唆された。

抗原 A 以外に活性増強が観察されるか調べるため、抗原 A を含め計 10 種の抗原を免疫した。モノクローナル抗体を複数個取得できたもののうち、抗原 B, E, F については抗原 A と同様に CDC 活性の増強が観察されたが、抗原 A と同様に多数のマウスを免疫し、抗体のパネルを作製した、抗原 C については CDC 活性の増強は観察されなかった。抗原 A, B, E, F と抗原 C との違いから、CDC 活性増強には、抗原が持つドメイン構造が重要であることが示唆された。

本研究により、抗体を混合することにより活性が著しく増強する可能性があることがわかり、その活性は、エピトープや抗原の構造的長に依存する可能性が示唆され、医薬品としてオリゴクローナル抗体を開発する上で重要な知見を得ることが出来た。

2. 研究開発項目毎の成果

第一部 A: 系統的な高特異性抗体創製技術

① 膜タンパク質及びその複合体等の機能を有した抗原の系統的な産生技術

①-1 抗体創製のためのバキュロウイルスを用いた膜タンパク質及びその複合体の発現技術開発(JBA 駒場分室(中外製薬株、株特殊免疫研究所、株ペルセウスプロテオミクス)、東京大学先端科学技術研究センター)

1)がん表面マーカー候補を含む 8 種類の GPCR についてリコンビナント BV(budded virus;発芽型バキュロウイルス)を作製し発現を確認した(図 1)。

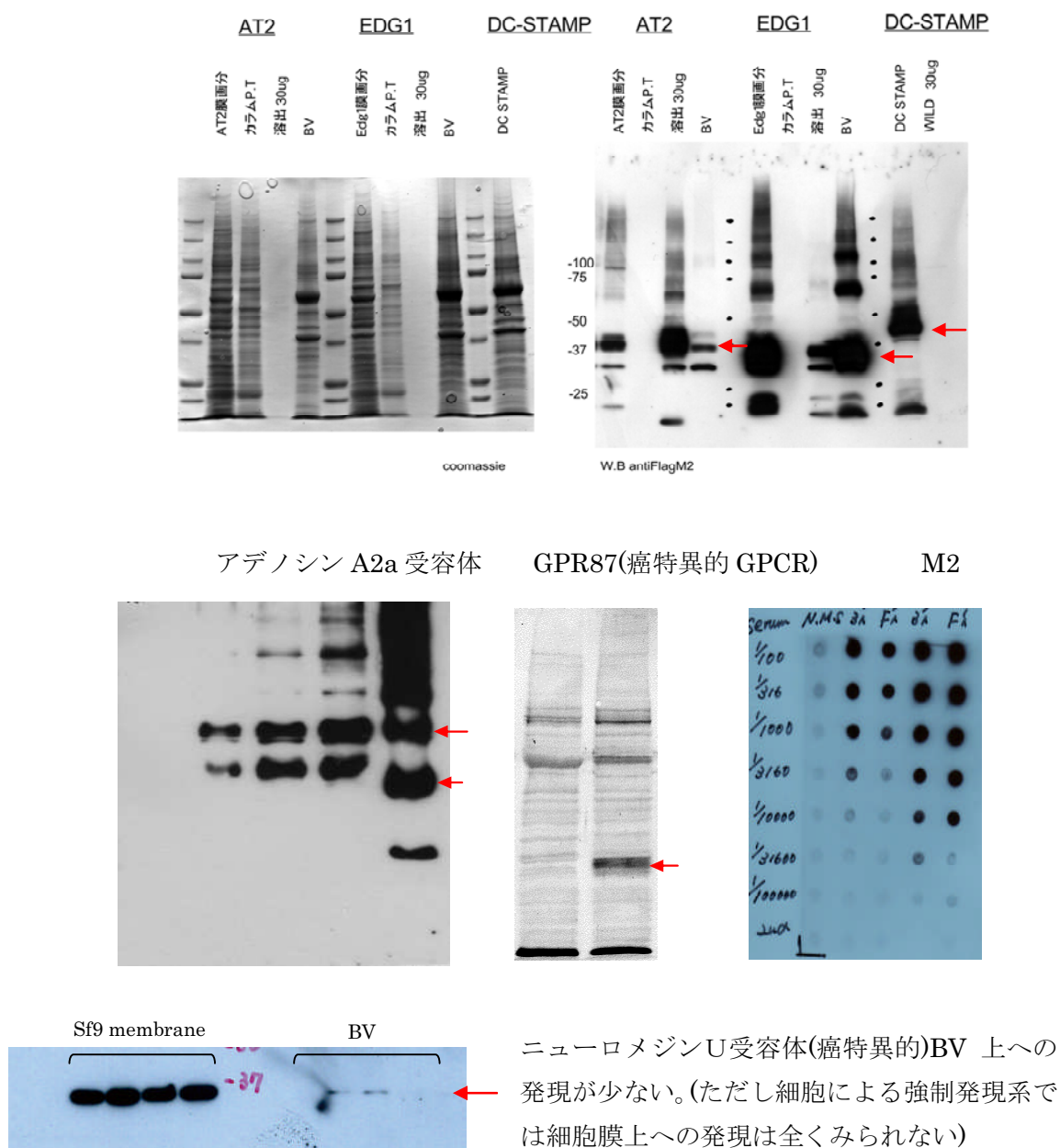


図 1 GPCR の発芽型バキュロウイルス(BV)への発現

GPCRのBV上への発現は各GPCRにより大きな差が認められた。発現量の高いAT2、M2、A2aについては発現BV免疫のみで抗体の取得が可能であったが、発現量の低いものに関しては、精製タンパク質のリポソーム再構成などの抗原(京大岩田研との共同研究による)との併用あるいはBV-ELISAなどの応用により抗体を取得した。陽性ウェル数は多いものでは、A2aの450ウェルを数えたが、FACSや共結晶化等の評価を踏まえ、最終的にクローン化したものは7種類のGPCRに対して81クローンである。

DC-STAMPについては取得した抗体と細胞抗原との反応が確認できなかった。またニューロメジン受容体(FM4)は陽性クローンの取得には至らなかった。FM4は哺乳類細胞上への強制発現はほとんどされず、また上述のようにBVへの発現もきわめて弱かったことが原因と考えられる。

このようなGPCRの発現量の差について、哺乳動物細胞への発現が困難とされているにおい受容体についてBVへの発現を試みた。その結果、右図に示すとおり、哺乳類細胞でも膜上への発現がみられるOREGでも通常発現がみられないS6でもBVへの発現が観察され、それぞれのリガンド結合アッセイで機能を持っていることがわかった。S6はHEKなどの哺乳類細胞ではRTP1と呼ばれる膜シャペロンタンパク質により膜にソートされることが知られている。BVではRTP1とは関係なく膜にソートされることがわかった。Sf9でのソーティング機構について、プロテオミクス等を用いて候補タンパク質の同定を試みている。

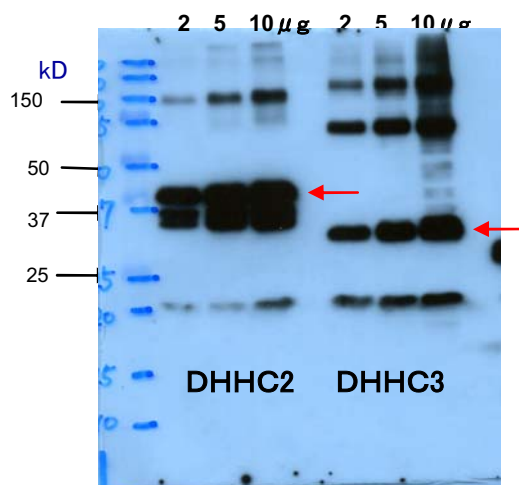
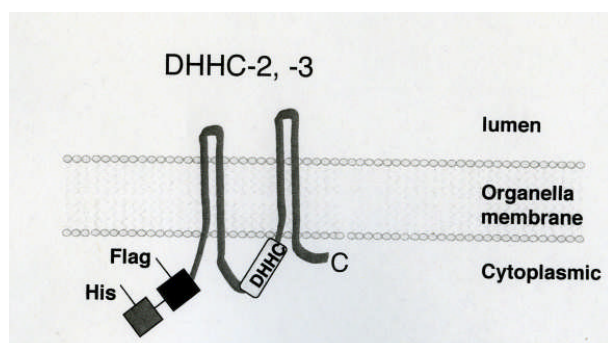
上記の得られたクローンについては、現在京大岩田研との共同研究にて共結晶化と構造解析にむけて解析を行っており、A2a受容体についてはリガンド結合阻害機能のある抗体について受容体との結晶が取得でき、高解像度での構造解析に成功している。

その他の主な多数回膜貫通型タンパク質については、

- (1)トランスポーターⅠ (8クローン)
- (2)トランスポーターⅡ (13クローン)
- (3)イオン交換輸送体 (5クローン)
- (4)胃がん高発現タンパク質 (23クローン)

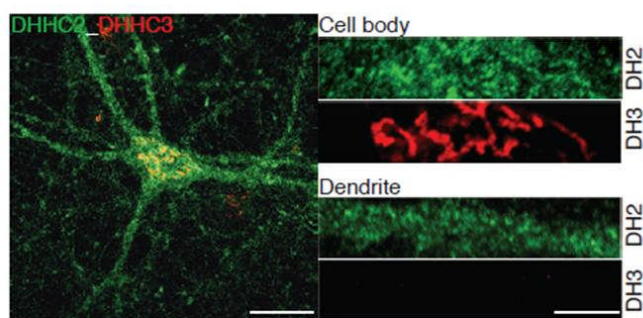
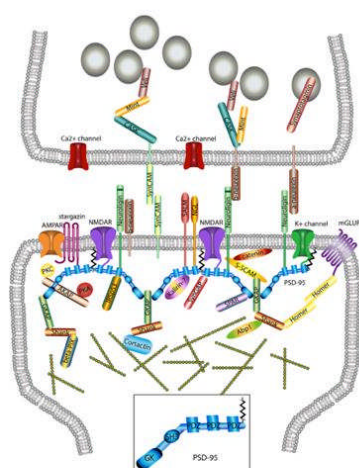
を取得し、それぞれ構造解析および機能解析、イメージングへの応用について評価している。

その他 ER タンパク質を含めて計 29 種類の膜タンパク質について 40 抗原の BV を作製し免疫した。以下に抗原と代表的抗体の評価を示す(図 2-1~10)。



DHHC-2(4 クローン)、DHHC-3(6 クローン)を樹立

岡崎生理研 深田研との共同研究



PSD(post synaptic density)におけるAMPA受容体等のScaffoldタンパクであるPSD-95をパルミトイル化し、膜への局在を制御しているのがDHHC2であることを突き止めた。 Noritake et al. *J. C. B.*

図 2-1 パルミトイル化酵素(DHHC-2 および DHHC-3)

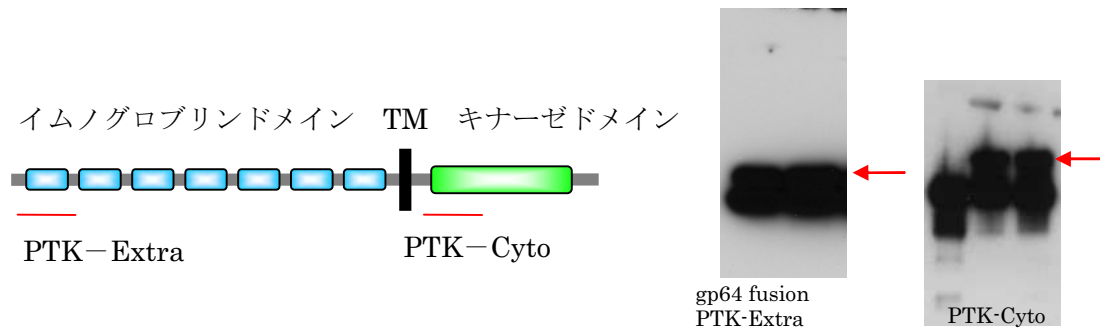


図 2-2 循環器疾患ターゲット膜タンパク質

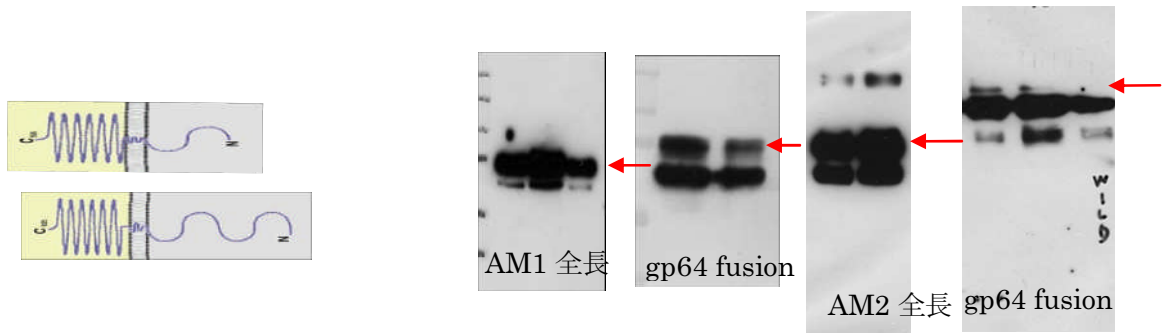


図 2-3 新規接着分子 一回膜貫通型 2 種類(AM1、AM2)

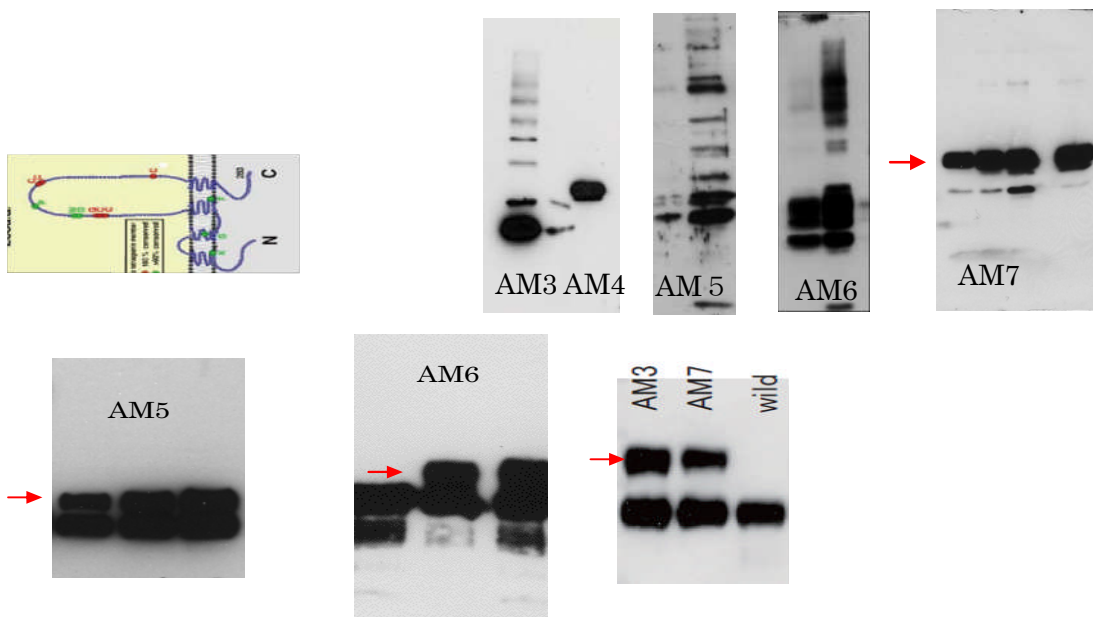


図 2-4 新規接着分子 4 回膜貫通型 5 種類(AM3~AM7)全長発現 patterns

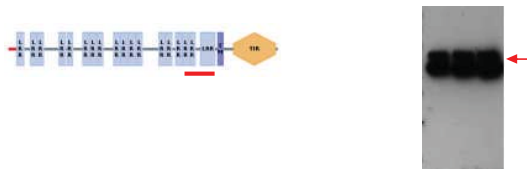


図 2-5 腎癌特異的の一回膜貫通型蛋白質(TLR3)部分エピトープの gp64fusion パターン
 TLR3 は細胞内 C 端を欠失することにより、細胞膜へソートされる。これを利用して細胞外ドメインを BV に発現させ、その BV を免疫することにより、細胞膜上の TLR3 を認識する抗体を 2 クローン取得した。これらの抗体は細胞膜上にある強制発現 TLR3 を免疫沈降(IP)することを IPMS により確認した。さらに、腎がん培養細胞 TUHR10TKB 細胞において、内在性の TLR3 の認識を FACS により試みたが、下記に示すように、サポニン処理により細胞内の TLR3 は認識するが、細胞表面にはほとんど TLR3 は検知されなかった。この抗体はヒト腎がん組織では細胞表面に抗原が認識されるため、抗体医薬の候補となりうると考えられるが、さらなる検討が必要と思われる。

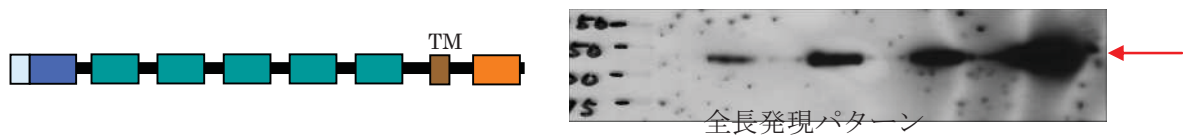


図 2-6 すい癌特異的の接着分子(Amigo2)一回膜貫通型
 抗体医薬候補をペルセウスプロテオミクス社と共同で開発した(後述)。

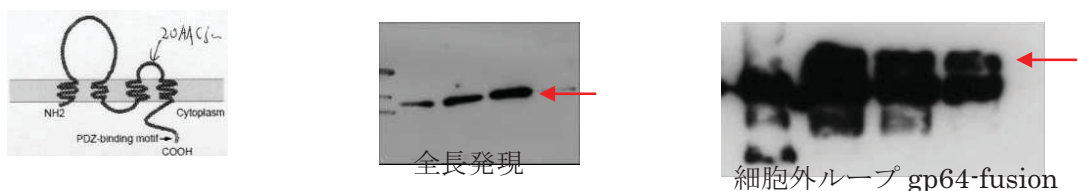


図 2-7 Claudin1(tight junction protein, claudin-1 は表皮のバリアー)
 抗血清価上昇を確認したが、モノクローナル抗体の取得には至っていない。

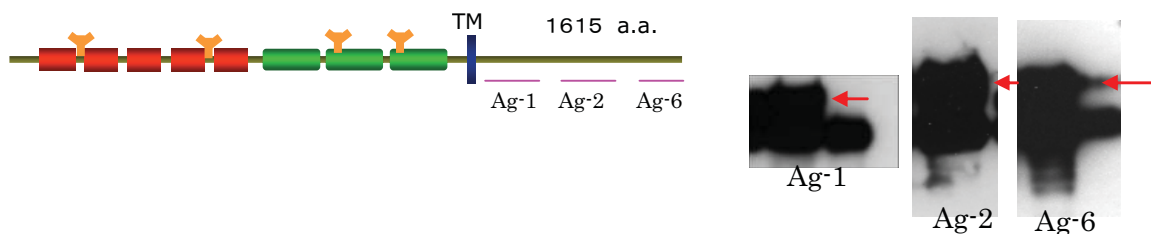


図 2-8 肝癌特異的のマーカー蛋白質 Robo1 C 端(細胞内)
 細胞内および細胞外について数 10 クローンを取得している。細胞外認識抗体について

はすでに中外製薬との共同研究により BV 免疫にて取得したクローンのうちもっとも活性の高いモノクローナル抗体 5209 を選定し、mFcFvSA 化等、抗体改変を行い PET イメージングに供した(後述)。また、N 末端抗体 7241 は gp64 フュージョンにて作製し、細胞表面上の ROBO1 は認識しないものの、WB や免疫組織染色には高い特異的なシグナルを検出する抗体であることが判明し、組織染色により、肝がん以外の肺がん、扁平上皮がんなどに高発現であること、および腫瘍新生血管の内皮細胞に高発現であることがわかり、血管新生阻害薬としての可能性が示された(後述)。さらに、細胞表面を認識するクローンでは、免疫沈降-MS 解析により、シグナル伝達に重要な分子の候補を同定することができた(後述)。これらの機構解明は抗体医薬のより効果的な治療法の開発につながると期待される。

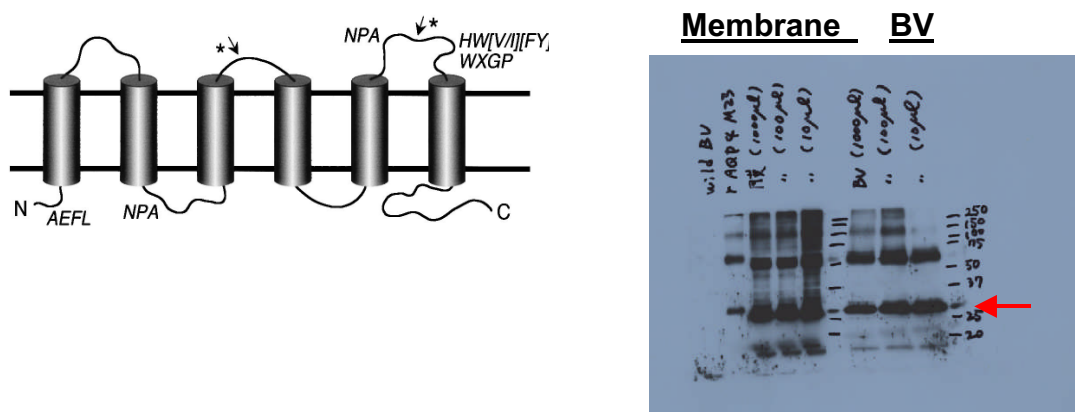


図 2-9 アクアポリン 4

アクアポリン 4 は水分子を細胞内に取り込むチャネル膜タンパク質として同定されたアクアポリンのファミリータンパク質の一つである。脳のアストロサイトに多く存在し、脳浮腫との関連で関心がもたれている。また、多発性硬化症の自己抗体がアクアポリン 4 に対して作られることから、自己免疫疾患との関連も注目されている。

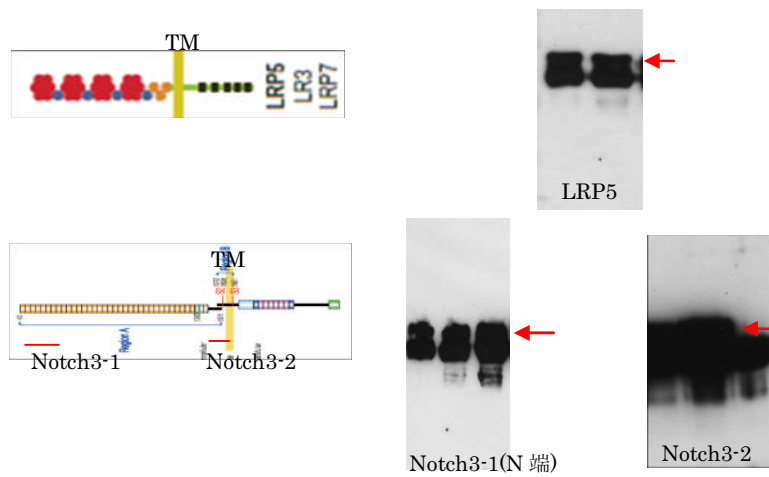


図 2-10 LRP5、Notch3(乳がん特異的ターゲット)

スクリーニング法に関する開発

スクリーニング法について、ステアブル発現細胞 FACS 法に加えて、発現 BV を用いる BV ELISA 法を開発した。抗血清評価、スクリーニングに有効である(図 3 参照)。

さらに、膜タンパク質の最適化した抗原投与方法、コロニー選択法を開発し(図 4、図 5)、ER の 4 回膜貫通型タンパク質 2 種類について内在性タンパク質を認識する抗体を取得、および従来法で作製困難な GPCR3 種類について FACS 可能な抗体を取得した(図 6)。図 7 に抗 GPCR(M2)抗体の 1 例を示す。

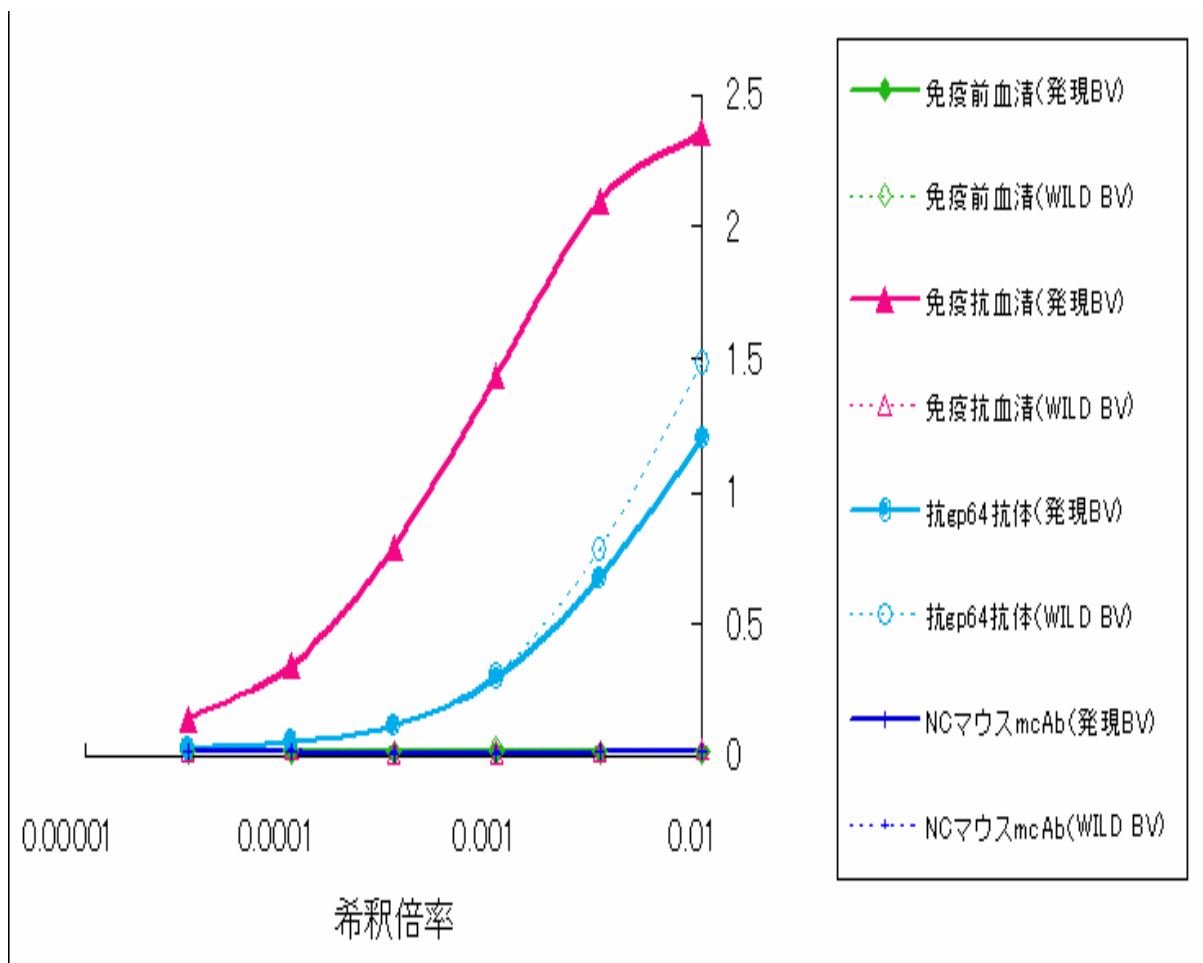


図3 発現 BV を用いる BV ELISA 法

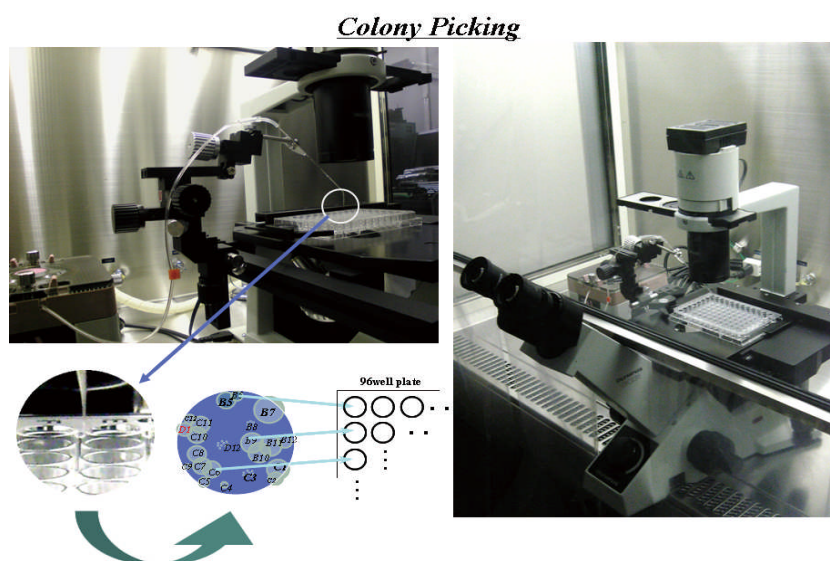


図4 コロニー選択法の開発

一次スクリーニング時の96穴プレートに形成されたコロニーをマイクロマニピュレー

ターにより一つ一つピックし、独立したウェルに移送する。

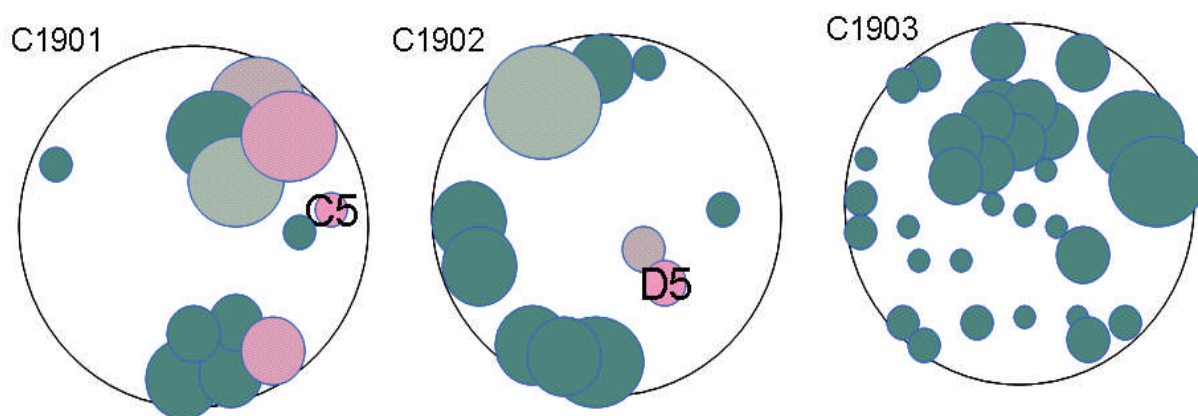


図5 コロニー選択法の一例

ムスカリン受容体 M2(GPCR)を BV に発現(図 2 参照)し、M2 ノックアウトマウスに免疫した。抗血清価をドットプロットで評価後フュージョンを行い、1st スクリーニングでコロニー選択を行った。ピンクで図示したものが陽性であることが判明したコロニー。

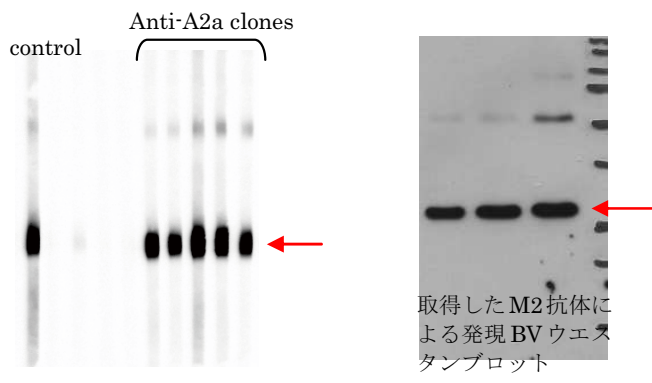
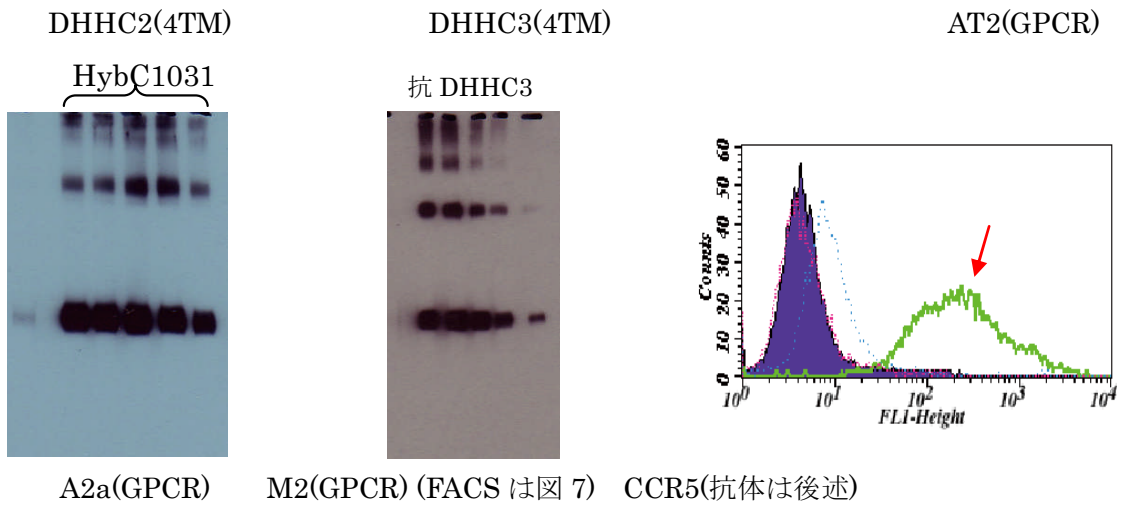


図 6 抗体を取得した膜タンパク質(多数回膜貫通型)

抗体取得例 抗M2(ムスカリン)抗体

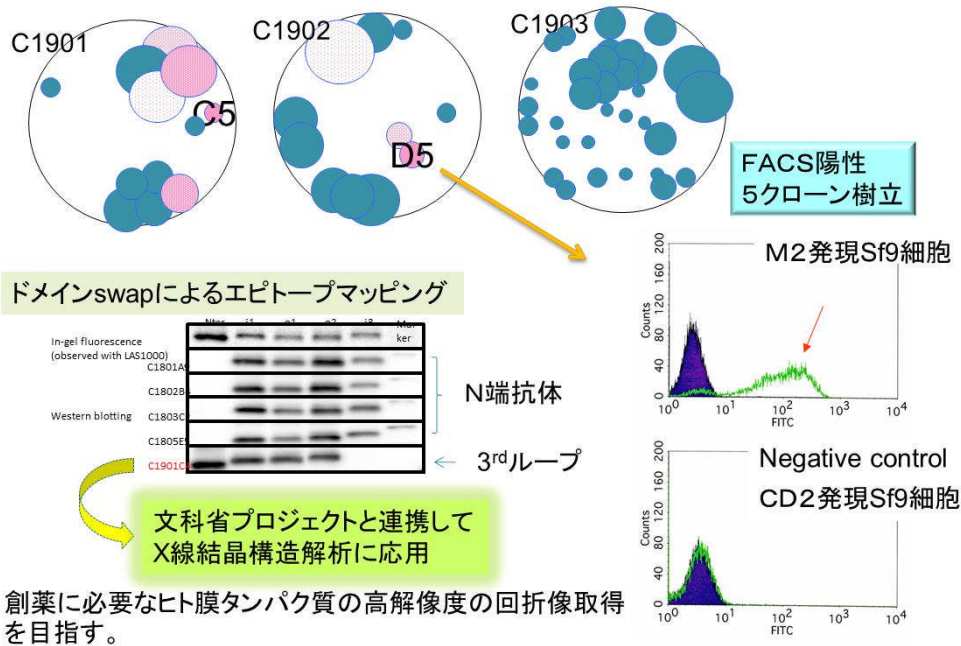


図7 GPCR(M2)抗体の取得例

2)様々な疾病のマーカー候補として、癌関連(54種類)、心血管系疾患(45種類)、糖尿病(29種類)、精神神経疾患(17種類)、骨運動器疾患(10種類)その他核内タンパク質あるいはシグナル伝達複合体あわせて165種類244抗原でBVおよびgp64フュージョンBVを作製した。

3)リコンビナントウイルスの作製法を改良し、抗原作製の簡便化と効率化を図った。これまでリコンビナントウイルスの作製は、pBacSurf1あるいはpBlueBacベクターを用いてきた。これらのベクターは、Sf9細胞の中で相同組み換えによって抗原タンパク質の遺伝子をバキュロウイルス遺伝子に移す。しかし、その効率が非常に低いため、組み換えが起こらない野生型のウイルスを除く必要があった。その操作は煩雑で野生型のウイルスを完全に除けない危険性があり、実際にウイルスを増幅する過程で野生型のウイルスが増えてしまうトラブルもあった。そこで、大腸菌の中で相同組み換えを起こすBac-to-bac法を試みた。この方法は、大腸菌の中での相同組み換え効率が高いため、通常の実験レベルではリコンビナントウイルスの精製を行う必要がなく、ウイルス作製に要する時間と労力が少なくできる利点がある。いくつかの組み換え体を作製し、相同組み換えの効率を調べてみた。そうしたところ、組み換えの効率が高いことは確認できたが、やはり野生型の混入が認められるものがいくつか見つかった。この点を改善するために、一回大腸菌の中で組み換えをおこしたバクミドをさらにもう一回大腸菌に形質転

換し、組み替え体と野生型を完全に分離することに成功した(図 9)。ウイルスの作製を Bac-to-bac 法に変えたことで BV 調製に要する過程を平均 3 ヶ月から 1 ヶ月半に短縮できた。また、この方法では、トランスフォーメーション後 10 日前後で発現チェックができることから、発現のよくない抗原について、迅速に対応できるようになった。さらに Bac-to-bac 法で gp64 フュージョンタンパク質を作製するためのベクターを独自に作製し、gp64 フュージョンタンパク質発現ウイルスの作製方法についても検討を行った。抗原タンパク質の発現が悪いものについて、抗原の長さを 30 アミノ酸まで短くすることで発現を上げることができ、抗体の作製にも問題が無いことを確かめた。

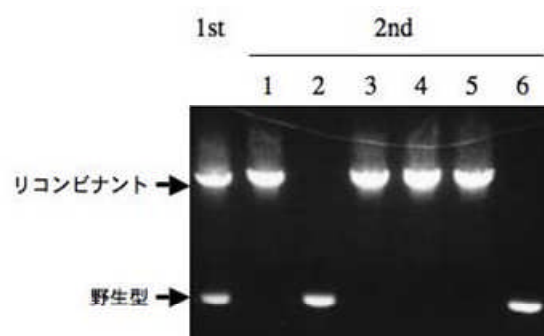


図 8 転写因子 X リコンビナントバクミドの精製

転写因子 X のバクミドを作製したところ、野生型とリコンビナントが混在していた (1st)。これをもう 1 回トランスフォームすることで野生型 (2, 6)、とリコンビナント (1, 3, 4, 5) に分けることができた (2nd)。

4) HIV 感染受容体 CCR5 に対する抗体の作製

AIDS の発症および AIDS による死亡者数は、1996 年以降の多剤併用療法の導入により劇的に減少した。しかしながら脂質代謝異常などの副作用や薬剤耐性ウイルスの出現を抑制する目的で、CD4 陽性リンパ球数が $200/\text{mm}^3$ 以下となるまで治療開始をなるべく遅らせる方針がとられてきた。近年、多くの大規模試験において $350\text{-}500/\text{mm}^3$ 以下で治療を開始することの優位性が報告されるようになり、治療開始時期が早まる傾向が強くなっている。この治療開始時期の早期化は新たな薬剤の開発により可能になってきており、今後も新たな薬剤の開発が求められている。

ケモカインレセプター CCR5 は免疫細胞の細胞膜に発現する G タンパク質共役型受容体であり、MIP1 α や RANTES と結合して免疫細胞に遊走刺激を伝達する。HIV はこの CCR5 をコレセプターとして利用して免疫細胞に感染する。CCR5 が HIV の表面タンパク質 gp120 との結合に重要である場所は大きく 2 つあるといわれており、1 つは N 端領域の硫酸化修飾されたチロシン残基群であり、もう 1 つは第 2 細胞外ループを含む膜貫通領域である。現在、抗 HIV 薬として承認されている薬剤のうち CCR5 阻害剤はマラビロクのみであり、マラビロクは CCR5 の膜貫通領域にはまり込むことで gp120 と CCR5

と結合を阻害する。また様々なグループにより抗 CCR5 抗体を CCR5 阻害剤として使用する試みが報告されているが、HIV と CCR5 との結合を強く阻害する抗体は第 2 細胞外ループに結合する抗体であり、CCR5 の N 端領域に結合する抗体で強く阻害する抗体は作製されておらず、抗 HIV 薬の新たなターゲットとなると考えられる。

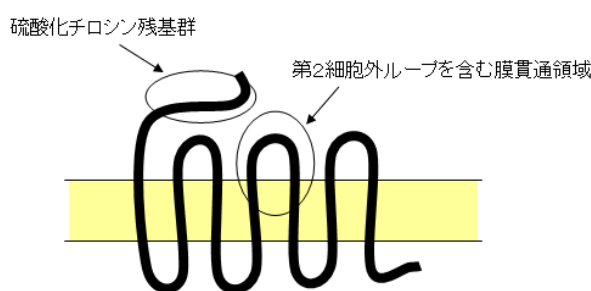


図 9 Gp120 が結合する CCR5 の部位

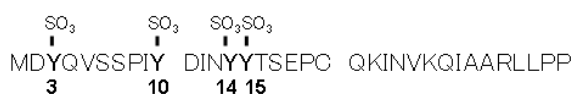


図 10 CCR5 N 端領域の硫酸化チロシン

γ セクレターゼ複合体の阻害抗体の作製について : γ セクレターゼはアルツハイマー症で変性部位に蓄積する β アミロイドをその前駆体 APP から α セクレターゼに引き続いて切断して生成するプロテアーゼである。4 種の膜タンパク質(プレセニン、ニカストリン、PEN2、APH)の複合体となって活性を持つ。γ セクレターゼの生理的意義は明確ではないが、家族性アルツハイマー症の原因遺伝子がプレセニンの変異であることから、アルツハイマー症の引き金として注目を浴びており、その阻害剤が治療薬として試されている。γ セクレターゼの基質として、APP のほかに Notch 等が知られており、γ セクレターゼの阻害剤は副作用が懸念される。γ セクレターゼの基質特異性はニカストリンにより調節されているとする仮説があり、ニカストリンに対する抗体はその機構を解明する手がかりとなると期待される。東大薬学部岩坪研との共同研究により、NEDO プロジェクトにより取得した抗体には、直接 γ セクレターゼを阻害するものと、細胞内で intrabody として scFv を発現させると γ セクレターゼの maturation を阻害するもの(Hayashi et al. JBC, 2009)との 2 種類があることがわかった。

また、診断的価値の高い抗体が2種類得られている。ひとつはDJ-1の酸化型を特異的に認識するもので、もうひとつはアスパラギン合成酵素を認識する抗体である。両者とも可溶性タンパク質で膜タンパク質ではないが、通常免疫では抗体が得られにくい。BV上に発現して免疫することにより、有用性が高いと考えられる抗体が取得できた。

酸化DJ-1抗体

DJ-1はPARK7とも呼ばれ、パーキンソン病の原因遺伝子のひとつと考えられている。産総研二木研究室の斎藤らにより、システイン残基の酸化型の分離法が確立され、本NEDOプロジェクトとの共同で酸化型DJ-1を特異的に認識する抗体の取得を試みた。斎藤らの分析によりBV上に発現したDJ-1タンパク質はすでに酸化されていることが判明し、これを免疫することにより、下図に示すように酸化DJ-1のみを特異的に認識する抗体の取得に成功した。この抗体を用いてパーキンソン患者の未治療群の赤血球を調べたところ有意に酸化型が増加していることが示された。酸化ストレスの実態が捉えられるようになったことは意義が深く、またパーキンソン症の病態究明に利用価値が高いものと考えられる。

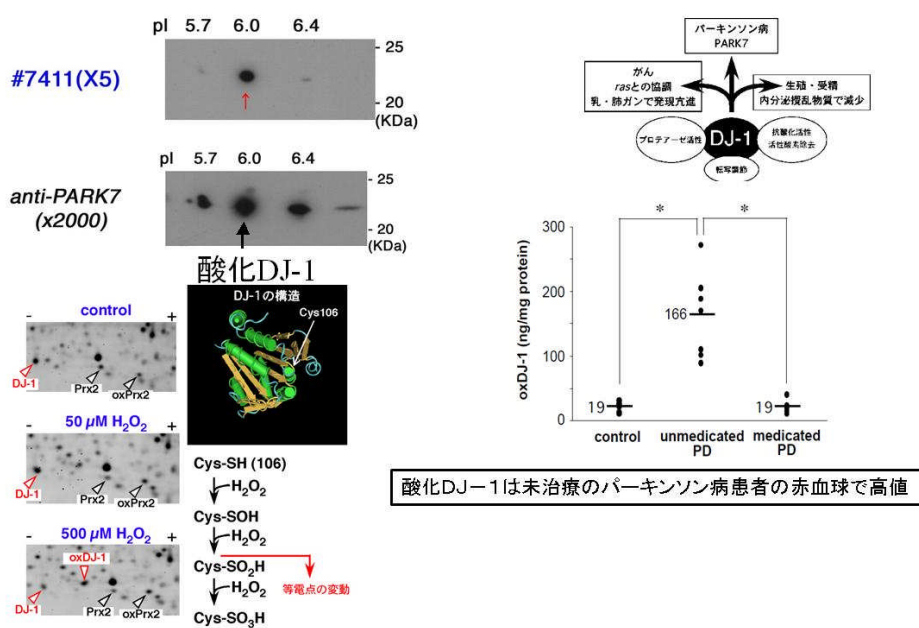


図 11 酸化DJ-1 認識抗体

アスパラギン合成酵素に対する抗体

小児急性リンパ性白血病の治療としてL-アスパラギナーゼがよく用いられている。白血病細胞ではアスパラギン合成酵素のレベルが低く、L-アスパラギナーゼによってアス

パラギンを枯渇させることにより、自ら合成できない白血病細胞のみを障害させる治療戦略である。したがって、白血病細胞でアスパラギン合成酵素の量を測定することは治療効果の判定に重要である。本プロジェクトでは、愛知医科大学の鬼頭研と共同で、アスパラギナーゼを gp64 フェージョンで BV に発現した。

次章にて述べる FOXP3 も細胞内可溶性タンパク質であるが、適切な固定を行うことにより抗体でフローサイトメトリー検査への応用を図ることができる。

5)がん表面抗原標的タンパク質に対する抗体の作製(ペルセウスプロテオミクス社との共同研究)

A)Neurotrimin(HNT)

HNT はが脳で発現する接着分子イムノグロブリン様スーパーファミリーに属し、脳の発達における神経回路形成に関わる分子である。最近では、HNT は上皮性卵巣癌で発現が亢進しているという報告がある。

HNT は三つのイムノグロブリンドメインを持つ GPI アンカータンパク質である(図 12)。本研究において、膀胱癌組織を用いた DNA マイクロアレイの遺伝子発現解析により、hnt 遺伝子の発現量が癌組織において特異的に多いことを見出した(図 13、14)。この膀胱癌組織に高発現する HNT をがん治療標的分子とし monoclonal 抗体を作製し、分子標的がん治療抗体薬の開発を試みた。

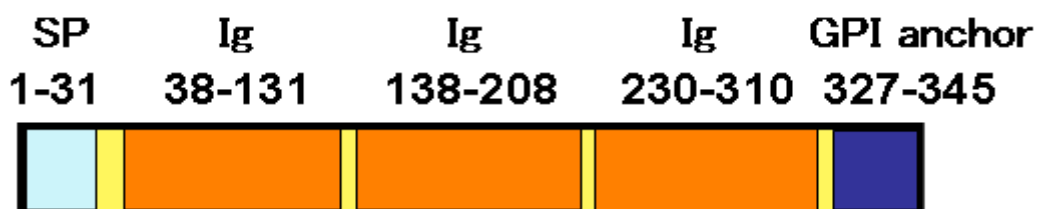
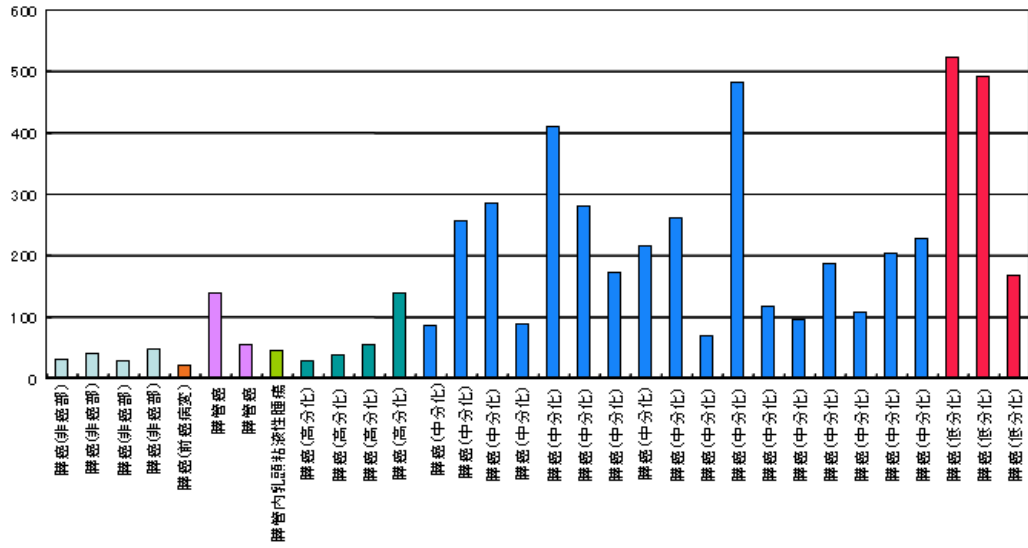


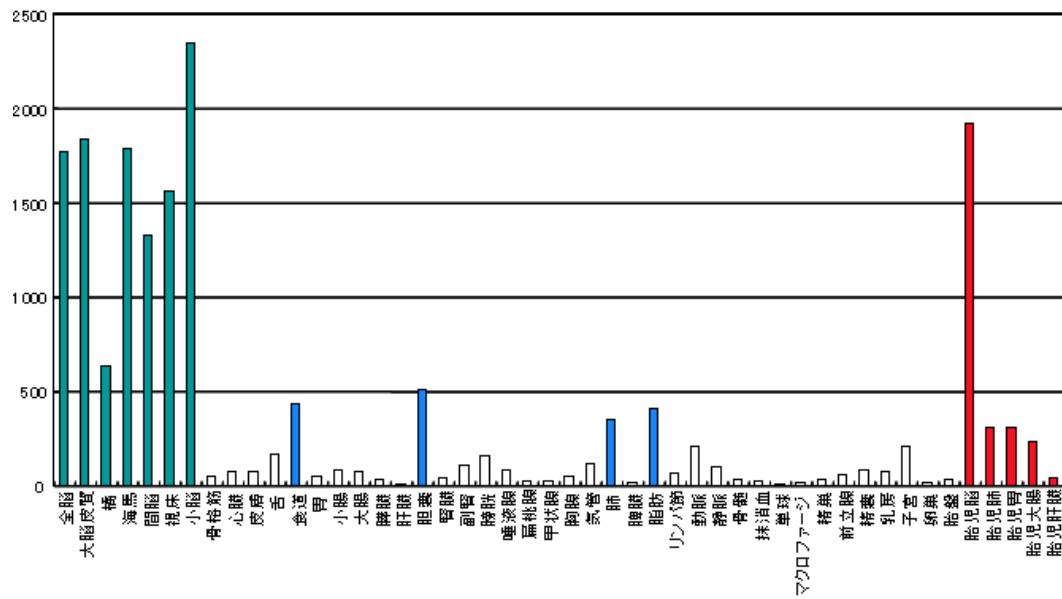
図 12 HNT タンパク質の分子構造



GeneChip U133 plus 2

Nor panin duct IPMN well mod poor

図 13 膵癌における HNT の mRNA 発現



GeneChip U133 plus 2

図 14 正常組織における HNT mRNA の発現

a)抗体の作製

i)抗原の作製

HNT の cDNA は、PCR 法によってクローニングされた。得られた HNT の cDNA を制限酵素の処理によりバキュロウイルス発現系ベクター pBlueBac 4.5、また、哺乳類細胞発現用ベクター pEF/Myc-His B に組み込んだ。分泌型 HNT(sHNT)を得るため、HNT 細胞外部分をコードする cDNA を哺乳類細胞発現用ベクター pEB6CAGMCS-I-GFP へ組み込んだ。続いて、HNT の安定発現細胞株及び sHNT の安定発現細胞株を作製した。それぞれの発現 plasmid を用いて、CHO 細胞に transfection し、限界希釈法によりクローニングした。その結果、HNT 全長発現 CHO クローン(EXZ1903-4)及び、sHNT 分泌する CHO 細胞(EXZ1802)が得られた。EXZ1903-4 を monoclonal 抗体作製時の screening に使用した。EXZ1802 細胞株を無血清培地(CHO-S-SFM-II)で培養を行い、培養上清の精製により sHNT-HIS 融合タンパク質を得た。この精製蛋白質は免疫原として使用した。

次いで、Invitrogen 社の指示書に準じて pBlueBac 4.5 及び BAC-N-BLUE DNA と共に SF 9 細胞に導入し、HNT 全長タンパク質発現組み換えバキュロウイルスを調製した。調製した組み換えバキュロウイルスを Sf9 細胞に感染させ、27°C で 3 日間培養した。HNT 全長タンパク質を発現する発芽型バキュロウイルス(BV)は 3 日間培養後の培養上清より回収した。

ii)免疫及び抗体の取得

sHNT タンパク質を免疫原とした monoclonal antibody の作製

生理食塩水に溶解した 50µg の sHNT タンパク質と Titer-MAX を等量混合して MRI-lpr マウスに免疫した。最終免疫から 3 日後にマウスの脾臓細胞を無菌的に調製し、ポリエチレングリコール法によってマウスミエローマ細胞 NS-1 との細胞融合を行った。

HNT 発現 BV を免疫原とした monoclonal antibody の作製

1mg のタンパク量に相当する HNT 全長発現 BV を生理食塩水に懸濁し、200ng の百日咳毒素と混合したものを gp64 トランスジェニックマウスに免疫した。最終免疫から 3 日後にマウスの脾臓細胞を無菌的に調製し、ポリエチレングリコール法によってマウスミエローマ細胞 NS-1 と細胞融合した。

陽性ハイブリドーマの screening

抗体を産生する陽性 hybridoma の screening は、sHNT タンパク質を免疫原として作製したハイブリドーマ株については、HNT 発現 BV 固相化 ELISA、HNT 発現 BV を免疫原として作製したハイブリドーマ株については sHNT 固相化 ELISA によって行った。一次 screening の陽性ハイブリドーマの培養上清につき、HNT 強制発現細胞株 EXZ1903-4 及び CHO 細胞を用いて二次 screening を行った。

b)抗体の特性

In vitro ADCC、CDC 活性

分子標的がん治療抗体の作用機序の一つは、antibody-dependent cytotoxicity(ADCC)

及び complement dependent cytotoxicity(CDC)を利用し、がん細胞を殺すと考えられている。従って、抗 HNT タンパク質抗体が ADCC 活性又は CDC 活性を有するかどうかを調べた。その結果、いくつかの抗体が強い ADCC 活性、また、CDC 活性を示した。

In vivo 抗腫瘍効果

In vitro で一番強い ADCC 活性を示した PPZ4070 抗体を用いて、抗腫瘍効果を検討した。具体的には、HNT タンパク質強制発現 Mia Paca2 細胞株を SCID マウスの皮下に 1×10^6 細胞個/マウスとなるように移植した。腫瘍体積が $100\text{mm}^3 \sim 200\text{mm}^3$ になった時点でランダムに群分けし、それぞれの群に PPZ4070(30mg/kg)、また抗体の isotype control K7124 抗体(30mg/kg)を静脈で投与した。投与は毎週 2 回で、計 8 回だった。その結果、図 15 が示したように、PPZ4070 抗体は、腫瘍の増殖を阻害した。

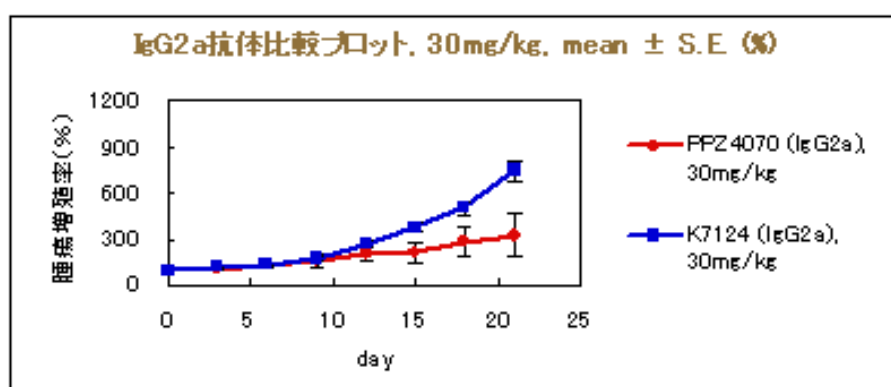


図 15 PPZ4070 の抗腫瘍効果

B)Amigo2

Amigo2 は、Amigo family に属する 1 回膜貫通型タンパク質である。同じファミリーである Amigo1 及び Amigo2 と、アミノ酸数、ドメイン、及び遺伝子配列のホモロジーが極めて類似している。Amigo ファミリーのタンパク質の構造は、全て類似し細胞外に 6 つの leucine rich repeats(LRRs)を持ち、これらのドメインを挟むようにして LRR アミノ末端ドメインと LRR カルボキシル末端ドメインが存在する。また、細胞外の膜貫通ドメインの近くには、immunoglobulin ドメインが存在する(図 16)。Amigo ファミリーは、神経組織に発現し、細胞接着分子として機能することが示唆されている。本研究では、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果より、膵臓癌組織において、Amigo2 遺伝子の発現量が正常な膵臓組織よりも多いことを見出した(図 17、18)。更に、組織免疫染色により膵臓癌患者さんの検体から Amigo2 タンパク質の発現が高いことを確認した(図 19)。一方、各正常組織において、Amigo2 タンパク質の発現がほとんど検出されなかった。以上のことより、Amigo2 が抗体治療薬の治療標的候補になることを示唆された。本研究は Amigo2 に対する monoclonal 抗体を作製、分子標的がん治療抗体薬の開発を試みた。

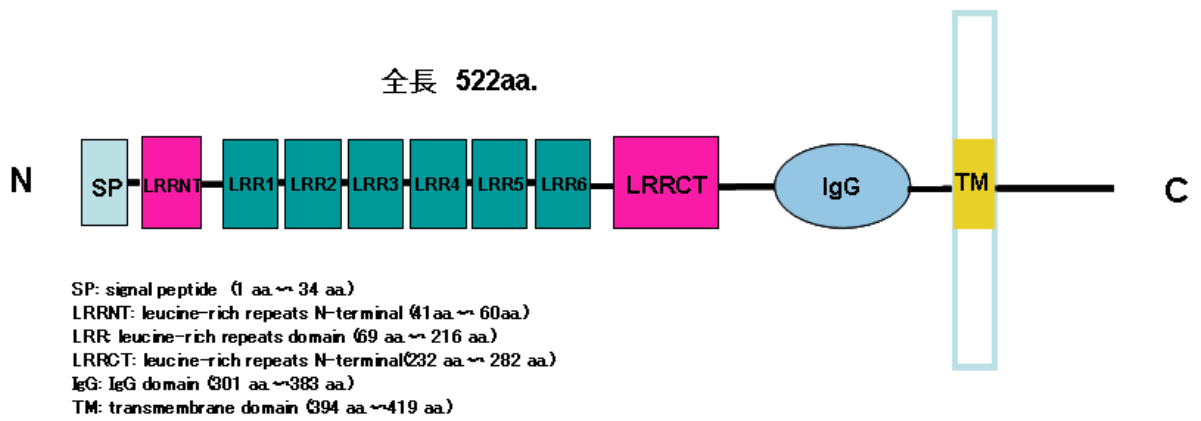
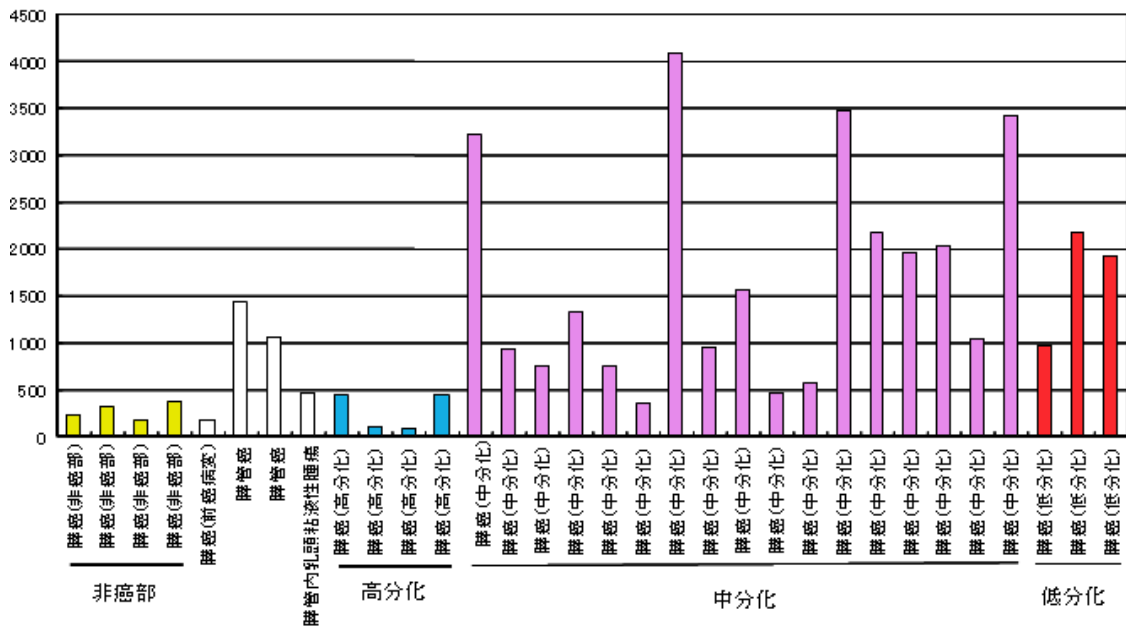
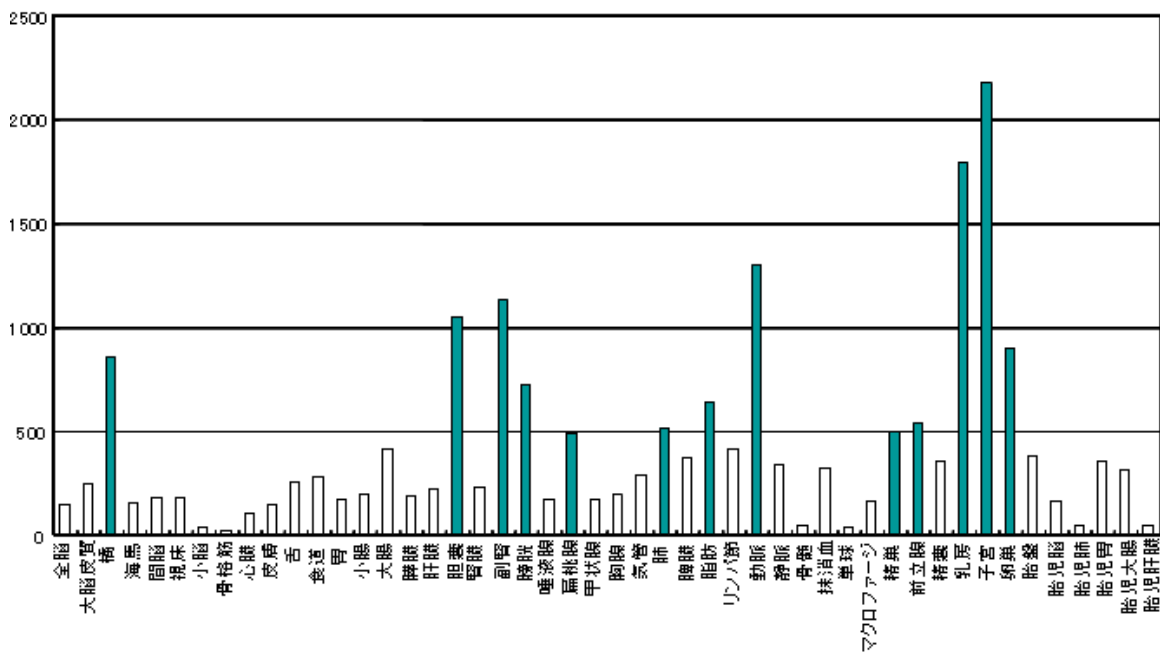


図 16 Amigo2 タンパク質の分子構造



*全RNAを各10ngずつ用い、GeneChipU133APlus2.0(Affymetrix社製)で遺伝子発現を解析した。

図 17 膵癌における amigo2 の mRNA 発現



*各種ヒト正常臓器組織の全RNAを各10ngずつ用いて、GeneChipU133Plus 2.0 (Affymetrix社製)で遺伝子発現解析した。

図 18 正常組織における amigo2 mRNA の発現

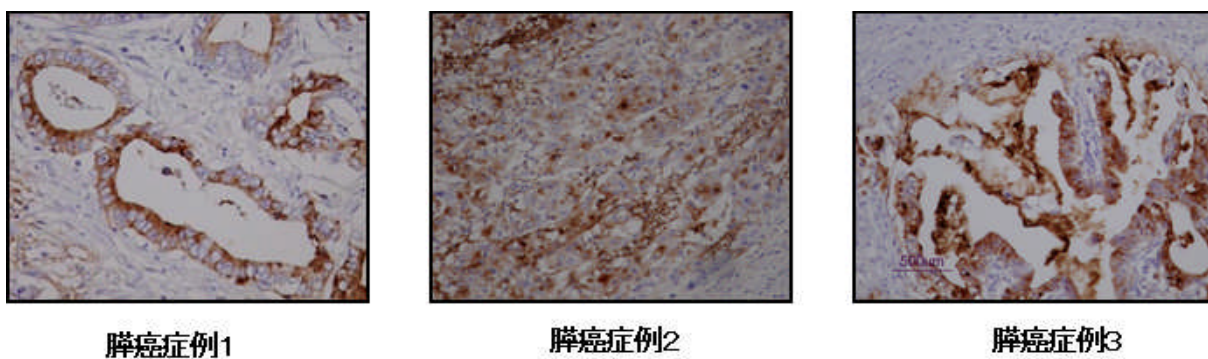


図 19 膵癌における Amigo2 タンパク質の発現

a)抗体の作製

i)抗原の作製

Human Amigo2 の細胞外部分(aa1~aa393)に相当する DNA を PCR により得られ、哺乳類細胞発現用ベクターpEF/Myc-His に組みこみにより、発現 plasmid を作製した。この発現 plasmid を CHO 細胞に導入し、human Amigo2 Fragment (sAMIGO2)を上清中に分泌する細胞の安定株を樹立した。sAMIGO2 は安定株の培養上清から HisTrap カラムにより精製した。この精製蛋白質を免疫原として使用した。

また、Human Amigo2 の全長 cDNA を発現ベクターpEF/Myc-His に組みこんだ。この Human Amigo2 全長発現 plasmid を CHO 細胞に transfection し、限界希釈法にてク

ローニングを行ない、安定発現株の樹立を行なった。この Human Amigo2 の強制発現 CHO 細胞を用いて、抗体を産生する陽性 hybridoma の screening を行った。

ii) 抗体の作製

抗 Amigo2 monoclonal 抗体を得るために、精製した sAmigo2 蛋白質を免疫原として MRL/lpr マウスに免疫した。最終免疫をおこなった後に脾臓細胞を取り出し、常法に従ってポリエチレングリコール法によりマウスミエローマ細胞との細胞融合を行った。

抗体を産生する陽性 hybridoma の screening は、全長 Amigo2 を発現する CHO 細胞株、及び CHO 細胞を用いてフローサイトメトリで行った。陽性 hybridoma は、上清が全長 Amigo2 細胞と反応し、CHO 細胞と反応しないものを選択した。その後、cloning, secondary screening を行い、最終的に取得した抗体産生 hybridoma をマウスに移植し、腹水より精製抗体を得た。

b) 抗体の特性

In vitro ADCC、CDC 活性

抗 Amigo2 抗体が ADCC 活性又は CDC 活性を示すかどうかについて調べた。その結果、いくつかの抗体が強い CDC 活性、また、ADCC 活性を示した。

In vivo 抗腫瘍効果

In vitro で強い ADCC、CDC 活性を示した PPZ3124 抗体を用いて、抗腫瘍効果を検討した。具体的には、Human Amigo2 強制発現膵がん細胞株 Mia Paca2 を SCID マウスの皮下に 5×10^6 細胞/マウスとなるように移植した。腫瘍体積が $100\text{mm}^3 \sim 200\text{mm}^3$ になった時点でランダムに群分けし、それぞれの群に PPZ3124 (1~10mg/kg)、また抗体の isotype control K7124 抗体 (10mg/kg) を静脈で投与した。投与は毎週 2 回で、計 10 回だった。その結果、PPZ3124 抗体は、腫瘍の増殖を阻害した。

C) ENPP3

ヒト前立腺からクローニングされたオリゴヌクレオチド、ヌクレオシドリン酸や NAD の加水分解を触媒する酵素 ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) のファミリーに属しているタイプ II 膜貫通型糖蛋白質である。本研究では、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果より、腎癌組織において、enpp3 遺伝子の発現量が正常な腎臓組織より多いことを見出した(図 20)。更に、組織免疫染色により腎癌患者さんの検体から ENPP3 タンパク質の発現が高いことを確認した(図 21)。本研究は ENPP3 に対する monoclonal 抗体を作製し、分子標的がん治療抗体薬の開発を試みた。

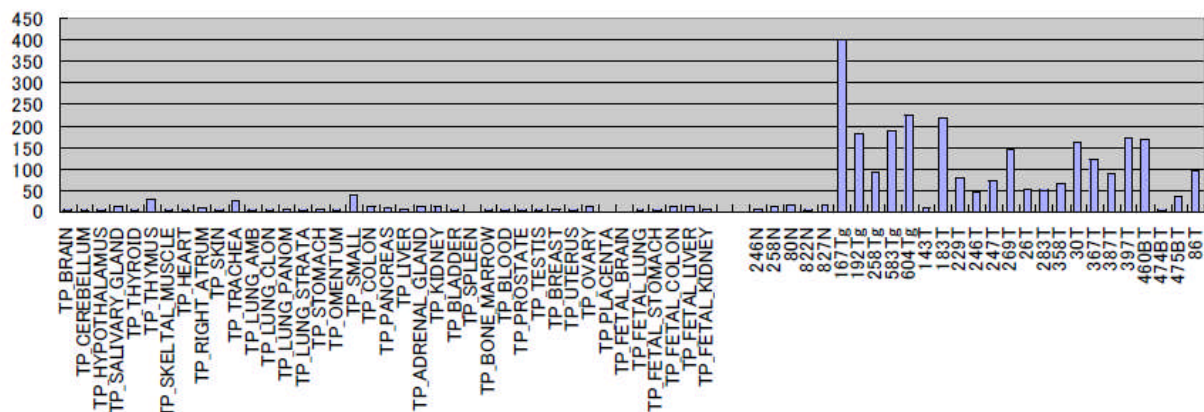


図 20 腎癌及び各正常組織における enpp3 mRNA の発現

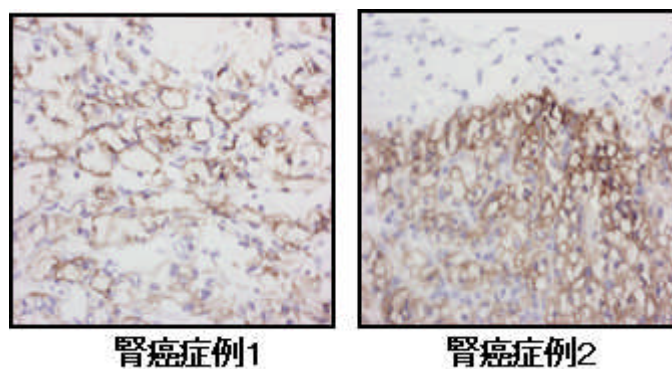


図 21 腎癌組織における ENPP3 蛋白質の発現

a)抗体の作製

i)免疫原の作製

ENPP3 蛋白質全長相当する DNA に HA をコードする塩基配列を付け、哺乳類細胞発現用ベクター-phCMV に組みこんだ。この発現 plasmid を HEK293 細胞、また、CHO 細胞に導入し、限界希釈法によってクローニングを行ない、それぞれの安定発現株を樹立した。ENPP3 の強制発現 HEK293 細胞を免疫原として使用した。ENPP3 の強制発現 CHO 細胞を用いて、抗体を産生する陽性 hybridoma の screening を行った。

また、ENPP3 蛋白質全長相当する DNA に HIS をコードする塩基配列を付け、バキュロウイルス発現系ベクター-pBlueBac 4.5 に組みこんだ。指示書に準じてこの pBlueBac 4.5 plasmid 及び BAC-N-BLUE DNA と共に Sf9 細胞に導入し、ENPP3 全長タンパク質発現組み換えバキュロウイルスを調製した。調製した組み換えバキュロウイルスを Sf9 細胞に加え感染させた後、27°C で 3 日間培養した。ENPP3 全長タンパク質を発現する発芽型バキュロウイルス(BV)は 3 日間培養後の培養上清より回収した。

ii)抗体の作製

抗 ENPP3 抗体を得るために、ENPP3 の強制発現 HEK293 細胞を免疫原として MRL/lpr マウスに免疫した。最終免疫をおこなった後に脾臓細胞を取り出し、常法に従ってポリエチレングリコール法によりマウスミエローマ細胞との細胞融合を行った。また、ENPP3 全長タンパク質を発現する発芽型バキュロウイルスを免疫原として gp64 トランスジェニックマウスに免疫した。最終免疫をおこなった後に脾臓細胞を取り出し、常法に従ってポリエチレングリコール法によりマウスミエローマ細胞との細胞融合を行った。抗体を産生する陽性 hybridoma の screening は、全長 ENPP3 を発現する CHO 細胞株、及び CHO 細胞を用いてフローサイトメトリで行った。陽性 hybridoma は、培養上清が全長 ENPP3 の強制発現 CHO 細胞と反応し、CHO 細胞と反応しないものを選択した。その後、cloning, secondary screening を行い、最終的に取得した抗体産生 hybridoma をマウスに移植し、腹水により精製抗体が得られた。ENPP3 については、他社がん治療抗体薬の先行開発及び他社に先に特許権利化されたことが判明し、本研究はその時点で中止とした。

抗体の寄託について

本新機能抗体作製プロジェクトにて作製した抗体および先行する FOCUS プロジェクトと NEDO タンパクチッププロジェクトにおいて作製した抗体については、参加企業の要請により製品化されているものあるいは今後製品化の予定のあるもの、特許の範囲にあるものを除いて、広く一般の研究者および抗体製品開発企業に活用されることを目的としてパブリックのリソースセンターに寄託することとした。このため、平成 22 年度はまとめとクローンの選定および寄託のための細胞の凍結とデータ整理を行った。

理研バイオリソースセンターへの寄託を予定しており、まず前提条件のマイコプラズマ感染について、貯蔵室素タンク別のチェックを行い、感染フリーであることを確認した。

①-2 DNA 免疫法による GPCR など細胞膜タンパク質に対する抗体の作製法の開発

(東京理科大学基礎工学部)

1)研究の背景

既存の医薬品の約半数は G タンパク質共役型受容体(GPCR)を標的としており、機能が未知である GPCR のリガンドの同定や機能予測は、医薬品を開発する上で最も重要なシード開発研究である。

機能未知 GPCR の機能は、その組織・細胞での発現情報によって予測、推定が可能であることから、機能未知 GPCR に対する抗体の調製がシード開発の中心課題の一つになる。

また、リガンドが明らかになっている GPCR であっても、アンタゴニスティック抗体

やアゴニスティック抗体が得られれば、リガンドの同定などの機能解析研究に有用なだけでなく、それらの抗体を抗体医薬のシードとして開発することが可能になる。

GPCR を単離、精製することは極めて困難であることから、これまでは細胞外ドメインのペプチド免疫による抗体作製が試みられてきた。しかしながら、GPCR の立体構造を認識し、リガンドの結合を阻止でき、組織・細胞での発現を解析できるような抗体の作製に成功した例は希有であり、市販の抗 GPCR 抗体の品質は極めて粗悪であるといわれている。

2) 研究の目的

本研究では、これまで困難であった GPCR の立体構造を認識し、リガンドの結合を阻止でき、組織・細胞での発現を解析できるような抗体を効率よく作製する方法の確立を目指す。戦略としては、我々が開発してきた抗体作製に最適化した DNA 免疫法をさらに GPCR など細胞膜タンパク質に特化し、機能未知の GPCR に対しても効率よくモノクローナル抗体を作製できるシステムを構築する。さらに、組換えウイルスベクターを用いたプライムブースターによる抗体応答の促進や、遺伝子導入した樹状細胞を用いた細胞免疫によって免疫寛容を打破し、マウスとヒトで保存されている GPCR であってもマウスのモノクローナル抗体を作製できるシステムを確立したい。

3) 方法(DNA 免疫法)の特徴と期待される利点

DNA 免疫では、マウスの免疫から抗体の検出までのすべての過程がプラスミドベクターによる発現系を用いたもので可能であり、抗原の精製は一切行う必要がなく、迅速な抗体作製が可能である(図 22)。これまで、DNA 免疫によって細胞性免疫は強く誘導することができるが、抗体応答はほとんど誘導できないとされていた。

我々は DNA 免疫を抗体応答に最適化し、強い抗体応答を誘導する免疫法の確立に成功している(未発表)。用いるプラスミドベクターには Gateway システムが導入されており、目的遺伝子をさまざまな目的に適したプラスミドベクターに効率よく組み込むことができる。

さらに我々は、GPCR など細胞膜タンパク質に対する抗体作製を可能にする分子アジュバントとして、大腸菌のシャペロンタンパク質である Gro-EL が有用であることを見いだしている(国際特許申請中)。

DNA 免疫では、マウス体内で発現したタンパク質が認識されるので、ネイティブな立体構造を認識できる抗体が産生される可能性が高い(図 22)。

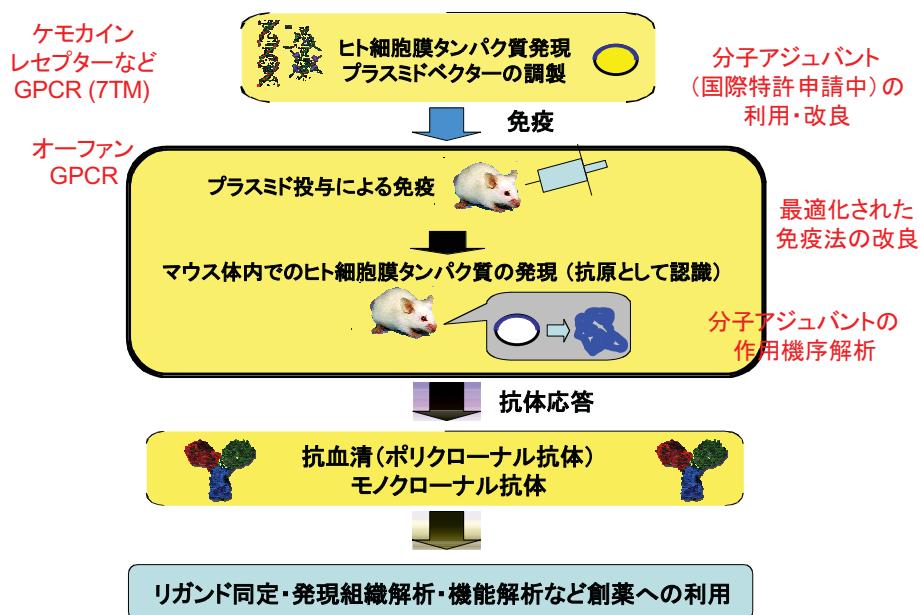


図 22 FL cDNA を用いた遺伝子免疫による GPCR などヒト細胞膜タンパク質に対する抗体の作製

4)これまでの成果

平成 18 年度および 19 年度の目標はほぼ全て達成された。ただし、この方法では、12 回貫通細胞膜タンパク質に対する抗体を作製することはできなかった。

A)我々の開発した分子アジュバントを用いた DNA 免疫法によって、GPCR のクラス A とクラス C に対する抗体を作製した。最初に、クラス A の GPCR であるエンドセリンレセプターの二つのタイプ(ETAR および ETBR)をモデル抗原として、GPCR に対する抗体作製を可能にする遺伝子免疫法を確立した。さらに、それぞれに対するモノクローナル抗体を作製し、それらの抗体を用いて ETAR および ETBR の機能解析が可能であることを示した。この遺伝子免疫法を用いてクラス A の GPCR である 3 種類のケモカインレセプター(CCR3、CCR5、CXCR4)に特異的なポリクローナル抗体を作製した。この抗体の一部にはアンタゴニスト活性が証明された。また、CCR5 に対するモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体はそれぞれのケモカインレセプターの機能解析に有用である可能性が示唆された。さらに、クラス A のオーファン GPCR(以下 oGPCR-A)に対するポリクローナル抗体を作製した。このポリクローナル抗体を用いて、oGPCR-A が骨髄腫(ミエローマ)細胞に発現している可能性が初めて明らかにされた。一方、クラス C の GPCR であるオーファン GPCR(以下 oGPCR-C)に特異的なポリクローナル抗体およびモノクロー

一ナル抗体が作製された(図 23)。このオーファン oGPCR-C に対するモノクローナル抗体を用いて、ヒト肺正常組織及び特定の肺がんの組織に特異的に発現している oGPCR-C を検出することができた(図 24)。これらのオーファン GPCR に特異的な抗体はそれぞれの GPCR の機能の推定やそれを発現するがんの診断などに有用である可能性が示唆された。

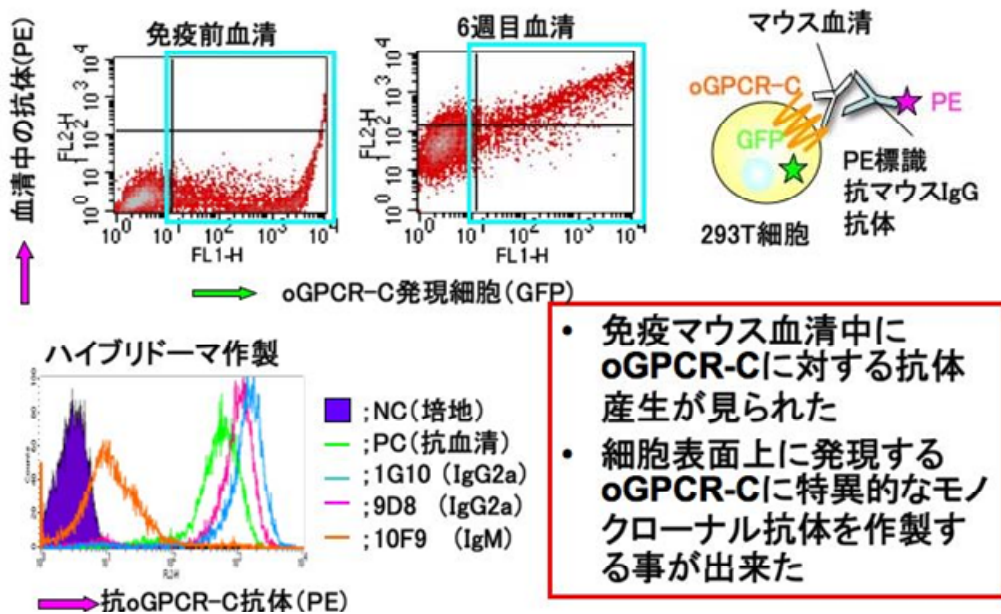
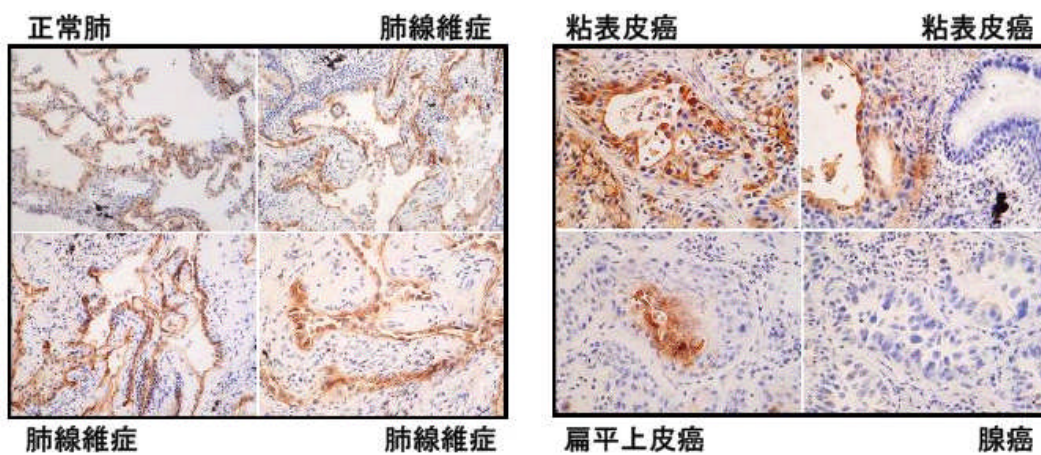


図 23 oGPCR-C 特異的モノクローナル抗体の作製



順天堂大学 熊坂利夫先生との共同研究

肺の上皮細胞において染色が見られた
肺癌組織の上皮細胞により強い反応性が見られた

図 24 GPCR-C タンパク質の肺上皮細胞における発現

B)1 回膜貫通型細胞膜タンパク質であるヒトの **erb-B2** に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製した。また、機能未知の 2 回膜貫通型細胞膜タンパク質に対するポリクローナル抗体を作製した。

C)分子アジュバントとしての大腸菌 **Gro-EL** の作用機序を解析した結果、**GPCR** の細胞膜での発現を促進している可能性が示唆されたが、その他のさまざまな促進機序が関与している可能性も示された(詳細は特許申請中であるので、ここでは記載しない)。この分子アジュバントとは異なる新規分子アジュバントの開発に着手した。

D)**GPCR** 発現バキュロウイルスとの併用による抗体作製法の開発は、新たに、1 種類の **GPCR(AT2)** を発現するプラスミドベクターを作製し、**AT2** 遺伝子ノックアウトマウスを免疫する準備を完了した(東京大学浜窪教授との共同研究)が、動物施設の移転などのために止まっていた。平成 20 年 6 月に運転が始まるので、免疫を始める予定である。DNA 免疫と組換えアデノウイルスを組み合わせたプライムブースト法の開発に着手した。

5)中間評価後(平成 20 年～22 年度)の成果

A)**GPCR** に対するモノクローナル抗体の作製：

我々の確立した DNA 免疫法を用いて、前述の **ETAR**、**ETBR**、**CCR5**、**oGPCR-C** に加えて、さらに 6 種類の **GPCR** (**CXCR4**、**CCR2B**、**CCR11**、**AT2**、**CCX-CKR**、**CXCR7**) に対するモノクローナル抗体を作製し、計 10 種類の **GPCR** に対するモノクローナル抗体を作製した。これまでのポリクローナル抗体の作製成功率は 100%、モノクローナル抗体の作製成功率は 83%であり、このような高成功率で **GPCR** に対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作製できている施設は世界中にどこにも存在しない。DNA 免疫法のさらなる最適化によって、現在は 1 匹の免疫マウスの脾臓から少なくとも 5 クローン以上のハイブリドーマが調製でき、多いときには 1 匹から 60 クローン以上のハイブリドーマが調製できるようになった。この効率は通常のタンパク質とアジュバントを用いて調製できるハイブリドーマの効率にほぼ匹敵する。その結果、1 つの **GPCR** 分子に対してモノクローナル抗体のパネルを調製することが可能になり、そのパネルには免疫学的特性の異なる **IgG** アイソタイプと異なるエピトープを認識するクローンが含まれることが明らかになった。典型的な例として非典型的なサイトカインである **CCX-CKR** に対するモノクローナル抗体パネルを **Table 1** に示す(Takatsuka et al., *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010 Dec 22. [Epub ahead of print])。 **CCX-CKR** はヒトとマウスでホモロジーが非常に高い(95%)が、N 末端に存在するアミノ酸配列のわずかな違いと、そのエピトープに隣接する 3 カ所の硫酸化チロシンによって多様なエピトープが形成されており、それらに対するそれぞれのモノクローナル抗体が作製できた(図 25)。また、このモノクローナル抗体パネルの中からリガンド様の活性を持つ抗体 **13E11** を選択することができた。興味深いことに、この **13E11** 抗体はリガンドのレセプター結合部位を認識していることが明らかになった(後述)。

表 1 Characteristics of anti-CCX-CKR monoclonal antibodies

Clone	Isotype	Reactivity				Epitope localization* [a.a.]	Function
		FCM	CDC	W.B.	I.P.		
8B5	IgG1	+	—	—	+	1-14	—
10F4	IgG1	+	+/-	—	+	1-14	—
14F7	IgG1	+	—	—	+	1-14	—
14G9	IgG1	+	—	—	+	1-14	—
2F11	IgG2a	+	+++	+	+	1-10	—
6G9	IgG2a	+	+++	—	+	1-14	—
8E7	IgG2a	+	+++	—	+	1-14	—
8F6	IgG2a	+	+++	—	+	1-14	—
13E11	IgG2b	+	+++	—	+	1-14	+***
14F10	IgG3	+	+/-	—	+	1-14**	—

+: positive, -/+ : weakly positive, — : negative

FCM : flow cytometry, W.B. : Western blot

I.P. : immunoprecipitation, CDC : complement-dependent cytotoxicity

* : Epitope localization on N-terminal of the first extracellular domain

** : Conformational

*** : Ligand-like activity

1
4
10
14
24

HUMAN MAL **E**Q**N**^{*}**Q****S**T**D****Y****Y****Y****E** **E****N****E****M****N**G**T****Y**

2F11

13E11, 14F10 and others

MOUSE MAL **E****L****N****Q****S****A****E****Y****Y****Y****E** **E****N****E****M****N****Y****T****H**

図 25 ヒト CCX-CKR の第一細胞外ドメインエピトープ

B 細胞エピトープとして 4-24 番目までのアミノ酸配列が予想される。四角で囲ったアミノ酸残基にマウスとの違いが見られ、3つの酸性アミノ酸残基(太文字)を含む 4-10 番目までの配列を 2F11 が認識し、その他のクローンはこの配列(エピトープ)と 3つ連続したチロシン残基を含んだ 4-14 番目までの配列を認識する可能性が高いと予測される(下線部)。N* : N 型糖鎖付加サイト

B)リガンド様抗体の作製

我々の確立した DNA 免疫法を用いて、細胞表面に発現している GPCR を認識できるモノクローナル抗体を作製できるようになり、これまで困難であった抗体作製の壁を越えたが、さらにもう一段困難な課題である生物活性を持つ抗体の選択についても成功した。GPCR はリガンドの刺激を受けるとそれに応答して、さまざまな生理現象を調節する。ケモカインレセプターを発現する細胞はリガンドに反応して遊走するが、近年、その遊走を調製する非典型的なケモカインレセプターが見いだされ、がんの転移などからその働きが注目されている。非典型的ケモカインレセプターCCX-CKR に対するモノクローナル抗体パネルを調べたところ、その中の一つ 13E11 はリガンド様の活性を示し、CCX-CKR の細胞内移行を誘導した。細胞内移行は蛍光標識抗体の細胞内への移行をフローサイトメトリーで定量し(図 26)、蛍光顕微鏡(図 27)で確認した。このようなリガンド様の活性を示す抗体はこれまで報告がなく、CCC-CKR など非典型的ケモカインの機能解析に有用な初めての機能性抗体である。

C)ヒトポリクローナル抗体の作製

我々の確立した方法で、ヒト抗体を産生する KM マウスを免疫することによって、ヒトの GPCR に対するヒト抗体を作製できるかを検討した。その結果、CXCR4、CCR3、CCR5 に対するポリクローナル抗体を調製することができた。

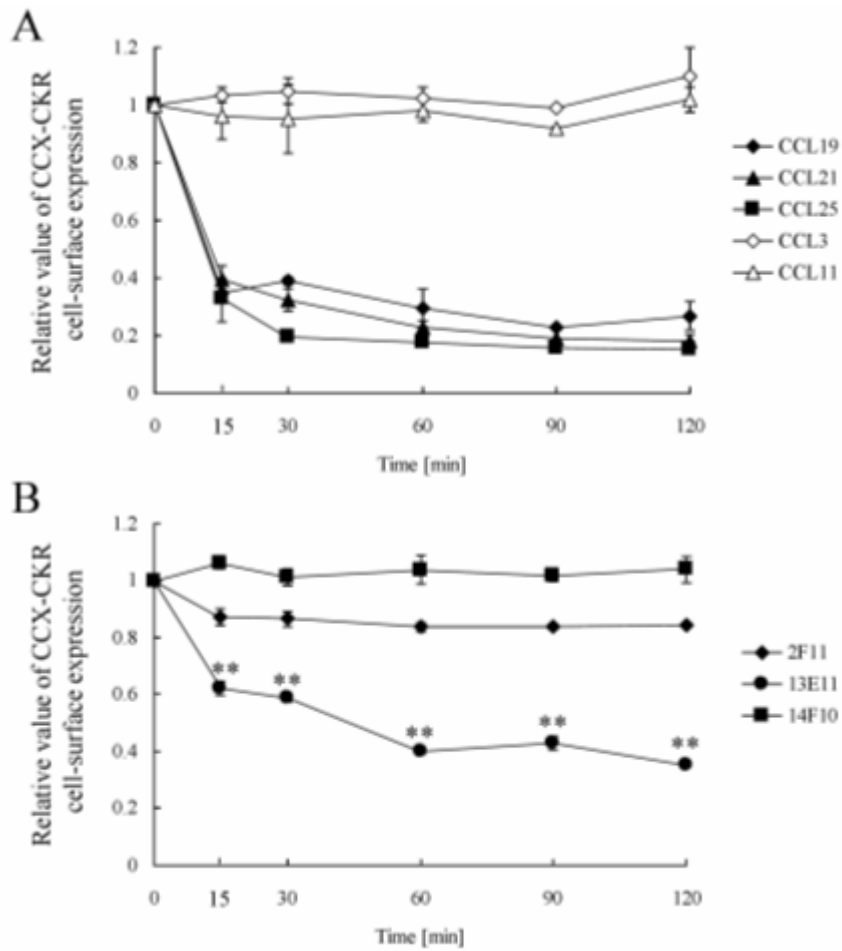
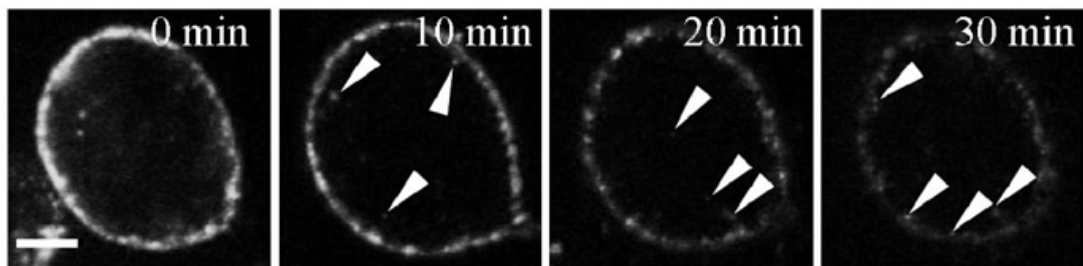


図 26 モノクローナル抗体 13E11 によって誘導される CCX-CKR の細胞内部移行
 (A)特異的リガンドまたは(B)抗体によって誘導される CCX-CKR の細胞内部移行の経時変化。リガンドによる CCX-CKR の細胞内部移行は 2F11 と FITC 標識された二次抗体を用いて FCM により解析した。また抗体を用いた CCX-CKR の細胞内部移行は FITC 標識された二次抗体のみで染色し FCM により解析した。またリガンドではないケモカイン CCL3 と CCL11、リガンド様活性を示さないモノクローナル抗体 2F11 と 14F10 はネガティブコントロールとして用いた。3 回の実験結果を平均し±標準誤差で示した。
 ** $P < 0.01$

A



B

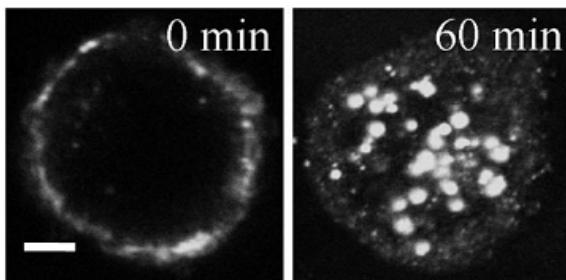


図 27 モノクローナル抗体 13E11 によって誘導される CCX-CKR の細胞内部移行(共焦点レーザースキャン蛍光顕微鏡による観察)。

(A)ATTO488 標識した 13E11 によって誘導される CCX-CKR の細胞内部移行の経時変化(0~30 分間)。(B)ATTO488 標識した 13E11 が CCX-CKR の細胞内部移行を誘導したことによる細胞内部への集積(0 分後、60 分後)。3 回の実験から同様の結果を得ている。スケールバー : 5 μ m

D)免疫寛容の打破

GPCR の中にはその機能の重要性から、非常に保存性の高いものが存在する。

保存性の高い GPCR に対するモノクローナル抗体を作製する方法を確立するために、計画段階では GPCR を発現するバキュロウイルスを用いて追加免疫をする予定であったが、KO マウスを用いて、我々の確立した DNA 免疫を行うことでホモロジーが 99%であるラットの AT2R に対するマウスモノクローナル抗体を作製することができた。この抗体はヒトとマウスの AT2R を認識できる。

また、この抗体を用いてマウスの樹状細胞が AT2R を発現していることを見いだした(東大先端研・浜窪先生と児玉先生との共同研究、論文準備中)

E)GPCR 以外の細胞膜タンパク質に対するモノクローナル抗体の作製 :

我々の確立した DNA 免疫法と遺伝子導入樹状細胞を用いた細胞免疫法を組み合わせることによって、6 回膜貫通タンパク質である STEAP4 (six transmembrane epithelial antigen of prostate 4)に対するモノクローナル抗体を作製した。

まとめ

5年間の研究計画はほぼすべて遂行された。本研究によって、我々の確立した DNA 免疫法がさらに改良され、世界に類を見ないレベルまでモノクローナル抗体の作製効率を高めることができた。今後この方法は、GPCR に関する基礎研究に有用だけでなく、GPCR を標的とした創薬研究にも大きく貢献できるものと思われる。今後は、この技術ができるだけ多くの研究施設に技術移転して、普及に努めたい。

②高特異性、高親和性、高機能性を有する抗体の効率的な創製技術

②-1 免疫寛容の打破とアフィニティマチュレーションの促進による抗体産生能の増強(JBA 駒場分室(株)ペルセウスプロテオミクス)、東京大学先端科学技術研究センター、x 京都大学再生医科学研究所)

1)制御性 T 細胞(Treg)のマニピュレーションによる抗体作製技術の開発

抗体産生反応をはじめとする免疫反応は、微生物などの異物を排除するために生体に備わる防御機構である。その一方で免疫反応が自己を傷害しないように、生体には、自己由来の抗原に対する免疫反応を防ぐ免疫寛容の機構も備わっている。免疫寛容には大別して中枢性免疫寛容と末梢性免疫寛容の 2 つの機構が存在する。自己反応性 T 細胞はアポトーシスにより胸腺で除去される(中枢性免疫寛容)。しかしながら、一部の自己反応性 T 細胞は胸腺での除去を免れて末梢に現れる。末梢では制御性 T 細胞(Regulatory T-cells ; Treg)と呼ばれる T 細胞が自己反応性 T 細胞の活性化を抑制することにより、自己免疫反応の惹起を防いでいる(末梢性免疫寛容)(図 28)自己抗原と相同性の高い抗原に対しては異なる生物種由来の抗原であっても自己抗原と認識されて免疫寛容の機構が働くため、抗体が産生されにくい。生理的に重要な機能を持つ抗原の多くは動物種間で構造がよく保存されているため、抗体の作製が困難である。

近年、中枢性免疫寛容を回避するために、目的抗原の遺伝子を発現しない遺伝子ノックアウトマウスを免疫動物として用いて抗体作製に成功した例が報告されている。しかし、ノックアウトマウスの作製には多大な時間、労力、費用がかかり、また遺伝子によってはノックアウトマウスが胎生致死となるために使用不可能な場合も多い。

本研究では、Treg の免疫抑制機能を不活化して末梢性免疫寛容を破ることにより、従来は抗体の作製が困難であった自己抗原と類似性の高い抗原、特にノックアウトマウスが致死となるために使用できない抗原に対しても効率良くモノクローナル抗体を作製する技術の開発を目標として検討した。

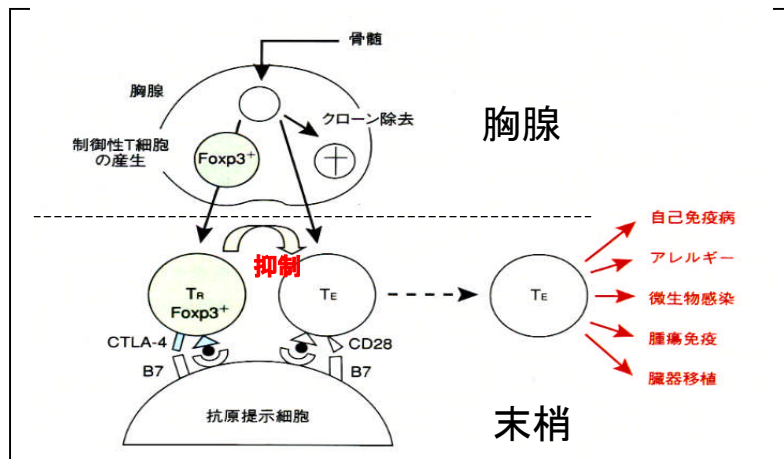


図 28 制御性 T 細胞(Treg)による免疫反応抑制の概念図(坂口ら、「実験医学」2003 より
 改変。)

A) Treg 機能不活化作用を持つ抗 GITR アゴニスト抗体投与効果の検討

Treg 上に発現する膜蛋白質である GITR にリガンドまたはアゴニスト抗体が結合することにより、Treg の免疫抑制機能が不活化されることが知られている。抗 GITR アゴニスト抗体を、静脈注射によりマウスに投与した。このマウスに目的抗原である GPCR 発現バキュロウイルスと部分精製した GPCR 蛋白を計 4 回、皮下に免疫した後、血中の特異抗体価を、GPCR 発現 CHO 細胞を用いた FACS により検定した。抗 GITR アゴニスト抗体投与群(図 29 左)では、コントロール抗体投与群(図 29 右)と比較して、血中抗体価の上昇が認められた。

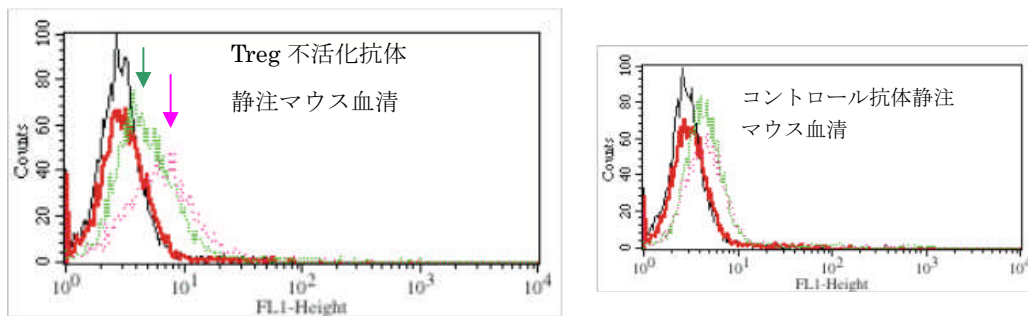


図 29 FACS によるマウス血中特異抗体価の検定

(黒：免疫前血清 vs コントロール CHO、赤：免疫前血清 vs GPCR 発現 CHO
 緑：4 回免疫血清 vs コントロール CHO、ピンク：4 回免疫血清 vs GPCR 発現 CHO)

B) Treg 除去細胞移入マウスへの免疫

より直接的に Treg の抑制機構を打破する方法として、Treg を人為的に除去したマウスへの免疫を試みた。正常マウス脾臓細胞より Treg を除去して得られた細胞を、内在性 T

細胞を持たないマウスに移入した。この細胞移入マウスを免疫動物として免疫操作を行った。(図 30)

3種類の抗原蛋白質(うち2種類はマウス自己抗原蛋白質)に関して血中抗体価の上昇を認めた。(図 31~33)うち1種類の抗原に関しては、特異抗体産生ハイブリドーマの樹立に成功した。

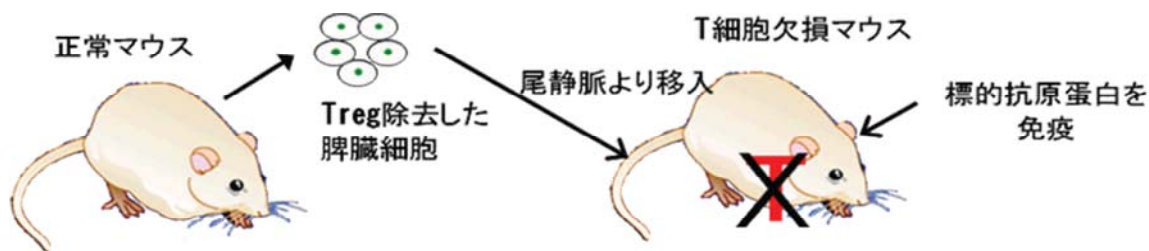


図 30 Treg 除去細胞移入マウスへの免疫の模式図

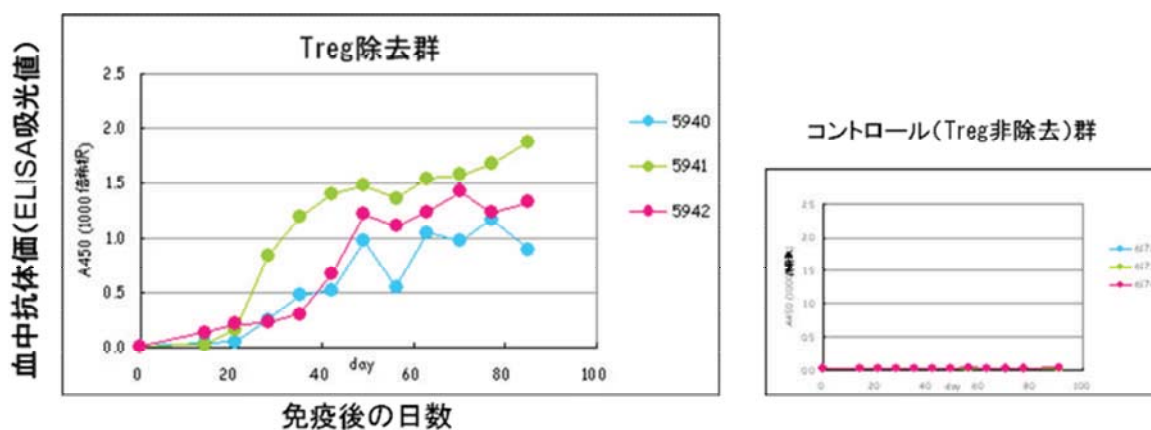


図 31 Treg 除去細胞移入マウスへのマウスサイログロブリンの免疫 (ELISA による血中抗体価の測定結果)

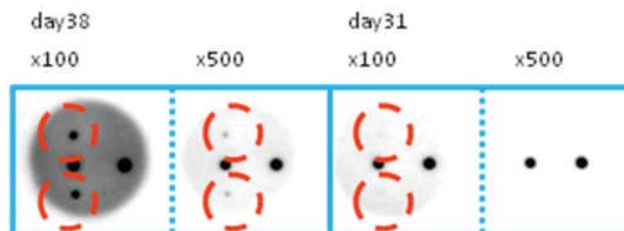


図 32 Treg 除去細胞移入マウスへのマウス G・12 の免疫(dot blot 法による血中での特異抗体の検出)

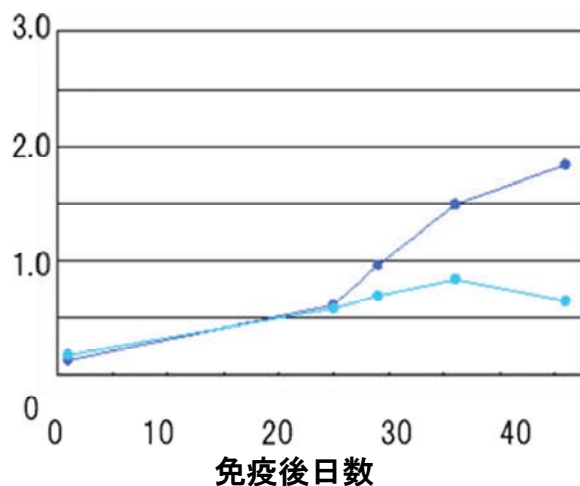


図 33 Treg 除去細胞移入マウスへのヒト膜蛋白グリピカン 3 の免疫
(ELISA による血中抗体価の測定結果)

以上より、Treg 除去細胞移入マウスに免疫することにより、従来は抗体作製が困難であった自己蛋白質抗原や自己蛋白質と相同性の高い抗原に対しても、抗体を作製可能であることが示された。この免疫技術に関して、特許申請を行った。

2)アフィニティーマチュレーションの促進による高親和性抗体作製技術の開発

B 細胞や抗原提示細胞(樹状細胞等)の機能をモジュレートして、B 細胞の活性化とアフィニティーマチュレーションを促進させることにより、抗体産生の効率を上げ、さらに抗体の抗原親和性を向上させる技術の開発を目的として検討した。

A)B 細胞共刺激分子を介するシグナル増強の抗体産生反応への効果の検討

B 細胞や樹状細胞の膜タンパク質で B 細胞の活性化とアフィニティマチュレーションを促進する共刺激分子を用いて、細胞表面抗原に対する高親和性抗体を取得する方法の開発を試みた。

がん特異的タンパク質ディスプレイウイルスと B 細胞共刺激分子発現ウイルスを共免疫したマウスより得られたモノクローナル抗体は細胞上に発現するがん特異的タンパク質と結合した。このモノクローナル抗体は、がん特異的タンパク質ディスプレイウイルスのみを免疫して得られた抗体と比較して、より低濃度でがん特異的タンパク質発現細胞に結合した。すなわち、native な構造の抗原を認識し、なおかつ抗原に対する親和性が高い抗体が得られた。

B) B 細胞活性化分子 BCSM ディスプレイウイルスの作製と、抗体作製への効果の検討

血中蛋白である BCSM は、B 細胞上の受容体に結合して細胞に共刺激シグナルを与えることにより、B 細胞活性化を促進し、抗体産生反応を増強する作用を持つ。

BCSM の cDNA をマウス肝 cDNA ライブラリーよりクローニングし、バキュロウイルスエンベロープタンパク質 gp64 の膜貫通・細胞内ドメインと融合させて、BCSM をディスプレイする組み換えバキュロウイルスを作製した。ウイルス上にディスプレイされた BCSM が受容体結合活性を有することを、BCSM 受容体発現 B 細胞株を用いた FACS により確認した。(図 34)

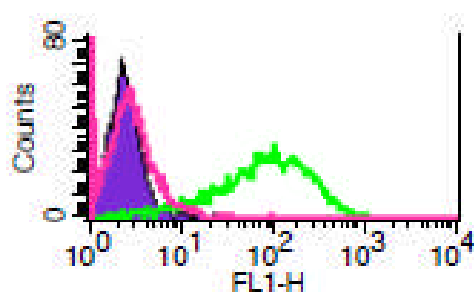


図 34 BCSM ディスプレイバキュロウイルスの B 細胞への特異的な結合

紫：細胞のみ

緑：BCSM ディスプレイウイルスの結合

ピンク：抗 BCSM 受容体抗体によるブロッキング

BCSM と標的抗原膜蛋白質を共発現するバキュロウイルスをマウスに免疫した。2 種類の膜蛋白質に関して検討を行ったところ、いずれの場合にも抗体産生ハイブリドーマ形成数の顕著な増加がみられた。(表 2、表 3)

Cell ELISA と FACS によりスクリーニングを行った結果、native な抗原を認識するハイブリドーマが多数得られた。

表2 7回膜貫通膜蛋白質であるXとBCSMを共発現するバキュロウイルスを免疫したマウスでは抗X抗体産生ハイブリドーマ形成数が増加した。

実験	免疫原	免疫マウス	陽性ウェル数
1	精製膜蛋白X	X-KO	5
2	X発現BV + 精製X	gp64-Tg	3
3	X発現BV	X-KO x gp64-Tg	6
4	X・BCSM共発現BV (Exp. 1)	X-KO x gp64-Tg	33
5	X・BCSM共発現BV (Exp. 2)	X-KO x gp64-Tg	25

表3 6回膜貫通蛋白YとBCSMを共発現するバキュロウイルスを免疫したマウスでは、抗Y抗体産生ハイブリドーマ形成数が増加した。

免疫原	1st screening ウェル総数	1st screening 方法	FACS 陽性ウェル数
膜蛋白Y 単独発現BV	1044	Cell ELISA, FACS Y発現CHO細胞	27
膜蛋白Y BCSM共発現BV	1152	Cell ELISA, FACS Y発現CHO細胞	61

これらの結果から、BCSMと標的抗原膜蛋白質を共発現するバキュロウイルスをマウスに免疫することにより、抗体産生ハイブリドーマの形成効率が顕著に向上し、この方法が膜蛋白質の抗体作製に有効であることが示された。

②-1-2 外来抗原に対する特異的免疫応答の増強

(京都大学再生医科学研究所)

正常免疫系において、FoxP3⁺CD4⁺ 制御性 T 細胞(Treg)が過剰な免疫応答を抑制し自己免疫病を防いでいる。Treg細胞は様々な免疫応答を抑制していることが知られており、本研究ではTreg細胞による免疫抑制機構を操作することにより、特に自己抗原と相同性

の高い抗原に対する抗体を産生できる手法を開発することを目的とした。

1) Treg 細胞に特異的な抗体を取得し、抗体をマウスに投与することによって免疫応答を高める。

マウス CD25⁺CD4⁺ 細胞をラットに免疫し、細胞融合により得られた hybridoma 細胞の中から、CD25⁺細胞を特異的に染色することのできる抗体を産生するクローンを選ぶことにより、Treg 細胞を特異的に染めることができる新規 monoclonal 抗体を得ることができた。この抗体の抗原は、免疫沈降、蛋白電気泳動、質量分析により 4 型葉酸受容体(FR4)であると同定された。

この抗体を用いて、Treg 細胞が FR4 を恒常的に高発現していること、さまざまな抗原刺激後でも Treg 細胞を FR4 高発現細胞として分離できることを示した。別系統マウス抗原で *in vitro* で刺激した CD4⁺ T 細胞中の FR4 高発現細胞は同抗原刺激に対する免疫反応を抑制し、ヌードマウス(T 細胞欠損マウス)に T 細胞と共移入した場合に皮膚移植片の生着を抗原特異的に延長した。一方、CD25 陽性でも FR4 低発現の細胞は、増殖応答が速く皮膚移植片の拒絶を促進することから活性化した effector T 細胞と考えられた。次に、*in vivo* で蛋白抗原で刺激したマウスの所属リンパ節細胞を調べたところ、FR4 及び CD25 の発現強度により性質の異なる 4 つの細胞群(Treg 細胞、増殖反応が強く IL-2 産生が強い細胞、IFN γ 産生が強い細胞、ナイーブ細胞)に分画できた。*In vivo* 抗原刺激後の Treg 細胞は抗原特異的および非特異的に、刺激前の Treg 細胞と比べてより強い抑制活性を示した。

腫瘍免疫療法へ応用した。抗 FR4 抗体をマウスに投与することにより、おそらく FR4 の作用を阻害することで、FR4 高発現細胞を除去することができた。この方法により、担癌マウスの腫瘍免疫を活性化し腫瘍拒絶を誘導できた。また、*in vitro* で腫瘍抗原で刺激したリンパ球中から FR4 高発現細胞のみを除去してヌードマウスに移入し、腫瘍を接種したところ、FR4 高発現細胞除去群において有意な腫瘍増殖抑制と生存の延長を認められた(図 35)。

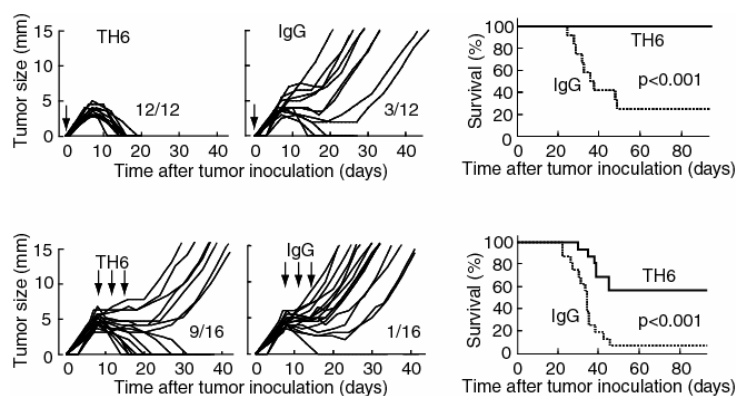


図 35 制御性 T 細胞除去による腫瘍免疫応答

抗 FR4 抗体 の 投与 により、免疫 自己寛容 を 破綻させ、自己免疫病 や 自己抗原 に対する 抗体 産生 を 誘導 することも 可能 であつた。生後 10、20 日目に 抗 FR4 抗体 を マウス に 投与 した 場合、半数 程度 に 致死 的な 自己免疫病 が 発症 した。全例 に 高力価 の 抗胃壁 抗体 産生 を 伴う 自己免疫性 胃炎 を 発症 した(図 36)。更に、投与 群 の 血清 中 には 膀胱尿管 上皮 に対する 自己抗体 を 全例 で 検出 し、多く が 水腎症 を 発症 して いた(図 37)。

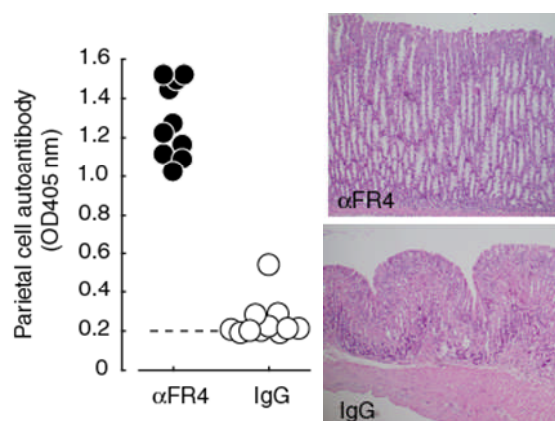


図 36 制御性 T 細胞 除去 による、抗胃壁 抗体 (自己抗体) 産生 と 自己免疫性 胃炎 の 発症

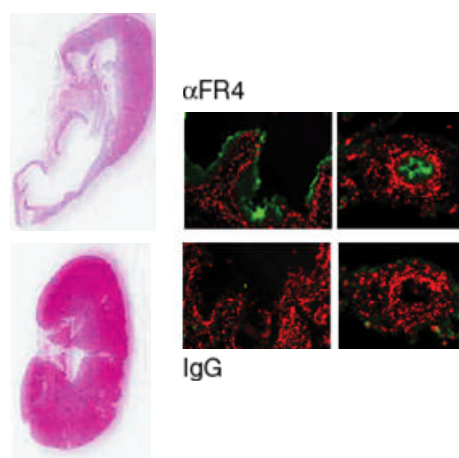


図 37 制御性 T 細胞 除去 抗体 による 水腎症 の 発症 と 膀胱尿管 上皮 に対する 自己抗体 の 産生

以上 まとめると、免疫 応答 において、抗原 特異 的 Treg 細胞 の 抑制 活性 は より 強化 され、FR4 を 標的 に して、この 強化 された Treg 細胞 を 活性化 T 細胞 と 区別 して 除いたり 抽出 したり すること で 免疫 応答 を コントロール する ことが できる ことが 分かった。この ように Treg 細胞 を 操作 すること により、自己 抗原 も しくは 種間 で 相同性 が 高い 抗原 に対しても 抗体 産生 を 効率 よく 誘導 できる 可能性 が 示唆 された。

2)Treg 細胞の免疫抑制機能に必須の分子を遺伝的に改変することで免疫抑制機能を解除する方法を開発する。

CTLA-4 を FoxP3 発現細胞特異的に欠損するマウス(CKO マウス)を作製した。このマウスは 3 週間程度で死亡する CTLA-4 完全欠損マウスよりは長期生存するものの、2 ヶ月程度で、リンパ球増殖、自己抗体産生を伴う自己免疫病を呈して死亡する。抗体産生能については、血清中の IgG、IgE 抗体価の有意な上昇を認めた。逆に、CTLA-4 を高発現した T 細胞は、Treg 細胞様の免疫抑制能を有していた。この事実は、Treg 細胞における CTLA-4 の重要性を示すと同時に、CTLA-4 を標的とすることが、新規の抗体産生誘導の手法となりうることを示している。

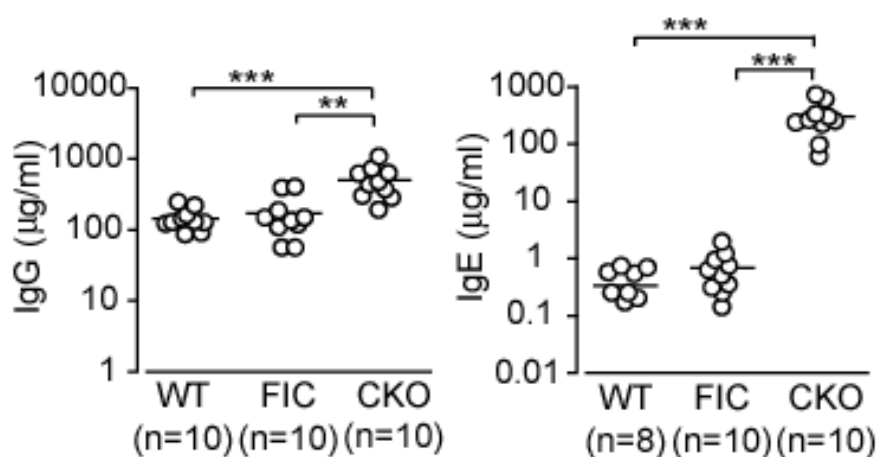


図 38 制御性 T 細胞特異的 CTLA-4 欠損マウス(CKO)マウスでの血清中の IgG、IgE 抗体価。

転写因子 FoxP3 は Treg 細胞の機能に不可欠であり、FoxP3 欠損マウスは、Treg 細胞を欠損することから自己免疫病を発症し、致死となる。これまでの研究(Ono M et al, Nature,2007)により、Treg 細胞の免疫制御機能には転写因子 FoxP3 と転写因子 AML1(Runx1)の相互作用が必要なことが明らかになっていた。この成果を応用し、われわれは、Treg 特異的に AML1 を欠損するマウスを作製した(FoxP3-IRES-Cre x AML1 floxed マウス)。また、AML1、2、3 に共通する必須の cofactor である CBFβ を Treg 特異的に欠損するマウス(FoxP3-IRES-Cre x CBFβ floxed マウス)も作製した。これにより、得られたマウスは、FoxP3 欠損マウスより長期に(6 か月以上)生存することができるが、自己免疫病を発症した。CBF は FoxP3 と結合して、FoxP3 や Th2 サイトカインである IL-4 の発現を直接的に調節しており、AML-1 や CBF β を欠損する Treg 細胞を持つマウスでは、自己抗体産生、高 IgE 血症を呈した。AML1/CBF β 複合体の Treg における重要性を示すと同時に、これら Treg 細胞で重要な役割を担う転写因子群を標的にすることが、新規の抗体産生誘導の手法となりうることを示した。

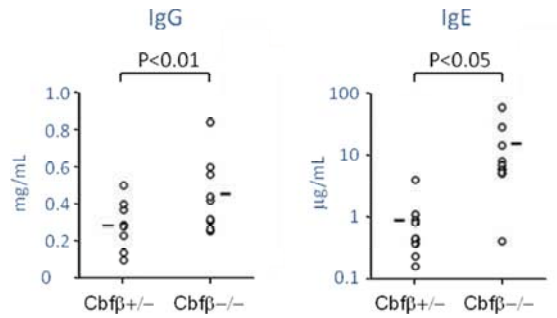


図 39 制御性 T 細胞特異的 CBFbeta 欠損マウスでの血清中の IgG、IgE 抗体価。

3) 胸腺と末梢での免疫自己寛容を操作したマウスの作製

自己免疫寛容には Treg 細胞による末梢リンパ組織での免疫抑制とともに胸腺など中枢性リンパ組織での自己反応性細胞の除去も重要である。我々は、T 細胞の主要なシグナル伝達分子である ZAP-70 に点突然変異を持つマウス (SKG マウス) を樹立し、このマウスでの自己免疫寛容の破たんについて解析した。このマウスでは、胸腺での自己反応性 T 細胞の除去が十分におこらず、さらに Treg 細胞の免疫抑制機能も低下していることが分かった。中枢、末梢リンパ組織いずれにも異常を持つマウスでは、単に Treg 細胞を除去するだけでは認められない種々の自己免疫病を、遺伝的背景依存性に発症した。

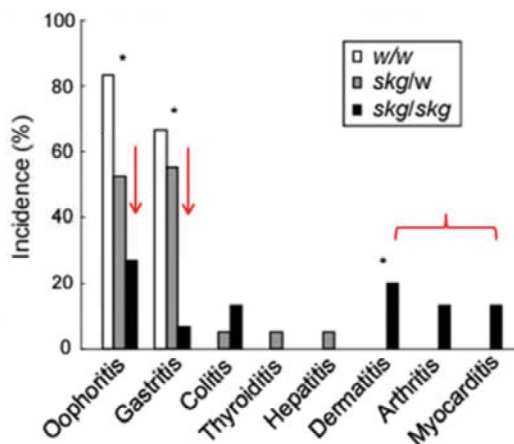


図 40 SKG マウス (skg) および正常マウス (w) から制御性 T 細胞を除去することにより誘導される自己免疫病

Treg 細胞を標的にする様々な方法を開発した。抗体作製に利用可能な、Treg 細胞除去抗体、Treg 細胞に異常のある複数のマウス系統、Treg 細胞と胸腺選択に異常のあるマウス系統を樹立した。Treg 細胞を除去するかその機能を阻害すること、さらに、胸腺での負の選択に異常のあるマウスを組み合わせることで、免疫自己寛容を打破することが可能であった。自己抗原と相同性が高いために従来法では作製が困難であった抗体の作製が容易になる可能性を示した。

②-2-1 抗体工学

②-2-1-1 PURESYSYSTEM による小分子化抗体の改良と創製

(JBA 駒場分室(富士フィルム)、東京大学先端科学技術研究センター、東京大学新領域創成科学研究科)

1) PURE Ribosome Display の確立

無細胞タンパク質合成系を利用するリボソームディスプレイ(Ribosome Display (RD))は、ファージディスプレイ(Phage Display (PD))の欠点を克服する有用な抗体選択法である(図 41)。RD は、タンパク質合成反応中に形成される mRNA-リボソーム-新生タンパク質から成る三者複合体の形でタンパク質を提示させる技術であり、リボソームを介して遺伝情報と遺伝子産物のリンクを実現する。しかし、細胞抽出液を用いた従来の無細胞タンパク質合成系で行なう RD では、抽出液に混入する核酸分解酵素などの影響により期待した結果が十分に得られなかった。

そこで、我々が開発した PURE system を基にした RD の開発を行なった。PURE system は、精製した因子からなる再構成型無細胞タンパク質合成系のため、夾雑物が極めて少なく RD に最適な無細胞タンパク質合成系である。しかし、従来の PURE system はタンパク質合成を目的にした反応系である。そこで、因子の調製法、特にリボソーム調製法の改良や、RD 反応条件の検討を行なった。その結果、大腸菌 S30 抽出液を使用した従来法に比べ、mRNA の回収率が 2 桁高い反応系の構築に成功し(表 4)、PURE Ribosome Display(PRDR)と名付けた。

表 4 リボソームディスプレイ法の比較

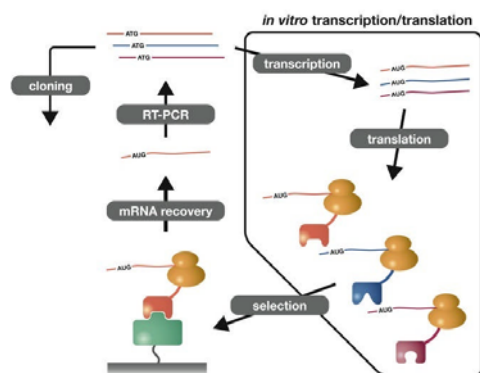


図 41 リボソームディスプレイ法

PURE Ribosome Display法と従来の Ribosome Display法の比較

	Pure Ribosome Display	S30 Ribosome Display ^(a)
Design of template	No limitation	With removal of the termination codon
Temperature	4°C-37°C	4°C
Recovery rate	Above 2.5%	Up to 0.2%
Enrichment / single selection round	~12000 fold	~ 1000 fold
Enrichment / several rounds (from 1 : 10 ⁸)	2-3 rounds	5 rounds

a) A. Pluckthun, et al., 1997, 1999

2) PURE system を生かした scFv 選択系の確立

RD で抗体を選択するには、抗原タンパク質を何らかの担体に固定化する必要がある。現在は、あらかじめ大腸菌等の生細胞で発現させ精製したタンパク質を担体に固定化する方法が主流である。しかし、このような抗原タンパク質の調製方法は、タンパク質を

精製する必要があるために時間がかかり、短時間で選択できるという RD の利点の一つが生かされていなかった。また、タンパク質の精製ができない場合は、RD 自体を行うことができなかった。そこで、抗原タンパク質の調製法として、PURE system を用い、新生ポリペプチド鎖の部位特異的にビオチン化したタンパク質を合成した後、アビジン化プレートに固定する方法を試みた。PURE system を用いて部位特異的にビオチン化した DHFR を合成後、精製せずにそのまま反応液をアビジン化プレートに固定した後、上記 PRD により、マウスナীব scFv ライブラリーから特異的な scFv の選択を行なった。その結果、1 回の選択で、DHFR 特異的な scFv を取得することに成功した。また、選択サイクルを繰り返すことで、scFv が濃縮されることが明らかとなった(図 42)。これにより、抗原調製から抗体選択まで PURE system を用いて迅速に行なう系が確立できた。

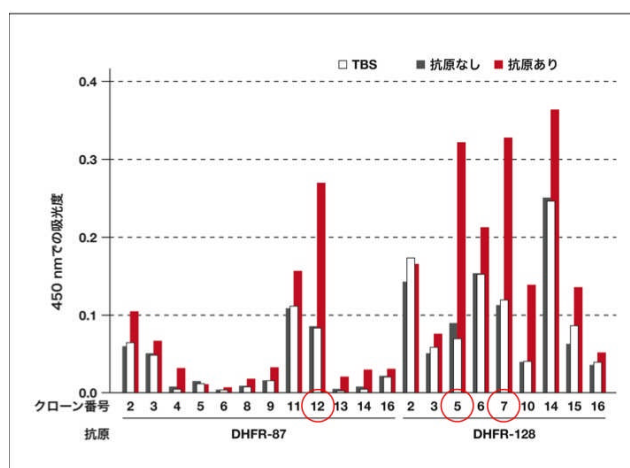


図 42 リボソームディスプレイで選択した scFv クローンの ELISA

3) PURE Ribosome Display の応用

確立した PURE system による高効率リボソームディスプレイ (PURE RD) を用い、様々な抗原に対する低分子抗体の取得を試みた。選択圧の強弱、複数のブロッキング剤の添加など様々な条件下での選択を行なった。また、ライブラリーとしては、マウス由来 scFv だけでなく、ヒト由来 scFv および抗体重鎖由来のドメイン抗体のライブラリーも検討した。しかしながら、scFv などの抗体の取得には、個々の抗原および抗体によって選択条件を最適化する必要があり、現在までのところ、目的の scFv およびドメイン抗体を取得するには至らなかった。今後は、さらに選択条件の検討をすすめ、抗体選択法の標準化を目指す。

4) PRD を用いた無細胞エピトープマッピング法の開発および改良

東京理科大学の増保教授のグループで取得されたモノクローナル抗体の提供を受け、PURE system を用いたエピトープマッピング法の開発を行い、リボソームディスプレイ

法により抗体のエピトープを決定することが可能であることが示された。具体的な実験は、10 アミノ酸のランダムな配列を N 端に有する mRNA のライブラリーを、解離因子を含まない PURE system で発現させ、抗体に結合した翻訳複合体を単離し、その mRNA の配列を決定した。2 種類のモノクローナル抗体で選抜を行い、抗原に類似した配列を 2 ~3 ラウンドで得ることができた。また、この配列を改変した抗原が抗体に結合できないことから、エピトープを正確に同定できていることが確認された。さらに、実験操作の簡便化を目指し、溶出条件および抗体の精製度について検討をすすめた。溶出条件については、抗体に結合させたペプチド-リボソーム-mRNA 三者複合体の溶出を特異的な抗原ではなく、EDTA を用いることでも可能だった。また、抗体産生細胞の培養上清中の未精製モノクローナル抗体に対するエピトープマッピングを行ない、カラム精製したモノクローナル抗体に対するマッピングと同様の結果を得た。これにより、従来法と比較し、より迅速かつ簡便にモノクローナル抗体のエピトープマッピングができる方法へ改良することが出来た。このことにより、配列認識の抗体についてリボソームディスプレイ法によるエピトープマッピングが可能であることが示されたと言える。

5) 膜タンパク質合成系の確立

従来の PURE system は、可溶性タンパク質を合成するための反応系のため、膜タンパク質を、活性を有した状態で合成することが難しかった。そこで、膜タンパク質の合成に必要と考えられる膜成分や可溶性因子を添加して膜タンパク質の合成が可能となる改良型 PURE system の開発を進めている。すでに、大腸菌内膜反転小胞を添加した系で膜タンパク質の合成に成功していたが、精製した大腸菌膜透過チャネルタンパク質 (SecYEG) のみをタンパク質として含むプロテオリポソームを添加した膜タンパク質合成系の開発を行なった。その結果、この合成系において膜透過タンパク質がチャネル依存的に膜局在することを確認した。また、PURE system で合成した真核生物由来の膜タンパク質 (GPCR やアディポネクチンレセプターなど) が、リポソームの膜面分に挿入されることも確認した。

さらに、膜成分としてナノリポタンパク質粒子 (NLP) を使用する無細胞膜タンパク質合成法の開発を進めた。NLP は、ナノディスクとも呼ばれ、脂質二重層がアポリポタンパク質によって束ねられた構造を持つ分子である。はじめに、モデル膜タンパク質を用いて合成反応条件の検討を行なった。その結果、通常の PURE system 反応液に NLP を添加して合成するだけで、合成されたモデル膜タンパク質が NLP に埋め込まれ、可溶性分子として存在できることを確認した (図 43)。さらに、現在までに検討した膜タンパク質においては、原核生物由来、真核生物由来ともに、NLP 存在下で合成することにより、可溶性が顕著に増大することを確認した。現在、合成した膜タンパク質の活性評価等を進めており、今後は、リボソームディスプレイによる抗体選択の抗原としての使用も検討する予定である。

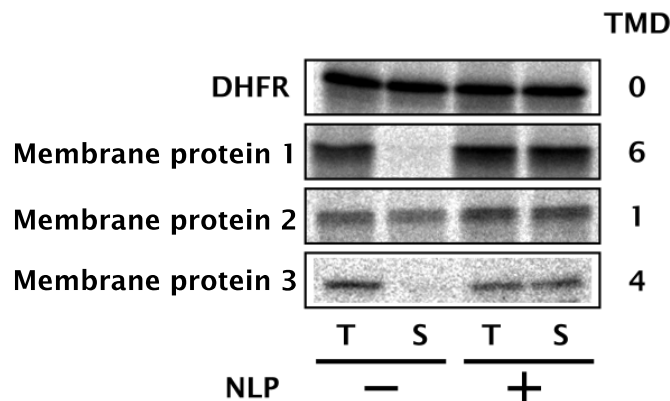


図 43 NLP を使用した膜タンパク質の合成 T:合成後、S:遠心後の上清

②-2-1-2 変異導入と物理生物化学解析

(JBA 駒場分室(富士フイルム)、東京大学先端科学技術研究センター、東京大学新領域創成科学研究科)

児玉・浜窪グループで調製・構築される抗体の中で特にその医療への展開が期待され科学的に重要であると考えられる分子種 4 種類(抗体クローン#1、クローン#2、クローン#3、クローン#4)について、焦点を絞り、研究を進めた。本報告では、特に今後の展開が大きく期待されるクローン#2 について詳述する。

1) ターゲット抗体クローン#1 について

マウス抗体 scFv および Fv は、精製過程においてカラム樹脂への吸着、多量体の形成等により種々の測定に耐えうる十分量のタンパク質調製が難しいことから、変異導入による抗体の安定化と物性改変を検討したものの、目的の収量を得ることはできなかった。

ヒト型化抗体 scFv は、大腸菌を用いた発現系により封入体として得た。段階透析法による巻き戻しによって調製したところ、ヒト型化抗体 scFv はマウス抗体と同様、多量体形成が優勢であることが明らかとなった。このことから、抗体クローン#1 は CDR 配列依存的に多量体化する傾向を有することが示唆された。また、ヒト型化 scFv-Fc でも大腸菌を用いた発現システムによる調製方法を検討したところ、やはり得られる分子種は多量体が優勢であった。

2) 新規ターゲット抗体クローン#2 について

A) 可変領域断片 Fv ならびに一本鎖抗体 scFv の調製系構築

マウス由来モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから遺伝子を増幅、可変領域配列を決定し、Fv ならびに scFv について大腸菌を用いた調製システムを構築した。Fv は菌体内で封入体として発現し、一方、scFv は培地上清中に可溶性分子として発現した。scFv

は、1.58 mg/1L 培地の高収率で均一分子種の単量体を得ることができた。発現量と調製法の簡便さから、特に scFv に焦点を絞って、改変抗体の作製を進めた。構築を完了した改変抗体を図 44 に示した。

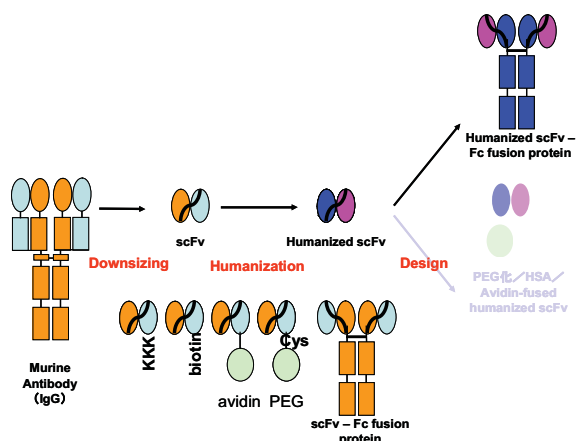


図 44 改変抗体構築のプラットフォーム
現時点までに完成しているものを示した。

B) 抗体の物性解析と放射能標識体の作製

ターゲットとする抗体について、IgG 型および scFv と抗原との相互作用を Biacore、ITC を用いて解析した。scFv は 25 °C 条件下において、IgG と比較してエンタルピーの値が 16.5 kJ/mol 程度、またエントロピーの値が 17 J/mol・K 程度増加しており、結合定数はほぼ同等の結合定数を有していることが明らかとなった(図 45)。さらに、 δC_p の値は、-1.27 kJ/mol・K であることから、抗原抗体相互作用には疎水性相互作用が比較的大きく寄与している可能性が考えられた。

DSC を用いて熱安定性を検討したところ、scFv は抗原との結合により 6 °C 程度の T_m 値の上昇が認められた(図 46)。これらから、同抗体の scFv が IgG と同等の活性を有していること、改変抗体作製にふさわしいものであることが明らかとなった。

生体内での分布、半減期等の体内動態を検討するため、マウスを用いた in vivo での実験を予定している。現在までに、DOTA を修飾した DOTA-scFv に放射性 Gd を付加させ、標識率 83%、純度 98%にて scFv の放射性標識体の調整を完了し、生体内での腫瘍特異的集積を観察した。

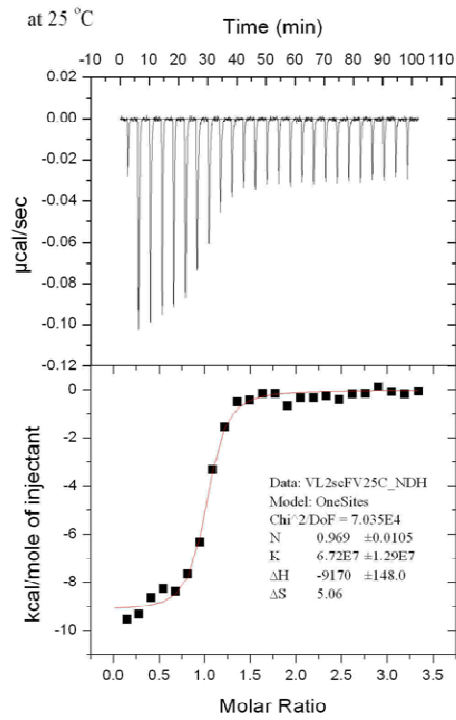


図 45 scFv の等温滴定型熱量測定
25°Cにおけるプロファイルを示した。上は生データ、下は得られた滴定曲線。

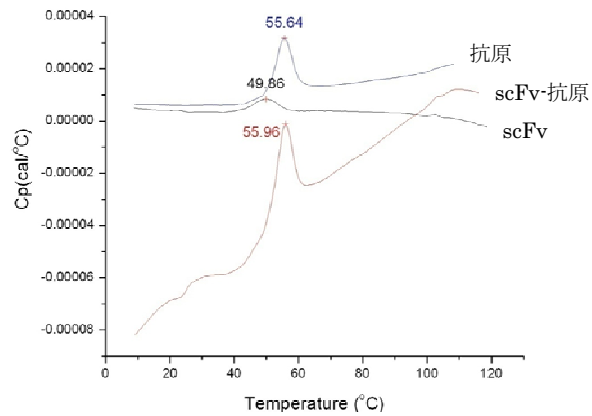


図 46 示差走査型熱量測定
抗原存在下で T_m が 6°C 上昇している。

C) PEG 修飾 scFv の調製系の確立

生体中での半減期の向上、安定性の強化等を期待し、PEG 修飾 scFv の作製を進めた。PEG 修飾剤には Maleimide を付加した PEG3000 誘導体を用いた。PEG 誘導体が抗体

分子に非特異的に付加するのを防ぐため、scFv の N 末端にはシステイン残基を遺伝子工学的に導入し、チオール基による Maleimide への求核反応によって部位特異的に PEG 化を行うことを試みた(図 47)。

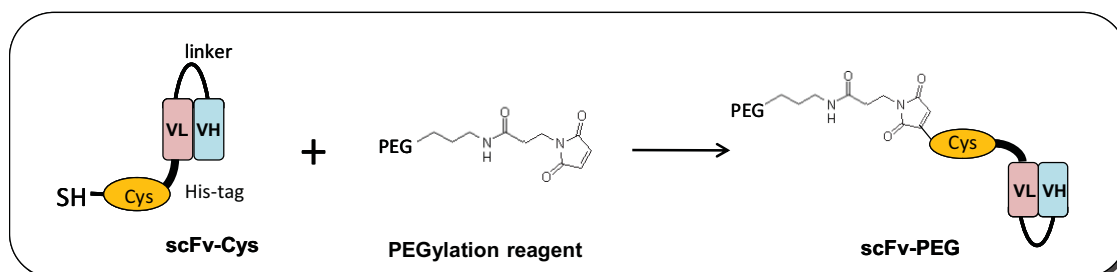


図 47 scFv の PEG 化 : scFv の C 末端に Cys を導入し、マレイミドへの求核反応で共有結合させる。

末端にシステインを導入した scFv では、野生型 scFv と比較して収量が 1 割程度と大きく減少していたものの、大腸菌による発現系により可溶性の均一分子種かつ単量体として調製することが可能であった。1 mg/mL 程度の scFv 溶液に対し、5 当量の PEG 修飾剤、2 当量の TCEP・HCl(Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride) を室温にて 24 時間反応させた結果、収率 21.5%にて単一分子量の PEG 修飾 scFv 作製に成功した(図 48)。未反応の scFv 以外に副生成物の存在は確認できなかった。放射能標識を行った PEG 修飾 scFv によってマウスをモデルとした *in vivo* の体内動態を観察したところ、特異的な集積は見られなかった。

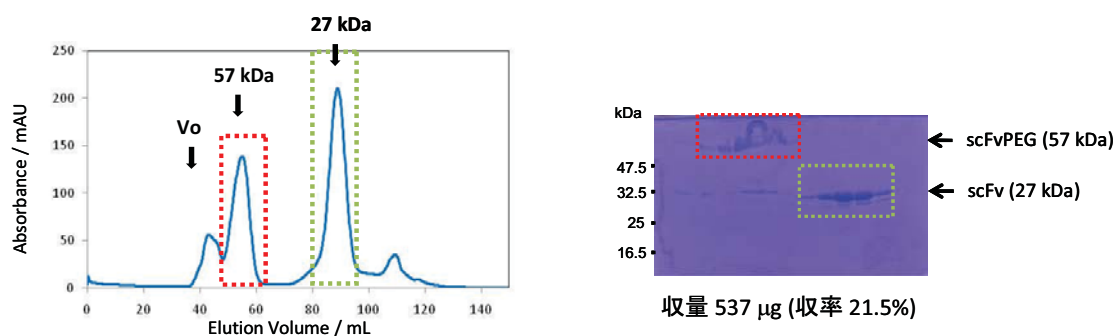


図 48 PEG 化反応後の scFv のゲルろ過による分析。左はクロマトグラム、右は左図で囲ってある溶出画分の SDS-PAGE の結果を示す。

D)scFv-SA 融合蛋白質、scFv-SACore(変異体)の調製系構築と性格付け

抗体の応用例として最も有力なものの一つにドラッグデリバリーシステムが挙げられる。標的への薬物輸送という役割を担うにあたって、高特異性、高親和性を持った生体

由来の物質である抗体は理想的であるといえる。しかし、抗体 IgG 全長ではその安定性と分子サイズのために体内に残留してしまい、標的以外の部位で副作用を引き起こす恐れがある。問題点に対する有力な解決策としてプレターゲティング法が提案されている。この方法は、まず標的分子へと改変抗体を集積させ、その後に改変抗体特異的に結合する修飾を施した薬剤を用いて、抗体を足場とした 2 段階の輸送を行う方法である(図 49)。プレターゲティング法を行うために、まず、抗体の抗原結合部位のみを取り出したサイズの小さい改変抗体である一本鎖抗体(scFv)とストレプトアビジン(SA)を融合させた scFv-SA を構築した。SA はビオチンと強固な結合を形成し($K_d \approx 10^{-15} \text{ M}$)し、更にビオチンは小分子であるために 2 段階目の反応での余剰分が速やかに排出される。scFv-SA はマウスにおいて抗体 IgG と比較して高い腫瘍集積性を持っていた。

しかしながら、SA 部位が抗原性を持つことが問題となる可能性があり、浸潤性、抗原性において機能向上を図るために、ビオチン結合に関与している core 領域のみを用いた scFv-SAcore を構築した。更に、抗原性の低下を目的として、SAcore 表面に変異を導入した各種変異体を作製した。児玉らのグループがカニクイザルを用いた実験によって、野生型(WT)より著しく抗原性が低下した変異体を見出している。そこで、scFv-SAcore(変異体含む)の発現系を構築した。融合蛋白質はいずれも不溶性画分に発現していた。巻き戻しによって大量調製を行った。その際の巻き戻し効率は、変異体において高いものであった(表 5)。SA 融合蛋白質において、変性可溶化剤を徐々に透析によって除去することで巻き戻しが可能となり 4 量体が形成された点は非常に興味深い。

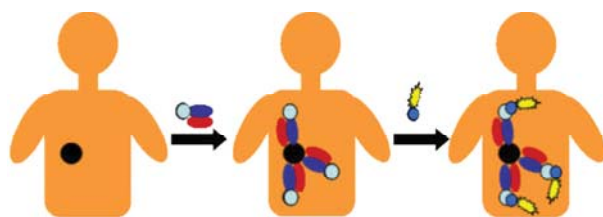


図 49 プレターゲティング法の模式

表 5 scFv-SAcore 変異体の巻き戻し効率。変異体の巻き戻し効率が高いことが分かる。

変異体	巻き戻し効率	変異数
WT	20%	0
001	35%	1
072	41%	1
314	41%	6
414	41%	6

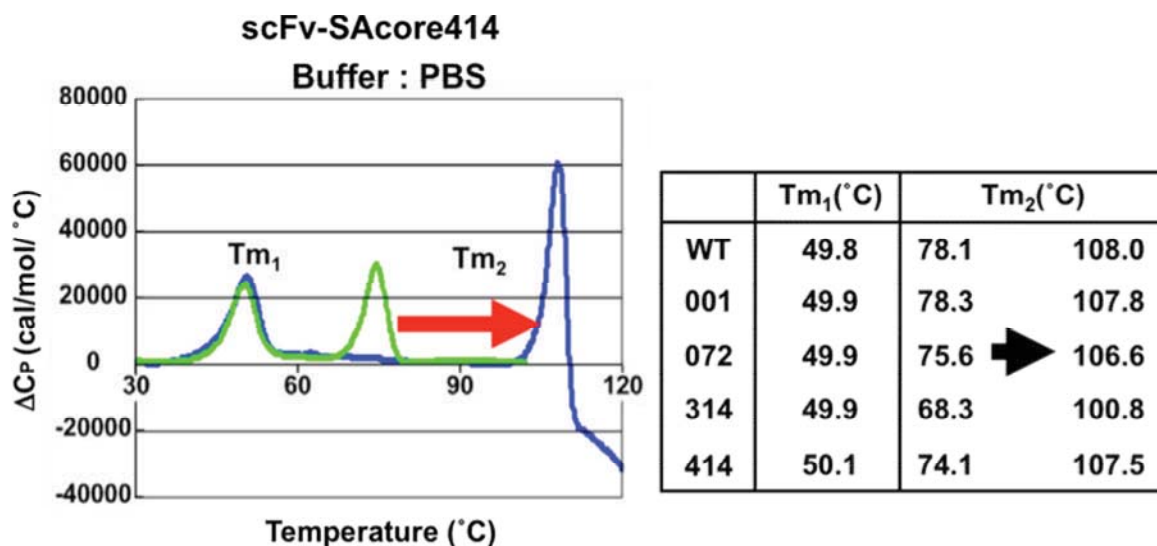


図 50 変異体 414 を融合させた scFv-SAcore414 の DSC を用いた解析

scFv-SAcore のビオチン結合能について等温滴定型熱量測定(ITC)、示差走査型熱量測定(DSC)を用いて確認したところ、十分な熱安定性を有していることが分かった(図 50)。また ITC を用いて抗原結合能についても確認した。SAcore とビオチンは 1:1 で結合し、scFv と ROBO1 は 0.5:1 で結合した。また、scFv が示す相互作用の熱力学的特性は、融合しない分子種と同様でほぼ維持されていた(図 51)。抗原親和性が若干低下しているが、これはエントロピー損に起因していることから、親和性向上についての検討が課題となる。また、今後、腫瘍集積性等の検討を行う予定である。

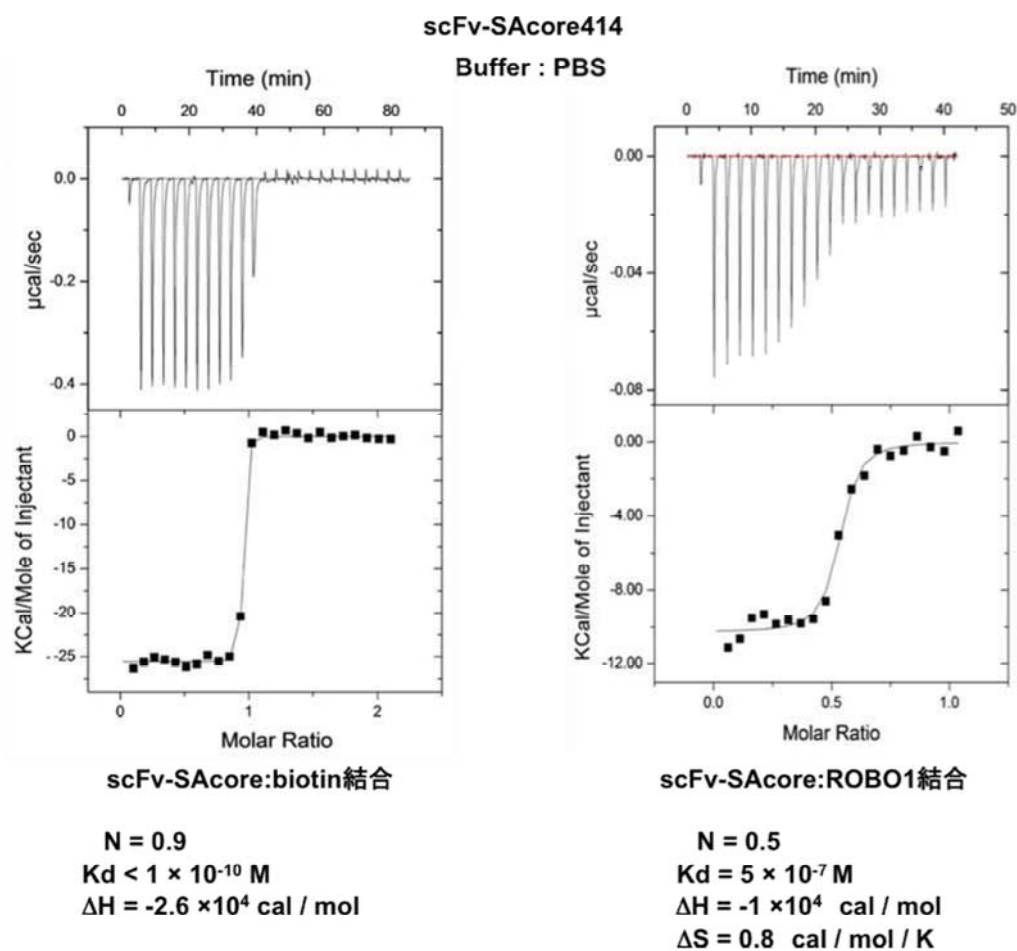


図 51 ITC による scFv-SAcore 変異体とビオチン、ならびに抗原(ROBO1)との相互作用解析。25℃、PBS 条件下での結果を示した。左から、ビオチンは 4 結合できること、その親和性がきわめて高いこと、右から、抗原は 1 分子あたり 2 分子結合できることが分かる。

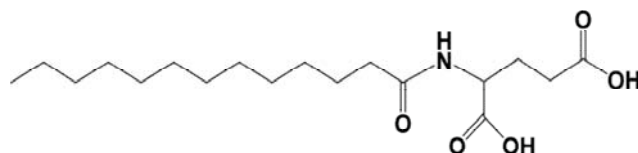
E) ヒト型化抗体(scFv ならびに scFv-Fc)の発現系構築

抗体クローン #1 のヒト型化と同様の手法により、ヒト型化 scFv ならびに scFv-Fc の遺伝子配列を設計し、続いて、それらの分子種を得るための大腸菌による発現系の構築を行った。いずれも大腸菌体内で封入体として得られた。後述の巻き戻し法により可溶性分子種を得ることができた。

F) 新規な巻き戻し法の構築

scFv と種々の改変抗体の調製において、しばしば封入体として発現されることから、より簡便で大規模化を可能とする方法の構築が求められた。そこで、界面活性剤抽出と希釈による巻き戻し系の構築を行った。界面活性剤にはアミノ酸系界面活性剤である C12-Glu(図 52)、希釈時における凝集抑制剤として Arg-HCl を添加すること、希釈方法

を多段階とすること(図 53)、により、顕著な巻き戻し効率を得た。これらは、アミノ酸自身が持つ蛋白質水和構造の安定化作用と、界面活性剤が持つ吸着能、蛋白質の折り畳みにより自発的に脱離する活性剤の選択が鍵となった。本手法により、scFv はもとより、Fab、scFv-SA、scFv-SAc core、scFv-Fc の巻き戻しが可能となった。



C12-Glu (Amisoft)

図 52 C12-Glu

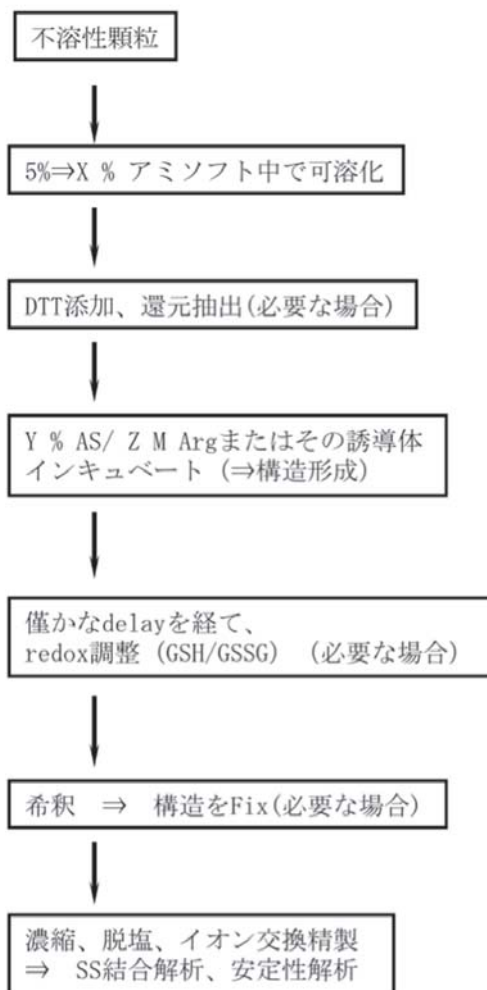


図 53 C12-Glu(アミソフト)を用いた組換え蛋白質の巻き戻し方法

cFv の場合の最適条件は X=1%、Y=0.1%、Z=0.4-0.8M であった。これら三つのパラメーターを変化させること、場合によっては最終的な希釈段階で 40°C程度に加熱することで、多くの改変抗体の折りたたみが可能となる。

②-2-2 高特異性、高親和性、高機能性を有する抗体を用いた生体分子の細胞内局在解析 (JBA 駒場分室(横河電機株)、東京大学先端科学技術研究センター)

イノシトールリン酸化酵素抗体

1)抗体作製、抗体評価

胞骨格調節や、細胞遊走、接着に関与する分子イノシトールリン酸化酵素の各アイソフォーム特異的な配列を選択して gp64 融合タンパクとして発現したバキュロウイルスをマウスに免疫することにより単クローン抗体を作製した。それぞれのアイソフォームは各組織に特徴的な発現パターンを示した。

2)組織染色による解析

作製した抗体を用いて脳、網膜、筋、肺、腎、精巣などのイノシトールリン酸化酵素を免疫組織染色すると、例えば、ラット精巣では、以下のように精子細胞質に発現が見られた。

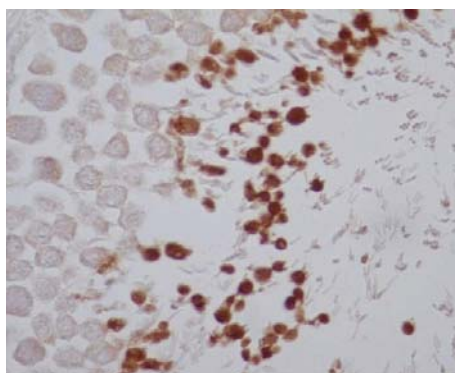


図 54 免疫組織染色(ラット精細胞細胞質)

APE 抗体

A)抗体作製

高特異性、高親和性、高機能性を有する抗体を用いた生体分子の細胞内局在解析を行うために、対象タンパクとして細胞内局在に興味を持たれるものの、現時点で上記目的に使用できる良質な抗体が存在しない APE(Akt phosphorylation enhancer)を候補として選び、3カ所のエピトープを設定し抗原を作製した。抗原は、バキュロウイルス表面に gp64 融合タンパクとして発現させた上で、そのバキュロウイルスをマウス免疫に使用した。

現在までに二カ所のエピトープ(A-1、A-2)に対するモノクローナル抗体が得られ、そのスクリーニングを行った。A-1、A-2 とも、Western blotting および免疫沈降に使用可能な抗体を産生するハイブリドーマを数クローン得ることができた。また A-1 については免疫染色に使用可能なクローンを得ることができた。

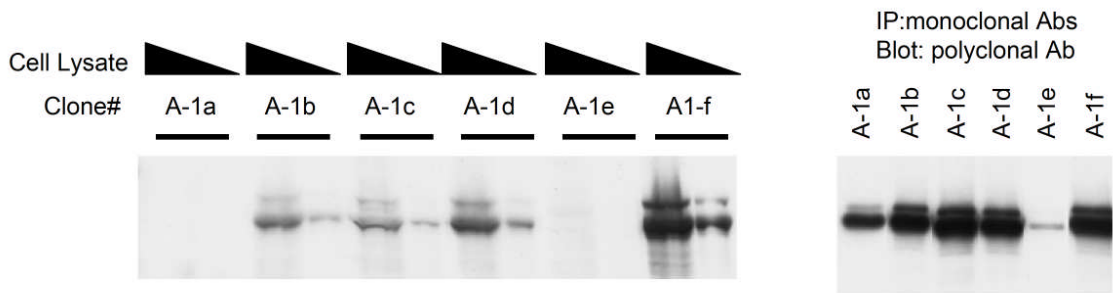


図 55 APE 抗体の免疫染色(Hela cell)

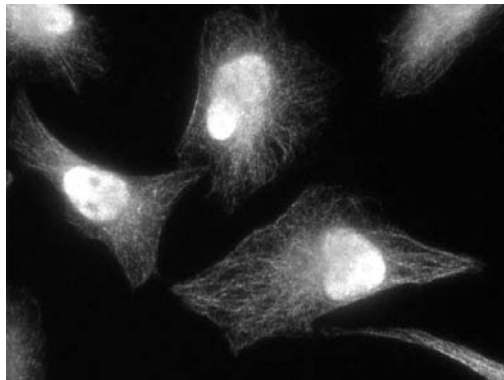


図 56 APE 抗体の免疫染色による評価(HeLa cell)

B)免疫染色による検討

選択した抗体を用いて、内因性タンパクの局在が、成長因子刺激、細胞接着、細胞周期などに伴い変化するかを検討した。APE の細胞内局在は、間期には主に細胞質に存在し、M 期には細胞質の他に分裂期微小管への局在を認めた。

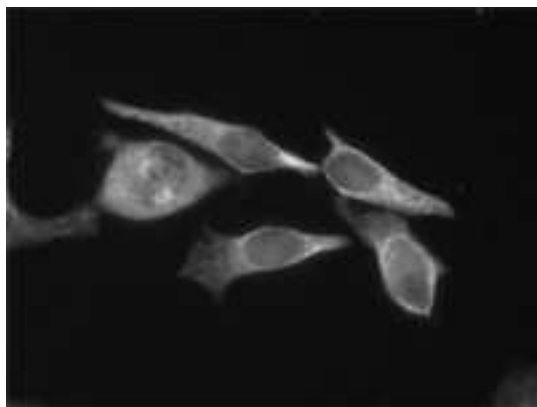


図 57 APE は M 期に分裂期微小管へ局在する

C)免疫沈降と Western による検討

細胞免疫染色での検討により、細胞内局在の変化が認められたタンパクについて、酵素阻害剤処理前後の免疫沈降や、免疫沈降した内因性タンパクの *in vitro* でのキナーゼ、ホスファターゼアッセイなどを行い、タンパクの修飾の有無を検討した。

APE は M 期に SDS-PAGE で molecular shift が認められ、このシフトは、 λ ホスファターゼで消失することから、APE は M 期でリン酸化されることが明らかになった。

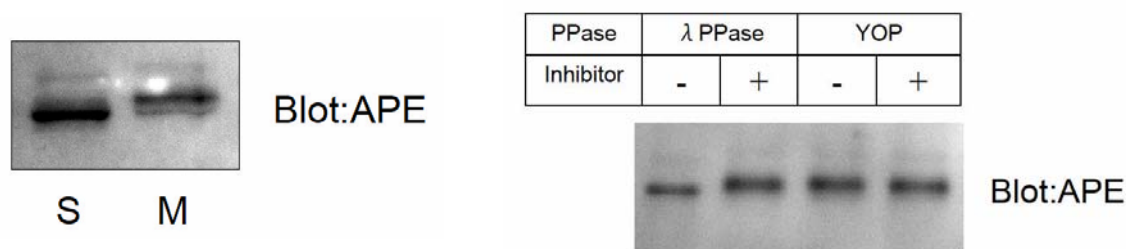


図 58 APE は M 期にリン酸化される

これらのモノクローナル抗体は、既存のポリクローナル抗体と比較して、Western blotting や免疫沈降における特異性が著しく改善していた。このような特異性向上がプロテオミクス解析などを通じて対象タンパクに対する新規結合タンパクのクローニングにつながるかどうか、今後検討予定である。

D)プロテオミクスへの着手

上記の検討は内因性タンパクの変化を解析しており、過剰発現などの実験系に伴うアーチファクトではなく、生理的に起こっている現象と考えられる。細胞内局在や分子の修飾を受けるタンパクについては、そのような変化が他のタンパクとの相互作用によって生じていると考えられ、このようなタンパクについては、内因性結合タンパクを検討するために、磁気ビーズと共有結合させた抗体による免疫沈降と免疫沈降物の LC-MS による解析を行うこととした。複数エピトープに対して抗体が得られている分子については、特異性および免疫沈降効率が最も高い抗体を比較検討して選択し、実験に用いる抗体を精製した。

②-2-3 強力なエフェクター活性または天然にないエフェクター機能を有する超活性抗体

(東京理科大学薬学部)

1)タンデム Fc 型改変抗体の開発

A)タンデム Fc 型改変抗体の cDNA コンストラクト

CD20 抗原に対するマウス mAb である 1F5 の VH と VL 遺伝子をクローニングした。また、ヒト κ CL と IgG1-CH の遺伝子をクローニングした。これらを用いて、キメラ抗体の遺伝子およびその Fc ドメインが 2 つあるいは 3 つタンデムに連結したコンストラク

トを作製し、それぞれを発現ベクターpCAGGS-neoN と pCAGGS-dhfrN に挿入した。

B) タンデム Fc 型改変抗体のタンパク質作製

上記両ベクターを CHO-DG44 細胞に導入して、薬剤耐性選択により安定高発現細胞株を得た。それらの培養上清から抗体を精製した。まず protein G カラム、次に分子篩 HPLC によって精製した。

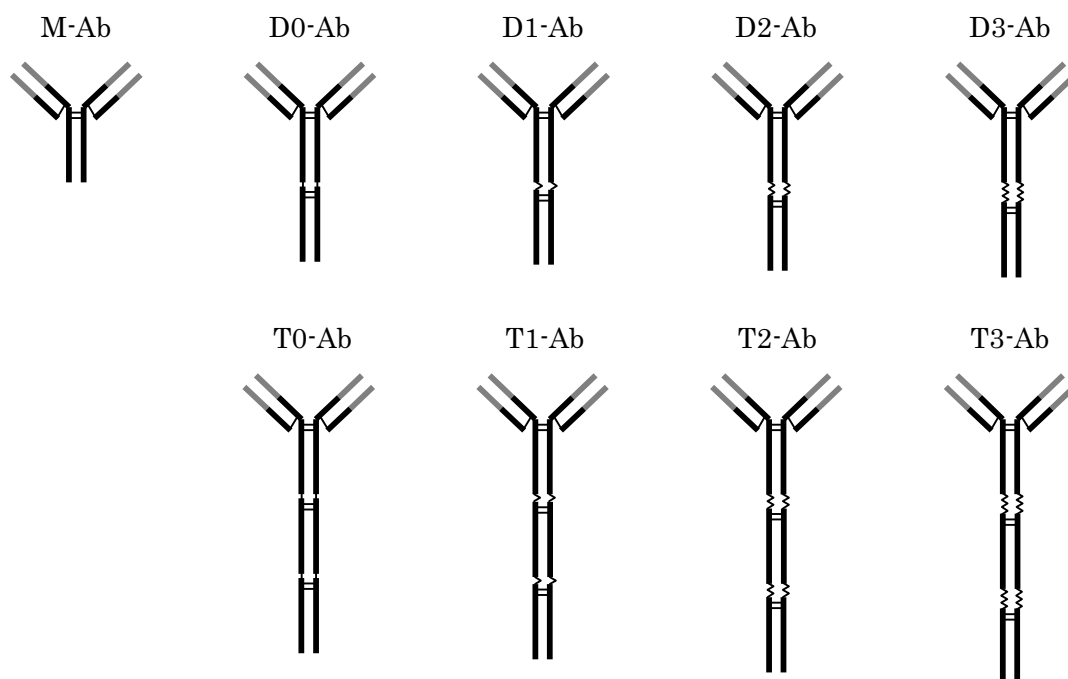


図 59 作製したタンデム Fc 型超活性抗体の模式図

命名は、M が Fc monomer、D が Fc dimer、T が Fc trimer を意味する。番号 0、1、2、3 はリンカー(Gly·Gly·Gly·Gly·Ser)_n の長さ(n の数)を意味する。

C) 抗原 CD20 に対する結合親和性

CD20 を発現している Ramos 細胞にタンデム Fc 型改変抗体を反応させて、蛍光標識二次抗体を用いて、flowcytometry によって評価した。その結果、M-Ab に比べて、改変抗体の抗原親和性は同等ないし若干低下していた。

D) Fc γ 受容体(Fc γ Rs)との親和性

Fc γ Rs の細胞外ドメインをクローニングして、リコンビナントタンパク質として発現させた。これを固相化して、改変抗体を反応させて、二次抗体によって結合活性を測定した。Fc γ RI への結合活性は Fc 多量体化による変化があまり見られなかったが、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIII(Val158)、Fc γ RIII(Phe158)のいずれについても、結合活性が増強していた。T-Ab>D-Ab>M-Ab の順番であり、リンカーがある方がリンカーのない抗体よ

りも強力だった。T3-Ab の結合活性は、通常の抗体である M-Ab に比べて、100 倍前後増強されていた。

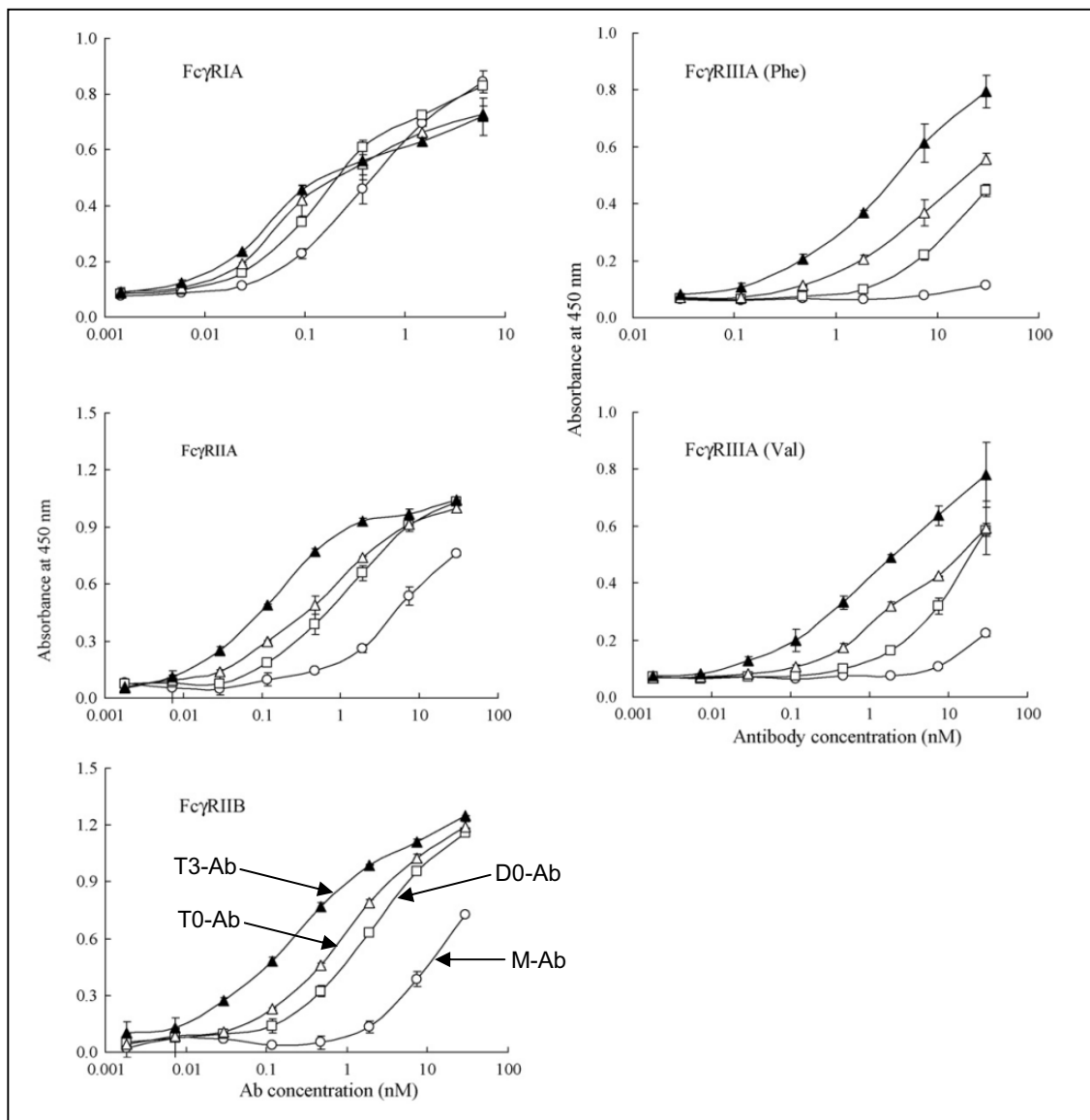


図 60 タンデム Fc 型改変抗体の Fc γ 受容体への結合親和性比較

E)ADCC(Antibody-dependent cellular cytotoxicity)活性

ADCC の測定には、健康人の末梢血から分離した単核球細胞(PBMC)をエフェクター細胞として、Ramos 細胞を標的細胞とした。E/T 比を 25 として、抗体濃度を変量して細胞傷害活性を、細胞外の LDH 酵素活性から評価した。その結果、ADCC 活性は Fc γ RIII 受容体への結合活性と同様に、T3-Ab>T0-Ab>D0-Ab>M-Ab の順番であった。リンカーがある方がリンカーのない抗体よりも強力だった。T3-Ab の活性は、天然の抗体である M-Ab に比べて、50-100 倍増強されていた。T3-Ab と M-Ab とをさらに比較してみる

と、E/T 比を変えても、Phe158 型ホモ接合体あるいは Val158 型ホモ接合体の PBMC を用いても、Ramos の代わりに CD20 の発現量が少ない Namalva 細胞を用いても、T3-Ab の優位性は明らかだった。

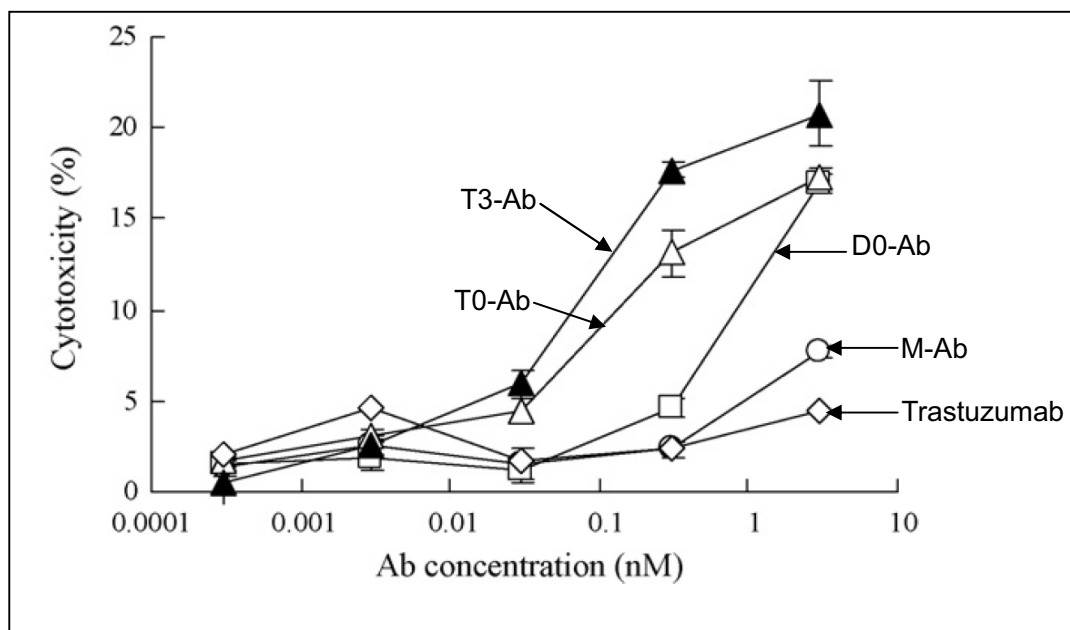


図 61 タンデム Fc 型改変抗体の ADCC 活性

CDC (Complement-dependent cytotoxicity) 活性も検討した。CDC 活性においては、T3-Ab と M-Ab に差がなかった。補体の活性化には、抗体の Fc 部分の特別な配位が必要であり、それがタンデム Fc 型改変では満たされないであろう。

いずれにしても、抗 CD20 抗体である rituximab の制がん活性は、臨床的な研究から ADCC が重要であることが示唆されている。その意味で、タンデム Fc 型改変体は制がん抗体としての利用が期待される。

F) 単球系細胞からのサイトカイン/ケモカイン分泌促進

がんの臨床研究から、腫瘍塊に細胞傷害性T細胞やマクロファージが浸潤している患者は、浸潤していない患者よりも予後がよいことが報告されている。そこで、図37に示すように、がん細胞に結合した改変抗体が単球/マクロファージ系細胞に働いて、それらの細胞がケモカイン/サイトカインを分泌するのを促進する可能性がある。ケモカインはT細胞やマクロファージを遊走させて、抗腫瘍効果を発揮する可能性がある。そこで、Ramos細胞に改変抗体を反応させたうえで、エフェクター細胞として単球系細胞株 THP-1を反応させた。その結果、インターフェロン- γ 、MIP-1 α あるいはIL-8が発現誘導されることが判明した。IFN- γ もMIP-1 α も、標的細胞と抗体とエフェクター細胞

の三者が揃っていないと分泌されなかった。

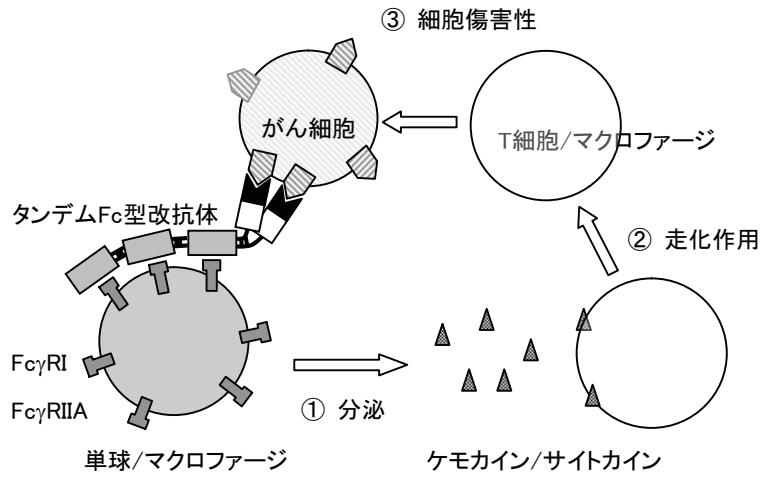


図 62 抗体依存性サイトカイン分泌作用

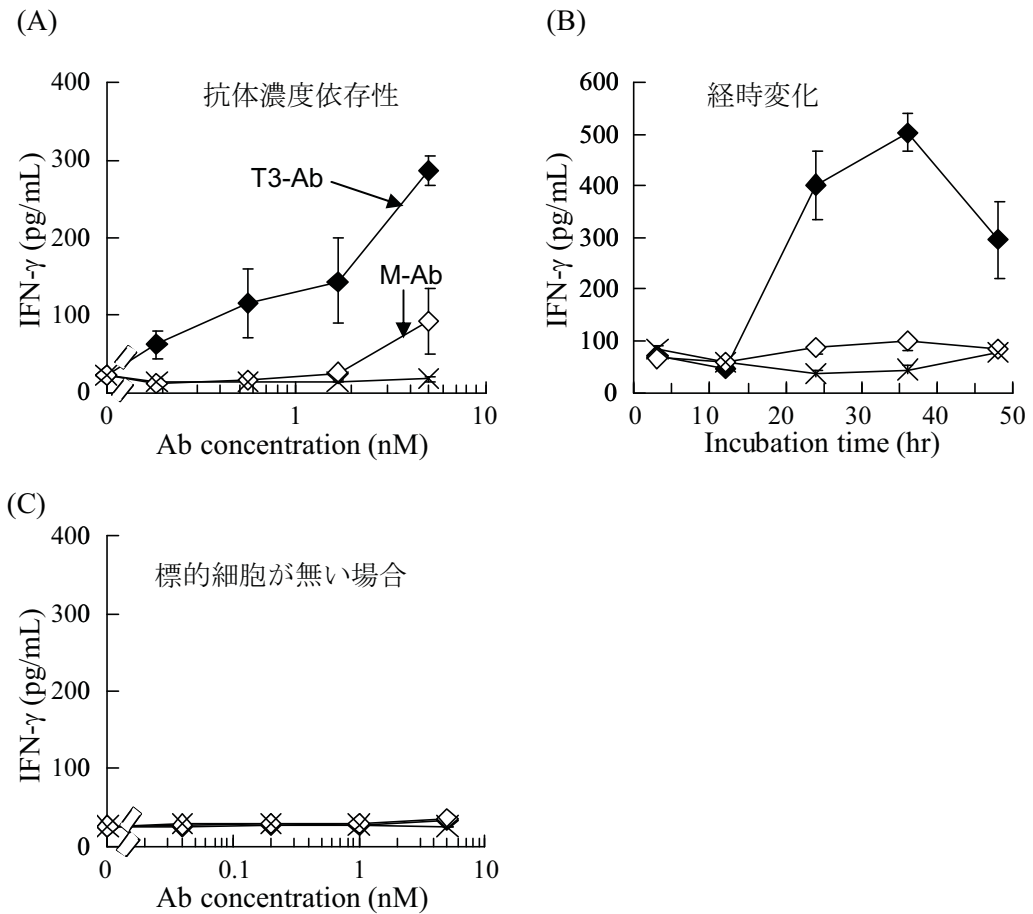


図63 抗体依存性サイトカイン分泌作用

ヒトRamos細胞にT3-AbあるいはM-Abを反応させて、単球系細胞THP-1と培養した。その結果、分泌されたインターフェロン γ を測定した。

図63に示すように、抗体濃度依存性と経時的な変化を見ても、T3-AbはM-Abよりもずっと効率よくIFN- γ の産生を誘導した。IFN- γ のみならず、MIP-1 α の産生においても同様の結果を得た。THP-1細胞では、NK細胞と違って、Fc γ RIとFc γ RIIが発現しており、Fc γ RIIIはほとんど発現していない。したがって、T3-AbはFc γ RIとFc γ RIIに働いて、こうしたサイトカイン/ケモカイン分泌をもたらしたものと考えられる。

G)がん細胞貪食におけるオプソニン活性

phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)で分化させたTHP-1細胞をエフェクター細胞として、Ramos細胞にT3-AbあるいはM-Abを反応させて、貪食させた。両細胞を異なる蛍光で標識し、flowcytometryによって評価した。その結果、T3-AはM-Abに比べて明らかにオプソニン活性が増強されていた。

H)in vivo制がん活性

a)T3-AbとM-Abと大量作製

T3-AbとM-Abと大量作製がまず課題となった。動物実験に用いるとなると、数mgの抗体が必要になる。この作製に時間と労力がかかった。2名がそれぞれT3-AbとM-Abを作製し、要した時間は8ヶ月だった。in vivoの制がん活性を明らかにすることはそれでも重要な研究課題である。

T3-AbあるいはM-Abを安定に発現するCHO-DG44細胞クローンをまずウシ血清入り培地で増殖させた後、無血清培地に置換して、その培養上清から抗体を精製した。25Lの培養上清から5mgのT3-Abを得た。また、20Lの培養上清から1.5mgのM-Abを得た。培養上清からT3-AbあるいはM-Abを精製するには、固定化protein Aアフィニティークロマトグラフィー、続いて分子篩HPLCにかけた。

下記の表は、T3-Abの精製表である。固定化protein AでほとんどIgGが精製される。次に、凝集分子を除去するために、分子篩HPLCにかけた。

表 6 T3-Ab の精製

	Total volume (mL)	Protein conc. (mg / mL)	Total protein (mg)	T3-Ab conc. (mg / mL)	Total T3-Ab (mg)	T3-Ab/ total protein	Purification
培養上清	600	6.6	4000	0.39	230	0.000058	1
Protein A	0.85	0.28	0.24	36	30	0.013	220
HPLC 後	11	0.012	0.13	2.5	27	0.21	3500
濃縮後	0.38	0.30	0.11	66	25	0.22	3800
透析後	0.35	0.54	0.19	66	23	0.12	2100

M-Ab も同様に精製された。

b)マウス FcγRIV への結合親和性

タンデム Fc 型改変抗体の最終的な目的は疾患の治療薬であるからヒトに効くことが重要であるが、マウスでの制がん活性評価をする前に、マウス FcγRIV(ヒト FcγRIIIA に相同な分子)への結合親和性を測定することにした。図 64 に示すように、マウス FcγRIV でも T3-Ab は M-Ab よりも強い親和性を示した。しかしながら、ヒト FcγRIIIA の場合ほどその差は大きくなかった。

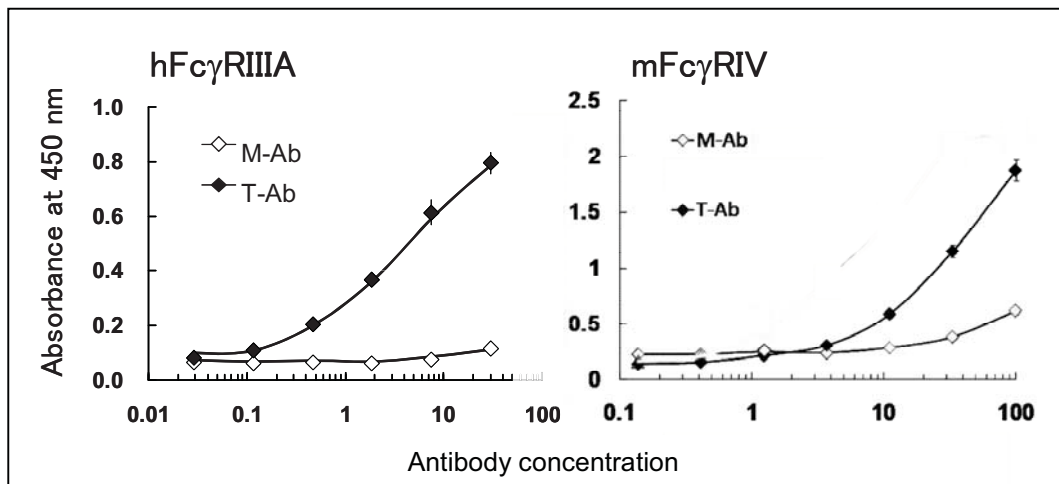


図 64 タンデム Fc 型改変抗体のマウス FcγRIV への結合親和性

c) ヒトがん細胞を移植した担がんマウスにおける制がん活性の評価

6-7 週齢の SCID マウス(♂)にヒト Raji 細胞を 5×10^6 cells/mouse 皮下移植し、T3-Ab、M-Ab あるいは PBS を 3 日目から 1 週間毎に腹腔内投与する。そして、腫瘍の大きさをノギスで測定した。

図 65 に示すように、抗体の投与量が 4 pmol のときには T3-Ab の方が M-Ab よりも強い制がん活性を示したが、投与量が大きくなるにしたがって、両者の関係が逆転していった。この原因が何であるか分かっていない。ヒト FcγRIIIA とマウス FcγRIV の違いによるものか。あるいは、T3-Ab が網内系細胞などの FcγRs にがん細胞と無関係に結合してしまうためなのか。これは今後の重要な研究課題である。例えば、マウス FcγRIV をノックアウトして、ヒト FcγRIIIA を導入したトランスジェニックマウスが作出されている。そんなマウスではどんな制がん活性を示すか。大変関心がある。

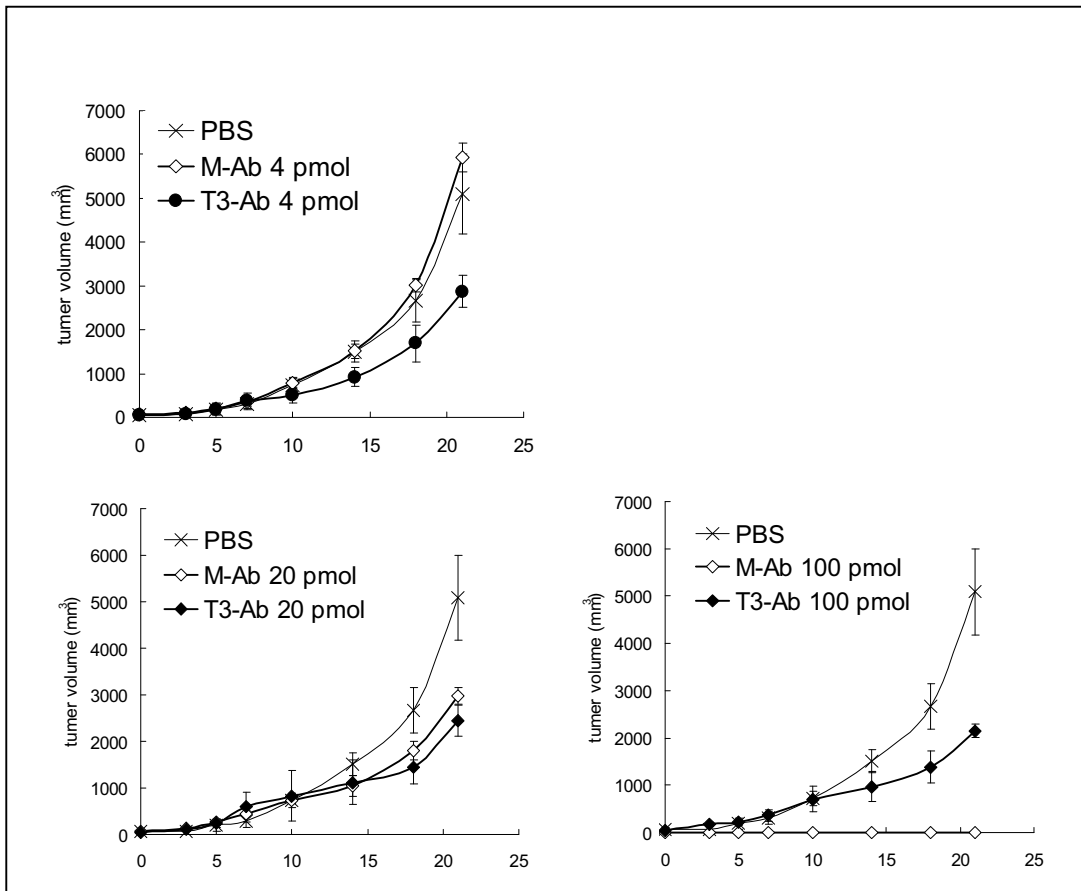


図 65 ヒト Raji 細胞を接種した担がん SCID マウスにおける T3-Ab と M-Ab の制がん活性

競合改変抗体との比較

エフェクター機能が強化された改変抗体は、我々のタンデム Fc 型改変体の他に、フコース欠損型抗体と Fc アミノ酸置換型抗体が報告されている。いずれも FcγRIII への親和性が増強された結果、ADCC が 50–100 倍増強されている。その他の抗体受容体との結合性とエフェクター機能はどうであろうか。上述のように、タンデム Fc 型改変抗体は他の受容体への親和性も強化されており、ケモカインの分泌が増強されていた。また、タンデム Fc 型改変抗体は FcRn 受容体への親和性も上昇して、体内半減期がさらに長くなっている可能性もある。短所は、分子量がそれだけ大きくなるために、①製造の過程で変性タンパク質が生じやすい、②組織への浸透性が低くなっている、という危惧がある。

表 7 競合改変抗体との比較

改変抗体	FcγRIII	ADCC	FcγRII	サイトカイン 分泌	FcRn 持続性
タンデム Fc 型	約 100 倍	50~100 倍	約 100 倍	10 倍	? (長い)
フコース欠損型	約 100 倍	50~100 倍	1 倍	? (→)	? (→)
Fc アミノ酸置換型	約 100 倍	50~100 倍	約 25 倍	? (若干増強)	? (→)

カッコ内は期待される結果を示す。

2) タンデム Fc 型受容体融合体(TNFR_{II}-Fc-Fc)の開発

TNFR_{II}-Fc は etanercept(商品名 Enbrel)として関節リウマチの治療薬として臨床で用いられている。本研究では、etanercept よりも優れた治療薬を目指した基盤研究を実施した。

A) TNFR_{II}-Fc-Fc の cDNA コンストラクト

TNFR_{II}-Fc と TNFR_{II}-Fc-Fc をコードする cDNA は、PCR と制限酵素を用いて構築された。TNFR_{II} の細胞外ドメインをコードする cDNA をヒト IgG1 の Fc(ヒンジ部から CH3 ドメインまで)に連結した。これを pcDNA3.1/Zeo に挿入した。TNFR_{II}-Fc-Fc を構築するために、タンデムに連結した Fc の cDNA を TNFR_{II} の細胞外ドメインの下流に連結した。フレキシブルなペプチドリンカーとして(G₄S)₃を 2 つの Fc の間に挿入した。

B) TNFR_{II}-Fc-Fc のタンパク質作製

上記発現ベクターを CHO-DG44 細胞に TransFast でトランスフェクトし、IMDM+2%FCS = 0.1mg/ml zeocin 培地で 96 穴培養器を用いて培養した。1 週間後、限界希釈法で細胞をクローニングした。クローニングした細胞を無血清培地で培養し、固定化した protein A で抗体をアフィニティー精製した。

分子篩 HPLC と SDS-PAGE 電気泳動の結果、TNFR_{II}-Fc-Fc には期待通り、2 本のペプチド鎖から成る 200kDa の分子とともに、1 本鎖の 80kDa の分子が生成していた。以下、TNFR_{II}-Fc-Fc (200kDa)および TNFR_{II}-Fc-Fc (80kDa)と略す。

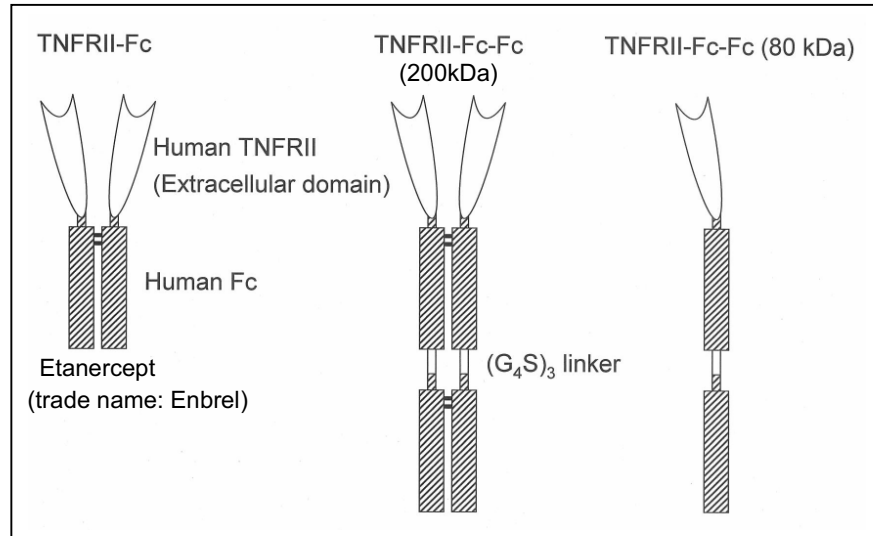


図 66 TNFRII-Fc-Fc の構造 200kDa と 80kDa とが存在した。

C)TNFRII-Fc-Fc の TNF α 結合活性

TNF α を固相化して、これらのタンパク質の結合活性を評価した。その結果、TNFRII-Fc-Fc(200kDa)は、TNFRII-Fc と同じ活性を示し、TNFRII-Fc-Fc(80kDa)は弱い活性を示した。

D)TNFRII-Fc-Fc の TNF α 細胞毒性中和活性

前記のように、TNF α との結合活性は、TNFRII-Fc-Fc(200kDa) = TNFRII-Fc > TNFRII-Fc(80kDa)であった通り、TNF α の殺細胞活性を中和する能力も TNFRII-Fc-Fc(200kDa) = TNFRII-Fc > TNFRII-Fc(80kDa)であった(図 67)。

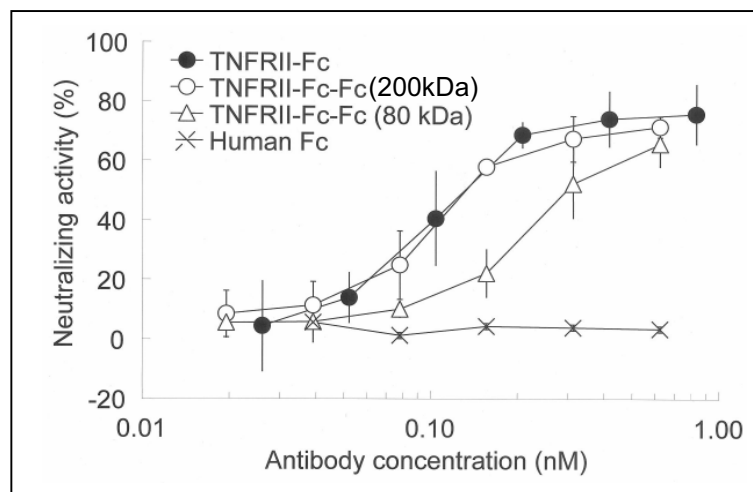


図 67 TNFRII-Fc-Fc の TNF α 中和活性

E) TNFRII-Fc-Fc の Fc γ 受容体との親和性

Fc γ Rs を固相化して ELISA により結合親和性を評価した。図 68 に示すように、TNFRII-Fc-Fc(200kDa) > TNFRII-Fc-Fc(80kDa) = TNFRII-Fc であった。Fc γ RIIIA のみならず、Fc γ RI、Fc γ RIIA および Fc γ RIIB においてもこの序列は変らなかった。したがって、抗原への親和性も Fc γ Rs への親和性も TNFRII-Fc-Fc が優れているので、強い ADCC 活性が期待された。

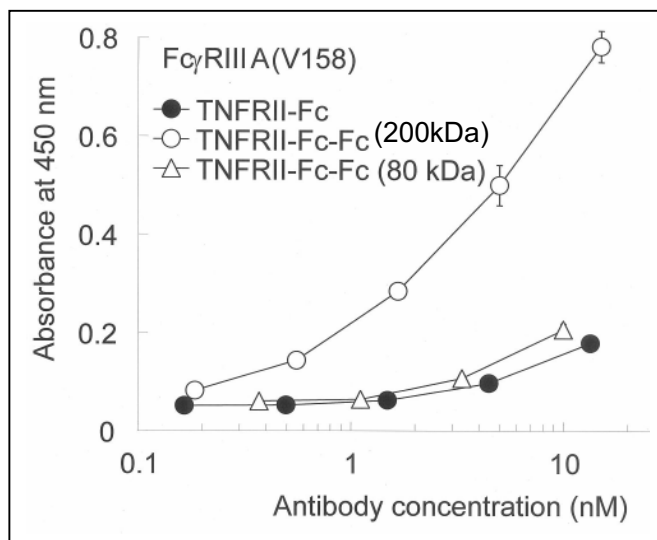


図 68 TNFRII-Fc-Fc の Fc γ Rs への結合親和性

F) TNF α を細胞膜上に発現する細胞に対する ADCC 活性

TNF α は生合成されると、細胞膜上に存在する。その後、細胞膜から離れて分泌される。そこで、TNF α が安定に細胞膜上に存在する細胞株を作製し、TNFRII-Fc 融合体の ADCC 活性を評価した。その結果、どの E/T 比 (Effector cells/target cells ratios) においても、活性は TNFRII-Fc-Fc(200kDa) > TNFRII-Fc-Fc(80kDa) = TNFRII-Fc の順であった。

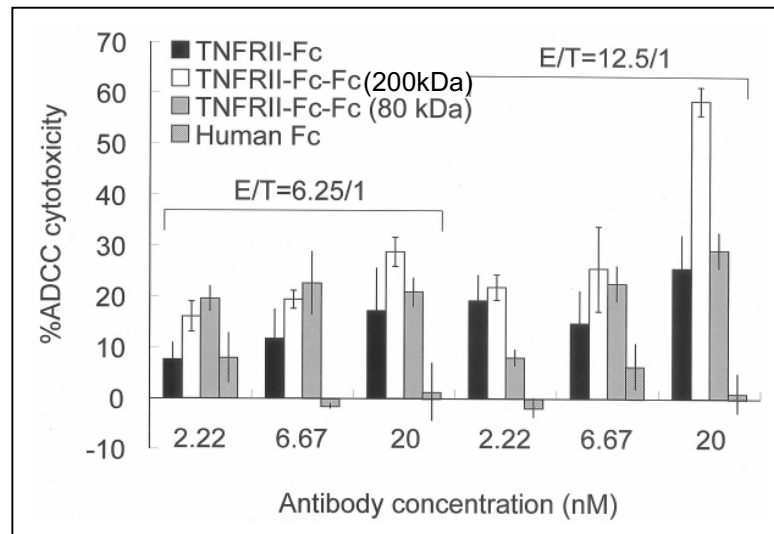


図 69 TNF α 発現細胞に対する TNFRII-Fc-Fc の ADCC 活性

G) TNF α を細胞膜上に発現する細胞に対する CDC 活性

ウサギ新鮮血清を補体原とした Complement-dependent cytotoxicity (CDC) を測定した。その結果、大きな差はなかったが、序列としては、やはり TNFRII-Fc-Fc(200kDa) > TNFRII-Fc-Fc(80kDa) = TNFRII-Fc であった。

H) DSS(Dextran sulfate sodium)による大腸炎モデルマウスにおける抗炎症効果

BALB/c(♂)マウス 5 週齢に 7 日間、飲み水に 5%(W/V)DSS を加えておく。マウスは大腸炎を発症する。そのために体重が減少していく。DSS を普通の水に戻すと体重が戻る。第 3 日から 7 日まで毎日薬物を投与した。体重を第 21 日まで測定した。

その結果を図 70 に示す。TNFRII-Fc-Fc(200kDa) 0.04 nmol と TNFRII-Fc 1.2 nmol がほとんど同じ治療効果を示している。また、TNFRII-Fc-Fc(80kDa)も 0.4 nmol で治療効果を発揮した。以上の結果は、TNFRII-Fc-Fc が既存薬 TNFRII-Fc よりも優れた治療効果を発揮することを期待させる。

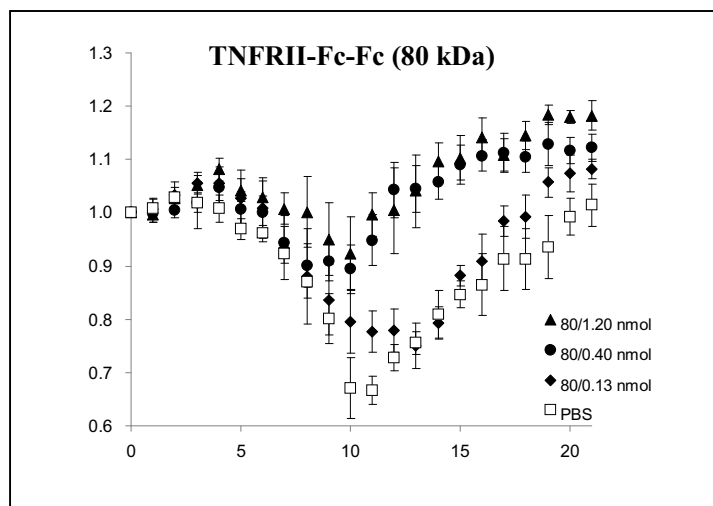
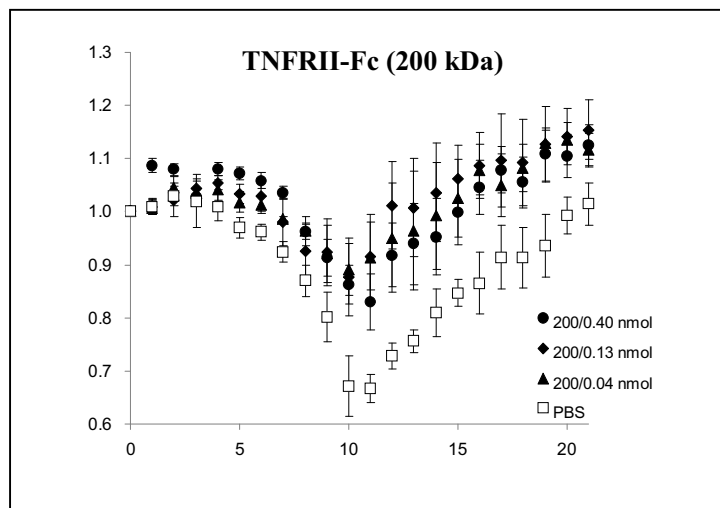
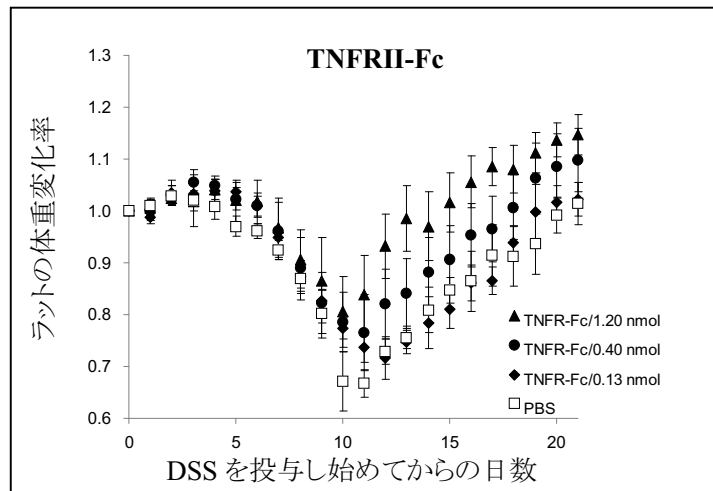


図 70 DSS 大腸炎マウスモデルにおける TNFR-II-Fc-Fc の治療効果

②-2-4 新規非免疫法による抗体作製

(株)カイオム・バイオサイエンス)

1) 発芽バキュロウイルス発現系と ADLib®システムを組み合わせた膜タンパクに対する新規抗体作製法の開発

GPCR を含む複数回膜貫通タンパクには従来より医薬の重要なターゲットと認識されてきたが、従来のモノクローナル抗体作製法では抗体が取得しにくいことが知られている。(株)カイオム・バイオサイエンス(以後、カイオム)が事業化を行っている、完全に *in vitro* な新規抗体作製技術、ADLib®システムは、ニワトリ B 細胞由来の培養細胞株である DT40 の自律的な抗体遺伝子組換えを促進することで、細胞表面に抗体分子がディスプレイされた細胞集団で構成される大規模な抗体ライブラリーを作製し、抗原との *in vitro* での結合反応を用いて特異的抗体産生クローンの単離を行う方法である。通常は可溶性のタンパクを抗原として用いるが、先端研浜窪先生のグループにより開発された、発芽バキュロウイルス上に生理的な条件で複数回膜貫通タンパクをディスプレイさせる発現系を抗原として ADLib®システムに適用することで、これらに対する機能的な抗体作製を行うことができると考えられる(図 71)。

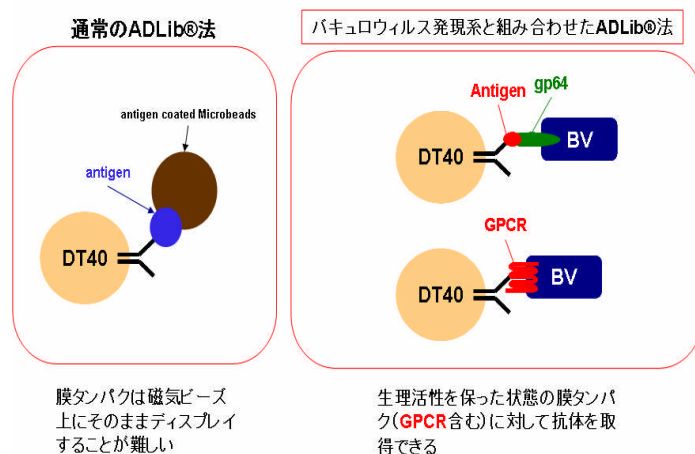


図 71 発芽バキュロウイルス発現法と ADLib®法

A) 発芽バキュロウイルス発現系と DT40 の相互作用の観察(図 72)

バキュロウイルスと DT40 細胞の結合を検出するためには、通常の ADLib®システムで用いる磁気ビーズによる細胞の選別では非特異的な反応が多く、抗体作製への応用が困難であることが明らかとなったため、MACS®システムと FACS システムの組み合わせによるバキュロウイルスと DT40 細胞の相互作用の観察の系の確立を行った。その結果、バキュロウイルスと特異的に相互作用する DT40 細胞クローンの単離に成功し、これを

用いたバキュロウィルスに反応する DT40 細胞を濃縮する系の確立に成功した。

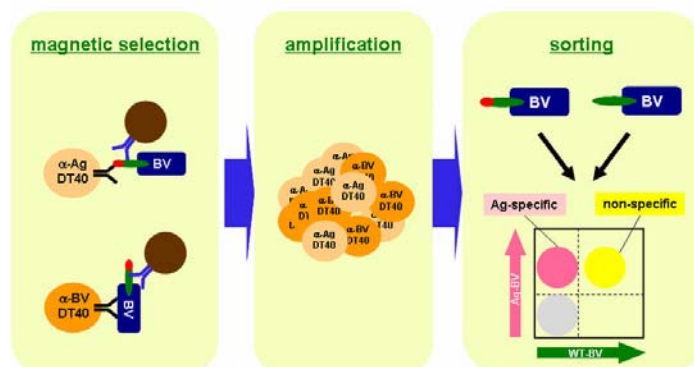


図 72 磁気ビーズとセルソーティングの組み合わせによる新しいスクリーニング方法

B)gp64 フュージョン型タンパクに対する特異的な抗体作製(図 73)

先端研浜窪先生よりご提供いただいた、細胞内因子 A の gp64 フュージョン型タンパクを発現するバキュロウィルスを用い、A)で開発した MACS®および FACS を組み合わせたセレクション系を用いて因子 A に対する特異的な抗体の作製を試みた。因子 A 発現バキュロウィルスと野生型バキュロウィルスを同時に用いて細胞染色する系を用いることで、因子 A に対して特異的に反応する抗体の単離に成功した。この抗体の性質について、継続して検討中である。この単離方法により、因子 A についての抗体作製をすでに 5 回実施しており、反応条件の改善により、抗体の取得効率が改善している。

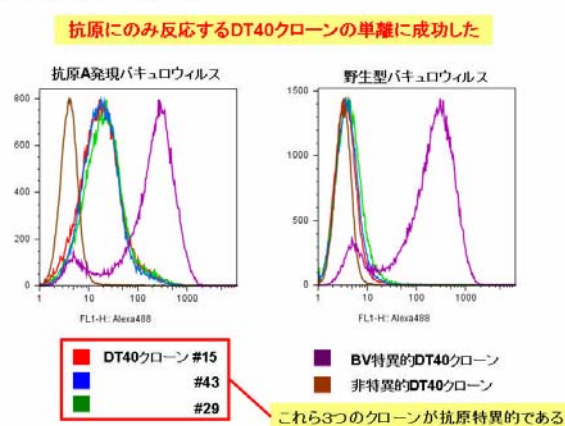


図 73 抗原 BV 特異的細胞の検出、単離

C)GPCR タンパクに対する抗体作製の試み (図 74)

さらに GPCR ファミリーに属する膜タンパク B、および C についても、その発現バキ

ユロウイルスを提供いただき、ライブラリーからの選択を行った。同様の二重染色系において、タンパク B および C を発現するバキュロウイルスのみに反応している細胞集団を検出することに成功した。これらの細胞集団からセルソーティングにより細胞を単離し、その反応性を観察したところ、抗原を発現するバキュロウイルスに対して選択的に結合することが明らかとなった。

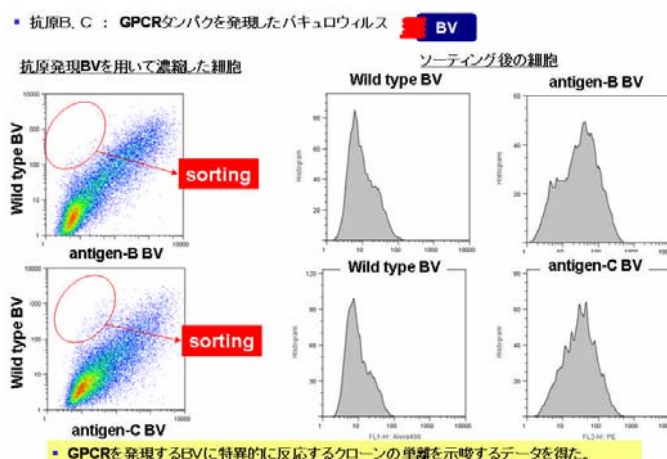


図 74 GPCR 発現バキュロウイルスを用いた実験

この結果から、A)、B)において開発された抗体作製法は、GPCR に対しても適用可能であることが示唆された。

D)他のタンパクに対する抗体作製への応用

上記で開発された MACS®および FACS を用いたセレクション手法は、バキュロウイルス以外の他のタンパクに対しても適用可能であると考えられたため、膜タンパクの細胞外ドメインタンパクに対して MACS を用いた細胞選別を試みたところ、ターゲットに対し特異的な抗体の単離に成功した。

2)ADLib®システムによる癌特異的抗原に対する抗体作製

平成 22 年度は、前章で述べたシステムを含む、細胞膜に発現するタンパクに対する抗体作製法を用いて、財団法人癌研究会(以後、癌研)との共同研究により、癌研のゲノミクス的手法により見出された癌組織特異的に発現する細胞膜タンパクに対する抗体作製を行った。取り組んだ抗原は、複数膜貫通性タンパクを含む 6 抗原であり、疾患領域は乳がん、膵がん、卵巣がんなどである。

平成 22 年度は、これらのうちの 4 種類について抗体作製を行った。そのうち 2 種類については精製タンパクないしはペプチドを利用した通常の ADLib®システムによる抗体

作製、2種類の抗原(7回膜貫通性)のタンパクについては、細胞膜に発現するタンパクに対する抗体作製法(ADLib® axCELL システム)を適用した。前者の精製タンパクを用いた2抗原のうち1抗原に対しては、複数の抗体を得ることに成功し、今後診断・治療への応用性の検証に入る。後者については、それぞれの抗原を発現した細胞株の作製を行い、これらを材料としてADLib® axCELL システムにより、ELISA レベルで反応性を示したクローンを200個以上得ることに成功した。現在その他の手法により、ターゲットへの反応性の検証を続けている。

②-3 DT40 細胞を中心とした抗体創製技術開発

(岡山大学工学部、帝人ファーマ)

<H. 18~19年度の研究計画と成果>

培養中に自発的に抗体遺伝子を変異させるニワトリB細胞株DT40の構成する抗体ライブラリーを用いて、迅速かつ効率的なin vitro 抗体作製システムを確立し、抗体医薬の候補となる有用抗体を創製することを目的とする。この研究開発の特長は、我々の樹立した抗体遺伝子の変異機能の可逆的ON/OFF制御が可能な細胞株DT40-SWを用いる点にある。DT40-SW株では、細胞外からのestrogen誘導体の刺激により活性化されるCre recombinase とloxP配列で挟んだAID遺伝子の組み合わせにより、AID遺伝子の挿入方向を反転することにより、AIDの発現をスイッチし、結果として変異機能をON/OFF制御できる(図75)。即ち、変異導入に必須のタンパクAIDの発現をONにして培養することにより十分な多様性をもつ抗体ライブラリーを形成させ、そこから目的抗体を産生するクローンを取得した後は、AID発現をOFFにして変異を停止させ、その抗原特異性を安定化するシステムである。

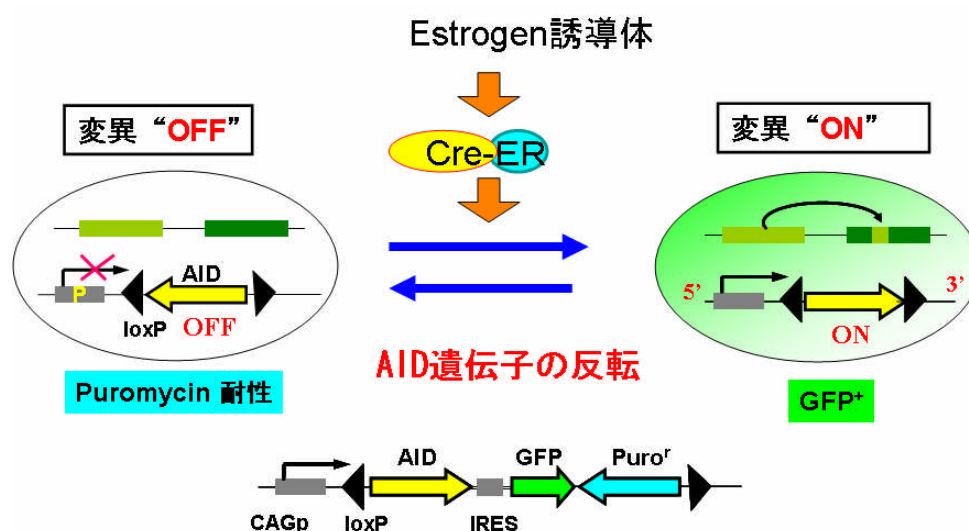


図75 変異機能のON/OFF制御可能な細胞株DT40-SW

このシステムの他の利点として、ライブラリーの形成がin vitroで行われるために免疫

寛容の制限がかなり回避されていること、繰り返し変異導入と選択を行うことにより生体内で起こる抗体の親和性成熟と類似した機構で、抗体の特異性、親和性を改良することができること、が挙げられる。DT40-SWを用いる抗体作製技術をより実用的なものにするために、培養条件、クローン単離条件を最適化することに加えて、遺伝子改変によりDT40-SWに更なる高機能を付与する必要がある。平成18～19年度は、この目標を達成するために、主として以下の点に焦点を当てて検討を行った。

- 1) 免疫寛容を回避した十分な多様性のあるDT40-SW抗体ライブラリーの作製
- 2) 変異導入効率の向上
- 3) 抗体の親和性成熟が可能であることの実証と条件の最適化
- 4) 親和性成熟をより効率的に進行させるための変異導入様式の転換方法の確立
- 5) 抗体産生能力の増強

これらについて検討し、以下のような成果を得た。

1) 変異機能の可逆的ON/OFF制御が可能なDT40-SW株を用いて、免疫寛容の制限の少ない抗体ライブラリーを構築した。

A) DT40-SW細胞を6～10ヶ月長期連続大量培養し、抗体レパートリーの十分な多様性を備えたライブラリーを構築した。このライブラリーからランダムに選んだ34クローンのVH、VLの配列解析を行い、同一のものは全く見いだせなかったことから十分広範な抗体レパートリーが形成されていることを確認した(図76)。

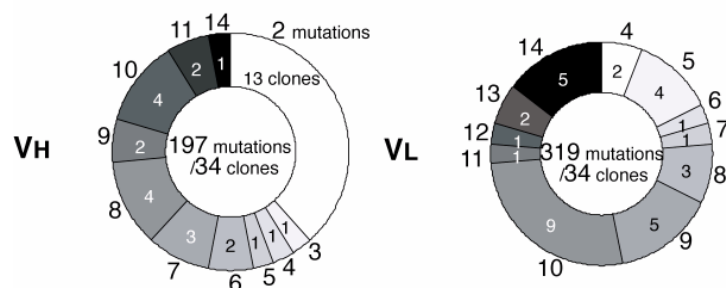


図76 DT40-SWライブラリーの抗体可変部の多様性の確認

B) この抗体ライブラリーを用いて、自己抗原としてのニワトリタンパク(卵白アルブミン、リゾチーム)やssDNAに対する抗体も取得できたことから、免疫寛容による制限が十分回避されていることを確認した。

2) DT40-SWのライブラリーから、迅速に目的抗体産生クローンを単離する方法を確立し、AID発現をOFFにすることにより、単離したクローンの抗原特異性を安定化できることを確認した。また変異機能のON/OFF制御と選択によって、親和性成熟による抗体の改良を行うことができることを確認した。

A) 抗原結合磁気ビーズによる吸着法以外に、セルソーターによる抗原特異的クローンの単離条件を確立した(図77)。この方法は目的細胞が単一細胞として培養プレートに回収できるといふ点で優れている。

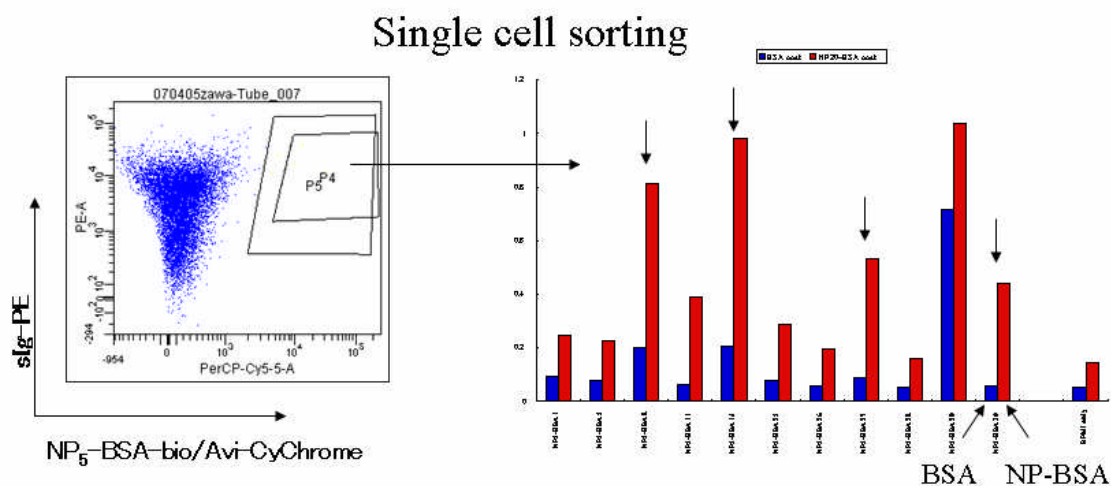


図 77 DT40-SW ライブラリーからのセルソーターによる抗 NP クローンの単離 (左図の P4 区画から単一細胞を単離し、培養後 ELISA で特異性を確認(右図))。

B)DT40-SW ライブラリーから、NP-BSA-biotin などをリガンドとして、磁気ビーズ法やセルソーターによってハプテン NP に対する抗体産生クローンを取得した。単離までに要する時間は 2 週間程度であり、この方法が効率性、迅速性という点で優れていることが示された。

単離されたクローンの抗原特異性を安定に保持するために、4-hydroxytamoxifen 処理して変異機構を OFF にしたクローンを得た。AID-OFF のクローンは puromycin 耐性となるので、薬剤耐性により簡単に単離することが可能である。AID-ON の状態では、一ヶ月以上培養すると NP 特異性の失われた細胞が有意に増加してくるが(図 78 右)、AID-OFF のクローンでは、NP 特異性はまったく消失せず(図 78 左)、抗原特異性が安定に保持されていることが実証された。

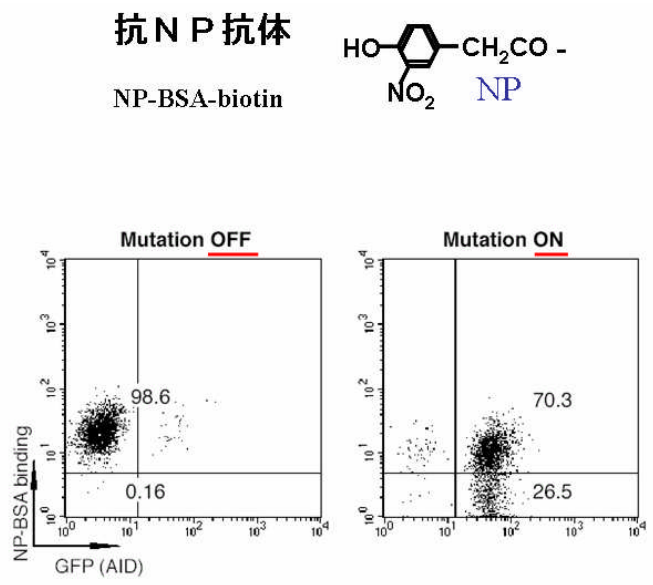


図 78 変異機能の停止による単離された抗体産生細胞の抗原特異性の安定化

この点で、DT40-SW 株の AID 発現の ON-OFF 制御システムは極めて有用である。
 C)このクローンの変異機能を再び ON にし、培養による多様化と選択を繰り返すことにより更に高親和性のクローンを得た(親和性成熟の確認：図 79)。

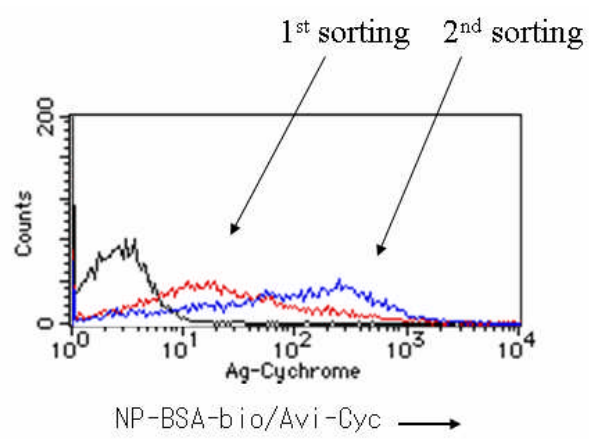


図 79 抗 NP 抗体産生クローンの親和性成熟

3)DT40-SW を用いる抗体作製システムを更に効率よく作動させるために、変異導入効率を上昇させることは、抗体ライブラリーの迅速な形成という点で重要な課題である。また、親和性成熟の効率化という観点からは、導入される変異が主として点突然変異型であることが重要と考えられる。DT40 における抗体遺伝子への変異導入は野生型株では主として遺伝子変換により行われ、数十塩基の領域が、一度に置換される変異様式である。そこで、遺伝子変換に関与する遺伝子 XRCC3 の発現を制御することによって変異導

入様式を点突然変異型に転換できる細胞株を作出することを目指した。

A) 多様性の高いDT40-SWライブラリーを迅速に構築することを目的として、核からの輸出シグナルを含むAIDのC末端部分を欠失させた変異体(AID-ΔC)を内因性のAIDと置き換えた新規細胞株DT40-SW-ΔC(図80)を作製した。この細胞株では、期待されたように変異導入頻度が約2倍上昇していることを確認した。

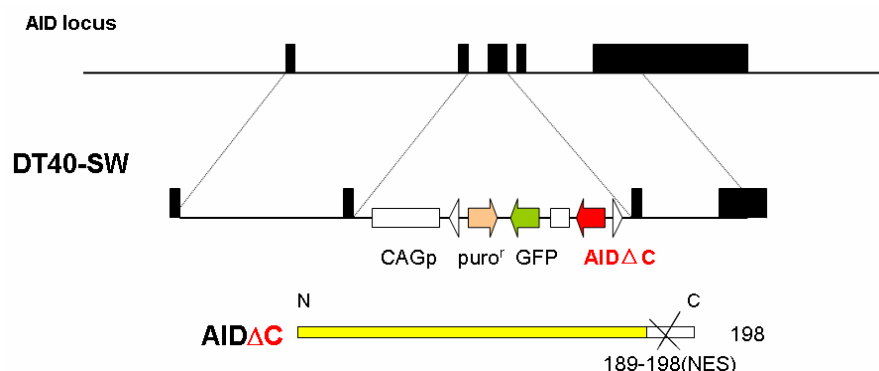


図80 DT40-SW-ΔC株の樹立

B)DT40-SW 細胞における抗体遺伝子の変異は、主としてV遺伝子上流の偽遺伝子の部分配列をコピーして取り込む遺伝子変換によって行われる。これは抗体レパートリーの拡大には有利であるが、選ばれたクローンの親和性や特異性を改良する機構としては点突然変異の方が適していると考えられる。実際にニワトリ体内でこのような使い分けが行われているとの報告もある。従来、DNA修復に関与するXRCC2やXRCC3をノックアウトすると変異は全て点突然変異型になることは知られていたが、細胞の増殖速度が極端に低下する難点があった。

種々検討の結果、2つのXRCC3遺伝子座の片方だけをノックアウトすることにより、十分に点突然変異が導入されるようになり(図81)、細胞増殖にはほとんど影響がないことが分かった。一方のXRCC3だけをノックアウトすることは、1回のノ遺伝子導入操作で実行でき、必要に応じて、親和性成熟に適した点突然変異型の細胞株を得ることが可能である(特許出願済み)。

さらに、内因性XRCC3遺伝子をノックアウトし、tet-offプロモーターに連結したXRCC3を外部から新たに導入した新規細胞株を樹立した。これにより、ライブラリー形成時には遺伝子変換型で抗体遺伝子を多様化し、テトラサイクリン存在下の培養に移すことによって、親和性成熟に適した点突然変異型に転換させることが可能になった。

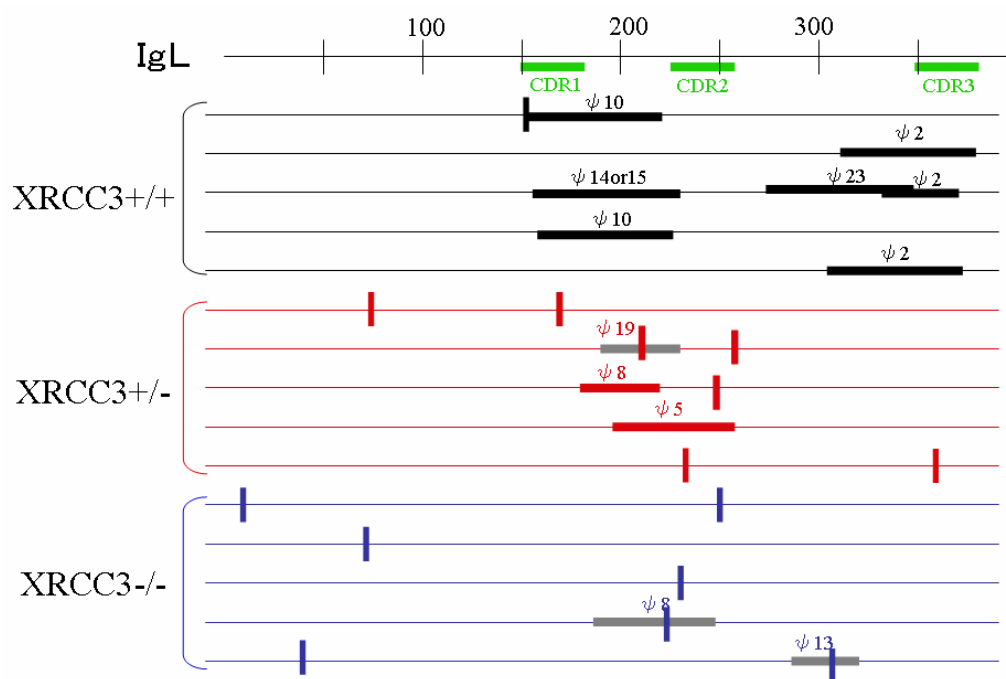


図 81 XRCC3 ノックアウト株における遺伝子変換型から点突然変異型への転換 (縦の短い線が点突然変異を示す)。

4) Pax5 の発現抑制による抗体産生の増強

Pax5 の一方の遺伝子座をノックアウトし発現を低下させることで、形質細胞に特有の転写因子 Blimp-1、XBP-1 の発現が上昇し、抗体産生が約 2 倍に増加することを確認した(図 82)。この方法は、一般にマウスハイブリドーマよりも抗体産生能の低い DT40 の抗体分泌量を増加させる技術として有用である。

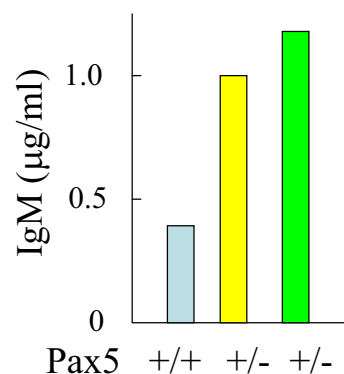


図 82 Pax5 遺伝子を部分的に破壊することによる抗体産生能の増強

<H.20~22年度の研究計画と成果>

H.18~19年度で確立したDT40-SWを用いる抗体作製システムを更に高機能化するために、以下の点に焦点を当てて、研究開発を行った。

- 1) 親和性成熟による高親和性抗体の取得の実証
 - 2) 任意の抗体のVH、VL遺伝子をDT40-SWのVH、VL遺伝子座に導入し、変異導入と選択により機能改変を行うことのできるシステムの構築。
 - 3) ヒト型の抗体を発現するDT40-SWシステムの構築とその利用
- 以下に、各研究の成果について述べる。

1) XRCC3遺伝子の制御による親和性成熟の効率化と、高親和性抗体取得の実証。

比較的低親和性の抗NP抗体産生クローンを用い、一方のXRCC3遺伝子を破壊したXRCC3(+/-)株を作製した。このXRCC3(+/-)抗NP抗体産生クローンを、4~5週間、継代培養し、NP結合性の亢進した集団を、FACSを用いるsingle cell sortingによって単離し、96 wellプレート中で培養した。生育してきたクローンの培養上清中の抗NP抗体のNP結合性を、低密度NP化抗原と高密度NP化抗原に対する相対的結合により評価し、元のクローンよりも抗原に対する親和性の向上したクローンを選択した。元のクローン(Kd=180nM)からKdが0.3nMに向上したクローンが得られたことから、この方法の有用性が実証された。この方法はXRCC3の片方だけのknockoutで実施可能なため、簡便である。

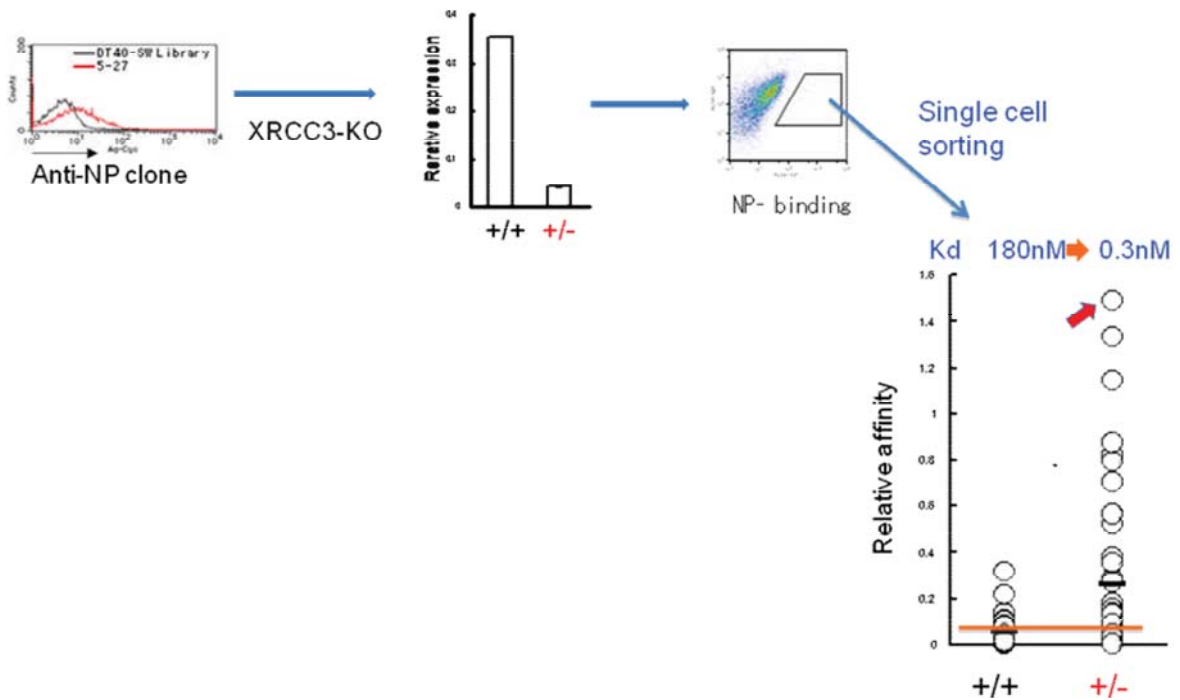


図 83 XRCC3(+/-)株における効率的親和性成熟の実証

2)異種抗体の VH、VL 遺伝子を DT40-SW の VH、VL 遺伝子座に導入する技術の確立と導入抗体遺伝子の機能改変の実施。

マウスやヒトの任意の抗体の VH、VL 遺伝子を DT40-SW の VH、VL 遺伝子座に標的相同組換えにより導入し、キメラ抗体として発現させ、この細胞内で変異させることにより機能改変を行うことができるシステムを確立した。従来 VL の導入は可能であったが、VH の導入については、塩基配列情報が未知の領域があったため独自に塩基配列を解析し、VH 導入用ターゲティングベクターを構築した(図 84)。

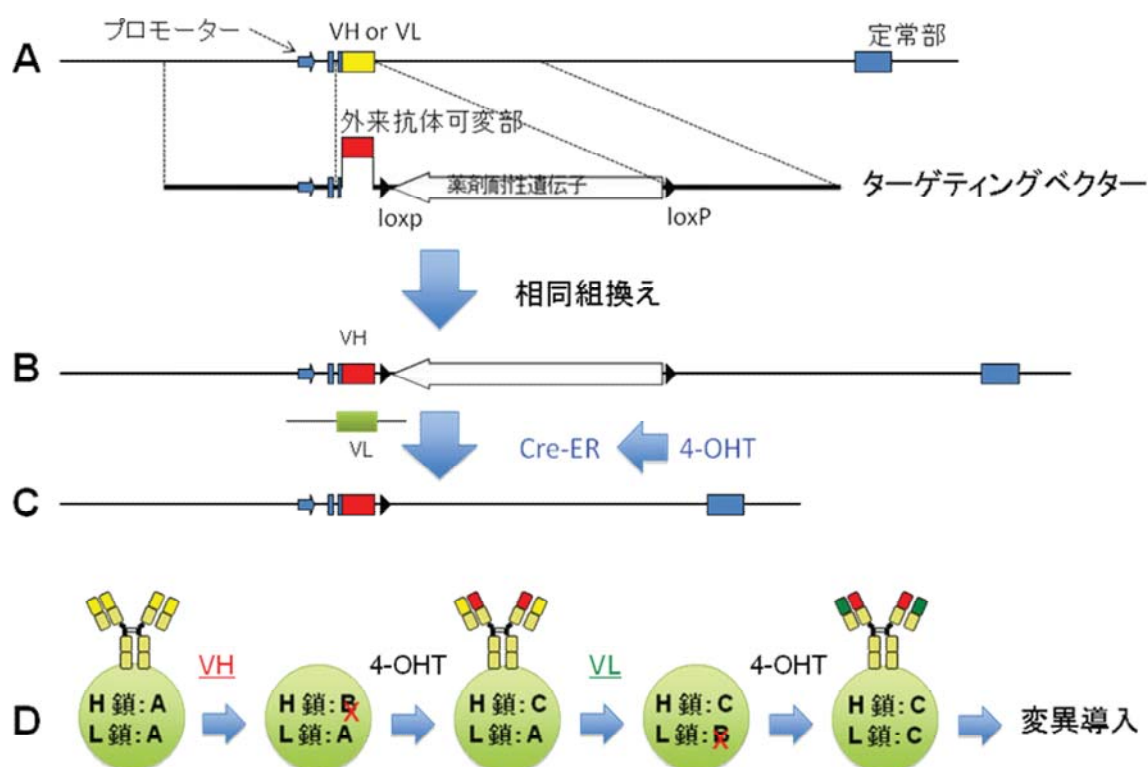


図 84 DT40-SW 細胞への外来 VH、VL 導入システムの確立

このターゲティングベクターは導入しようとする VH や VL の下流に薬剤耐性遺伝子を連結してあるため、ターゲティングが成功すると、H 鎖や L 鎖が発現しなくなるので、sIg が陰性の細胞集団を単離すれば、効率よく相同組換え体を取得することができる。その後、Cre-ER を 4-hydroxytamoxifen(4-OHT)で活性化することにより、薬剤耐性遺伝子を脱落させると、sIg 発現が復活する(図 84)。

この方法により、任意の異種抗体の VH、VL を DT40-SW 内に効率よく導入することができる。実際に、マウスの抗 NP 抗体の VH、VL 遺伝子をこの方法により導入すると、

マウス-ヒトキメラ抗体として、発現することを実証した(図 85)。キメラ抗体は細胞表面に発現し、培養上清にも分泌されること、発現した抗体の抗原特異性は保持されること、を確認した(図 85 B、C、D)。

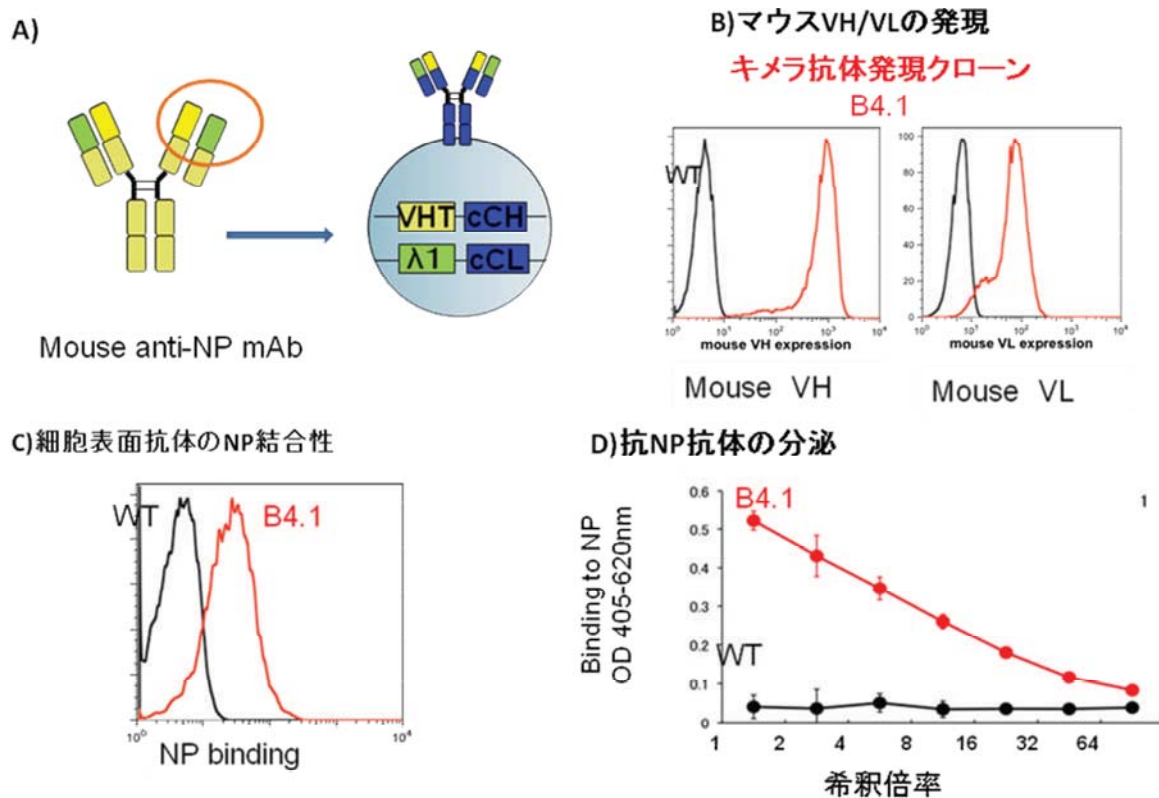


図 85 マウスの VH、VL 遺伝子の DT40-SW への導入とキメラ抗体としての発現。

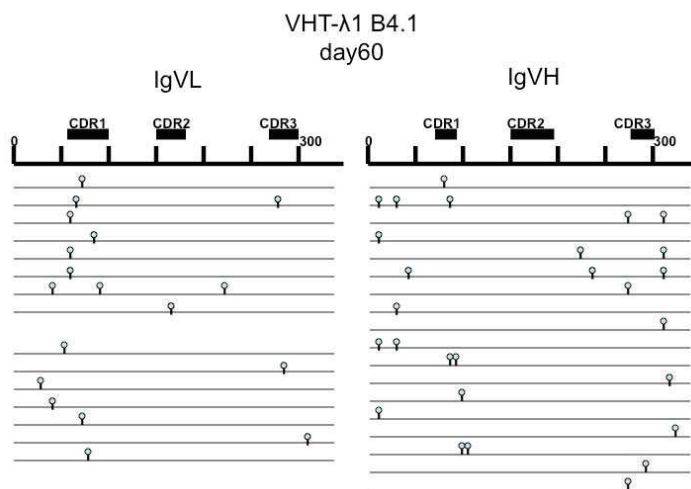


図 86 キメラ抗体の可変部遺伝子への変異導入の確認。

導入された異種抗体の VH、VL 遺伝子には、培養中に多くの変異が導入されることを確認した(図 86)。そこで、キメラ抗体を発現するクローンを一定期間培養した後に、親和性の向上した細胞集団を FACS により単離し、親和性成熟したクローンを単離できるかどうか検討した。

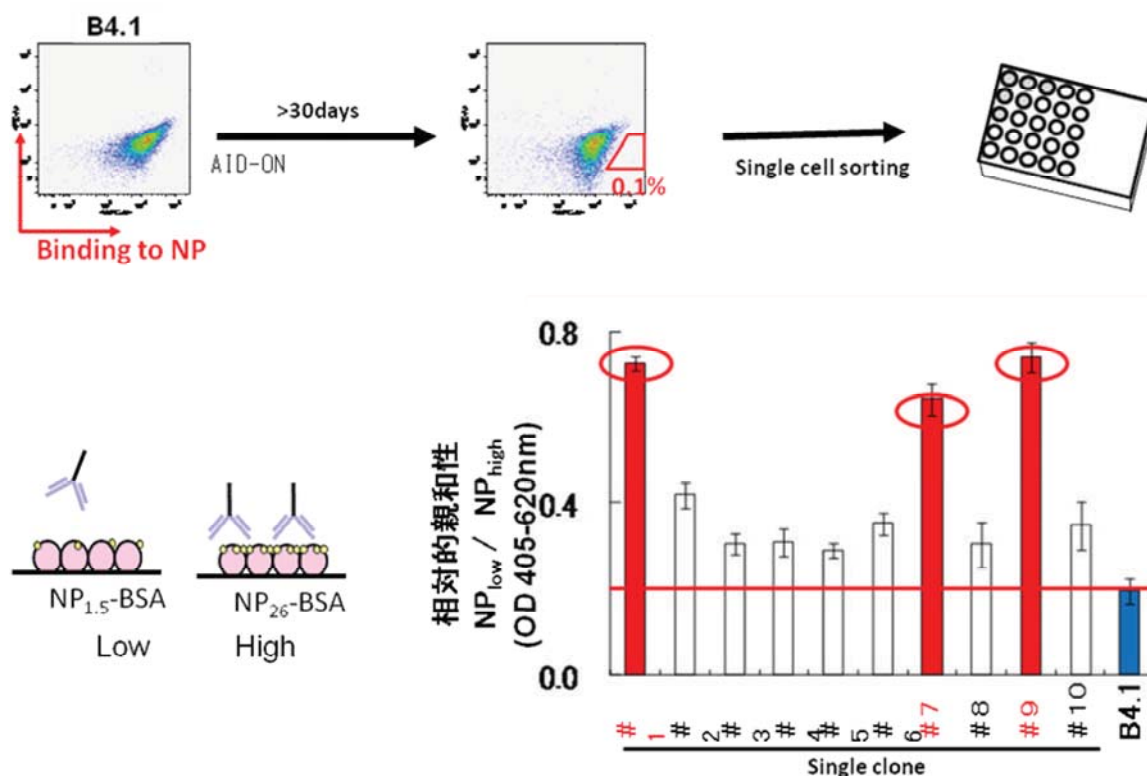


図 87 DT40-SW に導入した異種抗体の親和性成熟の実証。

マウス抗 NP 抗体可変部遺伝子を導入した B4.1 株を 30 日以上継代培養し、NP 結合性の向上した細胞集団を single cell sorting によって単離し、分泌される抗体の NP に対する親和性を評価し、元株の抗体と比較したところ、いくつかの高親和性クローンを得ることができた(図 87、#1、7、9)。これにより任意の VH、VL 遺伝子を DT40-細胞に導入し、変異導入と選択によって、抗体の機能改良を行うことが可能であることが分かった。

3) ヒト型の抗体を発現する DT40-SW システムの構築。

定常部がヒト型の抗体を産生する DT40-SW 細胞は、産生される抗体の機能をヒトの評価系を用いて機能評価できるため、抗体医薬の開発のツールとして有用である。我々は、ヒト IgG1 の定常部遺伝子でニワトリ IgM 定常部遺伝子を置き換えた新規な DT40-SW 株を作製するためのターゲティングベクターを構築した(図 88)。このベクターの特徴は、定常部遺伝子上流に薬剤耐性遺伝子を挿入してあることであり、これによって相同組換えが成功すると、sIg 陰性の細胞になる。この方法により、相同組換え頻

度が低い場合にも、効率よく目的クローンを得ることが可能である。

B ヒトIgG1定常部遺伝子のDT40-SWへの導入

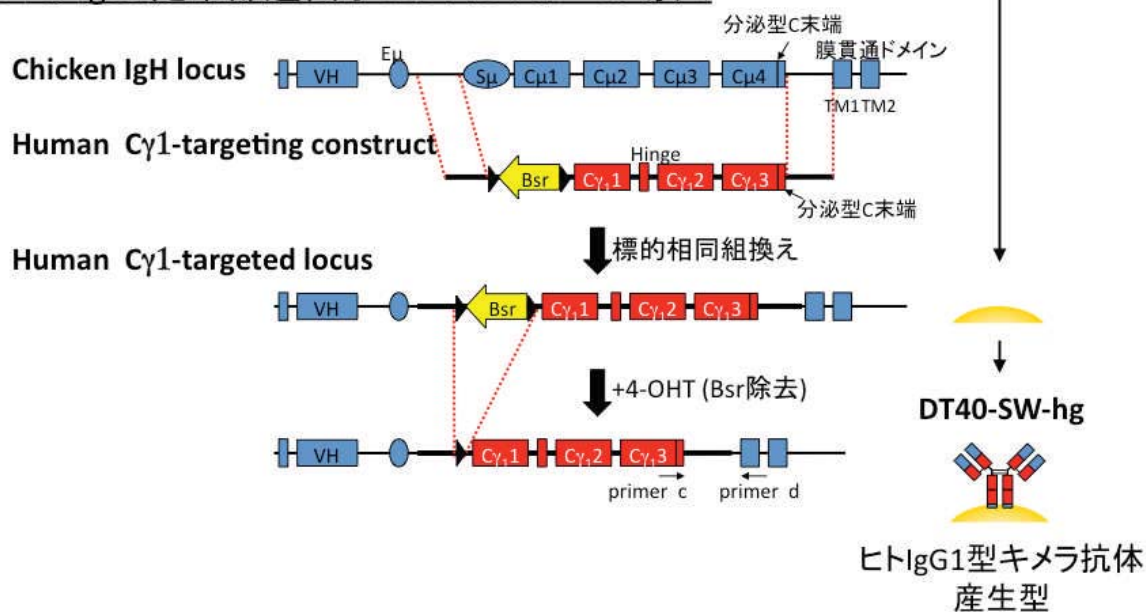


図 88 ヒト型抗体産生 DT40-SW 株の樹立。

ヒト型DT40-SWシステム

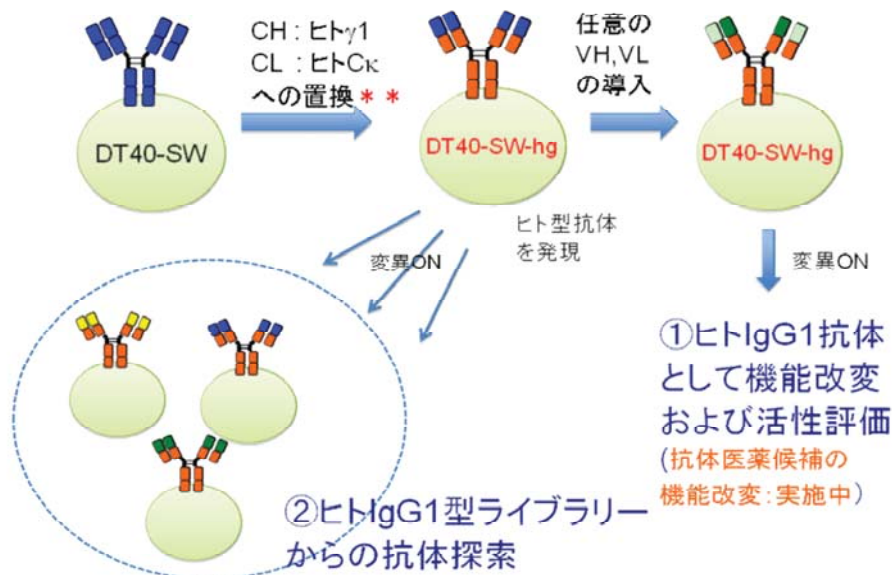


図 89 ヒト型抗体を産生する DT40-SW-hg 株による抗体作製と異種抗体の機能改変

このようにして得られたヒト型 IgG1 定常部をもつ DT40-SW-hg 株は、ニワトリヒ

トキメラ抗体を発現し、一部を分泌することを確認した。また継代培養により可変部に多くの変異が蓄積することも確認できた。

ヒト型 DT40-SW システムは、ライブラリーとして利用すれば、定常部がヒト型の抗体をキメラ抗体としてスクリーニングしてくることが可能であり、その機能評価はヒトの系で行うことができる。

また、抗体医薬の候補となる抗体の可変部遺伝子を DT40-SW-hg 株に導入し、ヒト型抗体として機能改変を図ることも可能である。このように、ヒト型 DT40-SW システムは抗体医薬開発のツールとして極めて利用価値が高いものである(図 89)。

現在、数種の癌特異抗原、血液疾患関連抗原に対する抗体を選び、このシステムの有用性の実証実験を継続中である。

②-4 ニワトリモノクローナル抗体作製技術を活用した免疫寛容回避等の基盤技術の開発 (広島大学大学院生物圏科学研究科、国立循環器病センター)

1) ナイブライブラリー作製

ニワトリナイブファージ抗体ライブラリーの作製に成功した。このライブラリーから種々の抗体クローンの作製が可能であった。

2) 既知の細胞融合用ニワトリ細胞株の改良

既知細胞株の改変を行い、融合効率の大幅な改善が達成されるとともに、従来法よりも安定して陽性ハイブリドーマを維持できるようにした。

3) ニワトリ抗体可変領域のアミノ酸変異による親和性拡大

ニワトリ抗体可変領域のある特定領域に変異導入することによって、抗体の親和性を高めること明らかにした。この変異は調べた限りの全ての抗体において親和性拡大に関与していた。

4) インテグリン特異的ニワトリモノクローナル抗体の作製(特許出願、PCT 出願)

- ・種々のヒトインテグリンに特異的なニワトリモノクローナル抗体を樹立するとともに、これらの抗体のニワトリ・マウスキメラ抗体、ニワトリ・ヒトキメラ抗体およびヒト化抗体を作製した。
- ・ヒトインテグリン発現ニワトリまたはヒト細胞株を樹立した(免疫用、検査用として活用)。

5) インテグリンリガンド分子特異的モノクローナル抗体の作製(特許出願)

- ・リガンド重合化阻害モノクローナル抗体を作製した。
- ・同重合化阻害モノクローナル抗体のニワトリ・マウスキメラ抗体、ニワトリ・ヒトキメラ抗体、ヒト化抗体を作製した。

6) アポ B 特異的モノクローナル抗体の作製(特許出願)

- ・ヒトとマウスの ApoB に交差反応するアポ B 特異的ニワトリモノクローナル抗体の作製に成功した。

7)酸化 LDL 受容体(LOX-1)特異的モノクローナル抗体の作製(特許出願)

- ・極めて多数種の LOX-1 特異的ニワトリモノクローナル抗体の作製に成功した。これらのうち 45 種類は酸化 LDL の結合を阻害する中和抗体であった。また、病態モデル動物に使用可能な種々の動物 LOX-1 と交差する抗体も含まれていた。

8)酸化 LDL 検出系の構築

- ・可溶性 LOX-1 とヒト・マウスアポ B 特異的ニワトリモノクローナル抗体の組み合わせにより、マウスやヒト血清(血漿)中の酸化 LDL を高感度で検出可能な ELISA 系構築に成功した。

9)ニワトリ・マウスキメラ抗体作製用ベクターの開発

- ・ニワトリ抗体の実験動物(マウス)への応用のためのニワトリ・マウスキメラ抗体作製用ベクターの開発に成功した。

10)ニワトリ・マウスキメラ抗体の安全性評価試験

- ・ニワトリ・マウスキメラ抗体作製用ベクターを用いてニワトリ・マウスキメラ抗体を作製し、マウスへの投与実験を行い、マウスに対する免疫原性が極めて低いことを確認した。

11)抗体の活性評価用の技術開発に成功した。

- ・同評価系を活用することで、種々の薬剤の効果や抗体の評価ができるようになった。

12)5 年間に作製した産業上有用性のある抗体。

A)インテグリン抗体(158 種 : 97 種)

抗体創薬候補 : 6 種

その他は、研究抗体として活用可能

B)インテグリンリガンド関連抗体(65 種)

抗体創薬候補 : 4 種

その他は、研究抗体として活用可能

C)抗 LOX-1 モノクローナル抗体(142 種)

抗体創薬候補 : 4 種

LOX-1 リガンド関連抗体 : 17 種

③ 抗体を系統的に創製するための基盤技術及び創製された抗体の評価

③-1-1 機能ゲノム解析による標的探索技術の開発

(JBA 駒場分室(中外製薬株)、東京大学先端科学技術研究センター)

1)全エクソン発現データベースの構築とデータマイニング手法の開発

近年、従来報告されてきた血液系腫瘍のみならず、前立腺癌における TMPRSS2 と ETS ファミリーの転座など固形腫瘍においても転座あるいは融合遺伝子の存在が報告されている。肺腺癌における EML4-ALK 転座に関する報告には我々も解析に参加した(Soda ら、Nature 2007)。

全エクソンアレイ(Exon 1.0 ST Array, Affymetrix)はエクソン毎に 140 万に及ぶオリゴヌクレオチドプローブセットが合成されたアレイによりエクソン毎の転写レベルをモニタリングできるアレイである。従来の発現解析システムは遺伝子内の特定箇所にプローブが設計されていたのに対して、スプライシングバリエーションなどの変異転写産物を検出することが出来るように開発されている。

平成 19 年度までに腫瘍細胞株 117(肺癌 31、胃癌 16、乳癌 25、卵巣癌 22、血液腫瘍 17、大腸癌 4 など)、臨床腫瘍検体 95(肺腺癌 23、小細胞癌 13、胃癌 11、乳癌 23、卵巣癌 20、ユースング肉腫 5)、胎児性組織 5 検体および正常組織 66 検体の合計 283 検体について RNA を抽出し、エクソン毎の発現情報を収集した(20 年 1 月 15 日現在)。エクソンアレイを用いて得られた発現データをデータベース化した(図 90)。また、胃癌細胞株 OCUM-2M のエクソンアレイデータ(2 回測定)の Core プローブ(312,077 プローブセット)のシグナルの散布図に示したように、データの再現性は悪くないと考えられた(図 91)。

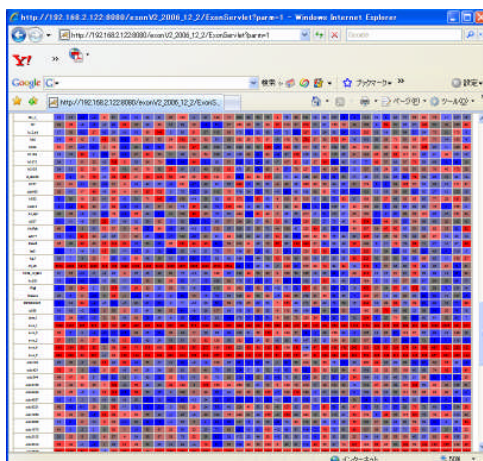


図 90 エクソンアレイを用いて得られた発現データ

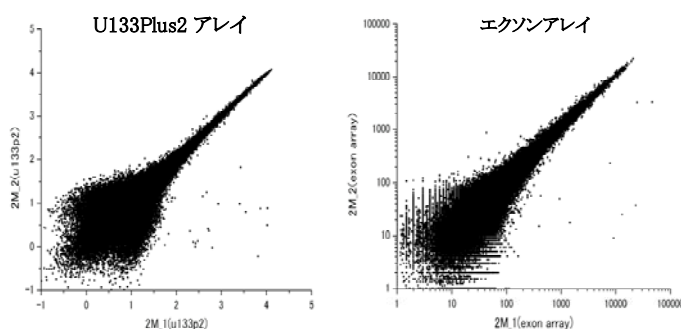


図 91 アレイデータの再現性

左は従来の U133plus2 アレイ、右はエクソンアレイのデータの散布図である。サンプルは胃癌細胞株 OCUM-2MD3 の全 RNA

一方、変異転写産物探索の基盤を構築すべく、エクソンアレイデータのビューワーを新規開発した。既知の遺伝子転座の例として、慢性骨髄性白血病(K562 細胞)における Bcr-Abl 転座など既存の染色体転座を同定可能であり、Ewing 肉腫症例から得られた検体においても EWSR1-FLI1 転座を検出することが出来た(図 92)。5 例を解析したところ、3 例において FLI 遺伝子の 3'側のエクソンの発現量が増加していることが検出され、転座の存在が示唆された。また、肺腺癌における ALK 遺伝子転座も 1 例検出された。

エクソンアレイは搭載されたプローブ数も数百万に及び、配列中にはイントロン由来のプローブも混在するため、データマイニングは容易ではない。遺伝子を 2 分割し、5'側と 3'側のシグナル値の間で有意な違いがあるかを検定し、候補遺伝子とした後に分子毎にマニュアルで確認を行った(図 93)。

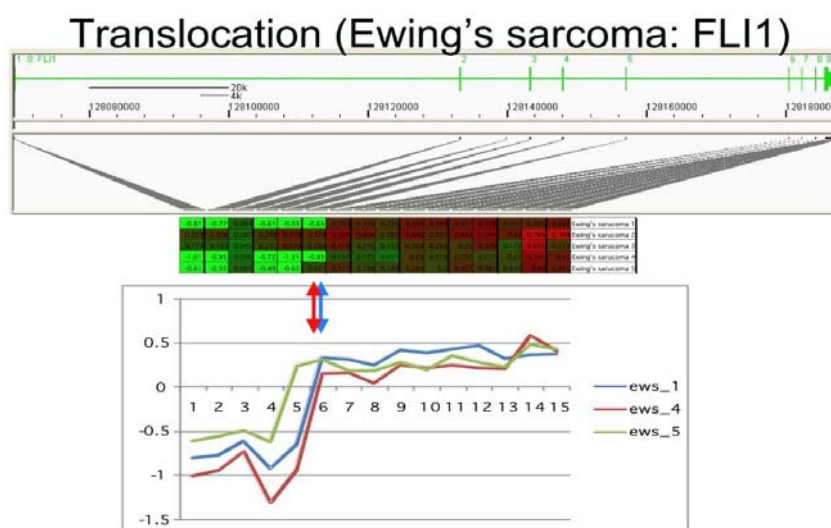


図92 Ewing肉腫におけるEWSR1-FLI1融合遺伝子

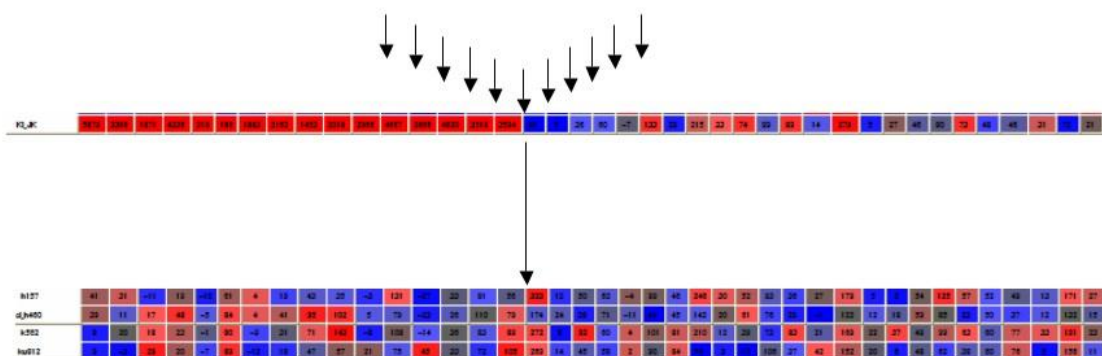


図 93 転座遺伝子の絞り込み

腫瘍組織のみに検出され、正常組織、細胞では観測されない新規変異転写産物を探索するため、エクソンレベルのシグナルがエクソン間で変動しているような遺伝子を抽出した。解析した細胞株及び臨床検体のうち 175 検体において 201 遺伝子に変異転写産物が検出された。抗体作製候補として細胞膜に存在する可能性がある分子を中心に数十に及ぶ変異産物候補遺伝子を抽出し、変異スプライシングあるいは融合遺伝子産物を同定するために 5'および 3'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)法による検討を行った(図 94)。そのなかには肺がん細胞株あるいは胃癌検体にのみ存在する膜型チロシンキナーゼ遺伝子のバリエーションの存在が確認され、抗体作製の標的分子としてさらなる検討が進行中である。

候補遺伝子に対して RACE(Rapid Amplification of cDNA End)法により変異転写産物の融合遺伝子の同定を進めており、2 遺伝子について転座が確認されている。NPM-ALK 転座が確認されたリンパ腫細胞株 Ki-JK の例を示す(図 95)。

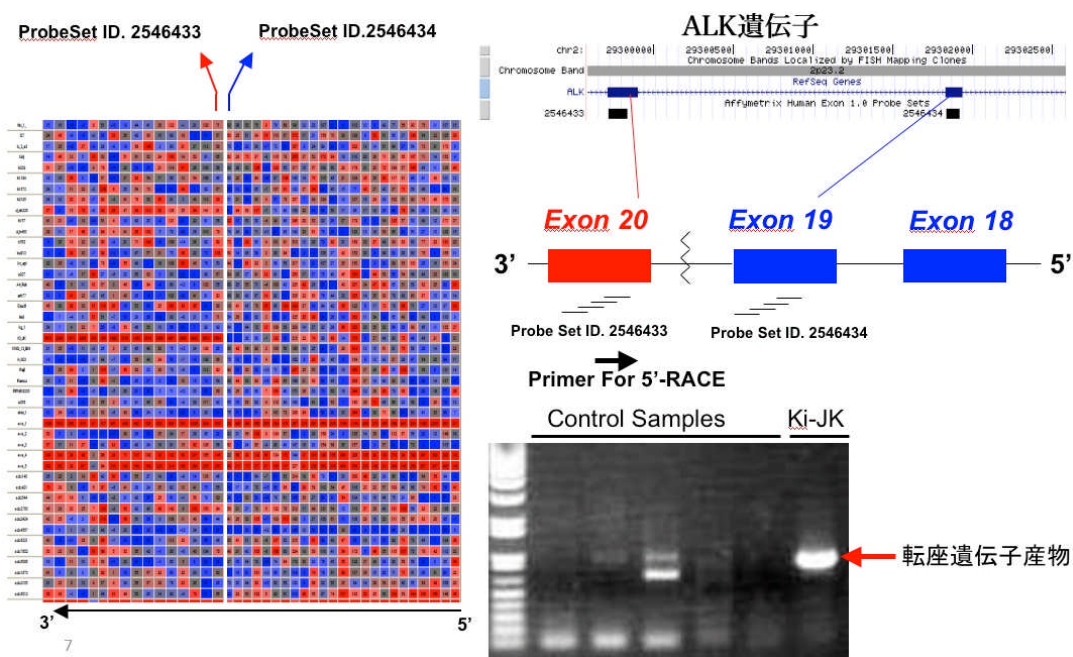


図 94 5'-RACE による融合遺伝子の同定

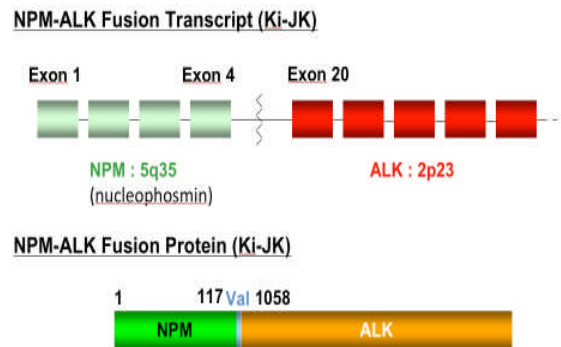


図 95 NPM-ALK 融合遺伝子

次世代シーケンサーの導入により、RNA の配列解析を行うことにより頻度情報のみならず、転写開始点、スプライシングバリエーションなどトランスクリプトーム全般に関する情報が得られるようになり、腫瘍における変異転写産物を探索するために有用と考えられた。次世代シーケンサーの中には RNA を直接に配列解析できるプラットフォームも存在するが、現状では開発途上であり、増幅を必要とするプラットフォームが殆どである。リード長、両端からの配列決定、転写されるストランド特異性などそれぞれの解析プロトコル毎に特長を有するため、解析プロトコルによる偏りなどを検証していく必要があると考えられた。例えば、シーケンシング用ライブラリー作製プロセスでのキメラ産物、塩基組成に起因する **representation** のバイアスなどを克服するべく反応系のさらなる改良が必要と思われた。

予備的検討として RNA-seq による発現プロファイルと従来のマイクロアレイデータの間の相関に関して検討した。二重鎖 cDNA を作製しペアエンドシーケンシングを行うことにより、Genome Analyzer II (Illumina) の 1 レーンあたり 1000 万前後の配列情報が得られた。RNA-seq による発現プロファイルは Refseq 遺伝子あたりにマップされたタグ数としてカウントした。RNA-seq データとエクソンアレイデータの間には良好な相関が認められた。通常のマイクロアレイは遺伝子の 3'側にプローブがデザインされているのに対して、遺伝子全域にわたる発現情報が得られる RNA-seq とはエクソンアレイが相関がよいと考えられた。GAIIX では 1 レーンあたりの解析可能な分子数が 2500 万以上得られることから 1 検体の解析には十分すぎる情報が得られ、今後バーコードによる多検体解析によるコストの削減が期待されることから、エクソンアレイにかわる解析法として有用と思われた。

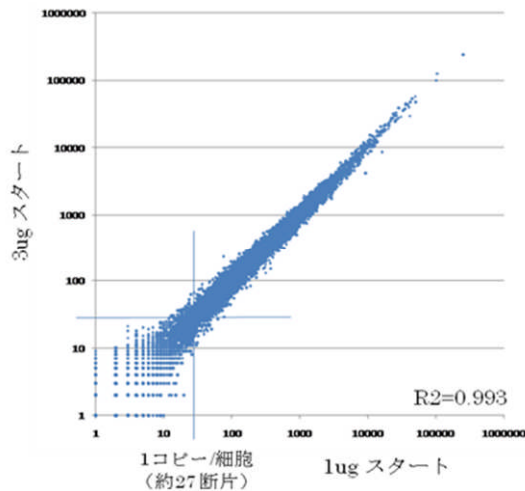


図 96 1ug 及び 3ug の total RNA からの既知のトランスクリプトの発現解析

それぞれ 800 万断片の解析である。5 ケタ程度の高いダイナミックレンジで高い再現性が見られた。細胞あたり 1 コピーのトランスクリプトが約 27 断片でカバーされ従来のマイクロアレイでは難しかった低発現レベルでの動きを捉える事が可能である。

2) 癌特異的発現遺伝子および癌特異的エピトープ候補の同定

エクソンアレイおよび CodeLink アレイ (GE) を用いた網羅的な発現解析により腫瘍特異的発現を示す新規標的分子の探索を行った。CodeLink アレイは 55,000 種類の転写産物の解析を行うことが出来る。エクソンアレイは 23,234 種類の Unigene を解析することが可能であり、U133Plus2 アレイには搭載されていない遺伝子が 3,963 個存在するため、新規標的分子探索のために有効と考えられた。

いわゆる“トリプルネガティブ”乳癌(エストロゲン受容体陰性、Her-2 陰性)23 例、スキルス胃癌 23 例、正常組織 38 検体を解析した。特異的発現遺伝子を探索した結果、腫瘍において高発現する新規分子を数種同定し、抗体作製に着手した(図 98)。

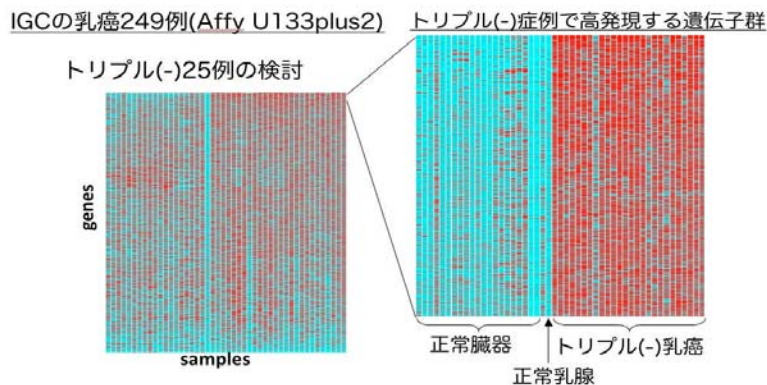


図 97 乳癌組織プロファイルデータマイニング

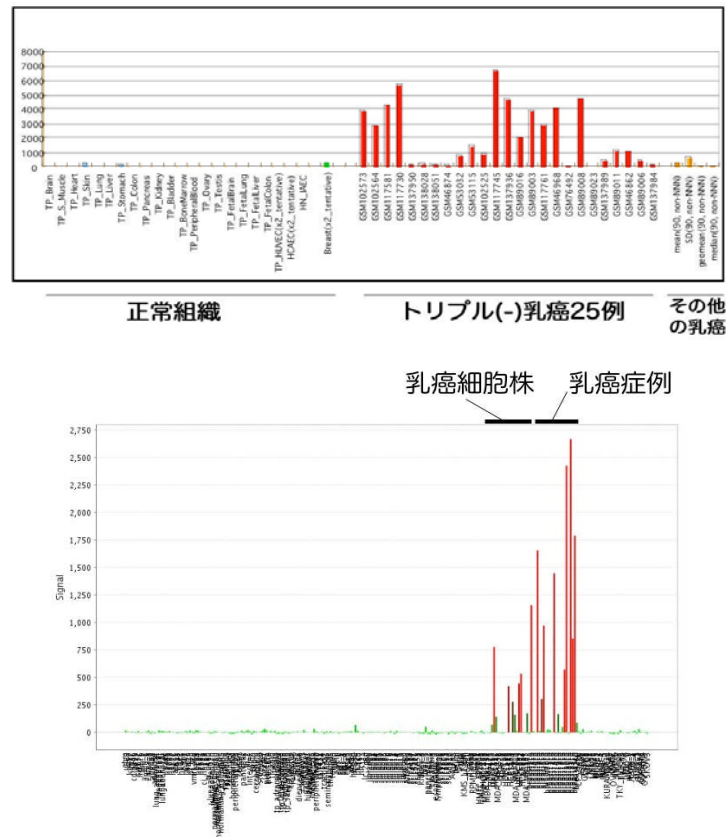


図 98 トリプル(-)乳癌に高発現する遺伝子

エクソンアレイを網羅的な発現解析の延長として通常の発現アレイとして癌特異的発現を示す遺伝子の抽出に利用した。従来の U133A アレイではバックグラウンドのシグナルが高く、癌特異的な発現症例が少なく、候補分子として抽出されなかった(図 99)。既存の U133 アレイや CodeLink アレイのプローブデザインが最適化されていなかったり、チップに搭載されていないような遺伝子のスクリーニングに有効であった。エクソンアレイは従来のアレイに比較してより網羅的であるので、あらためてプロファイリングを行い、癌における高発現分子のスクリーニングを行った。

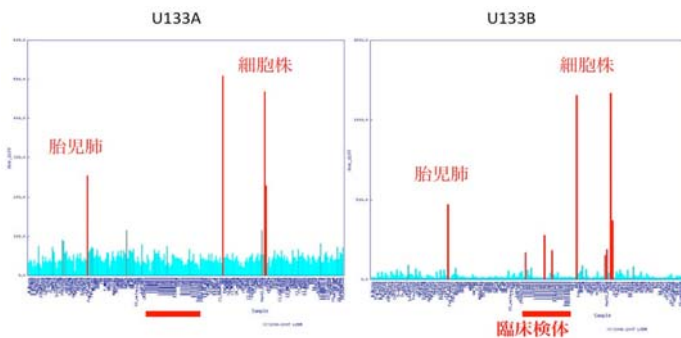


図 99 従来の発現アレイの問題点

U133A(左)ではバックグラウンドシグナルが高く、癌細胞からのシグナルが検出されない。