

「新機能抗体創製技術開発」

事後評価報告書

平成23年11月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構

研究評価委員会

平成23年11月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
理事長 古川 一夫 殿

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会 委員長 西村 吉雄

NEDO技術委員・技術委員会等規程第32条の規定に基づき、別添のとおり
評価結果について報告します。

目 次

はじめに	1
分科会委員名簿	2
審議経過	3
評価概要	4
研究評価委員会におけるコメント	7
研究評価委員会委員名簿	8
第1章 評価	
1. プロジェクト全体に関する評価結果	1-1
1. 1 総論	
1. 2 各論	
2. 個別テーマに関する評価結果	1-14
2. 1 系統的な高特異性抗体創製技術	
2. 2 高効率な抗体分離精製技術	
3. 評点結果	1-25
第2章 評価対象プロジェクト	
1. 事業原簿	2-1
2. 分科会における説明資料	2-2
参考資料1 評価の実施方法	参考資料 1-1
参考資料2 評価に係る被評価者意見	参考資料 2-1

はじめに

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構においては、被評価プロジェクトごとに当該技術の外部専門家、有識者等によって構成される研究評価分科会を研究評価委員会によって設置し、同分科会にて被評価対象プロジェクトの研究評価を行い、評価報告書案を策定の上、研究評価委員会において確定している。

本書は、「新機能抗体創製技術開発」の事後評価報告書であり、第28回研究評価委員会において設置された「新機能抗体創製技術開発」（事後評価）研究評価分科会において評価報告書案を策定し、第30回研究評価委員会（平成23年11月24日）に諮り、確定されたものである。

平成23年11月
独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会

「新機能抗体創製技術開発」

事後評価分科会委員名簿

(平成23年7月現在)

	氏名	所属、役職
分科会長	うえだ りゅうぞう 上田 龍三	名古屋市 病院局 局長
分科会長 代理	しく ひろし 珠玖 洋	三重大学 大学院医学研究科 教授
委員	こうろ たく 紅露 拓	独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 免疫応答制御プロジェクトリーダー
	なかにし あつし 中西 淳	武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 生物研究 所 リサーチマネジャー
	なかの ひでお 中野 秀雄	名古屋大学 大学院生命農学研究科 教授
	ひ の もとひろ 日野 資弘	アステラス製薬株式会社 生物工学研究所 所長
	ふるかわ ひでひこ 古川 秀比古	第一三共株式会社 研究開発本部 抗体医薬研究 所 所長

敬称略、五十音順

審議経過

● 第1回 分科会（平成23年7月6日）

公開セッション

1. 開会、分科会の設置、資料の確認
2. 分科会の公開について
3. 評価の実施方法について
4. 評価報告書の構成について
5. プロジェクトの概要説明

非公開セッション

6. プロジェクトの詳細説明
7. 全体を通しての質疑

公開セッション

8. まとめ・講評
9. 今後の予定、その他、閉会

● 第30回研究評価委員会（平成23年11月24日）

評価概要

1. 総論

1) 総合評価

本プロジェクトは、系統的な高特異性抗体創製技術および高効率な抗体分離精製技術の基礎的・基盤的研究開発であり、がんや免疫を対象とした医薬品開発の中で極めて重要な位置付けを確保しつつある。また、この分野の研究開発が米国に比し、大きく遅れを取っていた日本において、本プロジェクトが遂行されたことは意義深い。さらに、技術整備の結果として多くのシーズ抗体が取得されており、その一部については前臨床試験も予定されている点は高く評価できる。抗体精製法に関しても従来の技術を凌駕する技術が育ちつつあり、今後の実用化展開に期待が持てる。

一方、個々の技術についての成果は素晴らしいが、それらの相互関係が弱いために、成果の一般化という面で不十分である。その成果を利用して第三者が抗体創製を行なえるか課題も残る。また、抗体開発は国際的な競争の中で行われているが、国際特許出願が少ない。

今後、本プロジェクトの成果として生まれてきた多くのシーズの焦点を絞り、医薬品としての成功第一例を示すことを期待する。

2) 今後に対する提言

本プロジェクトでの抗体創製技術開発および分離精製技術開発の成果や知財を明確にし、積極的に企業での利用、応用を更に促進することが重要である。その成果を礎にして、我が国のバイオベンチャーの擁立や育成を少しでも刺激できるような仕組みを検討して欲しい。参加企業が第一優先権を有するのは当然であるが、税金を投入して創出した成果であり、日本企業に対して優先的にライセンスすることや、情報を提供する仕組みも検討して欲しい。

ファージの系による抗体作製技術は確立され、非常に多彩な抗体が得られたが、その多くが結合能は良好であるが生体における機能抗体として有用なものは得難い事実に関して、抗体医薬として開発をどう切り開くかは今後の課題である。

2. 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

抗体産生技術及び抗体精製技術の革新が本プロジェクトの根幹であり、抗体産生技術の革新はバイオテクノロジーの基幹でもある。この分野の開発研究が

米国に比し、大きく遅れを取っていた日本において、本プロジェクトが遂行されたことは意義深い。優れた抗体医薬品の開発は、今後の医療の発展にとって極めて大きな位置を占め、健康安心イノベーションプログラムにとって非常に適切な事業である。大学や公共研究機関の技術・知識やインフラがベースにあって初めて推進できるものであり、NEDOの関与は重要である。

一方、本プロジェクトで多くの抗体を産生した実施者と、抗体を分析してその有用性を解析できる専門集団とは異なることから、その専門集団との連携を大きくし、一つでも二つでも生物学や医療に有用性を見出すことが重要である。その連携や情宣活動がもっと社会に見える形にして欲しい。

今後ますます抗体医薬市場が大きくなると期待されていることから、製薬企業やベンチャーキャピタルが、研究資金の出し手として期待されても良い分野である。今後はこのプロジェクトの成果をベースに、民間から資金がこの分野に投入され、それがうまく回っていくようなシステムづくりに注力していくことも重要であろう。

2) 研究開発マネジメントについて

アカデミアと産業化能力のある企業をバランスよく配置した実施体制を構築し、相互の連携を密にして開発を進めた。プロジェクト進行中に、当初のプロジェクトリーダーの関与した重要なコアである研究開発項目がスピンアウトするという大きな発展的变化があったが、その後の調整も含めて適切にマネージされた。

一方、現在の抗体医薬の市場は成熟化しつつある中で、新たな領域・市場を切り拓くための新機能抗体という観点から、より戦略的な目標設定が必要であった。また、目標設定が抗体の数など量的なものにこだわり過ぎた。

国際競争力の向上のためには研究の能力に加え、成果の適切な権利化が不可欠である。今後のプロジェクト立案に際しては、どのように知的財産権を確立するかについて、実施者に任せるだけでなく、より戦略的な取組体制が構築できるよう留意して欲しい。

3) 研究開発成果について

掲げられた数値目標がほぼクリアされている点は、高く評価できる。得られた研究成果の中には、世界初のものも多々あり、また科学的にみて興味深いものも多い。学術論文への発表は投入された予算に見合っていると評価できる。特に、抗体創製技術については、発芽バキュロウイルス (BV) 上への膜タンパク質のディスプレイによる抗原を用いた免疫により色々な膜抗原に対する抗体創製の方法論を確立した。抗体分離精製技術については、従来法より効率が高

く、また穏和な精製が可能な新規なリガンドを、網羅的な変異導入と徹底的なスクリーニングにより得ている。

一方、作製した抗体の数は目標を達成しているが、個々の抗体の有用性を判断する材料が少ない。既存抗体との比較検証を行い、新規性、有用性に関する訴求点をさらに明確する必要がある。また、残念ながら国際特許の数が必ずしも多くない。知的財産の確保に関しては、国際特許を取得できて初めて国際競争力を有することから、プロジェクト終了後でも特許戦略、特許出願は継続して欲しい。さらに、今回のプロジェクトで出願された特許の中で、どれだけ多く数年後にグローバルレベルな権利化がされているかについての検証も必要である。

4) 実用化の見通しについて

本プロジェクトで創製された抗体の中に、参画企業が関心を示し実用化に向けて開発を進めている抗体があることは評価できる。また、高効率な抗体分離精製のためのアフィニティー・リガンドなど、早期の実用化が期待される。さらに、抗体の取得システムも本プロジェクトを通じてシステムとして完成しつつある。プロジェクト期間の途中でスピナウトしたリボゾームディスプレイは商品化されており、高く評価できる。

一方、本プロジェクトの成果物である抗体のプロジェクト外への情報提供をさらに促進するとともに、実用化の判断となる成果物の競争力をアピールできるデータの取得が必要である。また、抗体分離精製技術は、スケールアップの成否で実用化の見通しが大きく異なる。課題を明確にし、実用化できるように解決策を立案することが求められる。

本プロジェクトの成果としての技術情報や生産物情報を共有したオールジャパン的な連携組織による抗体作製技術の創製と応用を継続することが重要であろう。

研究評価委員会におけるコメント

第30回研究評価委員会（平成23年11月14日開催）に諮り、本評価報告書は確定された。研究評価委員会からのコメントは特になし。

研究評価委員会

委員名簿（敬称略、五十音順）

職 位	氏 名	所属、役職
委員長	西村 吉雄	学校法人早稲田大学大学院 政治学研究科 （科学技術ジャーナリスト養成プログラム） 客員教授
委員長 代理	吉原 一紘	オミクロンナノテクノロジージャパン株式会社 最高顧問
委員	安宅 龍明	一般社団法人ナノテクノロジービジネス推進協議会 企画運営推進会議（オリンパス株式会社 未来創造研 究所） 副議長（コーディネーター）
	五十嵐 哲	工学院大学 応用化学科 教授
	伊東 弘一	学校法人早稲田大学 理工学術院総合研究所 客員教授（専任）
	稲葉 陽二	日本大学 法学部 教授
	尾形 仁士	三菱電機エンジニアリング株式会社 相談役
	小林 直人	学校法人早稲田大学 研究戦略センター 教授
	佐久間一郎	国立大学法人東京大学大学院 工学系研究科 精密機械工学専攻 教授
	佐藤 了平	大阪大学大学院 マテリアル生産科学専攻 （システムデザイン領域担当） 教授
	菅野 純夫	国立大学法人東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 教授
	架谷 昌信	愛知工業大学 工学部機械学科 教授・総合技術研究所所長
	宮島 篤	国立大学法人東京大学 分子細胞生物学研究所 教授

第1章 評価

この章では、分科会の総意である評価結果を枠内に掲載している。なお、枠の下の「○」「●」「・」が付された箇条書きは、評価委員のコメントを原文のまま、参考として掲載したものである。

1. プロジェクト全体に関する評価結果

1. 1 総論

1) 総合評価

本プロジェクトは、系統的な高特異性抗体創製技術および高効率な抗体分離精製技術の基礎的・基盤的研究開発であり、がんや免疫を対象とした医薬品開発の中で極めて重要な位置付けを確保しつつある。また、この分野の研究開発が米国に比し、大きく遅れを取っていた日本において、本プロジェクトが遂行されたことは意義深い。さらに、技術整備の結果として多くのシーズ抗体が取得されており、その一部については前臨床試験も予定されている点は高く評価できる。抗体精製法に関しても従来の技術を凌駕する技術が育ちつつあり、今後の実用化展開に期待が持てる。

一方、個々の技術についての成果は素晴らしいが、それらの相互関係が弱いために、成果の一般化という面で不十分である。その成果を利用して第三者が抗体創製を行なえるか課題も残る。また、抗体開発は国際的な競争の中で行われているが、国際特許出願が少ない。

今後、本プロジェクトの成果として生まれてきた多くのシーズの焦点を絞り、医薬品としての成功第一例を示すことを期待する。

〈肯定的意見〉

- 抗体医療は癌や免疫を中心とした医薬品の中で極めて重要な位置付けを確保し、さらにそれを生かした領域は大きく広がっていくことが予想されている。バイオ医薬品産業の我が国の活性化が極めて重要であることが指摘される中で、より優れた抗体を効率良く産み出していく技術開発は、その成果の全人类的貢献をベースとして、また我が国の経済力推進の為にも極めて大きな意義を持つ。本事業計画は極めて妥当であり、またその成果への各領域からの期待は大きい。
- 事業進行中に、PL の関与した重要なコアである事業項目がスピンアウトするという大きな発展的变化があったが、その後の調整も含め適切にマネージされた印象が強い。
- 技術整備の結果として多くのシーズ抗体が取得されており、その一部については前臨床試験も予定されている点は高く評価できる。抗体精製法に関しても従来の技術を凌駕する技術が育ちつつあり、今後の実用化展開に期待が持てる。
- 世界での開発競争の中でも最も厳しい分野で、企画当時日本が企業戦略としては世界に大きく遅れを取っていた「新機能抗体創製技術開発」と言う、明確な目標を掲げて立ち上げたプロジェクトであったが、初期設定した中

間目標（平成 20 年度末）、事業最終目標（平成 22 年度末）を共に十分達成しえたのみならず、さらに数値目標でも期待以上の成果を上げた事は、事業の観点からも大いに評価できる。

- 企業等では、各々独自の抗体獲得という目標達成が先行せざるを得ない状況で、基盤的技術開発が相対的には弱くなっているのが現状である。本事業が技術プラットフォーム作製を目指して我国で行われた意義は極めて大きい。
- バイオ医薬品を視野に入れた抗体作出、精製技術について様々な視点から網羅的に研究が行われ、一定の成果を得ることができた。
- 医薬品、診断薬さらにリサーチツールとしての位置が確立している抗体に対して、新機能を持つ抗体を創製し、新たな産業活性化を目指す当初の方向性は妥当と考えられる。プロジェクトで創製された一部の抗体、あるいは分離精製技術など実用化段階に進んでいるものもあり、一定の成果を上げた。
- 当初の取得目標抗体の数をクリアしている。また複数の非常に興味深い抗体も見いだされており、今後実用化へ向けて期待させる。また抗体精製については国際特許も多数出願されており、得られた成果は実用化に近いものと評価できる。
- 開発候補抗体および抗体分離精製技術の基本技術が創出されており、費用対効果は十分取れていると考える。

〈問題点・改善すべき点〉

- 個々の技術についての成果は素晴らしいが、それらの相互関係が弱いために、成果の一般化という面で不十分である。特に本研究結果を利用して第三者が抗体創製を行なえるか疑問である。
- 当初のプロジェクトリーダーらが本プロジェクトから途中離脱されたが、知財管理の問題はないのか。また、本プロジェクトと彼らの今後の研究継続に関する継続進展の関係は社会に対してどのような開示（公開）となるのか、明確でなかった。
- 本事業開始時のチーム編成の段階で、事業成果の実用化を具体的に推進し得る製薬会社等企業のより積極的参加が望ましかったのではないか。
- すでに世界的に多くの企業が参入し、市場や開発段階に多数の製品が存在する抗体ビジネスに関して、高特異性や高収率など既存の技術の改善を目指した研究に公的資金を投入することが妥当かどうか疑問である。新機能を担う本来の目的部分はプロジェクトの途中でスピアウトしたが、その時点の情勢変化に対応し内容の大胆な見直しが必要であった。
- 抗体特許は国際的な競争の中で行われている。従って知財の評価は基本的

には PCT 特許などの外国出願で行うべきものと考えられる。その点で投入された金額に比較して、数の上では十分ではないように思われる。

- 基盤技術関連の知財の押さえ方に課題がある。日本特許では競争力を確保できていない。外国特許出願できる種がないか、プロジェクト全体についてよく吟味をしてほしい。
- 成果に応じた知財面における権利の確保および、類似技術に関する先行技術調査については改善の余地を感じる。より強力な知財戦略を持つ必要があるように思う。

〈その他の意見〉

- ・ プロジェクトリーダーが計画実施途中で交代するという不安要素があったが、全体でのチームワークも良く、日本の抗体医学全体からの発展的交代であり、本計画の本質には影響を及ぼさず問題はなかった。
- ・ もし「加速財源制度」による追加資金の配分がなかったら、本プロジェクトはこのような成果を得られなかったとすれば、当初の企画に問題はなかったか。
- ・ 本プロジェクトの成果として多くのシーズが生まれてきている、焦点を絞り企業機器として、または医薬品としての成功第 1 例を早急に確立することが重要である。
- ・ こここで研究開発された抗体スクリーニングシステム、および抗体精製システムが実用化され、日本の抗体医薬開発の基盤技術として実際に使用されることを切に希望する。

2) 今後に対する提言

本プロジェクトでの抗体創製技術開発および分離精製技術開発の成果や知財を明確にし、積極的に企業での利用、応用を更に促進することが重要である。その成果を礎にして、我が国のバイオベンチャーの擁立や育成を少しでも刺激できるような仕組みを検討して欲しい。参加企業が第一優先権を有するのは当然であるが、税金を投入して創出した成果であり、日本企業に対して優先的にライセンスすることや、情報を提供する仕組みも検討して欲しい。

ファージの系による抗体作製技術は確立され、非常に多彩な抗体が得られたが、その多くが結合能は良好であるが生体における機能抗体として有用なものは得難い事実に関して、抗体医薬として開発をどう切り開くかは今後の課題である。

〈今後に対する提言〉

- ・ 本プロジェクトでの抗体創製技術開発成果と分離精製技術開発成果の評価と知財を明確にし、積極的に企業での利用、応用の促進活動が重要である。
ファージの系による抗体作製技術は確立され、非常に多彩な抗体が得られたが、その多くが生体との機能的反応は得られにくい事実に関して、今後、抗体医薬として開発をどう切り開くかは課題である。
- ・ 安易に日本特許出願や論文発表を評価基準としない。
外国特許として出願できるものは出願し、さらに磨きをかけて特許とすべき基盤技術に関しては、早期に次期プロジェクトとして立案し、確実な知的財産とすべきである。
参加企業が第一優先権を有するのは当然であるが、税金を投入して創出した成果であり、日本企業に対して優先的にライセンスすることや、情報を提供する仕組みを作るべきである。
- ・ NEDO によるこのようなプロジェクトの成果を礎にして、本邦におけるバイオベンチャーの擁立や育成を少しでも刺激できるような仕組みが構築できないものかと思う。
- ・ 5年間の個々の成果は顕著なものが多く含まれているが、技術開発として、本事業年度で完了し得る内容はむしろ限られている。今後の開発技術の継続がこれまでのインベストメントをより生かす為にも不可欠である。
- ・ 企業側では、各々が独自の手法とノウハウを注ぎ込んで抗体医薬の開発事業を進めており、今回の NEDO 事業での成果技術がどの様に取り入れられていくのかについて興味深い。オールジャパンという視点で本事業での開発技術に関する情報のプラットフォームシステムを合わせて作って

くことが重要である。

- 抗体医薬品は定着した位置付けを築く一方で、その医薬品としての利用方法については、国際的にも開発が進んでいない。抗体の幅広い応用方法に関する事業計画が今後極めて重要と考える。
- 本研究で確立された抗体作出、精製技術についてそのメリット、デメリットを比較検討することにより、どのようなケースでどのようなアプローチが有効か、分かりやすく解説していただきたい。
- 今後、NEDO の事業設定の段階で、技術の現状分析に加え将来の技術予測により重点を置き、プロジェクト終了時に世界に勝てる技術開発が期待できる事業への投資を期待する。
- 国際的な競争力確保するため、研究者と NEDO で協力し、研究成果の特許化実用化を進めていただきたい。

〈その他の意見〉

1. 2 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

抗体産生技術及び抗体精製技術の革新が本プロジェクトの根幹であり、抗体産生技術の革新はバイオテクノロジーの基幹でもある。この分野の開発研究が米国に比し、大きく遅れを取っていた日本において、本プロジェクトが遂行されたことは意義深い。優れた抗体医薬品の開発は、今後の医療の発展にとって極めて大きな位置を占め、健康安心イノベーションプログラムにとって非常に適切な事業である。大学や公共研究機関の技術・知識やインフラがベースにあって初めて推進できるものであり、NEDOの関与は重要である。

一方、本プロジェクトで多くの抗体を産生した実施者と、抗体を分析してその有用性を解析できる専門集団とは異なることから、その専門集団との連携を大きくし、一つでも二つでも生物学や医療に有用性を見出すことが重要である。その連携や情宣活動がもっと社会に見える形にして欲しい。

今後ますます抗体医薬市場が大きくなると期待されていることから、製薬企業やベンチャーキャピタルが、研究資金の出し手として期待されても良い分野である。今後はこのプロジェクトの成果をベースに、民間から資金がこの分野に投入され、それがうまく回っていくようなシステムづくりに注力していくことも重要であろう。

〈肯定的意見〉

- 抗体産生技術革新はバイオテクノロジーの基幹である。この分野の開発研究が世界に比し、大きく遅れを取っていた日本において、本企画を設定した事は意義深い。
- 優れた抗体医薬品の開発は、今後の医療の発展にとって極めて大きな位置を占め、健康安心イノベーションプログラムにとって非常に適切な事業である。個々の抗体作製が各企業で多様な形で進められているが、大胆な基盤技術開発に各社速携して取り組むことは、実質上不可能である。オールジャパンという視点でNEDOの事業として産学連携を推進する取り組みは、有意義である。
- 大学や公共研究機関の技術・知識やインフラがベースにあってはじめて推進できるものであり、NEDOの関与は重要である。
- 日本のバイオ医薬品開発総じての取り組みが、国際的に遅れを取りつつあることは繰り返し指摘されており、抗体医薬品開発が今後加速化されることへの期待は大きい。本予算規模と5年間の期間では抗体作製から調整に至る迄の極めて包括的で多岐にわたる事業取り組みが意欲的過ぎた感がある。また5年間での完了は不可能な内容でもある。

- 多くの研究グループからなる共同研究であり、NEDO の関与により研究の方向性および成果の整理がなされる必要性があった。
- 健康安心イノベーションの目的に沿った事業であることは間違いない。
- 投じた予算に見合う技術成果が得られつつあり、バイオリジクス創薬のための基盤技術確立としての NEDO の関与は適切であったと思う。

〈問題点・改善すべき点〉

- 抗体産生技術、抗体精製技術の革新が本プロジェクトの根幹であり、本プロジェクトの本来の目的であるが、一方、社会的ニーズとしてはそこで産生された多くの抗体の有用性こそが重要である。その点、本プロジェクトで産生できた多くの抗体の分析、有用性の解析の専門担当者は本構成員とは別の集団であるから、その専門集団との連携を大きくし、一つでも二つでも生物学や医療に有用性を見出すことが重要である。その連携や情宣活動がもっと社会に見える形にして頂きたい。
- 抗体関連の研究は確かに公共の福祉に寄与するところも大きいですが、一方で今後ますます抗体医薬市場が大きくなることが期待されていることから、製薬企業やベンチャーキャピタルが、研究資金の出し手として期待されても良い分野である。今後はこのプロジェクトの成果をベースに、民間から資金がこの分野に投入され、それがうまく回っていくようなシステムづくりに注力していくことも重要であろう。
- 本研究成果が関与した民間企業だけのものとならず、公共の利益に役立つよう注意する必要がある。
- リード抗体の創出から工業生産まで、すでに、多くの企業が抗体医薬に参入している状況で、一部の新機能に焦点を当てたものを除いて、既存技術の改良を目指した研究や治療用抗体の作製を目指した研究を NEDO の事業として実施する必要性に疑問が残る。
- 公共性（公開性）と知的財産の構築は相いれないところもあり、日本の競争優位性確保の観点から機密保持をしながら進められる仕組みも必要。

2) 研究開発マネジメントについて

アカデミアと産業化能力のある企業をバランスよく配置した実施体制を構築し、相互の連携を密にして開発を進めた。プロジェクト進行中に、当初のプロジェクトリーダーの関与した重要なコアである研究開発項目がスピナウトするという大きな発展的変化があったが、その後の調整も含めて適切にマネージされた。

一方、現在の抗体医薬の市場は成熟化しつつある中で、新たな領域・市場を切り拓くための新機能抗体という観点から、より戦略的な目標設定が必要であった。また、目標設定が抗体の数など量的なものにこだわり過ぎた。

国際競争力の向上のためには研究の能力に加え、成果の適切な権利化が不可欠である。今後のプロジェクト立案に際しては、どのように知的財産権を確立するかについて、実施者に任せるだけでなく、より戦略的な取組体制が構築できるよう留意して欲しい。

〈肯定的意見〉

- アカデミアと産業化能力のある企業をバランスよく配置した実施体制を構築し、相互の連携を密にして開発を進めたことは評価できる。
- チームリーダーの元、非常にチームワークよく研究が進展している。計画実施途中でのチームリーダーの交代、主たる研究者2名の離脱は、本来本企画の計画時点では想定外の事であったが、抗体医療開発研究としての発展的交代であったため、本来の目的を見失うことなく、全体によくまとまって成果をだした事は評価できる。
- 事業進行中に PL および SPL による本事業のコアとなるプロジェクトがスピナウトするという極めて大きな変更が生じた。又、開発項目の絞り込みも合わせて行われる中で、適切に体制を再編成し、多岐に渡るプロジェクト内容を有機的に結びつけつつ、全体に推進することが果たされたと考える。
- 膜蛋白質に対する抗体作製は、科学的にも産業的にも非常に重要であることは明白である。しかしまだまだトライアンドエラーの多い、地道な積み重ねが必要な部分であり、その点に着目して研究を推進した点は評価できる。

抗体の精製コスト削減は抗体製造コスト削減に大きく寄与する。このような技術的な研究課題は、科学研究費などではともすると評価されにくい分野であり、特にこの傾向はバイオ関係において著しい。このことは結局のところバイオにおける日本の「物づくり技術」が次第に衰えていることの原因の一つではないかと個人的には思っている。NEDO のプロジェクト

の中でこの点を基盤的研究課題として組み込んだ点は良かったと思う。

- 大学、公的機関とシードの実用化可能な企業の組み合わせでプロジェクトを推進し、一定の成果を上げている。
- 十分な技術力を有する複数の企業が実施者として参画していることから、実用化への波及効果も期待される。

〈問題点・改善すべき点〉

- 現在の抗体医薬の市場は成熟化しつつある。その中で、新たな領域・市場を切り拓くための新機能抗体という観点からより戦略的な目標設定が必要であった。新機能に焦点を当てた部分が最先端研究にスピンアウトしたという事情を考慮しても、プロジェクトの目標設定が抗体の数など量的なものにこだわりすぎた。
- 主たる研究者の交代により、**Treg** 除去マウスによる抗体作製研究などは、解析や本特殊マウスを用いる有用性などの研究の進展が本プロジェクトとしては中途半端になっている事はいがめない。
- 多岐に渡る開発技術の相互関係の多少の不明さや、有機的つながりが必ずしも明らかでない印象がある。プロジェクト間の連携には、かなりの濃淡がある結果となっている。
- 評価指標として、取得抗体数は妥当か、質を評価する補完の指標とすべきかと思う。
評価指標に論文投稿数は妥当か。
評価指標としての特許出願は国際特許に絞るべきである。

〈その他の意見〉

- ・ 国際競争力の向上のためには研究の能力に加え、成果の適切な権利化が不可欠である。今後のプロジェクト立案に際しては、どのように知的財産権を確立するかについて、研究者に任せるだけではなく、より戦略的な取り組み体制が構築できるよう留意して欲しい。
- ・ 研究開発マネジメントの神髄は、各研究者が最終目標を外さずに、しかしある一定の自由度を持ち、余計な事務作業に煩わされることなく、研究開発に没頭できる環境を提供することである。ただそのような点を紙の資料で評価することは、困難である。

3) 研究開発成果について

掲げられた数値目標がほぼクリアされている点は、高く評価できる。得られた研究成果の中には、世界初のものも多々あり、また科学的にみて興味深いものも多い。学術論文への発表は投入された予算に見合っていると評価できる。特に、抗体創製技術については、発芽バキュロウイルス（BV）上への膜タンパク質のディスプレイによる抗原を用いた免疫により色々な膜抗原に対する抗体創製の方法論を確立した。抗体分離精製技術については、従来法より効率が高く、また穏和な精製が可能な新規なりガンドを、網羅的な変異導入と徹底的なスクリーニングにより得ている。

一方、作製した抗体の数は目標を達成しているが、個々の抗体の有用性を判断する材料が少ない。既存抗体との比較検証を行い、新規性、有用性に関する訴求点をさらに明確する必要がある。また、残念ながら国際特許の数が必ずしも多くない。知的財産の確保に関しては、国際特許を取得できて初めて国際競争力を有することから、プロジェクト終了後でも特許戦略、特許出願は継続して欲しい。さらに、今回のプロジェクトで出願された特許の中で、どれだけ多く数年後にグローバルレベルな権利化がされているかについての検証も必要である。

〈肯定的意見〉

- 掲げられた数値目標はほぼクリアされている点は、高く評価できる。得られた研究成果の中には、世界初のものも多々あり、また科学的にみて興味深いものも多い。学術論文への発表は投入された予算に見合っていると評価できる。
- グローバル開発候補抗体が取得できていることから、初期の目標化達成している。
- 初期の目標に関する達成度としては十分評価できる。
- A、B両チームに於いて数値目標は、この5年間で十分達成していると考えられる。又、各プロジェクトの開発達成度も評価できるものが多い。一方では、国際的にも前進しつつある競争分野での相対的な優位性が確保されつつあるのかは、ノウハウ等の秘密化も強い領域であるため、評価し得ない曖昧さが残る。
- 数値目標はクリアしており、また一部の研究は研究期間終了前に完結するなど、目標は十分に達成された。
- 設定した数値目標は、全体として達成している。

〈問題点・改善すべき点〉

- 高効率な抗体分離精製技術など一部を除いて、世界初あるいは世界最高水準の成果とは言い難い。作製した抗体の数は目標を達成しているが、個々の抗体の有用性を判断する材料が少ない。既存抗体との比較検証を行い、新規性、有用性に関する訴求点をさらに明確する必要がある。
- 残念ながら国際特許の数が必ずしも多くない。これは研究のステージが萌芽的なものから、実用化への遷移過程にあり、基本的な特許はすでに応募者らにより押さえられていたためであると推定される。しかしそれでもなお特にこのような大規模な国家プロジェクトを遂行する場合、学会誌に掲載しながら外国特許を取らないのでは、結局他国の企業を利することだけになる恐れが大きい。プロジェクト終了後でも特許戦略は継続して行っていただきたい。
- 知的財産の確保に関しては、外国特許を取得できて初めて国際競争力を有することから、特許戦略については再考を要する。
- 知財もシステムとしては事前に十分に考慮されて施行されている。ただ、このような開発研究は予想外の大きな波及効果が期待され、その際の知財の在りかたが十分か否か進捗状況に合わせて検討しておく必要がある。
- 論文等を中心とした成果の普及は十分に行われている。しかし本事業の成果をこの分野に関わりを持つ人々へ広く伝達するには、より工夫が必要かと考えられる。
- 各成果はそれぞれの研究グループの高い能力に裏付けられたものであり、汎用性という面では十分とは言えない。標準プロトコールの作成などが望まれる。また、国際特許の出願は必須である。
- 5年間の成果として多数の論文発表や学会発表数がなされているのに比較して、国際特許が数件しか出願されていない点については今後の改善が必要と感じる。本課題は中間評価の時点でも指摘されている、大きな改善が認められていない。

〈その他の意見〉

- ・ 真に国際競争力、優位性を有する技術であるかについて、客観的かつより深い検証が必要であるように思う。基本概念が第三者に押さえられていないかについての確認は、今後の実用化に先立ち特に重要である。今回のプロジェクトで出願された特許の中で、どれだけが数年後にグローバルレベルな権利化がされているかについての検証も必要である。

4) 実用化の見通しについて

本プロジェクトで創製された抗体の中に、参画企業が関心を示し実用化に向けて開発を進めている抗体があることは評価できる。また、高効率な抗体分離精製のためのアフィニティー・リガンドなど、早期の実用化が期待される。さらに、抗体の取得システムも本プロジェクトを通じてシステムとして完成しつつある。プロジェクト期間の途中でスピナウトしたリボゾームディスプレイは商品化されており、高く評価できる。

一方、本プロジェクトの成果物である抗体のプロジェクト外への情報提供をさらに促進するとともに、実用化の判断となる成果物の競争力をアピールできるデータの取得が必要である。また、抗体分離精製技術は、スケールアップの成否で実用化の見通しが大きく異なる。課題を明確にし、実用化できるように解決策を立案することが求められる。

本プロジェクトの成果としての技術情報や生産物情報を共有したオールジャパン的な連携組織による抗体作製技術の創製と応用を継続することが重要であろう。

〈肯定的意見〉

- 本プロジェクトで創製された抗体の中に、参画企業が関心を示し実用化に向けて開発を進めている抗体があることは評価できる。また、高効率な抗体分離精製のためのアフィニティー・リガンドなど、早期の実用化が期待される。
- 取得された数々の抗体が現に存在しており、それらが今後何らかの形で実用化できるものと期待している。抗体の取得システムもこの研究を通じてシステムとして完成してきている。また抗体探索用の小スケール抗体精製カラム、および途中でスピナウトしたが、リボゾームディスプレイについては、商品化されており、高く評価できる。
- 開発候補抗体が創出できていることから、基盤技術に関しての成果の波及効果が期待できる。
抗体分離精製技術は既存品に比べて優位な性質を示すことから、実用化の期待がある。
- 本プロジェクトにて確立された抗体取得に関する様々な技術基盤は今後のバイオリジクス分野の創薬への大きな波及効果を期待できるものと判断する。
- 既に実用化を目指した共同研究も着実に開始されており、評価できる。
- 開発技術の実用化には本来ある程度の時間が必要であり、本事業に於いても同様である。個々の抗体の実用化はあくまでも副次的な目標であり、今

後の追跡評価とすべきであろう。

- 各グループでの実用化イメージは明確である。あ

〈問題点・改善すべき点〉

- 本プロジェクトの成果物である抗体の外部への情報提供をさらに促進するとともに、実用化の判断となる成果物の競争力をアピールするデータの取得が必要である。
- 抗体分離精製技術は実用化が期待できるものの、スケールアップの成否で大きく成果が異なる。課題を明確にし、実用化ができるように計画を立案することが求められる。
- 研究成果が関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）をより期待するための仕組みが必ずしも明確でない。

〈その他の意見〉

- ・ 我が国の科学技術全体のレベルを上げるためには、博士課程学生の研究環境を整え、なるべく多くの学生が博士学位を取得するように務めなければならない。またポスドクで関わった方がその後民間会社やアカデミックポストに就くことも大きな成果であろう。今回のプロジェクトの成果により、何人の学生が学位を取得したのか、またポスドクのその後の進路などについても、個人情報保護法に抵触しない範囲での情報が欲しかった。またそういう観点からプロジェクトを立案し、また評価することも重要であると考えている。

2. 個別テーマに関する評価結果

2. 1 系統的な高特異性抗体創製技術

1) 成果に関する評価

全体的に極めて先端的で高いレベルでの技術開発が行われている。抗原タンパク作製、目的とする標的抗原に対する抗体を高効率で作製する技術開発、強い親和性を持った自然な分子構造に反応する抗体の高効率の取得法については全体に大きな成果を挙げている。特に、一般的に発現困難である膜タンパク質を対象とし、発現からその取得まで一貫して研究を行い、多数のモノクローナル抗体を実際に取得していることは、その困難さと有用性を考えると、非常に価値ある研究であると評価できる。免疫寛容打破技術により、従来正常マウスでは得られなかった抗体作製法を確立したことも特記すべきである。ファージディスプレイ法により得られた非常に多くのヒト抗体は、患者サンプルに対しアッセイしており、有用性が期待できる。オリゴクローナル抗体による CDC (補体依存性細胞障害) 活性の発現について、抗原と抗体の立体構造解析をベースにした解析は、今後の抗体医薬に新しい展開を与えるものと期待できる。

しかし、得られた有用な抗体が全て新規技術によるものではなく、新規技術のメリットが明確でない。特に、数値目標は十分にクリアしているものの、機能的な面で既存の抗体に対する差別点・優位性を示す検証データが不足している。

〈肯定的意見〉

- 全体的に極めて先端的で高いレベルでの技術開発が行われている。抗原タンパク作製と目的とする標的抗原に対する抗体を高効率で作製する技術開発、強い親和性を持った自然な分子構造に反応する抗体の高効率の取得法については全体に大きな成果を挙げている。

当初設定された、抗体作製の数値目標も十分なレベルで達成されている。

- 数値目標は十分にクリアしている。有用な抗体も複数種作られており、技術の有用性が裏付けられた。

- 一般的に発現困難である膜タンパク質を対象とし、発現からその取得まで一貫して研究を行い、多数のモノクローナル抗体を実際に取得していることは、その困難さと有用性を考えると、非常に価値ある研究であると評価できる。

ファージディスプレイ法により得られた非常に多数のヒト抗体は、患者サンプルに対しアッセイしており、有用性が期待できる。

オリゴクローナル抗体による CDC 活性の発現について、抗原と抗体の立体構造解析をベースにした解析は、今後の抗体医薬に新しい展開を与える

ものと期待できる。

- 系統的な高特異性抗体創製技術として取り組んだこのプロジェクトは各々目標点に達している。

発芽バキュロウイルス (BV) 上への膜タンパク質のディスプレイによる抗原を用いた免疫により色々な膜抗原に対する抗体作製の方法論を確立した。本システムにより、従来機能抗体の作製が困難であった G 蛋白質共役型受容体に対する多様な抗体作製に成功した。また、免疫寛容打破技術による従来の正常マウスでは得られなかった抗体作製法の確立も特記すべきである。本法により自己免疫抗体の作製に成功したことなど、本マウスによる新たな抗体作製の発展が期待される。

臨床応用が期待される HIV ウイルス感染阻害抗体、がん治療としての抗ニカストリン抗体作製に成功しており、他にも産業活性化に資する多くの機能抗体の作製にも成功している。

将来の診断応用として、Robo1 抗体の ScFv 改変を行い、マウスでの肝癌イメージングにも成果が得られた。

- 抗体を作製するのが困難な GPCR に対して、バキュロ発現系等を用いて抗体作製を試み、一定の成果を得たことは評価できる。
- 開発候補品の創出により膜蛋白についての抗体創製技術、高親和性抗体創出技術の汎用性が開発候補の創出により示されている。
オリゴクローナル抗体についても開発候補抗体が創製されており、新たな技術として評価できる。
- 抗体の取得に関する様々な技術改良が加えられ、これまで取得が難しかった標的に対する複数の抗体が取得されていることを高く評価する。総じて投下した資金に見合う創薬標的とシーズ抗体が見出されていると判断する。

〈問題点・改善すべき点〉

- 数値目標に重点が置かれたので、数をクリアすることが第一目標になり、技術自体の新規性はあまり認められない。成果物の抗体に関して、機能的な面で既存の抗体に対する差別点・優位性を示す検証データが不足している。
- 得られた有用な抗体がすべて新規技術によるものではなく、新規技術のメリットが明確でない。
- 既に多くの抗体が作製されているが、これらの成果を生物学的、医学的、また企業としての社会的ニーズの掘り起こしのためのシステムを構築して、これらの有用性の検討を科学的に進めることが重要である。
- より優れた親和性を持った抗体の作製法など基盤技術研究の段階での取

り組みもあり、本事業の継続性が切望される。

- 多くのシーズが見出されているものの、本プロジェクトの成果を実用化するためにはさらなる知財権の確保が必要であるように思われる。成果の公表と実用化のための権利確保を両立させることは容易ではないかもしれないが、今後のプロジェクトにおける改善点として引き継がれることを希望する。

2) 実用化の見通しに関する評価

臨床開発候補抗体が複数取得されていることから、本技術の応用から新規抗体医薬を創出するという実用化の可能性が認められる。

しかし、ファージライブラリーにより作製された抗体は、一般に結合能は良好だが、生体での機能抗体として有用なものは少ないとされており、この点の検討が今後の臨床応用では求められる。また、がん治療用抗体については、開発中の抗体が多数存在し競争が非常に激しい。先行品に対して治療効果、安全性の面で差別化、優位性を証明するのは非常にハードルが高い。独自性のある抗原の探索や、先行品がない対象疾患の開拓も視野に入れて実用化を進めるべきであろう。

〈肯定的意見〉

- 臨床開発候補抗体が複数取得されていることから、本技術の応用から新規抗体医薬を創出するという実用化の可能性が認められる。
- 既に実用化に踏み出しつつある成果がでてきている。
- 本事業で到達した技術基盤が、どの様に企業等に利用されるかは今後の大きな課題である。抗体作製の技術は、システムとして取り入れる必要もあり、企業等が本 NEDO 事業の技術成果を知り利用を実際に行えるようなシステム作りが必要である。
- 今回の研究で得られた抗体の実用化の可能性が見込める。
- 実際に多数の新規な抗体が得られており、実用化に向けて解析、応用実験が着実に進んでいる。
- 将来の創薬のシーズとなる抗体候補は複数存在している可能性が高い。

〈問題点・改善すべき点〉

- ファージライブラリーにより作製された抗体は、一般に結合能は良好だが、生体での機能抗体として有用なものは少ないとされており、この点の検討が今後の臨床応用では重要である。
- 癌治療用抗体については、開発中の抗体が多数存在し競争が非常に激しい。先行品に対して治療効果、安全性の面で差別化、優位性を証明するのは非常にハードルが高い。公的資金のプロジェクトとしては、すでに製品がある抗体の開発を目指すよりも、独自性のある抗原の探索や、先行品がない対象疾患の開拓も視野に入れて進めるべきである。
- 今回確立された抗体作製法には担当研究者のスキルに依存するものもあり、これを実用技術として利用できるのか疑問が残る。
- この分野は特に国際的な競争が激しい分野である。知財戦略を明確にして

国際特許取得に努力していただきたい。また国際的な展開について、なんら検討された形跡がみられないのは、今後改善すべきであろう。

- 日本のグローバル競争力を第一に考えるなら、知財の取得の仕方、情報公開の仕方について検討する必要がある。
- 医薬品として開発研究を進めるための更なる基礎研究の継続を可能とするサポートする体制についての配慮も必要であるとする。

3) 今後に対する提言

細胞株 DT40-SW など研究途中にある技術については早期の完成が望まれる。ICOS (isolation of antigen/antibody complexes through organic solvent) 法による抗体作製技術は応用範囲の広い技術であるので、がん関連のみでなく他の疾患の病態解析にも活用されることを期待する。

ここで検討された抗体取得法は基本的に試験管内で抗体を選択する技術であり、B 細胞 1 個から抗体を取得する技術を取り入れることにより、試験管内での結合能でスクリーニングされた抗体とは質的に異なる抗体を取得できると期待され、このプロジェクトに新たな展開を生む可能性があると考えられる。

本プロジェクトの成果としての技術情報や生産物情報を共有した抗体作製のオールジャパン的な連携組織、機構の充実による抗体作製技術の創製と応用の継続性が重要である。

〈今後に対する提言〉

- ・ 本プロジェクトの成果としての技術情報や生産物情報を共有した抗体作製のオールジャパン的な連携組織、機構の充実による抗体作製技術の創製と応用の継続性が重要である。
- ・ DT40-SW など研究途中にある技術については早期の完成が望まれる。
- ・ ICOS 法による抗体作製技術は応用範囲の広い技術であるので、癌関連のみでなく他の疾患の病態解析にも活用されることを期待する。
- ・ ここで検討された抗体取得法は、基本的に試験管内で抗体を選択する技術である。一方 B 細胞 1 個から抗体を取得する技術も現在では多数開発されてきている。生体内で選択されてきた抗体は、その機能において試験管内で選択されてきたものとは違う可能性がある。実際に様々な病原菌やウイルスに対して、中和活性を有する抗体を我々人間は個々に有しているので、病気にならずにすんでいる。B 細胞 1 個から抗体を取得する技術を取り入れることは、試験管内での結合能でスクリーニングされた抗体とは質的に異なる抗体を取得できると期待され、このプロジェクトに新たな展開を生む可能性があると考えられる。
- ・ 実用化の可能性のある種【技術・抗体】が取得されていることから、日本企業による実用化に向けた第 2 の仕組み作りが必要である。
- ・ 数値目標に明らかに到達している多数の抗体が、現実によどの様に医薬品として実用化されるのかは、企業サイドにしてみれば安易な決断ができる事ではなく、今後の経過を見守る必要がある。各企業の立場に立つと各々抗体作製したい目的分子等が存在しており、抗体作製の出発点での企業との合意が明らかには存在していない本事業の性格上、個別の抗体の実用化は

むしろ付加的効果と位置付けるべきである。

2. 2 高効率な抗体分離精製技術

1) 研究開発成果に関する評価

従来法より効率がが高く、また穏和な精製が可能な新規なリガンドを、網羅的な変異導入と徹底的なスクリーニングにより得ている。そのためこれにより得られる特許はかなり強力であることが期待できる。Protein A は広く用いられており、これに置き換わるようになれば、今回のプロジェクトの成果としては十分である。また、海外メーカーの主流製品と比べ、高効率だけでなく、高品質の抗体が精製できる点は高く評価できる。実証パイプラインのための無血清 CHO（チャイニーズハムスターの卵巣）細胞培養による評価システム及びヒト化抗体の精製技術検証用のパイプラインを確立したことも高く評価できる。

しかし、Protein A は長年抗体精製リガンドとして一般的に用いられてきており、海外でも同様な最適化が行なわれる可能性が高い。今後、長期にわたり優位性を維持するための独創性を明らかにして欲しい。

〈肯定的意見〉

- 従来法より効率がが高く、また穏和な精製が可能な新規なリガンドを、網羅的な変異導入と徹底的にスクリーニングすることで得ている。そのためこれにより得られる特許はかなり強力であることが期待できる。Protein A は広く用いられており、これに置き換わるようになれば、今回のプロジェクトの成果としては十分である。
実際に数多くの抗体に応用し、かなり出口に近い技術に仕上がってきているという印象を持った。
また比較的多数の国際特許を出している点は、国のプロジェクトとして必要であると考えられ、評価できる。
- 海外メーカーの主流製品と比べ、高効率だけでなく、高品質の抗体が精製できる点は高く評価できる。
- アフィニティー・リガンド開発から精製抗体の品質解析の工夫・改良に、抗体の高効率無精製を目的とした担体製造、実証パイプラインのための無血清 CHO 細胞培養による評価システムの確立、ヒト化抗体の精製技術検証用のパイプラインの確立など、初期目標設定を十分に達成しており高く評価できる。
- 分離精製は新たなリガンドの開発等高い技術で開発が進められた。
実際の抗体回収率も 70%という極めて高い数値目標に至っており、本事業の目標を大きく果たしていると考ええる。
A チームとの積極的な連携で、多くの抗体を実証パイプラインに用いての

技術評価、利用は重要である。

- アレイ技術によるアフィニティー・リガンドの最適化技術と高性能担体の開発により、抗体精製の効率化と品質改善を達成したことは高く評価できる。
- ラボスケールではあるが、高効率なリガンド、分離精製技術が構築できている。
- 高効率な抗体分離精製の基盤技術を確立した点は高く評価できる。あ

〈問題点・改善すべき点〉

- **Protein A** は長年抗体精製リガンドとして一般的に用いられてきており、海外でも同様な最適化が行なわれる可能性が高い。今後、長期にわたり優位性を維持するための独創性に不安がある。
- 本分野は非常に競争が厳しいことから迅速な実用化が鍵となる。そのためには本分野における製品開発の経験を有する企業との提携が成功のための重要な要素となる。

〈その他の意見〉

- ・ 分離精製製造技術として実用化されることを期待している。

2) 実用化の見通しについての評価

参加企業による商品化も含めて、中規模精製のレベルまでの実用化の目処がついていることは評価できる。ラボスケールの技術が確立できていることから、スケールアップが可能になれば、コスト低減の分離精製技術としても実用化が期待できる。

しかし、スケールアップについては、課題を十分に整理すべきである。また、実際に本プロジェクトで開発した技術を用いることにより、どの程度のコスト削減が可能かについて数値として示し、競争力をアピールする必要がある。

既に広く用いられている海外企業のシステムに比べ、低廉性や簡便性などの別の付加価値が無いと、新規参入は苦しいであろう。実用化にあたっては商品開発的な視点からのアプローチが必要である。

〈肯定的意見〉

- 参加企業による商品化も含めて、中規模精製のレベルまでの実用化の目処がついていることは評価できる。
- ラボスケールの技術が確立できていることから、スケールアップが可能になれば、コスト低減の分離精製技術として実用化が期待できる。
- 既に幾つか実用化に直結した取り組みがなされている。
- 個別性が濃厚な抗体作製とは異なり、優れた分離精製技術は多くの企業等で実用化される可能性が強い。また事実その為の努力と見通しが着々と作られつつあり多くの企業に、技術移転されることを是非期待したい。
- メーカーとの連携も取れており、早期の実用化が期待できる。
- スクリーニングスケールのモノリスカラムが既に実用化されている点、および複数の実用抗体の生産と精製にもパイロットスケールで試みられており、実用性が証明されつつあるのは評価できる。
- 適切な経験を有する企業との提携が成立すれば実用化は可能と考える。一方、提携の戦略が適切でない場合には本技術を広く普及させることには多くの困難が予想される。

〈問題点・改善すべき点〉

- スケールアップの課題を整理すべきである。
- 商業化レベルの大量精製に適した技術改良を期待する。また、実際に本プロジェクトで開発した技術を用いることにより、どの程度のコスト削減が可能かについて数値として示し、競争力をアピールする必要がある。
- 本来の医薬品としての実用化までには多くの課題が残っている。

〈その他の意見〉

- ・ 今回取得した新規な抗体特異的結合リガンドとモノリスカラムを組み合わせた商品化を考えられているようであるが、現在既に広く用いられている海外企業のシステムに比べ、値段、簡便性など、別の付加価値が無いと、新規参入者は苦しいのではないか。実用化にあたっては商品開発的な視点からのアプローチが必要であろう。
- ・ ヒト以外の動物種の免疫グロブリンに対する結合特性を測定することにより、基礎研究ツールとしての応用も検討してほしい。

3) 今後に対する提言

新規リガンドの探索により全く新しい抗体精製技術の確立にもチャレンジしてほしい。リガンドアレイライブラリーの技術は、抗体精製以外の広範な分野での活用も期待できる。

大規模な生産プロセスへの応用は、実験室レベルのものとはまた違った難しさがある。研究を進め、実績を積み重ねて信頼性を勝ち取って欲しい。スケールアップの課題を整理し、課題解決のための最適な研究チームを作ることも検討して欲しい。

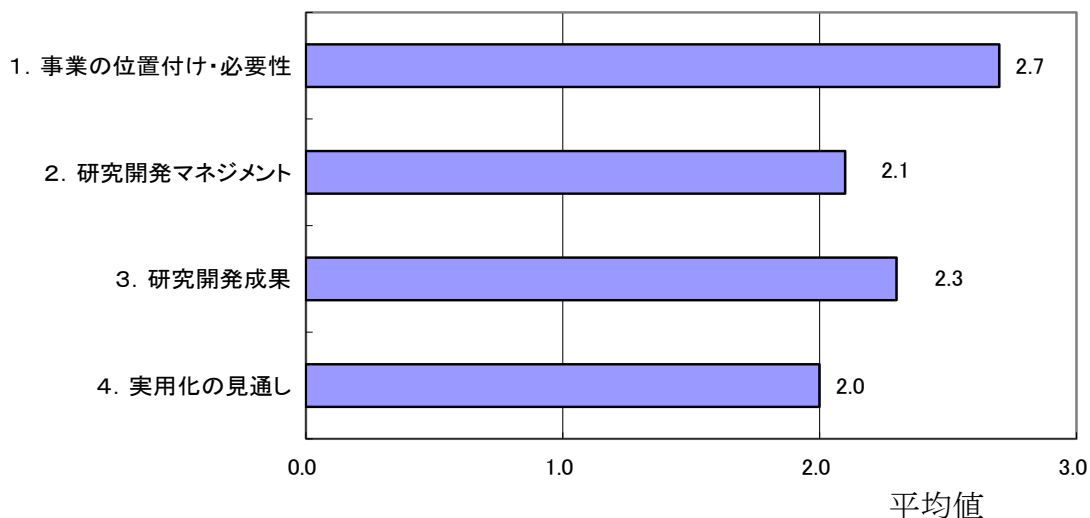
貴重な抗体を如何に低コストで高効率に調整し得るかは、抗体医薬品に伴う高医療費の問題を解決する重要な課題である。今後、この優れた技術開発成果が、一社でも多くの企業に技術移入される様な積極的努力が重要である。

〈今後に対する提言〉

- ・ 今後、同様な研究を行うのであれば、新規リガンドの探索により全く新しい抗体精製技術の確立にもチャレンジしてほしい。
- ・ 既存の精製技術に対して、コスト面、利便性、品質等の項目で明確な優位性を示すことが、市場に食い込む鍵になる。
リガンドアレイライブラリーの技術は、抗体精製以外の広範な分野での活用が期待できる。
- ・ 大規模な生産プロセスへの応用は、実験室レベルのものとはまた違った難しさがある。研究を進め、実績を積み重ねて信頼性を勝ち取っていただきたい。
- ・ スケールアップの課題を整理し、課題解決のための最適な研究チームを作ってもらいたい。
- ・ 貴重な抗体を如何にローコストで高効率に調整し得るかは、抗体医薬品に伴う高医療費の課題を一定に解決する重要な課題である。今後この優れた技術開発成果が、一社でも多くの企業に技術移入される様な積極的努力が重要である。
- ・ 実用化のための医薬品製造までの移行システムの構築のための情勢活動や国家的な TR 支援機構の構築が肝要であろう。

3. 評点結果

3. 1 プロジェクト全体



評価項目	平均値	素点 (注)							
		A	A	A	A	C	A	A	
1. 事業の位置付け・必要性について	2.7	A	A	A	A	C	A	A	
2. 研究開発マネジメントについて	2.1	B	A	A	B	C	B	B	
3. 研究開発成果について	2.3	B	A	A	B	C	A	B	
4. 実用化の見通しについて	2.0	B	B	B	C	B	A	B	

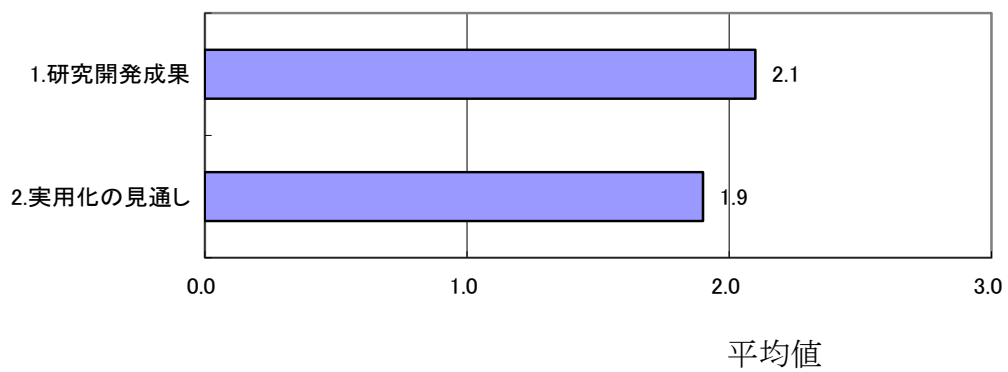
(注) A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

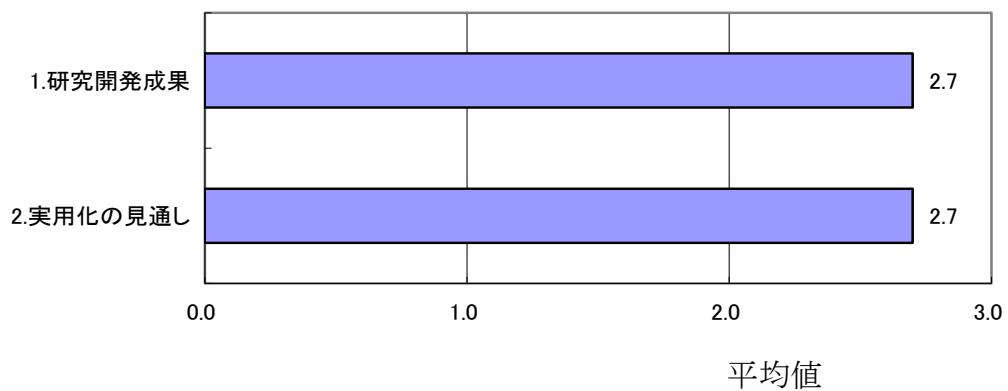
1. 事業の位置付け・必要性について	3. 研究開発成果について
・非常に重要 →A	・非常によい →A
・重要 →B	・よい →B
・概ね妥当 →C	・概ね妥当 →C
・妥当性がない、又は失われた →D	・妥当とはいえない →D
2. 研究開発マネジメントについて	4. 実用化の見通しについて
・非常によい →A	・明確 →A
・よい →B	・妥当 →B
・概ね適切 →C	・概ね妥当であるが、課題あり →C
・適切とはいえない →D	・見通しが不明 →D

3. 2 個別テーマ

3. 2. 1 系統的な高特異性抗体創製技術



3. 2. 2 高効率な抗体分離精製技術



個別テーマ名と評価項目	平均値	素点（注）							
3. 2. 1 系統的な高特異性抗体創製技術									
1. 研究開発成果について	2.1	B	A	A	B	C	B	B	
2. 実用化の見通しについて	1.9	B	B	B	C	C	A	B	
3. 2. 2 高効率な抗体分離精製技術									
1. 研究開発成果について	2.7	A	A	A	A	B	A	B	
2. 実用化の見通しについて	2.7	B	A	A	A	A	A	B	

（注）A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

1. 研究開発成果について

- ・非常によい
- ・よい
- ・概ね適切
- ・適切とはいえない

2. 実用化の見通しについて

- A ・明確 →A
- B ・妥当 →B
- C ・概ね妥当であるが、課題あり →C
- D ・見通しが不明 →D

第2章 評価対象プロジェクト

1. 事業原簿

次ページより、当該事業の事業原簿を示す。

「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-2
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						→	

	支 行 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。</p> <p>(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® 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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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、スキヤフォールドの選別系を開発した。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、ガラス板上薄層モリスシリカゲル、およびマイクロサイズモ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、現実の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 CD40 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 CD40 リガンド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 B5209B は細胞上に発現する ROBO1 蛋白と結合した。B5209B は、ROBO1 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 ROBO1 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 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。

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[®]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[®]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[®] 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。

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たことを確認した。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(㈱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(㈱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、結局二千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ー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も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りうるかについて、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 に対するエルビタックス、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(ヒタンパク質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与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チビックスに対して、我々のクローンが抗腫瘍効果を示す例も見つかる。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観察されたことで重要な点は、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った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。このクローン場合は、肝癌、腎癌、膵癌、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

	<p>実施した。</p> <p>Fab/抗原 A 複合体の結晶化</p> <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、1:1:1 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</p> <p>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="496 1093 1428 1256"> <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 AMIGO 2 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PET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 化とプレターゲット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アスバラギン合成酵素に対する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</p>						

的な規模で進むと考えられる高速シークエ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行ってきた。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抗体であるリツキシマンの 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チ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でいる。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 改変とプレターゲティング技術の開発により、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 および白血病治療マーカーとしてのアスパラギン合成酵素(AS)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、また AS の白血病治療における診断価値は確立しており、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、他の追随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事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事により、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勞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ける活用を目指す。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イルスのことで、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(低免疫原性といえます)、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るという考え方。
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。

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「プレターゲットング法」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。

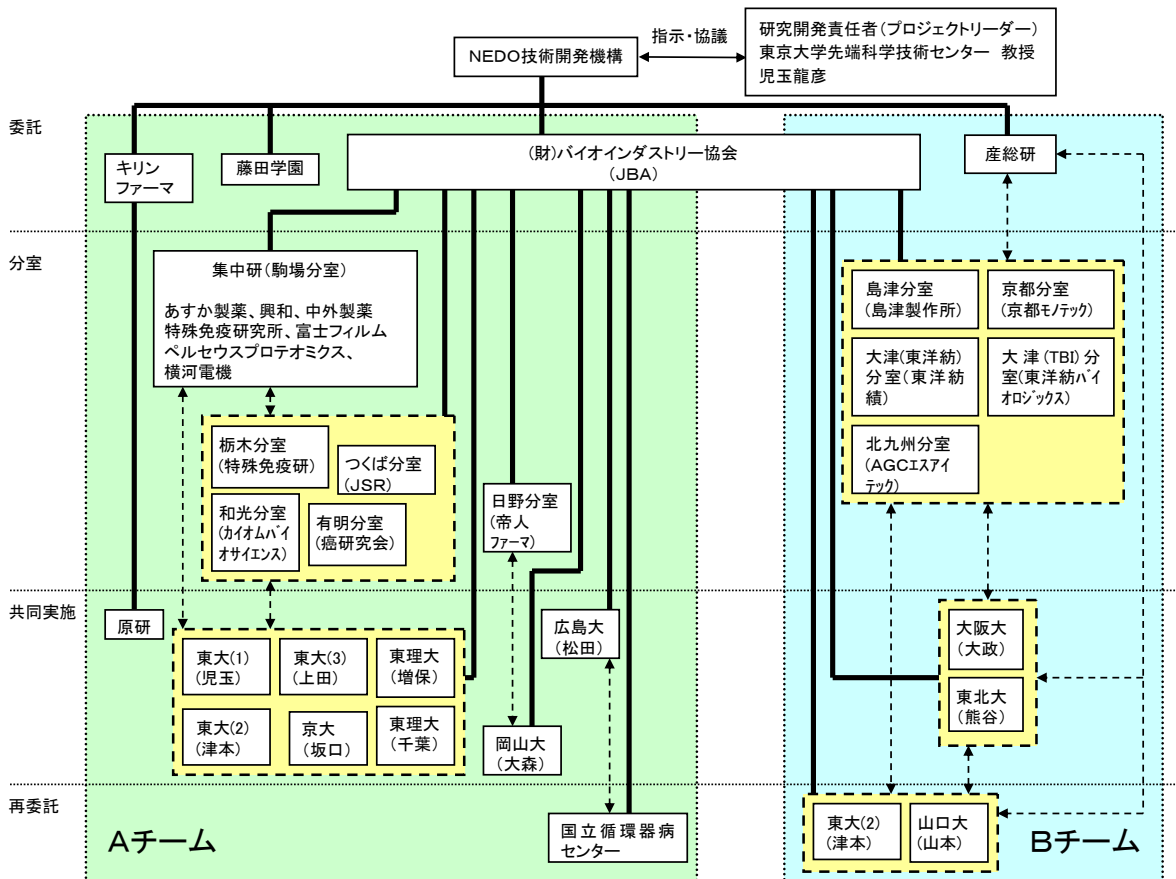
(公募プロセス)

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)



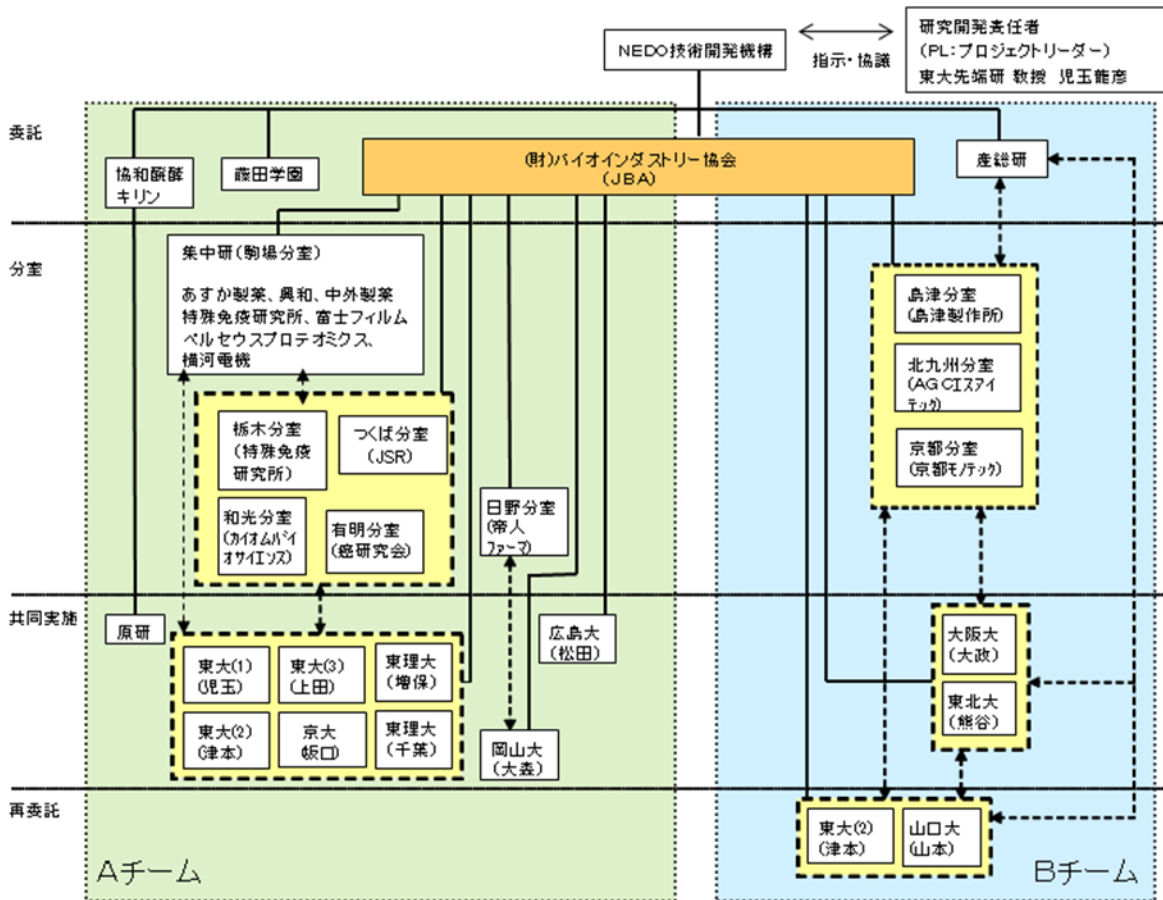
実施にあたり、部分提案された広島大学と岡山大学を財団法人バイオインダストリー協会のグループに統合し、財団法人バイオインダストリー協会が管理することとした。

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リ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。

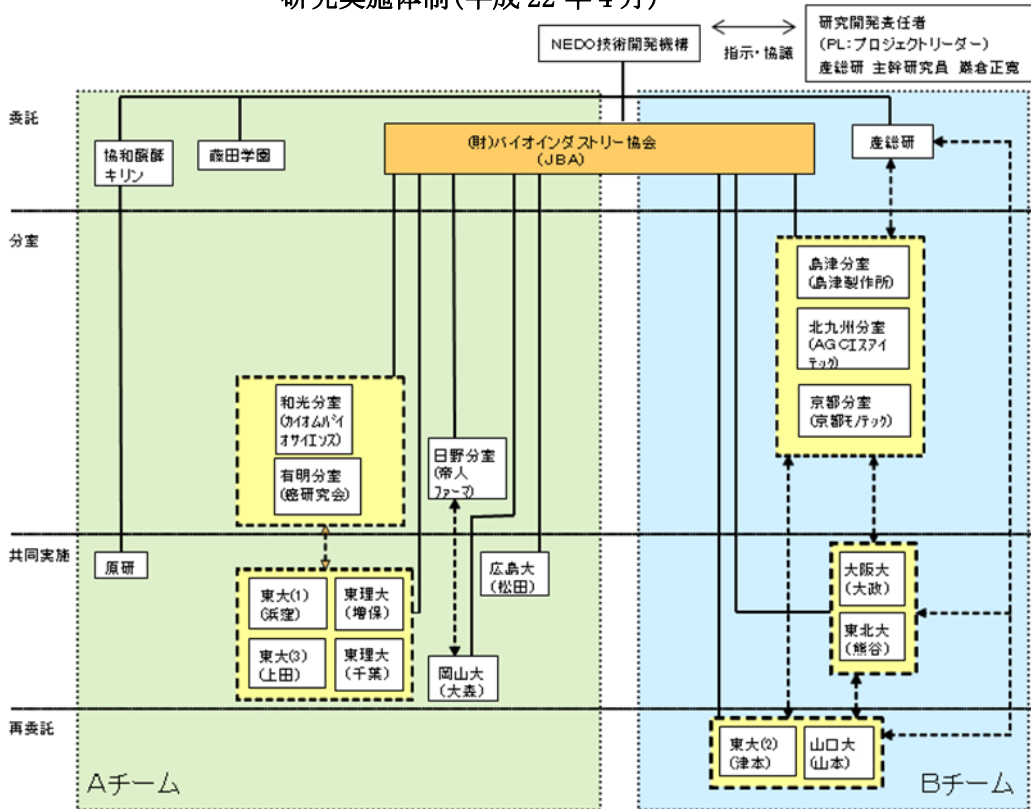
このため、当該技術開発をプロジェクトから切出し、新規に創設された FIRST プログラムへ応募することとし、「がんの再発・転移を治療する多機能な分子設計抗体の実用化」と題し、東京大学先端科学技術研究センター／児玉達彦教授を中心研究者として提案を行なった。厳正なる審査の結果、第 84 回総合科学技術会議（平成 21 年 9 月 4 日）において採択 30 課題の一つとして採択されることが決定した。その後、研究規模等に関する精査が行なわれ、第 89 回総合科学技術会議（平成 22 年 3 月 9 日）において、最先端研究開発支援プログラムの中心研究者、研究課題、研究支援担当機関及び研究計

画が決定された。

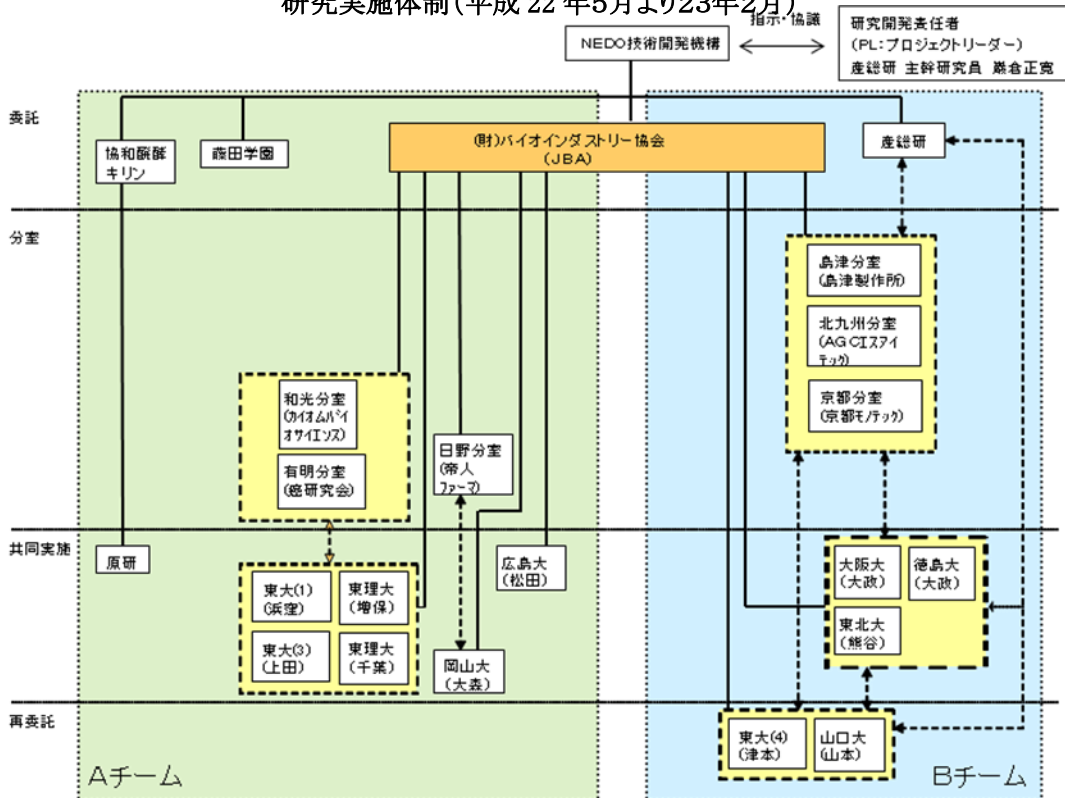
FIRST プログラムでの採択結果を受け、FIRST プログラムに専任義務があること、また、4年間のNEDOプロジェクトの進展状況に鑑み、最終年度である平成22年度の研究体制を抜本的に見直した。即ち、4年間の技術開発によって、先端研を中心に進めてきた「バキュロウィルスを用いる系統的な高特異性抗体の創製技術」については一通りの目途がついたことから、中間評価の指摘事項であった「早期に参画企業以外にも導出し、限られた人員・研究費をより効率的に基盤技術の開発に振り分けることが望ましい」に基づき、①開発課題を「バキュロウィルスを用いる系統的な高特異性抗体の創製技術」を除く系統的な創製技術の開発および抗体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准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、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（P L）
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（S P L）
河上裕（A B 共通委員）	慶應大学・医学部・先端医科学研究所・教授
西義介（A B 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（P L）
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（S P L）
河上裕（A B 共通委員）	慶應大学・医学部・先端医科学研究所・教授
西義介（A B 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「プレターゲット法」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。

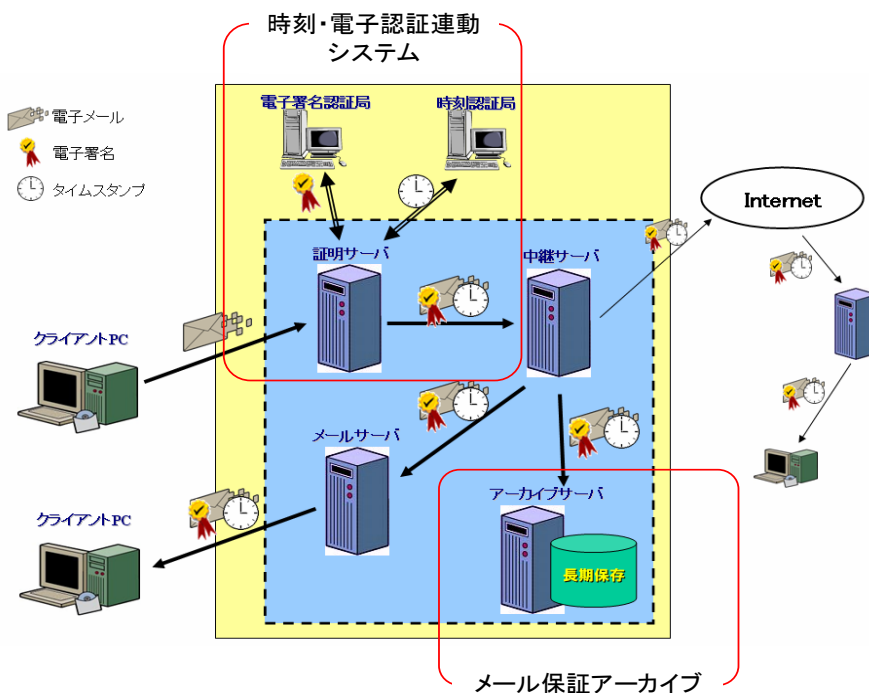
また平成 20 年度予算では、抗原の修飾を解析するために必須である高精度質量分析計(オービトラップ)を集中研に導入し、プロジェクトメンバーが使用できるよう整備を行なった。

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。

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)。

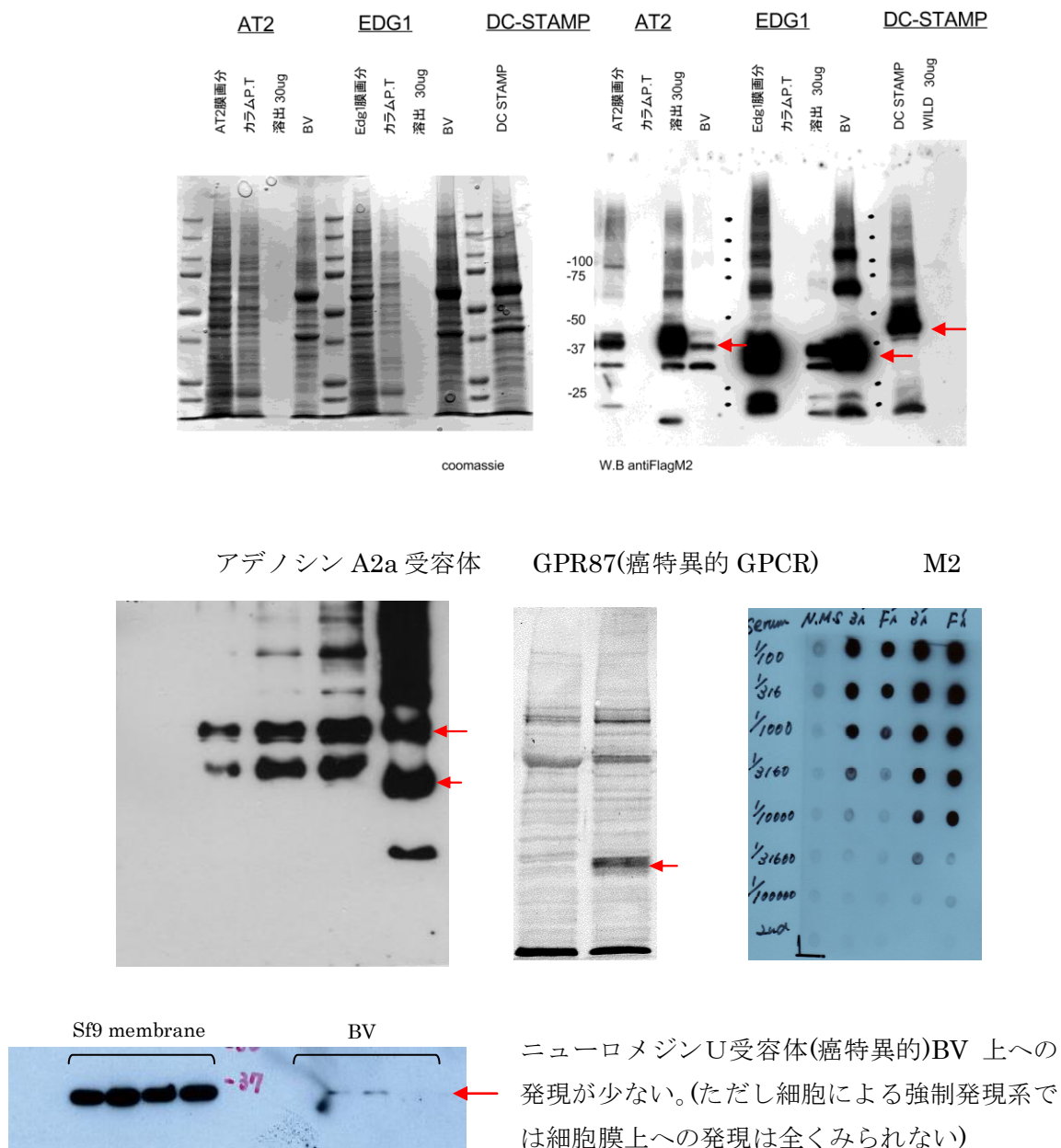


図 1 GPCR の発芽型バキュロウイルス(BV)への発現

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下記のとおりである。

- (1)M2 アセチルコリン受容体 _____ 14 クローン
- (2)AT2 アンジオテンシン受容体 _____ ヒト 14 クローン、マウス 7 クローン
- (3)A2a アデノシン受容体 _____ 23 クローン
- (4)CCR5 ケモカイン受容体 _____ 6 クローン
- (5)HRH1 ヒスタミン H1 受容体 _____ 11 クローン
- (6)DP2 プロスタグランジン D2 受容体 _____ 3 クローン
- (7)GPR87 すい癌、扁平上皮がんターゲット _____ 3 クローン

であった。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。

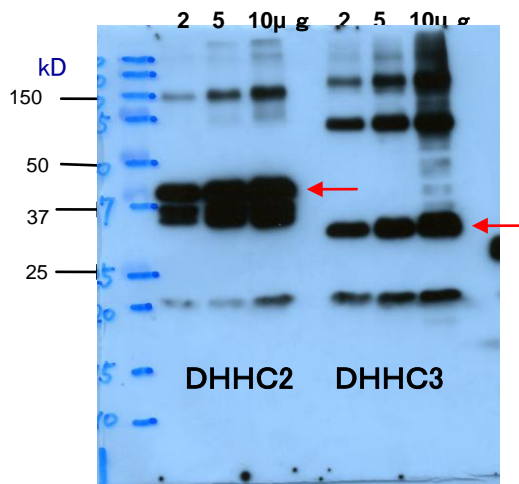
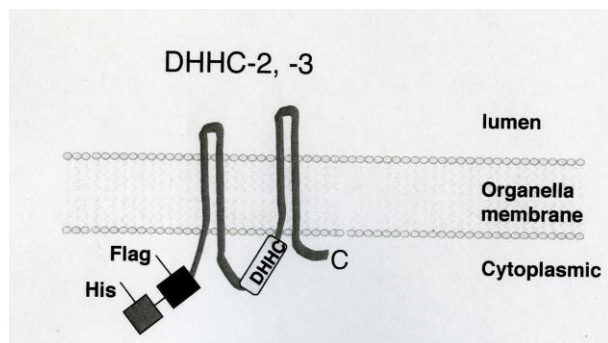
上記の得られたクローンについては、現在京大岩田研との共同研究にて共結晶化と構造解析にむけて解析を行っており、A2a受容体についてはリガンド結合阻害機能のある抗体について受容体との結晶が取得でき、高解像度での構造解析に成功している。

その他の主な多数回膜貫通型タンパク質については、

- (1)Glut1 グルコーストランスポーター (8クローン)
- (2)Glut5 グルコーストランスポーター (13クローン)
- (3)Band3 陰イオン交換輸送体 (5クローン)
- (4)カドヘリン 17 胃がん高発現細胞接着タンパク質 (23クローン)

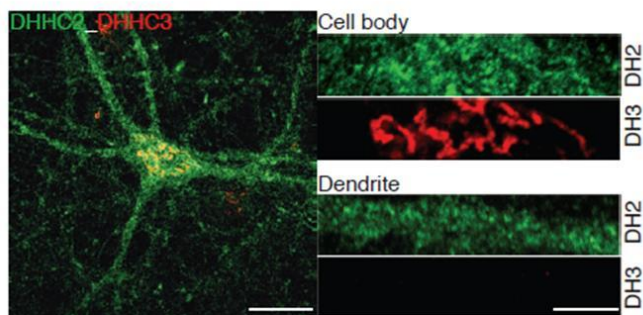
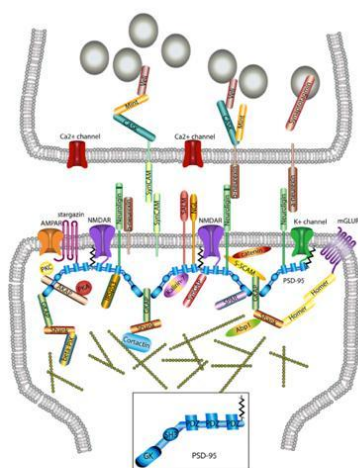
を取得し、それぞれ構造解析および機能解析、イメージングへの応用について評価している。

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)

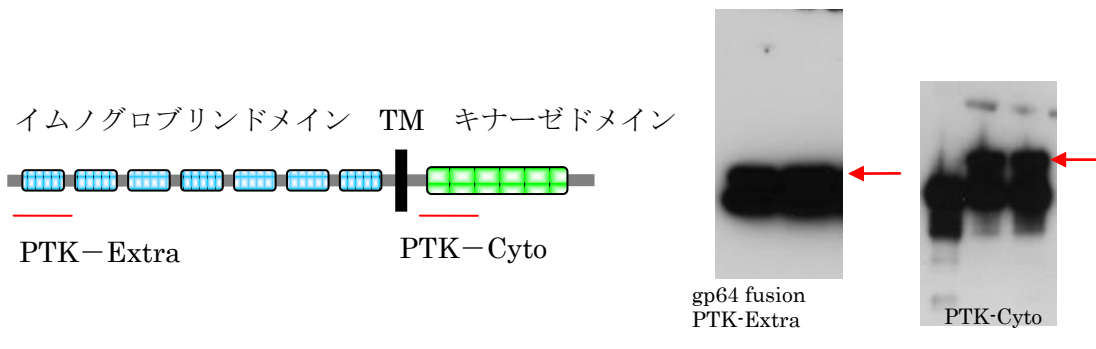


図 2-2 循環器疾患ターゲット膜タンパク質

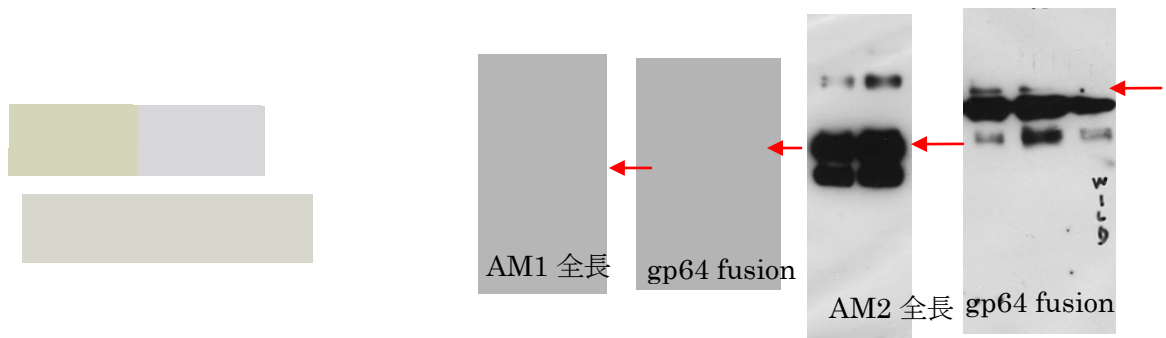


図 2-3 新規接着分子 一回膜貫通型 2 種類 (AM1、AM2)

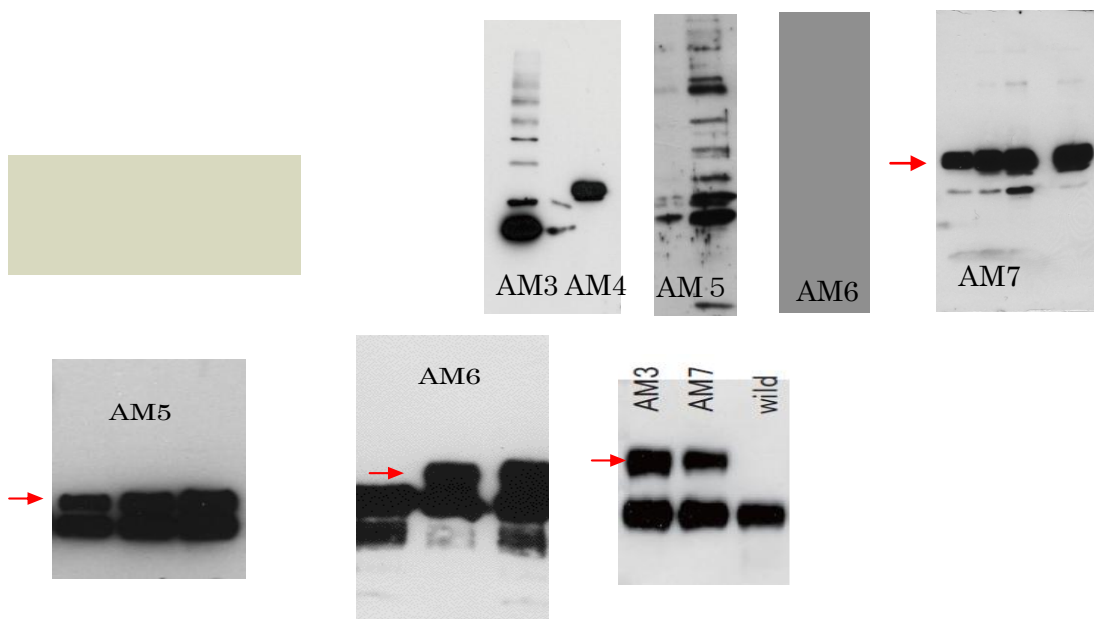


図 2-4 新規接着分子 4 回膜貫通型 5 種類 (AM3~AM7) 全長発現 patterns

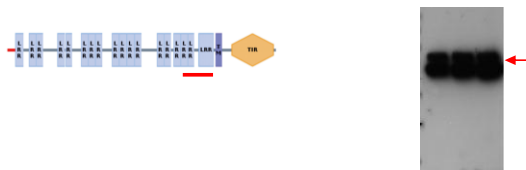


図 2-5 腎癌特異的の一回膜貫通型蛋白質(TLR3)部分エピトープの gp64fusion パターン
 TLR3 は細胞内 C 端を欠失することにより、細胞膜へソートされる。これを利用して細胞外ドメインを BV に発現させ、その BV を免疫することにより、細胞膜上の TLR3 を認識する抗体を 2 クローン取得した。これらの抗体は細胞膜上にある強制発現 TLR3 を免疫沈降(IP)することを IPMS により確認した。さらに、腎がん培養細胞 TUHR10TKB 細胞において、内在性の TLR3 の認識を FACS により試みたが、下記に示すように、サポニン処理により細胞内の TLR3 は認識するが、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)。

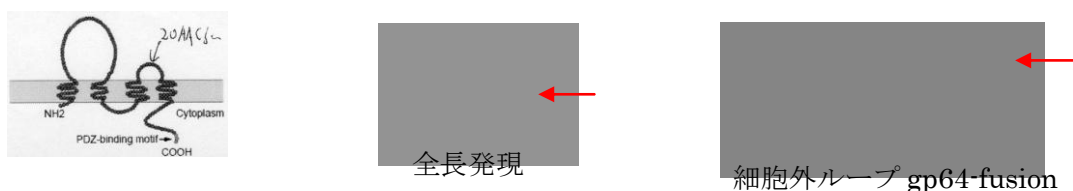


図 2-7 Claudin1(tight junction protein, claudin-1 は表皮のバリアー)
 抗血清価上昇を確認したが、モノクローナル抗体の取得には至っていない。

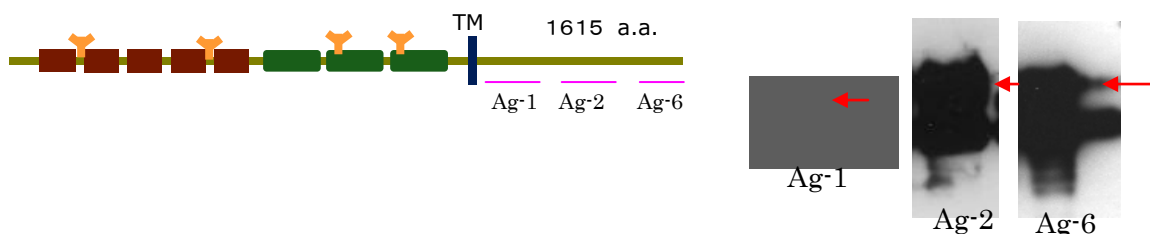


図 2-8 肝癌特異的のマーカ-蛋白質 Robo1 C 端(細胞内)
 細胞内および細胞外について数 10 クローンを取得している。細胞外認識抗体について

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。

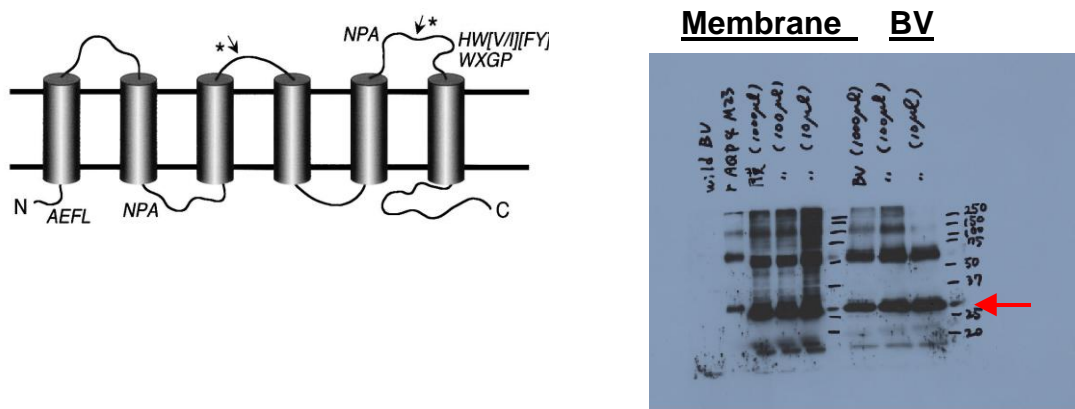


図 2-9 アクアポリン 4

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。発現させた BV を免疫し、強制発現 CHO を FACS で認識する抗体を取得した。

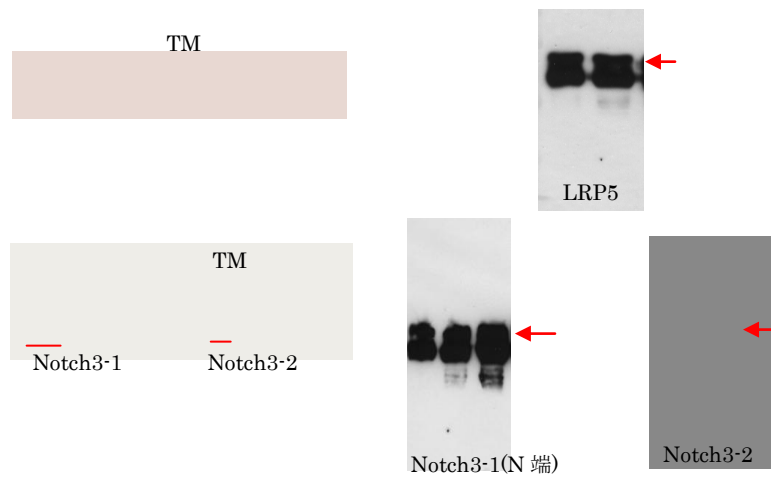


図 2-10 LRP5、Notch3(乳がん特異的ターゲット)

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。

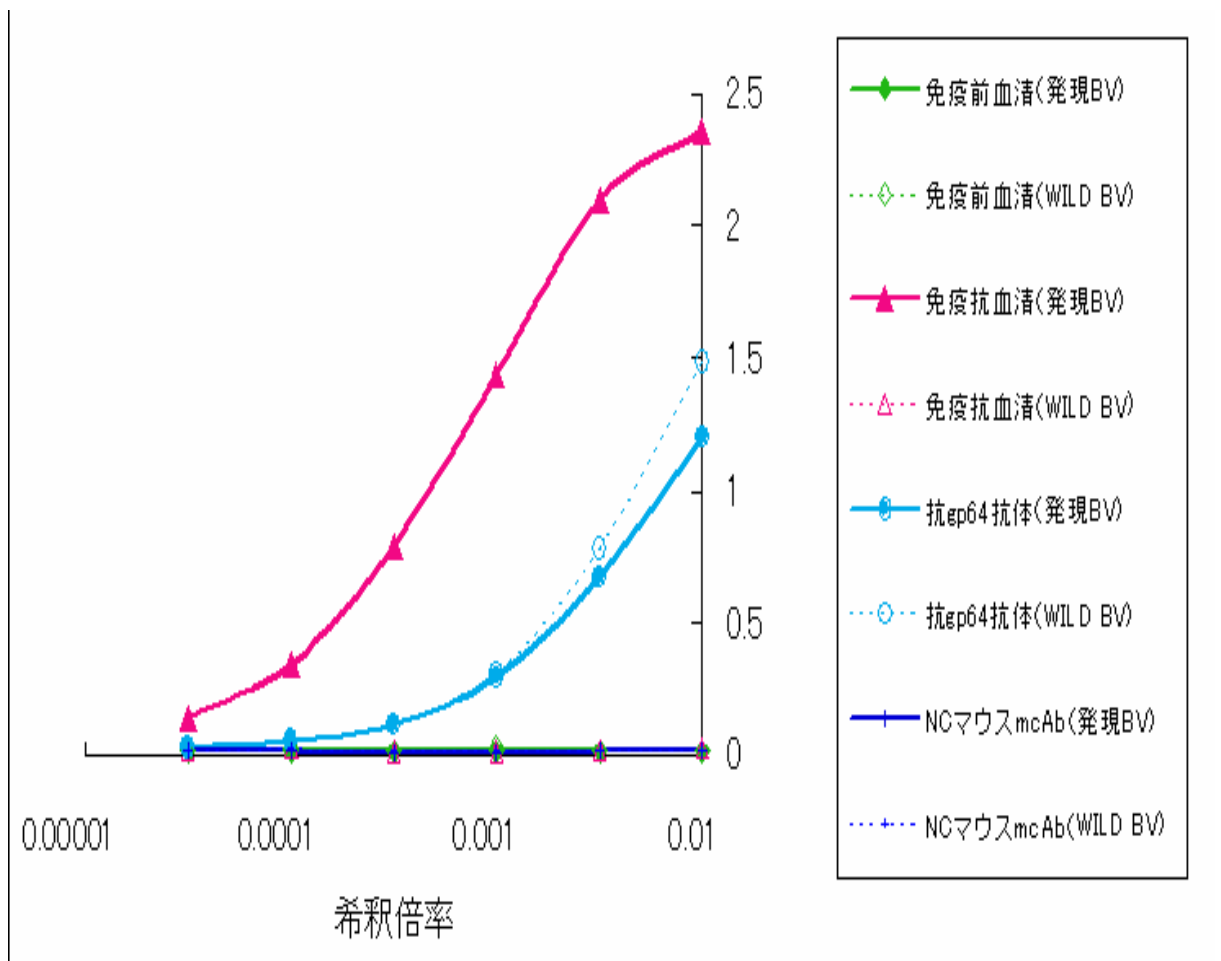


図3 発現BVを用いるBV ELISA法

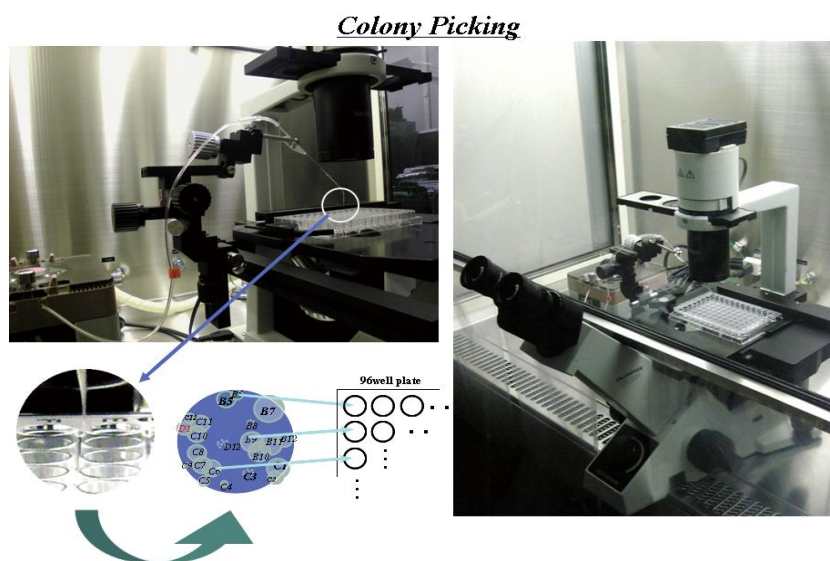


図4 コロニー選択法の開発

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。

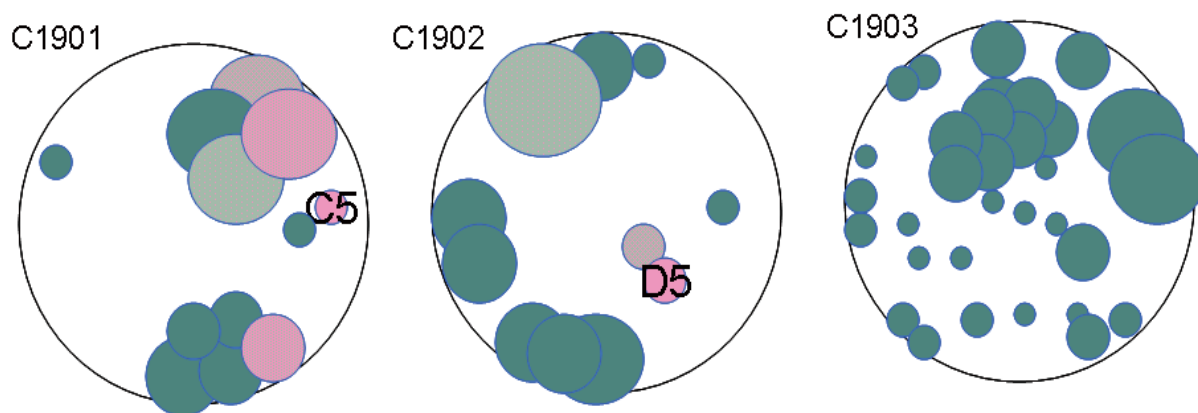


図 5 コロニー選択法の一例

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。

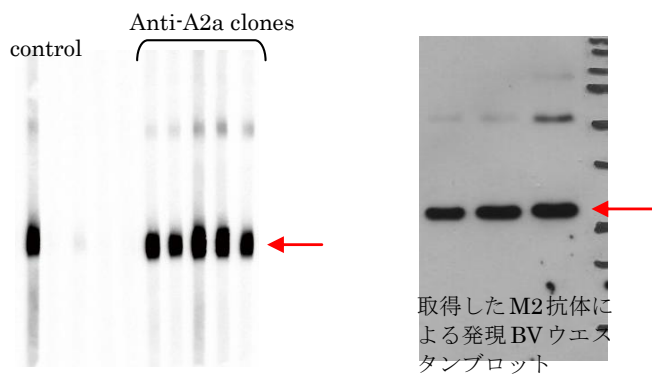
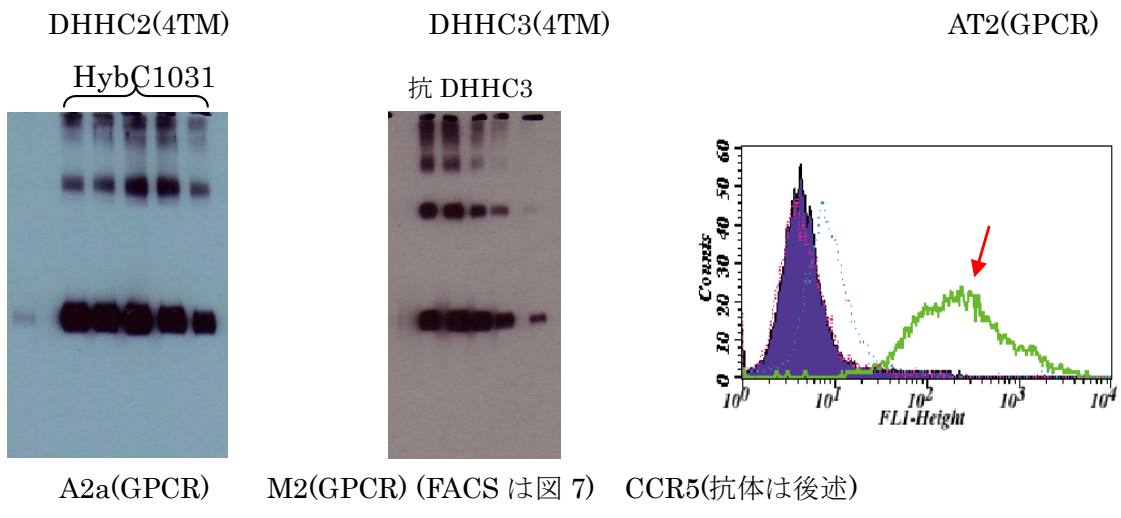


図 6 抗体を取得した膜タンパク質(多数回膜貫通型)

抗体取得例 抗M2(ムスカリン)抗体

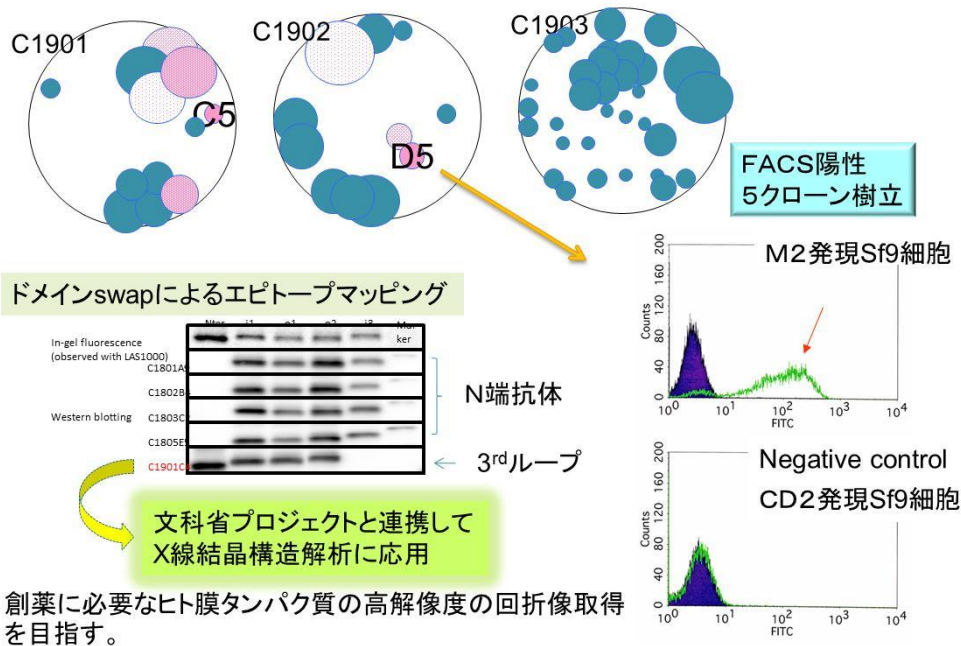


図7 GPCR(M2)抗体の取得例

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。

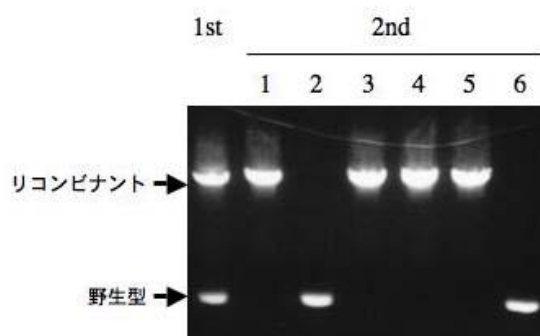


図 8 転写因子 X リコンビナントバクミドの精製

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。そこで CCR5 リコンビナントバキュロウイルスを作製し、これを sf9 細胞に感染させて得られた BV を抗原として、CCR5 の N 端領域の硫酸化修飾されたチロシン残基群を認識する抗体を作製した。

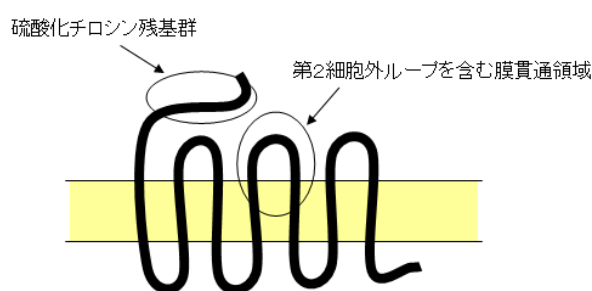


図 9 Gp120 が結合する CCR5 の部位

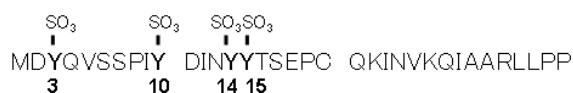


図 10 CCR5 N 端領域の硫酸化チロシン

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。

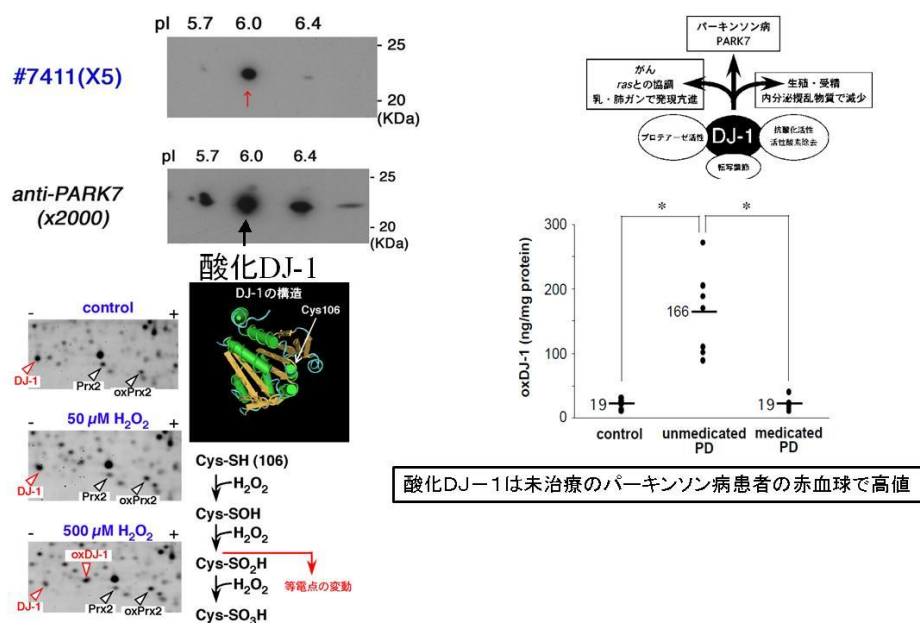


図 11 酸化DJ-1認識抗体

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、フローサイトメトリーに使用できる抗体を取得した。今後治療効果との関連を調査する予定である。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、膵癌組織を用いた 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)。この膵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。

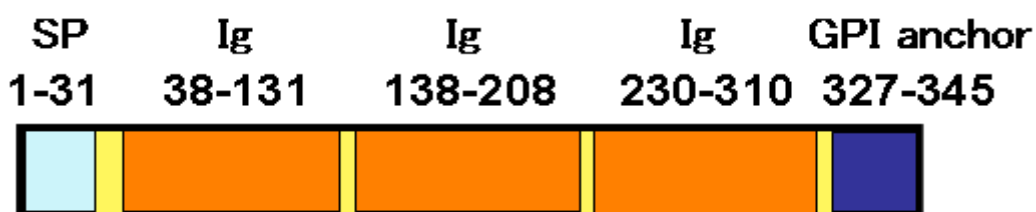
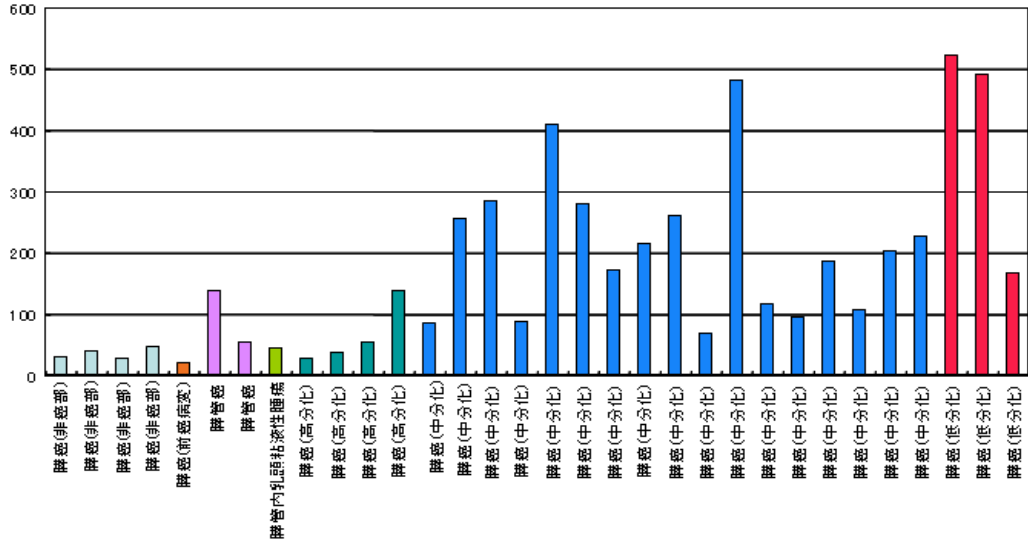


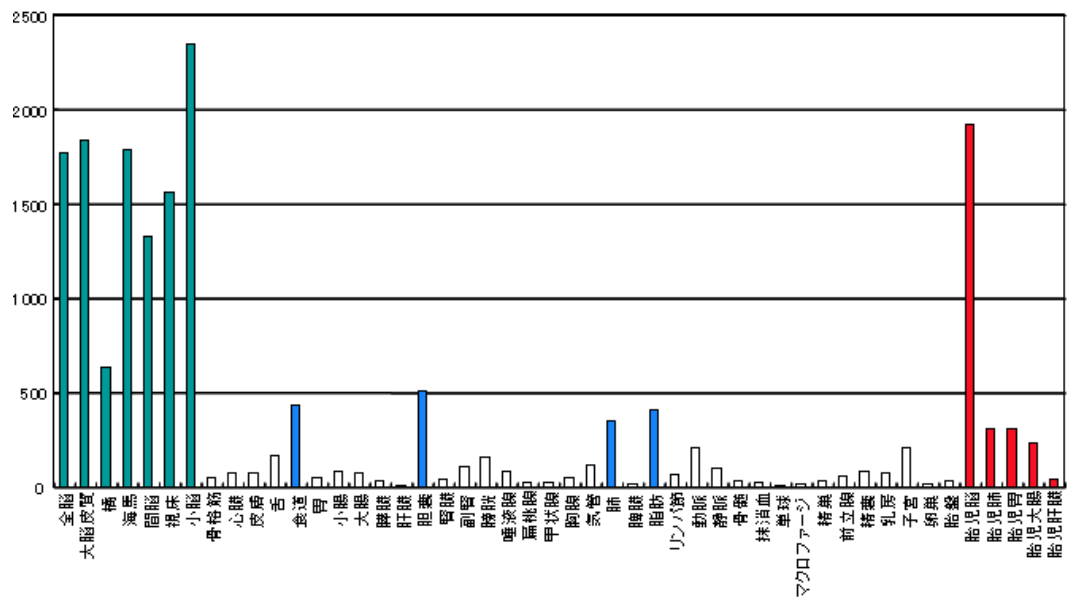
図 12 HNT タンパク質の分子構造



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 HNTmRNA 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 SF9 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。

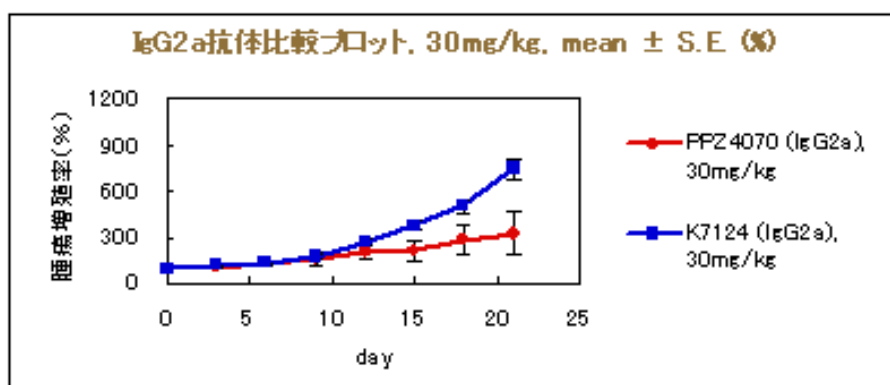


図 15 PPZ4070 の抗腫瘍効果

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。

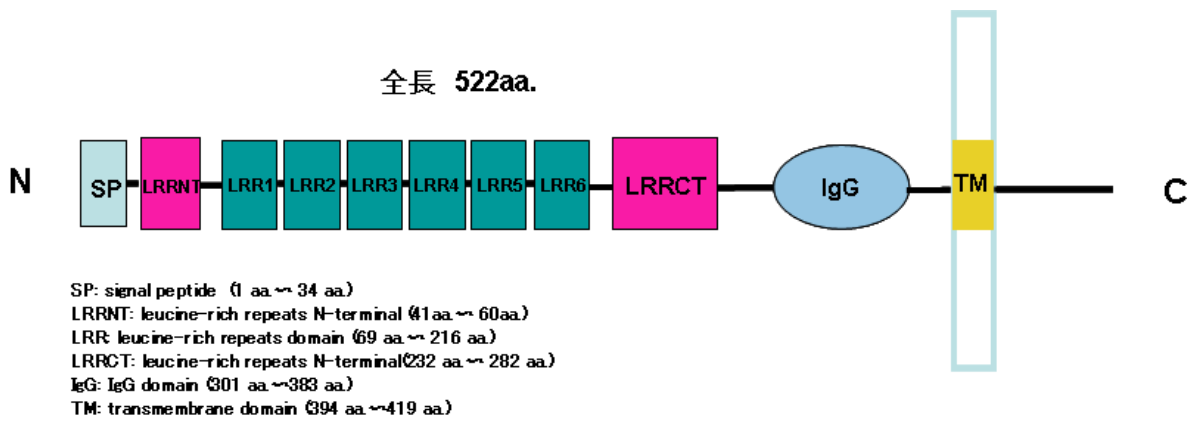
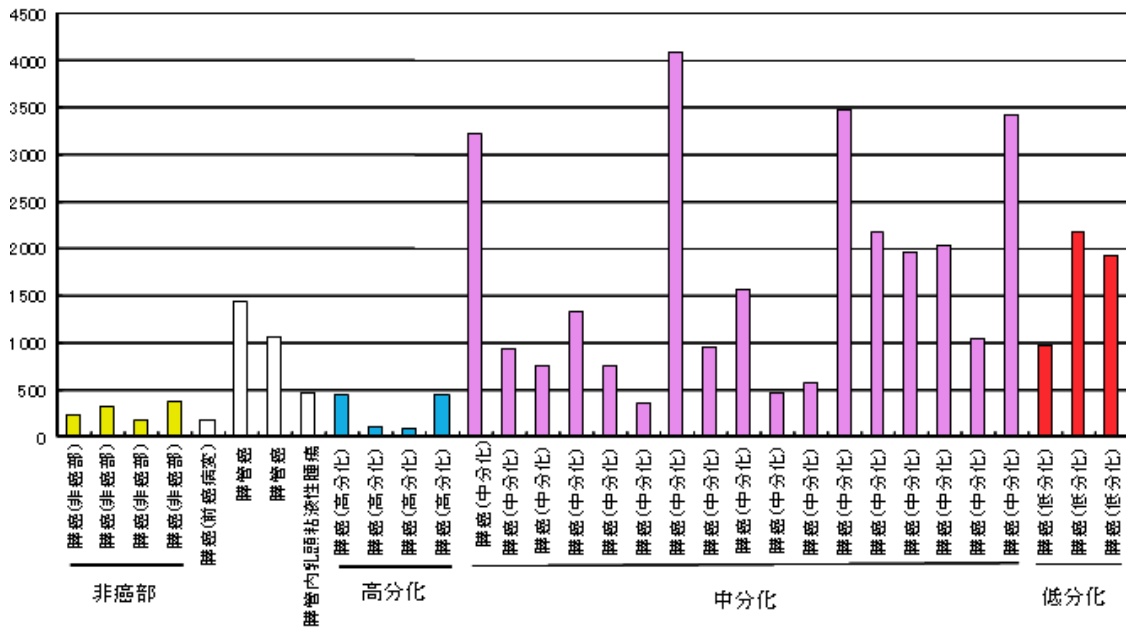


図 16 Amigo2 タンパク質の分子構造



*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

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。

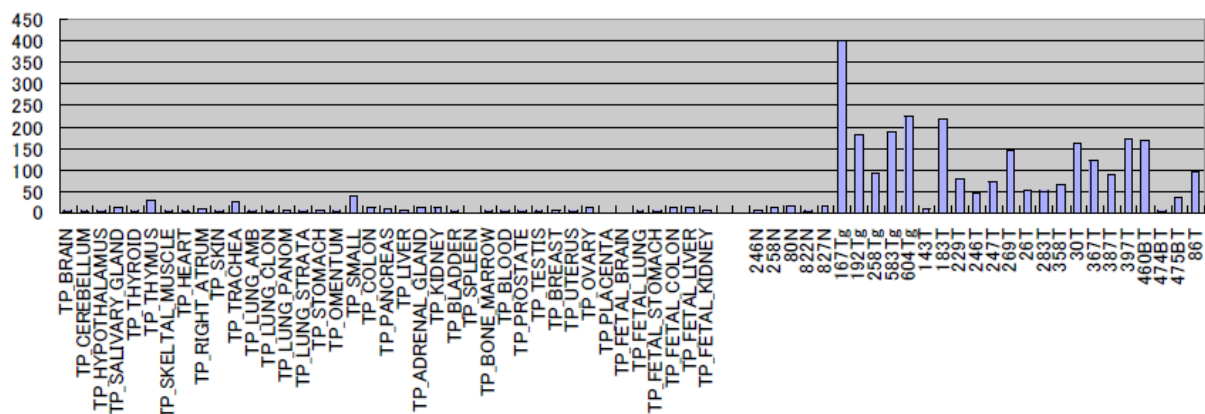


図 20 腎癌及び各正常組織における enpp3 mRNA の発現

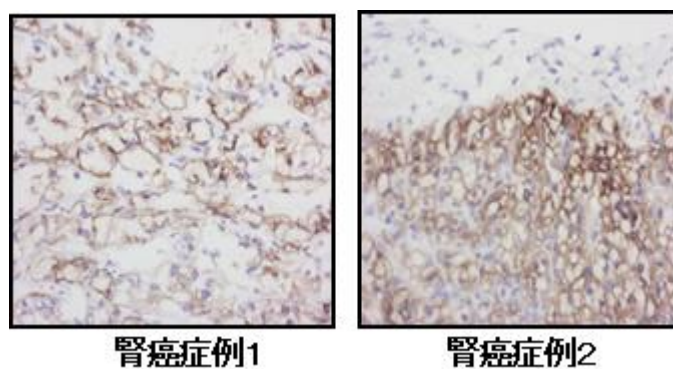


図 21 腎癌組織における ENPP3 蛋白質の発現

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)。

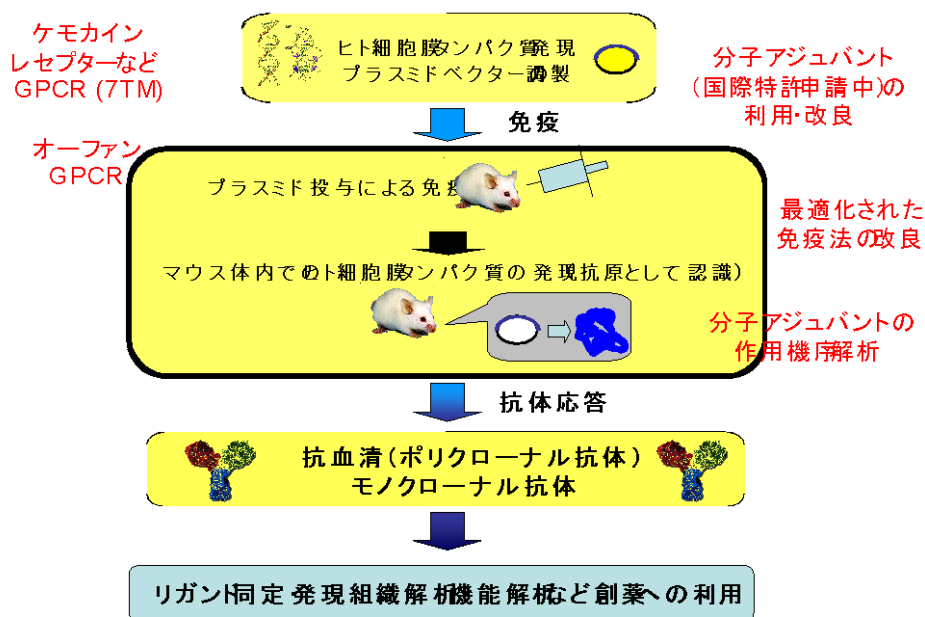


図 22 FL cDNA を用いた遺伝子免疫による GPCR などヒト細胞膜タンパク質に対する抗体の作製

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。

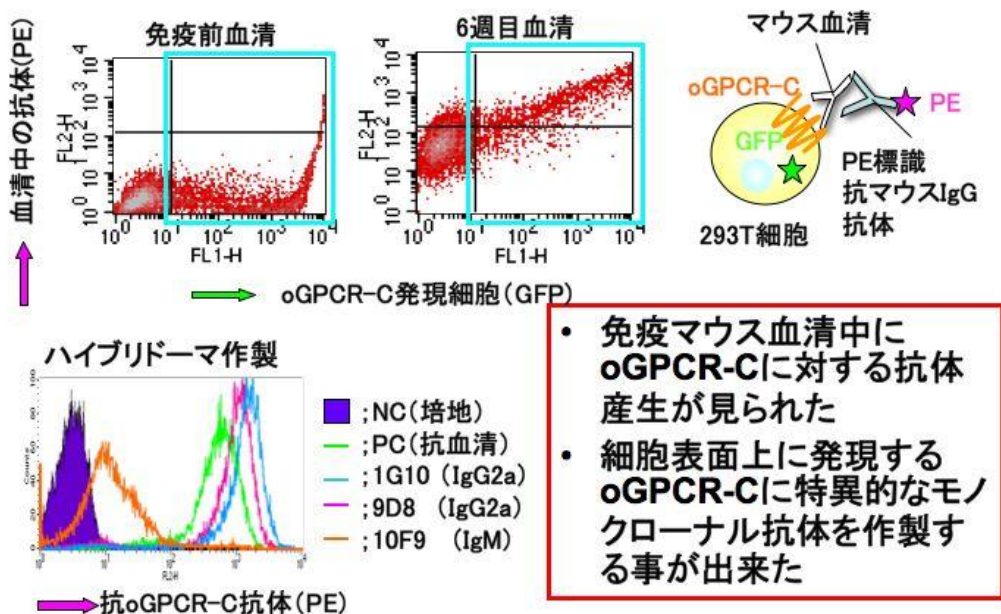
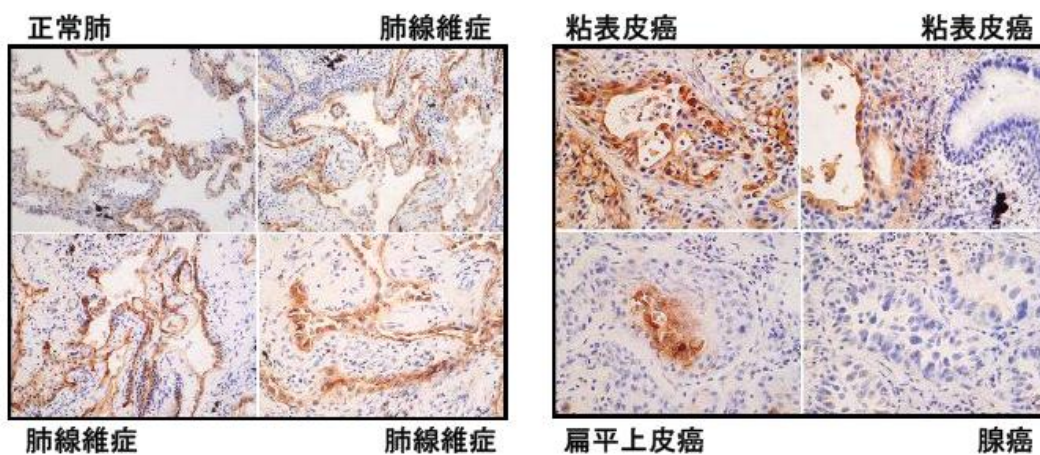


図 23 oGPCR-C 特異的モノクローナル抗体の作製



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**YYY**E** **E**N**E**M**N**G**T**Y

2F11

13E11, 14F10 and others

MOUSE MAL **E**L**N**Q**S**A**E**YYY**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つ連なっ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。このようなり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。

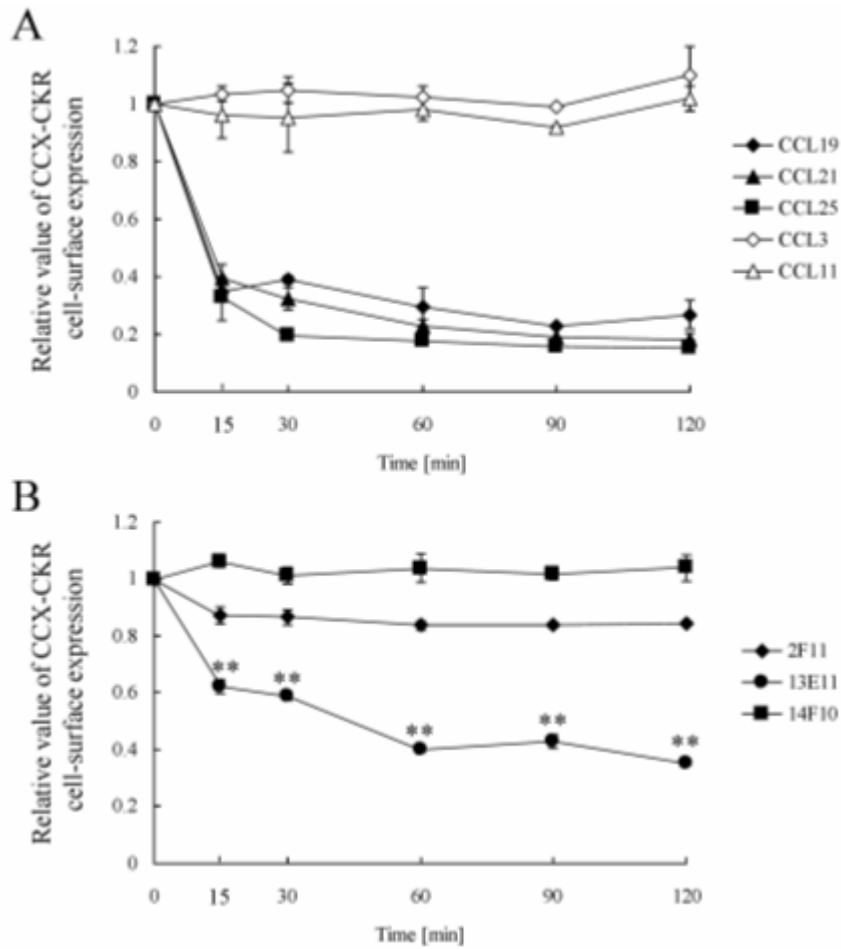
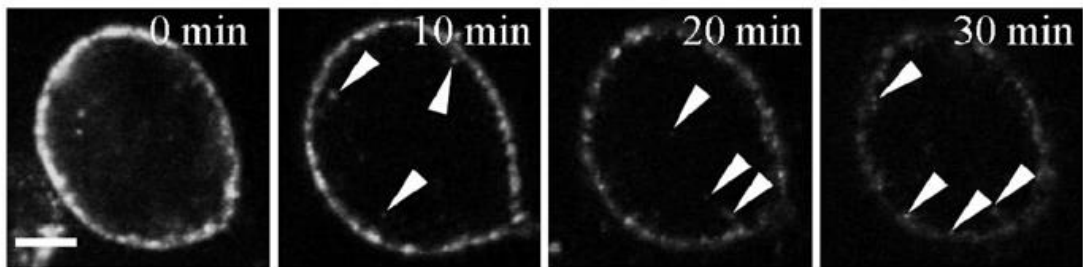


図 26 モノクローナル抗体 13E11 によって誘導される CCX-CKR の細胞内部移行
 (A)特異的リガンドまたは(B)抗体によって誘導される CCX-CKR の細胞内部移行の経時変化。リガンドによる CCX-CKR の細胞内部移行は 2F11 と FITC 標識された二次抗体を用いて FCM により解析した。また抗体を用いた CCX-CKR の細胞内部移行は FITC 標識された二次抗体のみで染色し FCM により解析した。またリガンドではないケモカイン CCL3 と CCL11、リガンド様活性を示さないモノクローナル抗体 2F11 と 14F10 はネガティブコントロールとして用い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

A



B

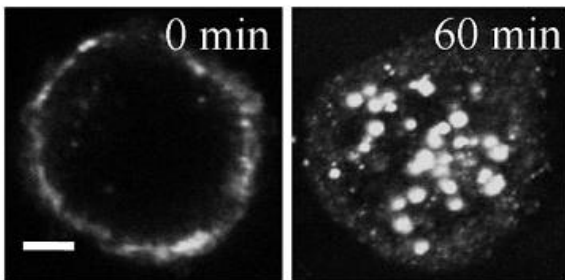


図 27 モノクローナル抗体 13E11 によって誘導される CCX-CKR の細胞内部移行(共焦点レーザースキャン蛍光顕微鏡による観察)。

(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なだけでなく、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。

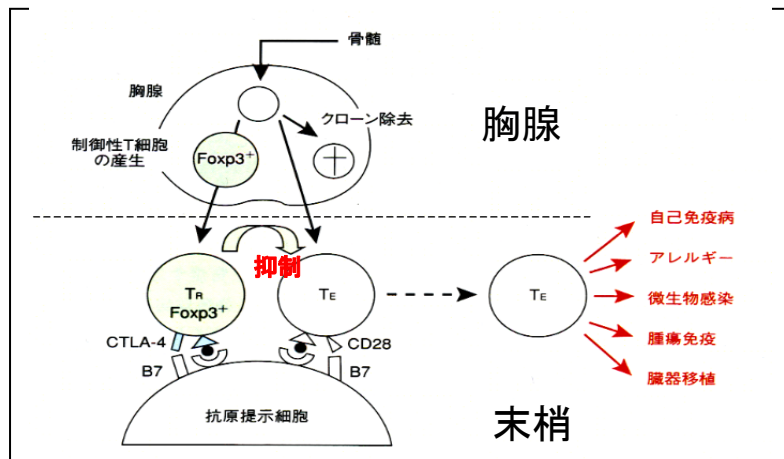


図 28 制御性 T 細胞(Treg)による免疫反応抑制の概念図(坂口ら、「実験医学」2003 より
 改変。)

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。

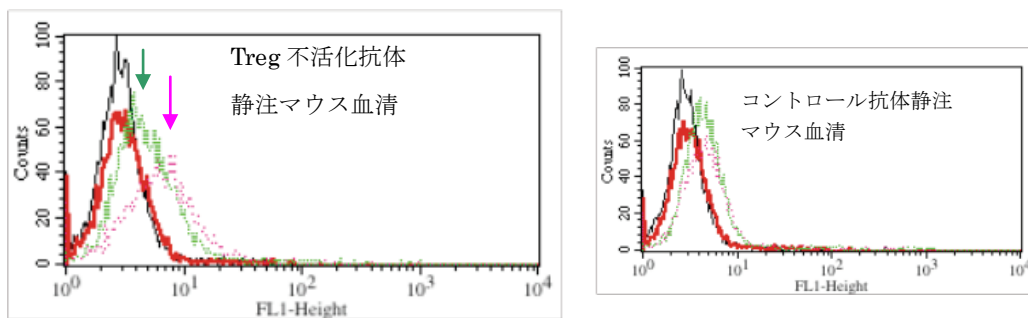


図 29 FACS によるマウス血中特異抗体価の検定

(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。

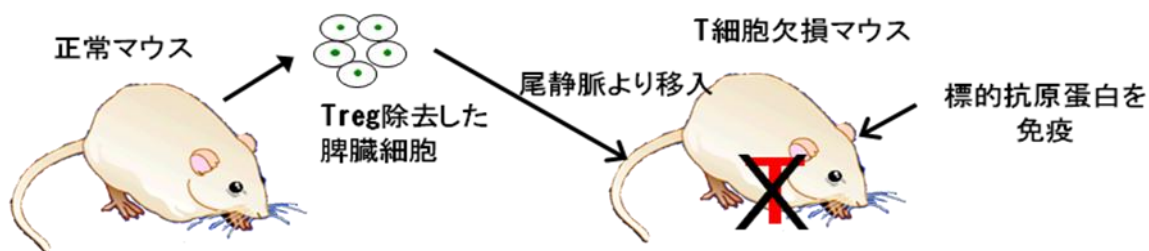


図 30 Treg 除去細胞移入マウスへの免疫の模式図

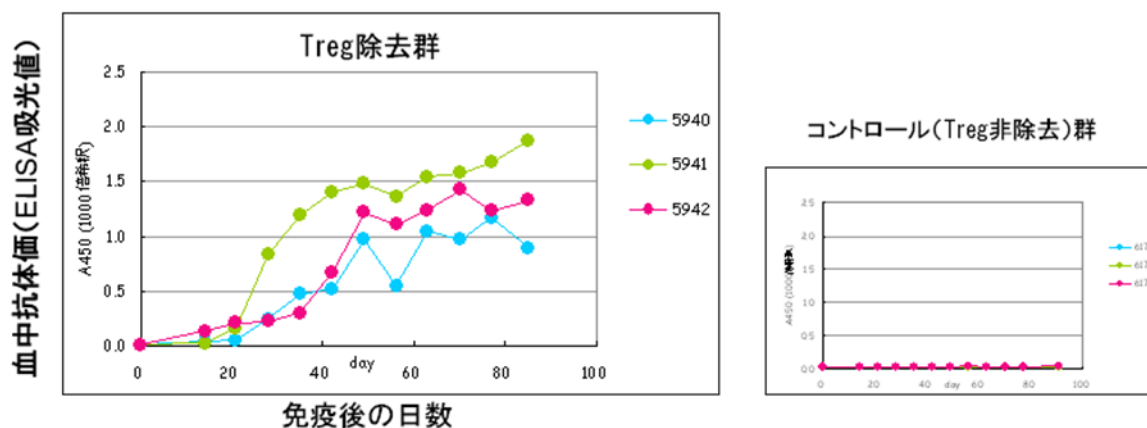


図 31 Treg 除去細胞移入マウスへのマウスサイログロブリンの免疫 (ELISA による血中抗体価の測定結果)

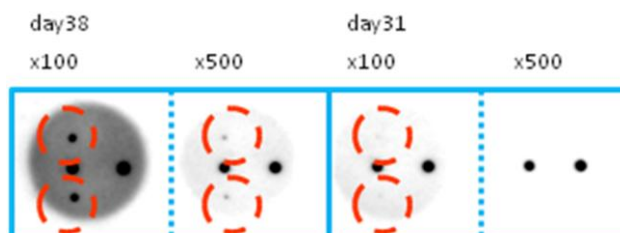


図 32 Treg 除去細胞移入マウスへのマウス G・12 の免疫(dot blot 法による血中での特異抗体の検出)

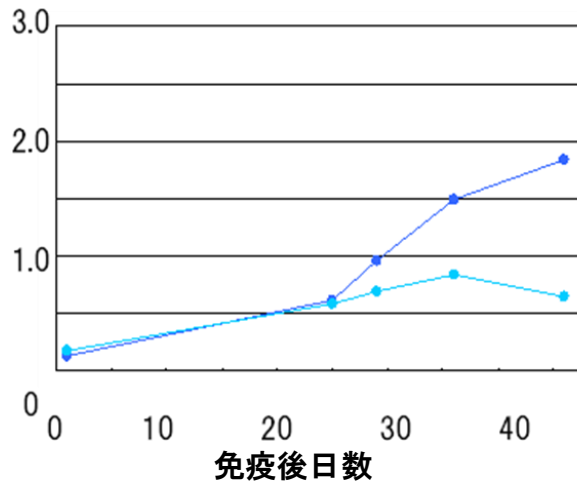


図 33 Treg 除去細胞移入マウスへのヒト膜蛋白グリピカン 3 の免疫 (ELISA による血中抗体価の測定結果)

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 CD40 を介するシグナル増強の抗体産生反応への効果の検討

CD40 は B 細胞や樹状細胞上に発現する膜蛋白質であり、活性化 T 細胞に発現する膜蛋白質 CD40 リガンドと相互作用することにより、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する共刺激分子として働く。このメカニズムを模倣するために、CD40 リガンドをディスプレイするバキュロウイルスと目的抗原膜蛋白質 ROBO1 ディスプレイバキュロウイルスをマウスに共免疫して、効果の検討を行った。

ROBO1 ディスプレイウイルスと CD40 リガンド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 B5209B は細胞上に発現する ROBO1 蛋白と結合した。B5209B は、ROBO1 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 ROBO1 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)

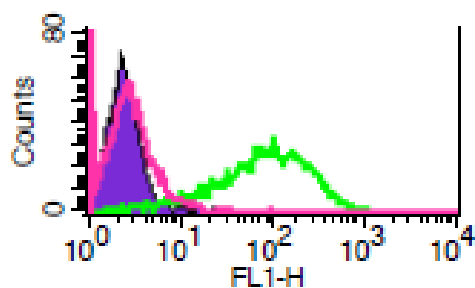


図 34 BCSM ディスプレイバキュロウイルスの B 細胞への特異的な結合

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 ELASA 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)。

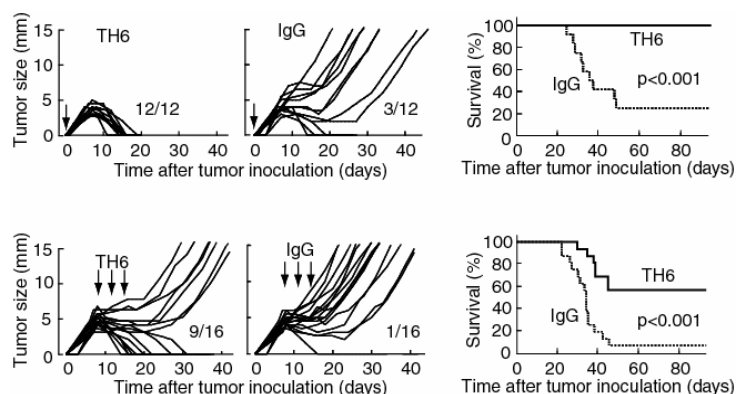


図 35 制御性 T 細胞除去による腫瘍免疫応答

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 っ 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)。

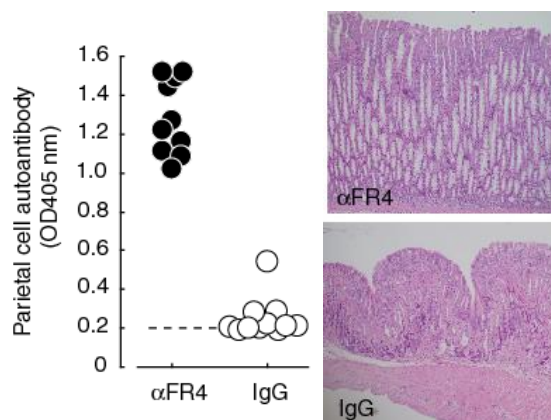


図 36 制御性 T 細胞除去による、抗胃壁抗体(自己抗体)産生と自己免疫性胃炎の発症

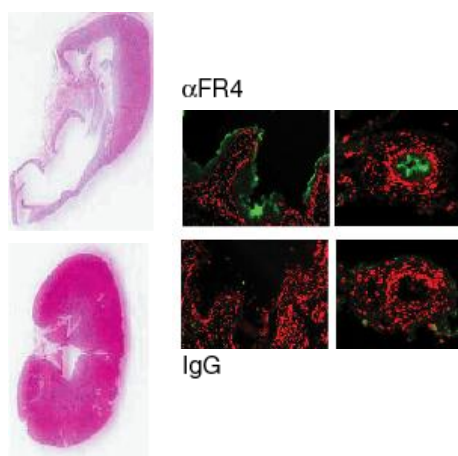


図 37 制御性 T 細胞除去抗体による水腎症の発症と膀胱尿管上皮に対する自己抗体の産生

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。

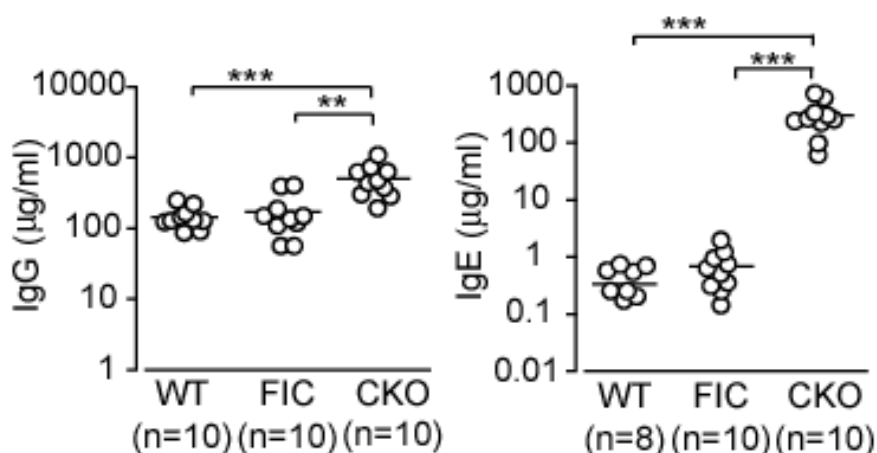


図 38 制御性 T 細胞特異的 CTLA-4 欠損マウス(CKO)マウスでの血清中の IgG、IgE 抗体価。

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。

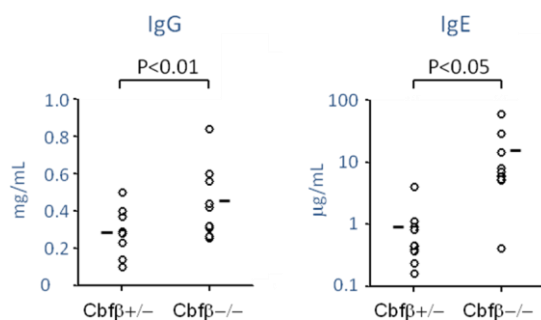


図 39 制御性 T 細胞特異的 CBFbeta 欠損マウスでの血清中の IgG、IgE 抗体価。

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。

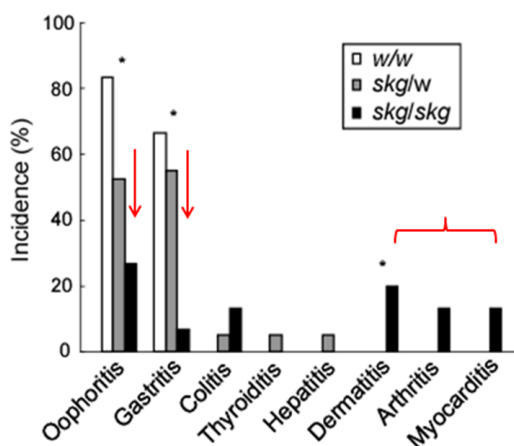


図 40 SKG マウス (*skg*) および正常マウス (*w*) から制御性 T 細胞を除去することにより誘導される自己免疫病

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)

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(PRD)と名付けた。

表 4 リボソームディスプレイ法の比較

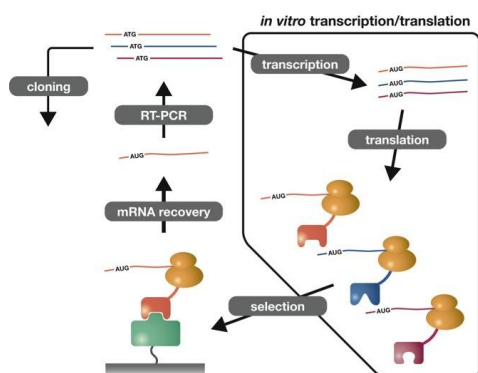


図 41 リボソームディスプレイ法

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。

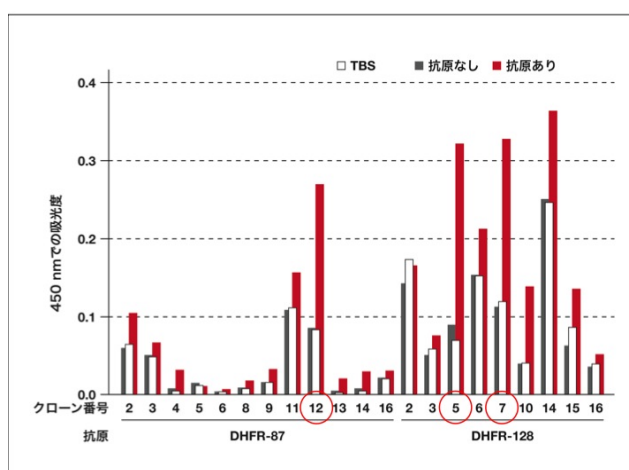


図 42 リボソームディスプレイで選択した scFv クローンの ELISA

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。

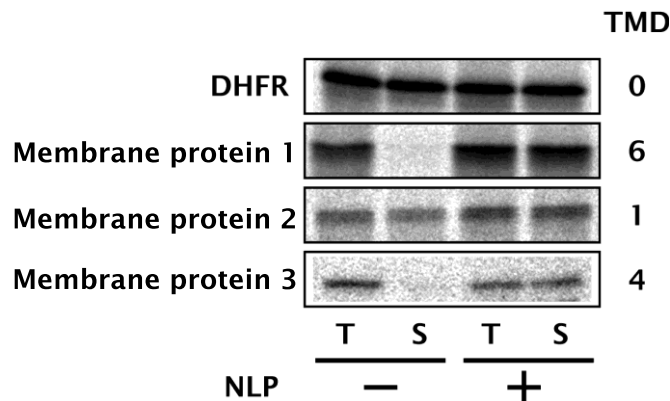


図 43 NLP を使用した膜タンパク質の合成 T:合成後、S:遠心後の上清

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。

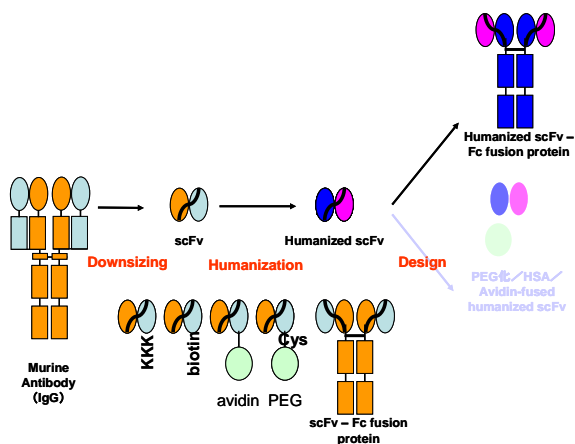


図 44 改変抗体構築のプラットフォーム
現時点までに完成しているものを示した。

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 Tm 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。

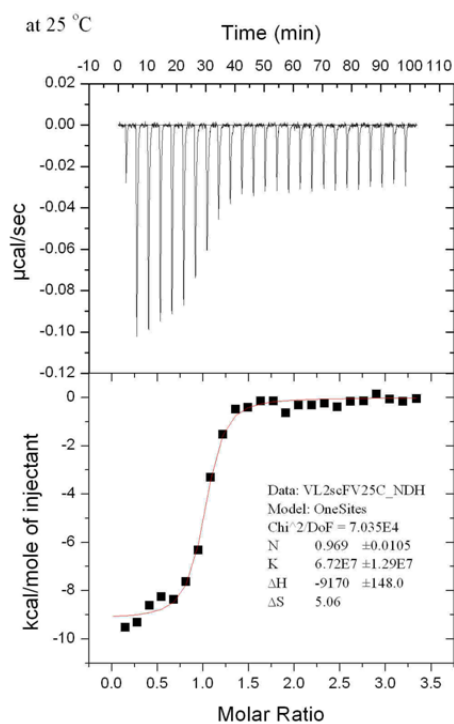


図 45 scFv の等温滴定型熱量測定
25°Cにおけるプロファイルを示した。上は生データ、下は得られた滴定曲線。

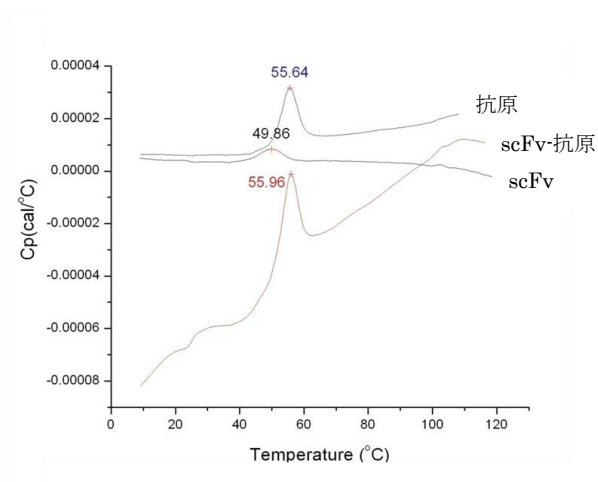


図 46 示差走査型熱量測定
抗原存在下で T_m が 6°C 上昇している。

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)。

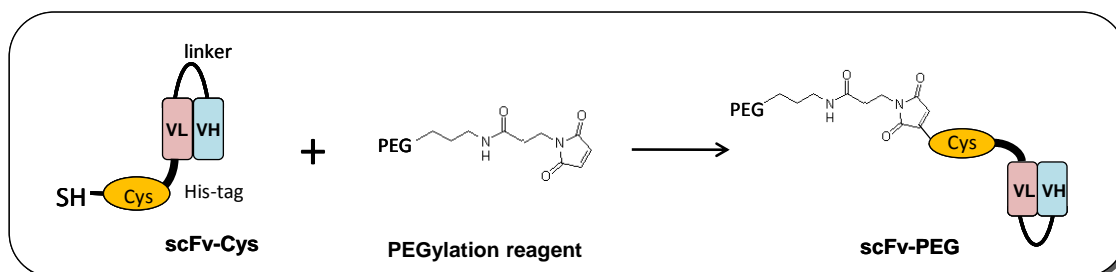


図 47 scFv の PEG 化：scFv の C 末端に Cys を導入し、マレイミドへの求核反応で共有結合させる。

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* で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。

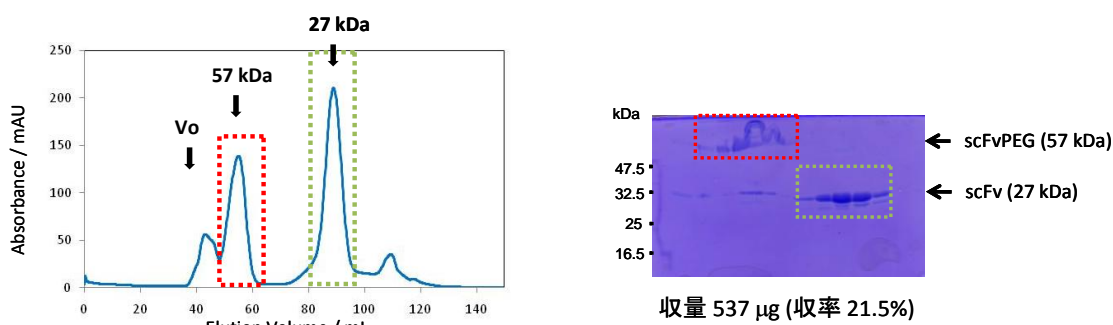


図 48 PEG 化反応後の scFv のゲルろ過による分析。左はクロマトグラム、右は左図で囲ってある溶出画分の SDS-PAGE の結果を示す。

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-SAc core を構築した。更に、抗原性の低下を目的として、SA core 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-SAc core(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。

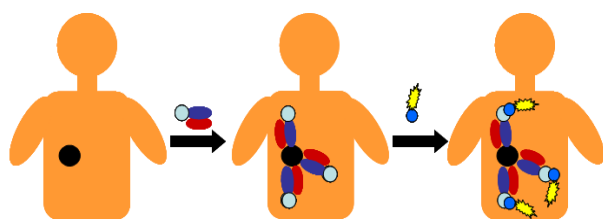


図 49 プレターゲティング法の模式

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

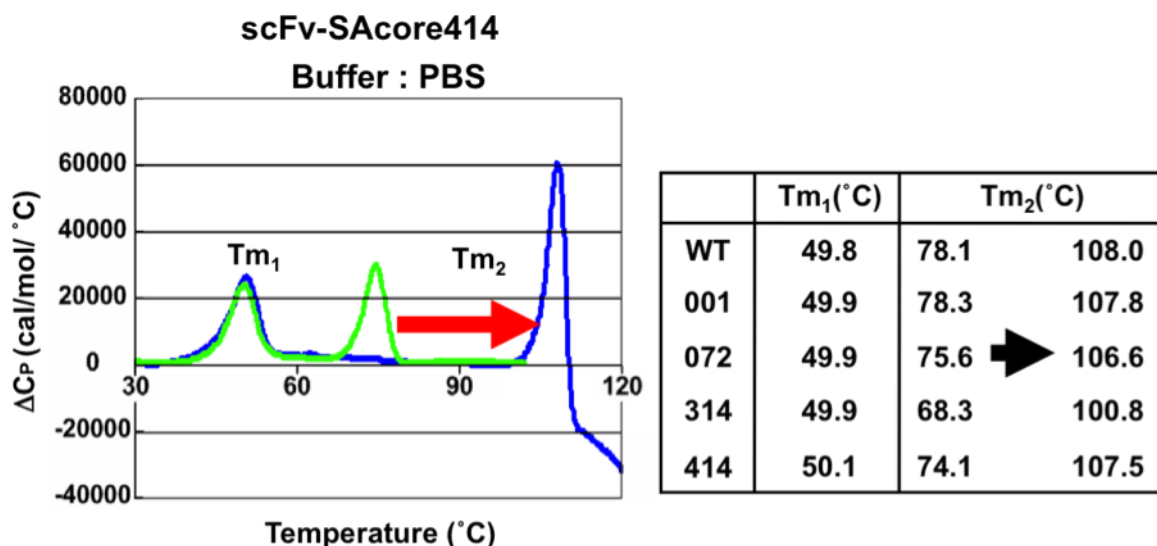


図 50 変異体 414 を融合させた scFv-SAcore414 の DSC を用いた解析

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。

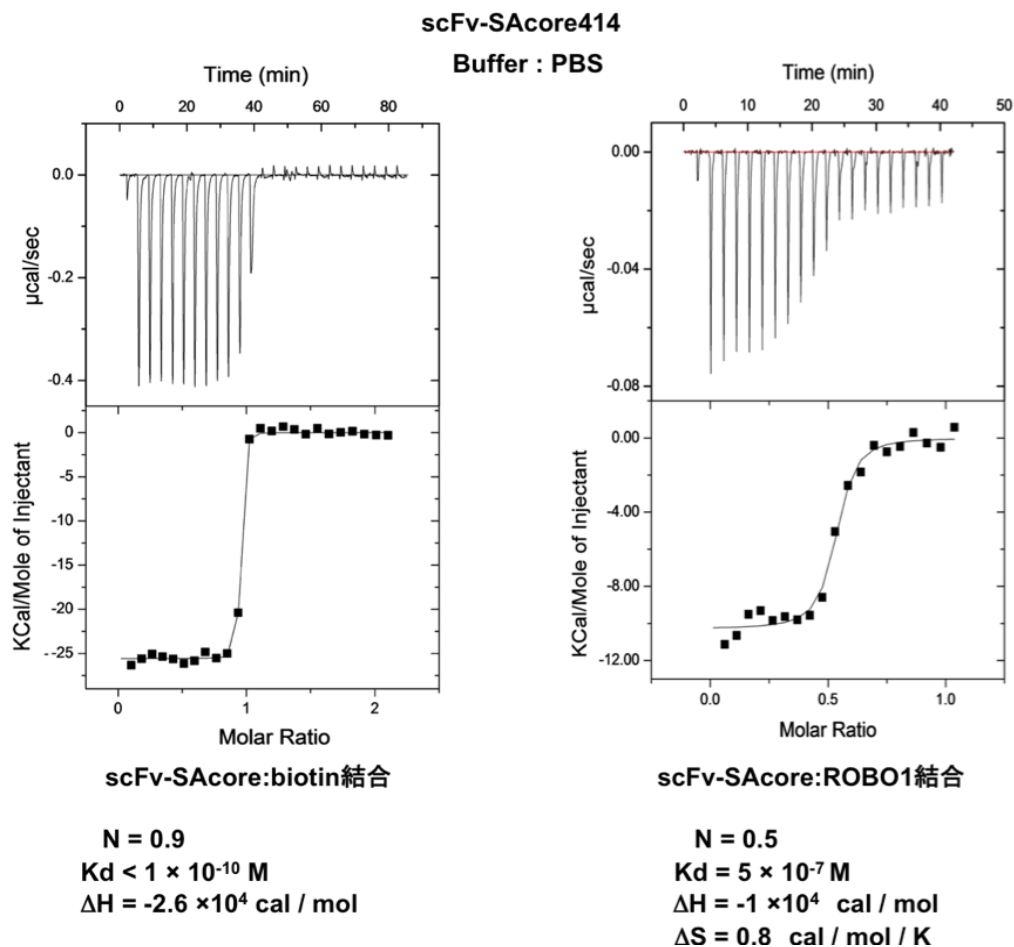


図 51 ITC による scFv-SAcore 変異体とビオチン、ならびに抗原(ROBO1)との相互作用解析。25°C、PBS 条件下での結果を示した。左から、ビオチンは 4 結合できること、その親和性がきわめて高いこと、右から、抗原は 1 分子あたり 2 分子結合できることが分かる。

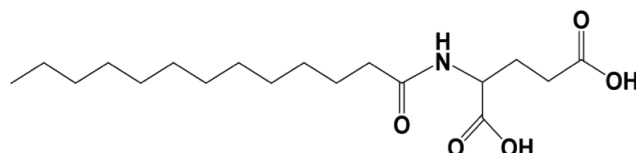
E) ヒト型化抗体(scFv ならびに scFv-Fc)の発現系構築

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

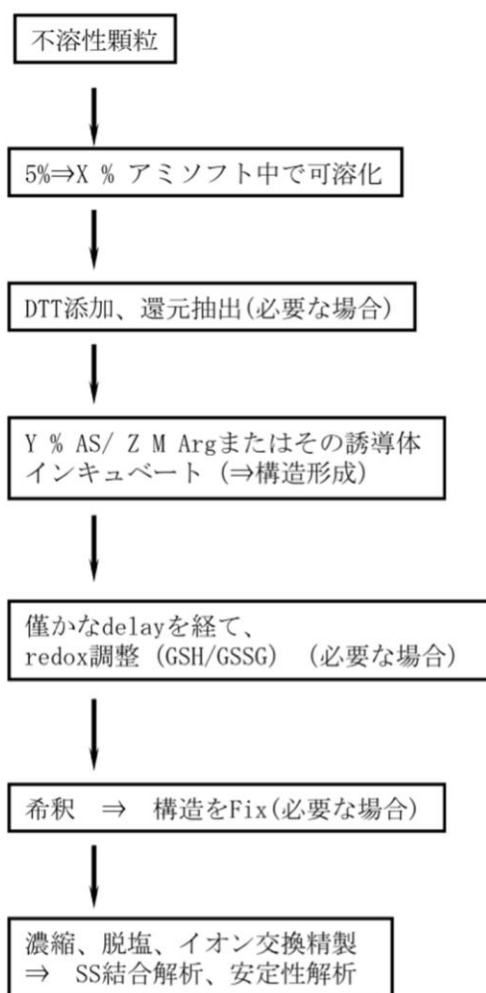


図 53 C12-Glu(アミソフト)を用いた組換え蛋白質の巻き戻し方法

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。

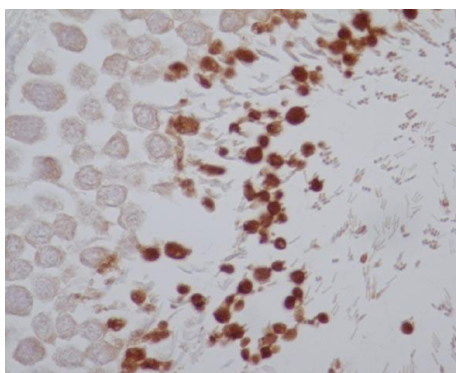


図 54 免疫組織染色(ラット精細胞細胞質)

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。

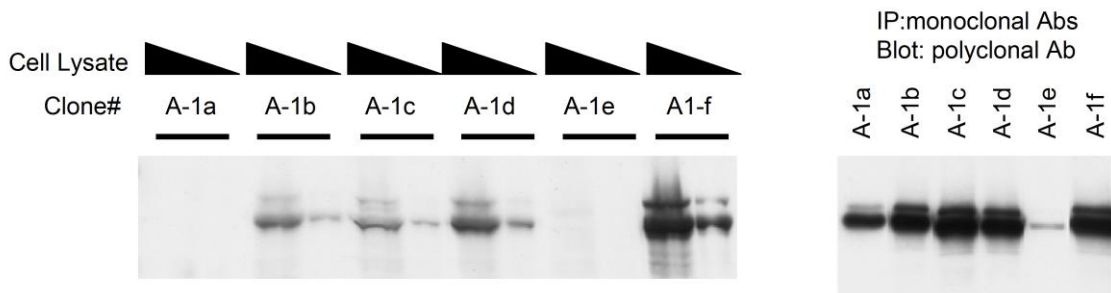


図 55 APE 抗体の免疫染色(Hela cell)

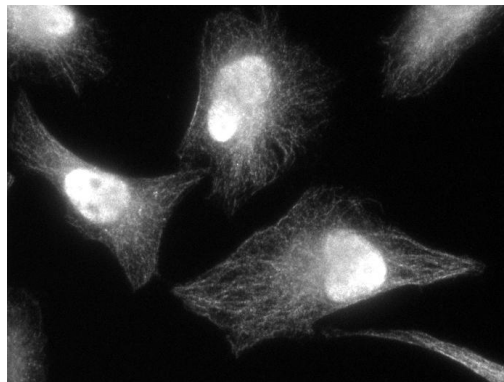


図 56 APE 抗体の免疫染色による評価(HeLa cell)

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。

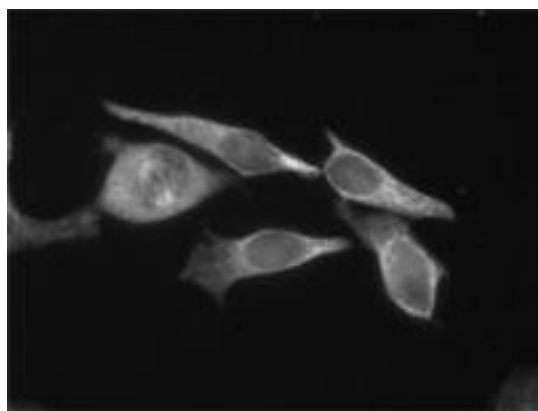


図 57 APE は M 期に分裂期微小管へ局在する

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。

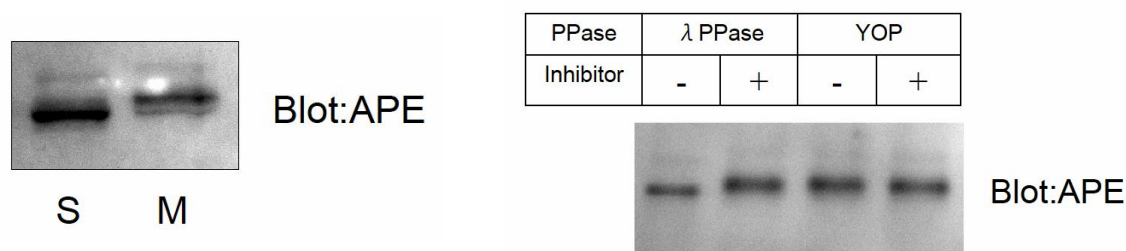


図 58 APE は M 期にリン酸化される

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。

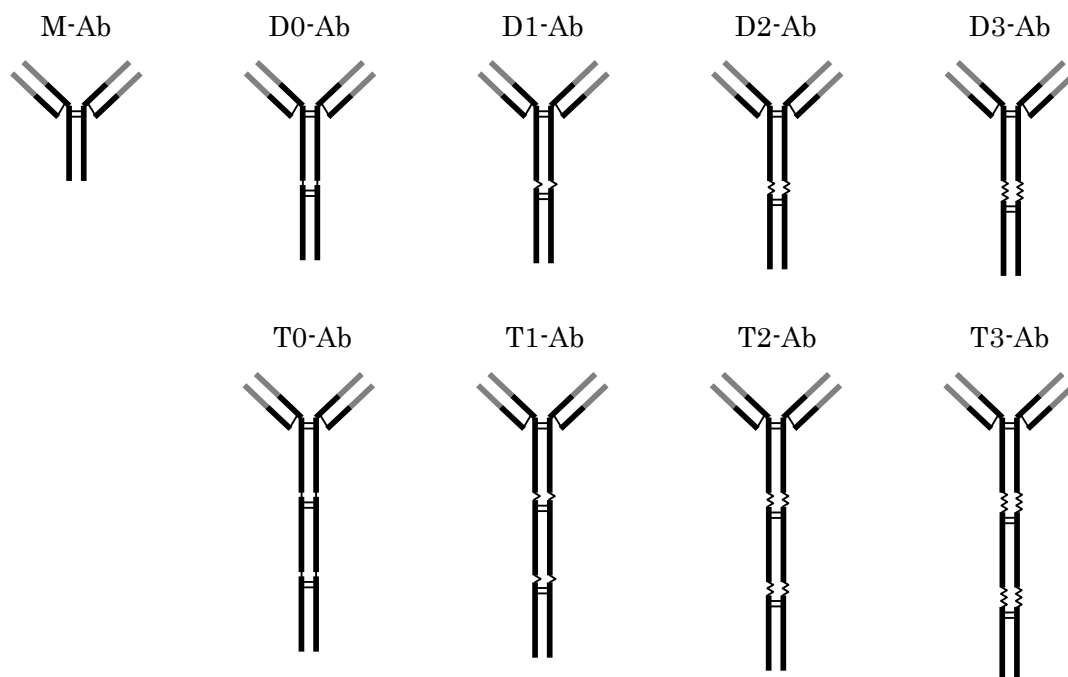


図 59 作製したタンデム Fc 型超活性抗体の模式図

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。

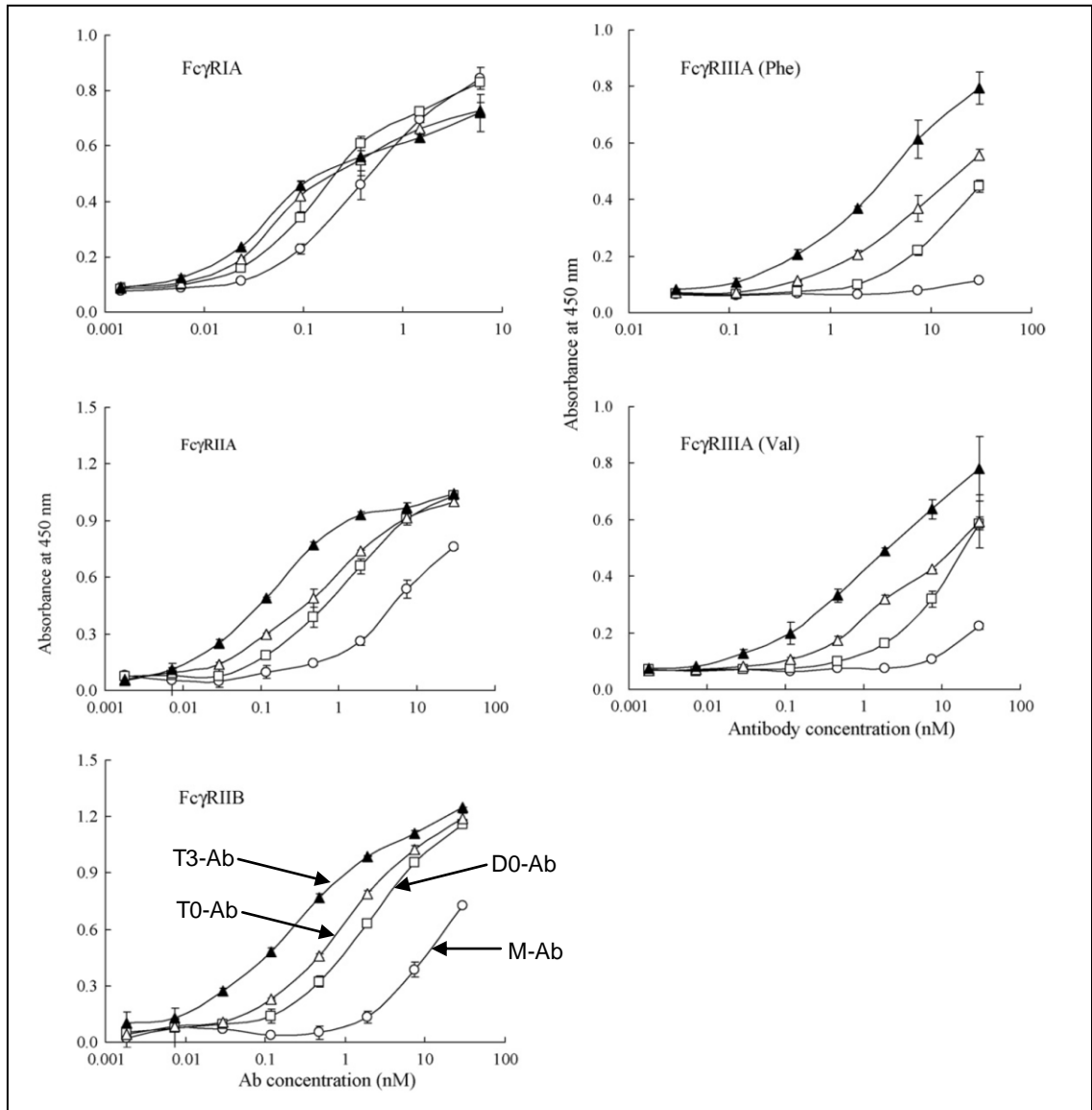


図 60 タンデム Fc 型改変抗体の Fc γ 受容体への結合親和性比較

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。

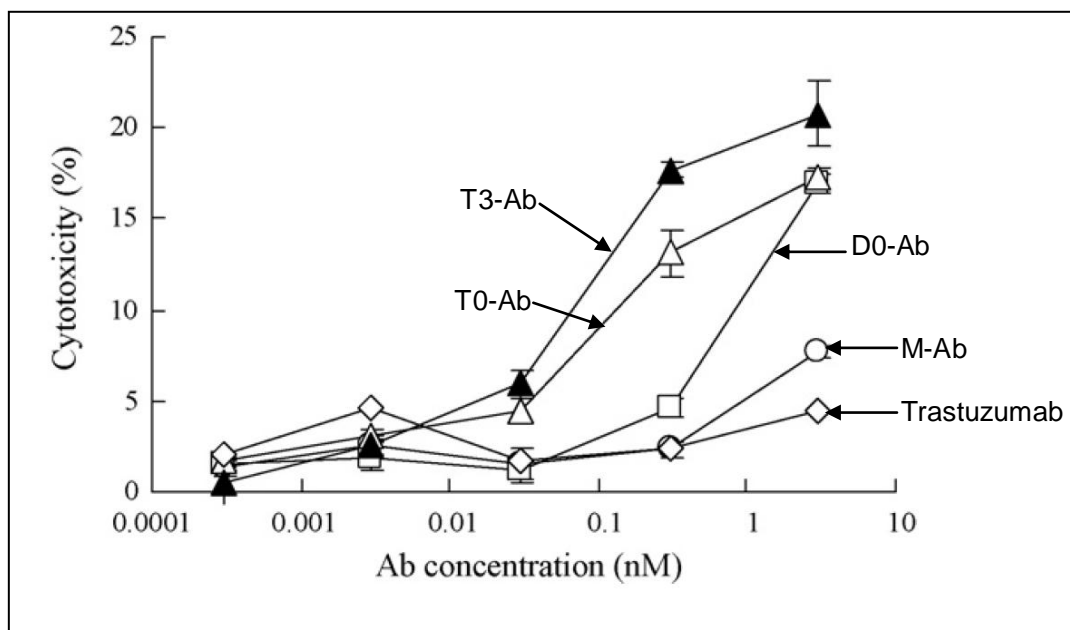


図 61 タンデム Fc 型改変抗体の ADCC 活性

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。

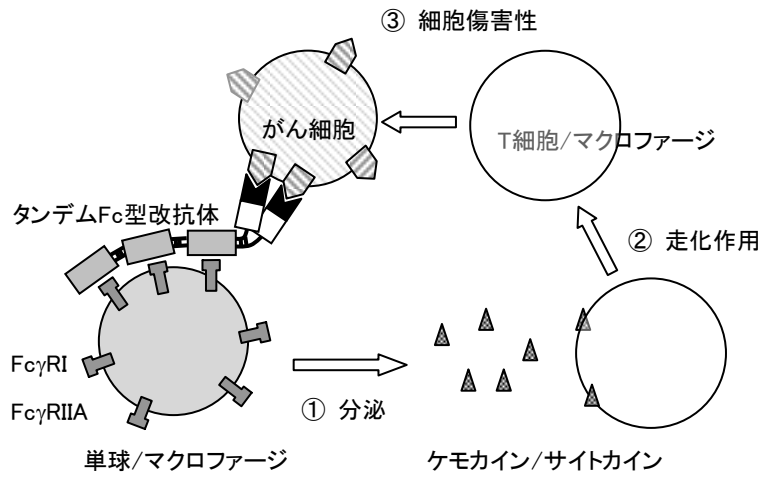


図 62 抗体依存性サイトカイン分泌作用

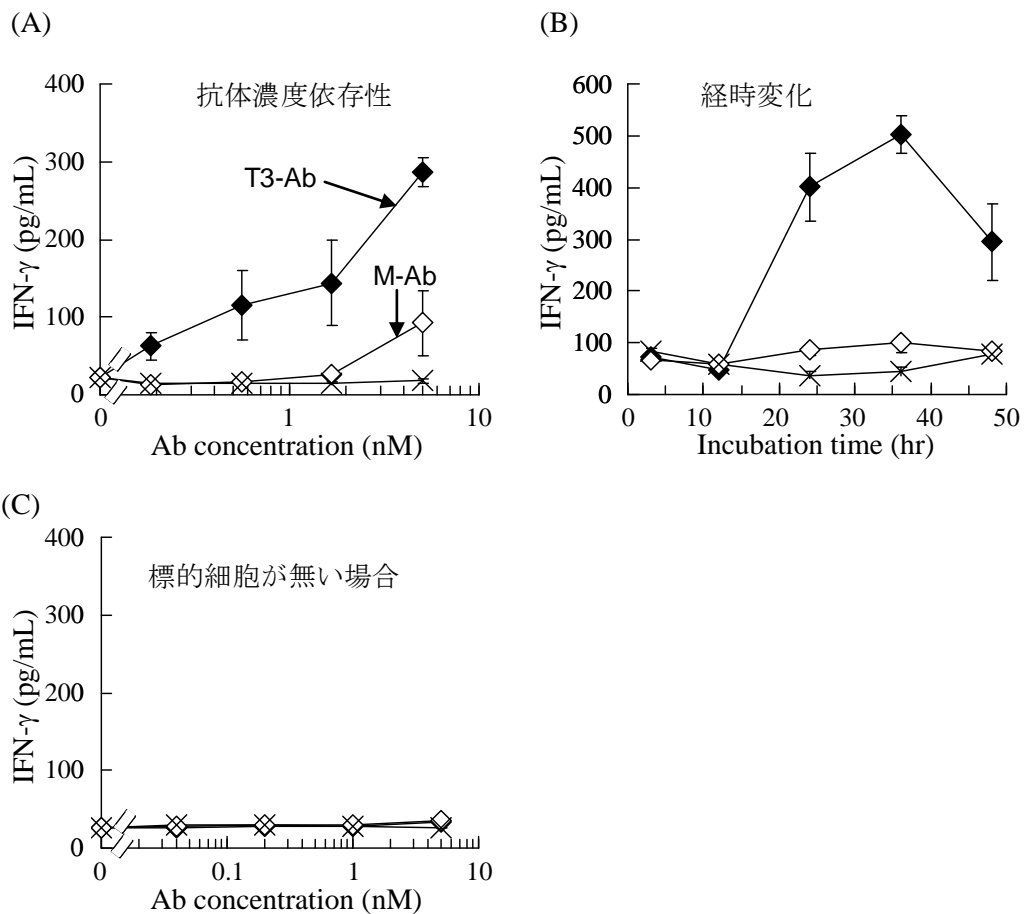


図63 抗体依存性サイトカイン分泌作用

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。25 L の培養上清から 5 mg の T3-Ab を得た。また、20 L の培養上清から 1.5 mg 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。

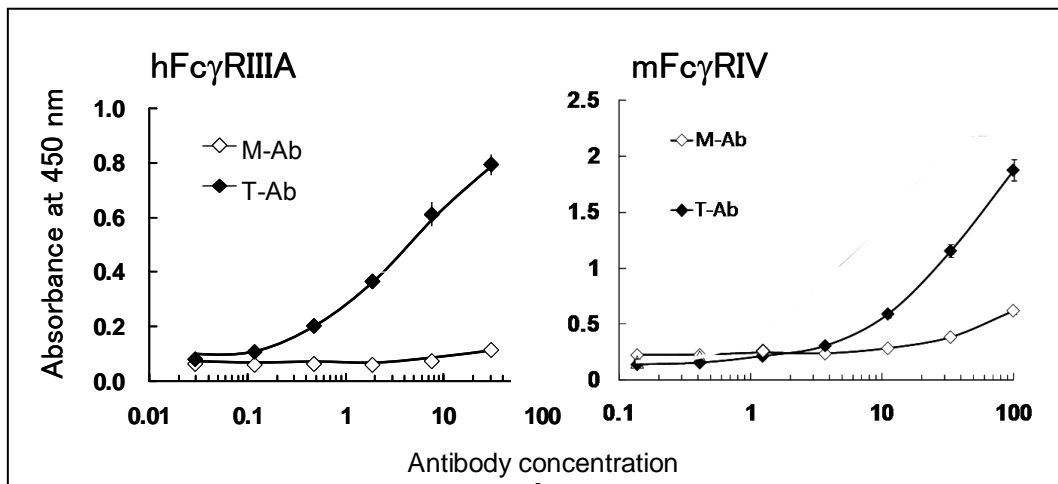


図 64 タンデム Fc 型改変抗体のマウス FcγRIV への結合親和性

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。

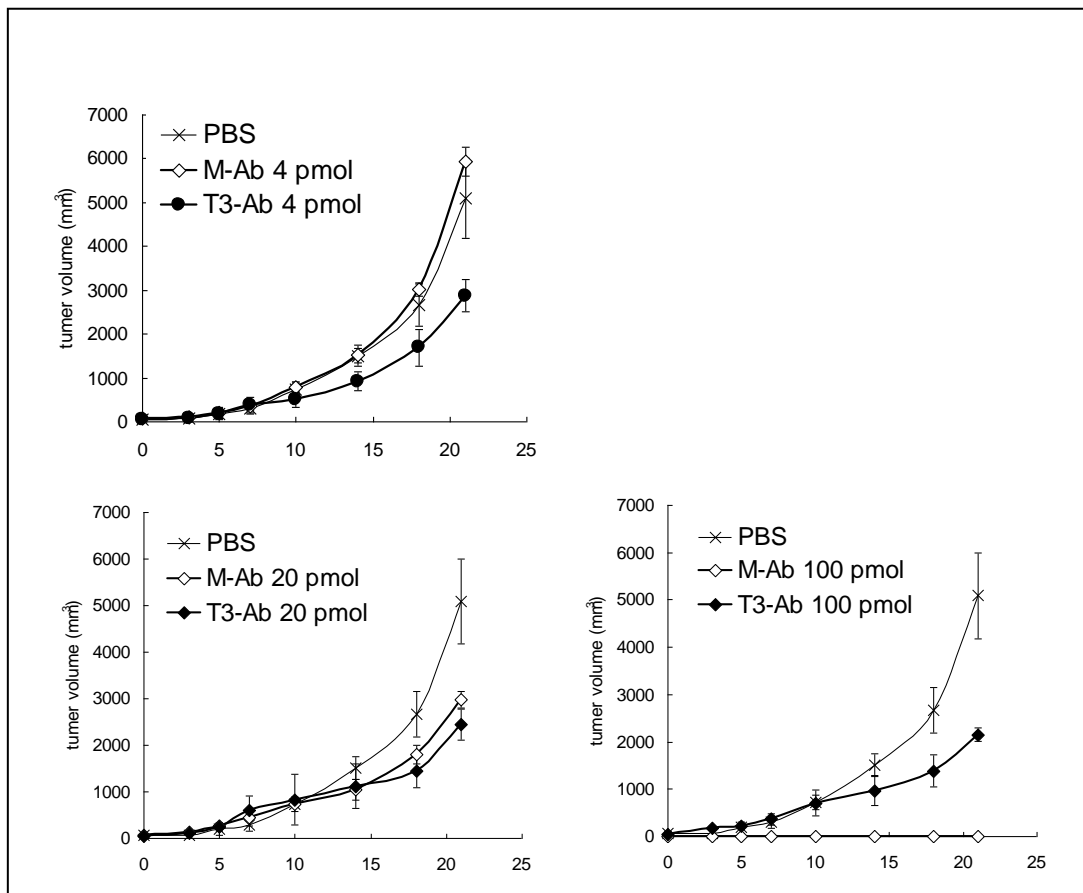


図 65 ヒト Raji 細胞を接種した担がん SCID マウスにおける T3-Ab と M-Ab の制がん活性

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(TNFRII-Fc-Fc)の開発

TNFRII-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) TNFRII-Fc-Fc の cDNA コンストラクト

TNFRII-Fc と TNFRII-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。TNFRII 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。TNFRII-Fc-Fc を構築するために、タンデムに連結した Fc の cDNA を TNFRII 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) TNFRII-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、TNFRII-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、TNFRII-Fc-Fc (200kDa)および TNFRII-Fc-Fc (80kDa)と略す。

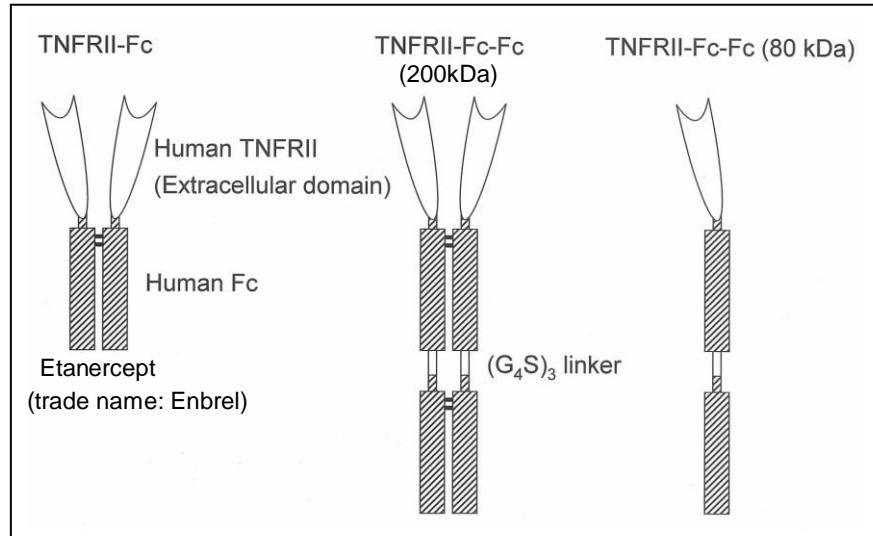


図 66 TNFRII-Fc-Fc の構造 200kDa と 80kDa とが存在した。

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)。

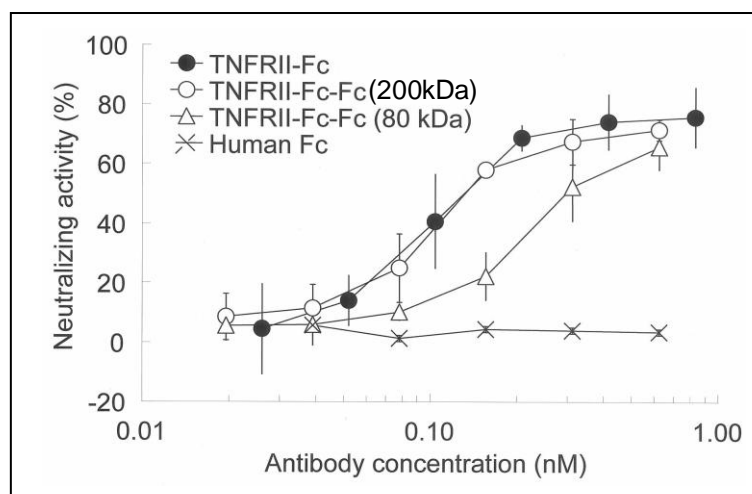


図 67 TNFRII-Fc-Fc の TNF α 中和活性

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。

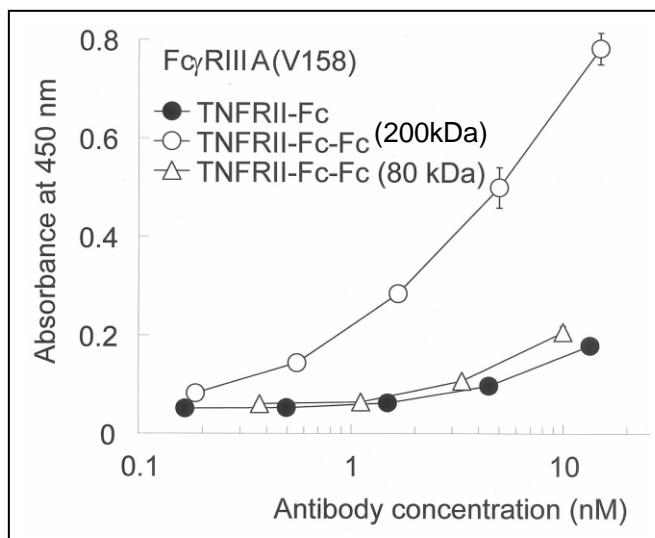


図 68 TNFRII-Fc-Fc の Fc γ Rs への結合親和性

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。

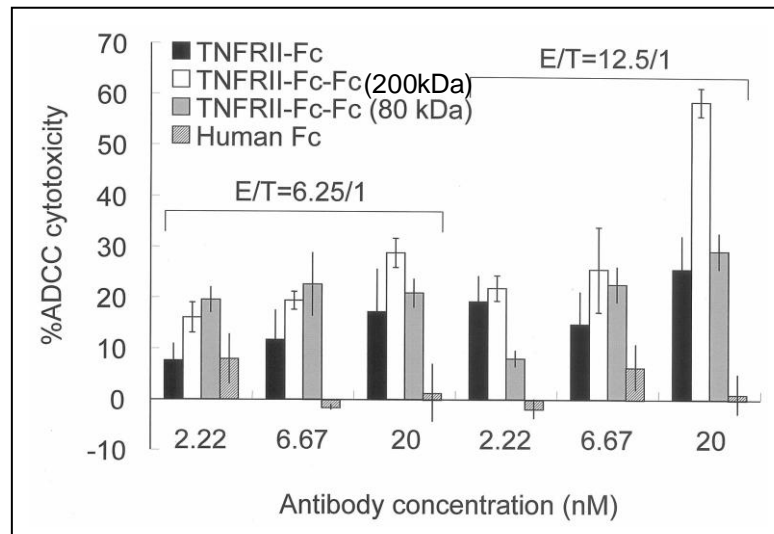


図 69 TNF α 発現細胞に対する TNFRII-Fc-Fc の ADCC 活性

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。

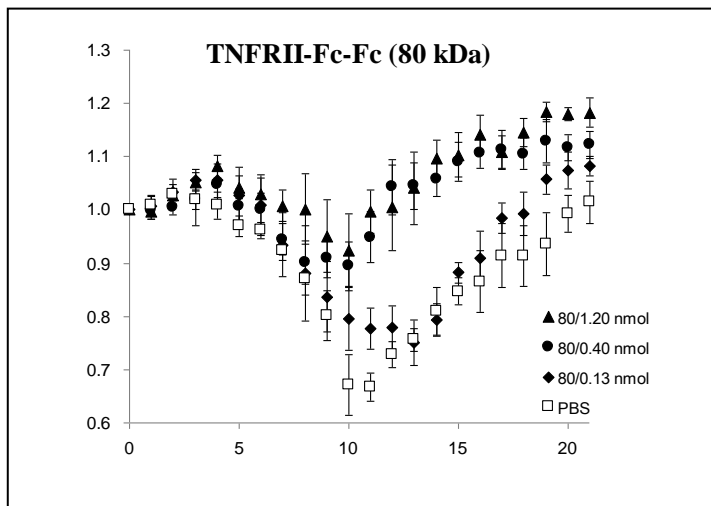
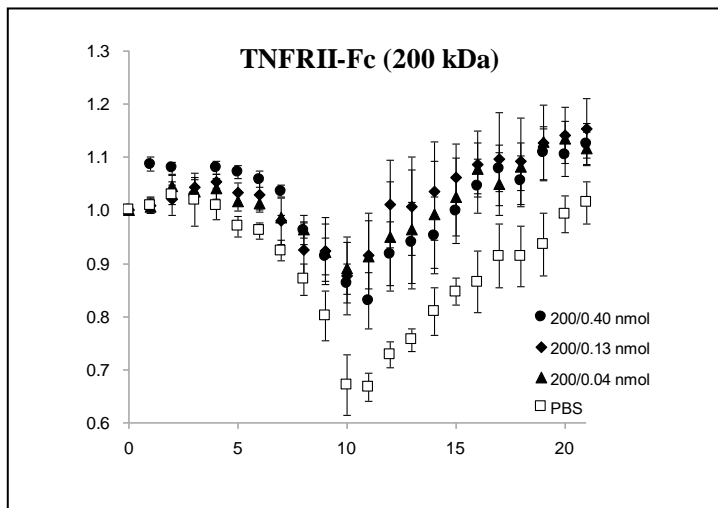
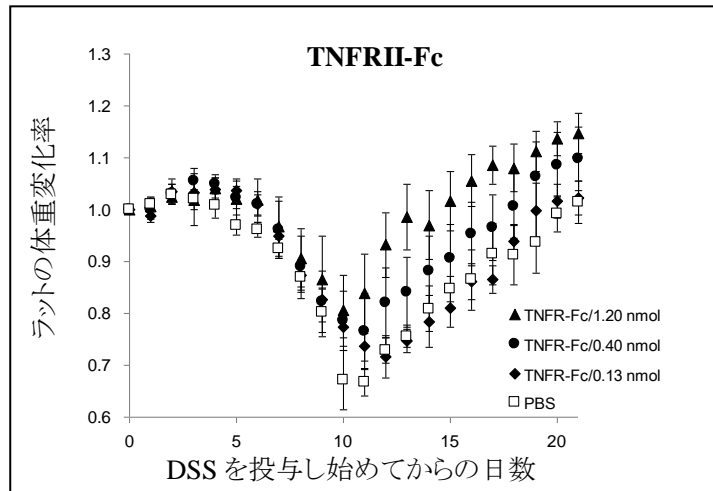


図 70 DSS 大腸炎マウスモデルにおける TNFRII-Fc-Fc の治療効果

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)。

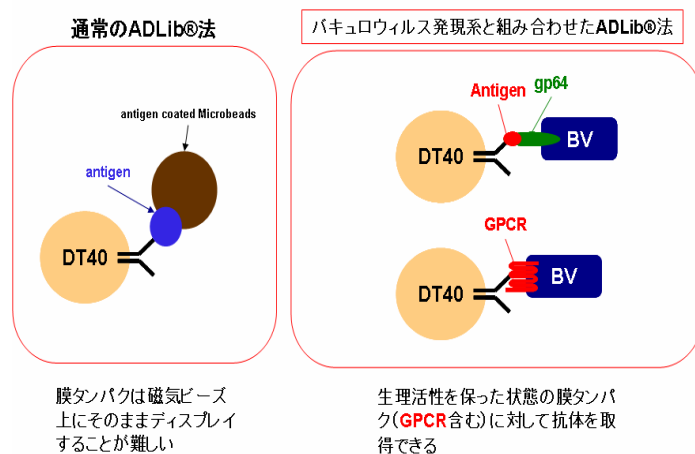


図 71 発芽バキュロウイルス発現法と ADLib®法

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。

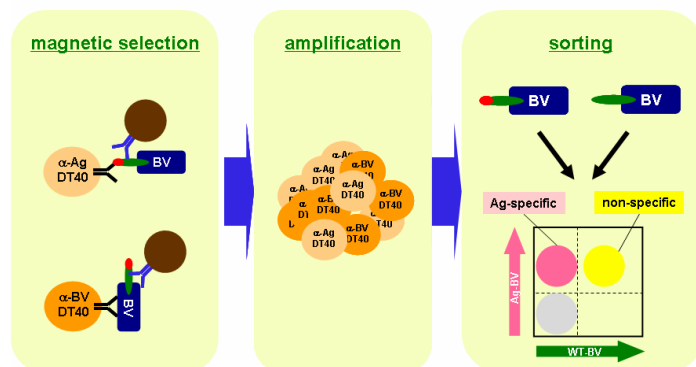


図 72 磁気ビーズとセルソーティングの組み合わせによる新しいスクリーニング方法

B)gp64 フェ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 フェ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と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。

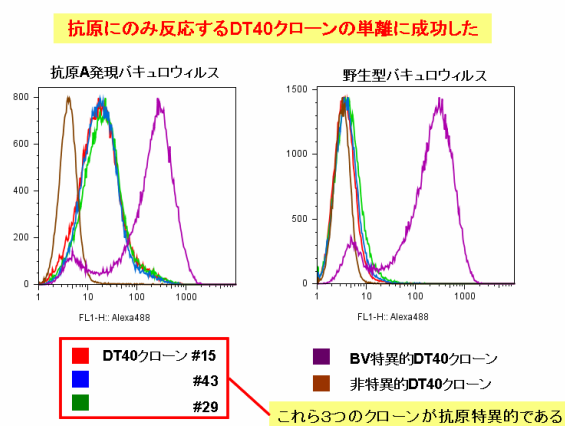


図 73 抗原 BV 特異的細胞の検出、単離

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

ユロウィ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ィルスのみ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ィルスに対して選択的に結合することが明らかとなった。

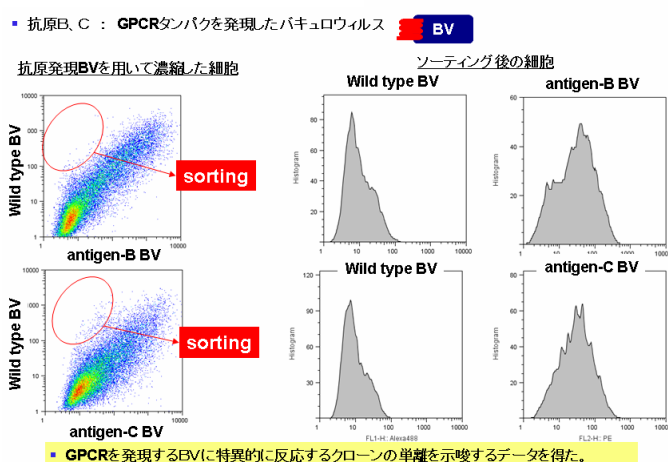


図 74 GPCR 発現バキュロウィルスを用いた実験

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、バキュロウィ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。

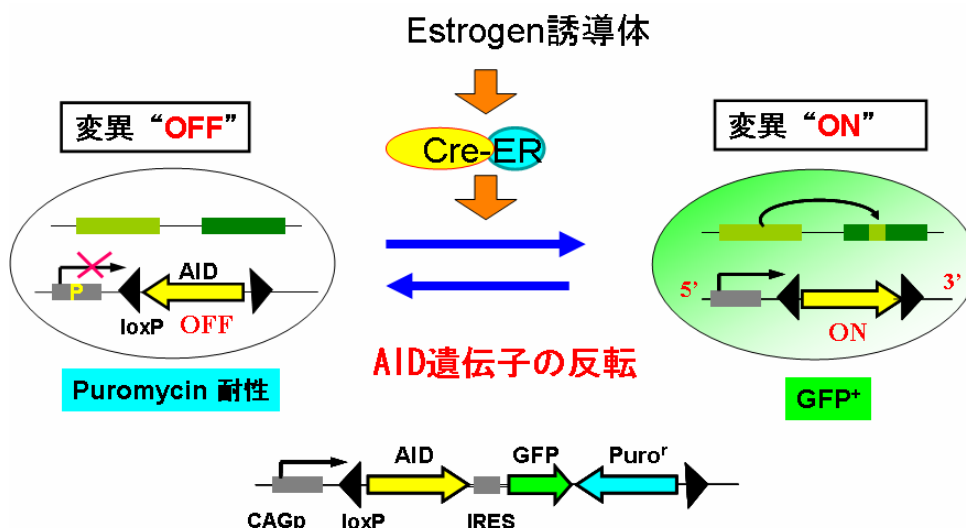


図75 変異機能のON/OFF制御可能な細胞株DT40-SW

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制御が可能で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)。

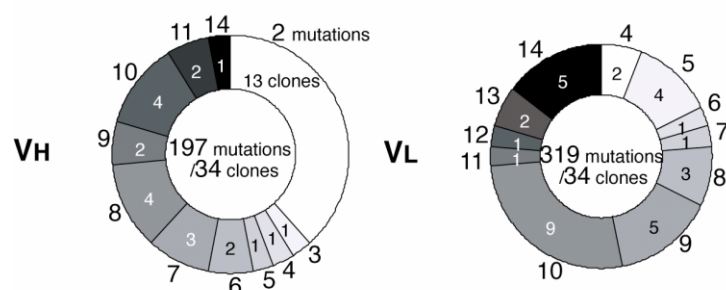


図76 DT40-SWライブラリーの抗体可変部の多様性の確認

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。

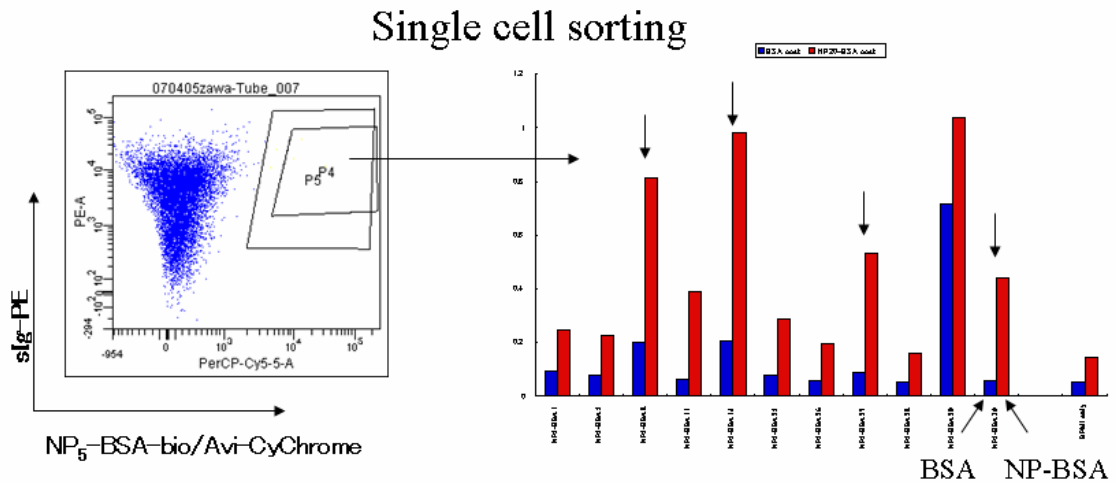


図 77 DT40-SW ライブラリーからのセルソーターによる抗 NP クローンの単離
(左図の P4 区画から単一細胞を単離し、培養後 ELISA で特異性を確認(右図))。

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。

抗NP抗体

NP-BSA-biotin

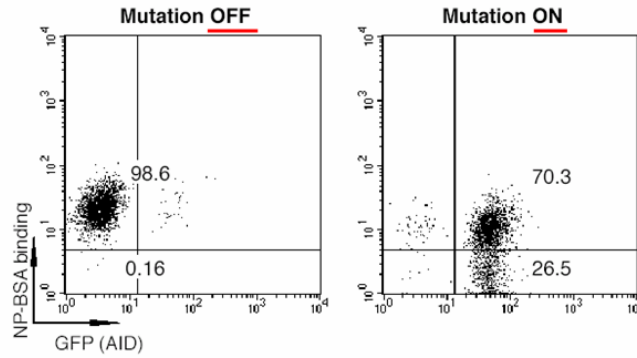
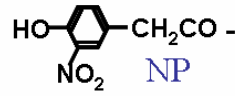


図 78 変異機能の停止による単離された抗体産生細胞の抗原特異性の安定化

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)。

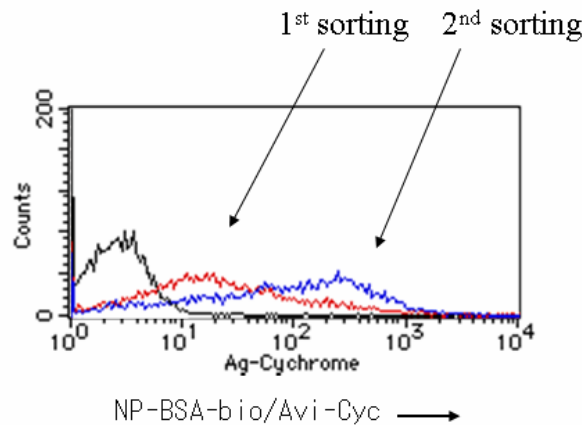


図 79 抗 NP 抗体産生クローンの親和性成熟

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。

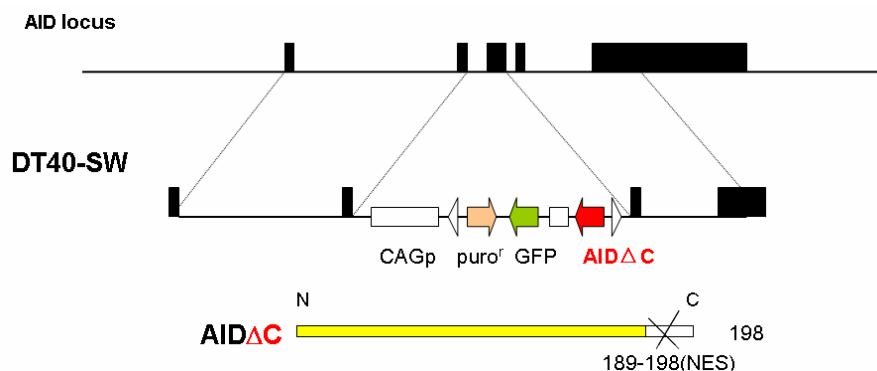


図80 DT40-SW-ΔC株の樹立

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。

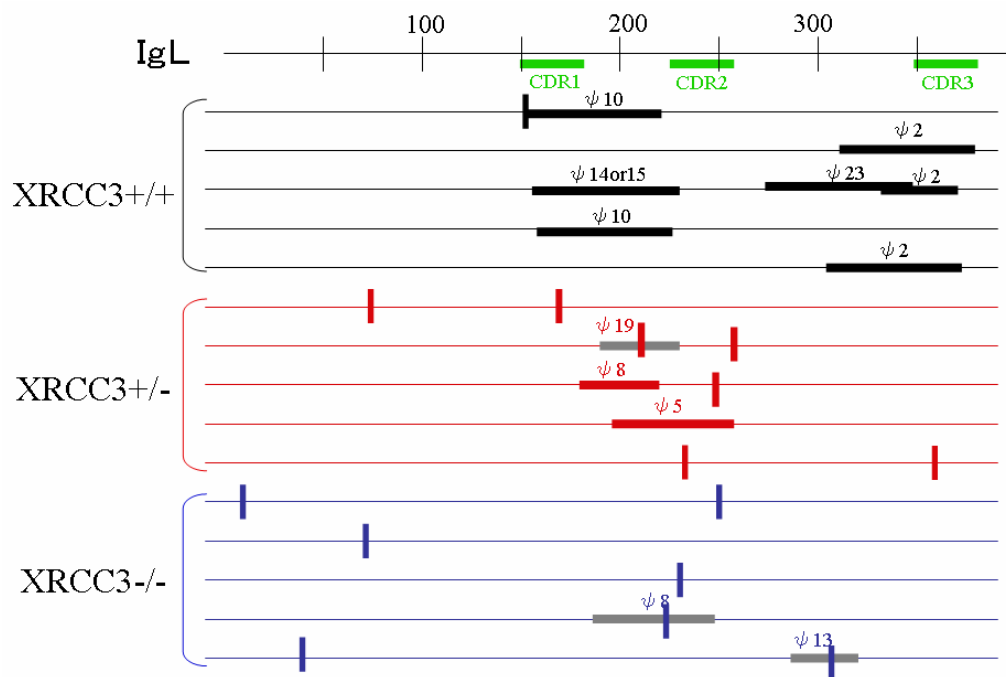


図 81 XRCC3 ノックアウト株における遺伝子変換型から点突然変異型への転換 (縦の短い線が点突然変異を示す)。

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。

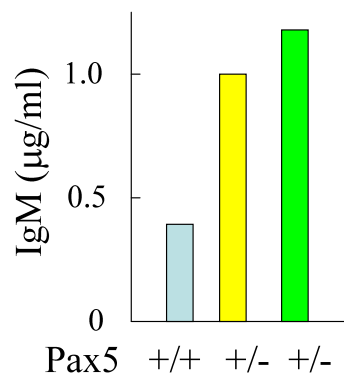


図 82 Pax5 遺伝子を部分的に破壊することによる抗体産生能の増強

<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 ($K_d=180\text{nM}$)から K_d 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。

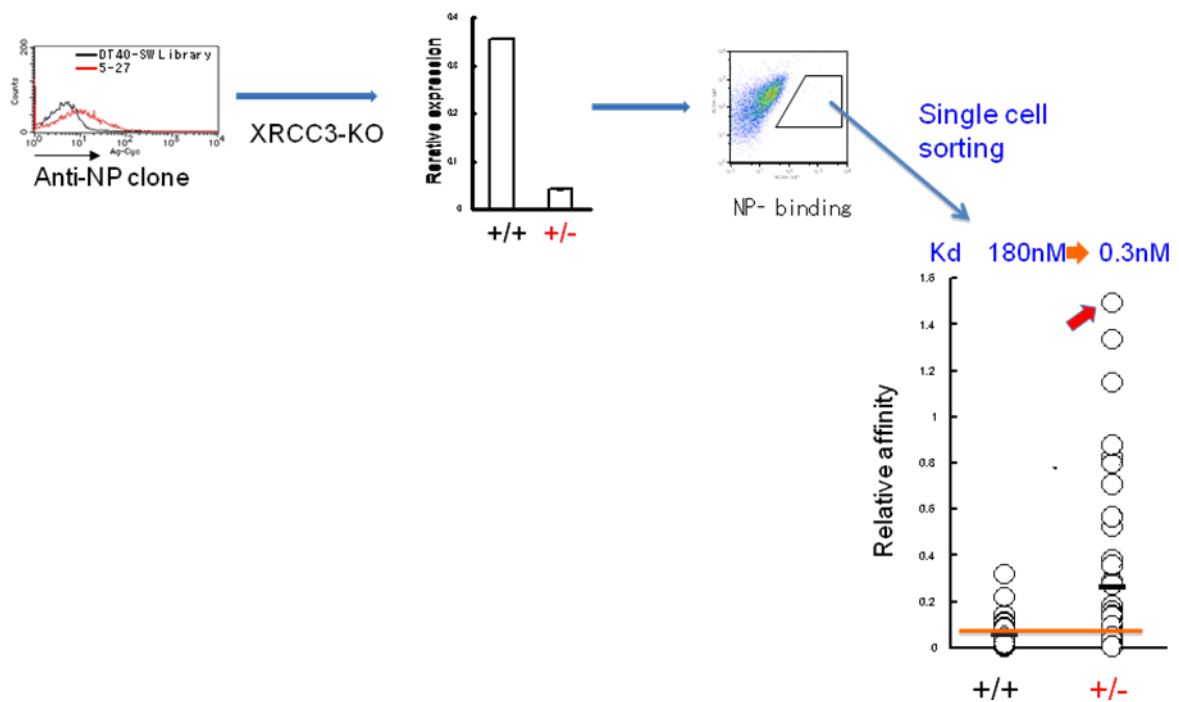


図 83 XRCC3(+/-)株における効率的親和性成熟の実証

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)。

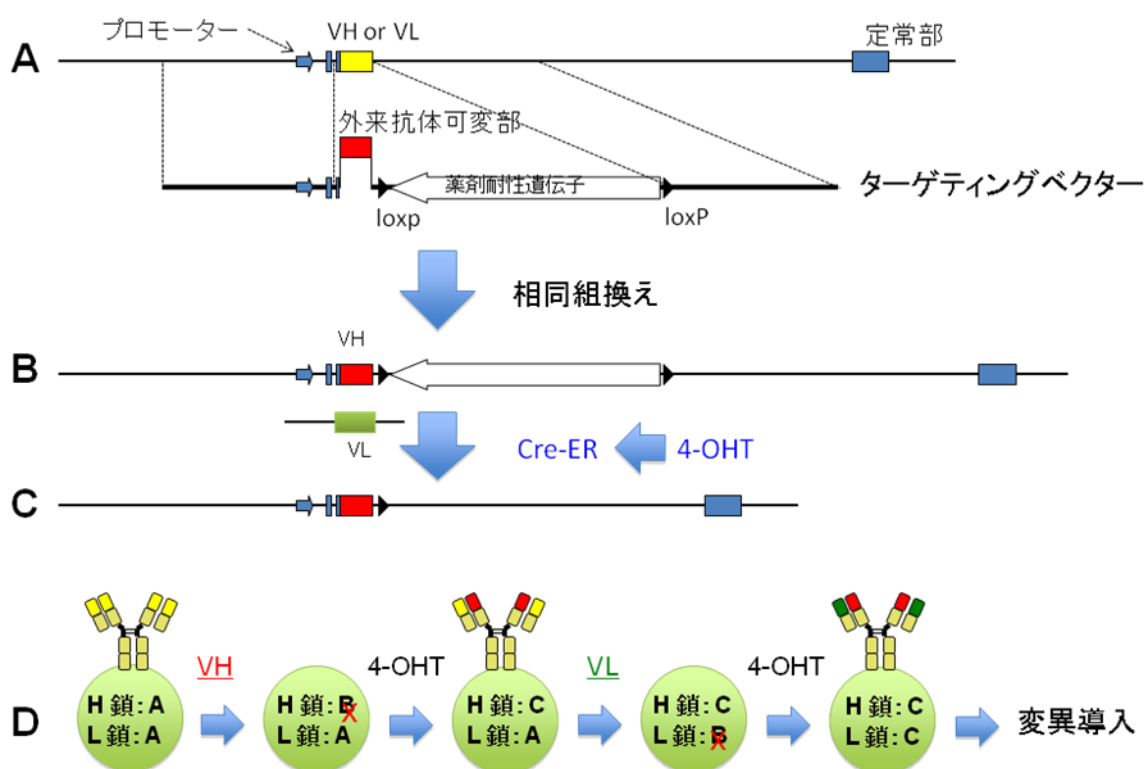


図 84 DT40-SW 細胞への外来 VH、VL 導入システムの確立

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-ニワトリキメラ抗体として、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)。

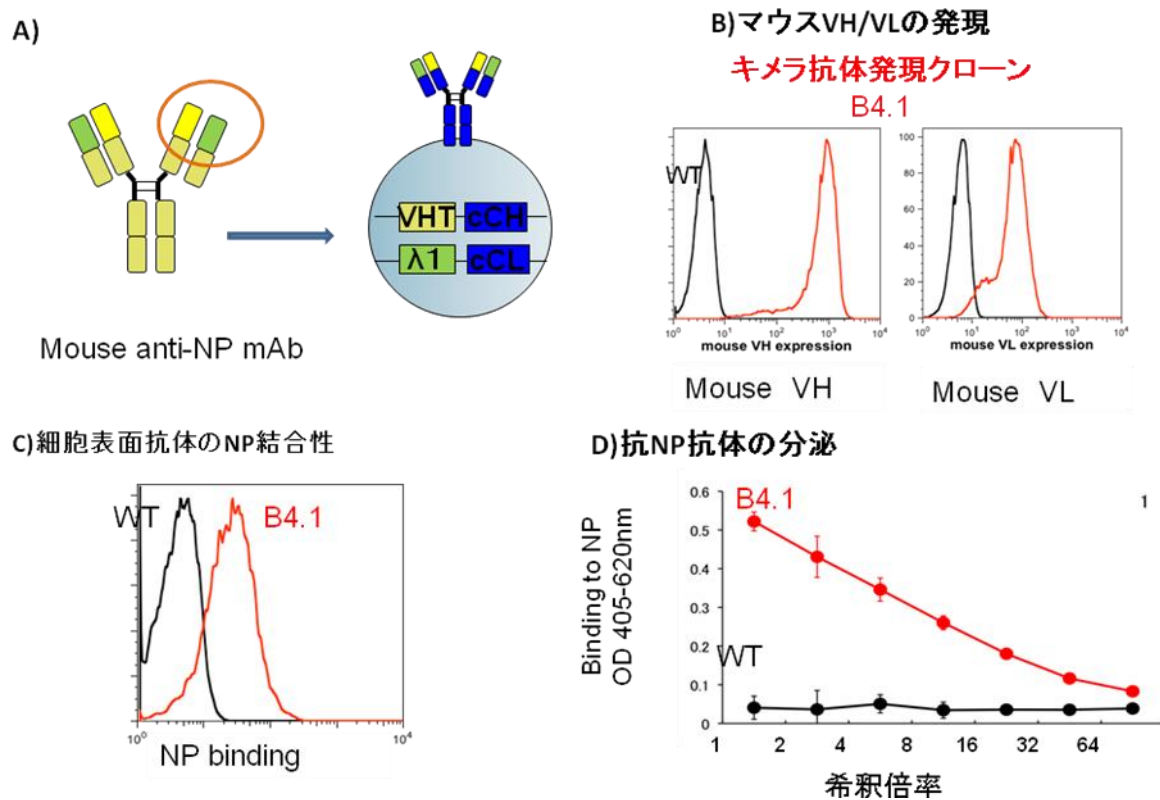


図 85 マウスの VH、VL 遺伝子の DT40-SW への導入とキメラ抗体としての発現。

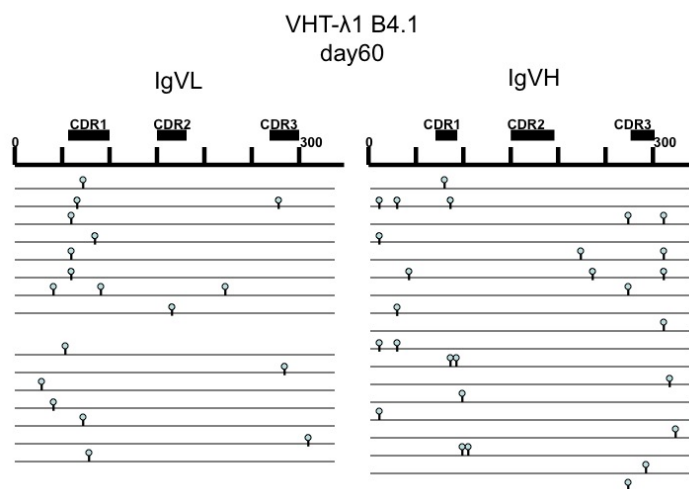


図 86 キメラ抗体の可変部遺伝子への変異導入の確認。

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。

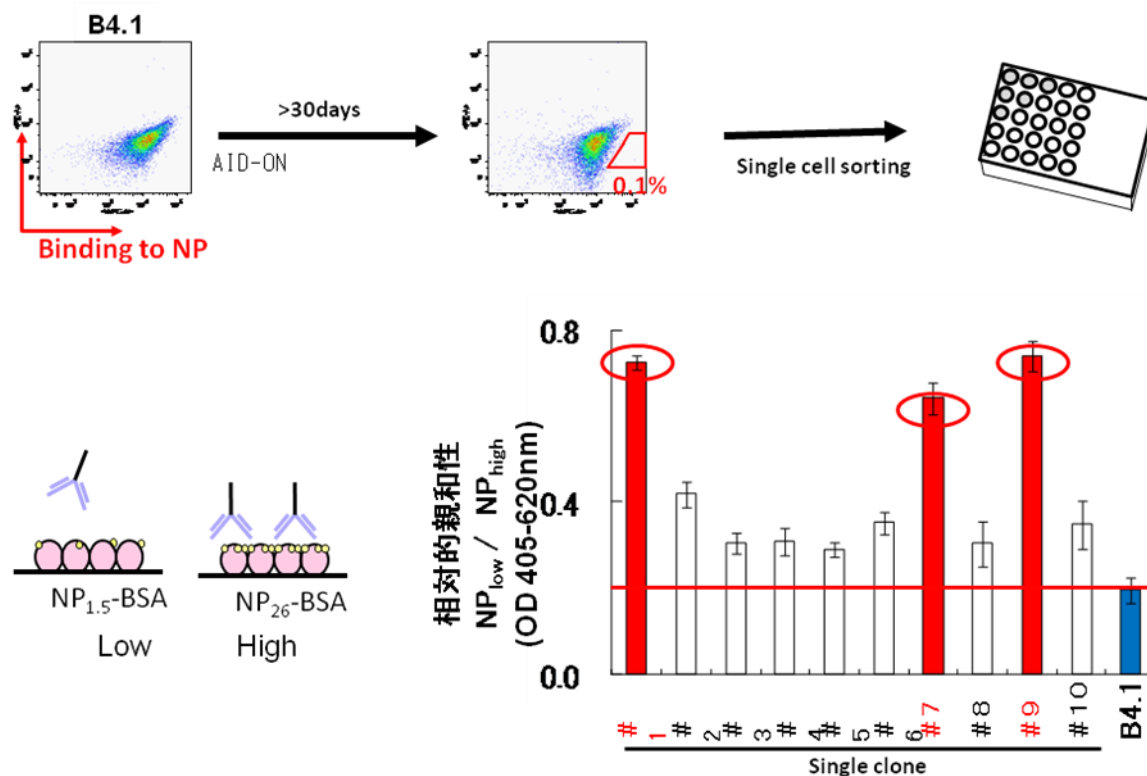


図 87 DT40-SW に導入した異種抗体の親和性成熟の実証。

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

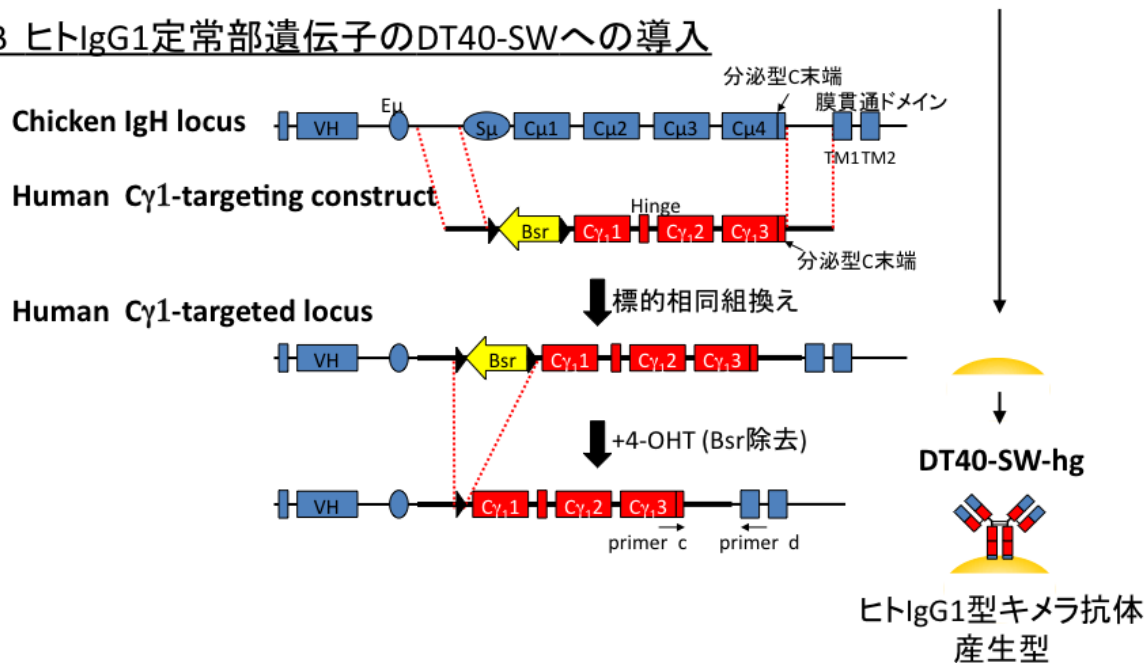


図 88 ヒト型抗体産生 DT40-SW 株の樹立。

ヒト型DT40-SWシステム

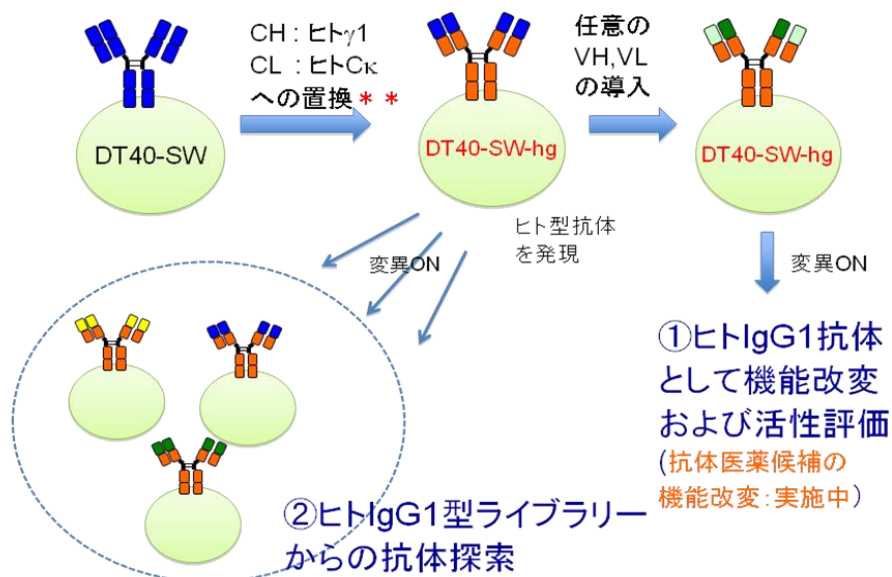


図 89 ヒト型抗体を産生する DT40-SW-hg 株による抗体作製と異種抗体の機能改変

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与え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参与していた。

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、ユーイング肉腫 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)。

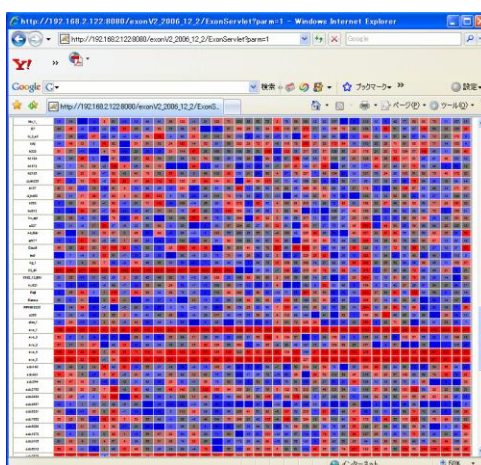


図 90 エクソンアレイを用いて得られた発現データ

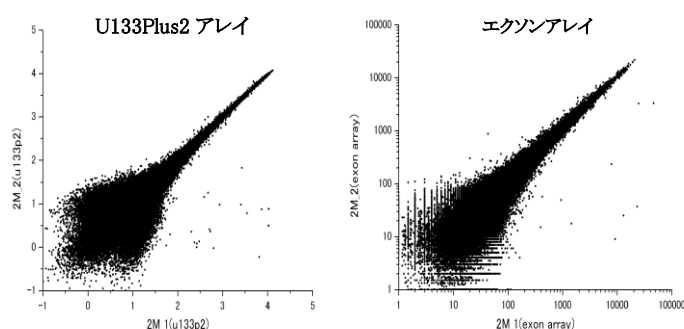


図 91 アレイデータの再現性

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)。

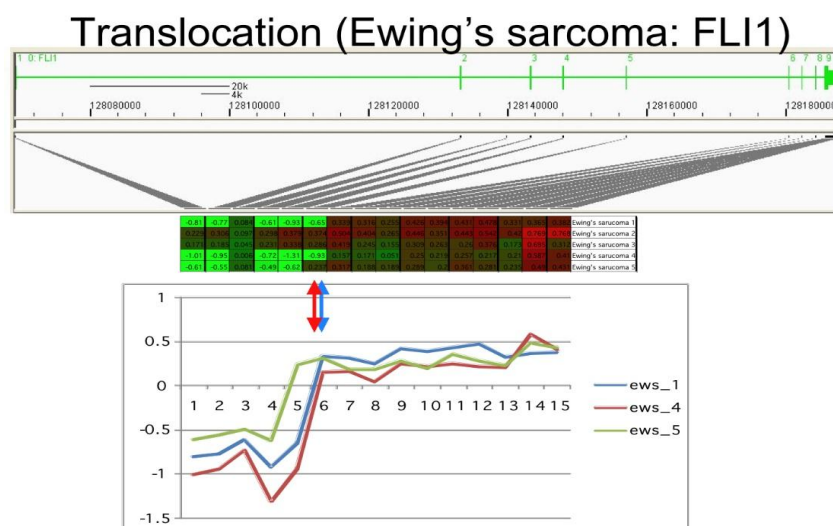


図 92 Ewing肉腫におけるEWSR1-FLI1融合遺伝子

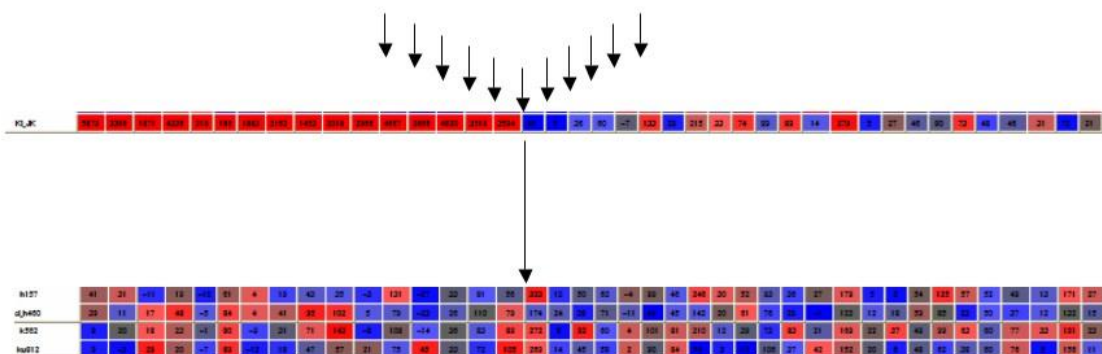


図 93 転座遺伝子の絞り込み

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)。

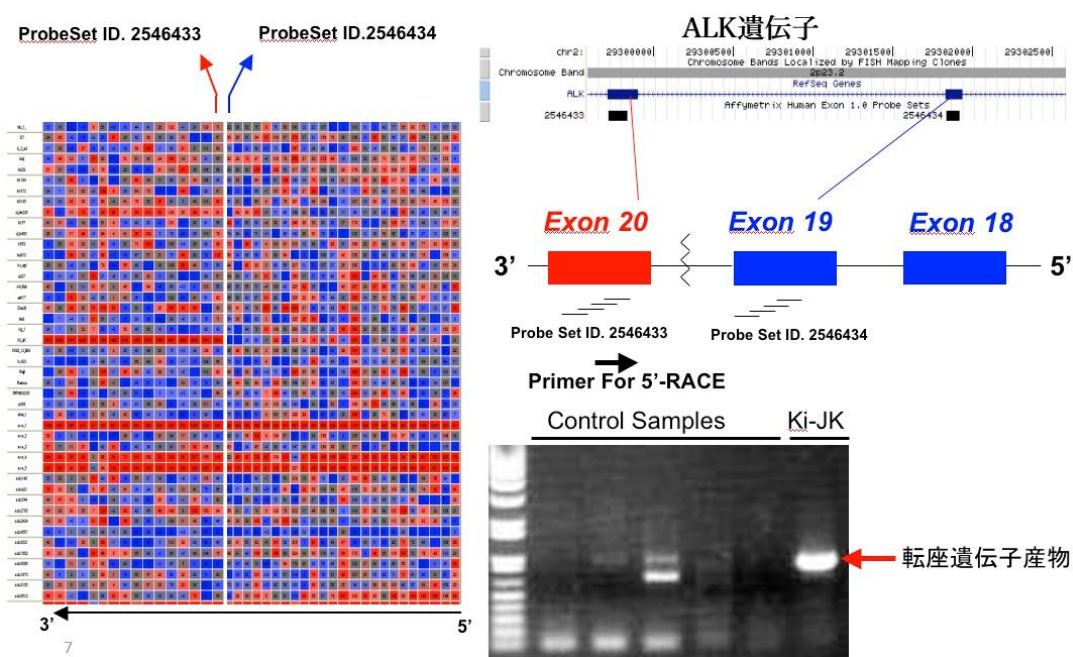


図 94 5'-RACE による融合遺伝子の同定

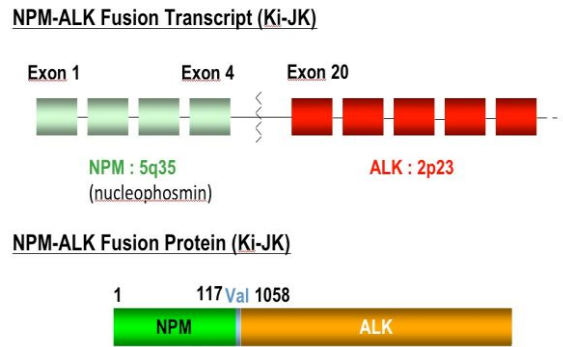


図 95 NPM-ALK 融合遺伝子

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的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。

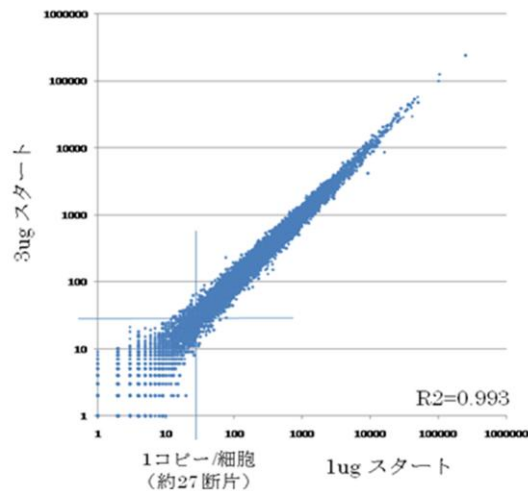


図 96 1ug 及び 3ug の total RNA からの既知のトランスクリプトの発現解析

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)。

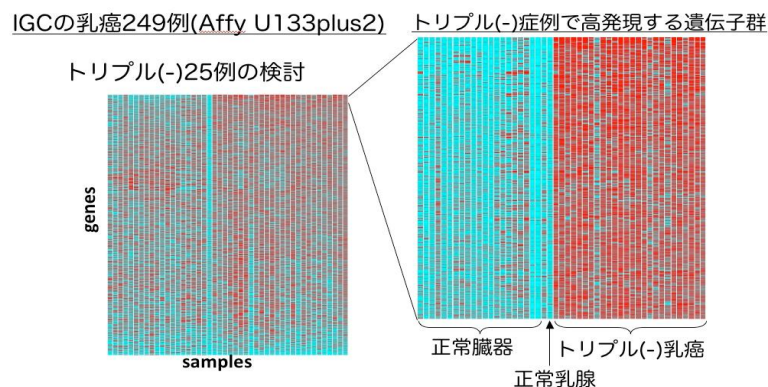
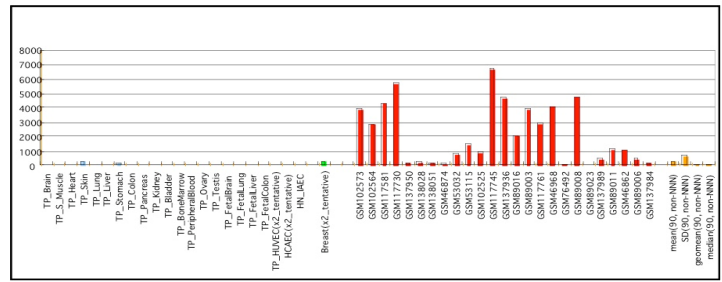


図 97 乳癌組織プロファイルデータマイニング



正常組織 トリプル(-)乳癌25例 その他の乳癌

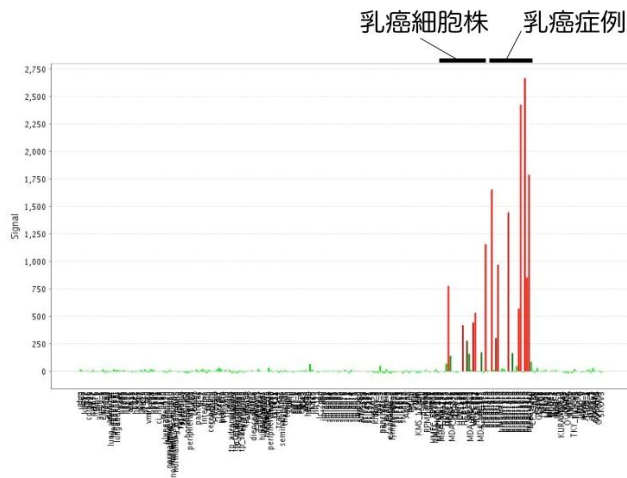


図 98 トリプル(-)乳癌に高発現する遺伝子

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。

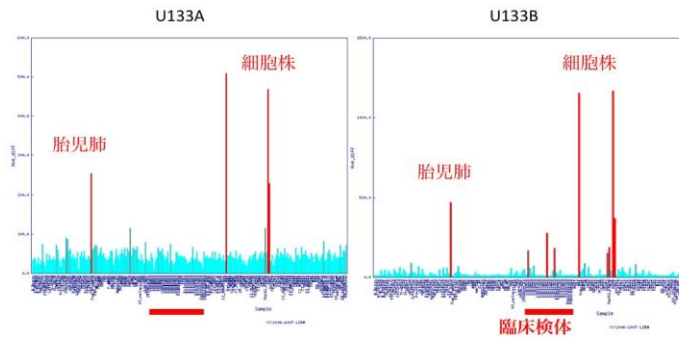


図 99 従来の発現アレイの問題点

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。

③-1-2 有効な高機能医薬抗体作製システムの開発

(JBA 有明分室((財)癌研究会))

系統的な高特異性抗体創製技術を開発する本プロジェクトにおいて、医療産業上有用で、かつ、個別化医療実現のための次世代診断・治療に応用し得る医療抗体を創製するためには、高機能抗体の標的となる候補分子やその複合体を、効果的かつ高効率で同定することが重要である。我々は本事業において、12 種のがんに対して、先進的遺伝子発現プロファイリングを行い、開発したデータマイニング技術を用いて、これらのプロファイリングデータを解析することにより、85 種の医薬抗体新規標的分子の同定に成功した。

また、同定される標的候補分子は種を越えて広く保存されているものが多いと推測され、このようなタンパク質に対する抗体作製は免疫寛容が起こり易いため困難な場合が多い。そこで、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高効率な高機能抗体産生を誘導するために、マウス発生病学を用いた有効な抗体作製技術の開発を目指しており、迅速かつ高効率のノックアウトマウス開発システムの確立と、これを用いての新規標的分子免疫用マウスの作製を行った。さらに高機能医薬抗体を効率よく開発するためには、創製される抗体の生物医学的検証を行い、その医療抗体としての有用性を評価することも重要な課題であり、こういった重要課題を解決するための技術開発も行った。

以上、本事業は順調に進展し、これまでに全ての課題に関して当初の目標を上回る成果が得られた。

1) 先進的発現プロファイリングによる標的の探索

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、優位性の高い 9 分子を抗体作製分子に決定し、本プロジェクトで抗体作製を行っている東京大学先端科学技術研究センターとカイオム社に情報を提供した。

エクソンアレイを用い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、既に 100 例を超える数の発現解析を行なった。臨床腫瘍検体の収集は 16 種のがんに対して行い、このうち 11 種のがんについては、それぞれ 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。

エクソンアレイ解析の本来の目的である「がん特異的な遺伝子転写産物の同定」を行うためのプログラム開発・改良に加え、エクソンアレイを包括的発現解析に用いるためのプログラムの開発・改良を行った。これらのプログラムによる解析と実験による検証により、がんの特異的な構造を有するキメラ遺伝子 6 遺伝子(膵がん細胞株および臨床検体に発現している 2 遺伝子、乳がん細胞株 2 遺伝子、乳がん臨床検体 1 遺伝子、骨肉種

臨床検体 1 遺伝子)およびエクソンスキップを有する遺伝子 9 遺伝子(膀胱がん細胞株)の同定に成功した。

A)先進的発現プロファイリングを用いた標的分子候補の探索

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長鎖オリゴカスタムアレイ(以下カスタムアレイと略す)、Affymetrix U133 Plus2.0 アレイ(以下 U133P2 アレイと略す)並びに GeneChip Human Exon 1.0 ST array(以下エクソンアレイと略す)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、これを用いて候補分子の同定を行った。エクソンアレイを用いた解析については、我々が開発したプログラムを用い、エクソンアレイデータより遺伝子発現量を算出したデータを用いた。このプログラムの詳細については下記 1)-B)-d)章で述べる。

a)アレイの重なるの検討

癌研究会ゲノムセンターではカスタムアレイを用いて遺伝子発現解析を行っている。このカスタムアレイは、2種類の蛍光色素を用いることにより、由来の異なる2種類のサンプルにおける遺伝子発現量比を測定することが可能である。また1種類の蛍光色素のみを用い定量解析アルゴリズムにて解析することにより各遺伝子の発現量の定量を行うことが可能である(シングルカラー解析)。このカスタムアレイでは約1万7千種類の遺伝子の発現量を解析することが可能である。

一方、Affymetrix 社製のマイクロアレイは世界的に用いられており、各種がん組織での遺伝子発現データが蓄積されつつある。この状況を考慮すれば、カスタムアレイのみ搭載されている遺伝子は、抗体医薬標的分子候補として未だ注目を集めていないものが含まれている可能性がある。従ってカスタムアレイのみ搭載されている遺伝子は以後行う抗体医薬候補遺伝子の探索においては、最優先されるべき遺伝子と考えられる。

そこで最初にカスタムアレイと U133P2 アレイに搭載されている遺伝子を比較し、カスタムアレイにのみ搭載されている遺伝子の同定を行った。方法は各々のアレイのプロープ毎にそのプロープに用いられている塩基配列を Unigene のデータベースと比較することにより、各プロープがどの Unigene ID の遺伝子であるかを決定した。この Unigene ID をもとに、各々のアレイに載っている遺伝子の比較を行った。その結果、図 100 に示すように、我々が用いているカスタムアレイには 17,746 種の遺伝子、Affymetrix U133P2 アレイには 23,934 種の遺伝子が搭載されており、そのうちの 2,109 個に関してはカスタムアレイにのみ搭載されていることが判明した。

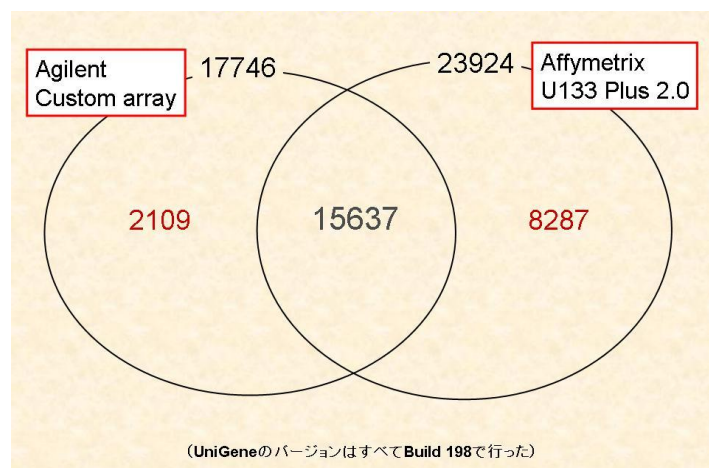


図 100 各アレイの対象遺伝子数

b)がん特異的に発現している遺伝子の抽出

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 アレイ並びに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、抗体標的分子候補の抽出システムの構築を行った。今回、抗体標的分子候補の抽出に用いた各がん種の解析症例数は以下の通りである。

表 8 各がん種の解析症例数

がん種名	解析症例数	アレイ
乳がん	225	カスタムアレイ
大腸がん	191	カスタムアレイ
大腸がん肝転移	22	カスタムアレイ
食道がん	52	カスタムアレイ
肺がん	49	カスタムアレイ
軟骨肉腫	62	カスタムアレイ
ユーイング肉腫	38	カスタムアレイ
膵がん	48	U133P2
子宮体がん	31	U133P2
卵巣がん	20	U133P2
悪性繊維性組織球腫(MFH)	59	U133P2
乳がんトリプルネガティブ症例	35	エクソンアレイ

抗体標的分子候補は後述する様に、カスタムアレイ発現データから 2 段階のデータマイニング、(I)標的分子の出現頻度と発現量による絞り込み、(II)標的分子の各種正常組織での発現をもとにした絞り込み、さらに 2 段階のテキストマイニング、(I)標的分子の膜局在推定による絞り込み、(II)標的分子の各種がん細胞および正常組織での発現や細胞内局在など文献情報をもとにした絞り込みの計 4 段階による絞り込みを行い、さらに培養細胞や組織標本を用いた各種実験による確認を経た後、抗体を作製する最終候補分子として選定した。

c)データマイニング(1) - 出現頻度と発現量による絞り込み

がん組織で特異的に発現している遺伝子のスクリーニングは 2 つの指標 a)発現が上昇している症例の割合、b)リファレンス(対象がん種に対する正常組織)に対する発現量比、を用いて行った。それぞれの指標の閾値は、出現頻度が 10%以上で発現量比が 3 倍以上の遺伝子を選定した。

d)テキストマイニング(1) – 膜局在推定による絞り込み

上記のスクリーニングにて選定された遺伝子の中で、膜に局在していると予測される遺伝子をテキストマイニングの手法を用いて絞り込んだ。選定された遺伝子の塩基配列からアミノ酸配列を予測し、その配列を 2 つの異なるアルゴリズム、SOSUI および Localizome を用いて解析することにより、膜への局在を推定した。これらのプログラムのいずれかで膜への局在が推定された遺伝子を 1 次候補として次のステップに供した。

e)データマイニング(2) – 各種正常組織での発現をもとにした絞り込み

標的分子の選択においてはその発現の特異性が重要であり、特に主要な臓器における発現レベルを確認するため、カスタムアレイを用い、シングルカラー解析法による定量的な正常組織発現プロファイルを取得しデータベースを構築した(正常組織 56 種類、図 101)。生命維持に関する重要性から、各正常臓器は Vital、Semi-Vital、Non-Vital、Brain or Fetal の 4 種類に分類し、Vital な臓器で一定レベル以上の発現がみられる遺伝子は候補から除外した。

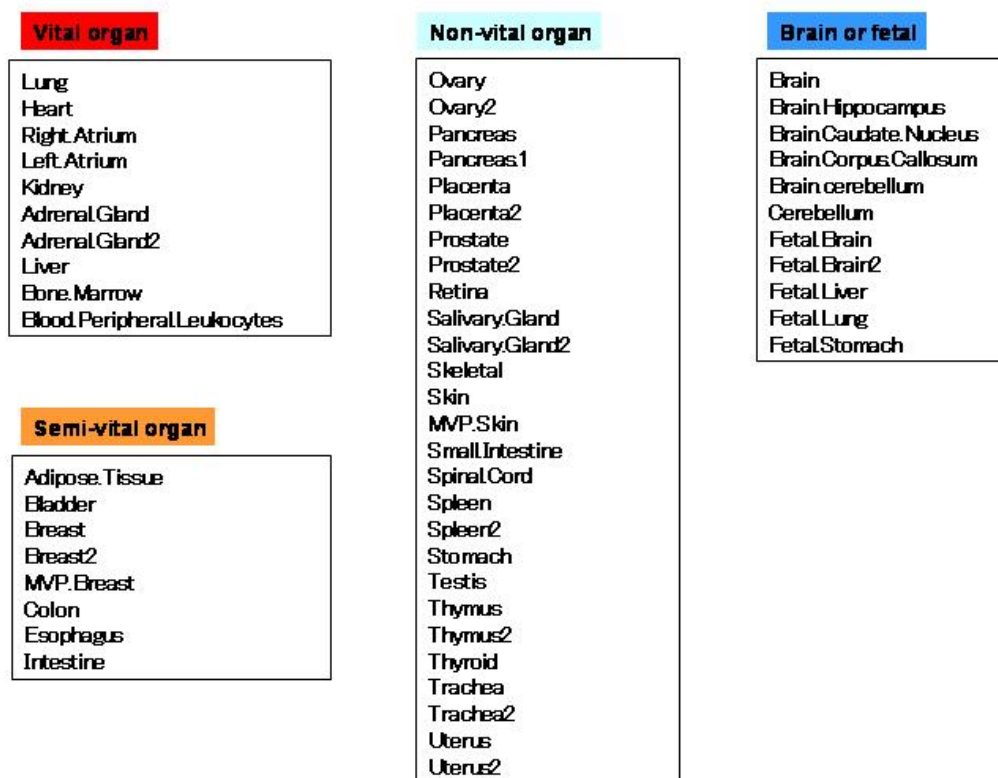


図 101 発現解析に使用した正常組織

f)テキストマイニング(2) – 文献情報をもとにした絞り込み

上記のステップで絞り込まれた遺伝子について、PubMed、Entrez Gene、OMIM など

の文献情報による絞り込みを行った。これらの情報から標的分子の細胞内局在、他のがん種や正常組織での発現量や発現パターンの確認を行い遺伝子の選定を行った。また機能未知の遺伝子については、UCSC(University of California Santa Cruz)の「Vertebrate Multiz Alignment & PhastCons Conservation」のデータを用い、28種の脊椎動物での Conservation score (保存スコア)を基に種特異性の検索、さらに、Blastプログラムを用いて、NCBIのデータベースとのホモロジー検索を基に遺伝子機能の推定を行い、2次候補を選定した。

g)実験 — 発現量や細胞内局在などの実験をもとにした絞り込み

上記に示した計4段階のデータマイニングおよびテキストマイニングにより選定された2次候補分子について、定量的RT-PCR、免疫染色、培養細胞における強制的遺伝子発現による細胞内局在の確認などの実験を行い遺伝子の絞り込みを行った。選定されたほとんどの標的分子候補については、定量的RT-PCRにより発現の定量を行い、RNAレベルでの発現の確認を行った。また、標的分子候補の中で、抗体が市販されているものについては、培養細胞およびヒトがんサンプルを用いた免疫染色による発現の確認を行った。図102は、乳がんの抗体医薬標的分子候補の一つである Cxxxxx1 の発現を、乳がん臨床例(DC013、DC008、DC022)を用いて免疫染色法で検討した結果である。抗 Cxxxxx1 ポリクローナル抗体による発現強度は、カスタムアレイ解析による Cxxxxx1 発現の強度 (Signal 値)とよく相関していた。

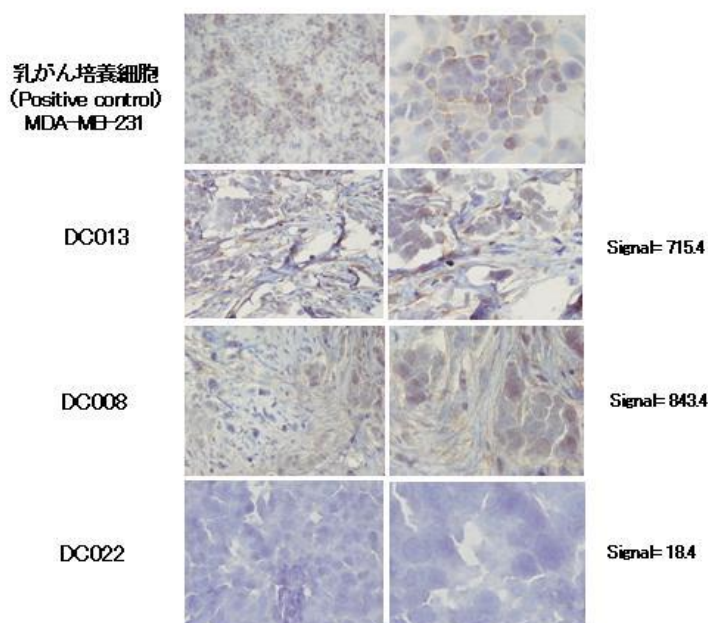


図 102 乳がん臨床例を用いた免疫染色による発現解析(抗 Cxxxxx1 ポリクローナル抗体)

図 103 は、乳がんの抗体医薬標的分子候補の一つである Txxxxx1 の細胞内局在の確認を培養細胞における強制的遺伝子発現により検討した結果である。乳がん培養細胞で強制的に発現させた Txxxxx1-EGFP の融合タンパク質は細胞膜に局在することが確認された。

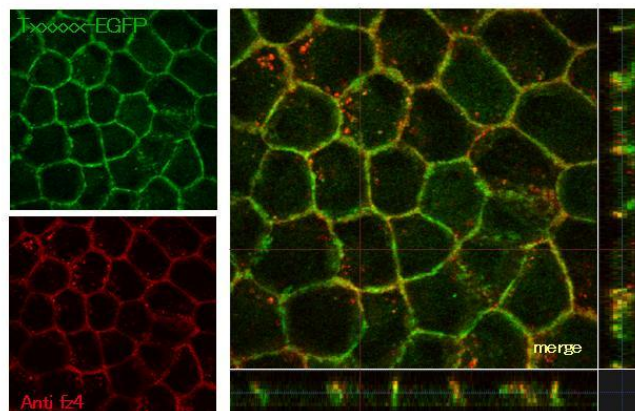


図 103 強制的遺伝子発現(EGFP 融合タンパク質)による細胞内局在の解析

このように、定量的 RT-PCR や免疫染色による標的分子候補の発現の確認・定量、さらに抗体もなく細胞内局在が明らかでない分子に対しては、培養細胞における強制的遺伝子発現による細胞内局在の確認を行い遺伝子の絞り込みを行った。

乳がんの抗体医薬標的分子の選定を例として、これまで述べてきたカスタムアレイ発現データからの抗体医薬標的分子候補選定システムの流れを図 104 に示す。カスタムアレイに搭載されている遺伝子 17746 種類から、それぞれ 1 段階目のデータマイニング(出現頻度と発現量での絞り込み)およびテキストマイニング(膜局在推定による絞り込み)により遺伝子の絞り込みを行い、111 遺伝子を 1 次候補として選定した。次に、2 段階目のデータマイニング(各正常組織での発現を基にした絞り込み)およびテキストマイニング(各種がん細胞および正常組織での発現、細胞内局在などの確認による絞り込み)により 2 次候補として 18 遺伝子を選定した。さらに、ヒト臨床サンプルにおける定量的 RT-PCR、免疫染色、培養細胞における強制的遺伝子発現による細胞内局在の確認などの実験を行い、8 遺伝子を抗体医薬標的分子候補として同定した。このように、今回構築したこのシステムを用い、上記の乳がんを含め 12 種のがん(乳がん、大腸がん、大腸がん肝転移、食道がん、肺がん、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)に対する抗体医薬新規標的分子候補 85 分子を同定した(表 9-1~3)。また、表 9-1 に示すように、各がん種で同定された抗体医薬標的分子候補を、出現頻度、発現量、正常組織での発現の有無、膜蛋白質であることの信頼度、がん特異性など、蓄積した情報をもとに優先順位を判定し、優先順位別に 3 つのグループ(A~C)に分類した。最も優先順位の高い A ランクの候補分子中から、特許等を考慮して他と競

合がないと思われる 9 分子を抗体作製と決定した。乳がんまたは大腸がんに関する 3 分子(Axxxxx1、Fxxxxx1、Gxxxxx1：表 9-1 赤色で表示)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。6 分子(Fxxxxx1、Sxxxxx1、AxxxxC、Sxxxx2、Pxxxx7、Gxxx4：表 9-1~3)3 緑色で表示)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た。

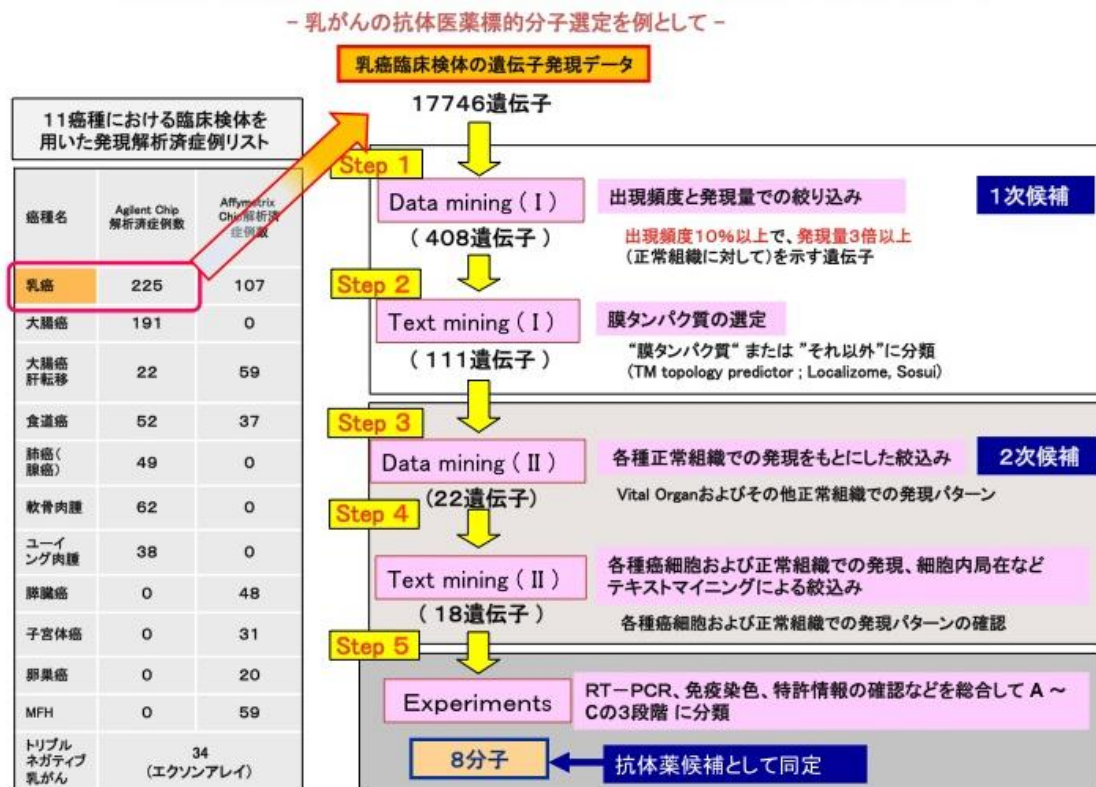


図 104 遺伝子発現データからの抗体医薬標的分子選定システムの確立

表 9-1 先進的遺伝子発現解析により同定された各がん種の抗体医薬新規標的分子のリスト

乳がん				大腸がん			
	標的分子	膜貫通	他のがんで同定		標的分子	膜貫通	他のがんで同定
Rank A	Fxxxxx2	7 回膜貫通	MFH (C)	Rank A	Gxxxxx1	12 回膜貫通	肝転移 (A)
	Axxxxx1	12 回膜貫通			Sxxxxx2	7 回膜貫通	
	Sxxxxx1	7 回膜貫通		Rank B	Lxxxxx6	7 回膜貫通	
	Fxxxxx1	2 回膜貫通	MFH (A) 骨軟部 (A)		SxxxxA3	12 回膜貫通	
	AxxxxC	7 回膜貫通			Lxxxxx8	1 回膜貫通	乳がん (B) 食道がん (B)
Rank B	Cxxxxx1	1 回膜貫通					
	VxxxxM	2 回膜貫通					
	Lxxxxx8	1 回膜貫通	大腸がん (B) 食道がん (B)				

表 9-2 先進的遺伝子発現解析により同定された各がん種の抗体医薬新規標的分子のリスト

大腸がん肝転移

	標的分子	膜貫通	他のがんで同定
Rank A	Sxxxx2	12 回膜貫通	大腸がん (A)
	Kxxxx8	8 回膜貫通	
Rank B	Txxxx4	5 回膜貫通	

食道がん

	標的分子	膜貫通	他のがんで同定
Rank A	GxxxxE	2 回膜貫通	
	UxxxxB	4 回膜貫通	
Rank B	Txxx6A	2 回膜貫通	
	PxxxxN	1 回膜貫通	骨軟部 (B)
	Dxxxx3	1 回膜貫通	

肺がん

	標的分子	膜貫通	他のがんで同定
Rank A	Lxxxx9	12 回膜貫通	
	Lxxxx3	1 回膜貫通	
Rank B	Rxxxx1	1 回膜貫通	
	HxxxxB	7 回膜貫通	

膵がん

	標的分子	膜貫通	他のがんで同定
Rank A	Sxxxx9	10 回膜貫通	
	Pxxxx7	1 回膜貫通	卵巣がん (A)
Rank B	cxxx61	1 回膜貫通	
	LxxxxK	2 回膜貫通	

軟骨肉腫

	標的分子	膜貫通	他のがんで同定
Rank A	Exxxx1	1 回膜貫通	
	AxxxxK	1 回膜貫通	ユーイング (A)
	RxxxxB	1 回膜貫通	
	Fxxxx1	2 回膜貫通	MFH (A) 乳がん (A)
Rank B	GxxxxC	7 回膜貫通	ユーイング (B)
	PxxxxN	1 回膜貫通	食道がん (B)
	SxxxG1	1 回膜貫通	
Rank C	Dxxxx8	4 回膜貫通	ユーイング (B)

ユーイング肉腫

	標的分子	膜貫通	他のがんで同定
Rank A	Exxxx1	1 回膜貫通	
	AxxxxK	1 回膜貫通	骨軟部 (A)
Rank B	OxxxxW	7 回膜貫通	
	Uxxxx2	1 回膜貫通	
	BxxxxC	1 回膜貫通	
	GxxxxC	7 回膜貫通	骨軟部 (B)
	AxxxxR1	1 回膜貫通	
	Txxxx3	1 回膜貫通	
	Dxxxx8	4 回膜貫通	骨軟部 (C)
Rank C	GxxxxC	1 回膜貫通	卵巣がん (A) 子宮体がん (A) MFH (B)
	Lxxxx1	1 回膜貫通	

表 9-3 先進的遺伝子発現解析により同定された各がん種の抗体医薬新規標的分子のリスト

卵巣がん

	標的分子	膜貫通	他のがんで同定
Rank A	L0xxx5	1 回膜貫通	子宮体がん (A)
	C1xxx6	1 回膜貫通	子宮体がん (A)
	Gxxx4	7 回膜貫通	子宮体がん (A) ユーイング (C) MFH (B)
	Pxxxx7	1 回膜貫通	膝がん (A)
Rank B	VxxxN1	2 回膜貫通	
	Rxxxx83	1 回膜貫通	子宮体がん (A)
	L0xxx1	3 回膜貫通	
	GxxxD2	1 回膜貫通	

子宮体がん

	標的分子	膜貫通	他のがんで同定
Rank A	L0xxx5	1 回膜貫通	卵巣がん (A)
	GxxxxP	4 回膜貫通	
	Rxxxx83	1 回膜貫通	卵巣がん (B)
	C1xxx6	1 回膜貫通	卵巣がん (A)
	Sxxx35	1 回膜貫通	
	Gxxx4	7 回膜貫通	卵巣がん (A) ユーイング (C) MFH (B)
Rank B	PxxxxL1	1 回膜貫通	
	Gxxx2	3 回膜貫通	
	Lxxxx4	1 回膜貫通	
	Txxxx1	7 回膜貫通	

悪性線維性組織球腫(MFH)

	標的分子	膜貫通	他のがんで同定
Rank A	CHxxx5	4 回膜貫通	乳がん幹 (A) 膝がん幹 (A)
	Rxxxx2	7 回膜貫通	
Rank B	RxxxD2		
	Sxxx01		

乳がんトリプルネガティブ

	標的分子	膜貫通	他のがんで同定
Rank A	Lxxx15	1 回膜貫通	
	Fxxxxx1	2 回膜貫通	乳がん (A) 骨軟部 (A)
	Axxx12	1 回膜貫通	
	GPxxx8	1 回膜貫通	
Rank B	FxxxxB	4 回膜貫通	
	LxxxR1	7 回膜貫通	
	Gxxx4	7 回膜貫通	卵巣がん 子宮体がん ユーイング
	PxxxxS	3 回膜貫通	
	PxxxxR	7 回膜貫通	
Rank C	TxxxF1	1 回膜貫通	
	Pxxxx1	1 回膜貫通	
	Fxxxxx2	7 回膜貫通	乳がん (A)
	SxxxC1	1 回膜貫通	
	AxxxxL	1 回膜貫通	
	PPxxxA	7 回膜貫通	

以上のように、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。以下に、我々がこれまでに同定した 85 分子の代表例として、抗体作製分子と決定した乳がんにおける標的分子候補 2 種および大腸がんにおける標的分子候補 1 種の詳細を示す。

まず、乳がんにおける 2 種の標的分子候補、Axxxxx1 および Fxxxxx1 の各々の全解析症例(101 例)における陽性率は、それぞれ 11% および 33% であり、定量的 RT-PCR による発現量の検証では、マイクロアレイとの間に高い相関を示した(Pearson=0.99 および 0.84)(図 105-108)。図 105、107 に、乳がん症例と各種正常組織における Axxxxx1 および Fxxxxx1 の発現解析結果とアミノ酸配列を基にした細胞内局在の推定、図 106、108 に Axxxxx1 および Fxxxxx1 の定量的 RT-PCR による発現解析の結果を示す。Axxxxx1 および Fxxxxx1 陽性症例での発現量の平均は、カスタムアレイに搭載されている全遺伝子の各症例での発現量の平均と比較して、それぞれ 10 倍および 8 倍といずれも高値を示した。さらに、Axxxxx1 の正常組織での発現は、乳腺上皮および精巣でわずかに認められたが、陽性症例の発現量の平均は、それら 2 つの正常組織の発現量の 20 倍以上であった(図 102)。また、Fxxxxx1 の正常組織での発現は、胃、網膜および乳腺上皮で発現が認められたが、陽性症例の発現量の平均は、正常組織の中で最も発現の高かった網膜および乳腺上皮の発現量の 4 倍以上であった(図 107)。

乳がん症例においては図 106、108 に示すように、対象として、乳がんの分子標的薬剤(抗体医薬)であるハーセプチンのターゲット分子、ErbB2 の発現量を定量的 RT-PCR で測定した。今回測定した ErbB2 陽性症例(5/11、赤棒)での発現量は、195-6465 (copies/ β -actin mRNA 10^4 copies)、平均 581(copies/ β -actin mRNA 10^4 copies)であった。一方、Fxxxxx1 陽性症例(赤棒)での Fxxxxx1 発現量は、11-74(copies/ β -actin mRNA 10^4 copies)、平均 32(copies/ β -actin mRNA 10^4 copies)であり、ErbB2 の陽性症例での発現と比較して低値を示したが、Axxxxx1 の発現量は、陽性症例で 1716-3770(copies/ β -actin mRNA 10^4 copies)、平均 2453(copies/ β -actin mRNA 10^4 copies)であり、ErbB2 の陽性症例での発現と比較して同等またはそれ以上の発現量であった。

大腸がんにおける標的分子候補 Gxxxxx1 の、大腸がん症例と各種正常組織における発現解析結果とアミノ酸配列を基にした細胞内局在の推定を図 109 に示す。全解析症例(164 例)における陽性率は 15% であり、その発現量の平均は、カスタムアレイに搭載されている全遺伝子の各症例での発現量の平均と比較して、2.3 倍であった。一方、各種正常組織での Gxxxxx1 の発現は、検討したすべての正常組織でほとんど認められなかった(図 110)。

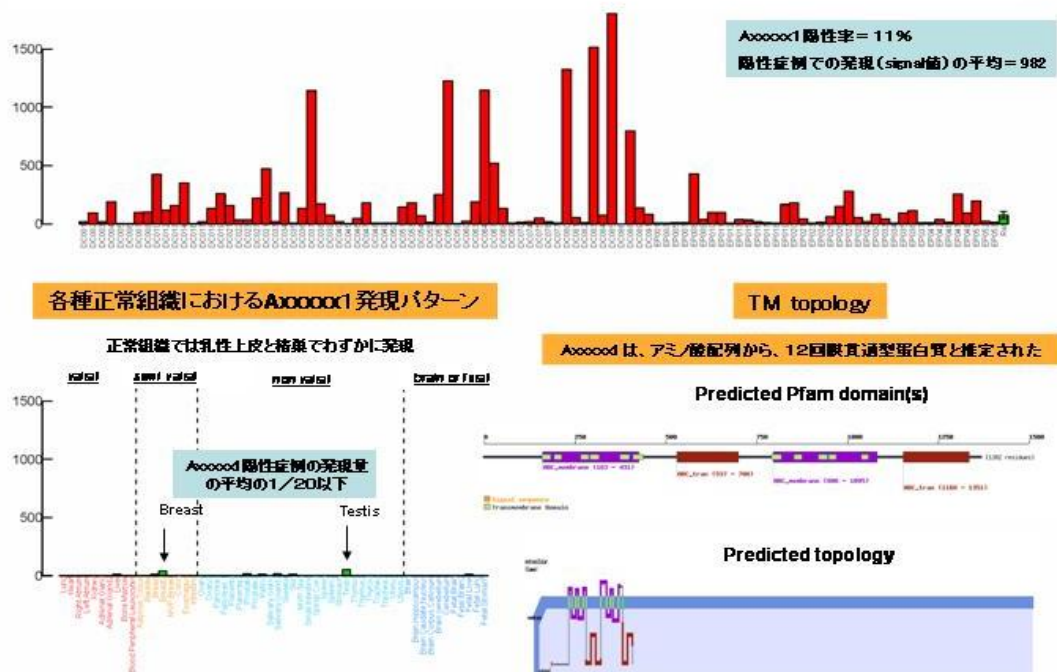


図 105 乳がん臨床例(101例)における Axxxxx1 の発現パターン

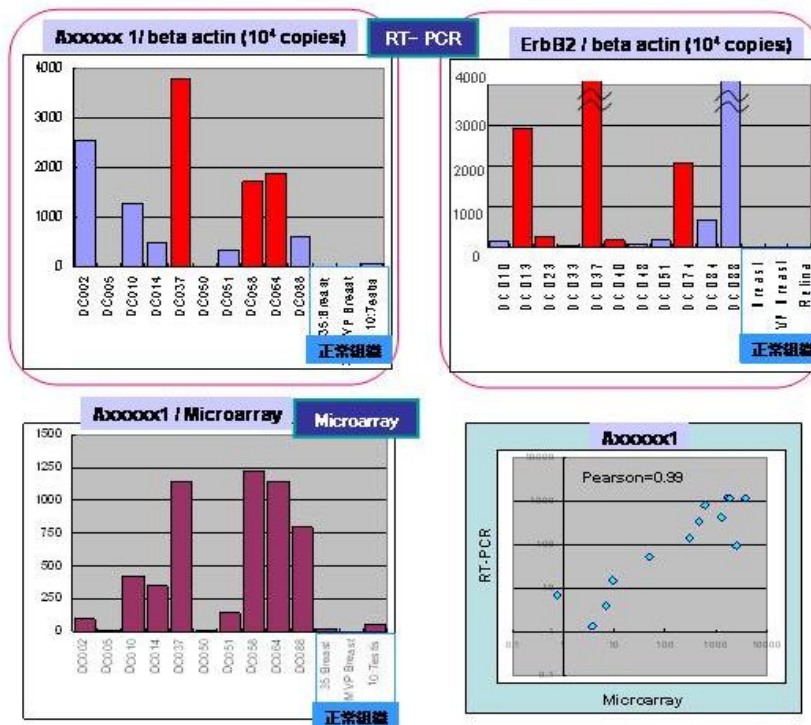


図 106 乳がん臨床例における Axxxxx1 の定量的発現解析

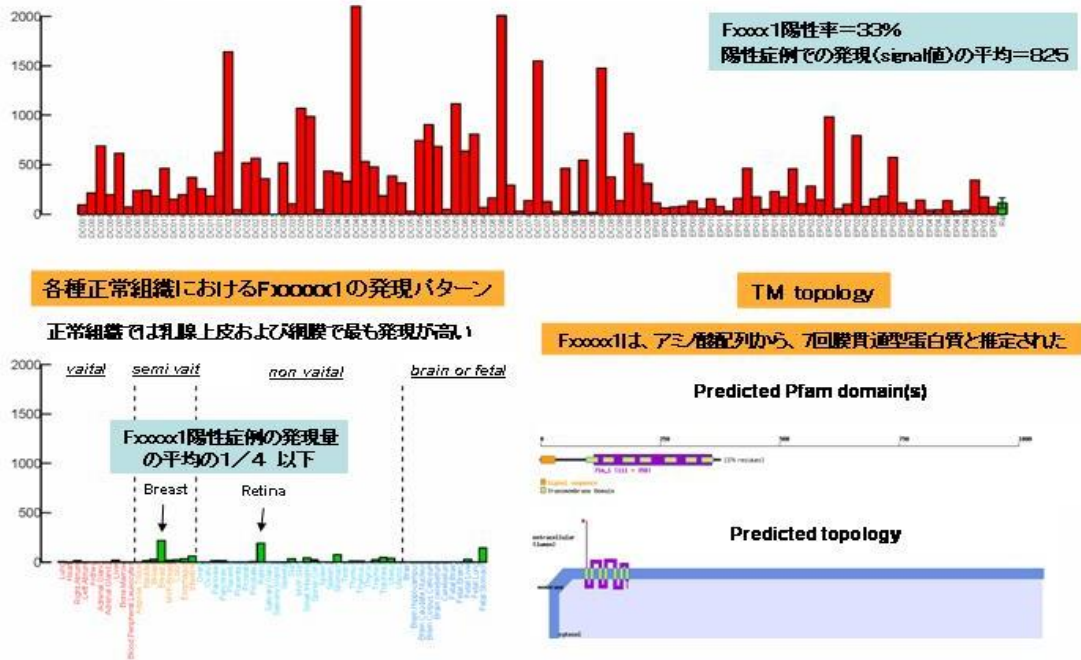


図 107 乳がん臨床例(101例)における Fxxxx1 の発現パターン

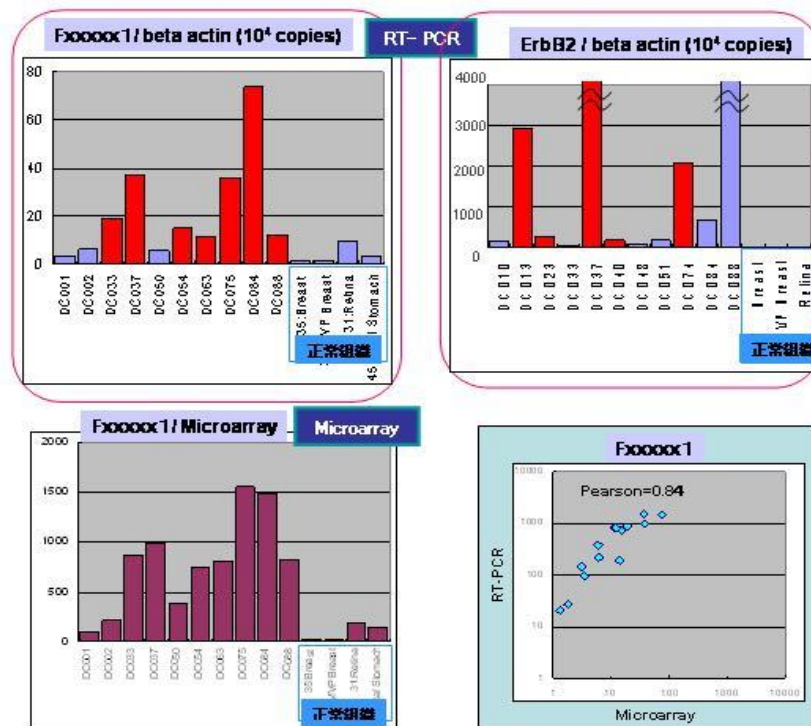


図 108 乳がん臨床例における Fxxxx1 の定量的発現解析

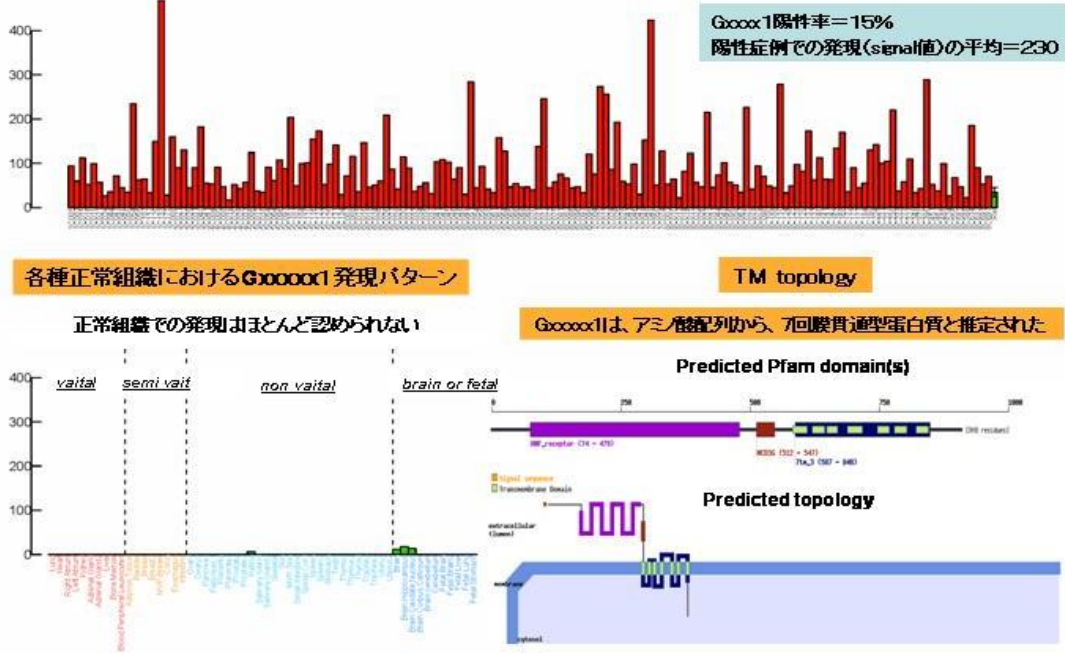


図 109 大腸がん臨床例(164 例)における Gxxxx1 の発現パターン

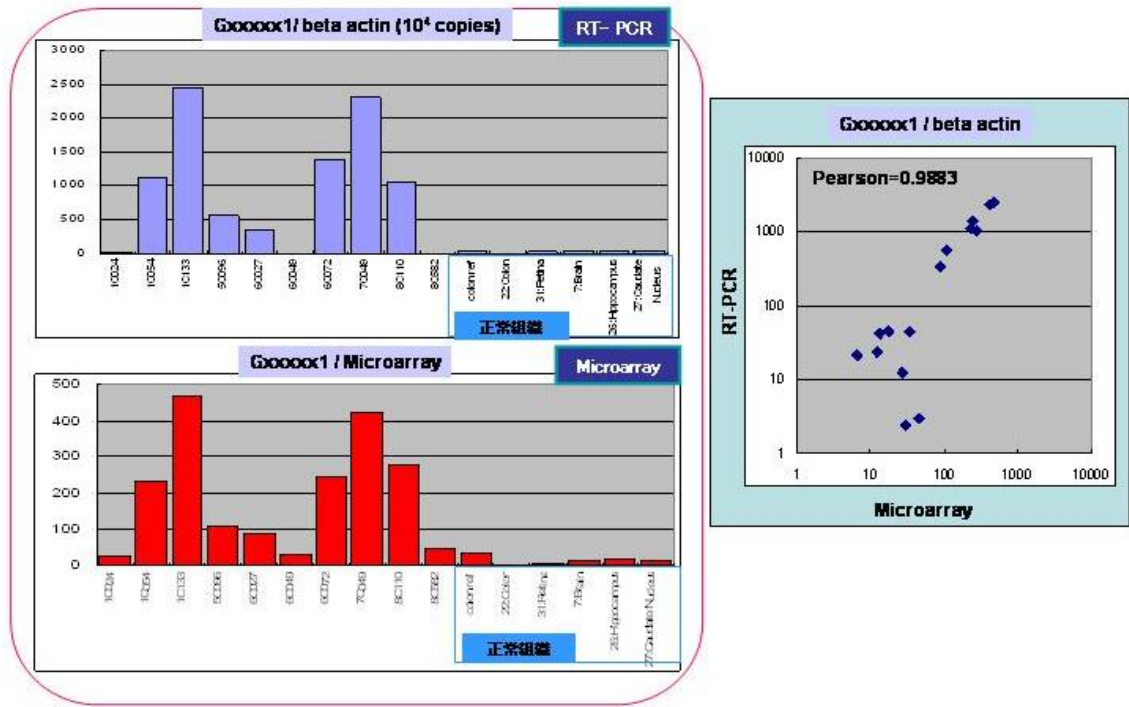


図 110 大腸がん臨床例における Axxxx1 の定量的発現解析

我々は、上記に示すように、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(Axxxxx1、Fxxxxx1、Gxxxxx1)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(Fxxxxx1、Sxxxxx1、AxxxxC、Sxxxx2、Pxxxx7、Gxxxx4)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た。

h)がん幹細胞を標的とする新規医薬抗体標的分子の探索

悪性腫瘍は不均一であり、未分化な細胞から分化した細胞まで存在し、階層性を形成していることが多い。その中で自己複製能力を有し、分化可能な、がん幹細胞と呼ばれる細胞集団の存在が示唆されている。このがん幹細胞が抗がん剤や放射線療法に対する抵抗性や再発、転移に関与していると考えられていることから、がん幹細胞を標的とする新たな治療法の開発が望まれている。そこで、がん幹細胞を標的とする新規医薬抗体標的分子を同定するため、難治性がんである膵がんと罹患数の多い乳がんのみに注目し、培養細胞からがん幹細胞を分離し遺伝子発現解析によって、がん幹細胞特異的な発現を示す分子の探索を行った。

ヒトがん細胞の表面抗原の発現パターンによる、がん幹細胞の同定には、多くの報告がなされているが、ヒト膵がん細胞では、表面抗原マーカーCD24(シアロ糖蛋白)、CD44(ヒアルロン酸結合蛋白)、ESA(ヒト上皮抗原 HEA)の全てが陽性の細胞にがん幹細胞が含まれることが報告されている。乳がんに関しては、CD44 陽性かつ CD24 陰性細胞が、がん幹細胞としての特徴を持つという論文が多く、また ALDH1(アルデヒド脱水素酵素)の発現が高い細胞が、がん幹細胞であるという報告もある。

そこで、ヒト膵がん培養細胞株のうち原発性膵がん由来株 11 例、転移性膵がん由来株 6 例に対して、CD24、CD44、ESA の 3 つの抗体で免疫染色し、FACS Aria にてそれぞれの細胞の陽性率を比較した。このうち CD24、CD44、ESA 全てが陽性の細胞分画が認められた 8 例について、全ての抗原マーカーが陽性の細胞、すなわち膵がん幹細胞を分離し、RNA を抽出した。U133P2アレイおよびエクソンアレイを用いて、膵がん幹細胞の遺伝子発現解析を行った。(図 111)

次に、本プロジェクトで開発した抗体医薬標的分子選定システムを用いて標的分子の探索を行った。Step1 から Step4 までの絞り込みを行い、U133P2アレイデータからは

12 分子を、エクソンアレイデータからは 25 分子を候補分子として絞り込んだ。このうち 10 分子は U133P2 アレイデータとエクソンアレイデータの両方で共通であった。これらについて出現頻度、発現量、正常組織での発現の有無、膜蛋白質であることの信頼度、がん特異性など、蓄積した情報をもとにした検討を行い、膵がん幹細胞に対する新規医薬標的分子を 10 分子決定した。(表 10)

また、ヒト乳がん培養細胞株 34 例に対して、CD24、CD44 の 2 つの抗体で免疫染色し、FACS Aria にて CD44 陽性かつ CD24 陰性細胞割合を比較した。このうち、CD44 陽性かつ CD24 陰性の細胞分画が認められた 5 例についてソーティングを行い、乳がん幹細胞と考えられる CD44 陽性かつ CD24 陰性の細胞を分離した。Affymetrix U133 および Exon array を用いて、正常細胞とがん幹細胞との発現パターンを比較し、遺伝子発現解析を行った。(図 111)

上記と同様に標的分子の探索を行った。Step1 から Step4 までの絞り込みを行い、U133P2 アレイデータからは 10 分子を、エクソンアレイデータからは 24 分子を候補分子として絞り込んだ。このうち U133P2 アレイデータとエクソンアレイデータの両方で共通であった分子は 1 分子であった。これらについて出現頻度、発現量、正常組織での発現の有無、膜蛋白質であることの信頼度、がん特異性など、蓄積した情報をもとにした検討を行い、乳がん幹細胞に対する新規医薬標的分子を 5 分子決定した。(表 10)

表 10 先進的遺伝子発現解析により同定された膵がん、乳がん幹細胞に対する抗体医薬標的分子のリスト

膵がん幹細胞標的候補分子

	標的分子	膜貫通	他のがんで同定
Rank A	PxxxP1	1 回膜貫通	
	PxxAP1	2 回膜貫通	
	FxxxP1	1 回膜貫通	
	TxxxP6	2 回膜貫通	
	SxxxP5	9 回膜貫通	
Rank B	AxxxxG	1 回膜貫通	
	Gxxxx7	7 回膜貫通	
	Dxxxx2	1 回膜貫通	
	AxxxxP	1 回膜貫通	
	CHxxx5	4 回膜貫通	乳がんトリプルネガティブ(A) 乳がん幹細胞(A)

乳がん幹細胞標的候補分子

	標的分子	膜貫通	他のがんで同定
Rank A	CxxxB5	1 回膜貫通	
	CHxxx5	4 回膜貫通	乳がんトリプルネガティブ(A) 膵がん幹細胞(A)
Rank B	Gxxxx3	3 回膜貫通	
	SxxxF2	12 回膜貫通	
	Vxxx1	4 回膜貫通	

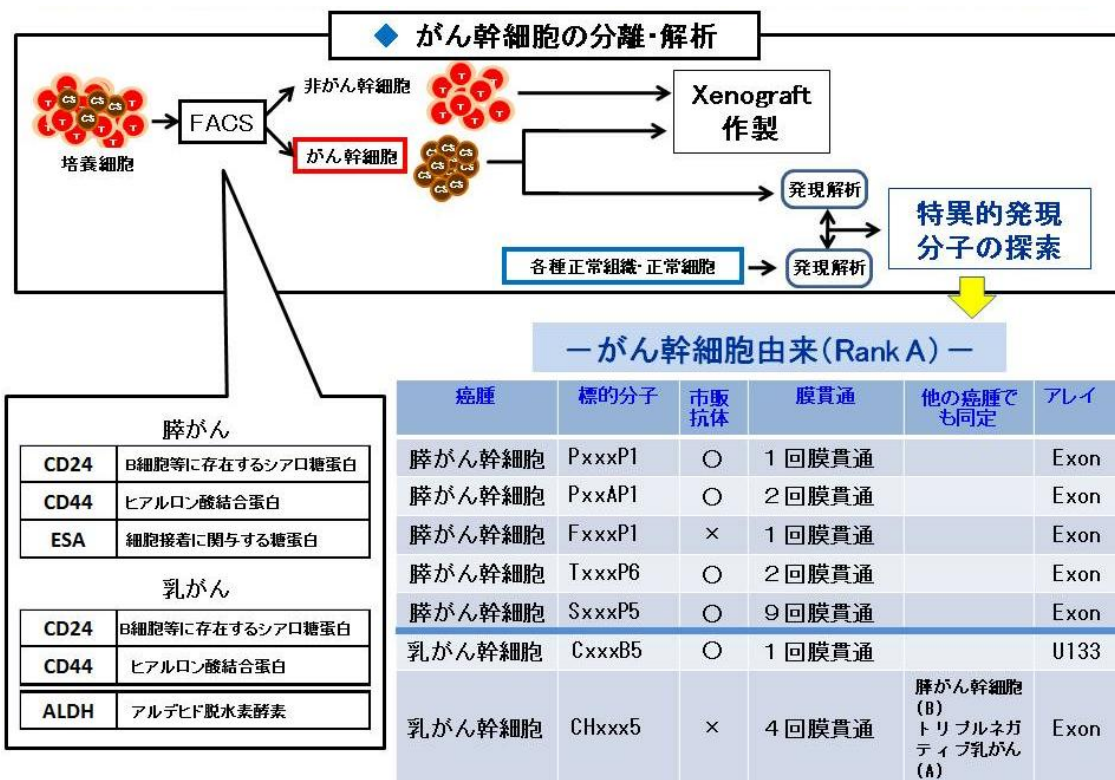


図 111 がん幹細胞由来の遺伝子発現プロファイリングによる標的の探索

図 112 に、膵がん幹細胞の新規標的候補分子の一例を示す。FxxxP1 は正常組織では精巣と子宮で発現をみとめるが、他の主要臓器での発現は低い。また臨床膵がんサンプルでは正常との比較で 3 倍以上の発現があるものはないが、膵がん幹細胞では 8 例すべてにおいて 5 倍以上の発現をみとめた。したがってこの分子は膵がん幹細胞特異的に発現していると考えられた。

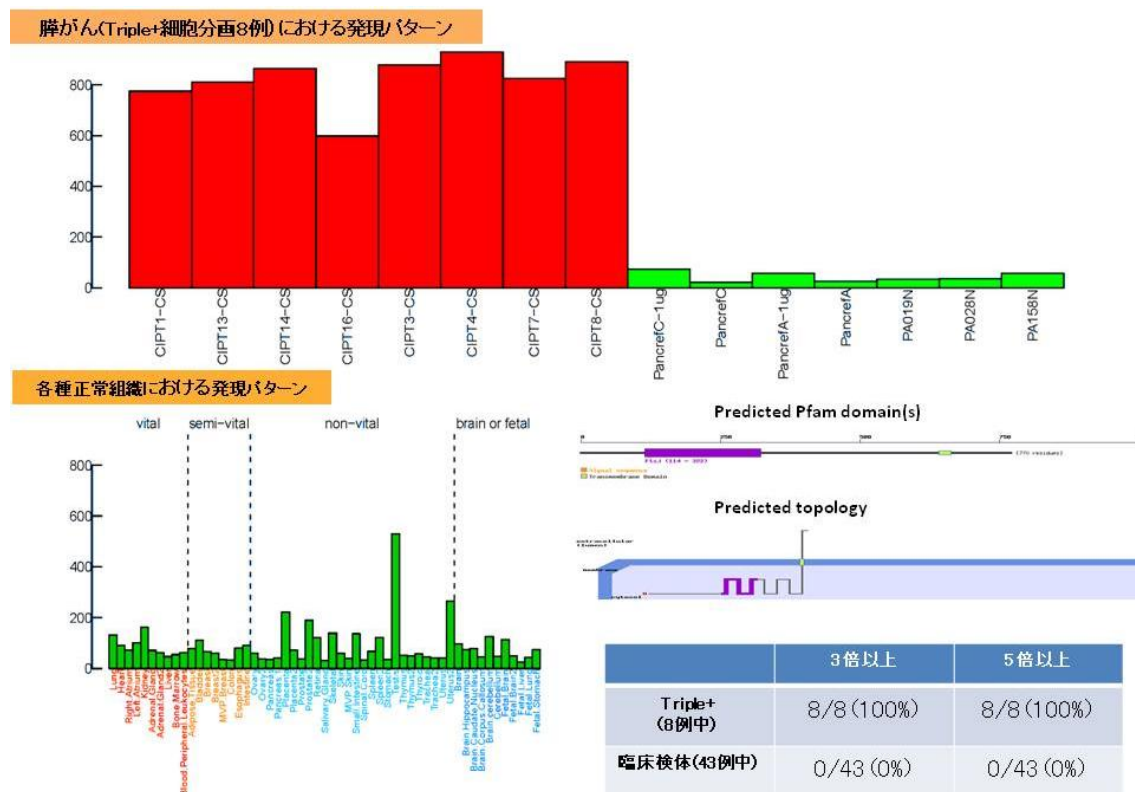


図 112 抗体医薬新規標的分子(膵がん幹細胞)-FxxxP1-

以上のように、膵がんおよび乳がん培養細胞株由来のがん幹細胞に関し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として膵がん 10 分子、乳がん 5 分子を同定した。

B)エクソンアレイを用いた標的候補分子の探索

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、エクソンアレイ(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。

これと並行して、臨床検体を解析する場合のサンプル量の違いによる発現量特性(再現性)を解明し、臨床検体に対する解析法を決定した。さらに、エクソンアレイ解析の本来

の目的である「がん特異的な遺伝子転写産物の同定」を行うためのプログラム開発に加え、エクソンアレイを包括的発現解析に用いるためのプログラム開発を行った。

a)アレイの重なるの検討とエクソンアレイ解析における実験法別再現性の検討

最初に、エクソンアレイを発現アレイとしての利用する場合に新たに解析結果を得ることのできる抗体医薬標的分子候補の数を検討するため、Affymetrix 社製 U133 Plus2.0 アレイと癌研究会ゲノムセンターが設計した Agilent 社の長鎖オリゴカスタムアレイと、エクソンアレイに搭載されている遺伝子の比較を行った(図 113)。遺伝子数の算定および種類の同異判定は、1)-A)-a)節に記述した Unigene ID を用いる方法で行った。前述したように Affymetrix U133 Plus2.0 アレイには 23,934 種の遺伝子が、癌研カスタムアレイには 17,746 種の遺伝子が搭載されている。エクソンアレイには 20,981 種の遺伝子が搭載されており、そのうちの 3,197 種は、Affymetrix U133 Plus2.0 アレイには搭載されず、エクソンアレイのみに搭載されている遺伝子であることが判明した。これまでに同一検体のカスタムアレイと Affymetrix U133Plus2.0 の両アレイを用いた解析結果から、Affymetrix U133 Plus2.0 アレイには十分に機能していないプローブセットが約 5%存在していることが判明している。これらの結果を考慮すると、エクソンアレイを用いることによってエクソンアレイのみに搭載された遺伝子(3,197種)と U133 アレイではプローブが不良で解析できなかった遺伝子(約 900種)の合計約 4,000 種の遺伝子の発現が新たに解析できると推測された。そのため、本来エクソンアレイは「がん特異的な遺伝子転写産物を同定」することにあるが、本事業においては同時にこれを包括的発現解析のツールとしても用いることにより、併行して行っている癌研カスタムアレイによる解析に加え、さらに 4000 種の遺伝子に関して、抗体医薬の標的分子となる可能性を検討することとした。

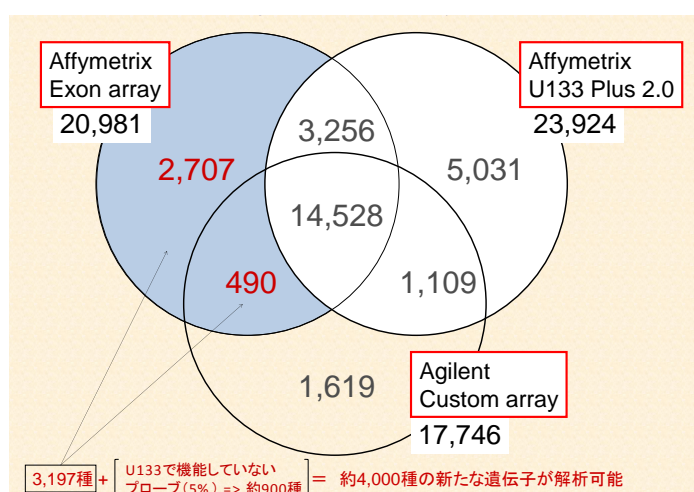


図 113 各アレイの遺伝子数

次に、エクソンアレイ解析を実際の臨床検体を用いて行う際に、特定の種類のがんで、使用可能な検体量が限定される場合があるため、RNA量に応じた解析法の特徴を明らかにした(図 114)。1 μ g の total RNA から ribosomal RNA を取り除いたサンプルを用いるリボマイナス法と、100ng の total RNA から ribosomal RNA を取り除かずそのまま使用するリボプラス法の比較を行った。膵がん培養細胞株の同一サンプルを繰り返し測定し、リボマイナス法とリボプラス法それぞれの発現特性の違いを検討した。その結果、リボプラス法を用いた発現量はリボマイナス法よりも低い値が観測される傾向が見られたが、2種の方法の発現量の相関係数は 0.93 から 0.96 と高い相関を示していた。そこで、本プロジェクトでは臨床検体をエクソンアレイで解析する場合、laser capture microdissection(LCM)により正確にがん細胞のみを採取し 100ng の total RNA を抽出、リボプラス法を用いて発現プロファイルを解析することに決定した。

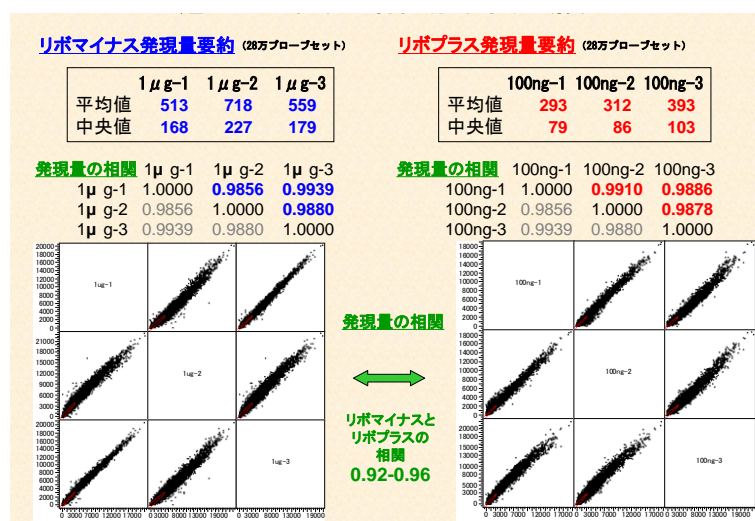


図 114 サンプル量の違いによる発現量特性(再現性)の解明

b) エクソンアレイ解析のための臨床検体の収集

エクソンアレイ解析のため、16種類のがんの臨床検体の収集を開始し、11種類のがん(乳がん、食道がん、膵臓がん、大腸がん、大腸がん肝転移、胃がん、子宮頸がん、子宮体がん、卵巣がん、MFH、甲状腺がん)において、それぞれ100症例を超える数の検体を収集した。その多くに関しては、既にマイクロダイセクションを行ってがん細胞のみを採取し、RNAの抽出を終えている。収集を行った臨床検体の一覧を表 11 に示す。

表 11 収集臨床検体一覧

癌研究会ゲノムセンター凍結保存臨床検体一覧

癌種名	総検体数	生検検体数	OPE検体数	Agilent 解析済症例数	Affymetrix 解析済症例数
乳癌	3290	416	2874	173	279
食道癌	708	434	274	52	36
膵癌	243	0	243	0	58
大腸癌	4112	2571	1589	191	0
大腸癌肝転移	385	0	385	22	25
胃癌	1315	1103	212	0	0
胆管癌	49	0	49	0	11
子宮頸癌	198	39	159	0	0
子宮体癌	417	0	417	0	31
卵巣癌	272	0	272	0	20
MFH	182	0	117	0	59
EWING	38	38	0	38	0
骨・軟部腫瘍	1566	57	1509	63	0
甲状腺癌	238 髄様癌 10 未分化癌 6	0	238	0	0
肝癌	217	0	217	0	5

c)エクソンアレイによる発現情報の解析

まず最初に、膵がん細胞株 20 種と乳がん細胞株 24 種とをエクソンアレイを用いて解析し、これら発現データを用いて、1)-B)-a)節で記載したエクソンアレイ解析における実験法別再現性の検討を行った。また、次節で説明するがん特異的な遺伝子転写産物の同定するためのプログラムを用いて、がん特異的な遺伝子転写産物を同定するためにこれらの発現データを用いた。

さらに、収集した臨床腫瘍検体の中から Agilent 社の癌研カスタムアレイで解析を行っていないがんを中心に、既に 100 例を超える検体に対してエクソンアレイによる発現解析を行った。各がん種における解析症例数は以下の通りである。

表 12 各がん種における解析症例数

がん種名	解析症例数
膵臓がん細胞株	20
正常膵組織	5
乳がん細胞株	24
正常乳腺培養細胞	2
正常乳腺組織	5
乳がん組織	86
骨肉種組織	15
骨肉種細胞株	2
正常骨培養株	1

d)エクソンアレイを包括的発現解析に用いるためのプログラムの開発

エクソンアレイの既存の解析ソフトウェアで使われている遺伝子レベルの発現量推定法は、解析したい全サンプルのアレイデータの情報を用いて、各々のサンプルの発現量を計算する。従って、既存の方法では、サンプルが追加されるたびに推定発現量を再計算する必要があり、また推定値自身も変わってしまうため、データベースに保存するための数値情報としては適していない。そこで、1 サンプルごとに遺伝子レベルの発現量の推定をする方法を開発した。取り扱うエクソンアレイデータは、アノテーション情報の確かな core プロブセットのみとした。推定アルゴリズムとしては、1 つの遺伝子の中にある core プロブセットのプロブのシグナル値とバックグラウンド値のそれぞれについて外れ値を取り除いた平均値を計算し、これらシグナル値とバックグラウンド値の平均値の差を遺伝子レベルの発現量とした。なお、平均値の計算には 'Tukey's biweight' 法を用いた。

この方法の有用性を確認するため、20 種の膀胱がん細胞株と 1 つ正常組織の遺伝子発現を U133 アレイとエクソンアレイによって計測し、がん特異的に発現の高い遺伝子の探索を行った。U133 アレイとエクソンアレイで共通する約 18000 遺伝子について発現量を比較し、U133 アレイではがんと正常で発現差がないが、エクソンアレイでは発現差が認められる遺伝子を探索した。探索の条件として、(1)U133 アレイでは正常に比べて発現が 2 倍以上のがん細胞株が 10%未満(1 株以下)、(2)エクソンアレイでは正常に比べて発現が 5 倍以上のがん細胞株が 20%以上(4 株以上)に設定し探索した。その結果、エクソンアレイによってのみがん特異的な発現を確認することができた遺伝子 215 個を同定することができた。このように本開発プログラムを用いたエクソンアレイデータを用いることにより、U133 アレイデータでは見落とされていたがん特異的に発現の高い遺伝子の同定が可能であることが示された。

e)がん特異的標的分子探索のためのプログラム開発

エクソンアレイ解析のためのプログラム開発では、エクソンアレイ解析の本来の目的である「がん特異的な遺伝子転写産物を同定」するためのプログラム開発に加えて、エクソンアレイを包括的発現解析に用いるためのプログラム開発も行った。

最初に、後者のエクソンアレイを包括的発現解析のために用いるプログラムについて説明する。このプログラムでは、1 つの遺伝子内の多数のエクソン発現データから 1 つの遺伝子発現量を計算し、カスタムアレイで解析したようにがん特異的に発現する遺伝子を抽出することができる。具体的には、複数のエクソン発現データから 1 つの遺伝子発現量を計算する際には、遺伝子内の統計学的異常値と判定されるエクソン発現値を有するエクソンは除外し、残りの比較的類似する発現量を持つエクソンを用いて平均的な遺伝子発現量を計算する。次に、カスタムアレイと同様に発現が上昇している検体の割合やレファレンス(対象がん種に対する正常組織)に対する発現量比を用いて遺伝子を抽出

する。閾値を変更させ、遺伝子発現量別に条件を満足するがん検体の数を集計表として出力する。また、データベース化した 55 種類の正常組織のエクソンアレイデータをプログラムで参照し、vital な臓器で高発現が見られる遺伝子は候補から除外する。エクソンアレイは従来のアレイよりも多くのプローブセットの値が利用できるため、本プログラムの開発により、エクソンアレイを従来の解析よりもより正確でより多くの遺伝子をカバーする遺伝子発現解析アレイとして用いることが可能となった。

次に、がん特異的な遺伝子転写産物を同定するためのプログラム開発では、抽出する対象に応じて、3 種類のプログラム(A、B、C)を作成した(図 115)。

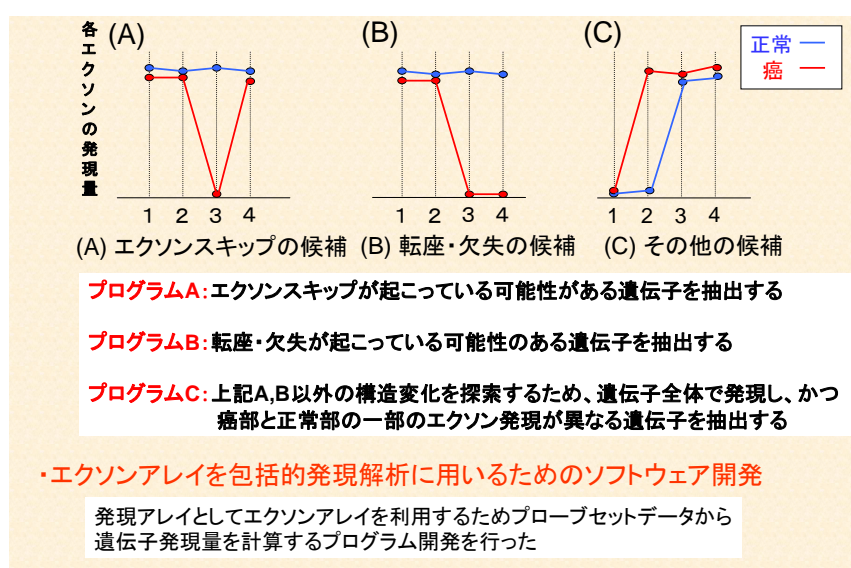


図 115 がん特異的標的分子探索のためのプログラム開発

プログラム A は、がん特異的な構造変化としてエクソンスキップが生じている遺伝子を抽出するプログラムで、がん部のエクソンスキップと、正常部のエクソンスキップのそれぞれを探索可能とした。さらに、1つのエクソン内に複数のプローブセットが存在する場合にも、そのエクソン内の変異の検出が可能である。プログラム B は、転座・欠失が生じている遺伝子を抽出するプログラムで、5'側のプローブセットは発現が認められるが、その隣のプローブセットから 3'側のプローブセットが全て連続して低発現である遺伝子を探索するプログラムである(5'と 3'が逆の場合も探索可能)。探索プログラム C は、がん部と正常部の間でがん特異的な構造変化を A、B のプログラムのように特定せず、多様な構造変化の探索を行う。そのため、遺伝子全体と各エクソンの発現量の両者を利用し、遺伝子全体ではがん部と正常部で共に有意に発現しているが、一部のエクソンにおいて発現量ががん部と正常部とで統計的に異なっている遺伝子を抽出するプログラムである。各プログラムとも、がん特異的な構造変化が一例の症例でも条件を満たせば候補遺伝子を抽出できるように開発を行った。

f)がん特異的な転写産物が同定された結果

がん特異的な遺伝子転写産物を同定するために開発した各プログラム A、B、C を用いて、膵がん細胞株 20 株と正常膵組織 5 例に対してエクソンアレイ解析を行って得られたデータセットと、乳がん細胞株 24 種、正常乳腺培養細胞 2 株と正常乳腺組織 5 例、乳がん組織 86 例、さらに骨肉腫組織 15 例、骨肉腫細胞株 2 例、正常骨培養細胞 1 例のデータセットに対して解析を行った。各プログラムから抽出された候補遺伝子の数、がん特異的なスプライスフォームを RT-PCR で確認した遺伝子数と、がん特異的な転写産物が確認された数を図 116 左に示す。プログラム C で探索した候補遺伝子に対して変異が確認された遺伝子は、プログラム A または B で探索した結果と一部一致していたが、プログラム A、B と比較し感度が低いため、中間評価以降はプログラム A または B を中心に改良・チューニングを行い解析を進めた(現在論文準備中)。

膵がんに対してプログラム A から抽出された遺伝子数は合計 620 個であった。ある特定のエクソンで発現量が低く抽出条件を満足していても遺伝子全体で発現量が低い場合は、観測値自体の偶然変動や測定誤差の影響により抽出条件をクリアした可能性が高いため、そのような遺伝子は RT-PCR の実験候補から除外した。さらに、抽出条件を満足したエクソン以外のエクソンにおいて発現量の分散が大きい遺伝子を優先的に選択し RT-PCR 実験を行った。膵がんで RT-PCR 実験を行った遺伝子数は現在までに 31 個である。その中で、中間評価以前では、プログラム A を用いて膵がん 20 株のエクソンスキップを探索し実験を行った 2 遺伝子中の 1 遺伝子(SLxx)においてがん細胞株に特異的なエクソンスキップが確認された。さらに中間評価以降、膵がんエクソンアレイデータに対するプログラム A の解析を継続し、現在までに計 9 個の遺伝子においてがん細胞株に特異的なエクソンスキップを発見した。なお、乳がんでは合計 163 遺伝子が候補遺伝子として抽出され、その内 3 個の遺伝子を RT-PCR の実験で確認を行ったが、エクソンスキップが確認された遺伝子は検出されなかった。

がんに特異的な構造を有するキメラ遺伝子の探索に関してはプログラム B による解析を行い、6 遺伝子(膵がん細胞株および臨床検体に発現している 2 遺伝子、乳がん細胞株 2 遺伝子、乳がん臨床検体 1 遺伝子、骨肉種臨床検体 1 遺伝子)においてがんに特異的な構造を有する融合遺伝子を発見した(図 116 右参照)。膵がん細胞株において確認された LOxxx-EAxxx については、今後も継続して解析を行う予定である。

プログラムA(特異的エクソン)を用いた探索				プログラムB(転座・欠失による変異転写産物)を用いた探索					
候補遺伝子 (がん細胞特異的)	細胞株 ×	正常でエクソスキップ 腫瘍で選択的スプライシング 有: ○ 無: ×	正常組織での発現 有: ○ 無: ×	がん種	融合 遺伝子	細胞株	臨床 検体	コドン 読件	細胞株 在り 否
VPXX	△ (2/20)	○ 正常: 2-4 腫瘍: 2-3-4	△ 骨髄筋?	腺がん 細胞株	RLXXX- ZMXXX	○ (1/20)	○ (1/58)	in frame	×
TPXX	×	○ 正常: 12-14 腫瘍: 12-13-14	△ 膵レベル		LOXXX- EAXXX	○ (3/20)	○ (3/9)	in frame	△
COXX	×	○ 正常: 6-7 腫瘍: 6-6-7	×	乳がん 細胞株	ZMXXX- CEXXX	○ (1/24)	×	out of frame	×
CTXX	×	○ 正常: 1-3 腫瘍: 1-2-3	×		DOXXX- CDXXX	○ (1/24)	×	out of frame	×
SLXX	×	×	○ 膵レベルで正常	乳がん 患者	ITXXX- RBXXX	×	○ (1/52)	in frame	×
TPXX	×	○ 正常: 5-7 腫瘍: 5-6-7	○ 膵レベルで正常・腫瘍・骨髄筋		骨肉腫 患者	MEXXX- GNXXX	×	○ (1/33)	out of frame
SHXX	×	×	○ 膵レベルで正常・腫瘍						
CDXX	○ (3/8)	○ 正常: 5-12 腫瘍: 5-11-12	×						
NRXX	○ (4/20)	○ 正常: 10-12 腫瘍: 10-11-12	×						

図 116 がんの特異的な構造を有するキメラ遺伝子の探索

C) LIMS システムの開発

匿名化患者情報とエクソンアレイやプロテオーム解析、ノックアウトマウス作製実験等の各種実験情報・結果を一元的に管理するための実験情報管理システム(LIMS)は初年度に開発を終了し、以後、本プロジェクトで使用する臨床検体に対する匿名化システムとの連携を可能としたシステムとして運用した。

2) マウス発生工学を用いた有効な抗体作製技術の開発

高機能抗体の標的として同定される候補分子の多くは種を越えて広く保存されており、このようなタンパク質に対する抗体作製は免疫寛容が起こり易いため困難なことが多い。そこで、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。

A) 迅速なノックアウトマウス作製システムの開発(図 117)

a) 迅速なターゲティングベクター作製システムの開発

先進的発現プロファイリングにより同定された抗体標的候補分子についてノックアウトマウスの作製を迅速に行うために、ターゲティングベクター作製を迅速に行うシステムを開発した。

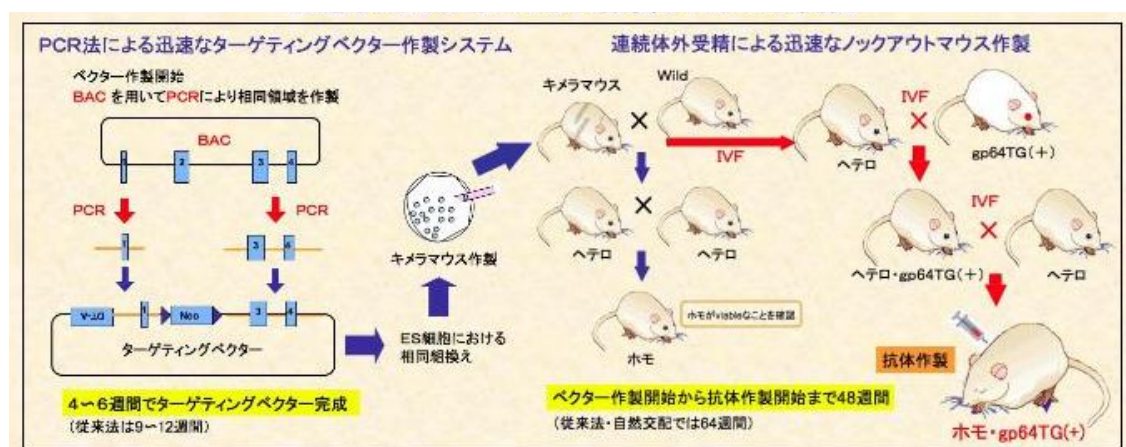


図 117 迅速なノックアウトマウス作製システムの開発

このシステムでは、同定された標的分子について Ensemble データベースから得た遺伝子情報をもとに標的エクソンを選定し、ターゲティングストラテジーを作成する。そして、目的とする標的遺伝子領域を含むマウス ES 細胞ゲノム DNA の BAC クローンを取得し、これをテンプレートとして PCR により 5' 相同領域および 3' 相同領域を増幅し、DTA-floxneo クローニングベクターに組み込むことによりターゲティングベクターを作製する。従来のターゲティングベクター作製法が 10 工程近くから成り、完成までに 9~12 週間を要するのに対して、この新たなシステムでは、作製工程が 5 ステップと少なく、4~6 週間でターゲティングベクターを作製することができる。実際に、このプロトコルを用いて 7 種類の遺伝子についてターゲティングベクターを作製し、常法にしたがってマウス ES 細胞に導入してスクリーニングを行った結果、6 種類の遺伝子について遺伝子改変 ES 細胞の作製に成功し、このシステムが有効に稼動することを確認した。一方、新システムにより遺伝子改変 ES 細胞が得られなかった遺伝子については、ターゲティングコンストラクトの変更や従来法によるターゲティングベクターの作製を行い、ノックアウトマウスの作製を追求する。実際に、遺伝子改変 ES 細胞が得られなかった 2 種類の

遺伝子についてターゲティングコンストラクトを作り直した結果、1種類の遺伝子について遺伝子改変 ES 細胞の作製に成功した。

b)連続体外受精による迅速なノックアウトマウス作製システムの開発

通常、マウスの妊娠期間は 18 日、生後 8 週で性成熟に達するので、自然交配では一世代を経るのに約 11 週を要する。しかしながら、雌は生後 4 週でホルモン処理により過排卵誘導をかけることが可能であり、したがって、体外受精を行うことにより 7 週毎に世代を進めることができる。そこで我々は、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。相同組み換えにより変異が導入された遺伝子改変 ES 細胞は、ブラストシストインジェクションによりマウスブラストシスト内に注入し、キメラマウスを作製する F1 マウスへの **germline transmission** を確認した後、F1 ヘテロ変異マウス同士の交配により F2 ホモ変異マウスを作製し、ホモ変異マウスが生存可能なことを確認する。これに平行して、F1 ヘテロ変異マウスを体外受精により大量に作製し、F1 ヘテロ変異マウスとバキュロウイルス gp64 タンパクを発現するトランスジェニックマウスとの体外受精により標的遺伝子ヘテロ・gp64(Tg/+)マウスを大量に作製し、さらに、このマウスの雌が 4 週齢に達した時点で標的遺伝子変異マウスとの体外受精を行い、標的遺伝子ホモ・gp64(Tg/+)マウスを作製する。キメラマウスから標的遺伝子ホモ・gp64(Tg/+)マウス作製まで、自然交配では少なくとも 35 週を要するが、本システムでは 27 週と短期間で標的遺伝子ホモ・gp64(Tg/+)マウス作製することができる。標的遺伝子ホモ・gp64(Tg/+)マウスは抗体作製に供試し、さらに、Balb/c マウスへの戻し交配を体外受精により 10 世代以上行い、遺伝的背景が Balb/c マウスになった標的遺伝子ノックアウトマウスを抗体作製に供試する。実際にこのシステムにより、現在までに、3種類の標的候補分子について標的遺伝子ホモ・gp64(Tg/+)マウスの作製を完了した。

B)抗体標的候補分子のノックアウトマウスの開発

先進的発現プロファイリングにより同定された抗体標的候補分子に対する高機能抗体を作製するために、15種類の抗体標的候補分子(GC001~GC0015)についてノックアウトマウスの作製を試みた。このうち8種類の標的候補分子についてノックアウトマウスの作製を完了し、7種類のノックアウトマウスが生存可能であった。各標的候補分子の特徴とノックアウトマウス開発状況を表 13 に示す。

表 13 抗体標的候補分子のノックアウトマウス

ID	Gene	Classification	Plan	Construct	ES	Germline	Homo	Homo-gp64(+)
GC001	A000000x	typelltrans-membrane protch	○	○	○	○	vbbb	○
GC002	G000000x	GPIanchored protch	○	○	○	○	vbbb	○
GC003	E000000x	typelltrans-membrane protch	○	○	○	○	vbbb	○
GC004	H000000x	G protch-coupled receptor	○	○	○	○	vbbb	○
GC005	C000000x	xltraspantrans-membrane protch	○	○	○	○	lthal	ND
GC006	A000000x	transpater protch	○	○	○	○	vbbb	h progress
GC007	C000000x	xltraspantrans-membrane protch	○	○	○	○	vbbb	h progress
GC008	F000000x	G protch-coupled receptor	○	○	○	○	vbbb	○
GC009	G000000x	G protch-coupled receptor	○	○	ND	ND	ND	ND
GC010	L000000x	transpater protch	○	○	○	○	ND	ND
GC011	S000000x	transpater protch	○	○	○	○	ND	ND
GC012	U000000x	Txltraspantrans-membrane protch	○	○	○	ND	ND	ND
GC013	S000000x	transpater protch	○	○	○	ND	ND	ND
GC014	L000000x	G protch-coupled receptor	○	○	○	ND	ND	ND
GC015	E000000x	Transpater protch	○	○	○	ND	ND	ND

さらに、本システムにより開発した 7 種類の抗体標的候補分子のノックアウトマウスを用いて高機能抗体の作製を効率的に行うために、6 種類の抗体標的候補分子のノックアウトマウスについては gp64 トランスジーンを導入を完了し、1 種類の抗体標的候補分子のノックアウトマウスについては gp64 トランスジーンを導入を進行中である。以下に各抗体標的候補分子のノックアウトマウス作製の概略を示す。

GC001(図 118)は、202 個の ES 細胞クローンをスクリーニングして 4 クローンの遺伝子改変 ES 細胞を得た。このうち 3 クローンをブラストシストインジェクションし、2 ラインの germline キメラを得た。さらに F1 ヘテロ変異マウス同士の交配により得られたホモ変異マウスは正常に生まれ、現在まで特に異常は認められていない。さらに、標的遺伝子ホモ・gp64(Tg+)マウスの作製を完了した。

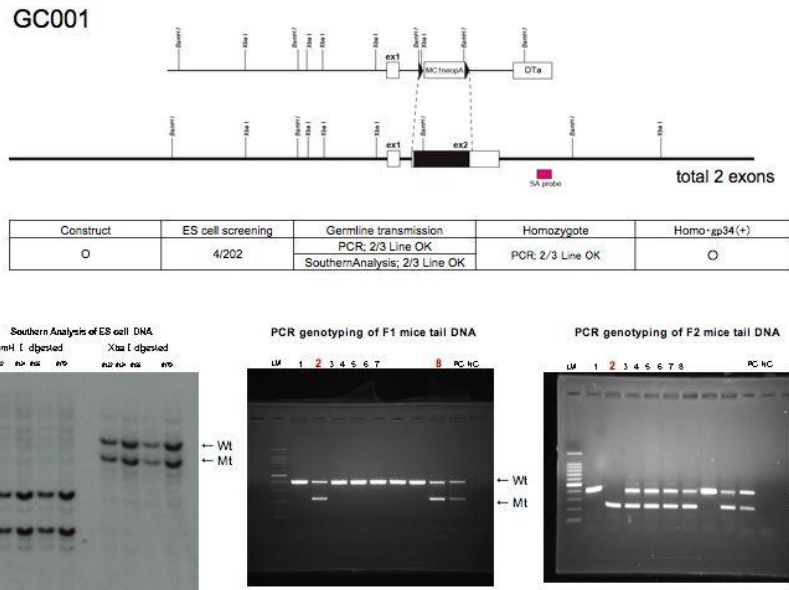


図 118 標的候補分子のノックアウトマウス作製の概略

GC002(図 119)は、5回のターゲティングで最終的に2クローンの遺伝子改変ES細胞を得ており、これら2クローンをブラストシストインジェクションして、2ラインでgermline transmissionを確認した。ノックアウトマウスは正常に生まれ、現在まで特に異常は認められていない。さらに、標的遺伝子ホモ・gp64(Tg+)マウスの作製を完了した。

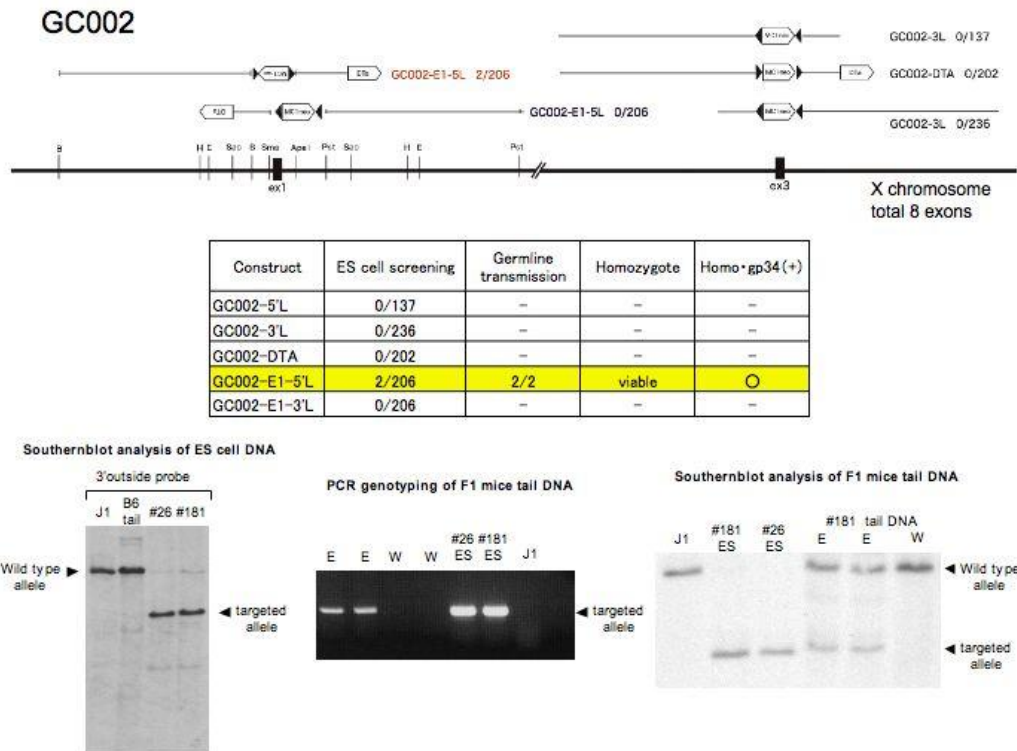


図 119 遺伝子改変 ES 細胞

GC003(図 120)は、213 個の ES 細胞クローンをスクリーニングして 13 クローンの遺伝子改変 ES 細胞を得た。このうち 3 クローンをブラストシストインジェクションし、3 ラインの germline キメラを得た。F1 ヘテロ変異マウス同士の交配により得られたホモ変異マウスは正常に生まれ、現在まで特に異常は認められていない。さらに、標的遺伝子ホモ・gp64(Tg+)マウスの作製を完了した。

GC004(図 121)は、6 回のターゲティングを行い、最終的に 1 クローンの遺伝子改変 ES 細胞を得た。この 1 クローンをブラストシストインジェクションして、germline transmission を確認した。ノックアウトマウスは正常に生まれ、現在まで特に異常は認められていない。さらに、標的遺伝子ホモ・gp64(Tg+)マウスの作製を完了した。

GC005 は、遺伝子改変 ES 細胞が得られ、germline transmission が確認されたが、ノックアウトマウスは致死であった。

GC006(図 122)は、192 個の ES 細胞クローンをスクリーニングして 5 クローンの遺伝子改変 ES 細胞を得た。このうち 4 クローンをブラストシストインジェクションし、1 ラインの germline キメラを得た。さらに F1 ヘテロ変異マウス同士の交配により得られたホモ変異マウスは生存可能であるが、野生型マウスやヘテロ変異マウスよりも矮小であった。

GC007 は、遺伝子改変 ES 細胞が得られ、germline transmission が確認され、ノックアウトマウスは正常に生まれ、現在まで特に異常は認められていない。

以下の図に、抗体標的候補分子のターゲティングの概要を例示する。

GC008(図 123)は、2 回のターゲティングを行い、最終的に 7 クローン of 遺伝子改変 ES 細胞を得た。このうち 2 クロンをブラストシストインジェクションし、2 ラインの germline キメラを得た。さらに F1 ヘテロ変異マウス同士の交配により得られたホモ変異マウスは正常に生まれ、現在まで特に異常は認められていない。さらに、標的遺伝子ホモ・gp64(Tg+)マウスの作製を完了した。

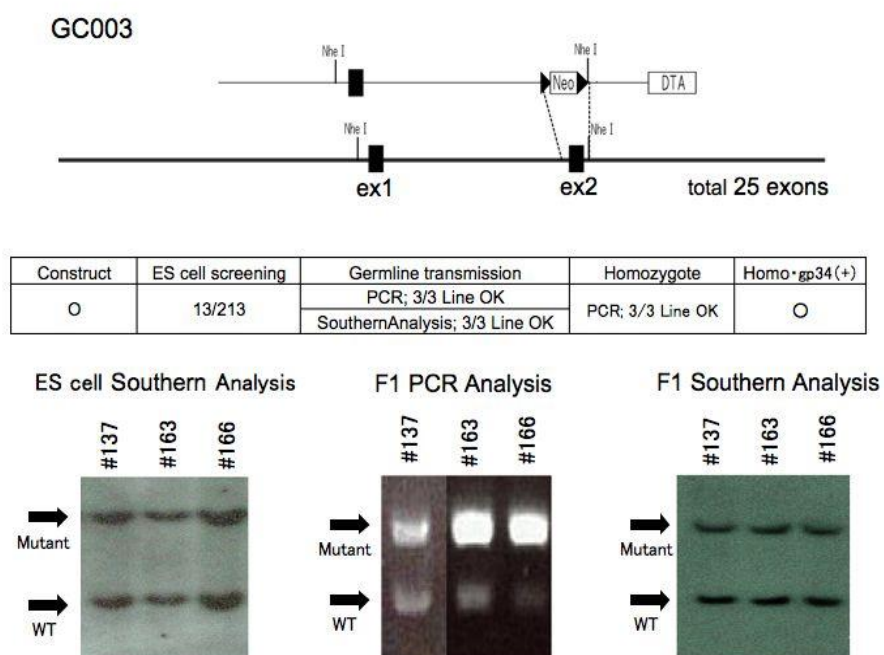


図 120 遺伝子改変 ES 細胞

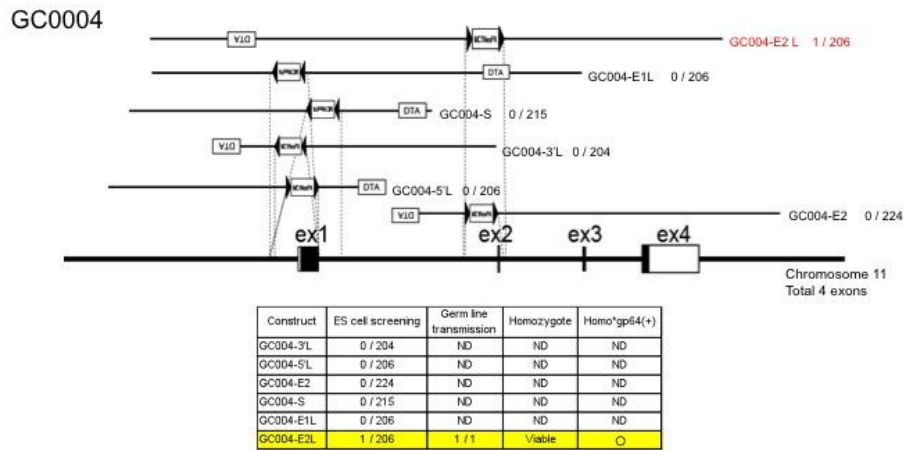
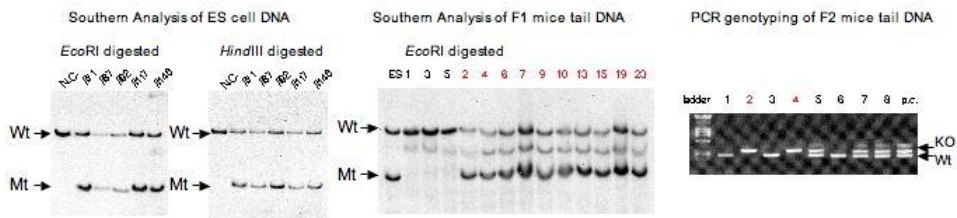
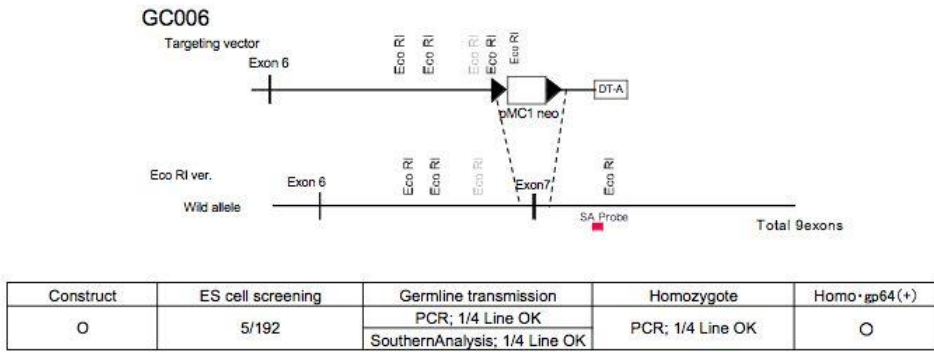


図 121 遺伝子改変 ES 細胞



GC006 ES-F2

図 122 遺伝子改変 ES 細胞

GC0008

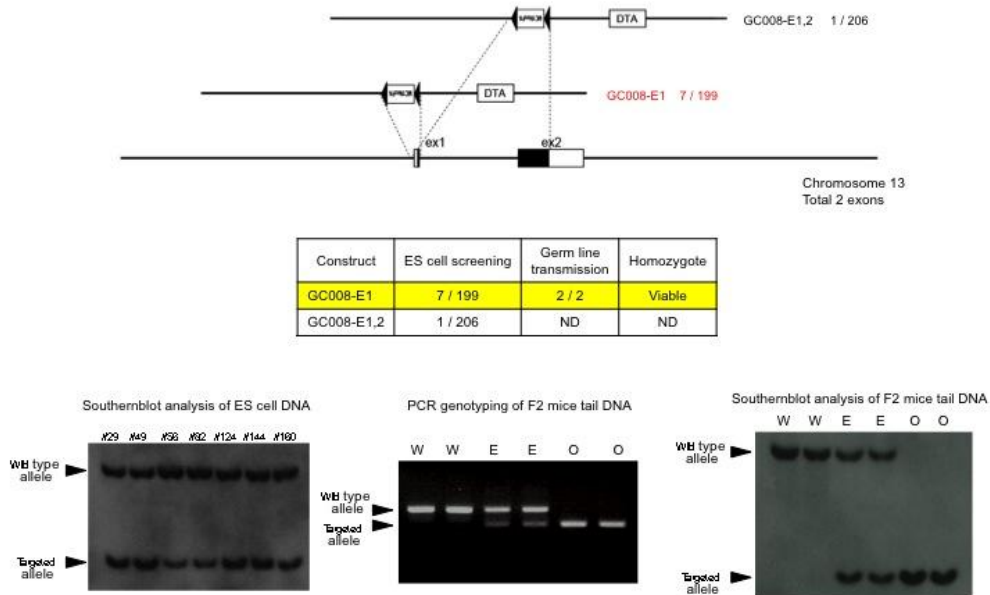


図 123 遺伝子改変 ES 細胞

3)機能抗体の体系的評価法の確立

高機能医薬抗体を開発する本プロジェクトにおいて創製される抗体を、大量にかつ効率的に解析し、よりすぐれた抗体を選別していくためには、抗体の体系的評価法の確立が不可欠である。そこで、我々は、抗体に対する各種の体系的機能評価法を行った。まず、抗体のがん細胞に対する機能を *in vitro* で定量的に評価するために、多数の培養細胞を用いた評価システムの確立を行った。また、生体内における抗体の特異性をハイスループットに解析するために、正常組織およびがん組織アレイの構築を行い、さらに、抗体の生体内での動態や効果を信頼性の高い方法で評価するために、ヒトの原発性腫瘍部の組織を直接マウスに移植するジェノグラフトの樹立を行った。

A)がん細胞を用いた評価システムの構築

創製された抗体の医療抗体としての有用性を生物学的に評価するために、がん腫由来細胞株の収集と基礎となるデータの集積を行った。まずがん種由来の細胞株の収集を行い乳がん 25 株、食道がん 10 株、膵がん 31 株、その他 12 株、計 78 株を収集した。収集した細胞株について、RNA の抽出を行い、カスタムアレイと U133P2 アレイを用いた網羅的発現解析を行い、発現プロファイリングデータを集積した。

また、創製された抗体の医療抗体としての有用性を評価するためには、生体内での効果の検討は不可欠である。そこで、乳がん細胞株 5 株、膵臓がん細胞株 14 株について、ヌ

ードマウスあるいは SCID マウスの皮下に移植し、造腫瘍能のチェックを行った。その結果、乳がん細胞株 5 例中 2 例(40%)、膵がん細胞株 14 例中 8 例(57%)に造腫瘍能が認められ、これらの細胞株については生体内における抗体の有用性の評価に用いることができることが示された。

B)組織アレイによる評価システムの構築

創製された抗体の生体内での特異性を確認するために、組織アレイの作製を行った。ヒト正常組織のパラフィンブロックを作製し、パラフィンブロック専用アレイヤー装置 KIN-1 型(東屋医科器械)を用いて、ヒト正常組織アレイを作製した。ヒト正常組織 50 種類と各種がん組織を搭載した組織アレイを作製した

C) *in vivo* 評価システムの構築

創製された抗体の機能評価の最終段階として、できるだけ原発性腫瘍の生体内での組織構築を保ったまま、抗体の集積性や効果の検討を行うことが理想的である。我々は、そのような検討を行なうために、ジェノグラフトを用いたシステムの確立を試みた。ジェノグラフトの作製は 2 種類の方法を用いて行った。一つは手術検体のがん組織を細切後、シャーレ内で培養を行い株化した後、SCID マウスに移植を行う方法である(細胞株ジェノグラフト)。この方法により乳がん 3 株、膵がん 12 株のジェノグラフトモデルを作製した。もう一つの方法として、手術検体のがん組織を細切し SCID マウスに移植を行う方法をとった(ダイレクトジェノグラフト)。この方法では株化というプロセスを経ないため、より原発性腫瘍の生体内での性質を反映できるものと考えられる。この方法により膵がん 19 例のダイレクトジェノグラフトモデルの作製を完了した。また脾内移植法による肝転移モデルの作製を行い、肝転移モデル 4 例を確立した。

構築した評価システムの全体像を図 124 に示す。今回開発した評価法では、「がん細胞を用いた評価システム」を用いて高発現細胞株の選択を行い、「組織アレイによる評価システム」を用いて、標的分子組織レベルでの発現を確認することにより、抗体の特異性の評価を行う。また上記において選択された高発現株を用いることにより、細胞レベルでの殺細胞効果を評価し、「*in vivo* 評価システム」でジェノグラフトモデルを用いた個体における治療効果を評価することにより、新規抗体の抗腫瘍効果の評価を行う。このように、今回開発した評価システムを用いることにより、抗体の体系的評価が可能となった。

機能抗体の体系的評価法の確立

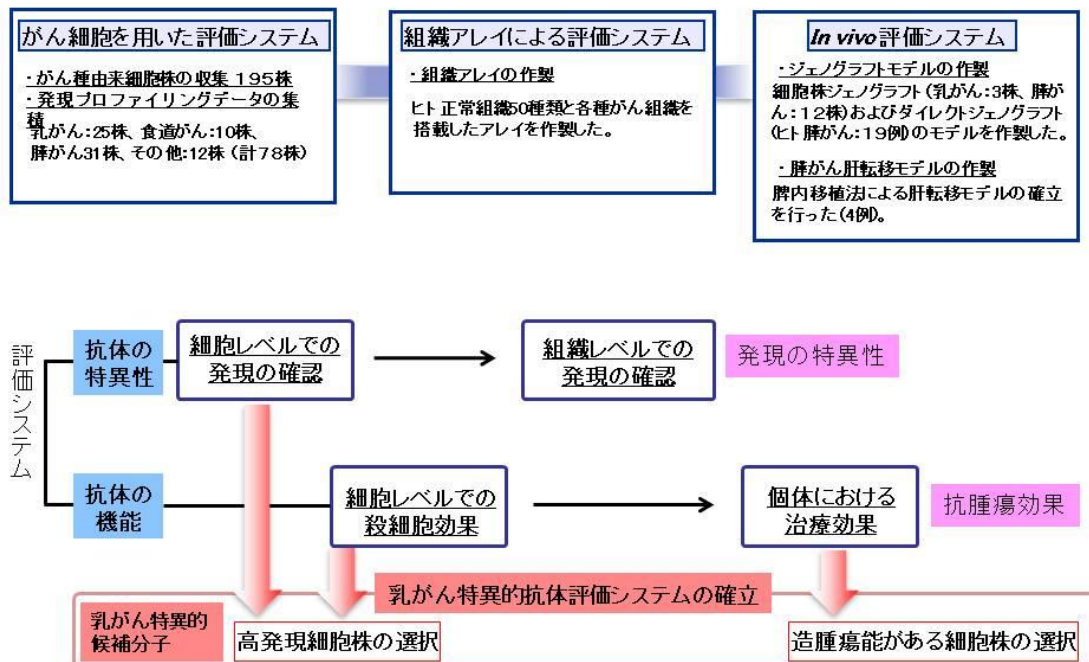


図 124 構築した評価システムの全体像

③-2-1 高親和性抗体を用いたターゲットドプロテオミクスによる複合体解析

(JBA 駒場分室(あすか製薬(株)、興和(株)、(株)ペルセウスプロテオミクス)、JBA つくば分室(JSR)、東京大先端研)

核内受容体は、結合するリガンドに依存して標的遺伝子群の転写を活性化したり抑制したりして、高等生物の分化・発生、個体機能維持など様々な役割を果たしているが、その制御においては受容体・リガンド複合体に対して刺激に応じて結合する様々なコファクター(転写共役因子)が存在することが分かっている。これらを同定することは核内受容体を標的とする創薬において重要な手がかりとなる。そのため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な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 dish 1枚程度の細胞から複合体を同定している(図 125)。

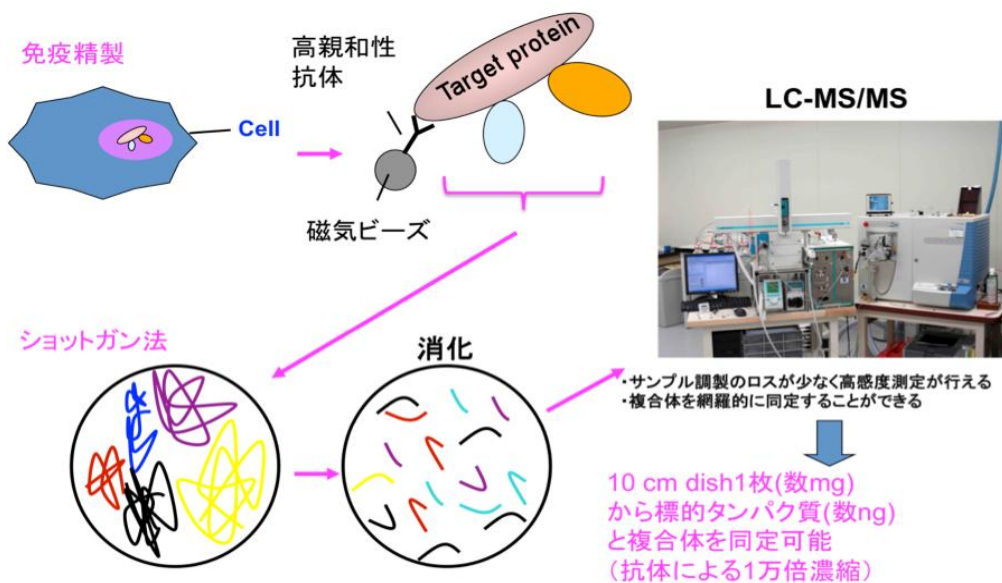


図 125 ショットガンプロテオミクスによる複合体解析

HNF4α は主に肝臓で発現しており脂質・グルコース・脂肪酸の代謝・発生・分化に関わる閥内受容体である。HNF4α 抗体を用いた解析では転写に関わるタンパク質や DNA 結合タンパクが多数同定されている(図 126)。

#	Bio View Identified Proteins (77)	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	
				Control	HNF4α
1	★ Hepatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF-4-alpha)	P41235	53 kDa	★	37
2	★ DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (p460)	P78527	469 kDa		39
3	★ Tubulin alpha-1C chain (Tubulin alpha-6 chain) (Alpha-tubulin 6)	Q980E3	50 kDa	★	3
4	★ Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (EC 2.4.2.30) (PARP-1)	P09874	113 kDa		2
5	★ FACT complex subunit SPT16 (Facilitates chromatin transcription complex subunit SPT16)	Q9Y589	120 kDa		12
6	★ FACT complex subunit SSRP1 (Facilitates chromatin transcription complex subunit SSRP1)	Q08945	81 kDa		9
7	★ Hepatocyte nuclear factor 4-gamma (HNF-4-gamma)	Q14541	46 kDa	★	8
8	★ Histone H4	P62805	11 kDa		8
9	★ ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2 (EC 3.6.1.-)	P13010	83 kDa		9
10	★ ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	P12956	70 kDa		9
11	★ WD repeat-containing protein 5 (BMP2-induced 3-kb gene protein)	P61964	37 kDa		3
12	★ RuvB-like 2 (EC 3.6.1.-) (48 kDa TATA box-binding protein-interacting protein)	Q9Y230	51 kDa		7
13	★ Histone H2B type 1-K (H2B K) (HIRA-interacting protein 1)	O60814 (...)	14 kDa	★	5
14	★ Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 (EC 3.6.1.-) (DEAD box protein 17)	Q92841	72 kDa	★	5
15	★ Transformation/transcription domain-associated protein (PAF350/400)	Q9Y4A5	438 kDa		8
16	★ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) (GAPDH)	P04406	36 kDa		3
17	★ Histone chaperone ASF1A (Anti-silencing function protein 1 homolog A)	Q9Y294	23 kDa		3
18	★ Splicing factor, proline- and glutamine-rich (Polypyrimidine tract-binding protein-associated-splicing factor)	P23246	76 kDa		5
19	★ WD repeat-containing protein 18	Q9B38	47 kDa		3
20	★ 78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP 78)	P11021	72 kDa		4
21	★ 60S acidic ribosomal protein P0 (L10E)	P05388	34 kDa		4
22	★ RuvB-like 1 (EC 3.6.1.-) (49 kDa TATA box-binding protein-interacting protein)	Q9Y265	50 kDa		4
23	★ DNA ligase 3 (EC 6.5.1.1) (DNA ligase III)	P49916	103 kDa		3
24	★ Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	P60709 (...)	42 kDa		3
25	★ Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1 (Modulator of non-genomic activity of estrogen receptor) (Transcription factor HMX3)	Q8I2L8	120 kDa		4
26	★ Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8)	P11142	71 kDa		3

図 126 HNF4α 複合体の解析

これらのデータは内在性の HNF4α と相互作用しているタンパク質を同定するもので、これまでのタグをつけて強制発現により相互作用候補タンパク質を同定しているプロテオミクスとは異なる。内在性の HNF4α を調べることにより、複数の新規リン酸化サイト

が見つかり、またオルタナティブスプライシングによって生ずる複数のアイソフォームとのヘテロ 2 量体を形成していることが明らかとなった。

これらのことから核内受容体 HNF4α は多種類の複合体を形成することによってより繊細な転写調節を行っていることが推測された。このような転写調節の機構を明らかにするためには、相互作用しているタンパク質の量比を求め、刺激後のダイナミックな変化を同定する必要がある。定量プロテオミクスとしては、現在安定同位体を用いてラベルする方法が用いられているが、継時的な変化を測定しダイナミックな調節機構を計測するには非ラベルの方法により定量することが望ましい。

そこで、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。これにより下図に示すように、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。

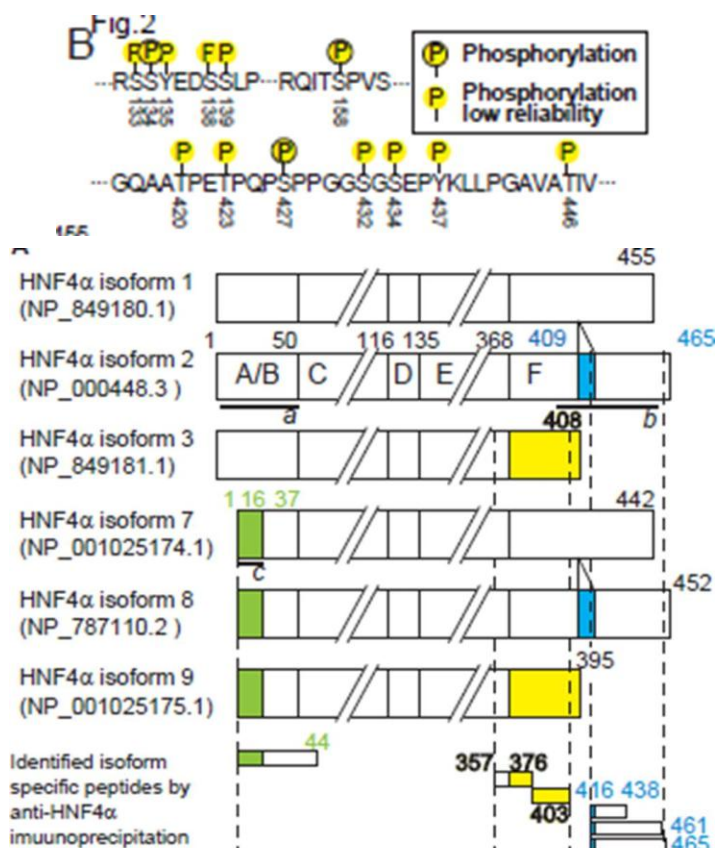


図 127 転写コアクチベーターやコリプレッサーの複合体の仮説

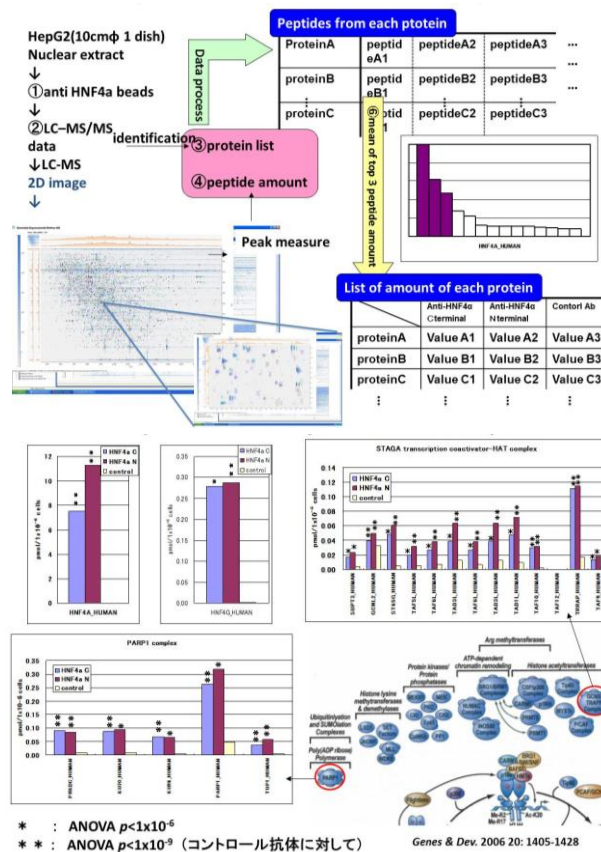


図 128 HNF4α の複合体の解析

副作用が少ない治療薬の開発には複合体の解析が必須であると考えられる。脂肪細胞を用いた複合体解析により既知の PPAR γ 複合体構成成分の RXR α の他に RXR β や mRNA プロセッシングに関わる多くのタンパク質が同定された。

1) プロテオミクスデータのノンラベル定量解析法について

これまでの複合体解析は質量分析による同定タンパクをコントロール抗体との比較によって行った物である。しかし核内受容体の様に複合体の構成変化で転写制御を行っている系ではそのダイナミズムを解析する必要がある。この手法を用いて多群解析もすでに検証済みでありリガンド刺激や分化、細胞周期による複合体変化を時系列で解析可能である。また同定ベースの手法と比べシグナルベースの解析ではペプチド配列に帰属できない有為なシグナルが多数得られる。これらの多くは機能的に重要な翻訳後修飾を含むと考えられる。

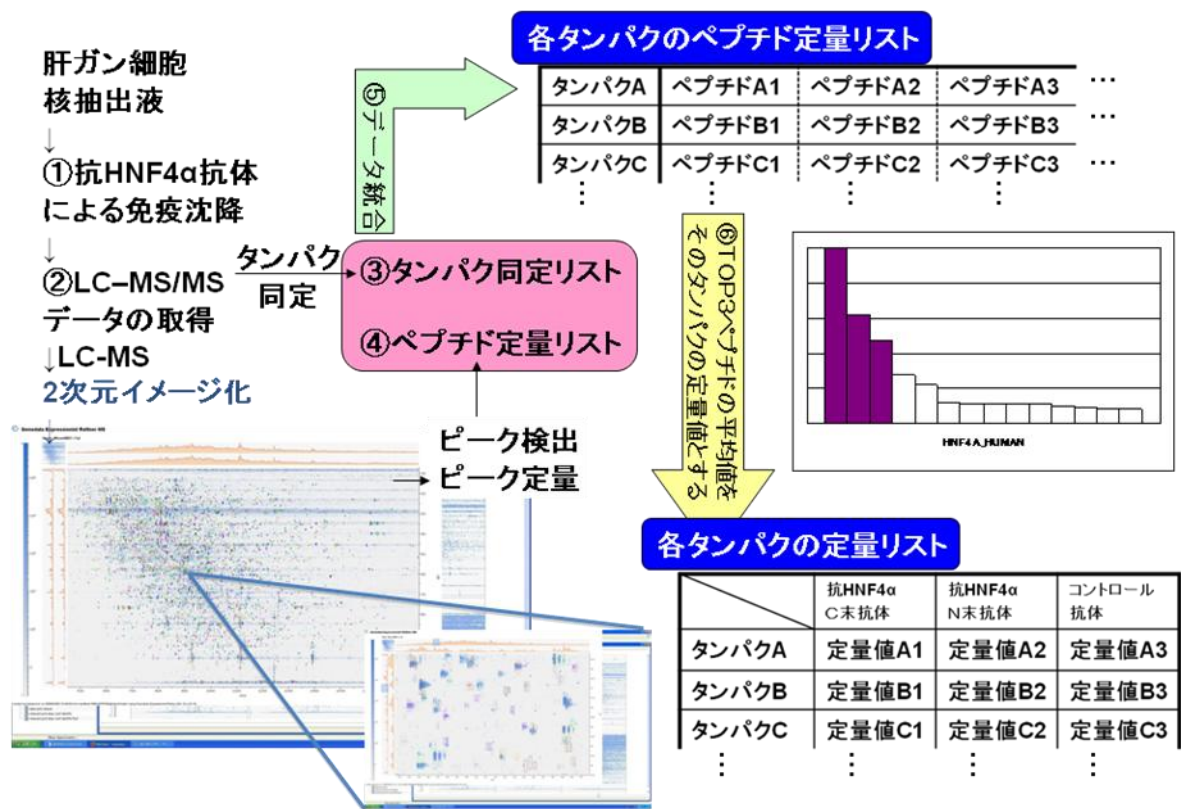


図 129 HNF4α 複合体の定量プロテオミクス解析

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、プレセニリン、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リニン、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

A)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

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ートープについて、130項目で抗体を樹立した(下表)。バキュロウィ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。

表 14 樹立した抗体の内訳

癌関連	55
心血管疾患関連	28
糖尿病代謝疾患関連	27
骨運動器疾患関連	3
脳神経	4
筋萎縮症関連	10
炎症系疾患関連	3
合計	130

B)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。

④ICOS 法を用いた癌治療用ヒト抗体単離技術開発

(藤田保健衛生大学総合医科学研究所)

④-1 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。表 15 に示す 49 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、結局二千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ー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つた。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IP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つた。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プ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 16 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。

④-2 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。なぜこのようなことが起こりうるかについて、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イ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 に対するエルビタックス、HER2 に対するハーセプチン、CD20 に対するリツキサンのこれに相当する。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Vド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、IgG 1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常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 130 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ビタックスやベクチビックスに対して、我々のクローンが抗腫瘍効果を示す例も見つかる。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観察されたことで重要な点は、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った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イーブ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は、肝癌、腎癌、膵癌、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。

表 1 5 スクリーニングに用いた11種類の癌種由来の細胞株 (49種類)

肝癌	HepG2, Nuk-1, OCTH-18, Hep3B, HLF, RBE and clinical samples
腎癌	Caki-1, CCF-RC1, ACHN
膵癌	PANC-1, MIA PaCa-2, BxPC-3, Capan-1
肺癌	A549, PC-14, NCI-H441, Calu-3, EBC-1, RERF-LC-AI, LK-2, VMRC-LCP
大腸癌	Caco-2, CW-2, SW480, HT-29
胃癌	MKN-45, NCI-N87, SNU-5, KATO III
卵巣癌	SKOv3, KF28, RMG-1, RMG-2
乳癌	BT474, MCF7, MDA-MB-231, CPL1500, YMB-1
前立腺癌	PC-3, DU-145, LNCapFGC, 22Rv1
メラノーマ	MMAc, HMV-II, G-361, CRL1579
グリオブラストーマ	U-87MG, T98G, A172, YKG1

表 1 6 プロジェクトで同定した癌特異抗原(32種類)と単離したヒトモノクローン抗体(555種類)

<u>Growth factor receptor</u>		<u>Adhesion molecule (IgSF)</u>		<u>Adenosine metabolism</u>	
EGFR	12	CADMI/IGSF4	29	CD73	1
HER2	22	ALCAM/CD166	13	<u>Complement inhibitor</u>	
HGFR	84	ICAM-1/CD54	25	MCP	101
PTK7/CCK-4	1	Lu/BCAM	49	<u>Protease inducer</u>	
EphA2	26	CEACAM6	1	EMMPRIN	5
IGF1R	3	CEA	2	<u>Prostate-specific antigen</u>	
PDGFR	3	JAM-A	2	PSMA	1
<u>Tyrosine phosphatase</u>		MCAM/MUC18/CD146	22	<u>Iron metabolism</u>	
PTP-LAR	46	<u>Adhesion molecule (Non IgSF)</u>		TIR	15
<u>Integrin family</u>		CD44	13	<u>Apoptosis inducer</u>	
α 3 β 1	16	EpCAM	3	TRAILR2	7
α V β 3	7	<u>Tetraspanin</u>		<u>Complement receptor</u>	
α 6 β 4	5	CD9	1	C1qR	2
α 2 β 1	1	<u>Tetraspanin partner</u>			
<u>Anoikis regulator</u>		PTGFRN(CD9P-1)	3		
CDCP1	31				

表 1 7 IgG化した抗体でモニタリングに提供された抗体一覧

抗体番号	抗体名称	認識抗原	抗体が示す作用(確認済み)
1	048-006	EGFR	強い抗腫瘍活性(in vitro,in vivo)
2	067-213	CD73(NT5E)	強い抗腫瘍活性(in vitro,in vivo)
3	059-053	CD147(EMMPRIN)	強いADCC誘導活性、in vivo抗腫瘍活性
4	028-179	TIR	強い抗腫瘍活性(in vitro,in vivo)
5	052-138	TIR	強い抗腫瘍活性(in vitro,in vivo)
6	076-048	IgSF4	ATL細胞に対し増殖阻止効果
7	029-028	EpCAM	強いADCC誘導活性、in vivo抗腫瘍活性
8	059-173	EGFR	強い抗腫瘍活性(in vitro,in vivo)
9	064-139	Intergrin α V β	強い細胞増殖阻止効果
10	067-153	EpCAM	強いADCC誘導活性、in vivo抗腫瘍活性
11	079-085	PTPRF	細胞増殖阻止効果
12	026-001	Intergrin α V β	強い細胞増殖阻止効果
13	035-212	IgSF4	ATL細胞に対し増殖阻止効果
14	051-054	IgSF4	ATL細胞に対し増殖阻止効果
15	055-237	CD44	強い細胞増殖阻止効果
16	057-024	CDCP1	強い細胞増殖阻止効果
17	058-069	CDCP1	強い細胞増殖阻止効果
18	066-166	CDCP1	強い細胞増殖阻止効果
19	015-126	Her-2	強い細胞増殖阻止効果
20	057-091	EGFR	強い抗腫瘍活性(in vitro,in vivo)

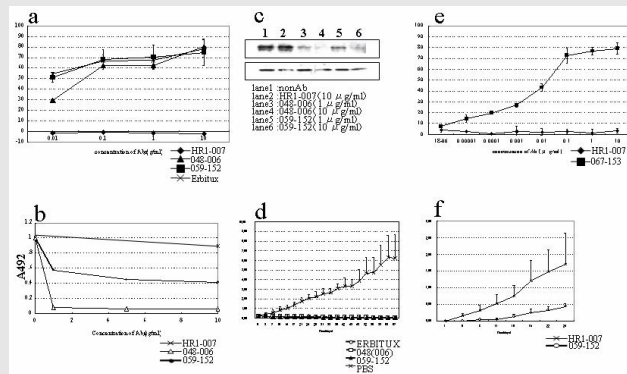


図 130 抗 EGFR 抗体及び抗 EpCAM 抗体の抗腫瘍活性

④オリゴクローナル抗体創製技術開発

(協和発酵キリン株式会社)

【研究の目的】

すでに、モノクローナル抗体は様々な疾患に対する治療薬として承認されており、その有効性が実証されている。しかしながら、臨床のニーズを満たすには活性が不十分であることもわかってきており、さらに強力な活性をもつ抗体医薬品の創製が望まれている。抗体医薬品としての機能を強化する有力な方法のひとつとして、複数の抗体を混合した、オリゴクローナル抗体、ポリクローナル抗体が考えられる(図 131)。個々の抗体の特性を同定しないポリクローナル抗体に比べ、オリゴクローナル抗体は、比較的少数の抗体の混合物である。特定の抗原、エピトープを認識する抗体を選抜して混合することにより、より強い効果を得ることができる可能性があり、同定された抗体を混合するため、ロット間のばらつきが少なく、ポリクローナル抗体に比べ安全性に優れていると考えられる。しかしながら、現時点では、どのような組み合わせの抗原、抗体が生物活性の増強をもたらすのか、ほとんど研究されていない。本研究においては、オリゴクローナル抗体の活性増強機構を解析し、効率的にオリゴクローナル抗体を作製する技術の開発を行った。

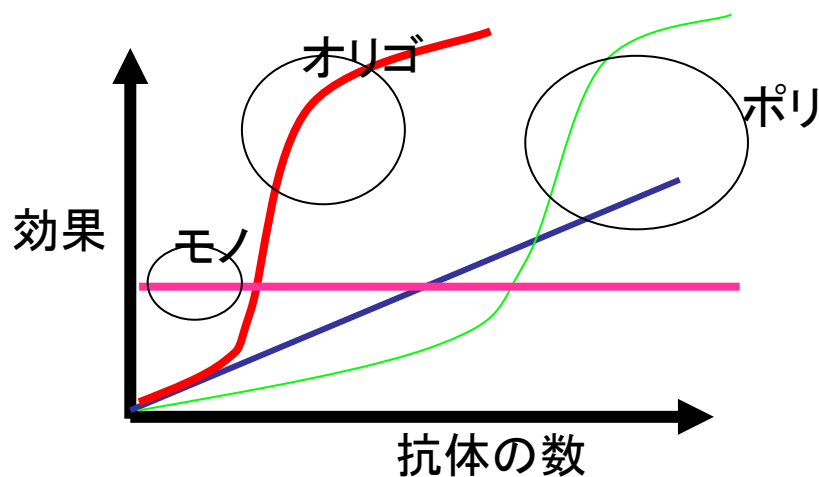


図 131 オリゴクローナル抗体の概念

オリゴクローナル抗体医薬品(エピトープ特異性の異なる複数の抗体の混合物)を作製する場合、単一抗原に対するものと、多抗原に対するものが考えられる。まず単一抗原に対する効果を解析するために抗原 A を選択した。オリゴクローナル抗体の選抜のためには、抗原蛋白質のいろいろなエピトープを認識する抗体の“パネル”を作製する必要がある。このために、抗体の結合部位を効率良く分類し、取得しづらい抗体を得るための抗原の作製が不可欠となる。抗体の取得方法としては、通常ハイブリドーマを用い

る方法を採用した。抗原は最終的に A, B, C, D, E, F, G, H, I, J の 10 種類についてマウスに免疫を実施し、抗体の取得を試みた。まず最初に、抗原 A について注力的に抗体を取得し、解析を実施した。その結果、抗体の混合により CDC 活性の増強が著しく増強し、産業上の利用を考慮した場合有望であると考えられたため、その他の抗原については、数個の抗体で CDC 活性の増強の有無を調べるという手法をとり、研究を進めた。

1) モデル抗原 A に対する抗体の取得と評価

【抗体の取得とエピトープ解析】

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。

上記スクリーニングで選抜された 29clone は eRDF 培地に馴化し、MabSelect を用いてその培養上清から Fc fusion 可溶化タンパクの精製と同様の方法でマウス抗 hEGFR-ECD モノクローナル抗体を精製した。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。まず、抗原 A-GST 融合蛋白質をキャプチャーするために GST capture kit (Biacore)に含まれる抗 GST 抗体を amino coupling kit (Biacore)によって CM5 センサーチップに固相化した。抗原 A-GST をインジェクションした後、精製モノクローナル抗体を 1st Ab としてインジェクションした。さらに、1st Ab と同じドメインを認識する別クローンの精製抗体を 2nd Ab としてインジェクションし、センサーグラム上の RU 値の上昇によって競合の有無を評価した。

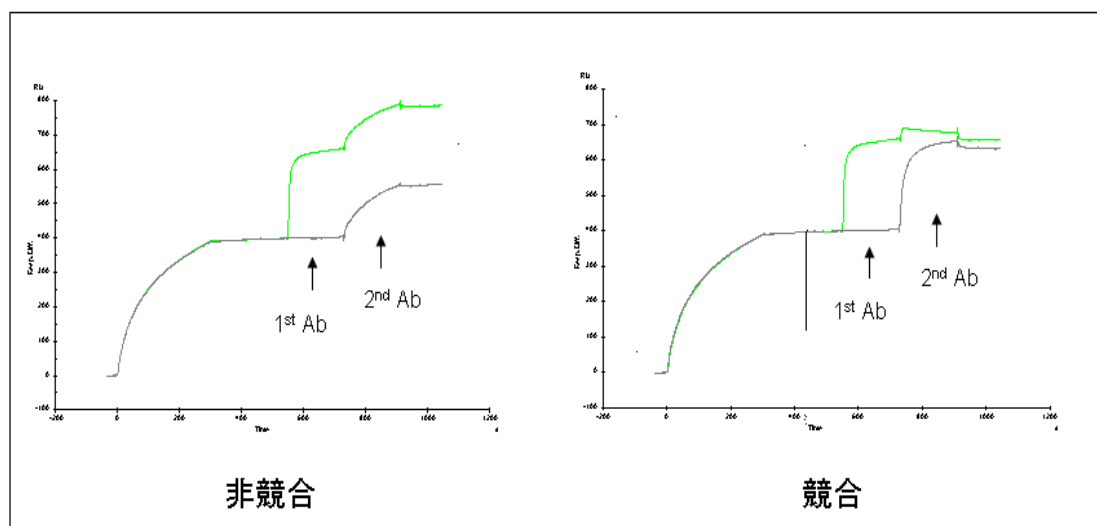


図 132 Biacore を用いた抗体の競合試験

2nd 抗体のセンサーグラムの RU 値の上昇により、競合、非競合を判断した。

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 (表 18)。

表 18 競合試験の結果

	2 nd antibody						
		AA	AB	AC	AD	AE	AF
1 st antibody	AA		—	—	—	—	—
	AB	— ^a		+	—	—	—
	AC	—	+ ^b		—	—	—
	AD	—	—	—		—	—
	AE	—	—	—	—		—
	AF	—	—	—	—	—	

a 競合 < 30%

b 競合 > 30%

【キメラ抗原を用いた結合部位の詳細な解析】

オリゴクローナル抗体の活性増強機構を解析するために、エピトープ解析を実施した。機能的抗体は、タンパク質の高次構造を認識するが多いため、抗原タンパク質の結晶構造に基づいて、マウス・ヒトキメラ抗原を作製し、その結合様式から、結晶構造上のどの部分に抗体が結合するか調べた。キメラ抗原をデザインするためのプログラムを開発した。立体構造情報から、標的領域の C α 元素(CA)の重心を求める。次にランダムに作成した平面のどちら側に各 CA が存在するか調べ、パターンベクトルとして 1 または -1 を与える。そして類似の平面を除くためにパターンベクトル M_i, M_j について以下のスコアを計算する。

$$Sim(M_i, M_j) = \frac{1}{N} |M_i \cdot M_j| = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N M_i(k) M_j(k)$$

ここで N は総残基数である。Sim スコアは 0 から 1 の間の値をとり、二つの平面の分割パターンが異なるほど 0 に近づく。この Sim スコアの閾値を設定し、既に採択されている平面とは異なる分割パターンを示す平面を抽出する。このようにして最初の平面を選んだ後、各平面に対して相互に直交する平面を抽出し、標的タンパク質の切り分けを行なう。このプログラムを用いて、抗原 A においてキメラタンパク質を 12 種作製し、選抜した 6 個の抗体についてエピトープ解析を実施した (図 132)。

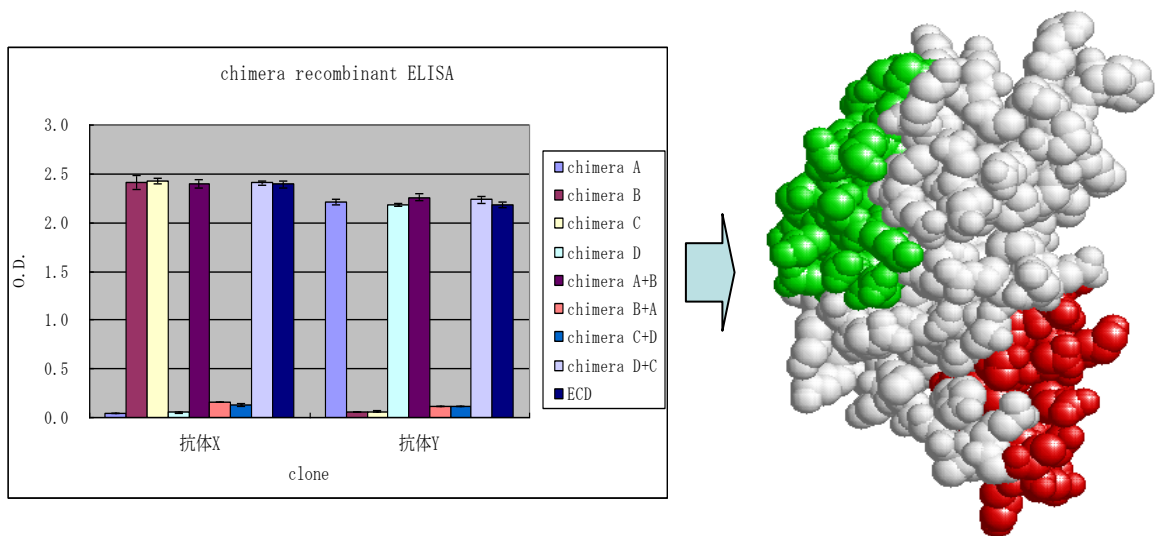


図 133 キメラ抗原を用いた、CDC 活性を増強する抗体の抗原結合部位推定の例。赤と緑の部分が 2 つの抗体の結合部位を示す。

2) 抗原 A に対するオリゴクローナル抗体の活性評価

【オリゴクローナル抗体の活性評価】

CDC 及び ADCC 活性を評価するため、選択された 6 抗体はすべて抗体可変領域のクローニングを行い、ヒト IgG1 定常領域と遺伝子工学的に連結した、キメラ抗体として発現・精製し、各種活性を評価した。評価項目として、1. 親和性、2. リガンド結合抑制活性、3. ADCC 活性、4. CDC 活性、5 細胞増殖抑制活性を調べた。結合については、可溶性抗原をもちいて ELISA (図 134A)、もしくは BiaCore(表 18)で解析を行った。抗体は 10^{-7} から 10^{-9} 程度の KD 値を示した。これは、いろいろなエピトープを認識する抗体を取得するため、自己免疫マウスを用いたため、アフィニティマチュレーションが十分ではなかった可能性が考えられる。リガンドの阻害活性 (図 134B) については既存抗体と同程度の活性を示すものもあった。マウスポリクローナル抗体により、リガンド阻害活性を調べたところ、高濃度においても完全に抑制来ることではできなかった。これは、リガンドの結合は各抗体の活性の平均値を取る傾向があるためであると考えられ、ポリクローナル抗体中に含まれる中和抗体の存在比率や、活性の強さが反映しているためであると考えられた。

ADCC 活性、CDC 活性を測定する前に、まず抗原の発現量を 16 種のヒト腫瘍株で解析を行い、その中から、抗発現の細胞株 (A431) と中発現の細胞株 (Colo205) をそれぞれ 1 種類選択し (図 135) 評価に使用した。

まず、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 (図 136)。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。

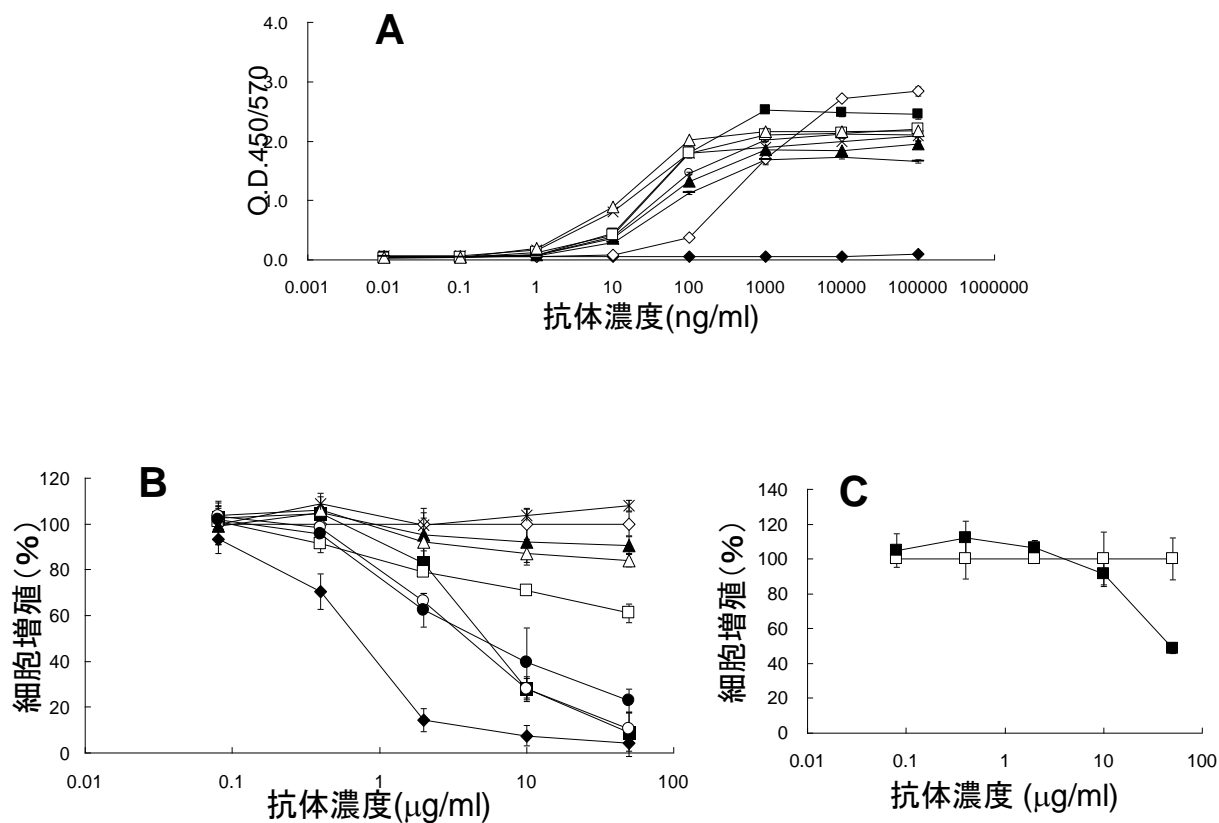


図 134 抗抗原 A 抗体の機能評価

A: 可溶性抗原に対する結合活性を ELISA により評価した

B: リガンド阻害活性。精製したキメラ抗体のリガンド阻害活性を調べた。

ビオチン化したリガンドを抗原発現細胞に添加し、抗体存在下でインキュベート後、HRP-結合アビジンと作用し、酵素反応により活性を評価した。コントロール抗体を 100% として活性を表示した。C: ポリクローナル抗体のリガンド阻害活性評価。マウス数十匹を免疫し、精製した抗抗原 A ポリクローナル抗体のリガンド阻害活性を調べた。コントロール IgG(◇), 既存抗体(◆), 6 抗体混合(■), AA(□), AB(▲), AC(△), AD(○), AE(●), AF(*)

表 19 抗 A 抗原抗体の特性

抗体名	リガンド 結合阻害 ^a	アゴニスト活性 ^b	親和性(mol/L)	
			マウス	キメラ
AA	+	-	5.11×10^{-8}	1.19×10^{-7}
AB	-	+++	2.88×10^{-7}	2.34×10^{-8}
AC	-	++	9.16×10^{-8}	3.22×10^{-7}
AD	++	-	1.61×10^{-8}	6.58×10^{-9}
AE	++	-	1.40×10^{-7}	5.66×10^{-8}
AF	-	-	6.87×10^{-7}	3.22×10^{-7}
既存抗体	+++	-	-	1.40×10^{-9}

a リガンド結合阻害活性: - = 抗体濃度 50 μ g/ml で 40%以下の阻害; + = 抗体濃度 50 μ g/ml で 40%以上の阻害; ++ = 抗体濃度 10 μ g/ml で 40%以上の阻害; +++ = 抗体濃度 2 μ g/ml で 40%以上の阻害

b アゴニスト活性; - = コントロール IgG1 と同等; + = リガンドより弱い; ++ = リガンドと同等

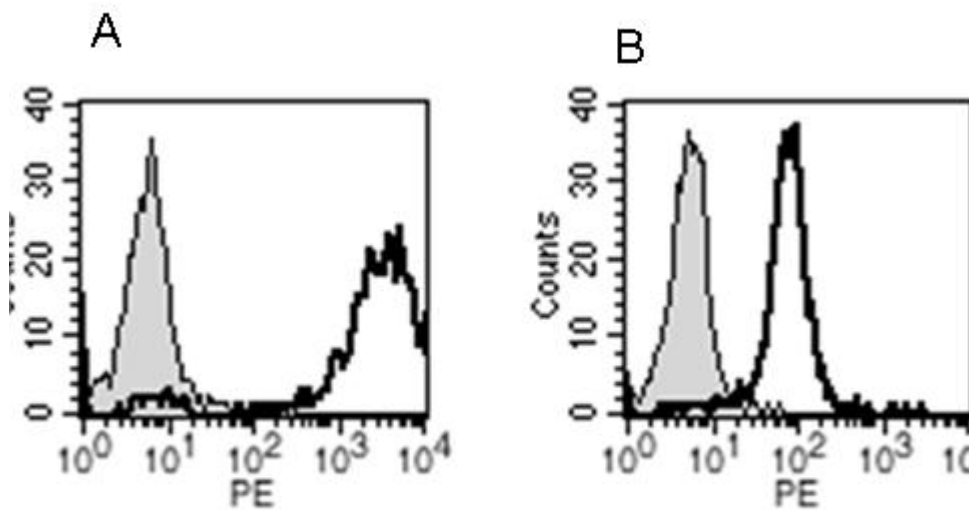


図 135 抗 A 抗体 (AA) の FACS 解析。ADCC 活性、CDC 活性を調べた 2 種類のヒト腫瘍株に対して、抗原の発現を調べるために、FACS 解析を実施した。

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 (図 138)。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 139 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 活性の場合は、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。

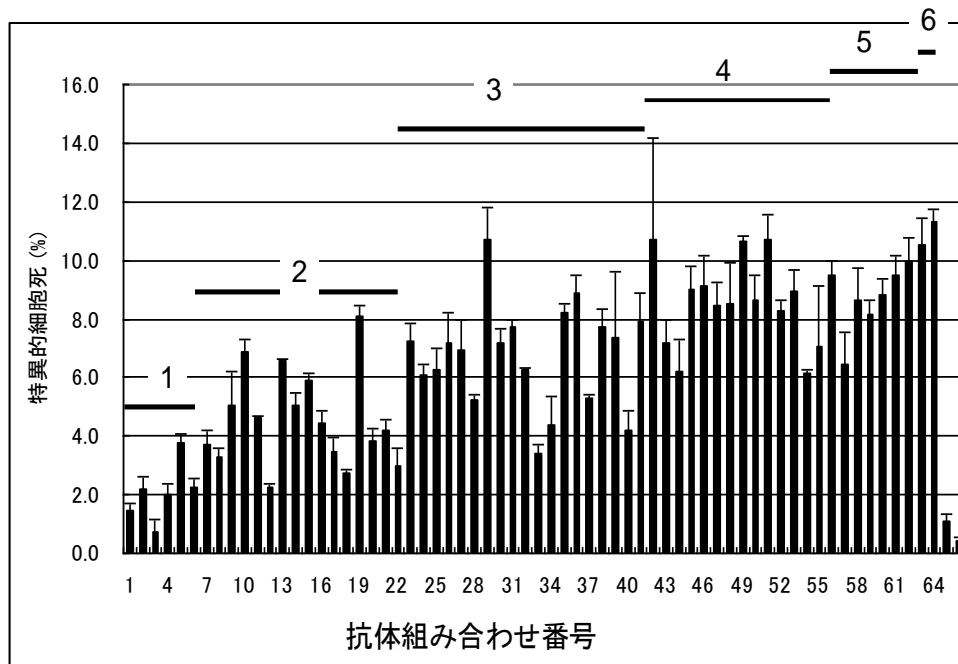


図 136 抗抗原 A 抗体の抗体の混合による ADCC 活性の増強。抗原 A を中程度発現する Colo205 細胞を標的細胞として、ADCC 活性を評価した。抗体の最終濃度は、 $1 \mu\text{g/ml}$ 、エフェクター細胞と ^{51}Cr を取り込ませた標的細胞の混合比は 25:1 で実施した。抗体とエフェクター細胞を添加・混合後 37°C で 4 時間培養した後、 ^{51}Cr のリリースを測定した。図中に示した数は抗体の混合数を示す。細胞障害活性の割合は、以下の計算式によって算出された。 $\% \text{ specific lysis} = (\text{experimental cpm} - \text{spontaneous cpm}) / (\text{maximal cpm} - \text{spontaneous cpm}) \times 100$.

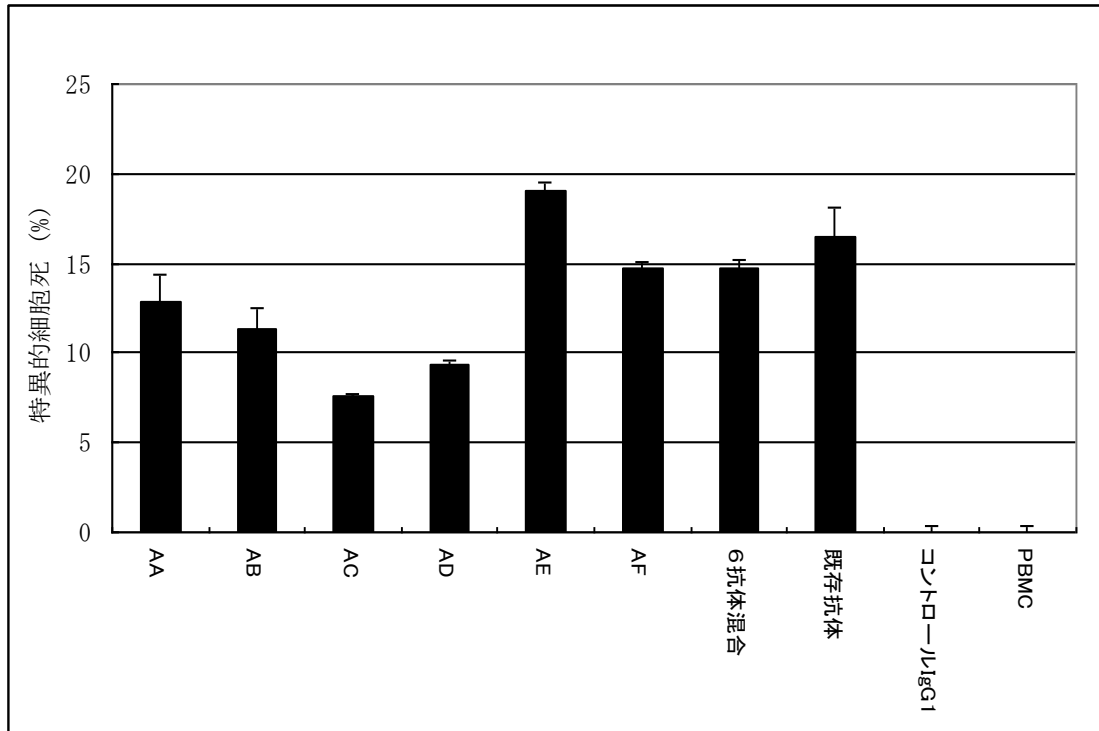


図 137 抗抗原 A 抗体の抗体の混合による ADCC 活性の増強。抗原 A を中程度発現する A431 細胞を標的細胞として、ADCC 活性を評価した。抗体の最終濃度は、1 μ g/ml, エフェクター細胞と ^{51}Cr を取り込ませた標的細胞の混合比は 25:1 で実施した。抗体とエフェクター細胞を添加・混合後 37 $^{\circ}\text{C}$ で 4 時間培養した後、 ^{51}Cr のリリースを測定した。図中に示した数は抗体の混合数を示す。細胞障害活性の割合は、以下の計算式によって算出された。 $\% \text{ specific lysis} = (\text{experimental cpm} - \text{spontaneous cpm}) / (\text{maximal cpm} - \text{spontaneous cpm}) \times 100$.

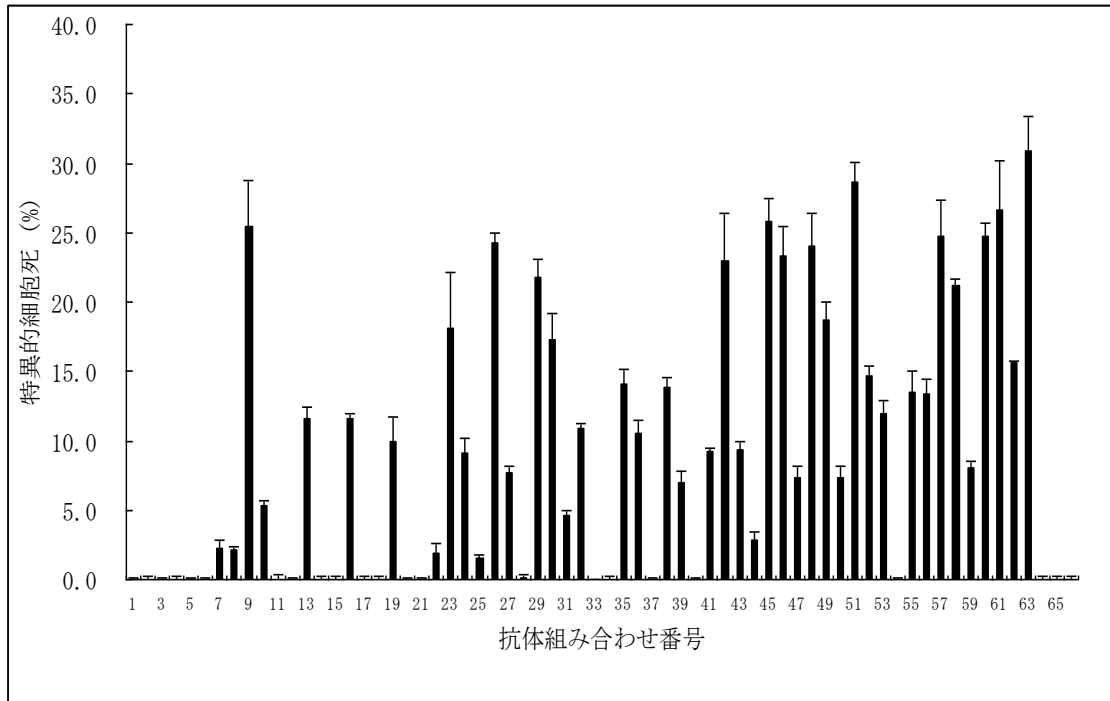


図 138 A431 細胞をもちいて、6 種の抗体を単独、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個混合した場合の CDC 活性を測定した。A431 (1×10^6) を $50 \mu\text{Ci}$ (1.85MBq) の ^{51}Cr と共に 37°C 1 時間インキュベートしラベルした。洗浄後、culture medium によって $5 \times 10^5/\text{ml}$ に調製した。抗体 (最終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ $100 \mu\text{l/well}$) とラベルされた A431 ($50 \mu\text{l/well}$) を V bottomed microtiter plate (Corning International K.K.) に添加した。Final 5% human serum ($50 \mu\text{l/well}$) を添加することによって反応を開始した。 37°C 2 時間インキュベーション後、遠心分離し ^{51}Cr を含む上清 $50 \mu\text{l}$ を Lumaplate (PerkinElmer Co., Ltd.) に移し乾燥させた。 ^{51}Cr リリースは、cpm として測定された。細胞障害活性の割合は、以下の計算式によって算出された。

$$\% \text{ specific lysis} = (\text{experimental cpm} - \text{spontaneous cpm}) / (\text{maximal cpm} - \text{spontaneous cpm}) \times 100.$$

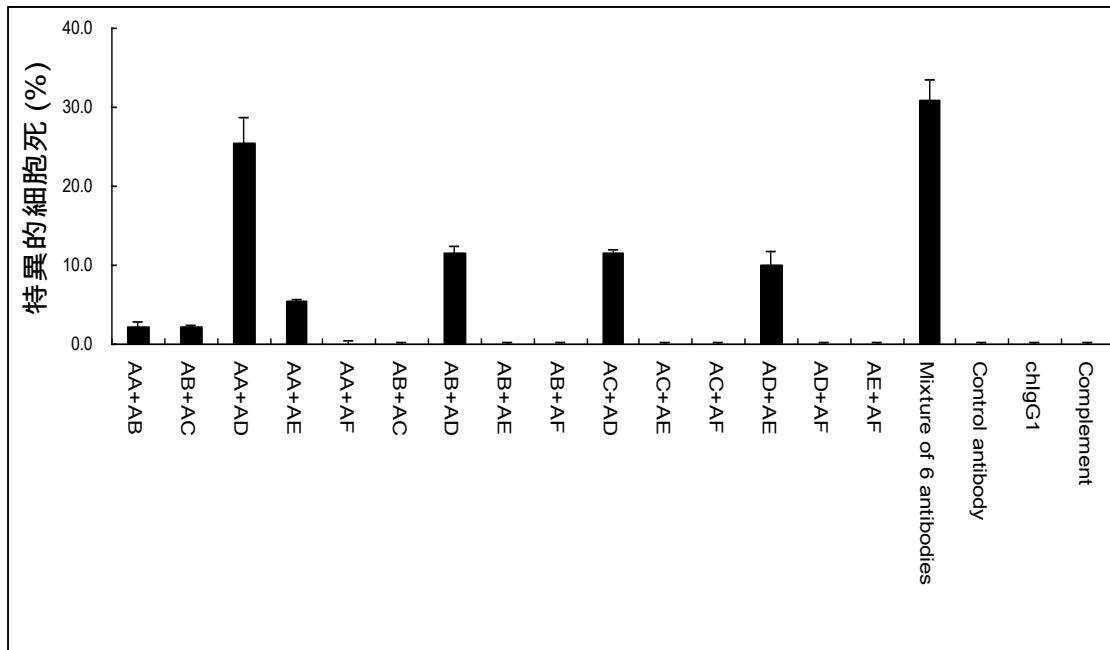


図 139 A431 細胞を用いて 抗体 2 つ混ぜた 15 組の組み合わせと 6 個すべて混ぜた場合の CDC 活性の比較。試験は図 138 の方法によって実施した。

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

抗原 A を特異的に認識する抗体のうち、AA、AB、AC、AD、AE について Fab を調製し、結晶化実験を実施した結果、AD を除く 4 種類の Fab の結晶化に成功した。

それぞれの抗体の結晶化条件を以下に示す。

AA: : 20% PEG3350, 1% Tryptone, 0.05M HEPES pH7.0 (PEG/ION-II 48)

AB: : 20 % (w/v) PEG3350, 8 % (v/v) Tacsimate (pH7.0) (PEG/ION-II 16) および 20% PEG3350, 0.2M Ammonium sulfate (PEG/ION-I 35) 他、2 条件で微結晶を確認した。

AC: : 25% (v/v) MPEG 550, 0.01M Zinc sulfate heptahydrate, 0.1M MES pH6.5,

AE: : 20% PEG3350, 0.2M Ammonium fluoride

いずれの条件でも、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。決定した立体構造を図 110 に示す。

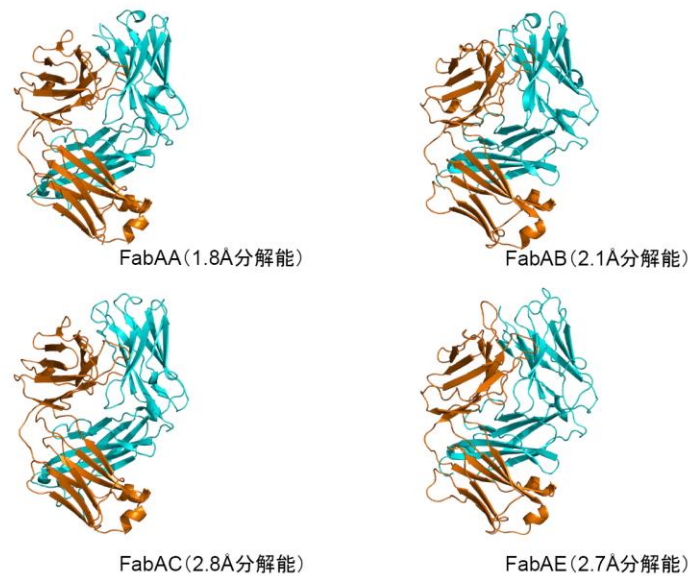


図 140 .オリゴクローナル抗体を構成する各抗体(Fab)の立体構造。抗体の重鎖および軽鎖は各々水色および橙で表示。

Fab/抗原 A 複合体の結晶化

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。

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

抗原 A と Fab との複合体の結晶化実験では、抗原 A に対して、1:1~1:3 までの様々な複合体を調製し、結晶化実験を行った(表 20)。1:3 複合体の結晶化実験では、抗原 A 1分子に対して、CDC 活性が増強する組み合わせと増強がない組み合わせの2種の組み合わせの複合体を調製し、結晶化スクリーニングを実施した。また、1:1:1 複合体の結晶化実験が難航することも想定し、EGF 受容体/Fab 1:1 複合体の結晶化スクリーニングも実施した。

結晶化スクリーニングの結果、1:1:1 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(表 20)。

1 分子の抗原 A に対して、CDC が増強する組み合わせと増強がない組み合わせで、2種の抗体を結合させた 1:1:1 複合体をそれぞれ調製し、結晶化スクリーニングを実施した。

また、1:1:1 複合体の結晶化が難航することも想定し、抗原 A/Fab 1:1 複合体も計 3 種作製し結晶化スクリーニングを実施した。

表 20 EGFR-ECD/Fab 複合体の結晶化実験 (まとめ)

	抗体組み合わせ	CDC 活 性 上昇	調 製	X 線回折実験結果
1:1 複 合 体	抗原 A / Fab(AA)		○	
	抗原 A / Fab(AB)		○	分解能 3.0 Å の反射を確認。
	抗原 A / Fab(AC)		○	
	抗原 A / Fab (AD)		○	
	抗原 A / Fab (AE)		○	
1:2 複 合 体	抗原 A / Fab (AA+AD)	+	○	
	抗原 A / Fab (AB+AD)	+	○	分解能 9.0 Å の反射を確認。
	抗原 A / Fab (AC+AD)	+	○	
	抗原 A / Fab (AD+AE)	+	○	
	抗原 A / Fab (AA+AC)	-	○	
	抗原 A / Fab (AB+AE)	-	○	微量結晶を確認。
1:3 複 合 体	抗原 A / Fab (AA+AC+AD)	+		
	抗原 A / Fab (AB+AD+AE)	+	○	

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 (表 21)。FabAB の部分欠失変異体 del-1 に対する結合と、FabAE の部分欠失変異体 del-3 に対する結合が確認できなかったが、これはエピトープではない領域も抗体結合に影響を与えており、その領域を除いた欠失変異を導入したためと考えられた。複合体形成可能な組み合わせのうち、CDC 活性の顕著な相乗効果が見られる組み合わせ (FabAB-FabAD) と見られない組み合わせ (Fab AB-Fab AC) を選択し、Fab AB/Del-2、FabAC/ドメイン Del-2、Fab AD/ドメイン Del-3 の 3 つの組み合わせについて、複合体を大量調製し結晶化実験を実施した。しかし、現時点ではいずれの複合体においても、結晶は得られていない。

表 21 Fab と部分欠失変異抗原 A との結合および結晶化実験（まとめ）

使用した Fab	抗原 A 部分欠失変異体	ゲル濾過実験 (抗原 - 抗体結合確認)	結晶化実験
Fab AA	Del-1	○	-
Fab AA	Del-2	○	-
Fab AB	Del-1	×	-
Fab AB	Del-2	○	実施
Fab AC	Del-2	○	実施
Fab AD	Del-3	○	実施
Fab AE	Del-3	×	-

オリゴクローナル抗体活性増強機構についての考察

オリゴクローナル抗体による CDC 活性増強機構を考察するために、これまでに得られている抗原 A の構造情報を総括した Fab 複合体モデル構造を作製した。データベース(PDB)に登録されている抗原 A の立体構造に、本プロジェクトで得られたマウス・ヒトキメラ抗原を用いたエピトープ解析の結果を反映させて、オリゴクローナル抗体と Fab の複合体モデルを作成した(図 141)。抗体 AA, AB, AC, AE については、本研究で解析した Fab 単体の立体構造情報を、抗体 AD については構造未決定のために Fab AE の構造情報を使用した。得られたモデルから下記のことが推定できる。

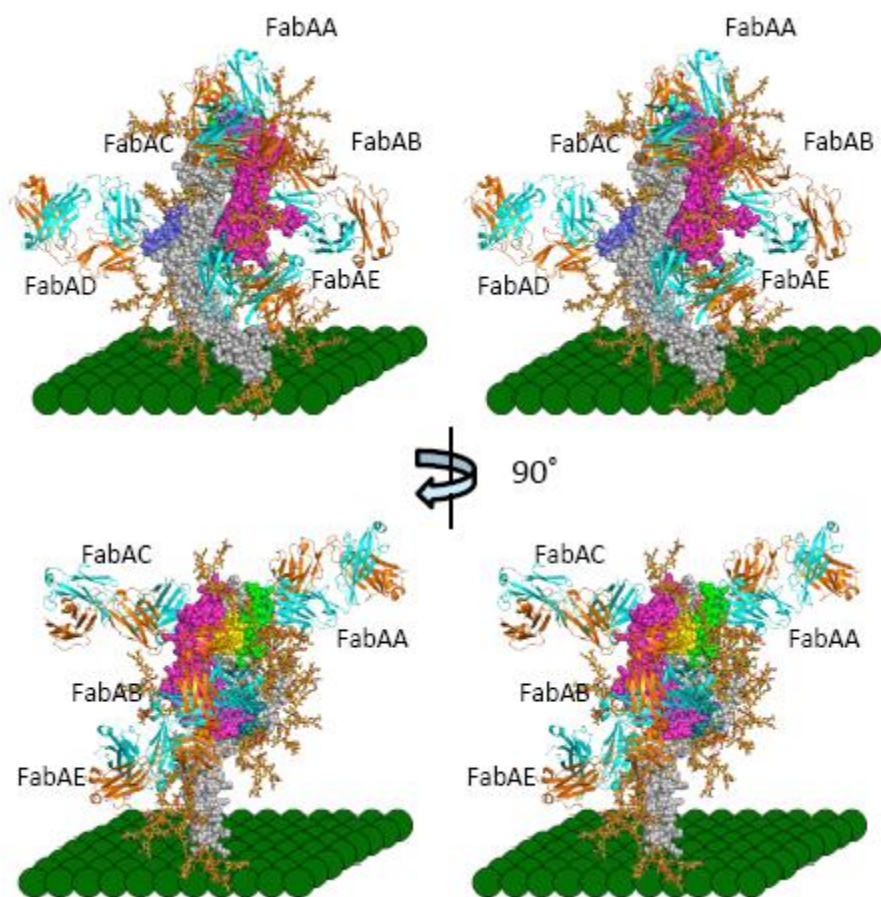


図 141 抗原 A に対するオリゴクローナル抗体(Fab)結合モデル。抗原 A は球状モデル、糖鎖は棒状モデル、抗体はリボンモデルで表示。キメラ体を用いて決定された抗原 A 中の各抗体による認識領域は (AA: 緑、AB: 黄、AC: 赤紫、AD: 青、AE: 青緑) で、抗体の重鎖および軽鎖は各々水色および橙で表示。

抗体 AA(Fab AA)および AD(Fab AD)は、その他の抗体(Fab AB, AC, AE)と空間的に離れた位置で結合する。

- 1) 抗体 AA(Fab AA)および AD(Fab AD)は、細胞膜から見て上側から結合している (Fc の C 末端が上を向いている)。
- 2) 抗体 AA(Fab AA)および AD(Fab AD)は CDC 活性上昇への寄与が高い抗体で、特にこの両者の組み合わせにおいて最も活性向上が見られる。

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。

4) 他抗原への応用の可能性の検討

【抗原 B 抗体の取得と抗原 B に対するオリゴクローナル抗体の CDC 活性評価】

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。競合試験や、機能評価の結果から 4 つの抗体を選択した。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 B 抗体 4 個の単独と 2 つずつ混合した場合の、CDC 活性の評価を行った(図 142)。抗抗原 B 抗体は、抗抗原 A 抗体と同様に単独では CDC 活性は示さなかった。しかしながら、抗抗原 B 抗体に対する抗体を混合した場合は、BD 抗体以外の抗体はどの抗体を組み合わせた場合においても CDC 活性が測定できるようになった。

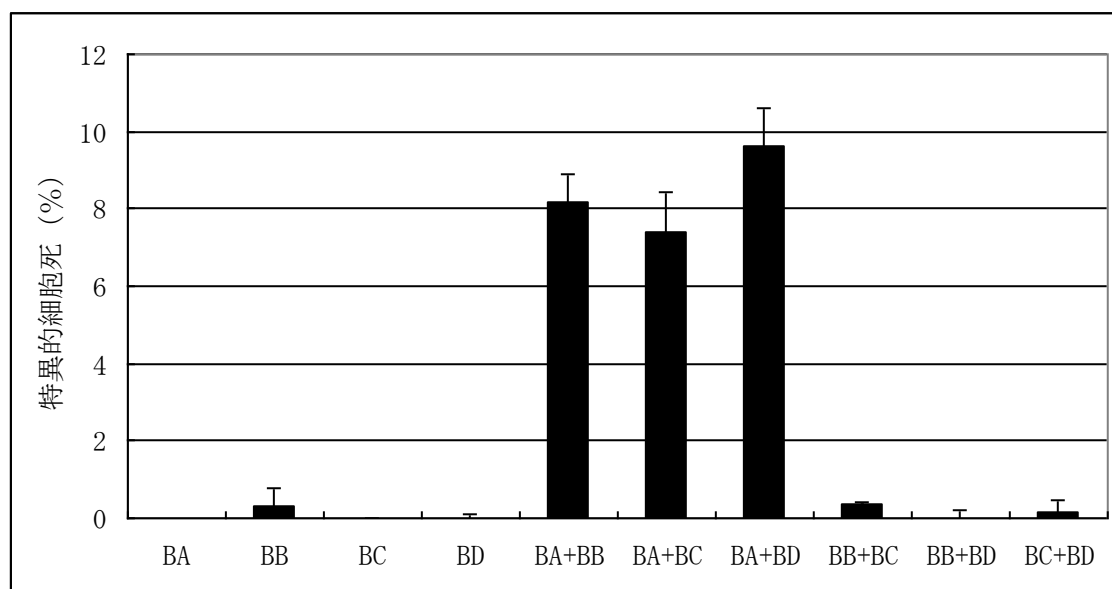


図 142 抗原 B 発現細胞を用いて、抗抗原 B 抗体の CDC 活性を測定した。図 138 に示したものと同様な方法で測定を行った。

【抗原 E,F 抗体の取得と抗原 E,F に対するオリゴクローナル抗体の CDC 活性評価】

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。

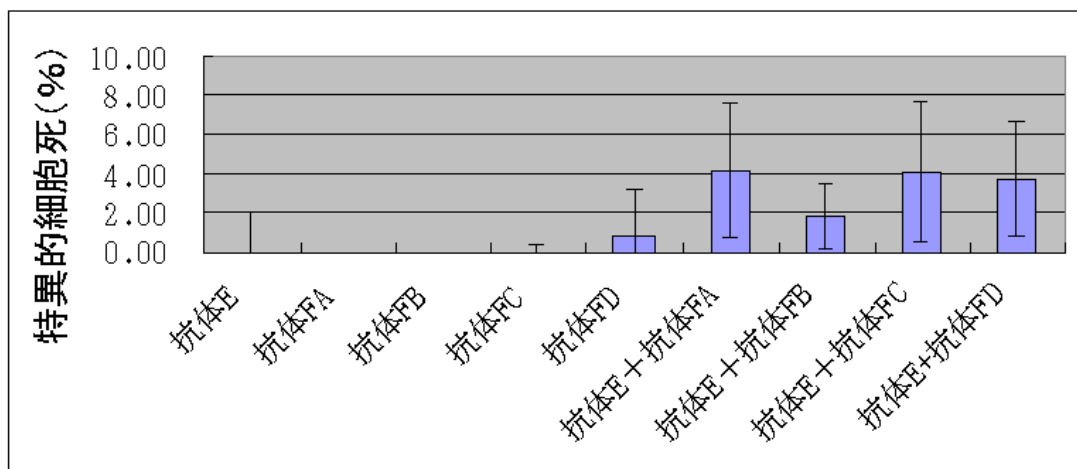


図 143 抗原 E、F 発現細胞を用いて、抗抗原 E、F 抗体の CDC 活性を測定した。図 8 に示したものと同様な方法で測定を行った。

【まとめ】

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。

第二部 B：高効率な抗体分離精製技術

研究開発項目②「高効率な抗体分離精製技術」は、技術領域に即した3つの小項目、(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)溶出工程技術開発で構成され、産業技術総合研究所およびバイオインダストリー協会各分室が、それぞれの小項目で担当する要素技術の開発を進めた。また、開発した要素技術を持ち寄り、全体として統一したダウンストリーム・システムを完成させるための技術融合も同時に進めた。システム構築のための技術融合は、抗体医薬製造工程の流れに沿った3つのステップ、ステップⅠ(培養)、ステップⅡ(精製)、ステップⅢ(品質管理)、ごとに行われた。以上の、要素技術の開発とシステム構築のための技術融合の関係をまとめると以下のように表わされる。

技術融合(実施団体間の協調)				
ステップⅠ(培養)		ステップⅡ(精製)		ステップⅢ(品質管理)
↑ 融合		↑ 融合		↑ 融合
要素技術	(1)タンパク質分子リガンド技術開発		産業技術総合研究所、島津製作所、東北大学(共同研究)	
	(2)高効率クロマト担体技術開発		産業技術総合研究所、AGC エスアイテック、京都モノテック	
	(3)溶出工程技術開発	東洋紡バイオロジックス(2009.3まで)、東北大学(共同研究、2009.3まで)、大阪大学(共同研究)、徳島大学(共同研究、2010.5より)	山口大学(再委託)	産業技術総合研究所、東洋紡績(2009.3まで)、東洋紡バイオロジックス(2009.3まで)、大阪大学(共同研究)、徳島大学(共同研究、2010.5より)、東京大学(再委託)、東北大学(共同研究、2009.4より)

3つの開発小項目で行う要素技術の開発および3つのステップに整理される技術融合の概略は以下のとおりである。

(1)タンパク質分子リガンド技術開発

抗体精製用のアフィニティークロマトカラムに充填されるアフィニティリガンドに関する技術開発を行う。具体的には、「①タンパク質分子リガンドに関する基盤技術の開発」として、抗体結合性を有する新規タンパク質の設計・創製技術の開発を行う。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、評価技術の開発を行う。また、「B・①タンパク質分子リガンドの多様化および評価に関する技術開発」として、アフィニティリガンドの多様化のためのライブラリー構築技術と効率的特性評価機器システムの開発を行った。

(2)高効率クロマト担体技術開発

抗体精製用のアフィニティークロマトカラムに充填されるクロマト担体に関する技術開発を行う。具体的には、「②高効率クロマト担体に関する基盤技術の開発」として、担体基材に対するタンパク質分子リガンドの配向制御固定化技術、高密度化・安定化固定化技術の開発を行う。また、「B・②無機固体系を用いたクロマト担体基材の開発」として、開発した新規クロマト担体の静的抗体結合量、動的抗体結合特性の評価を行う。また、クロマト担体に適用可能な動的特性の優れた基材の開発を行った。

(3)溶出工程技術開発

抗体精製のための各種クロマトグラフィーの溶出工程に関する技術開発を行う。具体的には、「③溶出工程に関する基盤技術の開発」として、溶出時の抗体の不可逆的な会合凝集・変性等を抑制するための溶出溶媒の最適化にむけて、抗体の凝集化過程を迅速に検出する技術の開発を行う。また、「B・③溶出工程における支援技術の開発および分離精製システムの実用的評価」として、溶出工程の高度化および効率化に向けた支援技術の開発を行う。開発した分離精製システム全体の実用性の評価を行った。

ステップ I (培養)

内外の大学、公的機関および製薬メーカー・創薬ベンチャーに対し、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依頼する。提供を受けた遺伝子または抗体産生細胞を元に、遺伝子の再構成、高発現細胞のクローニング、培養条件の検討等により抗体産生の生産性を向上させ、実用化に近いレベルまで生産システムを構築する。この系で、パイロットスケールの細胞培養を繰り返し、得られた培養液を「実証パイプライン」と称して各要素技術開発に供給する。また、本事業の後期では、研究開発項目①「系統的な高特異性抗体の創製技術開発」にて開発した新規の医薬候補のモノクローナル抗体に関して、同様の検討とパイロットスケールの細胞培養を行い、得られた培養液を「実証パイプライン」に加え各要素技術開発に供給した。

ステップ II (精製)

アフィニティリガンドのライブラリー構築、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要素技術を持ち寄って、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する。開発した試作カラムを用いて、ステップⅠで調整した医薬候補のヒト型モノクローナル抗体の培養原液を「実証パイプライン」として精製し、試作カラムの性能を評価した。

ステップⅢ(品質管理)

抗体の変性・凝集の分子機構の解析、抗体-溶媒相互作用に関する溶液化学的解析等の基礎的知見の集積と、抗体の変性・凝集検出技術の開発、抗体の分子多様性の評価法の開発、溶出溶媒の探索手法の開発、溶出工程のスケールアップシミュレーション技術等の要素技術の開発を進め、これらを基盤として、ステップⅡで行う、ヒト型モノクローナル抗体の培養原液の試作カラムによる精製実験において、最大のパフォーマンスを発揮するための溶出条件の特定を行う。また、あわせて、アフィニティクロマト前後の処理工程についても、溶液化学的観点からの最適化を進め、ステップⅠで調整した医薬候補のヒト型モノクローナル抗体の培養原液をステップⅡで精製することで得られた「実証パイプライン」の精製抗体の品質を確認する。

以下に、まず、要素技術の開発の進捗および成果に関して課題ごとに記載し、ついで、システム構築ための技術融合の進捗および成果に関してステップごとにまとめた。

B-① タンパク質分子リガンドの多様化および評価に関する技術開発

1)独立行政法人 産業技術総合研究所

図 144 は、タンパク質分子リガンド技術開発の開発方針の概略を示す。

リガンド機能を担う配列として、抗体結合機能を示す公知配列をもとに、配向制御固定化反応が適用できるようにシステイン残基及びリジン残基を全く含まない配列に改変したものを作製し、それを構成要素とするタンパク質集団を一次ライブラリーとした。

一次ライブラリーの構成要素には、アフィニティリガンドとして有用性があきらかであるプロテイン A 由来のドメインがあり、これをもとに、イ. プロテイン A 型リガンド・ライブラリーの開発を行った。プロテイン A 由来以外の配列については、ロ. プロテイン A 代替リガンド・ライブラリーの開発に供した。

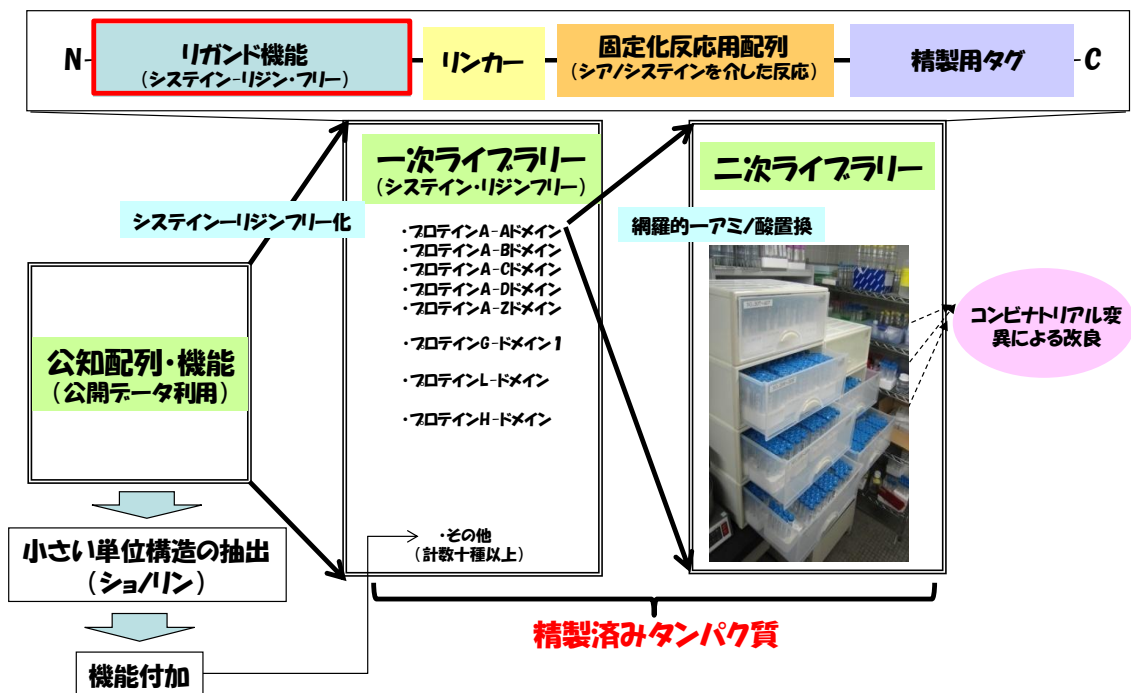


図 144 タンパク質分子リガンド技術開発の開発方針の概略

イ. プロテイン A 型リガンド・ライブラリの開発

抗体結合分子であるプロテイン A 配列を元に、カルボキシル末端側もしくはアミノ末端側を介して一箇所のみで担体に結合する形にアミノ酸配列を改変した。作製したアミノ酸配列を元に大腸菌で発現できる人工遺伝子を作製し、大腸菌での大量発現を行った。発現した固定化用改変プロテイン A を大量に作製し、クロマト担体作製用リガンドとしての供給を進めた。更に、この配列を出発として、網羅的な 1 アミノ酸変異体遺伝子を作製し、866 種類の遺伝子ライブラリーを完成させた。ついで、これらの人工遺伝子で形質転換した大腸菌の大量発現を行い、845 種類のプロテイン A 型リガンドタンパク質ライブラリー(これを 2 次ライブラリーと称する)を完成させた。表面プラズモン共鳴法を用いて、作製したすべての 1 アミノ酸変異体について、ヒトポリクローナル抗体との結合特性解析を完了した。また、島津分室が開発したリガンド特性評価装置を用いたアフィニティ担体に組み込んだ時のリガンド特性を解析した。その結果、作製したライブラリー中に、所望のリガンドがみいだされ、我々の開発方針の有効性が実証された。

更に、網羅的 1 アミノ酸変異体タンパク質ライブラリーの抗体結合特性データをもとに、より特性のすぐれた多重変異体タンパク質の設計・合成を進め、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の開発に成功した。アミノ末端 1 箇所で結合できるリガンドの開発を行い、リガンドの製造を自動的に行う反応装置を開発した。

ロ. プロテイン A 代替リガンド・ライブラリーの開発

プロテイン A 以外の 35 種の候補タンパク質を 1 次ライブラリー化し、これらの野生型

配列を配向制御固定化に向けデザインし、その人工遺伝子の合成及びその大腸菌での発現を行った。1次ライブラリーの中から抗体結合特性を優れた2種をプロトタイプリガンドとして特定し、この配列を出発として、網羅的な1アミノ酸変異体遺伝子を作製し、2次ライブラリーを構築した。表面プラズモン共鳴法を用いて、2次ライブラリーの452種の変異体について、ヒトポリクローナル抗体との結合特性解析を行った。計算機を用いた独自の分子設計法を開発し、熱安定性に優れたプロテインG変異体タンパク質を合成し、これらの抗体結合特性を定量的に測定した。この中から選別したリガンドの配列をさらに改変し、弱酸性域で溶出可能な実用的なプロテインA代替リガンドを完成させた。既知の抗体結合性のタンパク質とは全く異なるアミノ酸配列を有するリガンドを創出することを目指して、分子骨格として極微小人工タンパク質シニョリンを採用し、これを進化分子工学的手法で機能化することで、30アミノ酸以下ながら高い親和性で特異的に抗体を認識することができる小型人工リガンドタンパク質の開発に成功し、これを上記一次ライブラリーに組み込んだ。

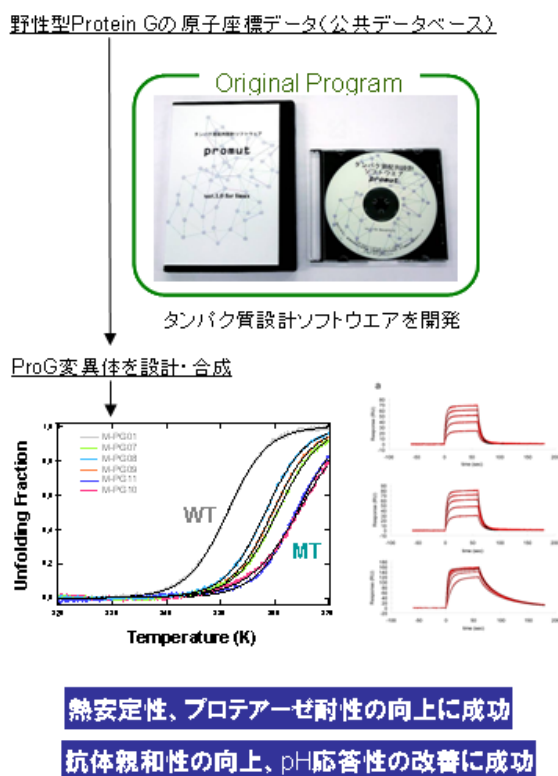


図 145 計算機を用いた独自の分子設計法を開発

ハ. リガンドの効率生産技術の研究

プロテインA型リガンド・ライブラリーの人工遺伝子の発現を効果的に行わせるための発現ベクター開発に関しては、高い転写効率で遺伝子を発現させる発現系を大腸菌で構築した。これを基本として、さらに商業規模生産に向けたスケールアップに伴う課題

を解決し、プロテイン A 型プロトタイプリガンドの数グラム～数百グラムスケールの安定的生産を可能にした。

2)島津分室(株式会社島津製作所)

イ. 抗体アレイスポットティング装置の開発

多種類のリガンドをアクリルアミド等の平板担体に自動的にスポットする装置(抗体アレイスポットティング装置)を開発した。1枚の担体に96点をスポットするのに要する時間は約40分程度であり、担体が平板モノリスの場合、スポットが重ならない最小間隔は1.2mm程度であった。

ロ. 抗体アレイを用いたリガンド特性評価装置の開発

イ. で作製した多種類のリガンドがスポットされた平板担体を用いて、これに各種抗体溶液を流し、その前後のスポット毎のタンパク質濃度をスポットの紫外線吸収を測定することでリガンドと抗体の相互作用を評価する装置(リガンド特性評価装置)を開発した。担体が平板モノリスの場合、最小画面取得間隔は8秒程度であった。

また、これとは別にリガンドを含むカラムからの溶出を測定する方式によるリガンド特性評価装置(2号機)を開発し、ハ.の溶媒探索用分析システムの検出系とした。

ハ. 溶媒探索用分析システムの開発

ロ.の評価装置2号機を検出系とし、新たに20個の溶媒を自動切替え可能な流路系を開発し、合わせて溶媒探索用分析システムとして構築した。カラム材料をモノリスとし、9種類の溶出溶媒を順次切替えた場合にデータ取得に要する時間は5時間半程度であった。

3)東北大学大学院工学研究科

イ. リード配列の構築とライブラリの作製

抗体精製用の新規リガンドとして、ヒトIgG1特異的抗体を産生するハイブリドーマから可変領域断片(Fv)の遺伝子配列をクローニングし、一本鎖抗体(scFv)遺伝子を作製、さらに大腸菌発現系を用いた調製系の構築を行った。作製したscFvのヒトIgG1に対する結合活性と特異性を表面プラズモン共鳴などにより確認後、抗体精製用の新規リガンドの構築に向けて主に固定化条件を検討し、固定化後の機能解析を進めた。結果、ヒトIgG1由来のFcに特異的な結合活性を有したまま固定化することに成功した。本技術は、既存のプロテインAを用いた精製条件では凝集が見られる等、調製が困難な抗体医薬候補に対して最適ナリガンドを用意する発想、可能性を期待させるものである。

B-② 無機固体系を用いたクロマト担体基材の開発

1)独立行政法人 産業技術総合研究所

ニ. リガンド固定化技術の開発

リガンドタンパク質を担体基材に固定化する際の配向を制御するために重要な、カル

ボキシル末端側のアミノ酸配列とスペーサー配列長の最適化をプロテイン A 型リガンドタンパク質に関して検討し、スペーサー配列としては 4 グリシンで十分であることを確認した。また、高密度かつ高安定な固定化を実現するため、足場となる担体基材表面の官能基の密度とリガンド候補タンパク質の投入濃度と固定化量との関係を明らかにした。これにより、従来より少ないリガンド投入量で、ほぼ最密充填に近いレベルまで抗体を結合できる高効率配向制御固定化技術の開発に成功した。また、新たな配向制御型配列固定化反応として、プロテイン A 様改変タンパク質の主鎖の N 末端のみ反応させる方法を開発した。

ホ. アフィニティ担体の評価

作製される多数のリガンド候補タンパク質を固定化したアフィニティ担体としての特性解析をハイスループット化するための方法として、96 種のリガンドを同時に検出評価できるクロマトレイ測定法を新規に開発した。この新しい測定法を安定に行うための素材や加工条件の検討を行い最適化することで、最終的に 845 種の固定化プロテイン A 型リガンドの抗体性能評価を行った。また、プロテイン A 型のプロトタイプリガンドを固定化したパイロットスケールのアフィニティ担体を作製した。得られたプロトタイプアフィニティ担体は、ヒトポリクローナル抗体に対する最大結合量(静的結合量)の値として 90mg/mL-resin、接触時間 0.8 分の動的結合容量として 40mg/mL-resin 以上、更に接触時間 3 秒の場合の動的結合量として 30mg/mL-resin 以上の値を示すなど、世界トップの結合性能を発揮した。「イ. プロテイン A 型リガンド・ライブラリ開発」において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ない温和な条件である pH5.0 における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%以上の安定回収することに成功した。プロトタイプアフィニティ担体を用いては、研究開発項目①「系統的な高特異性抗体の創製技術開発」にて開発した新規の医薬候補のモノクローナル抗体を含む「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、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。

2)北九州分室(AGC エスアイテック株式会社)

イ. クロマト動的特性改良に関する技術開発

アフィニティクロマト基材に適する細孔径 100nm を有する大細孔径シリカゲルの細孔物性の制御要因を調査し、量産化用電気炉の設計を行った。また、抗体の動的拡散係数が最大となる細孔物性の最適化を行った。

ロ. 基材表面の官能基付与に関する技術開発

アフィニティリガンドと結合させるアミノ基の修飾方法を検討し、理想的なポリメリック構造をつくるアミノ基高密度表面処理方法を確立した。以上の成果により、動的吸

着容量が、目標値を大きく上回る 20mg-IgG/mL-Bed 上の性能を有するアフィニティク
ロマト充填剤が得られた。

ハ. 最適化した多孔質球状シリカゲルのスケールアップに関する技術開発

目的とする多孔質球状シリカゲル原体 5kg/Batch の安定生産を行うべく、量産化用電
気炉の運転条件を最適化した。その結果、Batch 内および Batch 間のバラツキは低減し、
不良率 0%の生産性を達成させた。

ニ. 産総研が開発したアフィニティリガンドの修飾方法に関する技術開発

リガンドの化学安定性の向上と、更なる非特異吸着を低減させるために、高分子によ
り架橋させる技術を検討した。本アミノ基担体に産総研のアフィニティリガンドを修飾
し、修飾量と性能を維持したまま、化学的安定性を大きく向上させ、非特異吸着を低減
させることに成功した。次いで、クラス 10,000 のクリーンルームを使用した cGMP 準拠
体制を確立し、製造バリデーションを実施した結果、500cm/hr 以上の高流速領域におい
て、動的結合容量 40mg-IgG/mL-bed 以上、リガンドリーク量 88ng/mg-IgG 以下、エン
ドトキシン 10.0EU/mL 以下、Bioburden 100CFU/mL 以下を検証した。本担体 5L-bed
を試作するとともに、将来の量産プラントを設計した。

ホ. リガンドの化学的安定性の評価

市販の ELISA キットの選定ならびに最適化を図り、リガンドリーク量を精度良く測定
し得る分析系を構築した。本法を用いてリガンドリーク量を測定した結果、17ng/mg-IgG
という低いリーク量であり目標を大きく上回る結果を得た。

ヘ. アフィニティカラムの試作と評価

以上の成果を集約したアフィニティ担体を、ヒト型モノクローナル抗体培養液の連続
精製に供した。少なくとも 50 サイクルの間、高い動的結合容量を保持したまま、90%以
上の抗体回収率を維持できることから、本担体は高効率な抗体分離精製に十二分に耐え
得ることを立証した。

3)京都分室(株式会社京都モノテック)

イ. シリカモノリスの構造最適化およびスケールアップ

シリカモノリスの構造(マクロポア径およびメソポア径)の制御手法を確立した。マク
ロポア径については 0.5~50 μ m の範囲で、メソポア径については 8~100nm の範囲でそれ
ぞれ独立に制御可能とした。さらに、シリカモノリスの構造と抗体分離特性との関係を
調べる手法を確立し、抗体の動的結合容量と構造との関係を明らかにした。また、チュ
ーブ型シリカモノリスカラムを作製し(16 ϕ ×5 ϕ ×100 mm の中空型カラムを作製し、リガ
ンドを固定化することに成功した。分取に必要な溶出時間を短縮することに成功し、約
0.8CV の溶液量で分取が可能となった。さらに、大量分取を実現するための大型シリカ
モノリスの作製方法を確立し、直径 47mm のゲルを作製した。

ロ. シリカ表面への官能基導入技術の開発

シランカップリング剤によるアミノ基およびエポキシ基修飾については、アフィニティリガンドとシリカゲルとを化学的に結合させるためにシリカゲル表面へのアミノ基およびエポキシ基導入方法の検討し、反応試薬の選定、反応条件を確立するとともに修飾したアミノ基およびエポキシ基の定量方法、カラムとしての評価方法を確立した。また、ポリマーコート法により、アミノ基およびスルホ基をシリカモノリス表面に導入する技術を確立した。それぞれの官能基を導入したシリカモノリスのカラム特性評価を行い良好な結果を得た。さらにアミノ基修飾シリカモノリスに産総研より技術導入したプロテイン A 修飾を適用し、高速での抗体分離が可能であることを実証した。

ハ. 耐酸性、耐アルカリ性の向上

シリカモノリスの原料として珪素-炭素結合を有する化合物を用いることにより担体の耐酸性・耐アルカリ性を向上させることを目的とし、原料として 3 官能アルコキシドであるメチルトリメトキシシランを含有するハイブリッドシリカモノリスの作製を可能とした。さらに、作製条件によりハイブリッドシリカモノリスの構造制御を可能とした。ハイブリッドシリカ表面にアミノ基をポリマーコートすることにより更なる耐アルカリ性の向上を達成し、pH11 での連続使用を可能とした。結果 200 サイクルのアルカリ試験を行い、溶出ピークの形状、面積値が変化なく再現することができた。

ニ. 特性解析用アレイ基板の開発

リガンド特性評価装置用アレイ基板の開発を行う際に、必要として条件がスポットティングが可能であり、UV 透過性を有し、溶媒の送液が可能なシリカモノリス膜をシリカガラス表面に形成したアレイ基板を作製することである。アレイ基板中のシリカモノリス膜を形成させる部分を 3 種類作製することにより、膜の安定性及び UV 透過性の比較を試みた。最終的にサンドブラスト加工鏡面仕上げで作製した基板を用いて UV 透過性を良くし 500 個のスポットティングを可能にした。

B-③溶出工程における支援技術の開発および分離精製システムの実用的評価

1)独立行政法人 産業技術総合研究所

へ. 抗体の変性凝集検出技術の研究

B シート構造の変化の検出に優れた特徴を有する赤外分光法を用いて、抗体の変性凝集過程を迅速に検出する技術の開発を進めた。全反射型セルを用いたフーリエ変換赤外分光法の採用により、タンパク質溶液中の水の吸収や凝集による透過光の散乱・減衰に起因する問題が回避されることを確認し、再現性の高い安定な赤外分光スペクトルを得るための測定条件、加熱に伴う抗体溶液の変性凝集過程を感度よく迅速に検出するための測定条件を確立したのち、実験計画法にもとづく 28 種の溶媒条件のモデル抗体の加熱凝集過程を解析した。また、抗体溶液の赤外スペクトルを主成分分析することを特徴とする情報工学的アルゴリズムを考案し、溶液中の凝集体の存否を判定するプログラムを開発した。動的な光散乱法等による可溶性凝集体の検出基盤を整備し、「実証パイプライン」

のパイロットスケールの培養液から開発中のプロトタイプアフィニティ担体で精製された、複数の精製抗体の物理化学的品質を系統的に評価した。

2)大津(東洋紡)分室(東洋紡績株式会社)

イ. 抗体凝集の高感度検出技術の開発

抗体凝集について LC や電気泳動、定量的免疫検出法等の分析系を組み合わせ、培養液中および精製溶液中の抗体凝集を定量的に行いうる分離分析技術として、電気泳動で純度分析できる系を検討した。また、定量的免疫検出法により、培養液・精製液中の定量測定法を検討した。さらに、LC 分析の条件を検討した。平成 18 年 8 月 16 日以降に大津(東洋紡)分室で実施計画されていた研究については、大津(PBI：現 TBI)分室に移行させ大津(PBI：現 TBI)分室の研究機能を強化させた。

3)大津(TBI)分室(株式会社東洋紡バイオロジックス)

イ. 抗体産生細胞の調製

ヒト型モノクローナル抗体産生細胞について、15L 規模の培養を行いうる基礎的検討として、1L 規模の培養槽やフラスコを用い、無血清培地や添加物あるいは、攪拌数といった物理的、化学的条件を比較検討した。また、新たに導入した 15L 規模での培養が可能な培養槽の IQ、OQ を完了させた。次いで、30L スケールの培養規模へのスケールアップ培養の検討を行い、培養系を確立した。さらに、本技術開発に用いる IgG3 抗体産生細胞の樹立を行い、無血清馴化を完了するとともに、本技術開発に使用する抗体産生細胞培養上清を 2 回作製し提供した。

ロ. AC 前後処理技術の開発

澄明な培養上清を得るために、30L スケール培養の培養液を用いて、数種の膜による細胞除去条件検討を行い、細胞除去条件を定めた。

ハ. 評価用カラムの試作

プロテイン A およびイオン交換カラムによる抗体分離精製技術の検討を行い、本技術開発の比較対照法となるコンベンショナルな抗体精製法を設定し、30L スケール培養の培養上清を用いて抗体精製を行い、その培養上清からの抗体精製結果を得た。また、新たに導入した高速液体クロマトグラフィーおよびキャピラリー電気泳動装置の IQ、OQ、PQ を完了した。

ニ. 抗体凝集の高感度検出技術の開発

モデル抗体産生細胞の 30L スケールの培養によって得られた培養上清をプロテイン A、イオン交換カラムで精製し、得られた抗体を用いて、凝集体の高速液体クロマトグラフィーや電気泳動法を用いた検出法の検討を行い、高速液体クロマトグラフィー法による分析条件を設定した。

ホ. 抗体の分子多様性の評価法の開発

30L スケールの培養によってモデル抗体産生細胞を培養し、その培養上清から精製したヒト型モノクローナル抗体のシアル酸測定によって抗体の分子多様性の分析評価法検討を行った。

4)東北大学大学院工学研究科(共同実施)

ロ. 抗体産生細胞の調製

抗体医薬として充分期待がもてる組換え型 IgG 様抗体を複数設計、発現ベクターを構築した。CHO 細胞に遺伝子導入後、培地上清から精製し、機能評価を行った結果、有意ながん細胞の成長抑制効果が見られた。このため、安定産生株を樹立、遺伝子増幅を行った後、ダウンストリームを含めた抗体調製系開発のためのモデル抗体として MTA を締結し提供した。また安定性を向上させるために再設計を行った発現ベクターも構築し、同様にその遺伝子を提供すると共に、その安定発現 CHO 細胞株も樹立し機能評価を行った。これらの IgG 様抗体はモデル抗体としての利用の他、強力な治療効果を有しているため、投与量の低減、即ち薬価の低減化が見込まれる。

ハ. 精製抗体の品質評価と抗体断片の調製技術開発

大規模培養から調製された組換え型 IgG 様抗体を用いて、ラボスケールで調製した分子との機能の比較を行った。それぞれゲルろ過クロマトグラフィーで分画した分子を用いて、がん細胞傷害活性を評価した結果、何れの濃度領域でも同等の活性がみられた。また、抗体濃度に応じた抗腫瘍性のサイトカインの分泌量の増加も確認することができた。長期保存における安定性を評価した結果、4℃で半年以上安定であることが分かった。さらにこの組換え型 IgG 様抗体を基に、特異的プロテアーゼを利用したタンパク質分子リガンド開発のための機能性抗体断片の調製技術開発にも成功した。

5)大阪大学大学院工学研究科(共同実施)

イ. 抗体産生細胞の調製

抗体産生細胞として、3 種類(IgG1、IgG3、ならびに IgG1 様抗体)の抗体を生産する CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞を調製した。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 ATCC (American Tissue Culture Collection)由来 組換えヒト抗 IL-8 IgG1 生産株については、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に、細胞株のクローニングを行い、生産性の高い候補株を取得した。得られた候補株について、調製に必要なパラメータとして、比増殖速度および抗体比生産速度を 1L 以下の小スケール培養にて検証した。さらに、5 回の凍結融解を行い、得られた候補株がパラメータとしての比増殖速度および抗体比生産速度を維持していることを確認した。東北大学が構築した IgG1 様抗体発現 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った。得られた馴化細胞株について 1L 以下の小スケール培養にて抗体サン

ルを提供可能な調製に必要なパラメータとして、比増殖速度および抗体比生産速度を検証した。さらにヒト IgG3 抗体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を行い、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選択した。これら 3 種類の抗体全てについて、徳島大学にて確立された標準化手法に基づいて培養を行い、2 種類について標準化した手法によって調製した培養液を供給した。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 2 種類の医薬候補のヒト型モノクローナル抗体について、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(IgG1 生産株)について回分培養を用いた培養原液の供給方法を確立した。

ロ. 抗体の分子多様性の評価法の開発

上記にて生産されたヒト化 IgG1 様抗体を用いて、分子多様性のひとつであるシアル酸修飾を対象とした lectin binding assay による測定法構築を試みた。バックグラウンドを酸化処理によって低減した後、抗体濃度をそろえたサンプル調整を行い、これに対して標準曲線を作成する手法にて分子多様性の一つであるシアル酸の簡便な分析法を構築した。その結果、計画の 200 μ L より少量の 100 μ L のサンプル量にて分子多様性としてのシアル酸修飾を評価する系ができた。構築した系を用いて、IgG1 様抗体発現 CHO 細胞の培養経過中のシアル酸変化について検証した。さらに同様の検出系を応用することにより、抗体の ADCC、CDC 活性に影響するフコース、ガラクトース修飾について lectin binding assay を確立した。さらに、2 種類の抗体産生細胞(IgG1、ならびに IgG1 様抗体)について 1L の細胞培養槽スケールにて培養を行い、多様性としてフコースの経時変化を評価した。さらに東洋紡バイオロジックスの構築した LC を用いた凝集体評価法を用いて、その培養液から精製したヒト型モノクローナル抗体溶液中の凝集体含量について分析評価した。その結果、ヒト化 IgG1 様抗体においては、凝集体含量が培養経過に伴って増加し、培養終了時には 40%に達し、この割合は IgG1 抗体に比較して、非常に高い結果となった。

ハ. 抗体の分子多様性の制御手法の確立

1L の細胞培養槽スケールにおける結果に基づいて構築した凝集体含量と分子多様性の制御因子を含めたデータベースに基づいて構築された抗体培養液の供給方法の標準化に基づいて、ヒト化 IgG1 様抗体ならびに IgG1 抗体について、これを用いた標準化培養液を 1L の細胞培養槽スケールにてそれぞれ 1 回検証培養を行った。

6)徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部(共同実施)

イ. 抗体産生細胞の調製

抗体産生細胞として、大阪大学の構築した 3 種類(IgG1、IgG3、ならびに IgG1 様抗体)の抗体を生産する無血清馴化 CHO(Chinese Hamster Ovary)細胞について、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、それぞれの細胞株において工業生産に用いるレベルの要素技術検証用プロセス／パイプラインとなり得る抗体培養液の供給方法の標準化を行った。具体的には、WCB から 3 段階の種培養を経て 1L スケールのリアクター培養に至るスケールアップ手法ならびに培養条件、温度条件、生産培地の培地組成からハーベスト工程について詳細に設定し、さらに生産培養においては流加培養を用いた標準化の手法を確立した。

ロ. 抗体の分子多様性の評価法の開発

2 種類の抗体産生細胞について 1L の細胞培養槽スケールにて評価された抗体産生細胞の多様性および凝集体含量の結果に基づいて、小スケールでの結果も加味して凝集体含量と分子多様性の制御因子を含めたデータベースを作成した。凝集体含量は糖鎖含量に影響され、糖鎖量は培地添加物によって変動し、特に酵母加水分解物を添加することにより、糖鎖修飾が改善され、さらに抗体生産が増強された。

ハ. 抗体の分子多様性の制御手法の確立

1L の細胞培養槽スケールにおける結果に基づいて構築した凝集体含量と分子多様性の制御因子を含めたデータベースに基づいて、分子多様性の変動を最小化する要素技術検証用プロセス／パイプラインとなり得る抗体培養液の供給方法の標準化を行った。その結果、培養中のフコース修飾の変動を一定に抑えるためには、培養前半にグルコースを添加しない培養が適していた。

7) 東京大学大学院新領域創成科学研究科(再委託)

7) 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(再委託)

イ. 抗体の凝集機構と溶出溶媒に関する研究

抗体の酸性暴露と 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、酸性条件下での抗体構造に関する新規な知見を得た。抗体の製剤化における溶媒条件と安定性との関連に関する検討のなかで、アルギニンを中心にした、抗体の分子種に依存しづらい凝集抑制法の開発を行った。特に濃度、温度、pH に関して、抗体における凝集抑制条件を検討し、サブクラスに応じた条件を提案した。サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性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高い分離・分析・分取法を提案した。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、分離条件の至適化を図り、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、その抗体様出技術における安全性の物性基盤を築いた。

8)山口大学工学部(再委託)

イ. AC 前後処理技術の開発

静電的相互作用に基づくイオン交換クロマトグラフィーあるいはハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーのような複合モードクロマトグラフィーのリガンド密度や細孔構造と抗体や凝集体あるいは DNA 等の分離特性および吸着・脱着特性係を関係づけることを目的とした。

一体型イオン交換クロマトグラフィーマトリックス(モノリス)での流速依存性がないことを明らかにした。また、96 穴マイクロプレートモノリスによる実験方法を確立した。DNA のイオン交換クロマトグラフィーにおける保持機構についてタンパク質と対比して検討し、小さな DNA でも結合サイト数は大きく、非常に高い塩濃度が溶出に必要であることを明らかとした。

イオン交換クロマトグラフィーやハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーにおける溶出位置の推定を簡単な勾配溶出実験から得られるデータに基づいて可能であることを示した。また PEG を移動相に添加することにより重合体や DNA の除去効率が飛躍的に向上することを見出し、その機構を解析した。

ロ. 実用カラムのための設計理論の構築

96 穴マイクロプレートを利用したバッチ吸着実験方法による吸着等温線の迅速な測定方法を確立した。この方法では 1 穴(ウェル)あたり数 μL のクロマトグラフィー充填剤と 100-200 μL の液量で測定ができるので、試料が大幅に削減できる。ビーカー実験と比較して、スケールダウンが適切に行われていることを確認した。本プロジェクトで開発された Protein A 担体(AIST-2)を含む市販主要 Protein A 担体について吸着等温線を測定し、Langmuir 式で定式化した。

Protein A カラムクロマトグラフィーのスケールダウンについて検討し、内径 5mm 高さ 5cm(約 1mL)を標準サイズとして上記マイクロプレート実験に使用した主要 Protein A 担体を充填し動的吸着量と静的吸着量を滞留時間の関数として測定した。どのカラムも問題なくスケールダウンできたが、本プロジェクトで開発した AIST-2 タイプは充填が容易であり高さ 1.2cm(約 0.24mL)まで良好にスケールダウンが可能であった。スケールダウンの容易さに加えて、動的吸着量も滞留時間が 1 分で 40mg/mL となり、既存の標準的な Protein A 担体に比較してプロセス設計に有利である。

ハ. プロセスシミュレーション

動的吸着量 DBC と静的吸着量 SBC の比 DBC/SBC はカラムベッド有効利用率を表し、この値が高いほど高性能なクロマトグラフィーとなる。 DBC/SBC と滞留時間の関係は AIST-2 が最も高い値となり、高性能であることが示された。特に滞留時間 1 分では既存の標準品であるアガロース系 Protein A 担体が 0.45 程度であるのに対して 0.8 という非常に高い値であった。 DBC/SBC と滞留時間の関係を定式化することができた。この式に基づき任意のスケールのカラムの DBC を滞留時間の関数としてシミュレーションすること

が可能である。前述(ロ.)の 96 穴マイクロプレート実験から得られた吸着等温線から SBC が推定できることを明らかとしたので、96 穴マイクロプレートと 0.2mL 小型カラムにより少量の試料でプロセスシミュレーションに必要なデータを迅速に取得できる。また粒子径を考慮した無次元数で DBC/SBC はよく相関されたので、AIST-2 担体の粒子径を変更したときの DBC と滞留時間の関係もシミュレーション可能である。

ステップ I (培養)における技術融合の成果

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・創薬ベンチャーに対し、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、通常の場合では 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。



図146 モックアップに準じた標準化された培養液調製法

ステップII(精製)における技術融合の成果

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、各要素技術開発にヒードバックし、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より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、そこでえ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、これをシステイン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一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。

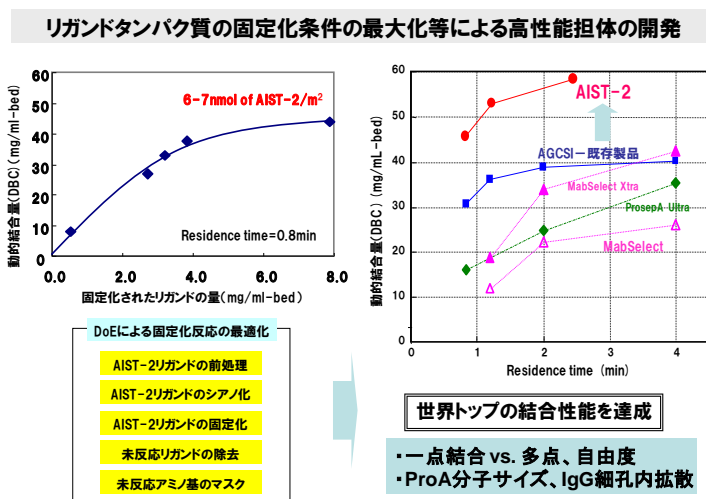


図 147 高性能アフィニティ担体の開発に成功

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ことを確認した。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、このことを実現する担体として、スピンカ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ンカラムに組み込むことより、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。

図は、この成果を活用して商品化が行われたAIST-2モノリススピンカラムの商品パンフレットである。

Ex-Pure Pro&Aタイプ

- 目的抗体の精製、濃縮
- 培養液中の抗体濃度の定量化
- 抗体精製における濃縮の最適化を迅速、且つ簡単に行う事ができます。
- 抗体精製のステップを大幅に簡素化することができます。

製品仕様

項目	モノリススピンカラム	Ex-Pure Pro&A	Ex-Pure Pro&A
カラム径	4.8 mm	4.8 mm	4.8 mm
長さ	100 mm	100 mm	100 mm
流速	1.0 mL/min	1.0 mL/min	1.0 mL/min
圧力	1.0 MPa	1.0 MPa	1.0 MPa

図4 回収率の電気泳動結果

1. マーカ
2. 培養液
3. フロースルー
4. 洗浄
5. 濃縮
6. 再洗

図5 Ex-Pure Pro&A スピンカラムの性能

Ex-Pure Pro&A スピンカラムは、0.4 mg/ml の Human IgG を 100 ml の培養液から回収することが可能です。

Ex-Pure Pro&A スピンカラムは、0.4 mg/ml の Human IgG を 100 ml の培養液から回収することが可能です。

図 148 商品化が行われた AIST-2 モノリススピンカラム

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。

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(㈱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(㈱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、実験計画法の一つ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。

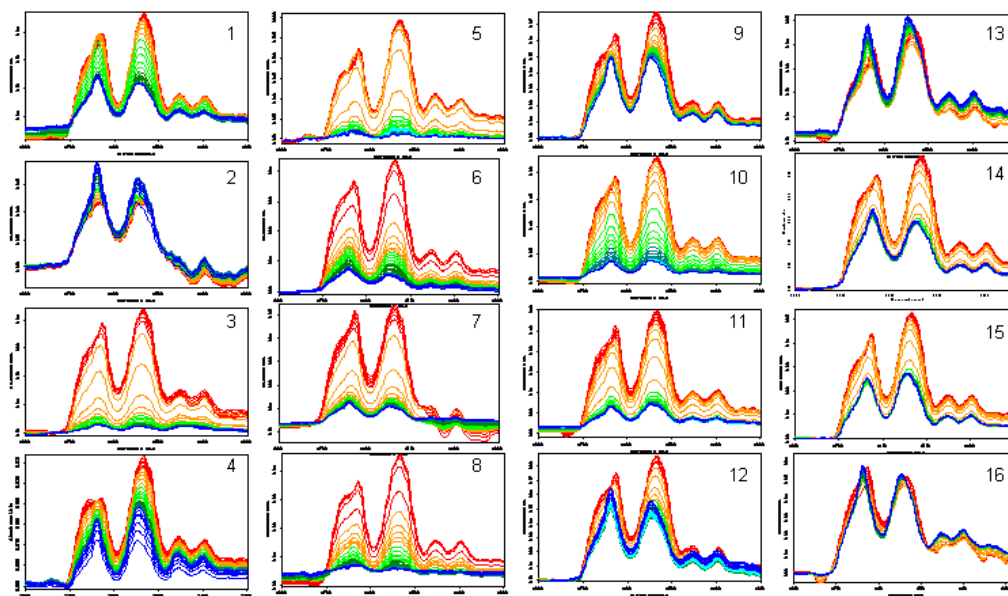


図 149 赤外分光スペクトルによる種々の抗体の加熱凝集過程の解析

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。

IV. 実用化の見通しについて

1. 実用化の見通しについて

1.1 系統的な高特異性抗体創製技術

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受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。

実用化の見通しとしては下記のことが考えられる。

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ROB01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PET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化とプレターゲット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アスパラギン合成酵素に対する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立し、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イズ抗体に関して、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「バイオリジカルズ（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行ってきた。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нка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、マウスモノクローン抗体をヒト・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 年のベクチビックスを最後に、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、様々な形での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チ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でいる。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 AMIGO2 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 ROB01 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、s cFv 改変とプレターゲティング技術の開発により、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 および白血病治療マーカーとしてのア

スパラギン合成酵素（AS）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、また AS の白血病治療における診断価値は確立しており、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、従来之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、他の追随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ことができると考えられる。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

コストを引き下げるためには、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ける活用を目指す。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。この企画に応えた企業が、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. ノードマウス中で、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臓、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。

健康安心イノベーションプログラム基本計画

平成22年4月1日
産業技術環境局
製造産業局

1. 目的

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。

この目的を達成するため、創業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。

2. 政策的位置付け

○新成長戦略（基本方針）（2009年12月30日）

強みを活かす成長分野として「グリーン・イノベーション」分野と「ライフ・イノベーション」分野を策定、人材育成や技術開発を後押しするほか、需要を創造すると同時に利用者の立場に立った社会ルールの変更に取り組む。また、政府は新たな分野に挑戦する人々を支援するとしている。

○革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略（2009年2月12日改訂）

内閣府、文部科学省、厚生労働省及び経済産業省の間において革新的な医薬品・医療機器の創出に向け、研究資金の集中投入、ベンチャー企業の育成、臨床研究・治験環境の整備、アジアとの連携、薬事法における審査の迅速化・質の向上、イノベーションの適切な評価、官民対話等、研究から上市に至る過程の一貫かつ集中的な支援を実施することとしている。

○「ドリームBTジャパン」（2008年12月11日BT戦略推進官民会議）

2002年に策定した「バイオテクノロジー戦略大綱」以降、バイオテクノロジーをめぐる状況が変化してきたことを背景に、新産業の育成・創出、食糧問題解決、バイオマス利活用等の課題に対処すべく、イノベーション強化11項目や官民が協働で取り組むべき最重点課題を策定した。

○新経済成長戦略のフォローアップと改訂（2008年9月19日閣議決定）

2006年6月に経済産業省がとりまとめた「新経済成長戦略」を、資源価格の高騰等の構造変化を踏まえフォローアップと改訂を行った。「資源生産性競争」時代における経済産業構造の構築、世界市場獲得と持続的発展のためのグローバル戦略の再構築、地域・中小企業・農林水産業・サービスの未来志向の活性化を3つの柱として、「新経済成長戦略」を強化した。

○「iPS細胞研究の推進について（第一次とりまとめ）」（2008年7月3日総合科学技術会議 iPS細胞研究WG）

iPS細胞研究の成果がもたらす医療への波及効果や新しいバイオインダストリーの進展等について検討を行い、iPS細胞研究を推進するための研究推進体制、国の支援の在り方、知的財産戦略、国際化協力の在り方等を取りまとめた。

○「イノベーション25」（2007年6月閣議決定）

生涯健康な社会形成に向けて中長期的に取り組むべき課題として、治療重点の医療から予防・健康増進を重視する保健医療体系の転換、生命倫理・安全性と医療技術促進政策の調和などをとりあげ、再生医療及び在宅医療・介護に係る社会還元加速プロジェクトを実施するとともに、臨床研究・臨床への橋渡し研究をはじめとする研究開発ロードマップの提示により所要の措置を講じていくこととしている。

○がん対策推進基本計画（2007年6月閣議決定）

がん対策基本法に基づき、国、地方公共団体及び関係者等が、がん対策を総合的かつ計画的に推進するために策定された基本方針であり、取り組むべき施策の一つとして「がん研究」が取り上げられている。具体的には、現状、診断薬・診断機器の開発、治療薬・治療機器の開発等が推進されているが、さらに、有用な早期診断技術についての研究開発の推進等に取り組むことが提示されている。

○新健康フロンティア戦略（2007年4月新健康フロンティア戦略賢人会議）、同アクションプラン（2007年12月）

健康寿命の延伸や生活の質の向上を図ることを目的として策定された新健康フロンティア戦略及び新健康フロンティア戦略アクションプランの中で、「人間の活動領域の拡張に向けた取組」及び「医療・福祉技術のイノベーション」において、「先進的予防・診断・治療技術の開発」や「医薬等ベンチャー・基盤産業支援対策」等の施策が提示されている。

3. 達成目標

- ①医薬品開発の成功確率の向上に資する技術開発や、基礎研究から臨床への橋渡し研究等を通じた、医薬品の上市期間の短縮や開発コストの低減を図る。
- ②再生医療の早期実現を目標とし、産業化を促進する。
- ③医療機器¹など先進的な技術開発等の推進による国際競争力の強化、厚生労働省との連携事業（医療機器開発ガイドラインの策定など）による開発から製品に至るまでの期間の短縮等を達成する。
- ④高齢者・障害者の自立促進や介護者の負担軽減等のため、優れた技術や創意工夫のある福祉機器の実用化支援を行う。

¹ 医療機器は、画像診断システムなどの「診断機器」、内視鏡下手術支援システムなどの「治療機器」、その他家庭用医療機器、歯科材料、眼科用品を含む。

4. 研究開発内容

I. 創薬・診断

I-1. 革新的医薬品の創出

(1) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）

①概要

我が国が強みを持つ糖鎖工学分野において、これまでに取得・開発した「糖鎖遺伝子ライブラリー」「糖鎖構造解析技術」「糖鎖合成技術」を活用し、癌や感染症など様々な疾病に関与する糖鎖の機能を解析する基盤技術を確立し、我が国の優位性を維持するとともに、創薬・診断等の分野における糖鎖機能の産業利用の促進を図る。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、糖鎖や糖タンパク質などの機能を分子レベルで効率的に解明するための基盤技術、糖鎖の機能解析・検証技術、及び、有用性が認められた糖鎖機能を産業利用するための基盤技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発）（運営費交付金）

①概要

我が国が強みとする完全長cDNAライブラリーやタンパク質相互作用解析技術等を最大限に活用し、重要なタンパク質ネットワーク解析等により創薬の対象となるタンパク質の効率的な絞り込みを行うとともに、疾患等の生物現象を制御する化合物の探索まで、一貫した技術開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術や疾患を制御する化合物の探索・評価技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(3) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発）

①概要

創薬上重要な膜タンパク質は複合体を形成していることも多く、その構造解析及び相互作用の情報を取得することは創薬研究において重要であるが、その解析は非常に困難である。そこで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造及びその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析及び構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。

②技術目標及び達成時期

2011年度までに生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体の構造解析手法、リガンド分子との相互作用解析手法を確立するとともに、当該技術から得られた情報に基づく in silico スクリーニング手法を確立する。

③研究開発期間

2007年度～2011年度

(4) 新機能抗体創製技術開発 (運営費交付金)

①概要

ポストゲノム研究や診断・創薬等において重要となっている機能を有する抗体を創製するため、創薬標的として産業利用上重要だが、解析が困難な膜タンパク質やタンパク質複合体を特異的に認識できる抗体を系統的に作成する技術や抗体の分離・精製を高効率に行うための技術の開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、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ための基盤技術、及び、製造コスト低減に向けた抗体の分離・精製を高効率に行う技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(5) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発 (運営費交付金)

①概要

がん対策等の国民医療高度化を目指し、急速に発展している多様なバイオ技術の融合と医療現場への円滑な橋渡しによるイノベーションの創出・加速のため、総合科学技術会議のもと文部科学省及び厚生労働省と連携し、橋渡し研究の強化に一体的に取り組む。具体的には、民間企業と臨床研究機関（文部科学省や厚生労働省が整備する橋渡し研究拠点等）が一体となって行う、医薬品、医療機器、診断ツール等の開発を推進する。

②技術目標及び達成時期

2011年度までに医療現場及び臨床研究からのフィードバックに基づく研究開発により、医薬品、医療機器、診断ツール等の研究開発成果を円滑に実用化につなげる仕組みを確立する。

③研究開発期間

2007年度～2012年度

(6) 幹細胞産業応用促進基盤技術開発 (運営費交付金)

①概要

創薬プロセス効率化や再生医療への応用が期待される iPS 細胞等幹細胞について、産業応用に不可欠な基盤技術の開発や、iPS 細胞に関連した産業応用事例創出の促進を行う。

②技術目標及び達成時期

2013年度までに、安全で効率的なiPS細胞の作製技術を開発するとともに、産業応用に繋げるために必要となるiPS等幹細胞の選別・評価・製造技術を開発し、産業上利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。

③研究開発期間

2009年度～2013年度

(7) 後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発

①概要

がんや生活習慣病などの後天的疾患の原因として重要な因子である「後天的な遺伝子の変化（後天的ゲノム修飾）」を解析する技術や疾患との関連づけにより診断の指標を特定する手法の開発等を実施する。

②技術目標及び到達時期

2014年度までに、後天的ゲノム修飾解析技術開発として、極微量サンプルに対応した解析技術の高精度・高感度化、システム化を行うとともに、開発した技術やモデル動物等を活用し、後天的ゲノム修飾と疾患との関連づけを行う。また、探索的実証研究として、制御因子の探索・同定、制御に関する検証を行う。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

I-2. 診断ツールの開発

(1) 個別化医療実現のための技術融合バイオ診断技術開発（運営費交付金）

①概要

我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、診断への応用を可能とする全自動解析システムの開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発する。さらに、臨床現場において、微量サンプル（数ナノグラム）から、12時間以内に染色体異常（増幅、欠失、コピー数多型等）を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）【再掲】

(3) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

I-3. 創薬・診断に係る基盤整備

(1) 統合データベースプロジェクト

①概要

ライフサイエンス分野では、自身の研究成果と既存の研究成果と対比することにより、自身の研究成果の仮説を考案する手がかりが得られたり、新しい実用化の発想が得られたりする可能性があるため、国家プロジェクト等により産生された研究データを一括して活用できるデータベースが、産業界や社会から要望されている。

このため、政府全体の“生命科学データベース統合化の取組”の一環として、経済産業省関連の公的資金研究から産出される研究データを、産業上の有用性を評価のうえ、統合化し、産業界等に提供する。

②技術目標及び達成時期

2010年までに経済産業省関連機関により実施されたライフサイエンス分野の研究開発プロジェクトの成果に関する情報提供サイトを構築・運用する。また、ヒト遺伝子に関連した各種研究成果に関しては、平成17～19年度に実施したゲノム情報統合プロジェクトにおいて構築した「ヒト全遺伝子のアノテーション統合データベース (H-Invitational)」を基礎として、経済産業省関連の研究成果を連携して利用できるシステムを構築する。

③研究開発期間

2008年度～2010年度Ⅱ. 再生医療

II. 再生医療

II-1. 再生医療の実用化

(1) 次世代機能代替技術研究開発事業（うち、次世代再生医療技術研究開発）（運営費交付金）

①概要

生体内で自己組織の再生を促すセルフリー型再生デバイスや、少量の細胞により生体内で自律的に成熟する自律成熟型再生デバイスの実用化を促進するとともに、これら再生デバイスにおける有効性・安全性の評価技術等を確立する。

②技術目標及び達成時期

2014年度までに、生体内で自己組織の再生を促進するための細胞外マトリクス、幹細胞誘導・分化促進因子等の再生医療技術を確立し、工学的技術との組み合わせにより、セルフリー型再生デバイス及び自律成熟型再生デバイスを作製する。また、それらを用いて再生した組織等の有効性・安全性に関して、低侵襲で高精度な評価技術の標準化に取り組む。さらに、開発する再生デバイスを低侵襲に植込む技術を確立する。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

(2) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

II-2. 再生医療に係る基盤整備

(1) 医療機器開発ガイドライン策定事業

①概要

医療機器産業への投資、新規企業参入、医療機器研究開発の促進及び薬事法審査の円滑化・迅速化にも資する「医療機器開発ガイドライン」を厚生労働省との連携の下、産学の協力を得て、個別の機器ごとに策定し、国内での機器開発促進の環境整備を図るとともに、医療機器産業に製品として、または部品・部材の供給として参入しやすい環境を整備するための方策を検討し、医療機器分野の活性化・国際競争力の強化を図る。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、今後実用化が期待される先進的な医療機器について、工学的安定性や生物学的安定性等に関する詳細な評価基準を策定し、開発ガイドラインとして取りまとめる。また、平成21年度事業において検討・整理された医療機器産業への参入を促す方策や部材供給の活性化方策の具体化を図るため、様々なマッチング機会をコーディネートする人材育成や事業者の海外展開支援策並びに部材供給取引契約にかかるガイドラインの作成及びPL保険のあり方や普及方法等についてさらに検討を加え、医療機器産業の活性化に資するものとする。

③研究開発期間

2008年度～2010年度

Ⅲ. 医療機器

Ⅲ-1. 医療機器の開発

(1) がん超早期診断・治療機器総合研究開発プロジェクト（運営費交付金）

① 概要

がんの診断・治療の革新を一体の課題として捉え、多様な治療法選択が可能なより早期のステージのがんに対して、治療方針を決定するために必要ながん性状、並びに位置に関する正確な情報を確実に取得し、得られた診断情報に基づく侵襲性の低い治療を可能とすることで、患者のQOLを向上させる。

② 技術目標及び到達時期

診断機器システムとしては、分子プローブ等の薬剤並びにそれらの薬剤を用いる高感度・高解像度な画像診断システム、病理診断の効率・信頼性を向上させる病理画像等診断支援システム、遺伝子診断の信頼性を向上させる検体前処理技術を備えた血中がん分子・遺伝子診断システム等を開発する。

治療機器システムとしては、より侵襲性の低い外科的治療を実現する内視鏡下手術支援システム並びに高精度で容易なオペレーションを可能とするX線治療機器を開発する。

③ 研究開発期間

2010年度～2014年度

(うち、内視鏡下手術支援システムは 2007年度～2011年度)

(2) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

(3) 次世代機能代替技術研究開発事業（うち次世代心機能代替治療技術研究開発）（運営交付金）

①概要

小柄な体格にも適用可能な小型の製品で、血栓形成や感染を防ぎ、長期在宅使用が可能な植込み型補助人工心臓を開発する。

②技術目標及び達成時期

2014年度までに、小児を含めた小柄な患者への適用を可能とする、長期使用可能な小型の植込み型補助人工心臓を作製するとともに、有効性及び機械的・電気的・生物学的な安全性の評価を行う。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

Ⅲ-2. 医療機器の開発に係る基盤整備

(1) 医療機器開発ガイドライン策定事業【再掲】

①概要

医療機器産業への投資、新規企業参入、医療機器研究開発の促進及び薬事法審査の円滑化・迅速化にも資する「医療機器開発ガイドライン」を厚生労働省との連携の下、産学の協力を得て、個別の医療機器ごとに策定し、国内での機器開発促進の環境整備を図るとともに、医療機器産業に製品として、または部品・部材の供給として参入しやすい環境を整備するための方策を検討し、医療機器分野の活性化・国際競争力の強化を図る。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、今後実用化が期待される先進的な医療機器について、工学的安定性や生物学的安定性等に関する詳細な評価基準を策定し、開発ガイドラインとして取りまとめる。また、平成21年度事業において検討・整理された医療機器産業への参入を促す方策や部材供給の活性化方策の具体化を図るため、様々なマッチング機会をコーディネートする人材育成や事業者の海外展開支援策並びに部材供給取引契約にかかるガイドラインの作成及びPL保険のあり方や普及方法等についてさらに検討を加え、医療機器産業の活性化に資するものとする。

③研究開発期間

2008年度～2010年度

Ⅳ. 福祉機器

Ⅳ-1. 福祉機器の開発

(1) 福祉用具実用化開発推進事業（運営費交付金）

①概要

「福祉用具の研究開発及び普及の促進に関する法律」（福祉用具法）に基づき、高齢者・障害者及び介護者の生活の質の向上を目的として、生活支援分野、社会活動支援分野を中心とした福祉用具の実用化開発を行う民間企業等に対し、研究開発費

用の2/3以内を補助することで、多様な福祉ニーズに対応するとともに、当該分野における新産業の創出、成長の促進に資する。

②技術目標及び達成時期

高齢者、障害者の生活支援、社会参加支援に資する福祉用具の実用化開発を促進することにより、高齢者等の生活における負担の軽減を図り、安全で安心のできる生活を実現する。より具体的な目標として、各々の補助対象事業終了後3年経過した時点で50パーセント以上を製品化する。

③研究開発期間

1993年度～

IV-2. 福祉機器の開発に係る基盤整備

(1) 福祉機器情報収集・分析・提供事業

①概要

福祉用具法に基づき、民間による福祉機器の実用化のための研究開発を促進するため、福祉機器に関する産業技術に係る情報の収集・分析・提供事業を実施することで、当該分野における福祉機器の普及や新規産業の創出・成長の促進を図る。

②技術目標及び達成時期

各年において福祉機器に係るニーズ等の調査の実施及び福祉用具実用化推進事業で開発された福祉機器の各種展示会等への出展による情報収集・分析・情報の提供を実施する。

③研究開発期間

1993年度～

5. 政策目標の実現に向けた環境整備（成果の実用化、導入普及に向けた取組）

[標準化]

- ・各プロジェクトで得られた成果のうち、標準化すべきものについては、適切な標準化活動（国際規格（ISO/IEC）、日本工業規格（JIS）、その他国際的に認知された標準の提案等）を実施する。具体的には、統合データベースの情報やインターネットに公開されている情報資源等を相互運用するために、必要なデータ形式、フォーマット等の標準化を推進する。
- ・高齢者等支援機器については、関係省庁との緊密な連携の下、標準化等の手法による実用化及び普及の方策を検討する。

[導入普及促進]

- ・ゲノム研究の進展は、個人遺伝情報を用い、情報技術を駆使した幅広い医療・健康サービスによる人々の健康や福祉の向上、さらには新しい医療・健康サービス産業の育成に重要な役割を果たそうとしているが、その際、人権を尊重し、社会の理解と協力を得て、個人遺伝情報の厳格な管理の下で適正に事業を実施することが不可欠である。そのため、個

人遺伝情報を安全に保護するために作成した事業者が遵守すべきルール「経済産業分野のうち個人遺伝情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン（2004年12月17日告示）」（個人遺伝情報保護ガイドラインという）を適切に運用する。

[産業間連携]

- ・バイオベンチャーは商品を市場に送り出すまでに長期間を要する、研究開発のために多額の資金調達を必要とする、事業を行うために様々な規制・審査を経る必要がある等、他業種のベンチャー企業と比較して困難な問題を抱えていることが多い。そのため、バイオベンチャーの様々な問題に対して施策への反映を検討し、補助金等の施策の紹介を通じてバイオベンチャー振興を図る。
- ・「産業クラスター計画」に基づき、全国のバイオクラスターにおいて、企業間のネットワーク形成の支援、産学連携による研究開発プロジェクトの支援、地域系ベンチャーファンドによる資金調達支援等を実施していく。
- ・医療の進歩・国民の健康に貢献する医療機器・用具の産業技術力向上及び国際競争力強化を目指し、研究開発から市場化までのすべてのプロセスにおけるマクロな戦略の検討と、医療機器の重要性について社会的認知の向上を実現するための仕組み及び個別プロジェクトの形成をはかることを使命とした「医療技術産業戦略コンソーシアム（METIS）」が平成13年に設立され、平成21年10月より第4期に入っている。。

[プロジェクト等間の連携について]

- ・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発）については、タンパク質機能解析・活用プロジェクトの成果を活用することで、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術を開発する。
- ・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発）については、「生体高分子立体構造情報解析」の成果を活用することで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造及びその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析及び構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。
- ・糖鎖機能活用技術開発については、糖鎖合成関連遺伝子ライブラリー構築、糖鎖エンジニアリングプロジェクトの成果を活用することで、糖鎖の機能を効率的に解析するための基盤技術を開発する。
- ・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発の「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」、「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」については、必要に応じ、各々の成果を活用し、効率的、効果的な研究開発を図る。

[関係機関との連携]

- ・総合科学技術会議が推進する基本政策推進専門調査会 分野別推進総合PT ライフサイエンスPT及び科学技術連携施策（「生命科学の基礎・基盤」、「臨床研究・臨床への橋渡し研究」）の下、各プロジェクトについて、関係府省との適切な連携を図る。

[その他]

- ・一段と激化する特許戦争の中、成果実用化・効率的な研究開発を推進するため、プロジェクト企画段階から、研究テーマ周辺の論文及び特許状況のサーベイ実施やプロジェクト実施段階における特許出願後の事業化構想等、特許に関する戦略的取組（プロパテントアプローチの導入）を実施する。
- ・医療機器の審査体制の強化による薬事法審査の迅速化の観点から、2004年より独立行政法人産業技術総合研究所の工学系研究者を独立行政法人医薬品医療機器総合機構へ派遣しているところである。
- ・福祉機器においても、中小企業等産業側の観点を福祉政策に活かすため2008年より独立行政法人産業技術総合研究所の職員を厚生労働省に派遣中である。

6. 研究開発の実施に当たっての留意事項

事業の全部又は一部について独立行政法人の運営費交付金により実施されるもの（事業名に（運営費交付金）と記載したものは、中期目標、中期計画等に基づき、運営費交付金の総額の範囲内で、当該独立行政法人の裁量によって実施されるものである。

なお、適切な時期に、実用化・市場化状況等について検証する。

7. 改訂履歴

- (1) 平成12年12月28日付けがん・心疾患等対応高度医療機器プログラム制定。
- (2) 平成14年2月26日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。
- (3) 平成14年2月28日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。がん・心疾患等対応高度医療機器プログラム（平成12・12・27工総第13号）は、廃止。
- (4) 平成15年1月27日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画（平成14・02・25産局第4号）は、廃止。
- (5) 平成15年3月10日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画（平成14・02・05産局第2号）は、廃止。
- (6) 平成16年2月3日付け制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画（平成15・01・23産局第4号）及び健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画（平成15・03・07産局第17号）は、本プログラム基本計画に統合することとし、廃止。
- (7) 平成17年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成16・02・03産局第12号）は、廃止。
- (8) 平成18年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成17・03・25産局第1号）は、廃止。
- (9) 平成19年4月2日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成18・03・31産局第2号）は、廃止。
- (10) 平成20年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成19・03・20産局第5号）は、廃止。

- (11) 平成21年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成20・03・25産局第6号）は廃止。
- (12) 平成22年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成21・03・26産局第3号）は廃止。

(健康安心イノベーションプログラム)

「新機能抗体創製技術開発」基本計画

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

本研究開発は、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し、個の医療を通じた健康寿命の延伸、生活の質の向上を図り、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の実現をめざすことを目的とする「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施する。

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。

これにより、抗体を活用したポストゲノム研究の加速といった幅広い効果が期待できるとともに、ポストゲノム研究や創薬及び診断において有用な抗体の創製が加速され、個別化医療の早期実現や画期的な創薬等につながると同時に、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現に寄与することが期待される。

(2) 研究開発の目標

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。

(3) 研究開発の内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

- ①系統的な高特異性抗体創製技術
- ②高効率な抗体分離精製技術

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(以下、「NEDO技術開発機構」という。)が、単独ないし複数の原則、本邦の企業、研究組合、公益法人等の研究機関(原則、国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点からの国外企業との連携が必要な場合はこの限りではない。)から公募によって研究開発実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を構築し、委託して実施する。

共同研究に参加する各研究開発グループの有する研究開発ポテンシャルの最大限の活用により効率的な研究開発の推進を図る観点から、研究体にはNEDO技術開発機構が指名した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 児玉龍彦教授を研究開発責任者(プロジェクトリーダー)とし、その下に研究者を可能な限り結集して効果的な研究開発を実施する。

(2) 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDO技術開発機構は、経済産業省及びプロジェクトリーダーと密接な連携を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて、NEDO技術開発機構に設置する委員会及び技術検討会等、外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、四半期に一回程度プロジェクトリーダー等を通じて研究開発の進捗について報告を受けること等を行う。

3. 研究開発の実施期間

本研究開発の実施期間は、平成18年度から平成22年度までの5年間とする。

4. 評価に関する事項

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義ならびに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成20年度、事後評価を平成23年度に実施する。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

5. その他重要事項

(1) 研究開発成果の取り扱い

①共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発成果のうち、下記共通基盤技術に係る研究開発成果については、NEDO技術開発機構、実施者とも普及に努めるものとする。

a) 実現手法の確立、体系的整理

- ・ 系統的な高特異性抗体創製技術
- ・ 高効率な抗体分離精製技術

b) 新たな特性データの取得・整備

・ 診断・創薬ターゲットのデータの取得・整備等、本技術開発を通じて得られる有用な情報

②知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備または標準化等との連携を図るため、データベースへのデータの提供、標準情報（TR）制度への提案等を積極的に行う。

③知的財産権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、すべて受託先に帰属させることとする。

④成果の産業化

a) 受託者は、本研究開発から得られる研究開発成果の産業面での着実な活用を図るため、本研究開発の終了後に実施すべき取り組みのあり方や研究開発成果の産業面での活用のビ

ビジネスモデルを立案するとともに、立案した取り組みのあり方とビジネスモデルについて、研究開発の進捗等を考慮して、本研究開発期間中に必要な見直しを行う。

b) 受託者は、上記a)で立案した取り組みとビジネスモデルを本研究開発終了後、実行に移し、成果の産業面での活用に努めるものとする。

(2) 基本計画の変更

NEDO技術開発機構は、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済状況、内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(3) 根拠法

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号に基づき実施する。

(4) 関連指針の厳守

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)等、研究開発関連の指針を厳守しなければならない。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドラインの策定について」(平成16・12・24製局第1号)を厳守しなければならない。

6. 基本計画の改訂履歴

(1) 平成18年1月制定。

(2) 平成20年3月改訂。プロジェクトリーダー名の記載。

(3) 平成20年7月、イノベーションプログラム基本計画の制定により、「(1) 研究開発の目的」の記載を改訂。

(別紙) 研究開発計画

研究開発項目①「系統的な高特異性抗体創製技術」

1. 研究開発の必要性

抗体は生体内に存在する分子の一つで、近年、創薬及び診断等の産業利用上、極めて重要であることが明らかになりつつある。しかし、抗体創製においては、次のような技術課題があり、解決が求められている。①創薬等の標的として産業利用上極めて重要な膜タンパク質等については機能を有した状態で抗原とすることが難しく、特に、機能発現している複雑な複合体に対する抗体創製が困難であること、及び、②膜タンパク質は、生物種間で保存されている領域もあることから、免疫寛容により特異性の高い抗体創製が困難なケースが多く、動物種を変えても特異性の高い機能を有する抗体を得にくいことが課題である。こうした課題に対応するため、産業利用上、重要な膜タンパク質や複合体が機能を有した状態の抗原産生技術の開発、さらにその抗原に対して高特異性・高親和性を有する抗体の

効率的な創製技術の開発が必要である。

2. 研究開発の具体的内容

系統的な高特異性抗体の創製技術を構築する為に、以下の技術開発を行う。

(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。

3. 達成目標

(1) 最終目標（平成22年度末）

上記技術開発で得られる系統的な抗原の産生技術、高特異性・高親和性・高機能性を有する抗体を創製する技術について基盤技術の有効性を評価するため、産業上有用なタンパク質等を500程度産生するとともに、これを抗原として、産業上有用な機能を有する抗体を50程度取得し、その有用性を評価する。

(2) 中間目標（平成20年度末）

上記技術開発で得られる系統的な抗原の産生技術、高特異性・高親和性・高機能性を有する抗体を創製する技術について基盤技術の有効性を評価するため、産業上有用なタンパク質等を250程度産生するとともに、これを抗原として、産業上有用な機能を有する抗体を25程度取得し、その有用性を評価する。

研究開発項目②「高効率な抗体分離精製技術」

1. 研究開発の必要性

抗体の需要は近年大幅に伸びているが、高品質な抗体を低コストで生産・供給するためのダウンストリームの技術の開発が強く要望されている。しかし、抗体製造の低コスト化は容易でなく、製造プロセスにおける単位操作技術の抜本的革新が必要である。

抗体は培養細胞で生産されるが、その後の分離・精製工程が抗体製造の低コスト化を実現する上で技術課題となっている。例えば、分離・精製工程における単位操作技術として、

アフィニティー・クロマトが挙げられるが、この単位操作プロセスが時として全分離精製コストの8割以上になることもある。このアフィニティー・クロマトは、抗体分子と特異的に結合するリガンドを有するビーズ（担体）を充填したものである。現在は、リガンドとして主として天然型（及びその組換え型）の抗体結合性タンパク質（Protein A等）が用いられているが、拡大する多品種抗体の低コスト生産に対応できなくなっている。また、リガンドに結合した抗体の溶出工程では、溶媒・pHが過酷な為、抗体の不可逆的な会合凝集・変性が起こりやすく、低収率や凝集体混入の原因となり、低コスト化のみならず安全性・信頼性を確保する上での課題ともなっている。

こうした課題を解決するためには、分離・精製工程における新規アフィニティー・クロマトの開発を中心とした技術革新が重要である。具体的には、個々の抗体に対応するリガンド設計、担体基材の革新によるクロマトグラフィーの動的挙動の改良や溶出工程の最適化等の開発を行い、今後拡大的に開発される多品種の抗体を高品質、低コストで製造するための技術確立する必要がある。また、抗体の分離・精製工程のこれらの技術を短期間で最適化し、抗体の研究開発から量産開始までの時間短縮を図ることも重要である。

2. 研究開発の具体的内容

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。

3. 達成目標

(1)最終目標（平成22年度末）

抗体の大量生産（培養規模数千リットル以上）に対応する高品質で安全性に優れた製品を低コストで生産・供給するための分離・精製技術を確立する。具体的には、アフィニティー・クロマト用リガンドの選定から分離条件の設定までの工程を構成する単位操作それぞれについて最適化技術を開発することにより、分離精製が困難な新規抗体の分離・精製工程の最適化に係る設計時間を3ヶ月に短縮するとともに、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%以上にする。

(2)中間目標（平成20年度末）

分離精製コストの低減および信頼性の向上を図るうえで重要な基盤技術を確立する。具体的には、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）について、結合特性の一桁以上の改善を達成するリガンド創製技術を開発する。さらに、改善リガンドを用いたアフィニティークロマトシステムの開発により、60%以上の抗体回収率を達成する。

3. 達成目標

(1)最終目標（平成22年度末）

抗体の大量生産（培養規模数千リットル以上）に対応する高品質で安全性に優れた製品を低コストで生産・供給するための分離・精製技術を確立する。具体的には、アフィニティー・クロマト用リガンドの選定から分離条件の設定までの工程を構成する単位操作それぞれについて最適化技術を開発することにより、分離精製が困難な新規抗体の分離・精製工程の最適化に係る設計時間を3ヶ月に短縮するとともに、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%以上にする。

(2)中間目標（平成20年度末）

分離精製コストの低減および信頼性の向上を図るうえで重要な基盤技術を確立する。具体的には、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）について、結合特性の一桁以上の改善を達成するリガンド創製技術を開発する。さらに、改善リガンドを用いたアフィニティークロマトシステムの開発により、60%以上の抗体回収率を達成する。

(別紙) 研究開発計画

研究開発項目①「系統的な高特異性抗体創製技術」

1. 研究開発の必要性

抗体は生体内に存在する分子の一つで、近年、創薬及び診断等の産業利用上、極めて重要であることが明らかになりつつある。しかし、抗体創製においては、次のような技術課題があり、解決が求められている。①創薬等の標的として産業利用上極めて重要な膜タンパク質等については機能を有した状態で抗原とすることが難しく、特に、機能発現している複雑な複合体に対する抗体創製が困難であること、及び、②膜タンパク質は、生物種間で保存されている領域もあることから、免疫寛容により特異性の高い抗体創製が困難なケースが多く、動物種を変えても特異性の高い機能を有する抗体を得にくいことが課題である。こうした課題に対応するため、産業利用上、重要な膜タンパク質や複合体が機能を有した状態の抗原産生技術の開発、さらにその抗原に対して高特異性・高親和性を有する抗体の効率的な創製技術の開発が必要である。

2. 研究開発の具体的内容

系統的な高特異性抗体の創製技術を構築する為に、以下の技術開発を行う。

(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。

3. 達成目標

(1) 最終目標（平成22年度末）

上記技術開発で得られる系統的な抗原の産生技術、高特異性・高親和性・高機能性を有する抗体を創製する技術について基盤技術の有効性を評価するため、産業上有用なタンパク質等を500程度産生するとともに、これを抗原として、産業上有用な機能を有する抗体を50程度取得し、その有用性を評価する。

(2) 中間目標（平成20年度末）

上記技術開発で得られる系統的な抗原の産生技術、高特異性・高親和性・高機能性を有する抗体を創製する技術について基盤技術の有効性を評価するため、産業上有用なタンパク質等を250程度産生するとともに、これを抗原として、産業上有用な機能を有する抗体を25程度取得し、その有用性を評価する。

研究開発項目②「高効率な抗体分離精製技術」

1. 研究開発の必要性

抗体の需要は近年大幅に伸びているが、高品質な抗体を低コストで生産・供給するためのダウンストリームの技術の開発が強く要望されている。しかし、抗体製造の低コスト化は容易でなく、製造プロセスにおける単位操作技術の抜本的革新が必要である。

抗体は培養細胞で生産されるが、その後の分離・精製工程が抗体製造の低コスト化を実現する上で技術課題となっている。例えば、分離・精製工程における単位操作技術として、アフィニティー・クロマトが挙げられるが、この単位操作プロセスが時として全分離精製コストの8割以上になることもある。このアフィニティー・クロマトは、抗体分子と特異的に結合するリガンドを有するビーズ（担体）を充填したものである。現在は、リガンドとして主として天然型（及びその組換え型）の抗体結合性タンパク質（Protein A等）が用いられているが、拡大する多品種抗体の低コスト生産に対応できなくなっている。また、リガンドに結合した抗体の溶出工程では、溶媒・pHが過酷な為、抗体の不可逆的な会合凝集・変性が起こりやすく、低収率や凝集体混入の原因となり、低コスト化のみならず安全性・信頼性を確保する上での課題ともなっている。

こうした課題を解決するためには、分離・精製工程における新規アフィニティー・クロマトの開発を中心とした技術革新が重要である。具体的には、個々の抗体に対応するリガンド設計、担体基材の革新によるクロマトグラフィーの動的挙動の改良や溶出工程の最適化等の開発を行い、今後拡大的に開発される多品種の抗体を高品質、低コストで製造するための技術を確立する必要がある。また、抗体の分離・精製工程のこれらの技術を短期間で最適化し、抗体の研究開発から量産開始までの時間短縮を図ることも重要である。

2. 研究開発の具体的内容

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) 溶出工程技术開発

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。

3. 達成目標

(1) 最終目標（平成22年度末）

抗体の大量生産（培養規模数千リットル以上）に対応する高品質で安全性に優れた製品を低コストで生産・供給するための分離・精製技術を確立する。具体的には、アフィニティー・クロマト用リガンドの選定から分離条件の設定までの工程を構成する単位操作それぞれについて最適化技術を開発することにより、分離精製が困難な新規抗体の分離・精製工程の最適化に係る設計時間を3ヶ月に短縮するとともに、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%以上にする。

(2) 中間目標（平成20年度末）

分離精製コストの低減および信頼性の向上を図るうえで重要な基盤技術を確立する。具体的には、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）について、結合特性の一桁以上の改善を達成するリガンド創製技術を開発する。さらに、改善リガンドを用いたアフィニティークロマトシステムの開発により、60%以上の抗体回収率を達成する。

「新機能抗体創製技術開発」は技術戦略マップ2008(2008年4月10日公開)のバイオテクノロジー分野において、下記のように「創薬・診断分野」における重要な技術と位置づけられている。以下にその内容を抜粋し紹介する。

技術戦略マップ2008(経済産業省)

バイオテクノロジー分野の技術マップ(創薬・診断分野)

Ⅱ. 技術マップ

(1) 技術マップ

国民にとって最大の関心事項である健康とは、病気になった場合に早期に健康状態に戻れること、そして、そもそも病気にならず健康であり続けることに大きく二分される。この2つのニーズに対応するためには、副作用の少ない最適な医薬品の提供を可能とするとともに、将来の疾患リスクを事前に把握した上で、各人において日々の健康管理を行える環境の整備が重要となっている。このため、①「より良い医薬品の開発・提供」及び②「健康産業の創造(治療から予防への転換)」を研究開発の柱として位置づけ、ニーズに従って必要な技術を技術マップ上に俯瞰した。

① より良い医薬品の開発・提供

個々人の病態や遺伝的背景に応じて薬剤を選択することを可能とするためには、画期的な医薬品の開発を促進し、薬剤の母数を拡大することが重要であり、このためには、疾患メカニズムを踏まえ、医薬品のターゲットとなるタンパク質、糖鎖、RNA等の生体分子を探索・特定し、これを医薬品としていち早く市場化することが必要である。また、薬効や副作用の大小は個々人により異なるため、多数の医薬品の中から個々人に応じた最適な医薬品の選択・処方が求められている。このため、技術マップでは、画期的な医薬品開発のための技術課題と医薬品の最適な使用のための技術課題に分け、前者については、医薬品の種類と医薬品開発プロセスという軸から技術課題を整理している。なお、疾患と医薬品との関係については、がんやその他の疾患を見ても、その疾患メカニズムはある特定の疾患の中でも異なっており、また治療用のターゲットが複数存在することから、開発過程において、それぞれの疾患に対し固有の医薬品形態にとらわれない複数のアプローチが取られている。

② 健康産業の創造

病気を予防するためには、自らの罹患リスクを遺伝的に認識した上で、日々の健康管理を行える環境の整備が必要であり、このための技術課題を整理している。さらに、バイオマーカーに着眼し、当該技術より可能な予防及び超早期診断による健康維持のあり方について深化して検討を行い、技術マップを整理している。また、①、②の戦略を推進するうえ

で重要となる「ゲノム情報等をベースとした新規診断技術」のビジネスモデルを【参考資料3】に示す。このビジネスモデルから以下の点が見込まれる。

○現在の臨床現場における利用は治療に比べて相対的に保険点数が低いものの、健康産業を含む公的保険以外の自己負担、民間保険、雇用主負担等でカバーするエリアでの展開は有望である。

○医薬品開発におけるファーマコゲノミクスの進展により、医薬品と診断法の一体化開発や臨床現場での薬物療法における投薬前診断分野における市場の成長性が期待できる状況である（ただし、この分野では診断技術を提供する企業と製薬企業との密な協業が必要）。

（2）重要技術の考え方

この分野の具体的目標である

- ・画期的な医薬品をより早く効率的に提供することにより、優れた治療法を提供する。
- ・個の医療を支える薬剤のバラエティを拡大し、幅広い選択肢を提供する。
- ・個々人の特性・病態に合わせた最適な医療を実現する。
- ・疾患・罹患リスクの把握とこれに対応した予防・早期診断による適切な健康管理を実現する。

を踏まえて、下記の観点から重要技術を抽出し、技術マップに示している。なお、我が国発の技術として脚光を浴びているヒトiPS(induced pluripotent stem cell)細胞については、再生医療分野だけでなく、創薬分野においても「健常人iPS細胞に由来する健常モデル細胞（心筋細胞、肝細胞など）を用いた毒性評価」、「患者iPS細胞由来の疾患モデル細胞を用いた創薬スクリーニング」系の構築による創薬プロセスの効率化（成功率の向上やスピードアップ）や疾患メカニズム解明による新規医薬品の創出などに資する重要技術として幅広い観点から期待されており、技術マップ及びロードマップの該当箇所に明示している。また、iPS細胞研究の展開には、これまで取り組んできているES細胞及び体性幹細胞における知見が大いに活用されるものであり、我が国における幹細胞研究全体の加速が期待できる。

① 「画期的な医薬品・診断技術の開発」

創薬シーズの創出、バイオマーカーの探索、疾病状態における細胞内分子状態の把握等、画期的な医薬品及び診断技術の開発のために重要であると考えられる技術・機器。具体的には、画期的な医薬品ターゲットや各種診断マーカー探索のために重要となるゲノム、プロテオーム、糖鎖、RNA等の生体分子とこれらの相互作用解析や、研究を支援する研究ツール・機器の開発といった診断・医薬品開発への応用に必要な技術開発が挙げられる。

② 「医薬品開発の効率化」

成功確率の向上、製造コスト低減、開発期間短縮等、医薬品開発の効率化のために重要であると考えられる技術・機器。具体的には、医薬品開発の早期段階において毒性や薬剤有効性の評価に利用されるモデル生物系（iPS細胞から構築されるモデル細胞を含む）の

構築、細胞ネットワーク解析、バイオマーカーの活用、化合物ライブラリーの充実、ファーマコゲノミクス等が挙げられる。

③ 「ＱＯＬの向上」

診断の正確さや早期性・簡便性を向上し、日々の健康状態を把握し、疾病状況に応じた適切な医薬品投与や治療を可能とする技術・機器、また、将来の疾患リスクを予測可能とし、日々の健康状態の把握により疾患を未然に防ぐ技術・機器。具体的には、遺伝子情報と疾患との関連解明のための研究開発で得られた情報を有効に活用したバイオマーカーの同定、薬剤投与前に医療現場において安価かつ迅速に個人毎の疾患状態を詳細に診断するためのツールの開発、薬物動態の個人差を考慮した薬効・毒性把握等が挙げられる。

④ 「日本の強みが活かせる技術分野の更なる強化」

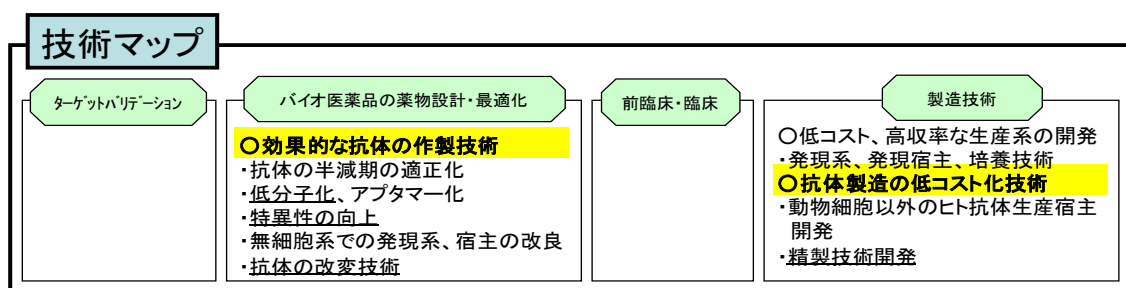
日本における研究が進んでいる分野や他分野での技術力を踏まえた分野等、現在及び将来の技術競争力を保持する上で重要であると考えられる技術・機器。具体的には、糖鎖、完全長cDNA、iPS細胞作製技術、発酵技術、中間体生産技術、微細加工技術等が挙げられる。

⑤ 「波及効果の高い技術」

他分野への波及も含め、波及効果の高い技術・機器。具体的には、新たな研究領域として開拓されつつあり、画期的な医薬品開発への寄与が期待される機能性RNA等が挙げられる。

(3) 改訂のポイント

□ 技術マップ中の重要技術として幹細胞操作技術、疾患モデル細胞の利用技術、安全性評価技術を中心にヒトiPS細胞の活用について追記した。



(経済産業省技術マップ2008より抜粋)

Ⅲ. 技術ロードマップ

(1) 技術ロードマップ

技術マップで抽出された重要技術を中心として作成したロードマップにおいては、個別技術の進展を示すⅢ. 「技術進捗」、技術の進展により得られる直接的な効果を上記の重要技術の分類のうち①～③毎に示したⅡ. 「具体的効果」、及び、この「具体的効果」がもたらす医療現場における変化をⅠ. 「医療現場における進展」として三段階に分けて整理

した。例えば、具体的効果の部分では、①2010年にはがんの抗体医薬のターゲットがほぼ探索され、2025年には自己免疫疾患や生活習慣病及び精神・神経疾患等の発症メカニズムがほぼ解明されているなど、種々の疾患に対する分子レベルでの解明が進むとともに、これを活用した医薬品の開発が進展することが予想される。②また、医薬品の臨床時のドロップアウトを低減する、ヒト臨床症状を反映した疾患モデルの作製技術の確立等により、医薬品の成功確率が現在の5%程度から2025年には50%程度まで向上するなど医薬品の開発効率の向上が予想される。③更に、早期診断・確定診断に有効な疾患マーカー、罹患リスク診断マーカー及び健康モニターマーカーが順次開発され、予防のための環境が整備されるとともに、1つの診断ツールで複数の薬剤の薬効を評価できるなど2015～2025年には個々人の特性を踏まえた治療方法を提供するための技術の確立が見込まれる。これらの技術的効果により、現在の治療を中心とした医療から、予防を重視した医療へと変遷し、また、病気になった場合であっても、現在、治療困難な疾患も含め、患者の体質・遺伝情報や病態に応じた個別療法の提供が可能になるなど、個別化医療が進展していると考えられる。

(2) 改訂のポイント

- 技術ロードマップ中の疾患モデル動物・細胞系にヒトiPS細胞に係る技術を追記した。

IV. その他の改訂のポイント

○ベンチマーキングの策定

- 研究開発規模、市場規模、ベンチャー企業の動向、特許出願技術動向について、海外との比較を行った。【創薬・診断分野の国際競争ポジション】

事前評価書

作成日 平成17年10月5日

1. 事業名称 (コード番号)	新機能抗体創製技術開発プロジェクト
2. 推進部署名	バイオテクノロジー・医療技術開発部
3. 事業概要	<p>(1)概要：抗体は生体内に存在する分子の一つで、近年、研究や創薬、診断等の産業利用上、極めて重要であることが明らかになりつつある。本施策では、産業上重要だが作製が困難な膜タンパク質やその複合体等に対して系統的に特異性の高い抗体を作成するための技術開発を行うとともに、抗体の製造コストを低減する抗体の効率的な分離・精製技術等の基盤技術の開発を行い、バイオ産業の競争力強化に貢献する。</p> <p>(2)事業規模：平成18年度事業費 15.6億円</p> <p>(3)事業期間：平成18年度～22年度（5年間）</p>
4. 評価の検討状況	
<p>(1)事業の位置付け・必要性</p> <p>①事業の位置付け</p> <p>本プロジェクトは、健康・安心プログラムの一環として実施されるものである。プログラムの目標である「国民が健康で安心して暮らせる社会の実現」に向け、達成すべき重要な課題の1つとして、個別化医療による効果的・効率的な医療の実現が掲げられている。個別化医療、すなわち、個々人の体質に合わせた、きめ細かで個々人にとって最適な個別的な医療を行う為には、個々人の疾患に対応する医薬を開発することが必須である。抗体医薬は特異性が高く、個別化医療に不可欠のものであるが、抗体の開発・製造において、種々の大きな技術課題がある。このような課題を解決し、系統的に抗体を作成できる基盤技術の構築は、民間単独では困難であり、国の負担をもって行うことが適切である。</p> <p>なお、技術戦略マップ(平成17年3月経済産業省策定)においては、個別化医療の実現に向けた技術のうち、波及効果が高く、医薬品の効率化に資する技術として、位置づけられている。</p>	

②事業の必要性

今後世界に類を見ない少子高齢社会を迎える我が国において、バイオテクノロジーに係る研究開発・産業化の加速や高度な医療福祉機器等の開発・実用化の促進を通じ、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することが必要とされる。特に、個別化医療・予防医療等高度医療の実現に向け、バイオテクノロジーを活用した画期的な創薬(治療薬・診断薬)創出が重要である。

抗体は生体内に存在する分子の一つで、近年、創薬及び診断等の産業利用上、極めて重要であることが明らかになりつつある。このように、抗体研究をめぐる世界的競争が激しい一方で、とりわけ有用と考えられる膜タンパク質及びその複合体に対する抗体の作成は困難であることや、製造コストが高いことが大きな技術課題となっている。(注:抗体とは、生体内の特定の分子に結合し、生理活性機能を発現するタンパク質)

こうした課題に対応し、膜タンパク質やその複合体等を効果的に発現させる技術や、様々な膜タンパク質複合体等を抗原として特異性の高い抗体を作製する技術が求められている。また、抗体の製造コストの低減を計るべく、抗体の分離・精製技術について高純度精製、高機能化、低コスト化を図るための技術革新が必要である。これ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必要とされている。

こうした課題を解決し、系統的に抗体を作成できる基盤技術の構築は、民間単独では困難。EUでは既に抗体の製造技術の開発等を国が推進、我が国でも主体的な関与が必要。

(2)研究開発目標の妥当性

<目標>

ポストゲノム研究や診断、創薬等において重要な機能を有する抗体を創製するため、以下の技術の開発を行う。

①創薬標的として産業利用上重要だが、解析が困難な膜タンパクやタンパク質複合体等を特異的に認識できる抗体を系統的に作製するための技術

②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

◎数値目標は、次のとおり：

- ・上記の新機能抗体創製基盤を構築することが目標であるが、その過程で診断薬となりうるリード抗体を30程度、治療薬となりうるリード抗体を10程度見出す。

<妥当性>

目標設定は、特異性抗体を創製する基盤技術を確立する段階である本プロジェクトとしては十分と考えられるが、NEDO POST2 やワークショップ等を通じて意見を聴取し、妥当性について更なる検討を行う。

(3)研究開発マネジメント

公募を行い最適な研究開発体制を構築する。プロジェクトリーダーを選定し、プロジェクトリーダーと協議して研究管理を行う。また、研究開発委員会を年2～3回開催し、研究テーマ間の連携の強化、進捗状況を踏まえた予算配分・事業計画の策定を行う。プロジェクト開始後3年目に中間評価を行い、その評価結果を踏まえ事業全体を見直す。

(4)研究開発成果

創薬上重要と考えられる膜タンパク質やその複合体等、500 個程度のタンパク質を対象に特異性の高い抗体を系統的に作製するための複合体発現技術、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。

(5)実用化・事業化の見通し

本プロジェクトは、産業上の有用性が期待される抗体の作成に共通する技術課題を解決することで、個別化医療の実現及び画期的な新薬開発及びポストゲノム研究の産業化に寄与する技術開発であり、高い波及効果が見込まれる。さらに、本プロジェクトにおいては、参画する企業等の自己負担により、当該技術の実用化のために必要な実用化研究を同時並行的に行い、適切な受益者負担による早期の市場投入を進める。

当プロジェクトの成果により、創薬や診断において有用な抗体の創製が加速されるので、製薬産業を中心に、研究開発スピード向上や製造コストの大幅な低減に資することが可能となる。さらに、製造コストの削減、高品質な抗体生産による医薬品の上市確立の向上が見込まれる。また、抗体を活用したポストゲノム研究の加速といった、幅広い効果が期待できるため、国としての付加価値が上がることから、対日投資や海外企業進出を促進させ、国内産業の活性化にもつながることが想定される。

(6)その他特記事項

5. 総合評価

本プロジェクトは、産業上の有用性が期待される抗体の作成に共通する技術課題を解決することで、個別化医療の実現及び画期的な新薬開発及びポストゲノム研究の産業化に寄与する技術開発であり、高い波及効果が見込まれる。当プロジェクトの成果により、創薬や診断において有用な抗体の創製が加速されるとともに、抗体を活用したポストゲノム研究の加速といった、幅広い効果が期待できるため、本プロジェクトの有効性は高いと考えられる。

「新機能抗体創製技術開発基本計画（案）」に対するパブリックコメント募集の結果について

平成18年2月27日
NEDO技術開発機構
バイオテクノロジー・医療技術開発部

NEDO POST 3において標記基本計画（案）に対するパブリックコメントの募集を行いました結果をご報告いたします。
お寄せいただきましたご意見を検討し、別添の基本計画に反映させていただきました。
みなさまからのご協力を頂き、ありがとうございました。

1. パブリックコメント募集期間

平成17年12月27日～平成18年1月11日

2. パブリックコメント投稿数＜有効のもの＞

計2件

3. パブリックコメントの内容とそれに対する考え方

ご意見の概要	ご意見に対する考え方	基本計画への反映
全体について		
<p>[意見1] 新規機能抗体の開発と、ヒト抗体の医薬品としての大量生産の両者の実現化を目指す、非常にバランスの良いプロジェクトだと思います。21世紀に登場した抗体医薬品は「がん治療分野」に今のところ限られておりますが、造血幹細胞移植などの組織幹細胞移植分野(再生医療分野)にも大変重要な役割を果たすと思います。既存分野に限らない、様々な難治性疾患分野を対象とした創薬シーズをたくさん開発していただき、国民の健康安心につながる成果を挙げていただければと思います。</p> <p>[意見2] ・抗原の作製、抗体の創製、抗体量産化という工程に分けてプロジェクトが構成されていることはロジカルであると考えます。プロジェクトの目的には、創薬や診断に向けて新機能抗体を創製すると記載されていますが、創薬と診断では技術開発に求められる特性が違ふと感じます。たとえば、量産化する抗体の量、求められる純度や混入物質の種類・量など。ワークショップでの各講師の資料からは、抗体医薬を意識した方向性が強く出ていると感じます。主眼をどこにおいて開発するか具体化する必要があるように思います。</p>	<p>[考え方と対応] ご意見のとおり、新機能抗体創製技術開発により、産業を活性化し、国民の健康安心につなげていきたいと考えております。</p> <p>・創薬と診断では、抗体に求められる特性が異なる面があると考えられますが、それらは実際に産業化を行う際に、考慮すればよいことかと考えられます。</p>	<p>[反映の有無と反映内容] 特になし。</p> <p>特になし。</p>

1. 研究開発の目的

(3) 研究開発の内容

[意見3]

・免疫寛容性に対する打開策は、やはり生物がゲノム上に持っているライブラリに頼らない、コンビケム的なアプローチが欠かせないと考えます。もちろんリスクがありますので、コンビケム一本に絞るのではなく、コンティンジェンシー(代替)プランとして、欧米にない独自技術に目を配っておくことが不可欠と考えます。

[意見4]

・アフィニティ精製法に関して、タンパク質分子リガンドの開発が項目として上がっていますが、タンパク質相互作用を弱めて溶出する際、タンパク質の構造が不安定化する条件にさらすため、抗体が不溶化するなどの現象が生じやすいと考えられます。アフィニティ用のリガンドとして、アダマーのようなペプチド性でないものを想定することも必要ではないでしょうか？その意味で、「タンパク質分子リガンド」からタンパク質という限定を外して適用可能な技術を探ることが必要ではないかと思えます。

・当該基本計画では、コンビケムに限定しておりませんので、広く独自技術のご提案をお願いします。

特になし。

・研究開発の具体的内容として、“タンパク質分子リガンド技術開発”が挙がっておりますが、これはタンパク質分子リガンドに限定するものではなく、タンパク質分子リガンドと同等以上の特性を有する物であれば、研究開発の対象となり得ます。

特になし。

特許論文リスト

特許、論文、外部発表等の件数（内訳）

区分 年度	国内	外国	PCT*出願	査読付き	学会発表	その他外部発表 （プレス発表等）
H18FY	3件	0件	0件	47件	22件	0件
H19FY	4件	0件	0件	52件	57件	2件
H20FY	0件	0件	0件	42件	45件	7件
H21FY	4件	0件	0件	49件	25件	6件
H22FY	5件	0件	1件	23件	15件	5件

[知的所有権] 研究開発項目①「系統的な高特異性抗体創製技術」

番号	出願者	出願番号	国内 外国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
001	東京大学、ペルセウス	特願 2006-291091 (特願 2006-114134 に 基づく優先権主張)	日本特許	2006/10/26	出願 済	膵臓癌の診断薬お よび治療薬	油谷浩幸、岩成 宏子、河野功、 勝美恵子、森由 紀子
002	東京大学、ペルセウス	特願 2006-347544	日本特許	2006/12/25	出願 済	膵臓癌の診断薬お よび治療薬	油谷浩幸、岩成 宏子、河野功
003	国立大学法人広島大学、ヒューマンサイエンス振興財団	特願 2007-256649	日本特許	2006	出願 済	新規抗体及びその 利用方法	松田治男、沢村 達也、西道教尚
004	東京大学、ペルセウス	特願 2007-48964	日本特許	2007/2/28	出願 済	腎癌の診断薬およ び治療薬	油谷浩幸、深山 正久、森川鉄 平、河野功、杉 山暁
005	東京大学、ペルセウス	特願 2007-068053	日本特許	2007/3/16	出願 済	癌の診断薬及び治 療薬	油谷浩幸、浜窪 隆雄、河野功
006	東京大学	特願 2007-140356	日本特許	2007/5	出願 済	抗 ROB01 抗体を含 む PET 用腫瘍診断 剤	岩成宏子、河野 功、浜窪隆雄、 熊倉嘉貴、伊藤 浩孝、先浜俊 子、油谷浩幸、 百瀬敏光
007	国立大学法人岡山大学	特願 2007-23174	日本特許	2007	出願 済	B細胞の抗体遺伝 子変異様式の転換 方法	大森齊、金山直 樹
008	東京大学 新潟大学 PPMX	2009-1209233	国内	2009/4/28	出願 済	免疫寛容機構の解 除を用いる抗体の 製造方法及び自己 免疫疾患モデル動 物の製造方法	浜窪隆雄、先浜 敏子、岩成宏 子、坂口志文、 内藤 真、須藤 幸夫、中田淑子
009	財団法人 癌研究会	特願 2009-046810	日本特許	2009/2/27	出願 中	食道がんに対する 放射線化学療法感 受性マーカー	野田哲生 陳勁松 高橋一臣
010	㈱広島バイオメ ディカル	特願 2009-145696	日本特許	2009	出願 済		松田治男、澤村 達也
011	広島大学	特願 2009-242891	日本特許	2009	出願 済	抗インテグリン ・8・1抗体	松田治男、西道 教尚、立石能 子、横崎恭之
		特願 2010-85473 PCT/099135771	PCT				

012	広島大学	特願 2010-065194	日本特許	2010	出願済	オステオポンチン特異的モノクローナル抗体	松田治男、西道教尚、横崎恭之
013	国立大学法人東京大学、国立大学法人新潟大学、株式会社ペルセウスプロテオミクス(PPMX)	2009-109230	国内	2010/4/28	出願済	転移基で修飾された基質の製造方法	浜窪隆雄、児玉龍彦、畑中研一、高橋一彰、須藤幸夫、川村猛、中田淑子
014	国立大学法人岡山大学	特願 2010-258404	日本特許	2010	出願済	ヒト型抗体を産生するB細胞の作製方法	大森齊、金山直樹
015	東京大学、田辺三菱製薬株式会社	特願 2010-268763	日本特許	2010/12/1	出願済	無細胞翻訳系でFabを提示しうるポリヌクレオチド構築物ならびにそれを用いたFabの製造方法およびスクリーニング方法	藤野泰寛、藤田梨紗子、和田浩一、藤重古都美、上田卓也、清水義宏、金森崇
016	東京理科大	特願 61425773	日本特許	2010/12/22	米国仮出願	Modified protein therapeutics	増保安彦、金子要、長島弘明、山野井彩香

【論文・文献発表】 研究開発項目①「系統的な高特異性抗体創製技術」

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
001	Tachibana K, Anzai N, Ueda C, Katayama T, Kirino T, Takahashi R, Yamasaki D, Ishimoto K, Tanaka T, Hamakubo T, Ueda Y, Arai H, Sakai J, Kodama T, Doi T.	東京大学・先端科学技術研究センター	Analysis of PPAR alpha function in human kidney cell line using siRNA.	<i>Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)</i> . (50):257-8	有	2006
002	Horiuchi K, Umetani M, Minami T, Okayama H, Takada S, Yamamoto M, Aburatani H, Reid PC, Housman DE, Hamakubo T, Kodama T.	東京大学・先端科学技術研究センター	Wilms' tumor 1-associating protein regulates G2/M transition through stabilization of cyclin A2 mRNA.	<i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> . 103(46):17278-83.	有	2006
003	Inoue K, Kobayashi M, Yano K, Miura M, Izumi A, Mataka C, Doi T, Hamakubo T, Reid PC, Hume DA, Yoshida M, Aird WC, Kodama T, Minami T.	東京大学・先端科学技術研究センター	Histone deacetylase inhibitor reduces monocyte adhesion to endothelium through the suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression.	<i>Arterioscler Thromb Vasc Biol</i> . 103(46):17278-83	有	2006
004	Ishimoto K, Tachibana K, Sumitomo M, Omote S, Hanano I, Yamasaki D, Watanabe Y, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Doi T.	東京大学・先端科学技術研究センター	Identification of human low-density lipoprotein receptor as a novel target gene regulated by liver X receptor alpha.	<i>FEBS Lett</i> . Sep 4;580(20):4929-33.	有	2006

005	Ito H, Funahashi S, Yamauchi N, Shibahara J, Midorikawa Y, Kawai S, Kinoshita Y, Watanabe A, Hippo Y, Ohtomo T, Iwanari H, Nakajima A, Makuuchi M, Fukayama M, Hirata Y, Hamakubo T, Kodama T, Tsuchiya M, Aburatani H.	東京大学・先端科学技術研究センター	Identification of ROBO1 as a novel hepatocellular carcinoma antigen and a potential therapeutic and diagnostic target.	<i>Clin Cancer Res.</i> Jun 1;12(11 Pt 1):3257-64.	有	2006
006	Ogura T, Mio K, Hayashi I, Miyashita H, Fukuda R, Kopan R, Kodama T, Hamakubo T, Iwatsubo T, Tomita T, Sato C.	東京大学・先端科学技術研究センター	Three-dimensional structure of the gamma-secretase complex.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i> May 5;343(2):525-34	有	2006
007	Daigo K, Sugita S, Mochizuki Y, Iwanari H, Hiraishi K, Miyano K, Kodama T, Hamakubo T.	東京大学・先端科学技術研究センター	A simple hybridoma screening method for high-affinity monoclonal antibodies using the signal ratio obtained from time-resolved fluorescence assay.	<i>Anal Biochem.</i> Apr 15;351(2):219-28.	有	2006
008	Saitoh R, Ohtomo T, Ito Y, Nezu J, Kimura N, Funahashi S, Aso Y, Ohizumi I, Kodama T, Hamakubo T, Tsuchiya M.	東京大学・先端科学技術研究センター	Recovery of functional peptide transporter PepT1 in budded baculovirus fraction.	<i>Protein Expr Purif.</i> Mar;46(1):130-5.	有	2006
009	Shinozaki-Narikawa N., Kodama T., Shibasaki Y.	東京大学・先端科学技術研究センター	Cooperation of phosphoinositides and BAR domain proteins in endosomal tubulation.	<i>Traffic 7,</i> 1539-1550.	有	2006
010	Tanaka, T., Jiang, S., Hotta, H., Takano, K., Iwanari, H., Sumi, K., Daigo, K., Ohashi, R., Sugai, M., Ikegame, C., Umezu, H., Hirayama, Y., Midorikawa, Y., Hippo, Y., Watanabe, A., Uchiyama, Y., Hasegawa, G., Reid, P., Aburatani, H., Hamakubo, T., Sakai, J., Naito, M. and Kodama, T.	東京大学・先端科学技術研究センター	Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha in the pathogenesis of human cancer.	<i>J Pathol</i> 2006; 198, 662-672.	有	2006
011	Takayasu, S., Sakurai, T., Iwasaki, S., Teranishi, H., Yamanaka, A., Williams, S. C., Iguchi, H., Kawasaki, Y. I., Ikeda, Y., Sakakibara, I., Ohno, K., Ioka, R. X., Murakami, S., Dohmae, N., Xie, J., Suda, T., Motoike, T., Ohuchi, T., Yanagisawa, M., and Sakai, J.	東京大学・先端科学技術研究センター	A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice.	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 103, 7438-7443.	有	2006

012	Takahashi S, Tanaka T, Kodama T, Sakai J	東京大学・先端科学技術研究センター	Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta), a novel target site for drug discovery in metabolic syndrome.	<i>Pharmacol Res</i> , 53, 501-507.	有	2006
013	Suh-J.-M., Yu C.-T., Tang K., Tanaka T., Kodama T., Tsai M.-J., Tsai S.-Y.	東京大学・先端科学技術研究センター	The expression profiles of nuclear receptors in the developing and adult kidney.	<i>Mol. Endocrinol.</i> , 20, 3412-3420.	有	2006
014	Suh-J.-M., Yu C.-T., Tang K., Tanaka T., Kodama T., Tsai M.-J., Tsai S.-Y.	東京大学・先端科学技術研究センター	The expression profiles of nuclear receptors in the developing and adult kidney.	<i>Mol. Endocrinol.</i> , 20, 3412-3420.	有	2006
015	Guo Y, Chen Y, Ito H, Watanabe A, Ge X, Kodama T, Aburatani H.	東京大学・先端科学技術研究センター	Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma.	<i>Gene</i> . 384:51-61	有	2006
016	Midorikawa Y, Yamamoto S, Ishikawa S, Kamimura N, Igarashi H, Sugimura H, Makuuchi M, Aburatani H.	東京大学・先端科学技術研究センター	Molecular karyotyping of human hepatocellular carcinoma using single-nucleotide polymorphism arrays.	<i>Oncogene</i> 25 (40):5581-90	有	2006
017	Kinoshita Y, Watanabe A, Hippo Y, Ohtomo T, Iwanari H, Nakajima A, Makuuchi M, Fukayama M, Hirata Y, Hamakubo T, Kodama T, Tsuchiya M, Aburatani H.	東京大学・先端科学技術研究センター	Identification of ROBO1 as a Novel Hepatocellular Carcinoma Antigen and a Potential Therapeutic and Diagnostic Target.	<i>Clin Cancer Res</i> . 12 (11):3257-64.	有	2006
018	Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y.	東京大学・先端科学技術研究センター	Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis.	<i>Nat Cell Biol</i> . 8 (12):1369-75	有	2006
019	<u>Tachibana K, Anzai N, Ueda C, Katayama T, Kirino T, Takahashi R, Yamasaki D, Ishimoto K, Tanaka T, Hamakubo T, Ueda Y, Arai H, Sakai J, Kodama T, Doi T.</u>	東京大学・先端科学技術研究センター	Analysis of PPAR alpha function in human kidney cell line using siRNA.	<i>Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)</i> . : (50):257-8.	有	2006
020	<u>Horiuchi K, Umetani M, Minami T, Okayama H, Takada S, Yamamoto M, Aburatani H, Reid PC, Housman DE, Hamakubo T, Kodama T.</u>	東京大学・先端科学技術研究センター	Wilms' tumor 1-associating protein regulates G2/M transition through stabilization of cyclin A2 mRNA.	<i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> . Nov 14;103 (46):17278-83.	有	2006
021	<u>Ogura T, Mio K, Hayashi I, Miyashita H, Fukuda R, Kopan R, Kodama T, Hamakubo T, Iwatsubo T, Tomita T, Sato C.</u>	東京大学・先端科学技術研究センター	Three-dimensional structure of the gamma-secretase complex.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i> . May 5;343 (2):525-34.	有	2006

022	<u>Tanaka T, Jiang S, Hotta H, Takano K, Iwanari H, Sumi K, Daigo K, Ohashi R, Sugai M, Ikegame C, Umezu H, Hirayama Y, Midorikawa Y, Hippo Y, Watanabe A, Uchiyama Y, Hasegawa G, Reid P, Aburatani H, Hamakubo T, Sakai J, Naito M, Kodama T.</u>	東京大学・先端科学技術研究センター	Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha in the pathogenesis of human cancer.	<i>J Pathol.</i> Apr;208(5):662-72	有	2006
023	<u>Saitoh R, Ohtomo T, Ito Y, Nezu J, Kimura N, Funahashi S, Aso Y, Ohizumi I, Kodama T, Hamakubo T, Tsuchiya M.</u>	東京大学・先端科学技術研究センター	Recovery of functional peptide transporter PepT1 in budded baculovirus fraction.	<i>Protein Expr Purif.</i> Mar;46(1):130-5	有	2006
024	Asakawa, H., Sasabe, M., Miyazaki, Ryuunosuke, Matsuda, H., Fukai, F., Hanada, K., Hirano, H. and Takasaki, S.	広島大学・大学院生物圏	The analysis of N-glycolylneuraminic acid (NeuGc) of hepatoma tissue and K562 cell ferritins using HPLC and mass spectrometry..	<i>Proc. Jpn. Acad. Ser. B.</i> 82:181-187,	有	2006
025	Ma, F.X., Zhou, B., Chen, Z., Ren, Q., Lu, S.H., Sawamura, T. and Han, Z.C	国立循環器病センター	Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase.	<i>J. Lipid Res.</i> 47:1227-1237	有	2006
026	Tanigawa, H., Miura, S., Matsuo, Y., Fujino, M., Sawamura, T. and Saku, K.	国立循環器病センター	Dominant-negative LOX-1 blocks homodimerization of wild-type LOX-1-induced cell proliferation through extracellular signal regulated kinase 1/2 activation.	<i>Hypertension</i> 48:294-300	有	2006
027	Akagi, M., Nishimura, S., Yoshida, K., Kakinuma, T., Sawamura, T., Munakata, H. and Hamanishi, C.	国立循環器病センター	Cyclic tensile stretch load and oxidized low density lipoprotein synergistically induce lectin-like oxidized LDL receptor-1 in cultured bovine chondrocytes, resulting in decreased cell viability and proteoglycan synthesis.	<i>J. Orthop. Res.</i> 24:1782-1790	有	2006
028	Kanata, S., Akagi, M., Nishimura, S., Hayakawa, S., Yoshida, K., Sawamura, T., Munakata, H. and Hamanishi, C.	国立循環器病センター	Oxidized LDL binding to LOX-1 upregulates VEGF expression in cultured bovine chondrocytes through activation of PPAR-gamma.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 348:1003-1010	有	2006
029	Tanigawa, H., Miura, S., Zhang, B., Uehara, Y., Matsuo, Y., Fujino, M., Sawamura, T. and Saku, K.	国立循環器病センター	Low-density lipoprotein oxidized to various degrees activates ERK1/2 through LOX-1.	<i>Atherosclerosis</i> 188:245-250	有	2006
030	Oka, K., Yasuhara, M., Suzumura, K., Tanaka, K. and Sawamura, T.	国立循環器病センター	Antioxidants Suppress Plasma Levels of Lectinlike Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-Ligands and Reduce	<i>J. Cardiovas. c Pharmacol.</i> 48:177-183	有	2006

			Atherosclerosis in Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits.			
031	Kanayama, N., Todo, K., Takahashi, S., Magari, M., Ohmori, H.	岡山大学	Genetic manipulation of an exogenous non-immunoglobulin protein by gene conversion machinery in a chicken B cell line.	<i>Nucleic Acids Res.</i> 34 e10.	有	2006
032	Yamaguchi T, Sakaguchi S.	京都大学再生医科学研究所	Skin controls immune regulators.	<i>Nat Med.</i> 12:1358-1359	有	2006
033	Katakai T, Nomura T, Gonda H, Sugai M, Agata Y, Nishio A, Masuda T, Sakaguchi S, Shimizu A.	京都大学再生医科学研究所	Spontaneous Large-Scale Lymphoid Neogenesis and Balanced Autoimmunity versus Tolerance in the Stomach of H+/K+-ATPase-Reactive TCR Transgenic Mouse.	<i>J Immunol.</i> 177:7858-67,	有	2006
034	Wing, K. and Sakaguchi, S.	京都大学再生医科学研究所	Regulatory T cells in allergy.	<i>Curr. Opin. Allergy and Immunol.</i> 6:482-8,	有	2006
035	Sakaguchi, S.	京都大学再生医科学研究所	Introduction: Regulatory T cells.	<i>Curr. Opin. Allergy and Immunol.</i> 6:482-8,	有	2006
036	Sakaguchi, S.	京都大学再生医科学研究所	Introduction: Regulatory T cells.	<i>Springer Semin. Immunopathol.</i> 28:1-2,	有	2006
037	Fehervari, Z. and Sakaguchi, S.	京都大学再生医科学研究所	Peacekeepers of the immune system.	<i>Sci Am.</i> 295:56-63,	有	2006
038	Wing, K., Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.	京都大学再生医科学研究所	Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells.	<i>Int. Immunol.</i> 18:991-1000	有	2006
039	Sugimoto, N., Oida, T., Hirota, K., Nakamura, K., Nomura, T., Uchiyama, T., and Sakaguchi, S.	京都大学再生医科学研究所	Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25 ⁺ CD4 ⁺ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis.	<i>Int. Immunol.</i> 18:1197-1209	有	2006
040	Nishioka, T., Shimizu, J, Iida, R., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S.	京都大学再生医科学研究所	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ T cells and CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ T cells in aged mice.	<i>J. Immunol.</i> 176:6586-6593	有	2006
041	Sakaguchi, S.	京都大学再生医科学研究所	Regulatory T cells: meden agan.	<i>Immunol. Rev.</i> 212:5-7,	有	2006
042	Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and	京都大学再生医科学研究所	Foxp3 ⁺ CD25 ⁺ CD4 ⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease.	<i>Immunol. Rev.</i> 212:8-27	有	2006

	Nomura, T.					
043	Ono, M., Shimizu, J., Miyachi, Y., and Sakaguchi, S.	京都大学再生医科学研究所	Induction of fatal autoimmune myocarditis and other autoimmune diseases in mice by depleting Foxp3-expressing naturally arising CD4 ⁺ regulatory T cells.	<i>J. Immunol.</i> 176:4748-4756	有	2006
044	Fehervari, Z., Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S.	京都大学再生医科学研究所	The dichotomous roles of IL-2: tolerance versus immunity.	<i>Trends Immunol.</i> 27:109-111,	有	2006
045	Yamaguchi, T. and Sakaguchi, S.	京都大学再生医科学研究所	Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer.	<i>Semin. Cancer Biol.</i> 16:115-123,	有	2006
046	Sakaguchi, S., Setoguchi, R., Yagi, H., and Nomura, T.	京都大学再生医科学研究所	Naturally arising Foxp3-expressing CD25 ⁺ CD4 ⁺ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease.	<i>Curr Top Microbiol Immunol</i> 305:51-66	有	2006
047	Fehervari, Z. and Sakaguchi, S.	京都大学再生医科学研究所	T lymphocytes: Regulatory. Nature Encyclopedia of Life Sciences.	<i>Wiley Interscience Available at www.els.net.</i>	有	2006
048	Tachibana K, Katayama T, Ueda C, Sumitomo M, Tagami M, Ishimoto K, Yamasaki D, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Obika S, Imanishi T, Doi T.	東京大学・先端科学技術研究センター	Antisense activity of 2',4'-BNA targeted to PPAR gamma in THP-1 and HCT116 cells.	<i>Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)</i> . (51):441-2.	有	2007
049	Baba M, Suzuki M, Ganeev RA, Kuroda H, Ozaki T, Hamakubo T, Masuda K, Hayashi M, Sakihama T, Kodama T, Kozasa T.	東京大学・先端科学技術研究センター	Decay time shortening of fluorescence from donor-acceptor pair proteins using ultrafast time-resolved fluorescence resonance energy transfer spectroscopy.	<i>Journal of Luminescenc</i> 127, 355-361	有	2007
050	Wako K, Kawasaki T, Yamana K, Suzuki K, Jiang S, Umezu H, Nishiyama T, Takahashi K, Hamakubo T, Kodama T, Naito M.	東京大学・先端科学技術研究センター	Expression of androgen receptor through androgen-converting enzymes is associated with biological aggressiveness in prostate cancer.	<i>J Clin Pathol.</i> 24 Apr:61(4):448-54	有	2007
051	Reid PC, Urano Y, Kodama T, Hamakubo T.	東京大学・先端科学技術研究センター	Alzheimer's Disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins.	<i>J Cell Mol Med.</i> May-Jun:11(3) :383-92.	有	2007
052	Yoshitake H, Takahashi M, Ishikawa H, Nojima M, Iwanari H, Watanabe A, Aburatani H, Yoshida K, Ishi K, Takamori K, Ogawa H, Hamakubo T, Kodama T,	東京大学・先端科学技術研究センター	Aldo-keto reductase family 1, member B10 in uterine carcinomas: a potential risk factor of recurrence after surgical therapy in cervical cancer.	<i>Int J Gynecol Cancer.</i> Nov-Dec:17(6) :1300-6	有	2007

	Araki Y.					
053	Takahashi S, Tanaka T, Sakai	東京大学・先端科学技術研究センター	New Therapeutic Target for Metabolic Syndrome: PPARdelta.	<i>Endocr J</i> , 54, 347-357,	有	2007
054	Sumi K, Tanaka T, Uchida A, Magoori K, Urashima Y, Ohashi R, Ohguchi H, Okamura M, Kudo H, Daigo K, Maejima T, Kojima N, Sakakibara I, Jiang S, Hasegawa G, Kim I, Osborne TF, Naito M, Gonzalez FJ, Hamakubo T, Kodama T, Sakai J.	東京大学・先端科学技術研究センター	Cooperative interaction between Hepatocyte Nuclear Factor 4{alpha} and GATA transcription factors Regulates ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8.	<i>Mol Cell Biol.</i> Jun;27(12):4248-60	有	2007
055	Saitoh R, Ohtomo T, Yamada Y, Kamada N, Nezu J, Kimura N, Funahashi S, Furugaki K, Yoshino T, Kawase Y, Kato A, Ueda O, Jishage K, Suzuki M, Fukuda R, Arai M, Iwanari H, Takahashi K, Sakihama T, Ohizumi I, Kodama T, Tsuchiya M, Hamakubo T.	東京大学・先端科学技術研究センター	Viral envelope protein gp64 transgenic mouse facilitates the generation of monoclonal antibodies against exogenous membrane proteins displayed on baculovirus.	<i>J Immunol Methods.</i> 2007 Apr 30;322(1-2):104-17.	有	2007
056	Sakamoto A, Kawasaki T, Kazawa T, Ohashi R, Jiang S, Maejima T, Tanaka T, Iwanari H, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Naito M.	東京大学・先端科学技術研究センター	Expression of Liver X Receptor {alpha} in Rat Fetal Tissues at Different Developmental Stages.	<i>J Histochem Cytochem.</i> Jun;55(6):641-9	有	2007
057	Iguchi H, Urashima Y, Inagaki Y, Ikeda Y, Okamura M, Tanaka T, Uchida A, Yamamoto TT, Kodama T, Sakai J	東京大学・先端科学技術研究センター	SOX6 Suppresses Cyclin D1 Promoter Activity by Interacting with beta-Catenin and Histone Deacetylase 1, and Its Down-regulation Induces Pancreatic beta-Cell Proliferation.	<i>J Biol Chem</i> 282, 19052-19061.	有	2007
058	Oshima T., Kawasaki T., Ohashi R., Hasegawa G., Jiang S., Umezumi H., Aoyagi Y., Iwanari H., Tanaka T., Hamakubo T., Kodama T.	東京大学・先端科学技術研究センター	Down-regulated P1 promoter-driven HNF4a expression in human colorectal carcinoma is a new prognostic factor against liver metastasis.	<i>Pathol. Int.</i> , 57, 82-90	有	2007
059	Qin J., Suh J.-M., Kim B.-J., Yu C.-T., Tanaka T., Kodama T., Tsai M.-J., Tsai S.-Y.	東京大学・先端科学技術研究センター	The expression pattern of nuclear receptors during cerebellar development.	<i>Dev. Dyn.</i> , 236, 810-820.	有	2007
060	Morikawa T, Sugiyama A, Kume H, Ota S, Kashima T, Tomita K, Kitamura T, Kodama T, Fukayama M, Aburatani H.	東京大学・先端科学技術研究センター	Identification of toll-like receptor 3 as a potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma.	<i>Clin Cancer Res.</i> 13(19):5703-9.	有	2007

061	<u>Tachibana K, Katayama T, Ueda C, Sumitomo M, Tagami M, Ishimoto K, Yamasaki D, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Obika S, Imanishi T, Doi T.</u>	東京大学・先端科学技術研究センター	Antisense activity of 2',4'-BNA targeted to PPAR gamma in THP-1 and HCT116 cells.	<i>Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)</i> . : (51):441-2	有	2007
062	<u>Yoshitake H, Takahashi M, Ishikawa H, Nojima M, Iwanari H, Watanabe A, Aburatani H, Yoshida K, Ishi K, Takamori K, Ogawa H, Hamakubo T, Kodama T, Araki Y.</u>	東京大学・先端科学技術研究センター	Aldo-keto reductase family 1, member B10 in uterine carcinomas: a potential risk factor of recurrence after surgical therapy in cervical cancer.	<i>Int J Gynecol Cancer</i> . Nov-Dec;17(6):1300-6	有	2007
063	<u>Sugiyama A, Wada Y, Izumi A, Kobayashi M, Kohro T, Patrick CR, Hamakubo T, Kodama T.</u>	東京大学・先端科学技術研究センター	Transcriptional activation by hypoxia and low-density lipoprotein loading in cultured vascular smooth muscle	<i>J Atheroscler Thromb</i> . Oct;14(5):226-34	有	2007
064	<u>Imamura M, Kawasaki T, Savchenko AS, Ohashi R, Jiang S, Miyamoto K, Ito Y, Iwanari H, Sagara M, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T, Uchiyama M, Naito M.</u>	東京大学・先端科学技術研究センター	Lipopolysaccharide induced expression of pentraxin 3 in human neutrophils and monocyte-derived macrophages.	<i>Cell Immunol</i> . Aug;248(2):86-94.	有	2007
065	<u>Reid PC, Urano Y, Kodama T, Hamakubo T.</u>	東京大学・先端科学技術研究センター	Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins.	<i>J Cell Mol Med</i> . May-Jun;11(3):383-92	有	2007
066	<u>Sumi K, Tanaka T, Uchida A, Magoori K, Urashima Y, Ohashi R, Ohguchi H, Okamura M, Kudo H, Daigo K, Maejima T, Kojima N, Sakakibara I, Jiang S, Hasegawa G, Kim I, Osborne TF, Naito M, Gonzalez FJ, Hamakubo T, Kodama T, Sakai J.</u>	東京大学・先端科学技術研究センター	Cooperative interaction between hepatocyte nuclear factor 4 alpha and GATA transcription factors regulates ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8.	<i>Mol Cell Biol</i> . Jun;27(12):4248-60	有	2007
067	<u>Saitoh R, Ohtomo T, Yamada Y, Kamada N, Nezu J, Kimura N, Funahashi S, Furugaki K, Yoshino T, Kawase Y, Kato A, Ueda O, Jishage K, Suzuki M, Fukuda R, Arai M, Iwanari H, Takahashi K, Sakihama T, Ohizumi I, Kodama T, Tsuchiya M, Hamakubo T.</u>	東京大学・先端科学技術研究センター	Viral envelope protein gp64 transgenic mouse facilitates the generation of monoclonal antibodies against exogenous membrane proteins displayed on baculovirus.	<i>J Immunol Methods</i> . Apr 30;322(1-2):104-17	有	2007
068	<u>Sakamoto A, Kawasaki T, Kazawa T, Ohashi R, Jiang S, Maejima T, Tanaka T, Iwanari H, Hamakubo T.</u>	東京大学・先端科学技術研究センター	Expression of liver X receptor alpha in rat fetal tissues at different developmental stages.	<i>J Histochem Cytochem</i> . Jun;55(6):641-9	有	2007

	<u>Sakai J., Kodama T., Naito M.</u>					
069	<u>Oshima T., Kawasaki T., Ohashi R., Hasegawa G., Jiang S., Umezumi H., Aoyagi Y., Iwanari H., Tanaka T., Hamakubo T., Kodama T., Naito M.</u>	東京大学・先端科学技術研究センター	Downregulated P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha expression in human colorectal carcinoma is a new prognostic factor against liver metastasis.	<i>Pathol Int.</i> Feb;57(2) :82-9	有	2007
070	Higashikawa F, Eboshida A, Yokosaki Y.	広島大学・大学院生物圏	Enhanced biological activity of polymeric osteopontin.	<i>FEBS lett</i> 581: 2697-2701	有	2007
071	Miyamoto, K., Shimamoto, T., Aosasa, M., Nakamura, N., Okubo, Y., Yokoyama, T., Horiuchi H., Furusawa, S. and Matsuda,	広島大学・大学院生物圏	H. Development of recombinant chicken IgY from single chain fragment of variable region for diagnosis of BSE.	<i>Biologicals,</i> 35:31-34,	有	2007
072	Miyamoto, K., Kimura, S., Nakamura, N., Yokoyama, T., Horiuchi, H., Furusawa, S. and Matsuda, H.	広島大学・大学院生物圏	Chicken antibody against a restrictive epitope of prion protein distinguishes normal and abnormal prion	<i>proteins. Biologicals,</i> 35:303-308,	有	2007
073	Miyoshi, M., Horiuchi, H., Fukushima, Y., Matsuda, H. and Furusawa, F.	広島大学・大学院生物圏	Cloning of the chicken interleukin-13 receptor alpha2 gene and production of a specific monoclonal antibody.	<i>Dev. Comp. Immunol.,</i> 31:394-406,	有	2007
074	Akagi, M., Kanata, S., Mori, S., Itabe, H., Sawamura, T. and Hamanishi, C.	国立循環器病センター	Possible involvement of the oxidized low-density lipoprotein/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 system in pathogenesis and progression of human osteoarthritis.	<i>Osteo arthritis Cartilage</i> 15:281-290,	有	2007
075	Mehta, J.L., Sanada, N., Hu, C.P., Chen, J., Dandapat, A., Sugawara, F., Satoh, H., Inoue, K., Kawase, Y., Jishage, K., Suzuki, H., Takeya, M., Schnackenberg, L., Beger, R., Hermonat, P.L., Thomas, M. and Sawamura, T.	国立循環器病センター	Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet.	<i>Circ. Res.</i> 100:1634-1642	有	2007
076	Marwali, M.R., Hu, C.P., Mohandas, B., Dandapat, A., Deonikar, P., Chen, J., Cawich, I., Sawamura, T., Kavdia, M. and Mehta, J.L.	国立循環器病センター	Modulation of ADP-induced platelet activation by aspirin and pravastatin: role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, nitric oxide, oxidative stress, and	<i>J. Pharmacol. Exp. Ther.</i> 322:1324-1332	有	2007

			inside-out integrin signaling.			
077	Inoue, N. and Sawamura, T.	国立循環器病センター	Lectin-like oxidized LDL receptor-1 as extracellular chaperone receptor: Its versatile functions and human diseases.	<i>Methods</i> 43:218-222	有	2007
078	Hu, C., Dandapat, A., Chen, J., Fujita, Y., Inoue, N., Kawase, Y., Jishage, K., Suzuki, H., Sawamura, T. and Mehta, J.L.	国立循環器病センター	LOX-1 deletion alters signals of myocardial remodeling immediately after ischemia-reperfusion.	<i>Cardiovasc. Res.</i> 76:292-302	有	2007
079	Ohashi, H., Shimizu, Y., Ying, B.W. and Ueda, T.	東京大学新領域	Efficient protein selection based on ribosome display system with purified components.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i> 352, 270-276	有	2007
080	Ushijima, M., Miyata, S., Eguchi, S., Kawakita, M., Yoshimoto, M., Iwase, T., Akiyama, F., Sakamoto, G., Nagasaki, K., Miki, Y., Noda, T., Hoshikawa, Y. and Matsuura, M.	癌研究所	Common peak approach by semi-supervised learning using mass spectrometry datasets for predicting effects on anticancer drugs on breast cancer.	<i>Cancer Informatics</i> Vol. 3, 285-293	有	2007
081	Oishi Y, Nagasaki K, Miyata S, Matsuura M, Nishimura S, Akiyama F, Iwai T, Miki Y.	癌研究所	Functional pathway characterized by gene expression analysis of supraclavicular lymph node metastasis-positive breast cancer.	<i>J Hum Genet.</i> 52(3):271-279	有	2007
082	Shibata H, Takano H, Ito M, Shioya H, Hirota M, Matsumoto H, Kakudo Y, Ishioka C, Akiyama T, Kanegae Y, Saito I, and Noda T.	癌研究所	Alpha-catenin is essential in intestinal adenoma formation.	<i>Proc Natl Acad Sci USA.</i> 104(46):18199-204,	有	2007
083	Sakaguchi S, Wing K, Miyara M.	京都大学再生医科学研究所	Regulatory T cells in brief history and perspective.	<i>Eur. J. Immunol</i> 37:s116-123,	有	2007
084	Sakaguchi S, Powrie F.	京都大学再生医科学研究所	Emerging challenges in regulatory T cell function and biology.	<i>Science</i> 317:627-629,	有	2007
085	Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, Ohkawa K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S.	京都大学再生医科学研究所	Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor.	<i>Immunity</i> 27:145-159,	有	2007
086	Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi S.	京都大学再生医科学研究所	Foxp3 controls regulatory T cell function via interacting with AML1/Runx1.	<i>Nature.</i> 446:685-689	有	2007
087	Nomura T, Sakaguchi S.	京都大学再生医科学研究所	Foxp3 and Aire in thymus-generated T(reg)	<i>Nat Immunol.</i> 8:333-334,	有	2007

		究所	cells: a link in self-tolerance.			
088	Miyara M, Sakaguchi S.	京都大学再生医科学研究所	Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression.	<i>Trends Mol Med.</i> 13:108-116,	有	2007
089	Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S.	京都大学再生医科学研究所	ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells	<i>Eur J Immunol.</i> 37:884-895,	有	2007
090	Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S.	京都大学再生医科学研究所	Regulatory T cell-mediated suppression: potential role of ICER.	<i>J Leukoc Biol</i> 81:161-167,	有	2007
091	Ejima D, Tsumoto K, Fukada H, Yumioka R, Nagase K, Arakawa T and Philo J.S.	東京大新領域	Effects of acid exposure on the conformation, stability, and aggregation of monoclonal antibodies.	<i>Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics</i> 66, 954-962	有	2007
092	Arakawa T, Ejima D, Tsumoto K, Ishibashi M and Tokunaga M	東京大新領域	Improved performance of column chromatography by arginine: Dye-affinity chromatography.	<i>Protein Expr. Purif.</i> 52, 410-414	有	2007
093	Tsumoto K, Ejima D, Nagase K and Arakawa T	東京大新領域	Arginine improves protein elution in hydrophobic interaction chromatography. The cases of human interleukin-6 and activin-A.	<i>J. Chromatogr. A</i> 1154, 81-86	有	2007
094	Arakawa T, Ejima D, Tsumoto K, Obeyama N, Tanaka Y, Kita Y and Timasheff S.N.	東京大新領域	Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of arginine effects.	<i>Biophys Chem.</i> 127, 1-8	有	2007
095	Arakawa T, Tsumoto K, Nagase K and Ejima D	東京大新領域	The effects of arginine on protein binding and elution in hydrophobic interaction and ion-exchange chromatography.	<i>Protein Expr. Purif.</i> 54, 110-116	有	2007
096	Tsumoto K, Ejima D, Senczuk A.M, Kita Y and Arakawa T	東京大新領域	Effects of salts on protein-surface interactions: applications for column chromatography.	<i>J. Pharmaceut. Sci.</i> 96, 1677-1690	有	2007
097	Arakawa T, Tsumoto K, Ejima D, Kita Y, Yonezawa Y and Tokunaga M	東京大新領域	Induced binding of proteins by ammonium sulfate in affinity and ion-exchange column chromatography.	<i>J. Biochem. Biophys. Methods</i> 70, 493-498	有	2007
098	Shiroishi M, Tsumoto K, Tanaka Y, Yokota A, Nakanishi T, Kondo H, Kumagai I	東京大新領域	Structural consequences of mutations in interfacial Tyr residues of a protein antigen-antibody complex: The case of HyHEL-10-HEL.	<i>J. Biol. Chem.</i> 282 , 6783-6791	有	2007
099	Watanabe H, Tsumoto K, Taguchi S, Yamashita K,	東京大新領域	A Human Antibody Fragment with High Affinity for	<i>Bioconjugate Chem.</i> 18 ,	有	2007

	Doi Y, Nishimiya Y, Kondo H, Umetsu M, Kumagai I		Biodegradable Polymer Film.	645-651		
100	Hu, C., Chen, J., Dandapat, A., Fujita, Y., Inoue, N., Kawase, Y., Jishage, K., Suzuki, H., Li, D., Hermonat, P.L., Sawamura, T. and Mehta, J.L.	広島大学・大学院生物圏	LOX-1 abrogation reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in mice.	<i>J. Mol. Cell. Cardiol.</i> , 44:76-83	有	2008
101	Sakihama T., Masuda K., Sato T., Doi T., Kodama T., Hamakubo T.	東京大学・先端科学技術研究センター	Functional reconstitution of G protein-coupled receptor-mediated adenylyl cyclase activation by a baculoviral co-display system.	<i>Journal of Biotechnol.</i> May 20;135(1):28-33	有	2008
102	Yorikawa C, Takaya E, Osako Y, Tanaka R, Terasawa Y, Hamakubo T, Mochizuki Y, Iwanari H, Kodama T, Maeda T, Hitomi K, Shibata H, Maki M.	東京大学・先端科学技術研究センター	Human calpain 7/Pa1BH associates with a subset of ESCRT-III-related proteins in its N-terminal region and partly localizes to endocytic membrane compartments.	<i>J Biochem.</i> Mar 3 Jun;143(6):731-45	有	2008
103	Sakihama T, Sato T, Iwanari H, Kitamura T, Sakaguchi S, Kodama T, Hamakubo T.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>A simple detection method for low-affinity membrane protein interactions by baculoviral display.</u>	<i>PLoS ONE.</i> ;3(12):e4024	有	2008
104	Ishiguro T, Sugimoto M, Kinoshita Y, Miyazaki Y, Nakano K, Tsunoda H, Sugo I, Ohizumi I, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T, Tsuchiya M, Yamada-Okabe H.	東京大学・先端科学技術研究センター	Anti-glypican 3 antibody as a potential antitumor agent for human liver cancer.	<i>Cancer Res.</i> Dec 1;68(23):9832-8	有	2008
105	Tachibana K, Anzai N, Ueda C, Katayama T, Yamasaki D, Kirino T, Takahashi R, Ishimoto K, Komori H, Tanaka T, Hamakubo T, Ueda Y, Arai H, Sakai J, Kodama T, Doi T.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Regulation of the human PDZK1 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha.</u>	<i>FEBS Lett.</i> Nov 26 ;582(28):3884-8	有	2008
106	Sugai M, Umezu H, Yamamoto T, Jiang S, Iwanari H, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T, Naito M.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Expression of hepatocyte nuclear factor 4 alpha in primary ovarian mucinous tumors.</u>	<i>Pathol Int.</i> Nov;58(11):681-6	有	2008
107	Yoshitake H, Shirai Y, Mochizuki Y, Iwanari H, Tsubamoto H, Koyama K, Takamori K, Ogawa H, Hasegawa A, Kodama T, Hamakubo T, Araki Y. J	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Molecular diversity of TEX101, a marker glycoprotein for germ cells monitored with monoclonal antibodies: variety of the molecular characteristics according to subcellular localization within the mouse testis.</u>	<i>Reprod Immunol.</i> Oct;79(1):1-11	有	2008

108	Ohguchi H, Tanaka T, Uchida A, Magoori K, Kudo H, Kim I, Daigo K, Sakakibara I, Okamura M, Harigae H, Sasaki T, Osborne TF, Gonzalez FJ, Hamakubo T, Kodama T, Sakai	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Hepatocyte nuclear factor 4alpha contributes to thyroid hormone homeostasis by cooperatively regulating the type 1 iodothyronine deiodinase gene with GATA4 and Kruppel-like transcription factor 9.</u>	<i>J. Mol Cell Biol.</i> Jun;28(12):3917-31	有	2008
109	. Sakihama T., Masuda K., Sato T., Doi T., Kodama T., Hamakubo T.	東京大学・先端科学技術研究センター	Functional reconstitution of G protein-coupled receptor-mediated adenylyl cyclase activation by a baculoviral co-display system	<i>J Biotechnol.</i> May 20;135(1):28-33	有	2008
110	Savchenko A, Imamura M, Ohashi R, Jiang S, Kawasaki T, Hasegawa G, Emura I, Iwanari H, Sagara M, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T, Naito M.	東京大学・先端科学技術研究センター	Expression of pentraxin 3 (PTX3) in human atherosclerotic lesions.	<i>J Pathol.</i> May;215(1):48-55	有	2008
111	Wako K, Kawasaki T, Yamana K, Suzuki K, Jiang S, Umez H, Nishiyama T, Takahashi K, Hamakubo T, Kodama T, Naito M.	東京大学・先端科学技術研究センター	Expression of androgen receptor through androgen-converting enzymes is associated with biological aggressiveness in prostate cancer.	<i>J Clin Pathol.</i> Apr;61(4):448-54	有	2008
112	<u>Yorikawa C, Takaya E, Osako Y, Tanaka R, Terasawa Y, Hamakubo T, Mochizuki Y, Iwanari H, Kodama T, Maeda T, Hitomi K, Shibata H, Maki M.</u>	東京大学・先端科学技術研究センター	Human calpain 7/Pa1BH associates with a subset of ESCRT-III-related proteins in its N-terminal region and partly localizes to endocytic membrane compartments.	<i>J Biochem.</i> Jun;143(6):731-745	有	2008
113	Hiroaki Nagashima, Tomoya Teduka, Wakako Tsuchida, Hiroaki Maeda, Junya Kohroki and Yasuhiko Masuho.	東京理科大学薬学部	Tandemly repeated Fc domain augments binding avidities of antibodies for Fcγ receptors, resulting in enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity.	<i>Mol. Immunol.</i> 45: 2752-63	有	2008
114	Tateishi, Y., Nishimichi, N., Horiuchi, H., Furusawa, S. and Matsuda, H.	広島大学・大学院生物圏	Construction of chicken-mouse chimeric antibody and immunogenicity in mice.	<i>J. Vet. Med. Sci.</i> , 70(4):397-400	有	2008
115	Sato, Yuko, Nishimichi, Norihisa, Nakano, Atsushi, Takikawa, Kenji, Inoue, Nobutaka, Matsuda, Haruo, and Sawamura, Tatsuya.	広島大学・大学院生物圏	Determination of LOX-1-ligand activity in mouse plasma with chicken monoclonal antibody for ApoB.	<i>Atherosclerosis</i> <i>i200</i> :303-309,	有	2008

116	Nakano, A., Inoue, N., Sato, Y., Nishimichi, N., Takikawa, K., Fujita, Y., Kakino, A., Yamaguchi, S., Matsuda, H. and Sawamura, T.	広島大学・大学院生物圏	LOX-1 Mediates Vascular Lipid Accumulation in Hypertensive Rats—Implication in the initial step of atherosclerosis under hypertension.	<i>Hypertension</i> , 52:86-92,	有	2008
117	Ishigaki, Y., Katagiri, H., Gao, J., Yamada, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Kaneko, K., Ogihara, T., Ishihara, H., Sato, Y., Takigawa, K., Nishimichi, N., Matsuda, H., Sawamura, T. and Oka, Y.	広島大学・大学院生物圏	Impact of plasma oxidized LDL removal on atherosclerosis.	<i>Circulation</i> 118:75-83,.	有	2008
118	Tang, D., Lu, J., Walterscheid, J.P., Chen, H.H., Engler, D.A., Sawamura, T., Chang, P.Y., Safi, H.J., Yang, C.Y. and Chen, C.H.	国立循環器病センター	Electronegative LDL circulating in smokers impairs endothelial progenitor cell differentiation by inhibiting Akt phosphorylation via LOX-1.	<i>J. Lipid Res.</i> 49:33-47	有	2008
119	Sato, Y., Baba, T., Zubair, M., Miyabayashi, K., Toyama, Y., Maekawa, M., Owaki, A., Mizusaki, H., Sawamura, T., Toshimori, K., Morohashi, K. I. and Katoh-Fukui, Y.	広島大学・大学院生物圏, 国立循環器病センター	Importance of forkhead transcription factor Fkh18 for development of testicular vasculature.	<i>Mol Reprod Dev.</i> Sep;75(9):1361-71.	有	2008
120	Tateishi, Y., Nishimichi, N., Horiuchi, H., Furusawa, S. and Matsuda, H.	広島大学・大学院生物圏, 国立循環器病センター	Construction of chicken-mouse chimeric antibody and immunogenicity in mice.	<i>J. Vet. Med. Sci.</i> Apr;70(4):397-400	有	2008
121	Sato, Y., Nishimichi, N., Nakano, A., Takikawa, K., Inoue, N., Matsuda, H. and Sawamura, T.	広島大学・大学院生物圏, 国立循環器病センター	Determination of LOX-1-ligand activity in mouse plasma with chicken monoclonal antibody for ApoB.	<i>Atherosclerosis</i> Oct;200(2):303-9	有	2008
122	Awaya T, Yokosaki Y, Yamane K, Usui H, Kohno N, Eboshida A.	国立循環器病センター	Gene-environment association of an <i>ITGB2</i> sequence variant with obesity in ethnic Japanese	<i>Obesity</i> Jun;16(6):1463-6	有	2008
123	Okazawa, T., Magari, M., Kimoto, T., Kouyama, E., Ohmori, H. and Kanayama, N.	岡山大学	Analysis of B cell selection in the germinal center reaction during a T-dependent antibody response at a single cell level.	<i>Immunol. Lett</i> 117, 96-105	有	2008
124	Sakaguchi, S	京都大学再生医科学研究所	Regulatory T cells in the past and for the futur	<i>Eur. J. Immunol</i> 38:901-937,	有	2008

125	Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M	京都大学再生医科学研究所	Regulatory T cells and immune tolerance	<i>Cell</i> 133: 775-787	有	2008
126	Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S	京都大学再生医科学研究所	Foxp3 ⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 29:10113-10118,	有	2008
127	Wakasa-Morimoto, G., Toyosaki-Maeda, T., Matsutani, T., Yoshida, R., Nakamura-Kikuoka, S., Maeda-Tanimura, M., Yoshitomi, H., Hirota, K., Hashimoto, H.,	京都大学再生医科学研究所	Arthritis and pneumonitis produced by the same T-cell clones from mice with spontaneous autoimmune arthritis	<i>Int. Immunol</i> 20:1331-1342	有	2008
128	Li, Y., Zhao, X., Cheng, D., Haga, H., Tsuruyama, T., Wood, K., Sakaguchi, S., Tanaka, K., Uemoto, S., and Koshiba, T	京都大学再生医科学研究所	The presence of FOXP3 expressing T cells within grafts of tolerance human liver transplant recipients	<i>Transplantation</i> 86:1837-1843	有	2008
129	Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S	京都大学再生医科学研究所	CTLA-4 control over Foxp3 ⁺ regulatory T cell function	<i>Science</i> 322:271-275	有	2008
130	Satoda N, Shoji T, Wu Y, Fujinaga T, Chen F, Aoyama A, Zhang JT, Takahashi A, Okamoto T, Matsumoto I, Sakai H, Li Y, Zhao X, Manabe T, Kobayashi E, Sakaguchi S, Wada H, Ohe H, Uemoto S, Tottori J, Bando T, Date H, Koshiba T	京都大学再生医科学研究所	Value of FOXP3 Expression in Peripheral Blood as Rejection Marker After Miniature Swine Lung Transplantation	<i>J. Heart Lung Transplant</i> 27:1293-1301	有	2008
131	Sakihama T, Sato T, Iwanari H, Kitamura T, Sakaguchi S, Kodama T, Hamakubo T	京都大学再生医科学研究所	A simple detection method for low-affinity membrane protein interactions by baculoviral display.	<i>PLoS ONE</i> 3(12):e4024	有	2008
132	Miyara, M., and Sakaguchi, S	京都大学再生医科学研究所	Regulatory T Cells and the Control of Auto-Immunity: From day 3 Thymectomy to FoxP3 ⁺ Regulatory T Cells. In Regulatory T cells and Clinical Application, Ed. S	<i>Jiang, Springer</i> p3-16,	有	2008
133	Tsumoto K, Yokota A, Tanaka Y, Ui M, Tsumuraya T, Fujii I, Kumagai I, Nagumo Y, Oguri H, Inoue M, Hiramama M.	東京大新領域	Critical contribution of aromatic rings to specific recognition of polyether rings: The case of ciguatera toxin CTX3C-ABC and its specific antibody 1C49.	<i>J Biol Chem.</i> May 2:283(18):12259-66	有	2008

134	Mihoko Ui, Yoshikazu Tanaka, Takeshi Tsumuraya, Ikuo Fujii, Masayuki Inoue, Masahiro Hiram, and Kouhei Tsumoto	東京大新領域	How Protein Recognizes Ladder-like Polycyclic Ethers: Interactions between Ciguatoxin (CTX3C) Fragments and Its specific antibody 10C9.	<i>J. Biol. Chem.</i> Jul 11:283 (28):19 440-7	有	2008
135	津本浩平, 田中良和	東京大新領域	抗体: 結晶構造と熱力学が語るその緻密なアーキテクチャ.	たんぱく質結晶の新展開 (CMC 出版),	有	2008
136	Makabe K, Nakanishi T, Tsumoto K, Tanaka Y, Kondo H, Umetsu M, Sone Y, Asano R and Kumagai I	東京大新領域	Thermodynamic consequences of mutations in vernier zone residues of a humanized anti-human epidermal growth factor receptor murine antibody, 528.	<i>J Biol Chem.</i> 283 , 1156-1166	有	2008
137	Nakanishi T, Tsumoto K, Yokota A, Kondo H and Kumagai I	東京大新領域	Critical contribution of VH-VL interaction to reshaping of an antibody: the case of humanization of anti-lysozyme antibody, HyHEL-10.	<i>Protein Sci.</i> 17 , 261-270	有	2008
138	Tsumoto K, Yokota A, Tanaka Y, Ui M, Tsumuraya T, Fujii I, Kumagai I, Nagumo Y, Oguri H, Inoue M and Hiram M	東京大新領域	Critical contribution of aromatic rings to specific recognition of polyether rings.: The case of ciguatoxin CTX3C-ABC and its specific antibody 1C49	<i>J. Biol. Chem.</i> 283 , 12259-12266	有	2008
139	Ui M, Tanaka Y, Tsumuraya T, Fujii I, Inoue M, Hiram M, and Tsumoto K	東京大新領域	How protein recognizes ladder-like polycyclic ethers: Interactions between Ciguatoxin (CTX3C) fragments and its specific antibody 10C9.	<i>J. Biol. Chem.</i> 283 , 19440-19447	有	2008
140	Hattori T, Umetsu M, Nakanishi T, Tsumoto K, Ohara S, Abe H, Naito M, Asano R, Adschiri T and Kumagai I	東京大新領域	Grafting of material-binding function into antibodies: Functionalization by peptide grafting.	<i>Biochem. Biophys. Res. Comm.</i> 365 , 751-757	有	2008
141	Hamada D, Tsumoto K, Sawara M, Tanaka N, Nakahira K, Shiraki K and Yanagihara I	東京大新領域	Effect of an amyloidogenic sequence attached to yellow fluorescent protein.	<i>Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics</i> 72 , 811-821	有	2008
142	Wada Y, Ohta Y, Xu M, Tsutsumi S, Minami T, Inoue K, Komura D, Kitakami J, Oshida N, Papantonis A, Izumi A, Kobayashi M, Meguro H, Kanki Y, Mimura I, Yamamoto K, Mataka C, Hamakubo T, Shirahige K, Aburatani H, Kimura H,	東京大学・先端科学技術研究センター	A wave of nascent transcription on activated human genes.	<i>Proc Natl Acad Sci USA.</i> Oct 27:106 (43):18 357-61	有	2009

	Kodama T, Cook PR, Ihara S. 27:106(43):18357-61					
143	Tachibana K, Takeuchi K, Inada H, Yamasaki D, Ishimoto K, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Doi T.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Regulation of the human SLC25A20 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha in human hepatoblastoma cells.</u>	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i> Nov 20 ;389(3):501-5	有	2009
144	Saito Y, Hamakubo T, Yoshida Y, Ogawa Y, Hara Y, Fujimura H, Imai Y, Iwanari H, Mochizuki Y, Shichiri M, Nishio K, Kinumi T, Noguchi N, Kodama T, Niki E.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Preparation and application of monoclonal antibodies against oxidized DJ-1. Significant elevation of oxidized DJ-1 in erythrocytes of early-stage Parkinson disease patients.</u>	<i>Neurosci Lett.</i> Nov 6;465(1):1-5	有	2009
145	Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Iwanari H, Isoo N, Osawa S, Fukuda MA, Kodama T, Hamakubo T, Li T, Wong PC, Tomita T, Iwatsubo T.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Single chain variable fragment against nicastrin inhibits the gamma-secretase activity.</u>	<i>J Biol Chem.</i> Oct 9;284(41):27838-47	有	2009
146	Saeki R, Kondoh M, Kakutan H, Tsunoda S, Mochizuki Y, Hamakubo T, Tsutsumi Y, Horiguchi Y, Yagi K.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule.</u>	<i>Mol Pharmacol.</i> Oct;76(4):918-26	有	2009
147	Minami T, Yano K, Miura M, Kobayashi M, Suehiro J, Reid PC, Hamakubo T, Ryeom S, Aird WC, Kodama T.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>The Down syndrome critical region gene 1 short variant promoters direct vascular bed-specific gene expression during inflammation in mice.</u>	<i>J Clin Invest.</i> Aug;119(8):2257-70. doi: 10.1172/JCI35738	有	2009
148	Komai T, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Shinkai Y.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Expression of the mouse PR domain protein Prdm8 in the developing central nervous system.</u>	<i>Gene Expr Patterns.</i> Oct;9(7):503-14	有	2009
149	Noritake J, Fukata Y, Iwanaga T, Hosomi N, Tsutsumi R, Matsuda N, Tani H, Iwanari H, Mochizuki Y, Kodama T, Matsuura Y, Bredt DS, Hamakubo T, Fukata M.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95.</u>	<i>J Cell Biol.</i> Jul 13;186(1):147-60	有	2009
150	Takano K, Hasegawa G, Jiang S, Kurosaki I, Hatakeyama K, Iwanari H, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T, Naito M.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Immunohistochemical staining for P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha may complement mucin phenotype of differentiated-type early gastric carcinoma.</u>	<i>Pathol Int.</i> Jul;59(7):462-70	有	2009
151	Ishimoto K, Nakamura H, Tachibana K, Yamasaki D, Ota A, Hirano K, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Sterol-mediated regulation of human lipin 1 gene expression in hepatoblastoma cells.</u>	<i>J Biol Chem.</i> Aug 14;284(33):22195-205	有	2009

	Kodama T, Doi T.					
152	Wakabayashi K, Okamura M, Tsutsumi S, Nishikawa NS, Tanaka T, Sakakibara I, Kitakami J, Ihara S, Hashimoto Y, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H, Sakai	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>The peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop.</u>	<i>J. Mol Cell Biol.</i> Jul;29(13):35-44-55	有	2009
153	Minegishi Y, Iwanari H, Mochizuki Y, Horii T, Hoshino T, Kodama T, Hamakubo T, Gotoh N.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Prominent expression of FRS2beta protein in neural cells and its association with intracellular vesicles.</u>	<i>FEBS Lett.</i> Feb 18;583(4):807-14. Epub 2009 Jan 31	有	2009
154	Takegoshi S, Jiang S, Ohashi R, Savchenko AS, Iwanari H, Tanaka T, Hasegawa G, Hamakubo T, Kodama T, Naito M.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Protein expression of nuclear receptors in human and murine tissues.</u>	<i>Pathol Int.</i> Feb;59(2):61-72	有	2009
155	Suzuki N, Tsumoto K, Hajicek N, Daigo K, Tokita R, Minami S, Kodama T, Hamakubo T, Kozasa T.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Activation of leukemia-associated RhoGEF by Galpha13 with significant conformational rearrangements in the interface.</u>	<i>J Biol Chem.</i> Feb 20;284(8):5000-9. Epub 2008 Dec 12		2009
156	Wakabayashi K, Okamura M, Tsutsumi S, Nishikawa NS, Tanaka T, Sakakibara I, Kitakami J, Ihara S, Hashimoto Y, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H, S	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>The peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop.</u>	<i>Molecular and Cellular Biology.</i> Jul;29(13):35-44-55	有	2009
157	Kazawa T, Kawasaki T, Sakamoto A, Imamura M, Ohashi R, Jiang S, Tanaka T, Iwanari H, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Naito M.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Expression of liver X receptor alpha and lipid metabolism in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophage.</u>	<i>Pathol Int.</i> Mar;59(3):152-60	有	2009
158	Minegishi Y, Iwanari H, Mochizuki Y, Horii T, Hoshino T, Kodama T, Hamakubo T, Gotoh N.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Prominent expression of FRS2beta protein in neural cells and its association with intracellular vesicles.</u>	<i>FEBS Lett.</i> Feb 18;583(4):807-14	有	2009
159	Takegoshi S, Jiang S, Ohashi R, Savchenko AS, Iwanari H, Tanaka T, Hasegawa G, Hamakubo T, Kodama T, Naito M.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Protein expression of nuclear receptors in human and murine tissues.</u>	<i>Pathol Int.</i> Feb;59(2):61-72	有	2009

160	Okamura M, Kudo H, Wakabayashi K, Tanaka T, Nonaka A, Uchida A, Tsutsumi S, Sakakibara I, Naito M, Osborne TF, Hamakubo T, Ito S, Aburatani H, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>COUP-TFII acts downstream of Wnt/beta-catenin signal to silence PPARgamma gene expression and repress adipogenesis.</u>	<i>J. Proc Natl Acad Sci USA.</i> Apr 7;106(14):5819-24	有	2009
161	Sako K, Fukuhara S, Minami T, Hamakubo T, Song H, Kodama T, Fukamizu A, Gutkind JS, Koh GY, Mochizuki N.	東京大学・先端科学技術研究センター	Angiopoietin-1 induces Kruppel-like factor 2 expression through a phosphoinositide 3-kinase/AKT-dependent activation of myocyte enhancer factor 2.	<i>J Biol Chem.</i> Feb 27;284(9):5592-601	有	2009
162	Suzuki N, Tsumoto K, Hajicek N, Daigo K, Tokita R, Minami S, Kodama T, Hamakubo T, Kozasa T.	東京大学・先端科学技術研究センター	Activation of leukemia-associated RhoGEF by Galpha13 with significant conformational rearrangements in the interface.	<i>J Biol Chem.</i> Feb 20;284(8):5000-9	有	2009
163	Nakano K, Orita T, Nezu J, Yoshino T, Ohizumi I, Sugimoto M, Furugaki K, Kinoshita Y, Ishiguro T, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H, Yamada-Okabe H, Tsuchiya M.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Anti-glypican 3 antibodies cause ADCC against human hepatocellular carcinoma cells.</u>	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i> Jan 9;378(2):279-84	有	2009
164	Iwamoto, S., Nishimichi, N., Tateishi, Y., Sato, Y., Horiuchi, H., Furusawa, S., Sawamura, T. and Matsuda, H.	広島大学・大学院生物圏	Generation and characterization of chicken monoclonal antibodies against human	<i>LOX-1. mAbs,</i> 1:357-363,	有	2009
165	Fujita Y, Kakino A, Nishimichi N, Yamaguchi S, Sato Y, Machida S, Cominacini L, Delneste Y, Matsuda H, Sawamura T.	広島大学・大学院生物圏	Oxidized. LDL receptor LOX-1 binds to C-reactive protein and mediates its vascular effects.	<i>Clin Chem.</i> 55(2):285-294,	有	2009
166	Nishimichi, N., Higashikawa, F., Kinoh, H. H., Tateishi, Y., Matsuda, H. and Yokosaki, Y.	広島大学・大学院生物圏	Polymeric osteopontin employs integrin $\alpha 9 \beta 1$ as a receptor and attracts neutrophils by presenting a de novo binding site.	<i>J. Biol. Chem.,</i> 284 :14769-14776,	有	2009
167	Elazab, M.F.A., Fukushima, Y., Horiuchi, H., Matsuda, H. and Furusaa, S.	広島大学・大学院生物圏	Prolonged suppression of chick humoral immune response by antigen specific maternal antibody.	<i>J. Vet. Med. Sci.,</i> 71:417-424,	有	2009
168	Sakaguchi, S., Ishibashi, D. and Matsuda, H.	広島大学・大学院生物圏	Antibody-based immunotherapeutic attempts in experimental animal models of prion diseases.	<i>Expert Opin.,</i> 19:907-917,	有	2009
169	Magari, M., Aya, T., Ikeda, M., Todo, K.,	岡山大学	Enhancement of antibody production from a chicken B	<i>J. Biosci. Bioeng.</i>	有	2009

	Kanayama, N., Ohmori, H.		cell line, DT40 By reducing Pax5 expression.	107, 206-209. 2009		
170	Osada E, Shimizu Y, Akbar BK, Kanamori T, Ueda T.	東京大学新領域	Epitope mapping using ribosome display in a reconstituted cell-free protein synthesis system.	<i>J. Biochem</i> 145, 693-700	有	2009
171	Yoshitomi, M., Koshiba, T., Haga, H., Li, Y., Zhao, X., Cheng, D., Miyagawa, A., Sakashita, H., Tsuruyama T., Ueda, M., Wood, K., Sakaguchi S., Manabe, T., Tanaka, K., and Uemoto, S	京都大学再生医科学研究所	Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression following liver transplantation	<i>Transplantation</i> 87:606-614,	有	2009
172	Nagahama, K., Fehervari, Z., Oida, T., Ogawa, O., and Sakaguchi, S	京都大学再生医科学研究所	Differential control of alloantigen-specific regulatory T cells and effector T cells by anti-CD4 and other agents in establishing transplantation tolerance	<i>Int. Immunol</i> 21:379-391	有	2009
173	Miyara, M., Shima, T., Kitoh, A., Yoshioka, Y., Niwa, A., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi T., Nomura, T., Wing, K., Ono, M., Amoura, Z., Gorochov, G., and Sakaguchi, S	京都大学再生医科学研究所	Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4(+) T cells expressing the FoxP3 transcription factor	<i>Immunity</i> 30: 899-911,	有	2009
174	Ohkura, N. and Sakaguchi, S	京都大学再生医科学研究所	A novel modifier of regulatory T cells	<i>Nat Immunol</i> 10: 685-686,	有	2009
175	Duan F, Lin Y, Liu C, Engelhorn ME, Cohen AD, Curran M, Sakaguchi S, Merghoub T, Terzulli S, Wolchok JD, Houghton AN.	京都大学再生医科学研究所	Immune rejection of mouse tumors expressing mutated self	<i>Cancer Res</i> 69:3545-3553	有	2009
176	Liu, Z., Tian, S., Faló, L. D. Jr, Sakaguchi, S., and You, Z	京都大学再生医科学研究所	Therapeutic Immunity by Adoptive Tumor-primed CD4(+) T-cell Transfer in Combination With In Vivo GITR Ligation	<i>Mol Ther</i> 17:1274-81	有	2009
177	Piao J, Kamimura Y, Iwai H, Cao Y, Kikuchi K, Hashiguchi M, Masunaga T, Jiang H, Tamura K, Sakaguchi S, Azuma M	京都大学再生医科学研究所	Enhancement of T-cell-mediated anti-tumour immunity via the ectopically expressed glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor-related receptor ligand (GITRL) on tumours	<i>Immunology</i> 127:489-99,	有	2009
178	Ito Y, Usui T, Kobayashi S, Iguchi-Hashimoto M,	京都大学再生医科学研	Gamma/delta T cells are the predominant source of	<i>Arthritis Rheum</i>	有	2009

	Ito H, Yoshitomi H, Nakamura T, Shimizu M, Kawabata D, Yukawa N, Hashimoto M, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Yoshifuji H, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T	究所	interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis	60:2294-2303		
179	Okamura T, Fujio K, Shibuya M, Sumitomo S, Shoda H, Sakaguchi S, Yamamoto K	京都大学再生医科学研究所	CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2	<i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 106:13974-9,	有	2009
180	Sakaguchi, S., Wing, K., and Yamaguchi, T	京都大学再生医科学研究所	Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg	<i>Eur. J. Immunol</i> /39:2331-6,	有	2009
181	Kitoh, A., Ono, M., Naoe, Y., Ohkura, N., Yamaguchi, T, Yaguchi, H., Kitabayashi, I., Tsukada, T., Nomura, T., Miyachi, Y., Taniuchi, I., and Sakaguchi, S	京都大学再生医科学研究所	Indispensable role of Runx1/Cbf-1 complexes for <i>in vivo</i> suppressive function of FoxP3+ regulatory T cells	<i>Immunity</i> 31:609-620	有	2009
182	Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T	京都大学再生医科学研究所	Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?	<i>Int. Immunol</i> 21:1105-11	有	2009
183	Onodera T, Jang MH, Guo Z, Yamasaki M, Hirata T, Bai Z, Tsuji NM, Nagakubo D, Yoshie O, Sakaguchi S, Takikawa O, Miyasaka M	京都大学再生医科学研究所	Constitutive expression of IDO by dendritic cells of mesenteric lymph nodes: functional involvement of the CTLA-4/B7 and CCL22/CCR4 interactions	<i>J. Immunol</i> 183:5608-5614	有	2009
184	津本浩平、宇井美穂子	東京大新領域	抗原抗体相互作用の熱力学的解析	特異性と親和性熱測定, 36 , 205-215	有	2009
185	Nagatoishi S, Tanaka Y, Kudou M and Tsumoto K.	東京大新領域	The interaction of hyperthermophilic TATA-box binding protein with single-stranded DNA is entropically favorable and exhibits a large negative heat capacity change at high salt concentration.	<i>Mol. Biosyst.</i> 5 , 957-961	有	2009
186	Motozono C, Yanaka S, Tsumoto K, Takiguchi M and Ueno T.	東京大新領域	Impact of intrinsic cooperative thermodynamics of peptide-MHC complexes on antiviral activity of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes	<i>J. Immunol.</i> 182 , 5528-5536	有	2009
187	Sakamoto S, Jose M. M. Caaveiro, Sano E, Tanaka Y, Kudou M and Tsumoto K	東京大新領域	Contributions of interfacial residues of human Interleukin15 to the specificity and affinity for its private alpha-receptor.	<i>J. Mol. Biol.</i> 389 , 880-894	有	2009

188	Suzuki N, Tsumoto K, Hajicek N, Daigo K, Tokita R, Minami S, Kodama T, Hamakubo T and Kozasa T.	東京大新領域	Activation of Leukemia-associated RhoGEF by Galpha 13 with significant conformational rearrangements in the interface.	<i>J. Biol. Chem.</i> 284 , 5000-5009	有	2009
189	Tamura I, Chiba J.	東京理科大基礎工学部	Production of antibodies against multipass membrane proteins expressed in human tumor cells using dendritic cell immunization.	<i>Biomed Biotechnol.</i> Apr 15	有	2009
190	Fujimoto A, Takatsuka S, Ishida I, Chiba J.	東京理科大基礎工学部	Production of human antibodies to native cytokine receptors using the genetic immunization of KM mice.	<i>Hum Antibodies.</i> ; 18(3):75-80.	有	2009
191	Akazawa YO, Saito Y, Hamakubo T, Masuo Y, Yoshida Y, Nishio K, Shichiri M, Miyasaka T, Iwanari H, Mochizuki Y, Kodama T, Noguchi N, Niki E.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Elevation of oxidized DJ-1 in the brain and erythrocytes of Parkinson disease model animals.</u>	<i>Neurosci Lett.</i> Oct 15;483(3):201-5. Epub 2010 Aug 11.	有	2010
192	Kuwako K, Kakumoto K, Imai T, Igarashi M, Hamakubo T, Sakakibara S, Tessier-Lavigne M, Okano HJ, Okano H.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Neural RNA-binding protein Musashi1 controls midline crossing of precerebellar neurons through posttranscriptional regulation of Robo3/Rig-1 expression.</u>	<i>Neuron.</i> Aug 12;67(3):407-21	有	2010
193	Seki M, Watanabe A, Enomoto S, Kawamura T, Ito H, Kodama T, Hamakubo T, Aburatani H.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Human ROBO1 is cleaved by metalloproteinases and gamma-secretase and migrates to the nucleus in cancer cells.</u>	<i>FEBS Lett.</i> 2010 Jul 2;584(13):2909-15. Epub May 13	有	2010
194	Ishimoto K, Tachibana K, Hanano I, Yamasaki D, Nakamura H, Kawai M, Urano Y, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Doi T.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Sterol-regulatory-element-binding protein 2 and nuclear factor Y control human farnesyl diphosphate synthase expression and affect cell proliferation in hepatoblastoma cells.</u>	<i>Biochem J.</i> Jul 15;429(2):347-57	有	2010
195	Uchida H, Kondoh M, Hanada T, Takahashi A, Hamakubo T, Yagi K.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide.</u>	<i>Biochem Pharmacol.</i> May 15;79(10):1437-44	有	2010
196	Suehiro J, Hamakubo T, Kodama T, Aird WC, Minami T.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Vascular endothelial growth factor activation of endothelial cells is mediated by early growth response-3.</u>	<i>Blood.</i> Mar 25;115(12):2520-32	有	2010
197	Hiroaki Nagashima and Yasuhiko Masuho	東京理科大薬学部	Enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by tandem Fc multimerization.	<i>Yakugaku Zasshi</i> 130: 49-54	無	2010

198	Tahara, H., Ide, K., Basnet, N. B., Tanaka, Y., Matsuda, H., Takematsu, H., Kozutsumi, Y. and Ohdan, H.	広島大学・大学院生物圏	Immunological property of antibodies against <i>N</i> -glycolylneuraminic acid epitopes in cytidine monophospho- <i>N</i> -acetylneuraminic acid hydroxylase-deficient mice.	<i>J. Immunol.</i> , 15:184 (6):326-3275,	有	2010
199	Inoue, N., Okamura, T., Kokubo, Y., Fujita, Y., Sato, Y., Nakanishi, M., Yanagida, K., Kakino, A., Iwamoto, S., Watanabe, M., Ogura, S., Otsui, K., Matsuda, H., Uchida, K., Yoshimoto, R. and Sawamura, T.	広島大学・大学院生物圏	LOX-1 index, a novel prediction biomarker for coronary heart disease and stroke.	<i>Clin. Chem.</i> , 56(4):550-558.	有	2010
200	Nakano, A., Inoue, N., Sato, Y., Nishimichi, N., Takikawa, K., Fujita, Y., Kakino, A., Otsui, K., Yamaguchi, S., Matsuda, H. and Sawamura, T.	広島大学・大学院生物圏	LOX-1 mediates vascular lipid retention under hypertensive state.	<i>J. Hypertens.</i> , 28(6):1273-1280,	有	2010
201	Matsumoto, T., Fujita, M., Sawamura, T., Kakino, A., Sato, Y., Matsuda, H., Nakanishi, M., Uchida, K., Nakae, I., Kanda, H., Yoshida, A., Miwa, K., Hayashi, H., Mitunami, K. and Horie, M.	広島大学・大学院生物圏	Pitavation reduces lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 ligands in hypercholesterolemic humans.	<i>Lipid</i> , 45(4):329-335,	有	2010.
202	Kajita, M., Todo, K., Magari, M., Kanayama, N., Ohmori, H.	岡山大学	Conditional transformation of immunoglobulin mutation pattern from gene conversion into point mutation by controlling XRCC3 expression in the DT40 B cell line.	<i>J. Biosci. Bioeng.</i> 109, 407-410. 2010	有	2010
203	Kajita, M., Okazawa, T., Ikeda, M., Todo, K., Magari, M., Kanayama, N., Ohmori, H.	岡山大学	Efficient affinity maturation of antibodies in an engineered chicken B cell line DT40-SW by increasing point mutation.	<i>J. Biosci. Bioeng.</i> 110, 351-358. 2010	有	2010
204	Magari, M., Kanehiro, Y., Todo, K., Ikeda, M., Kanayama, M., Ohmori, H.,	岡山大学	Enhancement of hypermutation frequency in the chicken B cell line DT40 for efficient diversification of the antibody repertoire.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 396, 353-358. 2010	有	2010
205	Ueda T, Kanamori T, Ohashi H	東京大学新領域	Ribosome display with the PURE technology	<i>Methods Mol. Biol.</i> 607, 219-225	有	2010
206	Hirono S, Yamaue H, Hoshikawa Y, Ina S, Tani M, Kawai M, Ushijima M, Matsuura M, Saiki Y, Saiura A, Yamamoto J, Miki	癌研究所	Molecular markers associated with lymph node metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma by genome-wide expression profiling.	<i>Cancer Sci.</i> 2009. 101(1):259-66.	有	2010

	Y, Noda T.					
207	Fujino T, Nomura K, Ishikawa Y, Makino H, Umezawa A, Aburatani H, Nagasaki K, Nakamura T.	癌研究所	Function of EWS-POU5F1 in sarcomagenesis and tumor cell maintenance.	<i>Am J Pathol.</i> 76(4):1973-82	有	2010
208	Ina S, Hirono S, Noda T, Yamaue H.	癌研究所	Identifying molecular markers for chemosensitivity to gemcitabine in pancreatic cancer: increased expression of interferon-stimulated gene 15 kd is associated with intrinsic chemoresistance.	<i>Pancreas</i> 39(4):473-85,	有	2010
209	津本浩平	東京大新領域	抗原抗体相互作用の熱力学的制御 生体機能関連	化学部会ニュースレター	無	2010
210	津本浩平、宇井美穂子	東京大新領域	相互作用の熱力学情報に基づく低分子リガンド設計	薬学雑誌	無	2010
211	Yanaka S, Sano E, Naruse N, Miura KI, Futatsumori-Sugai M, Caaveiro JM, Tsumoto K.	東京大新領域	Non-core region modulates interleukin-11 signaling activity: Generation of agonist and antagonist variants.	<i>J Biol Chem.</i> Dec 7, in press	有	2010
212	Yokoo N, Togashi T, Umetsu M, Tsumoto K, Hattori T, Nakanishi T, Ohara S, Takami S, Naka T, Abe H, Kumagai I, Adschiri T.	東京大新領域	Direct and Selective Immobilization of Proteins by Means of an Inorganic Material-Binding Peptide: Discussion on Functionalization in the Elongation to Material-Binding Peptide.	<i>J. Phys. Chem. B.</i> 114(1) , 480-486	有	2010
213	Yokota A., Tsumoto K., Shiroishi M., Nakanishi T., Kondo H., Kumagai I.	東京大新領域	Contribution of asparagine residues to the stabilization of a proteinaceous antigen-antibody complex: HyHEL-10-HEL	<i>J. Biol. Chem.</i> 285 , 7686-7696	有	2010
214	Saeko Yanaka, Motonori Kudou, Yoshikazu Tanaka, Takumi Sasaki, Sumiyo Takemoto, Atsuko Sakata Yukio Hattori, Tomoyuki Koshi, Shiro Futaki, Kouhei Tsumoto, and Toshihiro Nakashima	東京大新領域	Contribution of the flexible loop region to the function of Staphylococcal enterotoxin B (SEB)	<i>Protein Eng. Des. Select.</i> 23(5) , 415-421	有	2010
215	Futatsumori-Sugai M and Tsumoto K	東京大新領域	Signal peptide design for improving recombinant protein secretion in the baculovirus expression vector system	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 391(1) , 931-935	有	2010
216	Kunii R, Jiang S, Hasegawa G, Yamamoto T, Umezu H, Watanabe T, Tsuchida M, Hashimoto T, Hamakubo T, Kodama T, Sasai K, Naito M.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>The predominant expression of hepatocyte nuclear factor 4α (HNF4α) in thyroid transcription factor-1 (TTF-1)-negative pulmonary adenocarcinoma.</u>	<i>Histopathology.</i> Feb;58(3):467-476	有	2011

217	Kakutani H, Takahashi A, Kondoh M, Saito Y, Yamaura T, Sakihama T, Hamakubo T, Yagi K.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>A novel screening system for claudin binder using baculoviral display.</u>	<i>PLoS One.</i> Feb 14;6(2):e16611	有	2011
218	Saravanan G, Daigo K, Imae T, Hamakubo T.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Visual observation of avidin-biotin affinity by fluorescent G4.5 poly(amidoamine) dendrimer.</u>	<i>Colloids Surf B Biointerfaces.</i> Mar 1;83(1):58-60. Epub 2010 Nov 2.	有	2011
219	Daigo K, Kawamura T, Ohta Y, Ohashi R, Katayose S, Tanaka T, Aburatani H, Naito M, Kodama T, Ihara S, Hamakubo T.	東京大学・先端科学技術研究センター	<u>Proteomic analysis of native hepatocyte nuclear factor-4α (HNF4α) isoforms, phosphorylation status, and interactive cofactors.</u>	<i>J Biol Chem.</i> Jan 7;286(1):674-86. Epub 2010 Nov 3	有	2011
220	Hiroaki Nagashima, Michiko Ootsubo, Mizuho Fukazawa, Sotaro Motoi, Shu Konakahara and Yasuhiko Masuho.	東京理科大薬学部	Enhanced antibody-dependent cellular phagocytosis by chimeric monoclonal antibodies with tandemly repeated Fc domains.	<i>J. Biosci Bioeng.</i> In press	有	2011
221	Hiroaki Nagashima, Kaname Kaneko, Ayaka Yamanoi, Sotaro Motoi, Shu Konakahara, Junya Kohroki and Yasuhiko Masuho.	東京理科大薬学部	TNF receptor II fusion protein with tandemly repeated Fc domains.	<i>J. Biochem.</i> In press	有	2011
222	Hiroaki Nagashima, Tomoya Teduka, Wakako Tsuchida, Hiroaki Maeda, Junya Kohroki and Yasuhiko Masuho.	東京理科大薬学部	Tandemly repeated Fc domain augments binding avidities of antibodies for Fc γ receptors, resulting in enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity.	<i>Molecular Immunol.</i> in press	有	2011
223	Mihoko Ui, Yoshikazu Tanaka, Takeshi Tsumuraya, Ikuo Fujii, Masayuki Inoue, Masahiro Hirama, and Kouhei Tsumoto	東京大新領域	Structural and Energetic Hot-Spots for the Interaction between a Ladder-like Polycyclic Ether and the Anti-Ciguatoxin Antibody 10C9Fab.	<i>Molecular BioSystems</i> Mar 1;7(3):793-8.	有	2011
224	Rahul S. Rajan, Kouhei Tsumoto, Masao Tokunaga, Hiroko Tokunaga, Yoshiko Kita and Tsutomu Arakawa	東京大新領域	Chemical and Pharmacological Chaperones: Application for Recombinant Protein Production and Protein Folding Diseases.	<i>Current Medicinal Chemistry</i> ;18(1):1-15.	有	2011
225	<u>Takatsuka S, Sekiguchi A, Tokunaga M, Fujimoto A, Chiba J.</u>	東京理科大基礎工学部	Generation of a panel of monoclonal antibodies against atypical chemokine receptor CCX-CKR by DNA immunization.	<i>J Pharmacol Toxicol Methods.</i> Dec 22.	有	2010

[学会・研究発表] 研究開発項目①「系統的な高特異性抗体創製技術」

番号	発表者	所属	発表内容	学会・研究名	発表年
001	Kanayama, N., Todo, K., Magari, M., Ohmori, H.	岡山大工学部	Molecular evolution system of antibodies and other proteins using AID-dependent hypermutation machinery in a chicken B cell line.	20 th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Kyoto, Japan	2006
002	藤堂景史、岡澤貴裕、池田美香、藤田梨紗子、曲正樹、金山直樹、大森斉	岡山大工学部	培養B細胞株を用いた新規 in vitro 抗体作製システムによるモノクローナル抗体の取得	第58回 日本生物工学会大会	2006
003	梶田真道、藤堂景史、曲正樹、金山直樹、大森斉	岡山大工学部	点突然変異と遺伝子変換の制御によるニワトリB細胞株DT40からの高性能抗体ライブラリの構築	第58回 日本生物工学会大会	2006
004	金山直樹、藤堂景史、岡澤貴裕、池田美香、藤田梨紗子、曲正樹、大森斉	岡山大工学部	In vitro antibody generation system using a hypermutating chicken B cell line	日本免疫学会総会	2006
005	Kanayama, N., Todo, K., Okazawa, T., Magari, M., Ohmori, H.	岡山大工学部	An in vitro antibody generation system using a hypermutating chicken B cell line.	GTCbio' s 2nd Modern Drug Discovery and Development Summit (Philadelphia, USA)	2006
006	油谷浩幸	東京大先端研	演題：ゲノム情報と医療への応用	第1回 KMU 研究推進セミナー（金沢）	2006
007	油谷浩幸	東京大先端研	Glypican-3 as a novel diagnostic and therapeutic target for hepatocellular carcinoma	Gordon Research Conference (Proteoglycans) (米国)	2006
008	Iijima, Anai, Kodama, Shibasaki	東京大先端研	Rugulation of phophoinositides in cell-cell adhesion.	Shinozaki-Narikawa, Kodama, Shibasaki	2006
009	浜窪隆雄	東京大先端研	Methodological Challenges of the Post-Genomic Era.	Nature Methods-FujiFilm Symposium (箱根)	2006
010	Toshiya Tanaka, Aoi Uchida, Takao Hamakubo	東京大先端研	PPARd Agonist Ameliorates Reactive Oxygen Species and Adipocytokine Production in White Adipose Tissue of Obese Mice Models	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan	2006

011	Kenji Ishimoto, Keisuke Tachibana, Mikako Sumitomo, Shiho Omote, Ikuko Hanano, Daisuke Yamasaki, Yuichiro Watanabe, Toshiya Tanaka, Takao Hamakubo, Juro Sakai, Tatsuhiko Kodama, Takefumi Doi	東京大先端研	Identification of human low-density lipoprotein receptor as a novel target gene regulated by liver X receptor alpha	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan	2006
012	Koichi Sumi, Toshiya Tanaka, Yasuyo Urashima, Kenta Magoori, Masashi Okamura, Takashi Maejima, Aoi Uchida, Noriaki Kojima, Hiroto Ohguchi, Hiroko Iwanari, Frank_J. Gonzalez, Takashi Minami, Takao Hamakubo, Tatsuhiko Kodama, Juro Sakai.	東京大先端研	Transcriptional regulation of the ABCG5/ABCG8 gene by HNF4 α and SHP.	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan	2006
013	Daisuke Yamasaki, Keisuke Tachibana, Natsuko Kawabe, Hitomi Nakamura, Kenji Ishimoto, Hiroyuki Kagechika, Hiroyuki Miyachi, Toshiya Tanaka, Juro Sakai, Tatsuhiko Kodama, Takefumi Doi.	東京大先端研	Analysis of the antiproliferative mechanism of PPAR α ligand on human tumor cell lines.	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan	2006
014	Keisuke Tachibana, Naohiko Anzai, Chihiro Ueda, Tatsuya Katayama, Takayoshi Kirino, Rika Takahashi, Daisuke Yamasaki, Kenji Ishimoto, Toshiya Tanaka, Takao Hamakubo, Yukihiko Ueda, Hiroyuki Arai, Juro Sakai, Tatsuhiko Kodama, Takefumi Doi.	東京大先端研	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha up-regulates the PDZK1 gene expression via a PPRE in a human hepatoblastoma cell line	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan	2006
015	田中十志也, 酒井寿郎	東京大先端研	PPAR δ アゴニストのメタボリック シンドローム改善効果	第 27 回日本炎症・再生医学会, 東京	2006
016	Iguchi H and Sakai J	東京大先端研	Sox6 attenuates glucose stimulated insulin secretion by repressing pdx1 transcriptional activity and is down-regulated in	Keystone Symposia, Keystone, Vancouver, Canada	2006

			hyperinsulinemic obese mice		
017	Juro Sakai	東京大先端研	SOX6 contributes to the pancreatic β -cell adaptation in Obesity & Metabolic syndrome.	20th IUBMB Congress of biochemistry and molecular biology and 11 th FAOBMB congress, "Aging and Diseases Metabolic syndrome, atherosclerosis and obesity", Kyoto	2006
018	Shinobu Takayasu, Takeshi Sakurai, Satoshi Iwasaki, Ryoichi X Ioka, Akihiro Yamanaka, Haruhisa Iguchi, Yuka Imamura, S Clay Williams, Yukio Ikeda, Hitoshi Teranishi, Iori Sakakibara, Kousaku Ohno, Saori Murakami, Naoshi Dohmae, Jian Xie, Toshihiro Suda, Toshiyuki Motoike, Takashi Ohuchi, Masashi Yanagisawa and Juro Sakai	東京大先端研	G protein-coupled receptor GPR103: Purification of its native peptide ligand, a regulator of appetite, arousal, and blood pressure via the central nervous system.	ENDO2006, Boston, Massachusetts, USA	2006
019	浜窪隆雄		抗体医薬による統合的個別医療	「高分子」, 55 (652), 334-337,	2006
020	浜窪隆雄		ポストゲノム時代における膜タンパク質解析法—ウイルスディスプレイと抗体作成	日本レーザー医学会誌, 26 (4), 310-314,	2006
021	馬場基芳・鈴木将之・Rashid Ganeev・黒田寛人・尾崎恒之・浜窪隆雄・増田一之・林昌弘・先浜俊子・児玉龍彦・小笹徹		FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 分光法における蛋白機能性の出現機構	日本レーザー医学会誌, 26 (4), 315-320	2006
022	浜窪隆雄		ターゲットドプロテオミクス—高親和性抗体を用いた膜蛋白質複合体解析法	医学のあゆみ、Vol. 219 No. 9, 679-684,	2006
023	Yokosaki, Y., Higashikawa, F. and Kinoh, H.	国立循環器病センター	Polymeric osteopontin is a potent chemoattractant for neutrophils mediated by integrins.	Gordon conference, Fibronectin, Integrins & Related molecules, Lucca, Italy	2007
024	Sawamura, T.	国立循環器病センター	LOX-1 as a potential therapeutic target for cardiovascular disease.	13th World Congress of the ISHR,	2007

			Bologna,		
025	Sawamura, T.	国立循環器病センター	LOX-1 is Involved in high fat diet-induced arterial lipid-deposition in SHR-SP.	13th World Congress On Heart Disease (The international Academy of Cardiology) , Vancouver,	2007
026	Yokosaki, Y., Higashikawa, F. and Kinoh, H.	広島大学・大学院生物圏	Polymerization of osteopontin enhances its biological activity.	Gordon conference, Small integrin binding-proteins, Biddeford, ME, USA	2007
027	横崎恭之、東川史子、喜納裕美	広島大学・大学院生物圏	トランスグルタミナーゼ2はオステオポンチンを重合し好中球の遊走を惹起する	ワークショップ、拡大する21世紀のトランスグルタミナーゼ研究、日本分子生物学会、横浜	2007
028	Yokosaki, Y., Higashikawa, F. and Kinoh, H.	国立循環器病センター	Polymeric osteopontin is a potent chemoattractant for neutrophils mediated by integrins. Gordon conference,	Fibronectin, Integrins & Related molecules, April 22-27, , Lucca, Italy	2007
029	Sawamura, T.	国立循環器病センター	LOX-1 as a potential therapeutic target for cardiovascular disease.	XIX World Congress of the ISHR, Bologna, June,	2007
030	Sawamura, T.	国立循環器病センター	LOX-1 is Involved in high fat diet-induced arterial lipid-deposition in SHR-SP. 2007.	13th World Congress On Heart Disease (The international Academy of Cardiology) , Vancouver, July,	2007
031	Yokosaki, Y., Higashikawa, F. and Kinoh, H.	国立循環器病センター	Polymerization of osteopontin enhances its biological activity. Gordon conference,	Small integrin binding-proteins, August 5-10, Biddeford, ME, USA	2007
032	横崎恭之、東川史子、喜納裕美	国立循環器病センター	トランスグルタミナーゼ2はオステオポンチンを重合し好中球の遊走を惹起する、ワークショップ、拡大する21世紀のトランスグルタミナーゼ研究	日本分子生物学会、横浜	2007
033	曲正樹、綾高広、藤堂景史、金山直樹、大森齊	岡山工学部	ニワトリ培養B細胞株 DT40-SW を用いる in vitro 抗体作製システムの開発 : Pax5 発現抑制による抗体産生の増強	第59回 日本生物工学会大会	2007
034	岡澤貴裕、藤堂景史、梶田真道、曲正樹、金山直樹、大森齊	岡山工学部	ニワトリ培養B細胞株 DT40-SW を用いる in vitro 抗体作製システムの開発 : 抗原特異的クローンのセルソーターによる効率的	第59回 日本生物工学会大会	2007

			単離		
035	金広優一、曲正樹、藤堂景史、金山直樹、大森斉	岡山大工学部	ニワトリ培養B細胞株 DT40-SWを用いる in vitro 抗体作製システムの開発： 変異導入の促進による迅速な抗体ライブラリーの構築	第 59 回に本生物工学会大会	2007/9
036	Ohmori, H., Todo, K., Magari, M., Kanayama, N.	岡山大工学部	An efficient in vitro antibody generation system using a hypermutating chicken B cell line.	13th International Conference on Human Antibodies and Hybridomas (Milano, Italy)	2007
037	岡澤貴裕、藤堂景史、梶田真道、曲正樹、金山直樹、大森斉	岡山大工学部	ニワトリ培養B細胞株 DT40-SWを用いる in vitro 抗体作製システムの開発：抗原特異的クローンのセルソーターによる効率的単離	第 59 回 日本生物工学会大会	2007
038	手塚智也、伊沢賢一、長島弘明、興梠順也、増保安彦	東京理科大薬学部	Fc 多量体化による高活性抗体	日本薬学会 127 回 年会	2007
039	川上和美、長島弘明、興梠順也、増保安彦	東京理科大薬学部	化学的二量体化抗体の抗腫瘍活性	日本薬学会 127 回 年会	2007
040	宇井美穂子、田中良和、円谷健、藤井郁雄、井上將行、平間正博、津本浩平	東京大新領域	X線結晶構造解析による抗シガトキシン抗体の分子認識機構の解明	第 10 回バイオテクノロジー部会シンポジウム 早稲田大学国際会議場	2007
041	宇井美穂子、田中良和、円谷健、藤井郁雄、井上將行、平間正博、津本浩平	東京大新領域	抗シガトキシン抗体の分子認識機構：結晶構造と熱力学	第 22 回生体機能関連化学シンポジウム 東北大学多元物質科学研究所	2007
042	田中良和、三堀麻理子、工藤基徳、津本浩平	東京大新領域	アルギニンの示す蛋白質凝集抑制効果：作用機序と応用	第 22 回生体機能関連化学シンポジウム 東北大学多元物質科学研究所	2007
043	宇井美穂子、田中良和、円谷健、藤井郁雄、井上將行、平間正博、津本浩平	東京大新領域	抗シガトキシン抗体 10C9 Fab の構造学的・熱力学的解析	日本生物物理学会 第 45 回 年会 パシフィコ横浜	2007
044	瀬尾秀宗、市川久詞、針谷直人、李東輝、土屋京子、太田邦史（東大・総合文化研究科）、橋本修一	カイオム・バイオサイエンス	新規 in vitro モノクローナル抗体作製法・ADLib®システムによる迅速・効率的・網羅的な抗体作製ソリューションの開発	第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会（横浜）	2007
045	橋本修一、山谷仁志、笹沼麻貴、浅川美奈子、吉田章子、太田邦史、瀬尾秀宗	カイオム・バイオサイエンス	新規 in vitro モノクローナル抗体作製法・ADLib®システムによる治療用抗体作製ソリューションの開発	第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会（横浜）	2007
046	Masaaki Fujiwara	カイオム・バイオサイエンス	The ADLib® System: Alternative Diversity for Therapeutic Antibody Design	Antibody Engineering, IBC conference (San Diego)	2007

047	油谷 浩幸	東京大先端研	ゲノム情報を用いたがん診断および治療への展開	がん特定領域研究合同シンポジウム (東京)	2007
048	油谷 浩幸	東京大先端研	ゲノム情報と医療	第 19 回 Young Oncologist Conference (和歌山)	2007
049	油谷 浩幸	東京大先端研	Genomic strategy for personalized cancer treatment	The 6th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology (Fukuoka)	2007
050	Shinozaki-Narikawa, Kodama, Shibasaki	東京大先端研	Cooperation of phosphoinositides and BAR domain proteins in endosomal tubulation.	Dynamic Interplay Between Cytoskeletal and Membrane Systems	2007
051	Kenji Daigo, Takeshi Kawamura, Satoshi Katayose, Toshiya Tanaka, Tatsuhiko Kodama, Takao Hamakubo	東京大先端研	HIGH-RESOLUTION TARGETED PROTEOMICS OF ENDOGENOUS NUCLEAR RECEPTOR COMPLEX USING HIGH-QUALITY IMMUNOMAGNETIC BEADS	Cold Spring Harbor Laboratory Mechanisms of Eukaryotic Transcription Meeting (Cold Spring Harbor, NY)	2007
052	浜窪隆雄	東京大先端研	バキュロウイルスディスプレイ法を用いた高親和性抗体の作製とターゲットドプロテオミクスの応用	第 4 回千葉疾患プロテオミクス研究会 (千葉大学西千葉キャンパス)	2007
053	浜窪隆雄	東京大先端研	抗体作製技術の現状と展望	第 10 回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ (国際研究交流会館 (国立がんセンター内))	2007
054	浜窪隆雄	東京大先端研	バキュロウイルス発現系の開発系と膜蛋白質特異抗体の作製技術	タンパク質生産・精製技術最前線セミナー (横浜ランドマークタワー25F)	2007
055	太期健二、川村猛、片寄聡、田中十志也、児玉龍彦、浜窪隆雄	東京大先端研	高親和性抗体結合低非特異吸着磁性ビーズを用いた内在性 HNF4 α 複合体のショットガンプロテオミクス解析	第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 (パシフィコ横浜)	2007
056	先浜俊子、佐藤敬人、北村俊雄、児玉龍彦、浜窪隆雄	東京大先端研	Baculovirus Display 系を用いた膜蛋白質相互作用検出法とその応用	第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 (パシフィコ横浜)	2007

057	Koichi Sumi, Toshiya Tanaka, Aoi Uchida, Kenta Magoori, Riuko Ohashi, Hiromi Kudo, Insook Kim, Makoto Naito, Frank J. Gonzalez, Takao Hamakubo, Tatsuhiko Kodama, and Juro Sakai	東京大先端研	Cooperative interaction between Hepatocyte Nuclear Factor 4a and GATA transcription factors Regulates ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8	Keystone Symposia, Steamboat Springs, Colorado, USA	2007
058	Keisuke Tachibana, Naohiko Anzai, Chihiro Ueda, Tatsuya Katayama, Takayoshi Kirino, Rika Takahashi, Daisuke Yamasaki, Kenji Ishimoto, Toshiya Tanaka, Takao Hamakubo, Yukihiro Ueda, Hiroyuki Arai, Juro Sakai, Tatsuhiko Kodama and Takefumi Doi	東京大先端研	Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor responsive element (PPRE) in the human PDZK1 gene promoter	Keystone Symposia, Steamboat Springs, Colorado, USA	2007
059	山崎大典, 河邊奈津子, 中村仁美, 橋 敬祐, 岡田欣晃, 石本憲司, 宮地弘幸, 影近弘之, 田中十志也, 酒井寿郎, 児玉龍彦, 土井健史	東京大先端研	ヒト肝癌由来細胞株における核内受容体 PPAR α リガンド応答遺伝子の解析	日本薬学会 第127年会, 富山	2007
060	田中十志也, 大口裕人, 児玉龍彦, 酒井寿郎	東京大先端研	Hepatocyte nuclear factor 4a (HNF4 α) による Type 1 Iodothyronine Deiodinase (D1) の発現制御機構	第80回日本内分泌学会学術総会, 東京	2007
061	岡村将史, 田中十志也, 児玉龍彦, 酒井寿郎	東京大先端研	Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs) による脂肪細胞分化抑制についての検討	第80回日本内分泌学会学術総会, 東京	2007
062	寿見孝一, 田中十志也, 内田あおい, 馬郡健太, 児玉龍彦, 酒井寿郎	東京大先端研	Hepatocyte Nuclear Factor 4a (HNF4a) と GATA との協調作用による ATP-binding cassette G5 および G8 (ABCG5, ABCG8) の発現調節機構	第80回日本内分泌学会学術総会, 東京	2007
063	南茂隆生, 山縣和也, 田中十志也, 児玉龍彦, 福井健司, 宮川潤一郎, 下村伊一郎	東京大先端研	マウス胎発生過程における HNF-4a, HNF-1a, HNF-1b の発現様式の検討	第80回日本内分泌学会学術総会, 東京	2007
064	若林賢一, 堤修一, 岡村将史, 田中十志也, 児玉龍彦, 酒井寿郎, 油谷浩幸	東京大先端研	3T3-L1 脂肪細胞分化系における PPAR γ 標的遺伝子の探索研究	第1回日本エビジェネティクス研究会年会, 大阪	2007
065	KOICHI SUMI, TANAKA TOSHIYA, UCHIDA AOI, MAGOORI KENTA, KUDO HIROMI, NAITO MAKOTO, GONZALEZ FRANK J., HAMAKUBO TAKAO, KODAMA	東京大先端研	Cooperative interaction between Hepatocyte Nuclear Factor 4 and GATA transcription factors Regulates ATP-binding cassette sterol transporters	第39回日本動脈硬化学会, 大阪	2007

	TATSUHIKO, SAKAI JURO		ABC5 and ABC8		
066	Keisuke Tachibana, Tatsuya Katayama, Chihiro Ueda, Mikako Sumitomo, Masayuki Tagami, Kenji Ishimoto, Daisuke Yamasaki, Toshiya Tanaka, Takao Hamakubo, Juro Sakai, Tatsuhiko Kodama, Satoshi Obika, Takeshi Imanishi and Takefumi Doi	東京大先端研	Antisense activity of 2',4'-BNA targeted to PPAR gamma in THP-1 and HCT116 cells.	第5回国際核酸化学シンポジウム, 東京	2007
067	山崎大典、中村仁美、河邊奈津子、田子秀典、橋敬祐、石本憲司、宮地弘幸、田中十志也、酒井寿郎、児玉龍彦、土井健史	東京大先端研	フェノフィブラートによる肝癌細胞 (Huh7) の増殖抑制に関する遺伝子の網羅的発現解析	第30回日本分子生物学会年回, 第80回日本生化学会大会, 合同大会, 横浜	2007
068	河邊奈津子、山崎大典、中村仁美、橋敬祐、石本憲司、田中十志也、酒井寿郎、児玉龍彦、土井健史	東京大先端研	核内受容体 PPARα リガンドによるヒト乳癌細胞株の増殖抑制効果の分子機構解析	第30回日本分子生物学会年回, 第80回日本生化学会大会, 合同大会, 横浜	2007
069	Iori Sakakibara, Makoto Ishii, Takahiro Fujino, Clay Williams, Hiroyuki Aburatani, Masashi Yanagisawa, and Juro Sakai	東京大先端研	Acetyl-CoA Synthetase 2 Deficiency Leads to Metabolic Abnormalities under Ketogenic Conditions.	Endocrine Society's 89th Annual Meeting, Toronto, Ontario, Canada	2007
070	酒井寿郎	東京大先端研	ケトン体代謝をになうアセチル Co-A 合成酵素欠損マウス抗肥満効果の分子基盤の解析	第80回日本内分泌学会, 東京	2007
071	榊原伊織、酒井寿郎	東京大先端研	アセチル Co-A 合成酵素 2 型遺伝子欠損マウスの表現型解析	第80回日本内分泌学会, 東京	2007
072	増田一之、柴崎芳一、小笹徹、児玉龍彦、浜窪隆雄		“リガンド結合依存型三量体 G タンパク質活性化と RGS”	第30回日本分子生物学会年回・第80回日本生化学会大会 合同大会 12月13日 パシフィコ横浜	2007
073	先浜俊子、佐藤敬人、北村俊雄、児玉龍彦、浜窪隆雄		“Baculovirus Display 系を用いた膜蛋白質相互作用検出法とその応用”	Baculovirus Display 系を用いた膜蛋白質相互作用検出法とその応用年 12月13日 パシフィコ横浜	2007
074	太期健二、川村猛、片寄聡、田中十志也、児玉龍彦、浜窪隆雄		“高親和性抗体結合低非特異吸着磁性ビーズを用いた内在性 HNF4α 複合体のショットプロテオミクス解析”	第30回日本分子生物学会年回・第80回日本生化学会大会 合同大会 パシフィコ横浜	2007
075	浜窪隆雄		“バキュロウイルス発現系の開発系と膜蛋白質特異抗体の作製技術”	タンパク質生産・精製技術最前線セミナー” 横浜ランド	2007

				マークタワー25F	
076	浜窪隆雄		“抗体作製技術の現状と展望”	第10回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ 国際研究交流会館 (国立がんセンター内)	2007
077	浜窪隆雄	千葉大学西千葉キャンパス	“バキュロウイルスディスプレイ法を用いた高親和性抗体の作製とターゲットドプロテオミクスの応用”第4回千葉疾患プロテオミクス研究会年		2007
078	Kenji Daigo, Takeshi Kawamura, Satoshi Katayose, Toshiya Tanaka, Tatsuhiko Kodama, Takao Hamakubo		“High-resolution targeted proteomics of endogenous nuclear receptor complex using high-quality immunomagnetic beads”	Cold Spring Harbor Laboratory Mechanisms of Eukaryotic Transcription meeting Spring Harbor, NY	2007
079	浜窪隆雄、太期健二、児玉龍彦		バイオマーカーと抗体チップ	科学と生物 Vol. 45, No. 8, 533-538	2007
080	Kajsa Wing, Paz Prieto-Martin, Yasushi Onishi, Takashi Nomura, Shimon Sakaguchi	京都大学再生医科学研究所	The role of CTLA-4 specifically for CD4+Foxp3+ regulatory T cells in vivo	World Immune Regulation Meeting-II	2008
081	Makoto Miyara, Tomoko Shima, Akihiko Kitoh, Yumiko Yosioka, Akira Niwa, Cecile Taflin, Toshio Heike, Dominique Valeyre, Alexis Mathian, Zahir Amoura, Tatsutoshi Nakahata, Tomoyuki Yamaguchi, Takashi Nomura, Kajsa Wing, Guy Gorochochov, Masahiro Ono, Shimon Sakaguchi	京都大学再生医科学研究所	Functional delineation and differentiation dynamics of FoxP3-expressing subpopulation of CD4+ T cell in humans	World Immune Regulation Meeting-II	2008
082	鬼頭昭彦、小野昌弘、直江吉則、矢口浩子、大倉永也、北林一生、塚田俊彦、野村尚史、宮地良樹、谷内一郎、坂口志文	京都大学再生医科学研究所	Foxp3+制御性T細胞の生体内抑制機能には Runx complex が必須である	第18回 Kyoto T Cell Conference	2008
083	前田伸治、秋月修治、橋本求、野村尚史、坂口教子、坂口志文	京都大学再生医科学研究所	TCR シグナル伝達の補正による SKG マウス自己免疫性関節炎の発症抑制	第18回 Kyoto T Cell Conference	2008
084	山口智之、岸歩美、坂口志文	京都大学再生医科学研	oxp3による免疫制御のメカニズム/ How does Foxp3 control Treg	第38回日本免疫学会学術集会	2008

		研究所	suppression?		
085	Kitoh Akihiko, Ono Masahiro, Naoe Yoshinori, Yaguchi Hiroko, Ohkura Naganari, Kitabayashi Issei, Tsukada Toshihiko, Nomura Takashi, Miyachi Yoshiki Taniuchi Ichiro, Sakaguchi Shimon	京都大学再生医科学研究所	Runx 複合体は CD4+FoxP3+制御性 T 細胞の生体内抑制活性に必須である/ Runx complexes are required for CD4+FoxP3+ regulatory T-cell function in vivo	第 38 回日本免疫学会学術集会	2008
086	Prieto-Martin Paz, Wing Kajs, Yamaguchi Tomoyuki, Nomura Takashi, Sakaguchi Shimon	京都大学再生医科学研究所	CTLA-4 expression on Foxp3+ regulatory T cells plays a key role in tumor immunity and autoimmunity	第 38 回日本免疫学会学術集会	2008
087	野村尚史、秋月修治、前田伸治、橋本求、斉藤隆、坂口教子、坂口志文	京都大学再生医科学研究所	TCR シグナル不全による制御性 T 細胞分化障害と自己免疫病の発症・Autoimmune disease caused by Treg insufficiency due to defective TCR signaling	第 38 回日本免疫学会学術集会	2008
088	橋本求、廣田圭司、吉富啓之、前田伸治、寺平晋、野村尚史、坂口教子、岩倉洋一郎、三森経世、坂口志文	京都大学再生医科学研究所	SKG マウスの関節炎発症における dectin-1 依存的、非依存的な経路の解析 /Dectin-1-dependant and -independent pathway for the induction of arthritis in SKG mice	第 38 回日本免疫学会学術集会	2008
089	前田伸治、田中聡、廣田圭司、橋本求、寺平晋、秋月修治、野村尚史、上田龍三、坂口教子、坂口志文	京都大学再生医科学研究所	TCR シグナル伝達の補正による SKG マウス自己免疫性関節炎の発症抑制/Rescue of autoimmune arthritis in SKG mice by normalization of TCR signal transduction	第 38 回日本免疫学会学術集会	2008
090	Yoshinaga Ito, Takashi Usui, Shio Kobayashi, Mikiko Iguchi, Hiromu Ito, Hiroyuki Yoshitomi, Takashi Nakamura, Motomu Hashimoto, Noriko Sakaguchi, Shimon Sakaguchi Tuneyo Mimor	京都大学再生医科学研究所	T 細胞はコラーゲン誘発性関節炎局所における主要な Il-17 産生細胞である/Gamma delta T cells are the predominant Il-17-producing cells in affected joint of collagen-induced arthritis	第 38 回日本免疫学会学術集会	2008
091	荒川明子、小野昌弘、藤井弘子、中村元信、坂口志文、宮地良樹	京都大学再生医科学研究所	円形脱毛症患者の制御性 T 細胞減少/Altered frequency of regulatory T cells in alopecia areata patient	第 38 回日本免疫学会学術集会	2008
092	Shimon Sakaguchi	京都大学再生医科学研究所	The Role of Natural Regulatory T Cells in Autoimmunity,	12 th International Conference on Lymphocyte Activation and Immune Regulation	2008

093	Shimon Sakaguchi	京都大学再生医科学研究所	Role of regulatory T cells in tolerance and autoimmunity	EurAPS International Symposium on Molecular Background of Tolerance and Autoimmunity	2008
094	Shimon Sakaguchi	京都大学再生医科学研究所	Regulatory T cells for self-tolerance and immune homeostasis	13 th Congress of the Asia Pacific League of Association for Rheumatology (APLAR2008)	2008
095	Shimon Sakaguchi	京都大学再生医科学研究所	Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis	The 11 th Kyoto University International Symposium 2008 Frontier Bioscience in Modern Medicine	2008
096	Shimon Sakaguchi	京都大学再生医科学研究所	Keynote Lecture: Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis,	International Conference on Regulatory T Cells and Clinical Application in Human Diseases	2008
097	横崎恭之、西道教尚、松田治男、喜納裕美、川本英子.	広島大学・大学院生物圏	オステオポンチンのスプライスバリエーションの生物活性の違い.	宮崎サイエンスキャンプ宮崎	2008
098	乙井一典、井上信孝、藤田佳子、沢村達也	広島大学・大学院生物圏	血栓形成過程における LOX-1 の意義	第 81 回日本薬理学会年会、横浜・パシフィコ横浜	2008
099	井上信孝、中野厚史、藤田佳子、沢村達也	国立循環器病センター	動脈硬化初期病変としての血管内脂肪沈着における LOX-1 の意義—SHRSP ラットを用いた検討—	第 81 回日本薬理学会年会、横浜・パシフィコ横浜	2008
100	佐藤優子、西道教尚、中野厚史、瀧川健司、井上信孝、松田治男、沢村達也.	広島大学・大学院生物圏	ニワトリ抗 ApoB 抗体によるマウス血中の LOX-1 リガンド活性測定	第 81 回日本薬理学会年会、横浜・パシフィコ横浜	2008
101	西道教尚、佐藤優子、中野厚史、瀧川健司、井上信孝、堀内浩幸、古澤修一、沢村達也、松田治男	広島大学・大学院生物圏 国立循環器病センター	抗ヒト、マウスアポリポタンパク質 B (ApoB) 特異的ニワトリモノクローナル抗体の樹立およびその活用	日本農芸化学会 2008 年会、名古屋	2008
102	岩元真、西道教尚、立石能子、佐藤優子、堀内浩幸、古澤修一、沢村達也、松田治男、	広島大学・大学院生物圏 国立循環器病センター	酸化 LDL 受容体 (LOX-1) 特異的ニワトリモノクローナル抗体の樹立	日本農芸化学会 2008 年会、名古屋	2008
103	立石能子、西道教尚、堀内浩幸、古澤修一、松田治男	広島大学・大学院生物圏	ニワトリ・マウスキメラ抗体の作製とマウスにおけるキメラ抗体の免疫原性	日本農芸化学会 2008 年会、名古屋	2008

104	横崎恭之、西道教尚、松田治男、喜納裕美、川本英子.	広島大学・大学院生物圏国立循環器病センター	オステオポンチンのスプライスバリエーションの生物活性の違い.	宮崎サイエンスキャンプ	2008
105	乙井一典、井上信孝、藤田佳子、沢村達也	国立循環器病センター	血栓形成過程における LOX-1 の意義	第 81 回日本薬理学会年会 横浜・パシフィコ横浜	2008
106	井上信孝、中野厚史、藤田佳子、沢村達也	国立循環器病センター	動脈硬化初期病変としての血管内脂肪沈着における LOX-1 の意義—SHRSP ラットを用いた検討—	第 81 回日本薬理学会年会 横浜・パシフィコ横浜	2008
107	佐藤優子、西道教尚、中野厚史、瀧川健司、井上信孝、松田治男、沢村達也、	広島大学・大学院生物圏国立循環器病センター	ニワトリ抗 ApoB 抗体によるマウス血中の LOX-1 リガンド活性測定.	第 81 回日本薬理学会年会 横浜・パシフィコ横浜	2008
108	西道教尚、佐藤優子、中野厚史、瀧川健司、井上信孝、堀内浩幸、古澤修一、沢村達也、松田治男	広島大学・大学院生物圏国立循環器病センター	抗ヒト、マウスアポリポタンパク質 B (ApoB) 特異的ニワトリモノクローナル抗体の樹立およびその活用	日本農芸化学会 2008 年会 名古屋	2008
109	岩元真、西道教尚、立石能子、佐藤優子、堀内浩幸、古澤修一、沢村達也、松田治男	広島大学・大学院生物圏国立循環器病センター	酸化 LDL 受容体 (LOX-1) 特異的ニワトリモノクローナル抗体の樹立	日本農芸化学会 2008 年会名古屋	2008
110	立石能子、西道教尚、堀内浩幸、古澤修一、松田治男	広島大学・大学院生物圏国立循環器病センター	ニワトリ・マウスキメラ抗体の作製とマウスにおけるキメラ抗体の免疫原性	日本農芸化学会 2008 年会名古屋	2008
111	岩元真、西道教尚、立石能子、佐藤優子、堀内浩幸、古澤修一、沢村達也、松田治男	広島大学・大学院生物圏国立循環器病センター	酸化 LDL 受容体 (LOX-1) 特異的ニワトリモノクローナル抗体の樹立および機能解析	第 31 回日本分子生物学会年会 神戸 (12 月)	2008
112	金山直樹、曲 正樹、梶田真道、金広優一、藤堂景史、大森 齊	岡山大学工学部	変異導入能力を有する培養 B 細胞株を用いた in vitro 抗体作製システムの高機能化	日本分子生物学会 年会・日本生化学会 大会合同大会	2008
113	手塚智也、元井崇太郎、大坪美知子、小林栄治、長島弘明、興相順也、増保安彦	東京理科大学薬学部	Fc 多量体化抗体による単球・マクロファージ系細胞からのケモカイン産生誘導増強	日本薬学会 128 回 年会	2008
114	神谷由香里、中野雄一、谷口いつ子、興相順也、増保安彦	東京理科大学薬学部	抗 β catenin 抗体の細胞内導入	日本薬学会 128 回 年会	2008
115	長田江里子、アクバルピントン、金森崇、清水義宏、上田卓也	東京大学新領域	リポソームディスプレイを用いた抗体のエピトープマッピング系の開発	BMB2008	2008
116	金森崇、大橋広行、清水義宏、上田卓也	東京大学新領域	PURE Ribosome Display を用いた効率的な scFv の選択法の開発	BMB2008	2008
117	宇井美穂子、田中良和、円谷 健、藤井郁雄、井上将行、平間正博、津本浩平	東京大新領域	抗体 10C9 が示すポリエーテル系海洋毒素シガトキシン認識機構	第 10 回生命化学研究会シンポジウム・熊本 (2008) - つくる生命化学 - 未来への展望 - 熊本大学 工学部 百周年記念館	2008

118	宇井美穂子、田中良和、円谷 健、藤井郁雄、井上将行、平間正博、津本浩平	東京大新領域	抗シガトシキン抗体による合成環状エーテル抗原の認識機構	SORST ジョイントシンポジウム 「有機合成力」 -そのダイナミズム コクヨホール	2008
119	工藤基徳、三堀麻理子、田中良和、津本浩平	東京大新領域	タンパク質の構造に与えるアルギニンの効果	第 89 回 日本化学会春期年会 立教大学	2008
120	Kenji Daigo, Takeshi Kawamura, Satoshi Katayose, Toshiya Tanaka, Tatsuhiko Kodama, and Takao Hamakubo	東京大先端研	Functional proteomics of endogenous HNF4 α complex revealed the heterodimerization of HNF4 α and HNF4 γ in HepG2 cells	Keystone Symposia, Nuclear Receptors: Orphan Brothers Whistler Resort, Whistler, British Columbia)	2008
121	Toshiya Tanaka, Hiroto Ohguchi, Aoi Uchida, Kenta Magoori, Insook Kim, Hiromi Kudo, Takeshi Sasaki, Timothy F. Osborne, Frank J. Gonzalez, Takao Hamakubo, Tatsuhiko Kodama, and Juro Sakai.	東京大先端研	Hepatocyte Nuclear Factor 4a contributes to thyroid hormone homeostasis by cooperatively regulating the type1 Iodothyronine Deiodinase gene with GATA4 and Kruppel-like transcription factor 9	Keystone Symposia, Whistler, British Columbia, Canada	2008
122	Jen-Chieh Chuang, Ji-Young Cha, Toshiya Tanaka, Juro Sakai, and Joyce J. Reppa	東京大先端研	Identification and characterization of HNF4a/HNF4g heterodimers in beta-cells of the mouse endocrine pancreas	Jen-Chieh Chuang, Ji-Young Cha, Toshiya Tanaka, Juro Sakai, and Joyce J. Reppa	2008
123	Juro Sakai	東京大先端研	Deficiency of mitochondrial acetyl-CoA synthetase (AceCS 2) a KLF15 target gene impairs ketone body metabolism and develops hyperketonemia under low glucose diet.	International Symposium on the Biology of the Krüppel-like factors, Tokyo, Japan	2008
124	Kenji Daigo, Takeshi Kawamura, Satoshi Katayose, Toshiya Tanaka, Tatsuhiko Kodama, and Takao Hamakubo		“Functional proteomics of endogenous HNF4 α complex revealed the heterodimerization of HNF4 α and HNF4 γ in HepG2 cells”	Keystone Symposia, Nuclear Receptors: Orphan Brothers Whistler Resort, Whistler, British Columbia	2008
125	吉岡弓子、小野昌弘、小西郁生、坂口志文	京都大学再生医科学研究所	Control of T cell differentiation and cytokine production by an axis made by a set of morphogens	第 39 回日本免疫学会総会学術集会	2009
126	坂口志文、宮良亮	京都大学再	Functional delineation and	第 39 回日本免疫学	2009

		生医科学研究 所	differentiation dynamics of FoxP3-expressing subpopulation of human CD4+ T cells	会総会学術集会	
127	山口智之、坂口志文	京都大学再 生医科学研 究所	IL-2 低産生 CTLA-4 高発現の活 性化 T 細胞は免疫抑制活性を持 つ	第 39 回日本免疫学 会総会学術集会	2009
128	秋月修治、坂口教子、藤森 千尋、前田伸治、伊藤能永、 橋本求、野村尚史、斎藤隆、 三森経世、坂口志文	京都大学再 生医科学研 究所	TCR シグナル不全による制御性 T 細胞異常と自己免疫病の発症	第 39 回日本免疫学 会総会学術集会	2009
129	前田伸治、田中聡、廣田圭 司、藤森千尋、野村尚史、 秋月修治、橋本求、伊藤能 永、坂口教子、坂口志文	京都大学再 生医科学研 究所	正常 ZAP-70 の発現量操作による 自己免疫性関節炎の誘導	第 39 回日本免疫学 会総会学術集会	2009
130	坂口志文	京都大学再 生医科学研 究所	制御性 T 細胞による免疫応答制 御	JOINT FORUM	2009
131	Shimon Sakaguchi	京都大学再 生医科学研 究所	Biology and function of regulatory T Cells Regulatory	T cells and Cancer Immunotherapy	2009
132	坂口志文	京都大学再 生医科学研 究所	制御性 T 細胞による免疫応答制 御	日本免疫治療学研 究会学術集会	2009
133	Shimon Sakaguchi	京都大学再 生医科学研 究所	Manipulation of Treg for Anti Tumor Therapy	KEYSTONE SYMPOSIA: Regulatory T Cells	2009
134	Shimon Sakaguchi	京都大学再 生医科学研 究所	CTLA-4-dependent mechanism of Treg-mediated in vivo and in vitro suppression	WORLD IMMUNE REGULATION MEETING-III	2009
135	Shimon Sakaguchi	京都大学再 生医科学研 究所	T cell signaling, regulatory T cells and autoimmunity	Tolerance and Development. The Foundation des Treilles	2009
136	梶田真道、曲正樹、藤堂景 史、金山直樹、大森齊	岡山大工学 部	DT40-SW を用いる invitro 抗体 作製システムの高機能化：変異 様式の転換による高性能抗体作 製	日本生物工学会大 会	2009
137	金山直樹、小島聡史、 藤井忍、北村幸一、 井上和恵、岡山展久、松田 修一、藤堂景史、 曲正樹、大森齊	岡山大工学 部	変異能力を有するニワトリ B 細 胞株を用いた抗体の親和性成 熟:DT40-SW を用いたマウスモノ クローナル抗体の改変	日本分子生物学会 年会	2009
138	小島聡史、藤井忍、 北村幸一、井上和恵、 岡山展久、松田修一、藤堂	岡山大工学 部	変異能力を有するニワト リ B 細胞株を用いた抗体の親和 性成熟：外来の抗体可変部遺伝	日本分子生物学会 年会	2009

	景史、曲正樹、 金山直樹、大森齊		子のDT40-SWにおける発現・改良系の構築		
139	塩谷尚志、河口徳一、菅原稔、長崎光一、磯村実、牛嶋大、松浦正明、三木義男、野田哲生	癌研究所	乳がんと膵がんに関連するヒトがん幹細胞の分子学的特性解析	第 68 回日本癌学会 学術総会	2009
140	和田悠作、松浦正明、菅原稔、牛嶋大、宮田敏、長崎光一、三木義男、野田哲生	癌研究所	GeneChip Exon Array を用いた新規融合遺伝子探索方法の開発	第 32 回日本分子生 物学会年会	2009
141	長田江里子、アクバルピン タン、金森崇、清水義宏、 上田卓也	東京大学新 領域	リボソームディスプレイ法を用いた抗体のエピトープマッピング系の開発	第 9 回日本蛋白質 科学学会年会	2009
142	金紅蓮、福田奈那、金森崇、 上田卓也	東京大学新 領域	PURE Ribosome Display を用いた scFv 選択法の改良	第 82 回日本生化学 会大会	2009
143	福田奈那、金紅蓮、大橋広 行、金森崇、上田卓也	東京大学新 領域	Efficient selection of scFv using PURE Ribosome Display	第 32 回分子生物学 学会年会	2009
144	坂口志文	京都大学再 生医科学研究 所	関節リウマチと T 細胞異常	第 98 回日本病理学 会総会	2009.
145	Shimon Sakaguch	京都大学再 生医科学研究 所	Suppression Mechanisms of Foxp3 ⁺ Regulatory T Cells	FOCIS2009	2009
146	Shimon Sakaguchi	京都大学再 生医科学研究 所	Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis towards their clinical use.	TWINCORE-Symposiu m Infection Research and Beyond	2009
147	Shimon Sakaguchi	京都大学再 生医科学研究 所	T cell signaling, regulatory T cells and self-tolerance	International Conference on Immune Tolerance	2009
148	Shimon Sakaguchi	京都大学再 生医科学研究 所	Regulatory T cells for immune tolerance and tumor immunity	International Symposium on Immunotherapy and immunodeficiency	2009
149	橋本求、廣田圭司、吉富啓 之、前田伸治、寺平晋、秋 月修治、Prieto-Martin Paz, 野村尚史、坂口教子、 高橋実、藤田貞三、三森経 世、坂口志文	京都大学再 生医科学研究 所	補体による Th-17 依存性自己免 疫性関節炎の制御	第 39 回日本免疫学 会総会学術集会	2009
150	浜窪隆雄		「がん治療に向けた抗体分子デ ザイン」	情報計算化学生物 学会 第 304 回研究講演 会、東京、/12/18	2009
151	横崎恭之、西道教尚、松田 治男	広島大学・大 学院生物圏 国立循環器 病センター	Blockade of post-translational acquirement of chemotactic property of Osteopontin.	BIT Life science International Congress of Antibodies March 24, 北京	2010
152	沢村達也	国立循環器	LOX-1, the oxidized LDL	Basic Research	2010

		病センター	receptor, in cardiovascular dysfunction	Seminar and Related Meetings Houston America 5.31-6.2,	
153	澤村達也	国立循環器病センター	CRP in LOX-1 Biology Workshop on C-Reactive	Birmingham America, June 3	2010
154	金山直樹、井上和恵、岡山展久、山崎権也、金広優一、松田修一、串田健、池田美香、曲正樹、大森齊	岡山大工学部	ヒト型キメラ抗体を発現するニワトリB細胞株の樹立と応用	日本分子生物学会年会	2010
155	Shimoji T, Nagasaki K, Isomura M, Miki Y, Matsuura M, Noda T.	癌研究所	Molecular analysis for the differential diagnosis of cartilaginous tumors	8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, Waikoloa Hawaii, USA	2010
156	Development of detection method for novel fusion gene using GeneChip Exon Array	癌研究所	Wada Y, Matsuura M, Sugawara M, Ushijima M, Miyata S, Nagasaki K, Miki Y, Noda T.	8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, Waikoloa Hawaii, USA	2010
157	和田悠作、松浦正明、菅原稔、牛嶋大、宮田敏、長崎光一、三木義男、野田哲生	癌研究所	Gene Chip Exon array を用いた新規融合遺伝子探索方法の開発	第 69 回日本癌学会 学術総会	2010
158	元井崇太郎、水野裕貴、手塚智也、長島弘明、興相順也、小中原收、増保安彦	東京理科大学薬学部	タンデム Fc 型改変抗体による サイトカインとケモカインの産生誘導	日本薬学会 130 回 年会	2010
159	大坪美知子、深澤瑞紀、元井崇太郎、長島弘明、小中原收、増保安彦	東京理科大学薬学部	タンデム Fc 型改変抗体のがん細胞貪食促進活性	日本薬学会 130 回 年会	2010
160	伊藤悠美、金森崇、上田卓也	東京大学新領域	ナノリポ蛋白質粒子を用いた再構成型無細胞膜蛋白質合成系の確立	第 10 回日本蛋白質科学会年会	2010
161	浜窪隆雄		「肝がん治療用抗 Robo1 抗体の分子デザイン」	BMB学会、第 18 会場 神戸国際展示場、神戸 2010/12/09	2010
162	松原主典、庄屋雄二、立石能子、松田治男	広島大学・大学院生物圏国立循環器病センター	リンパ管新生モデルを用いたリンパ管新生抑制物質の検討	日本農芸化学会	2011 年会 (3 月) (発表予定)
163	水野裕貴、深澤瑞紀、長島弘明、興相順也、小中原收、増保安彦	東京理科大学薬学部	タンデム Fc 型改変抗体のサイトカイン・ケモカイン産生誘導と制がん活性	日本薬学会 131 回 年会	2011

164	深澤瑞紀、水野裕貴、大坪美知子、長島弘明、興相順也、小中原收、増保安彦	東京理科大学薬学部	タンDEM Fc型改変抗体の抗体依存性貪食活性および抗腫瘍活性評価	日本薬学会 131 回 年会	2011
165	金子要、長島弘明、山野井彩香、元井崇太郎、小中原收、興相順也、増保安彦	東京理科大学薬学部	多量体化 Fc と II 型 TNF 受容体細胞外ドメインとの融合体	日本薬学会 131 回 年会	2011

【新聞・マスコミ・その他 発表】 研究開発項目①「系統的な高特異性抗体創製技術」

番号	会社名	内容	掲載物	掲載日
001	東京理科大学	「薬学会 東京理科大学 Fc 部分を多量体化することで抗体の ADCC 活性を 100 倍増強」の見出しで発表された。	日経バイオテック	2007 年 4 月 9 日
002	東京理科大学	「東京理科大学 抗体医薬の活性 100 倍に遺伝子を改変 根元部分長く」の見出しで発表された。	日経産業新聞	2007 年 11 月 14 日
003	京都大学再生医科学研究所	平成 19 年度「上原賞」受賞者決定	読売新聞	2008 年 3 月 20 日
004	京都大学再生医科学研究所	免疫細胞活性化へのタンパク質を発見「がん療法に道	京都新聞	2008 年 7 月 8 日
005	京都大学再生医科学研究所	免疫制御細胞 世界で初めて特定	産経新聞	2008 年 9 月 10 日
006	京都大学再生医科学研究所	慶応医学賞に京大の坂口氏	京都新聞	2008 年 10 月 3 日
007	京都大学再生医科学研究所	免疫強化、がん消滅 京大がマウス実験成功	産経新聞	2008 年 10 月 10 日
008	京都大学再生医科学研究所	免疫反応抑制に仕組み解明 制御性 T 細胞マウスで実験	京都新聞	2008 年 10 月 10 日
009	京都大学再生医科学研究所	免疫反応を強化→がん細胞消滅	産経新聞	2008 年 10 月 10 日
010	京都大学再生医科学研究所	免疫細胞を 2 種に分類	産経新聞	2009 年 5 月 22 日
011	京都大学再生医科学研究所	制御リンパ球は 2 種類	京都新聞	2009 年 5 月 22 日
012	京都大学再生医科学研究所	免疫制御の細胞 目印発見	朝日新聞	2009 年 5 月 26 日
013	東京大学先端科学センター、自然科学研究機構	脳膜タンパク質 DHH C 2, 3 の抗体作製により、自然科学研究機構 生理学研究所 深田正紀教授との共同研究として	JST よりプレスリリース	2009 年 7 月 13 日

	構			
014	京都大学再生医 科学研究所	免疫制御、難病治療に道	日経産業新聞	2009年8月7日
015	京都大学再生医 科学研究所	生命科学の両雄、世界リード	日本経済新聞	2009年10月29日
016	京都大学再生医 科学研究所	免疫疾患の治療に情熱	京都新聞	2009年11月2日
017	癌研究会	カイオム 抗がん剤抗体 癌研と作製	日経産業新聞	2010年2月
018	カイオム・バイオ サイエンス	カイオム 抗がん剤抗体 癌研と作製	日経産業新聞	2010年2月22日
019	カイオム・バイオ サイエンス	カイオム・バイオサイエンス、癌研と抗腫瘍抗 体作製の共同研究開始	Biotechnology Japan	2010年2月22日
020	カイオム・バイオ サイエンス	カイオムと癌研究会が膜タンパク質に対する 抗体作製で共同研究を開始	カイオム・バイオ サイエンス プレスリリース	2010年2月22日
021	カイオム・バイオ サイエンス	バイオベンチャーで革命 抗体の効率的製造 方法を確立	毎日新聞	2011年1月6日

特許、論文、外部発表等の件数（内訳）

区分 年度	国内	外国	PCT*出願	査読付き	学会発表	その他外部発表 (プレス発表等)
H18FY	2件	0件	0件	3件	29件	0件
H19FY	11件	4件	2件	18件	33件	5件
H20FY	7件	1件	0件	11件	33件	0件
H21FY	11件	0件	0件	9件	30件	10件
H22FY	3件	0件	0件	27件	44件	10件

[知的所有権]

研究開発項目②「高効率な抗体分離精製技術」

番号	出願者	出願番号	国内 外国 PCT	出願日	状態	名称	発明者
001	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2006-276468	国内	2006/10/10	出願済	タンパク質の配向制御 固定化に適したタンパ ク質及びその製造方法	巖倉 正寛、広田 潔 憲、曾田 裕行、皿良 剛、有賀 由樹子、山 子 知織
002	国立大学 法人 東北大学	PCT/JP2006/ 320571	PCT	2006/10/16	出願済	高機能性二重特異性抗 体	熊谷 泉、浅野竜太郎
003	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2007-057791	国内	2007/3/7	出願済	タンパク質の配向制御 固定化に適したタンパ ク質	巖倉 正寛、広田 潔 憲、曾田 裕行、皿良 剛、有賀 由樹子、山 子 知織
004	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2007-059175	国内	2007/3/8	出願済	タンパク質の配向制御 固定化に適したタンパ ク質を固定化した担体	巖倉 正寛、広田 潔 憲、曾田 裕行、皿良 剛、有賀 由樹子、山 子 知織
005	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2007-059204	国内	2007/3/8	出願済	タンパク質の配向制御 固定化に適したタンパ ク質を設計する方法	巖倉 正寛、広田 潔 憲、曾田 裕行、皿良 剛、有賀 由樹子、山 子 知織
006	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2007-112175	国内	2007/04/20	出願済	リジン及びシステイン 残基を含まないタンパ ク質	巖倉 正寛、広田 潔 憲、曾田 裕行、皿良 剛、高橋 尚、有賀 由 樹子、山子 知織
007	独立行政 法人産業 技術総合 研究所研 究所	特願 2007-112218	国内	2007/04/20	出願済	アミノ末端1箇所配 向制御固定化された固 定化タンパク質	巖倉 正寛、広田 潔 憲、曾田 裕行、皿良 剛、高橋 尚、山子 知 織、有賀 由樹子
		PCT/JP2008/ 057481	PCT	2008/04/17	出願済		
		米国 12/596600	米国	2009/10/19	出願済		
008	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2007-123812	国内	2007/05/08	出願済	リジン及びシステイン 残基を含まないタンパ ク質の製造方法	巖倉 正寛、広田 潔 憲、曾田 裕行、皿良 剛、高橋 尚、有賀 由 樹子、山子 知織
009	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	米国 11/758629	米国	2007/06/05	出願済	配向制御したタンパク 質の固定化方法および それを利用したタンパ ク質の整列固定化方法	巖倉 正寛、広田 潔 憲
010	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	PCT/JP2007/ 069722	米国	2007/10/10	出願済	タンパク質の配向制御 固定化に適したタンパ ク質及び当該タンパク 質の固定化担体	巖倉 正寛、広田 潔 憲、曾田 裕行、皿良 剛、有賀 由樹子、山 子 知織

		米国 12/443623	米国	2007/10/10	出願済		巖倉 正寛、広田 潔 憲、曾田 裕行、皿良 剛、高橋 尚、有賀 由 樹子、山子 知織
011	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2007-272442	国内	2007/10/19	出願済	安定な変異型タンパク 質の製造方法	本田 真也、澤田 義 人、松丸 裕之
		PCT/JP2008/ 068861	PCT	2008/8/5	出願済		
012	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2007-291872	国内	2007/11/09	出願済	極微小タンパク質およ びその結晶	本田 真也、秋葉 俊 彦、石村 美雪、大石 郁子、小田原 孝行、 原田 一明
013	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2007-293726	国内	2007/11/12	出願済	安定な抗体結合性タン パク質	本田 真也、松丸 裕 之、渡邊 秀樹、大石 郁子、馮 延文
014	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2007-316752	国内	2007/12/07	出願済	変異型タンパク質のア ミノ酸配列設計方法お よび装置	本田 真也、澤田 義 人
015	独立行政 法人産業 技術総合 研究所 島津製作 所	特願 2007-336879	国内	2007/12/27	出願済	タンパク質アレイ基板	広田 潔憲、巖倉 正 寛、檜山 哲夫、阿久 根 智、松尾 拓平
016	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	(国内) 特願 2008-044609 (2007-31675 2 に基づく 優先権主張)	(国際) 未	2008/2/26	出願済	変異型タンパク質のア ミノ酸配列設計方法お よび装置	本田 真也、澤田 義 人
017	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2008-129342	国内	2008/5/16	出願済	弱酸性域での解離特性 を改良した抗体結合性 タンパク質及び抗体捕 捉剤	本田 真也、渡邊 秀 樹、松丸 裕之、馮 延 文
018	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2008-254189	国内	2008/9/30	出願済	弱酸性域での易解離性 を向上したプロテイン A 変異型タンパク質及 び抗体捕捉剤	本田 真也、松丸 裕 之、馮 延文、渡邊 秀 樹、大石 郁子
019	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2009-007538 (2008-12934 2 に基づく 優先権主張)	国内	2009/2/16	出願済	弱酸性域での解離特性 を改良した抗体結合性 タンパク質及び抗体捕 捉剤	本田 真也、渡邊 秀 樹、松丸 裕之、馮 延 文
020	独立行政 法人産業 技術総合 研究所 株式会社 島津製作 所	特願 2008-301503	国内	2008/11/26	出願済	分注方法	巖倉 正寛、広田 潔 憲、藤井 英彦、濱崎 勇二

021	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2008-305285	国内	2008/11/28	出願済	モノリスゲルを用いた タンパク質アレイ用検 出および解析システム	広田 潔憲、巖倉 正 寛、水口 博義
022	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2008-305352	国内	2008/11/28	出願済	タンパク質アレイを用 いた検出および解析方 法	広田 潔憲、巖倉 正 寛、藤井 英彦、濱崎 勇二、阿久根 智、檜 山 哲夫、今井 克行
023	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2009-290887	国内	2009/12/22	出願済	固体化タンパク質	巖倉 正寛、広田 潔 憲
024	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2009-291152	国内	2009/12/22	出願済	固定化タンパク質の製 造方法	巖倉 正寛、広田 潔 憲
025	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2009-291032	国内	2009/12/22	出願済	固定化タンパク質作製 用活性化担体	巖倉 正寛、広田 潔 憲
026	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2009-129895	国内	2009/5/29	出願済	シアノシステインを介 した切断の自動反応装 置	巖倉 正寛
027	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2009-104625	国内	2009/04/23	出願済	液体クロマトグラフィ ーを用いたタンパク質 分離精製装置	巖倉 正寛 皿良 剛
028	A G C エ スアイテ ック	特願 2009-147990	国内	2009/6/22	出願済	新規なプロテインA固 定化担体の製造方法	野村 育代、宮原 浩 嘉、井上 真樹
029	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2010-015416	国内	2010/01/27	出願済 (優先 権)	液体クロマトグラフィ ーを用いたタンパク質 分離精製装置	巖倉 正寛 皿良 剛
030	独立行政 法人産業 技術総合 研究所	特願 2010-080203	国内	2010/3/31	出願済	液体クロマトグラフィ ー装置	巖倉 正寛
031	独立行政 法人産業 技術総合 研究所 株式会社 京都モノ テック	特願 2010-101201	国内	2010/04/26	出願済	溶液中のイムノグロブ リン量の測定方法	巖倉 正寛 水口博義 大崎 隆
032	独立行政 法人産業 技術総合 研究所 株式会社 京都モノ テック	特願 2010-150314	国内	2010/6/30	出願済	固定化タンパク質およ び固定化タンパク質作 製用活性化担体	巖倉 正寛 水口博義 大崎 隆

実用新案

研究開発項目②「高効率な抗体分離精製技術」

番号	出願人	出願番号		出願日	状態	名称	発明人
	独立行政 法人産業 技術総合 研究所 株式会社 京都モノ テック	(国内) 実願 2008-00817 9	(国際) 未	2008/11/ 21	登録	抗体精製用チップ	水口 博義、巖倉 正 寛、広田 潔憲

[論文・文献発表]

研究開発項目②「高効率な抗体分離精製技術」

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
001	巖倉正寛、曾田裕行、広田潔憲、本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	【依頼総説】バイオロジカルズ製造の最適化を目指して：テラーメイド精製技術プラットフォーム	ケミカルエンジニアリング	無	2006
002	Shiroishi M, Kuroki K, Ose T, Rasubala L, Shiratori I, Arase H, Tsumoto K, Kumagai I, Kohda D, Maenaka K	東北大学	Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer	<i>J Biol Chem</i> , 281(15), 10439-10447	有	2006
003	Asano R, Sone Y, Makabe K, Tsumoto K, Hayashi H, Katayose Y, Unno M, Kudo T, Kumagai I	東北大学	Humanization of the bispecific epidermal growth factor receptor x CD3 diabody and its efficacy as a potential clinical reagent.	<i>Clin Cancer Res</i> 12(13), 4036-4042	有	2006
004	Shiroishi M, Kuroki K, Rasubala L, Tsumoto K, Kumagai I, Kurimoto E, Kato K, Kohda D, Maenaka K	東北大学	Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d)	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 103(44), 16412-16417	有	2006
005	熊谷 泉, 林 洋毅, 浅野 竜太郎	東北大学	抗 EGF レセプター・抗 CD3 二重特異性抗体の抗腫瘍作用	臨床免疫	無	2006
006	大政健史	大阪大学	「工業動物細胞」のゲノム解析 10g/l へ向けたチャレンジ	化学と生物 vol. 45, No. 1, pp. 9-11	無	2007
007	大政健史、奥村一夫	大阪大学 / 東洋紡績	「抗体医薬の生産技術 -実プロセスの紹介と今後の展望-」	「抗体医薬の最前線」シーエムシー出版 (分担執筆)	無	2007
008	Watanabe H, Tsumoto K, Taguchi S, Yamashita K, Doi Y, Nishimiya Y, Kondo H, Umetsu M, Kumagai I	東北大学	A human antibody fragment with high affinity for the surface of biodegradable plastic	<i>Bioconjugate Chem</i> 18(3), 645-651	有	2007
009	Shiroishi M, Tsumoto K, Tanaka Y, Yokota A, Nakanishi T, Kondo H, Kumagai I	東北大学	Structural consequences of mutations in interfacial Tyr residues of a protein antigen-antibody complex. The case of HyHEL-10-HEL	<i>J Biol Chem</i> 282(9), 6783-6791	有	2007
010	Asano R, Watanabe Y, Kawaguchi H, Fukazawa H., Nakanishi T, Umetsu M, Hayashi H, Katayose Y,	東北大学	Highly effective recombinant format of a humanized IgG-like bispecific antibody for cancer immunotherapy with	<i>J Biol Chem</i> 282(38), 27659-27665	有	2007

	Unno M, Kudo T, Kumagai I		retargeting of lymphocytes to tumor cells.			
011	中西 猛, 熊谷 泉	東北大学	抗体ライブラリー技術の現状と今後の展望	細胞工学	無	2007
012	熊谷 泉, 浅野竜太郎, 中西 猛	東北大学	抗体ドメインの積み木細工による高機能化と医用への展開	抗体医薬の最前線	無	2007
013	<u>Yamamoto S, Nakamura M, Tarmann C, Jungbauer A.</u>	山口大学	Retention studies of DNA on anion-exchange monolith chromatography:	<i>J. Chromatography A</i> , 9;1144(1):155-60	有	2007
014	Wen-Yih Chen, Ming-Shen Lin, Po-Hsun Lin, Pei-Shun Tasi, Yung Chang and Shuichi Yamamoto	山口大学	Studies of the interaction mechanism between single strand and double-strand DNA with hydroxyapatite by microcalorimetry and isotherm measurements	<i>Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects</i> , Volume 295, Issues 1-3, Pages 274-283	有	2007
015	W-Yih Chen, Z-C.Liu, L. P. Hsun, C-I. Fang, Shuichi Yamamoto	山口大学	The hydrophobic interactions of the ion-exchanger resin ligands with proteins at high salt concentrations by adsorption isotherms and isothermal titration calorimetry"	<i>Separation and Purification Technology</i> , Volume 54, , Pages 212-219	有	2007
016	Shuichi Yamamoto, Sachie Fujii, Noriko Yoshimoto and Parvin Akbarzadehlaleh	山口大学	Effect of Protein Conformational Changes on Separation Performance in Chromatography: Unfolded and PEGylated proteins	<i>Journal of Biotechnology</i> vol.132 ,pp .196-201	有	2007
017	Yamamoto, S. , Hakoda, M. , Oda, T. , Hosono, M.	山口大学	Rational method for designing efficient separations by chromatography on polystyrene-divinylbenzene resins eluted with aqueous ethanol	<i>Journal of Chromatography A</i> , 1162 , pp. 50-55	有	2007
018	Ishihara, T. , Kadoya, T. , Yamamoto, S	山口大学	Application of a chromatography model with linear gradient elution experimental data to the rapid scale-up in ion-exchange process chromatography of proteins	<i>Journal of Chromatography A</i> , 1162 , pp. 34-40,	有	2007
019	Arakawa T, Tsumoto K, Kita Y, Chang B and Ejima D	東京大新領域	Biotechnology applications of amino acids in protein	<i>Amino Acids</i> 33, 587-605	有	2007

			purification and formulations			
020	Tsumoto K, Ejima D, Senczuk A.M, Kita Y and Arakawa	東京大新領域	T Effects of salts on protein-surface interactions: applications for column chromatography.	<i>J Pharmaceut. Sci.</i> 96, 1677-1690	有	2007
021	Tsumoto K, Ejima D, Nagase K and Arakawa T .	東京大新領域	Arginine improves protein elution in hydrophobic interaction chromatography. The cases of human interleukin-6 and activin-A	<i>J. Chromatogr . A</i> 1154, 81-86	有	2007
022	Arakawa T, Tsumoto K, Nagase K and Ejima D	東京大新領域	The effects of arginine on protein binding and elution in hydrophobic interaction and ion-exchange chromatography.	<i>Protein Expr. Purif.</i> 54, 110-116	有	2007
023	T, Ejima D, Tsumoto K, Obeyama N, Tanaka Y, Kita Y and Timasheff S.N.	東京大新領域	Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of arginine effects.	<i>Biophys Chem.</i> 127, 1-8	有	2007
024	Ejima D, Tsumoto K, Fukada H, Yumioka R, Nagase K, Arakawa T and Philo J.S.	東京大新領域	Effects of acid exposure on the conformation, stability, and aggregation of monoclonal antibodies.	<i>Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics</i> 66, 954-962	有	2007
025	T. Arakawa, J.S. Philo, D. Ejima and K. Tsumoto	東京大新領域	Aggregation Analysis of Therapeutic Proteins, Part 2. Analytical Ultracentrifugation and Dynamic Light Scattering.	<i>BioProcess International</i> 5(4), 36-47	有	2007
026	T. Arakawa, J.S. Philo, D. Ejima and K. Tsumoto	東京大新領域	Aggregation Analysis of Therapeutic Proteins, Part 3 Principles and Optimization of Field-Flow Fractionation (FFF)	<i>BioProcess International</i> 5(11), 52-70	有	2007
027	S HONDA, T AKIBA, Y S KATO, Y SAWADA, M SEKIJIMA, M ISHIMURA, A OOISHI, H WATANABE, T ODAHARA and K HARATA	独立行政法人産業技術総合研究所	Crystal Structure of a Ten-Amino Acid Protein	<i>JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY</i> 130(46), 15327-15331	有	2008.
028	大政健史	大阪大学	Chinese hamster ovary (CHO)細胞の BAC ライブラリー構築とその活用	日本生物工学会誌 vol.86 No.8 p. 393-395	無	2008
029	Hattori T, Umetsu M, Nakanishi T, Tsumoto K, Ohara S, Abe H, Naito M, Asano R, Adschiri T,	東北大学	Grafting of material-binding function into antibodies Functionalization by peptide grafting	<i>Biochem Biophys Res Commun</i> 365(4),	有	2008

	Kumagai I			751-757		
030	Makabe K, Nakanishi T, Tsumoto K, Tanaka Y, Kondo H, Umetsu M, Sone Y, Asano R, Kumagai I	東北大学	Thermodynamic consequences of mutations in Vernier zone residues of a humanized anti-human epidermal growth factor receptor murine antibody, 528	<i>J Biol Chem</i> 283(2), 1156-1166	有	2008
031	Nakanishi T, Tsumoto K, Yokota A, Kondo H, Kumagai I	東北大学	Critical Contribution of VH-VL Interaction to Reshaping of an Antibody: The case of humanization of anti-lysozyme antibody, HyHEL-10	<i>Protein Sci</i> 17(2), 261-270	有	2008
032	Tsumoto K, Yokota A, Tanaka Y, Ui M, Tsumuraya T, Fujii I, Kumagai I, Nagumo Y, Oguri H, Inoue M, Hiramata M	東北大学	Critical contribution of aromatic rings to specific recognition of polyether rings. The case of ciguatera toxin CTX3C-ABC and its specific antibody 1C49	<i>J Biol Chem</i> 283(18), 12259-12266	有	2008
033	Sogo T, Kawahara M, Tsumoto K, Kumagai I, Ueda H, Nagamune T	東北大学	Selective expansion of genetically modified T cells using an antibody/interleukin-2 receptor chimera	<i>J Immunol Meth</i> 337(1), 16-23	有	2008
034	熊谷 泉, 浅野竜太郎	東北大学	リンパ球とがん細胞を認識するヒト型化二重特異性抗体,	<i>Drug Delivery System</i> 23(5), 518-525	無	2008
035	Asano R, Sone Y, Ikoma K, Hayashi H, Nakanishi T, Umetsu M, Katayose Y, Unno M, Kudo T, Kumagai I	東北大学	Preferential heterodimerization of a bispecific diabody based on a humanized anti-EGFR antibody 528	<i>Protein Eng Des Sel</i> 21(10), 597-603	有	2008
036	Asano R, Kawaguchi H, Watanabe Y, Nakanishi T, Umetsu M, Hayashi H, Katayose Y, Unno M, Kudo T, Kumagai I	東北大学	Diabody-based recombinant formats of humanized IgG-like bispecific antibody with effective retargeting of lymphocytes to tumor cells.	<i>J Immunother</i> 31(8), 752-761	有	2008
037	Umetsu M, Hattori T, Kikuchi S, Muto I, Nakanishi T, Watanabe H, Kumagai I	東北大学	Nanoparticles with affinity for biopolymer - Bioassisted room-temperature selective multistacking of inorganic particles on biopolymer film -	<i>J Mater Res</i> 23(12), 3241-3246	有	2008
038	Watanabe H, Nakanishi T, Umetsu M, Kumagai I	東北大学	Human Anti-gold Antibodies: BIOFUNCTIONALIZATION OF GOLD NANOPARTICLES AND SURFACES WITH ANTI-GOLD ANTIBODIES.	<i>J Biol Chem</i> 283(51), 36031-36038	有	2008
039	村上聖, 山本修一	山口大学	抗体医薬培養精製工程のモデル化と最適化	抗体医薬の最前線(単行本)、シーエムシー出版、第23章(分担執筆)。	無	2008

				pp. 259~271		
040	Noriko Yoshimoto, Y. Nishijima, P. Akbarzadehlaleh, S. Fujii, M. Abe and S. Yamamoto	山口大学	Micro-Plate Based Monolithic Ion-Exchange Chromatography for High Throughput Protein Purification Process Design.	<i>Journal of Chemical Engineering of Japan</i> Vol. 41, pp. 200 -205	有	2008
041	山本修一	山口大学	バイオ医薬品のクロマトグラ フィー分離プロセス	分離技術 Vol. 38, , pp. 194- 200	無	2008
042	Nakakido M, Tanaka Y, Mitsuhoori M, Kudou M, Ejima D, Arakawa T and Tsumoto K.	東京大新領 域	Structure-based analysis reveals hydration changes induced by arginine hydrochloride.	<i>Biophys. Chem.</i> 137, 105-109	有	2008
043	Abe R, Kudou M, Tanaka Y, Arakawa T and Tsumoto K.	東京大新領 域	Immobilized metal affinity chromatography in the presence of arginine.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 381, 306-310	有	2009
044	Y SAWADA, S HONDA.	独立行政法 人産業技術 総合研究所	ProSeg: a database of local structures of protein segments	<i>JOURNAL OF COMPUTER-A IDED MOLECULAR DESIGN</i> 23 (3), 163-169	有	2009
045	Watanabe H, Matsumaru H, Ooishi A, Feng Y, Odahara T, Suto K, Honda S.	独立行政法 人産業技術 総合研究所	Optimizing pH-response of affinity between Protein G and IgG Fc: How electrostatic modulations affect protein-protein interactions	<i>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY</i> 2 84 (18), 12373-1238 3	有	2009
046	本田真也	独立行政法 人産業技術 総合研究所	タンパク質のミニマルデザイ ン：スーパーシニョリンの構 造とゆらぎ	生物物理 49、126-129	有	2009
047	大政健史 他	大阪大学	タンパク質医薬品生産宿主と しての Chinese hamster ovary (CHO)細胞ゲノム解析 —特に 染色体の変化について—	ソフトウェ アバイオロ ジー第8巻、 pp. 11-13	無	2009
048	Omasa T, Cao Y, Park JY, Takagi Y, Kimura S, Yano H, Honda K, Asakawa S, Shimizu N and Ohtake H	大阪大学	Bacterial artificial chromosome library for genome-wide analysis of Chinese hamster ovary cells	<i>Biotech Bioeng</i> Volume 104, No. 5, pp. 986-994	有	2009
049	熊谷 泉, 浅野竜太郎	東北大学	次世代抗体医薬の分子設計	ケミカルエ ンジニヤリ ング 54(1), 65-71	無	2009
050	浅野竜太郎, 熊谷 泉	東北大学	がん免疫療法への応用研究を目 指した抗体-diabody-	バイオ医薬 の開発技術 とシーズ	無	2009

				151-161		
051	Ose T, Kuroki K, Matsushima M, Maenaka K, Kumagai I	東北大学	Importance of the hydrogen bonding network including Asp52 for catalysis, as revealed by Asn59 mutant hen egg-white lysozymes	<i>J Biochem</i> 146(5), 651-657	有	2009
052	Shuichi Yamamoto, Noriko Yoshimoto, Yukiko Nishizumi	山口大学	Theoretical background of monolithic short layer ion-exchange chromatography for separation of charged large biomolecules or bioparticles	<i>Journal of Chromatography A</i> , Vol. 1216, pp. 2612-2615	有	2009
053	Shuichi Yamamoto, Noriko Yoshimoto, Christina Tarmann, Alois Jungbauer	山口大学	Binding site and elution behavior of DNA and other large biomolecules in monolithic anion-exchange chromatography	<i>Journal of Chromatography A</i> , Vol. 1216, pp. 2616-2620	有	2009
054	Nakakido M, Kudou M, Arakawa T, and Tsumoto K.	東京大新領域	To be excluded or to bind, that is the question: Arginine effects on proteins	<i>Curr. Pharm. Biotechnol.</i> 10, 415-420	有	2009
055	Futatsumori-Sugai M, Abe R, Watanabe M, Kudou M, Yamamoto T, Ejima D, Arakawa T, and Tsumoto K.	東京大新領域	Utilization of an arginine-elution method for FLAG-tag chromatography	<i>Protein Expr Purif.</i> 67, 148-155	有	2009
056	曾田裕行	独立行政法人産業技術総合研究所	蛋白質医薬品製造技術の動向-抗体医薬を中心に-(第1編 第2章)	「抗体医薬のための細胞構築と培養技術」シーエムシー出版 (分担執筆)	無	2010
057	広田潔憲、曾田裕行、巖倉正寛	独立行政法人産業技術総合研究所	抗体医薬品におけるテーラードメイド精製技術を目指した新規アフィニティ精製リガンド開発 (第6編 第6章)	「抗体医薬のための細胞構築と培養技術」シーエムシー出版 (分担執筆)	無	2010
058	渡邊 秀樹、本田 真也	独立行政法人産業技術総合研究所	分子デザインによる抗体精製用蛋白質プロテインGの安定性およびpH応答性の論理的改変	<i>BIO INDUSTRY</i> 27 (12), 72-78	無	2010
059	巖倉正寛、広田潔憲、本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	バイオ医薬の製造技術について考える-連載の開始にあたり-	<i>PHARM TECH JAPAN</i> 26(12), 29-33	無	2010
060	大政健史 他	大阪大学/徳島大学	「細胞培養の始まりと意義」 「新しいDNAチップ“3D-Gene”を用いた解析法とその応用」 「細胞培養におけるカイネティ	「抗体医薬のための細胞構築と培養技術」シー	無	2010

			ックス—培養方法および解析方法を中心に—」	エムシー出版(分担執筆、監修)		
061	Wook-Dong Kim、大政健史 他	大阪大学	「バイオシミラー生産における課題および今後の展開—主として細胞株構築、培養プロセス構築の観点から—」	「バイオシミラー医薬品の開発状況および今後の展開」情報機構(分担執筆)	無	2010
062	Wook-Dong Kim、大政健史 他	大阪大学	動物細胞による医薬品タンパク質生産	「酵素利用技術体系」エヌ・ティー・エス(分担執筆)	無	2010
063	大政健史	大阪大学/ 徳島大学	タンパク質の品質管理機構を応用した生産性向上手法	日本生物工学会誌 Vol. 88, No. 12, pp. 649-651	無	2010
064	大政健史	大阪大学/ 徳島大学	動物細胞を用いたタンパク質生産—そのポテンシャルは如何ほどか—	酵素工学ニユース Vol. 64 pp. 26-30	無	2010
065	大政健史 他	大阪大学/ 徳島大学	生産細胞の品質保証について考える—はたしてゲノム解析はパンドラの匣か—	<i>PHARM TECH JAPAN</i> vol. 26, No. 13, pp. 95-102	無	2010
066	大政健史	大阪大学	動物細胞による医薬品タンパク質生産の現状	化学と生物 vol. 48, No. 4, pp. 255-262	無	2010
067	Omasa T, Kim W.D. Onitsuka M	大阪大学/ 徳島大学	Cell engineering and cultivation of Chinese hamster ovary (CHO) cells	<i>Current Pharmaceutical Biotechnology</i> vol. 11, pp. 233-240	有	2010
068	Park JY, Yamatani M, Wadano S, Takagi Y, Honda K, Omasa T and Ohtake H	大阪大学	Effects of palindrome structure on <i>Dhfr</i> amplification in Chinese hamster ovary cells	<i>Process Biochem</i> Vol. 45, pp. 1845-1851	有	2010
069	Park JY, Takagi Y, Yamatani M, Honda K, Asakawa S, Shimizu N, Omasa T, and Ohtake H	大阪大学	Identification and analysis of specific chromosomal region adjacent to exogenous <i>Dhfr</i> -amplified region in Chinese hamster ovary cell genome	<i>J Biosci Bioeng</i> Vol. 109, Number 5, pp. 504-511	有	2010
070	Kim WD, Tokunaga M, Ozaki H, Ishibashi T, Honda K, Kajiura H, Fujiyama K,	大阪大学/ 東北大学/ 東洋紡バイ	Glycosylation pattern of humanized IgG-like bispecific antibody produced by	<i>Applied Microbiol Biotechnol</i>	有	2010

	Ryutaro Asano R, Kumagai I, Omasa T, and Ohtake H	オロジックス	recombinant CHO cells	Volume 85, pp. 535-542		
071	Omasa T, Furuichi K, Iemura T, Katakura Y, Kishimoto M, and Suga K	大阪大学	Enhanced antibody production following intermediate addition based on flux analysis in mammalian cell continuous culture	<i>Bioprocess Biosys Eng</i> Volume 33, No. 1 pp. 117-125	有	2010
072	Hattori T, Umetsu M, Nakanishi T, Togashi T, Yokoo N, Abe H, Ohara S, Adschiri T, Kumagai I	東北大学	High-affinity anti-inorganic-material antibody generation by integrating graft and evolution technologies: The potential of antibodies as biointerface molecules	<i>J Biol Chem</i> 285(10), 7784-7793	有	2010
073	Yokota A, Tsumoto K, Shiroishi M, Nakanishi T, Kondo H, Kumagai I	東北大学	Contribution of asparagine residues to the stabilization of a proteinaceous antigen-antibody complex: HyHEL-10-HE	<i>J Biol Chem</i> 285(10), 7686-7696	有	2010
074	Asano R, Ikoma K, Kawaguchi H, Ishiyama Y, Nakanishi T, Umetsu M, Hayashi H, Katayose Y, Unno M, Kudo T, Kumagai I	東北大学	Application of the Fc fusion format to generate tag-free bi-specific diabodies	<i>FEBS J</i> 277(1), 477-487	有	2010
075	Yokoo N, Togashi T, Umetsu M, Tsumoto K, Hattori T, Nakanishi T, Ohara S, Takami S, Naka T, Abe H, Kumagai I, Adschiri T	東北大学	Direct and Selective Immobilization of Proteins by Means of an Inorganic Material-Binding Peptide: Discussion on Functionalization in the Elongation to Material-Binding Peptide	<i>J Phys Chem B</i> 114(1), 480-486	有	2010
076	Badran A, Asano R, Nakayama M, Watanabe Y, Nakanishi T, Umetsu M, Hayashi H, Katayose Y, Unno M, Kumagai I	東北大学	Target cell-restricted apoptosis induction by 528scFv-TRAIL fusion protein specific for human EGFR and expressed in <i>Escherichia coli</i>	<i>Int J Oncol</i> 36(5), 1229-1234	有	2010
077	Kumagai I, Asano R, Nakanishi T, Hashikami K, Tanaka S, Badran A, Sanada H, Umetsu M	東北大学	Integration of PEGylation and refolding for renaturation of recombinant proteins from insoluble aggregates produced in	<i>J Biosci Bioeng.</i> 109(5), 447-452	有	2010

			bacteria–Application to a single-chain Fv fragment			
078	Umetsu M, Nakanishi T, Asano R, Hattori T, Kumagai I	東北大学	Protein–protein interactions and selection: generation of molecule–binding proteins on the basis of tertiary structural information	<i>FEBS J</i> 277(9), 2006–2014	有	2010
079	Ibii T, Kaieda M, Hatakeyama S, Shiotsuka H, Watanabe H, Umetsu M, Kumagai I, Imamura T	東北大学	Direct immobilization of gold–binding antibody fragments for immunosensor applications	<i>Anal Chem</i> 82(10), 4229–4235	有	2010
080	Asano R, Ikoma K, Sone Y, Kawaguchi H, Taki S, Hayashi H, Nakanishi T, Umetsu M, Katayose Y, Unno M, Kudo T, Kumagai I	東北大学	Highly enhanced cytotoxicity of a dimeric bispecific diabody, the hEx3 tetrabody	<i>J Biol Chem</i> 285(27), 20844–20849	有	2010
081	Kubota T, Matsushita T, Niwa R, Kumagai I, Nakamura K	東北大学	Novel anti–Tn single-chain Fv–Fc fusion proteins derived from immunized phage library and antibody Fc domain	<i>Anticancer Res</i> 30(9), 3397–3405	有	2010
082	Sasajima Y, Iwasaki R, Tsumoto K, Kumagai I, Ihara M, Ueda H	東北大学	Expression of antibody variable region–human alkaline phosphatase fusion proteins in mammalian cells	<i>J Immunol Methods</i> 361(1–2), 57–63	有	2010
083	Uchida H, Chan J, Goins WF, Grandi P, Kumagai I, Cohen JB, Glorioso JC	東北大学	A double mutation in glycoprotein gB compensates for ineffective gD–dependent initiation of herpes simplex virus type 1 infection.	<i>J Virol</i> 84(23), 12200–12209	有	2010
084	M. Abe Akbarzadehlaleh, M. Hamachi, .Yoshimoto, Yamamoto	山口大学	Interaction mechanism of mono–PEGylated proteins in electrostatic interaction chromatography	<i>Bio technology Journal</i> Vol.5, pp. 477 –483	有	2010
085	Kouhei Tsumoto, Daisuke Ejima, Tsutomu Arakawa	東京大新領域	Review:Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs	<i>BBA</i> , 1764, 1677–1687	有	2006
086	Motonori Kudou; Daisuke Ejima; Haruna Sato; Ryosuke Yumioka; Tsutomu Arakawa; and Kouhei	東京大新領域	Refolding single-chain antibody (scFv) using lauroyl–L–glutamate as a solubilization detergent and	<i>Protein Exp. Purif.</i> in press	有	2010

	Tsumoto.		arginine as a refolding additive.			
087	Kudou M, Yumioka R, Ejima D, Arakawa T, Tsumoto K.	東京大新領域	A novel protein refolding system using lauroyl-l-glutamate as a solubilizing detergent and arginine as a folding assisting agent.	<i>Protein Expr Purif.</i> in press,	有	2010
088	Rahul S. Rajan, Kouhei Tsumoto, Masao Tokunaga, Hiroko Tokunaga, Yoshiko Kita and Tsutomu Arakawa	東京大新領域	Chemical and Pharmacological Chaperones: Application for Recombinant Protein Production and Protein Folding Diseases.	<i>Current Medicinal Chemistry</i> in press	有	2010
089	Tsumoto K, Arakawa T, Chen L.	東京大新領域	Step-Wise Refolding of Recombinant Proteins.	<i>Curr Pharm Biotechnol.</i> 11 (3) , 285-288	有	2010
090	Tsumoto K, Abe R, Ejima D, Arakawa T.	東京大新領域	Non-Denaturing Solubilization of Inclusion Bodies.	<i>Curr Pharm Biotechnol.</i> 11 (3) , 309-312	有	2010
091	Ryota Abe, Jose M. M. Caaveiro, Motonori Kudou and Kouhei Tsumoto	東京大新領域	Solubilization of Membrane Proteins with Novel N-Acylamino Acid Detergents.	<i>Mol. Biosyst.</i> 6 , 677-679	有	2010
092	Yumioka R, Tsumoto K, Arakawa T and Ejima D.	東京大新領域	Screening of effective column rinse solvent for Protein-A chromatography.	<i>Protein Exp. Purif.</i> 70 , 218-223	有	2010
093	広田潔憲、巖倉正寛	独立行政法人産業技術総合研究所	タンパク医薬の精製技術について考える -精製プロセスを構成する技術の俯瞰-	<i>PHARM TECH JAPAN</i> 27 (1)、63-75	無	2011
094	本田真也、有坂文雄、江島大輔	独立行政法人産業技術総合研究所	バイオ医薬の品質分析概論前編	<i>PHARM TECH JAPAN</i> 27 (2)、 259-267	無	2011
095	Asano R, Ikoma K, Shimomura I, Taki S, Nakanishi T, Umetsu M, Kumagai I	東北大学	Cytotoxic Enhancement of a Bispecific Diabody by Format Conversion to Tandem Single-chain Variable Fragment (taFv) THE CASE OF THE hEx3 DIABODY	<i>J Biol Chem</i> 286(3), 1812-1818	有	2011
096	本田真也、有坂文雄、江島大輔	独立行政法人産業技術総合研究所	バイオ医薬の品質分析概論後編	<i>PHARM TECH JAPAN</i>	無	印刷中

[学会・研究発表]

研究開発項目②「高効率な抗体分離精製技術」

番号	発表者	所属	発表内容	学会・研究名	発表年
001	巖倉正寛	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】DHFRの完全I残基変異ライブラリーの教えること	日本蛋白質科学会年会	2006
002	奥村一夫	東洋紡バイオロジックス(TBI)	バイオ医薬品製造技術の具体事例	ザルトリウス社主催「ダウンストリームテクノロジーフォーラム in Japan」	2006
003	本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】10アミノ酸の“タンパク質”、シニョリンの構造設計	日本蛋白質科学会年会	2006
004	熊谷 泉	東北大学	抗体工学の最近の進展	第6回日本蛋白質科学会年会	2006
005	浅野竜太郎, 川口博子, 熊谷 泉	東北大学	動物細胞発現系を用いて調製した新規二重特異性抗体の機能評価	第6回日本蛋白質科学会年会	2006
006	生駒桂子, 浅野竜太郎, 熊谷 泉	東北大学	動物細胞を用いたdiabody調製系の構築と新規組換え型二重特異性抗体の開発検討	第3回東北大学バイオサイエンスシンポジウム	2006
007	梅津光央, 熊谷 泉	東北大学	Fabrication of antibody with affinity for inorganic materials by CDR-grafting technique	Antibody Engineering Conference	2006
008	浅野竜太郎, 川口博子, 熊谷 泉	東北大学	Construction and characterization of effective recombinant IgG-like bispecific antibodies for cancer immunotherapy	Antibody Engineering Conference	2006
009	浅野竜太郎, 曾根由希子, 川口博子, 熊谷 泉	東北大学	In vivo efficacy of humanized diabody based on 528 mAb specific for EGFR antibody	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress	2006
010	川口博子, 浅野竜太郎, 熊谷 泉	東北大学	Construction and characterization of novel recombinant bispecific antibodies for cancer Immunotherapy	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress	2006
011	丸 喬光, 中西 猛, 浅野竜太郎, 熊谷 泉	東北大学	Affinity enhancement of the humanized anti-EGFR antibody fragment by phage display system	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress	2006

012	熊谷 泉	東北大学	タンパク質フォールドの積木細工と医薬品への展開	第5回産学連携フォーラム in 仙台	2006
013	大政健史	大阪大学	新機能抗体生産技術へ向けたチャイニーズハムスター卵巣細胞ゲノム解析	大阪大学生命科学・生命工学シンポジウム	2006
014	浅野竜太郎, 曾根由希子, 川口博子, 熊谷 泉	東北大学	抗 EGFR 528mAb を用いたヒト型化 diabody の in vivo 効果	第5回産学連携フォーラム in 仙台	2006
015	生駒桂子, 浅野竜太郎, 熊谷 泉	東北大学	CHO 細胞を用いた diabody 調製系の構築と新規組換え型二重特異性抗体の開発検討	第5回産学連携フォーラム in 仙台	2006
016	中西 猛, 丸 喬光, 浅野竜太郎, 熊谷 泉	東北大学	ファージ提示法を用いたヒト型化抗 EGFR 抗体の親和性向上	第5回産学連携フォーラム in 仙台	2006
017	熊谷 泉	東北大学	抗体のエンジニアリング	第1回生体ナノマシン構造研究会	2006
018	熊谷 泉	東北大学	ファージ抗体を利用した相互作用解析と新機能抗体の創製	大阪大学蛋白質研究所セミナー	2006
019	熊谷 泉	東北大学	抗体分子からバイオインターフェイスへの展開	バイオジャパン 2006	2006
020	浅野竜太郎, 川口博子, 熊谷 泉	東北大学	ヒト型化抗体可変領域に基づく IgG 様二重特異性抗体の構築と機能評価	日本分子生物学会 2006 フォーラム	2006
021	生駒桂子, 浅野竜太郎, 熊谷 泉	東北大学	EGFR と CD3 を標的とした二重特異性 tandem scFv の構築と機能評価	日本分子生物学会 2006 フォーラム	2006
022	生駒桂子, 浅野竜太郎, 熊谷 泉	東北大学	Construction of novel effective recombinant antibodies for cancer immunotherapy	日本免疫学会総会	2006
023	熊谷 泉	東北大学	オープンセミナー基調講演「抗体のエンジニアリング」	第2回 北東北ナノメディカルクラスター研究会 ウィンターキャンプ	2006
024	Shuichi Yamamoto, Sachie Fujii, Noriko Yoshimoto and Parvin Akbarzadehlaleh	山口大学	"Effects of protein conformational changes on separation performance in electrostatic interaction chromatography: PEGylated proteins and unfolded proteins,	6TH European symposium on biochemical engineering science (ESBES6), Salzburg, Austria	2006
025	Shuichi Yamamoto, Sachie Fujii, Noriko Yoshimoto and Parvin Akbarzadehlaleh	山口大学	"Separation of protein variants by electrostatic interaction chromatography -Biorecognition mechanism as a function of pH	International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides. (ISPPP) 2006, Innsbruck, Austria	2006
026	山本修一	山口大学	クロマトグラフィーにおける分子認識	化学工学会バイオ部会生物分離専門分科会セミナー 「分子認識と生物分離を考える」	2006

027	Shuichi Yamamoto, T. Ishihara	山口大学	Electrostatic interaction chromatography for separation of very similar proteins - effects of stationary and mobile phase properties	American Institute of Chemical Engineering, Annual meeting, San Francisco	2006
028	小林節夫	東洋紡バイオロジックス(TBI)	GMP 対応施設における抗体医薬製造について	第7回日本蛋白質化学会年会	2007
029	大政健史	大阪大学	チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞によるバイオ医薬品生産 -現状と課題-	第15回動物細胞工学シンポジウム	2007
030	大政健史	大阪大学	「工業動物細胞」によるバイオ医薬品生産 -現状と将来-	第7回日本蛋白質科学会年会	2007
031	徳永美和子、Kim Wookdong、奥村一夫、本田孝祐、大政健史、大竹久夫	大阪大学 / 東洋紡績	シアル酸特異的レクチンを用いた糖鎖末端シアル酸測定法	日本動物細胞工学会 2007 年度大会 (第20回大会)	2007
032	大政健史、大竹久夫	大阪大学	Chinese hamster ovary (CHO) 細胞のゲノム解析と応用	化学工学会第39回秋季大会	2007
033	澤田義人、本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	抗体精製用アフィニティリガンド設計のための代表ドメインデータセットの構築	ライフサイエンス分野融合会議	2007
034	松丸裕之、大石郁子、澤田義人、本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	抗体精製用アフィニティリガンドの合成と安定性の解析	ライフサイエンス分野融合会議	2007
035	大石郁子、澤田義人、本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	A T R / F T I R 法による抗体の凝集過程の解析	ライフサイエンス分野融合会議	2007
036	巖倉正寛	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】蛋白質の産業利用：シーズ探索型アプローチから問題解決型アプローチへの転換	日本蛋白質科学会年会	2007
037	本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】工業生産における薬剤タンパク質の分析技術	日本蛋白質科学会年会	2007
038	巖倉正寛	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】凝集抑制のための工学的デザイン	大阪大学蛋白研セミナー	2007
039	本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】薬剤蛋白質の凝集モニタリング	大阪大学蛋白研セミナー	2007
040	巖倉正寛	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】アフィニティクロマト開発に向けたリガンドタンパク質の再デザイン	第204回液体クロマトグラフィー研究懇談会例会	2007
041	巖倉正寛	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】アフィニティクロマト開発に向けたリガンドタンパク質の再デザイン	化学工学会第39回秋季大会	2007
042	大政健史	大阪大学	CHO (Chinese hamster ovary) 細胞の BAC ライブラリー構築とその活用	日本生物工学会、平成19年度大会	2007

043	Kim Wookdong、徳永美和子、Joon-Young Park、奥村一夫、本田孝祐、大政健史、大竹久夫	大阪大学 / 東洋紡績	Control of the heterogeneity of antibody glycosylation in Chinese hamster ovary cell cultivation : Construction of lectin binding assay for evaluation	Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC) 2007 Seoul	2007
044	熊谷 泉	東北大学	アカデミアからの蛋白質製造の技術移管と効率的プロセス開発	第5回 トランスレーションリサーチ研修会	2007
045	浅野竜太郎, 川口博子, 生駒桂子, 熊谷 泉	東北大学	がん標的治療薬を目指した組換え型 IgG 様二重特異性抗体の構築と機能評価	日本生化学会東北支部第73回例会・シンポジウム	2007
046	田中 翔, 浅野竜太郎, 熊谷 泉	東北大学	Tandem scFv 型二重特異性抗体の大腸菌発現系を用いた調整と機能評価	第7回日本蛋白質科学会年会	2007
047	田中 翔, 生駒桂子, 浅野竜太郎, 熊谷 泉	東北大学	高機能ヒト型化二重特異性抗体の大腸菌発現系を用いた調整と機能評価	第4回東北大学バイオサイエンスシンポジウム	2007
048	石山優奈, 生駒桂子, 浅野竜太郎, 熊谷 泉	東北大学	がん治療薬を目指した組換え型二重特異性抗体の高機能化の検討	第22回生体機能関連化学シンポジウム	2007
049	浅野竜太郎, 熊谷 泉	東北大学	Efficacy of Humanized IgG-like Bispecific Antibody Formats in Cancer Immunotherapy	Antibodies - Europe Engineering the Next Generation of Antibodies	2007
050	田原和浩, 浅野竜太郎, 熊谷 泉, 中西 猛	東北大学	Affinity Maturation of the Humanized Anti-EGFR Antibody Fragment by Phage Display	Antibodies - Europe Engineering the Next Generation of Antibodies	2007
051	浅野竜太郎, 生駒桂子, 熊谷 泉	東北大学	EGFR と CD3 を標的とした高機能な二重特異性抗体の形態	BMB2007	2007
052	石山優奈, 生駒桂子, 浅野竜太郎, 熊谷 泉	東北大学	がん治療を目指した IgG 様二重特異性抗体の高機能化	BMB2007	2007
053	田原和浩, 中西 猛, 浅野竜太郎, 熊谷 泉	東北大学	ファージ提示法を用いた高親和性 EGFR 特異的抗体の選択	BMB2007	2007
054	Shuichi Yamamoto	山口大学	Electrostatic interaction chromatography for separation of proteins and DNAs. -Effects of stationary and mobile phase properties on separation performance-	International symposium Biochromatography & nanobiotechnologies 2007	2007
055	山本修一	山口大学	バイオ医薬品のクロマトグラフィー分離プロセス:プラットフォーム技術とイノベーション	展望講演 化学工学会秋季大会 札幌	2007
056	Shuichi Yamamoto	山口大学	【キーノートレクチャー】 Chromatography for Bio- and Food-Production : Biorecognition and Engineering aspects	The Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference (APBioChEC) 2007, Taipei, Taiwan	2007

057	本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】自律セグメントの最適化による低リスクのタンパク質改変	日本蛋白質科学会 年会	2008
058	松丸裕之、澤田義人、渡邊秀樹、大石郁子、馮延文、須藤恭子、新井宗仁、本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	安定な変異型タンパク質の配列を設計するソフトウェアの開発	日本蛋白質科学会 年会	2008
059	澤田義人、加藤有介、秋葉俊彦、関嶋政和、石村美雪、大石郁子、小田原孝行、原田一明、本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	スーパーシニョリンの結晶構造と構造ダイナミクス	日本蛋白質科学会 年会	2008
060	巖倉正寛	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】バイオ計測における標準化	第28回日本糖質学会 年会	2008
061	本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	スーパーシニョリンの構造ダイナミクス	タンパク質・ゲノム 構造勉強会	2008
062	巖倉正寛、広田潔憲、本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】 IMPROVEMENTS OF DOWNSTREAM PROCESS FOR BIOLOGICALS THROUGH RE-DESIGN OF AFFINITY LIGANDS	The 21st Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology	2008
063	巖倉正寛、広田潔憲、本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】 医薬品抗体精製技術開発：精製技術の高度化による高品質医薬品製造への貢献	日本薬剤学会第24 年回	2008
064	Kim Wookdong、徳永美和子、Joon-Young Park、石橋卓也、本田孝祐、大政健史、大竹久夫	大阪大学/ 東洋紡績	Lectin-binding assayによるシアル酸修飾測定方法の開発	日本農芸化学会 2008年度大会	2008
065	Takeshi Omasa, Yihua Cao, Joon-Young Park, Yasuhiro Takagi, Hidenori Yano, Kohsuke Honda, Shuichi Asakawa, Nobuyoshi Shimizu, and Hisao Ohtake	大阪大学	Analysis of the specific chromosomal region adjacent to the <i>DHFR</i> gene amplified in CHO DR 1000L-4N cell line	Cell Culture Engineering XI, Queensland, Australia	2008
066	Wook-Dong Kim, Miwako Tokunaga, Joon-Young Park, Kohosuke Honda, Takeshi Omasa, and Hisao Ohtake	大阪大学	Lectin-binding assay for evaluation of glycosylation in biopharmaceutical production	Cell Culture Engineering XI, Queensland, Australia	2008
067	大政健史	大阪大学	【招待講演】抗体医薬生産を支える「工業動物細胞」：細胞構築から培養までのエンジニアリング	バイオインダストリー協会 バイオエンジニアリング研究会 RTD	2008
068	大政健史	大阪大学	【招待講演】FISH (fluorescence <i>in situ</i> hybridization)法のバイオ医薬品生産への応用	第15回 動物細胞工学シンポジウム	2008
069	徳永美和子、Kim Wookdong、石橋卓也、尾崎弘教、本田孝祐、大政健史、大竹久夫	大阪大学/ 東洋紡パイオロジックス	シアル酸特異的レクチンを用いた糖鎖末端シアル酸測定法	日本生物工学会、平成20年度大会	2008

070	大政 健史、大竹 久夫	大阪大学	タンパク質医薬品生産宿主としての CHO 細胞ゲノム解析とその応用 (シンポジウム講演)	化学工学会第 40 回 秋季大会	2008
071	Takeshi Omasa, Yihua Cao, Shuiichi Kimura, S. M. A. Haghparast, Yasuhiro Takagi, Kohsuke Honda and Hisao Ohtake	大阪大学	【招待講演】 Chinese Hamster Ovary Cells BAC library: Application to the characterization of CHO chromosomes	The thirteenth international biotechnology symposium and exhibition (IBS2008) Dalian, China	2008
072	Takeshi Omasa	大阪大学	Chinese hamster ovary (CHO) bacterial artificial chromosome (BAC) library -Its application in CHO genome analysis- (シンポジウム講演)	20 th annual and international meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT '08) Fukuoka, Japan	2008
073	Joon-Young Park, Yasuhiro Takagi, Hidenori Yano, Wook-Dong Kim, Kousuke Honda, Takeshi Omasa and Hisao Ohtake	大阪大学	Analysis of structure of the <i>Dhfr</i> gene-amplified chromosomal region in CHO DR1000L-4N cell line	14th Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC) 2008, Tokyo, Japan	2008
074	Wook-Dong Kim, Miwako Tokunaga, Hiroyuki Ozaki, Joon-Young Park, Takuya Ishibashi, Kohosuke Honda, Takeshi Omasa, and Hisao Ohtake	大阪大学/ 東洋紡バイオロジックス	The glycosylation pattern of a humanized single-chain diabody produced by recombinant CHO cells	14th Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC) 2008, Tokyo, Japan	2008
075	熊谷 泉	東北大学	【招待講演】次世代抗体医薬の分子設計	化学工学会 第 40 回秋季大会	2008
076	熊谷 泉	東北大学	【招待講演】次世代抗体創薬のバイオ工学を目指して	ゲノム創薬フォーラム第 11 回シンポジウム	2008
077	Mitsuyo Abe, Parvin Akbarzadehlaleh, Yuuki Sakaguchi, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto	山口大学	Effects of mobile phase modulators on retention and separation of proteins in electrostatic interaction chromatography	7th European Symposium on Chemical Engineering Science (ESBES7), Faro, Portugal	2008
078	Mitsuyo Abe, Parvin Akbarzadehlaleh, Yukiko Nishizumi, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto	山口大学	Binding and retention mechanism of PEGylated and non-PEGylated proteins in electrostatic interaction chromatography	International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides (ISPPP 2008), Baden-Baden, Germany	2008

079	Shuichi Yamamoto, Shintaro Higuma, Yuuki Sakaguchi, Tomohiko Yoshitake, Noriko Yoshimoto	山口大学	Binding mechanism of proteins and DNAs in electrostatic interaction chromatography -Ion exchange chromatography and hydroxyapatite chromatography-	American Institute of Chemical Engineering Annual Meeting, Philadelphia,	2008
080	Shuichi Yamamoto	山口大学	<Invited lecture > Do chromatography models help you understand, design, operate and validate your purification process?	<Invited lecture> The 21st Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT 2008), Fukuoka	2008
081	水口博義	京都モノテック	「超高速分析用一体型シリカカラムの開発と抗体精製への応用」	BioJapan 2008 「ビジネスパートナーリングプレゼンテーション」(横浜 パシフィコ横浜)	2008
082	大崎 隆、水口博義	京都モノテック	Preparation of monolithic silica columns for purification of various antibodies (postar)	HPLCKyoto2008, Kyoto, Japan	2008
083	Hidehiiko Fujii	島津製作所	Analysis of Protein Spot on a Thin Gel	International Mini-Symposium Monolith chromatography in biopharmaceutical purification process, Kyoto, Japan	2008
084	Nakakido Makoto, Tanaka Yoshikazu, Mitsuori Mariko, Kudou Motonori, Ejima Daisuke, Kita Yoshiko, Arakawa Tsutomu, Tsumoto Kouhei	島津製作所	Structural-based analyses reveals hydration changes induced by arginine hydrochloride.	BMB2008、神戸	2008
085	安部良太・工藤基徳・津本浩平	島津製作所	アルギニン存在下での金属アフィニティークロマトグラフィー	第8回日本蛋白質科学会年会、船堀	2008
086	巖倉正寛	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】高効率な抗体分離精製技術の開発	バイオエンジニアリング研究会講演会	2009
087	松丸裕之、澤田義人、渡邊秀樹、大石郁子、馮延文、須藤恭子、新井宗仁、本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	安定な変異型タンパク質の配列を設計するソフトウェアの開発	産業用酵素シンポジウム	2009
088	本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】短鎖ペプチドの foldability と evolvability	タンパク質の進化・進化学に関するシンポジウム	2009

089	本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	安定な変異型タンパク質の設計技術および抗体結合性タンパク質プロテインGへの応用	第8回 国際医薬品原料・中間体展	2009
090	本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】治療用抗体の効率的精製を目的としたFc結合蛋白質の改良	第9回日本蛋白質科学会年会	2009
091	渡邊秀樹、松丸裕之、大石郁子、馮延文、小田原孝行、須藤恭子、本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	結合界面への静電反発導入によるpH感受性リガンドの合理設計	第9回日本蛋白質科学会年会	2009
092	本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	タンパク質分子間相互作用のpH応答性の改善	2009年度「タンパク質・ゲノム構造」勉強会	2009
093	巖倉正寛	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】アフィニティ・リガンド開発の現状：クロマト状況を反映したリガンド・アレイとその検出装置開発	第17回「バイオロジカルズ(タンパク医薬)製造技術研究会」	2009
094	本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】タンパク質のミニマムデザイン	第2回国際高等研究所フェロー研究会	2009
095	大政 健史	大阪大学	蛋白質医薬品生産への応用を目指したCHO細胞のゲノム解析(シンポジウム講演)	日本農芸化学会 2009年度大会	2009
096	尾崎弘教、Kim Wookdong、徳永美和子、朴 俊映、石橋卓也、本田孝祐、大政健史、大竹久夫	大阪大学/東洋紡バイオロジックス	遺伝子組換え CHO 細胞で生産されたヒト型 single-chain diabody-Fc (scDb-Fc) の糖鎖構造解析	日本農芸化学会 2009年度大会	2009
097	Kim Wookdong、尾崎弘教、徳永美和子、川口央、田丸敬次郎、本田孝祐、大政健史、大竹久夫	大阪大学	Chinese hamster ovary 細胞を用いて生産された single chain diabody-Fc の糖鎖構造解析	日本動物細胞工学会 2009年度大会 (第22回大会)	2009
098	尾崎 弘教、金 昱東、徳永美和子、石橋 卓也、本田孝祐、大政 健史、大竹 久夫	大阪大学/東洋紡バイオロジックス	Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いたヒト型化 single-chain diabody-Fc の生産と糖鎖構造解析	日本生物工学会 平成 21 年度大会	2009
099	Wook-Dong Kim, Miwako Tokunaga, Hiroyuki Ozaki, Takuya Ishibashi, Kohsuke Honda, Takeshi Omasa, and Hisao Ohtake	大阪大学/東洋紡バイオロジックス	Evaluation for the heterogeneity of glycosylation in single-chain diabody-Fc fusion protein produced by CHO cell line	21th Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT2009), Dublin, Ireland	2009
100	Takeshi Omasa	大阪大学	Production of novel therapeutic antibody in Chinese hamster ovary cells	International Symposium on Bioprocess and Biosystems Engineering 2009 (ISBBE2009) Shanghai, China	2009
101	Takeshi Omasa, Miyuki Yamatani, Shuiichi Kimura, Yihua Cao, Joon Young Park, Kohsuke Honda, and Hisao Ohtake	大阪大学	【Key note 講演】 Bacterial artificial chromosome library for genome-wide analysis of Chinese hamster ovary cells	9th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 Kobe, Japan	2009

102	Wook-Dong Kim, Miwako Tokunaga, Hiroyuki Ozaki, Kohsuke Honda, Takeshi Omasa, and Hisao Ohtake	大阪大学	N-Glycan structure of humanized IgG-like bispecific antibody produced by recombinant Chinese hamster ovary cells	9th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 Kobe, Japan	2009
103	Takeshi Omasa, Wook-Dong Kim, Hiroyuki Ozaki, and Hisao Ohtake	大阪大学	The glycosylation pattern of humanized IgG-like antibody produced by suspension culture of recombinant CHO cells	15th Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC) 2009, Xiamen, China,	2009
104	Asano R, Kumagai I	東北大学	【招待講演】 Highly effective recombinant formats of humanized bispecific antibody for cancer immunotherapy	HOKKAIDO UNIVERSITY MAHIDOL UNIVERSITY Joint Symposium	2009
105	熊谷 泉	東北大学	【招待講演】 フォールドに基づくタンパク質工学 一次世代抗体医薬への展開	第8回医薬・バイオセミナー	2009
106	熊谷 泉	東北大学	【招待講演】 タンパク質フォールドの組換えと次世代抗体医薬	NMR構造生物学研究会第38回ワークショップ	2009
107	Shuichi Yamamoto, Mareto Hosono, Noriko Yoshimoto	山口大学	Process design of stepwise elution chromatography on the basis of iso-resolution curve	PREP 2009: 22nd International Symposium, Exhibit and Workshops on Preparative/Process Chromatography, Philadelphia	2009
108	S. Yamamoto, S. Higuma, N. Yoshimoto,	山口大学	<Invited lecture > Analysis of retention mechanism of proteins and DNAs in hydroxyapatite chromatography	<Invited lecture > 5th Conference on Hydroxyapatite and Related products, Rottach-Egern, Germany	2009
109	Noriko Yoshimoto, Shintaro Higuma, Yukiko Nisizumi, Hirotaka Higuchi, and Shuichi Yamamoto	山口大学	Characterization of the retention properties of proteins and DNAs in hydroxyapatite chromatography	Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC '09), Kobe, Japan	2009
110	水口博義	京都モノテック	Monolith for purification processes of biopharmaceuticals	Biochemical Engineering Conference (APBioChEC) 2009, Kobe, Japan	2009

111	Hidehiiko Fujii	島津製作所	High-throughput ligand screening by spotting technology with monolith	9th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 2009 (APBioChEC09) (口頭発表)	2009
112	安部良太・工藤基徳・津本浩平	島津製作所	Arg存在下の金属キレートクロマトグラフィーとその応用	日本化学会第90春季年会、日本大学船橋キャンパス	2009
113	巖倉正寛	独立行政法人産業技術総合研究所	Development of a "chromatography-array" system for high throughput screening and optimization of affinity ligands	PEPTALK2010	2010
114	巖倉正寛、広田潔憲	独立行政法人産業技術総合研究所	In situ observation of ligand-array interacting with IgG at chromatographic conditions	PEPTALK2010	2010
115	広田潔憲、巖倉正寛、大崎 隆、水口博義	独立行政法人産業技術総合研究所	Monolithic silica spin columns for affinity purification of antibodies	PEPTALK2010	2010
116	巖倉正寛、大崎 隆、水口博義、広田潔憲	独立行政法人産業技術総合研究所	抗体精製用モノリスシリカスピナラム	第9回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会	2010
117	本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】Rational Design of Ligand Protein That Ensures Optimum pH-Response in Affinity Purification of Antibody	2nd Annual International Congress of Antibodies	2010
118	広田潔憲、巖倉正寛	独立行政法人産業技術総合研究所	タンパク質とリガンドの相互作用をハイスループットでその場観察できるタンパク質アレイシステムの開発	第10回日本蛋白質科学会年会	2010
119	広田潔憲、本田真也、巖倉正寛	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】抗体医薬品のためのテーラーメイド精製技術開発	化学工学会 第42回秋季大会	2010
120	本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】抗体医薬の精製工程：抗体結合タンパク質の安定性と親和性の向上	医薬品・医療機器・化粧品セミナー	2010
121	馮 延文、大石 郁子、本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	A systematic approach for analyzing protein formulation stability	第48回日本生物物理学会	2010
122	本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	【招待講演】抗体/バイオ医薬品の精製工程～精製コスト改善にむけたプロテインA代替リガンドの開発～	技術情報協会 セミナー	2010

123	Takeshi Omasa	大阪大学	【招待講演】 Next generation cell engineering for the production of biologics	the 3 rd International Scientific Forum organized by Advanced Medical Research Center Yokohama, Kanagawa, Japan	2010
124	大政健史	大阪大学	【招待講演】 翻訳後修飾と細胞培養プロセス	第18回「バイオロジカルズ(タンパク医薬)製造技術研究会	2010
125	川口央、金 昱東、尾崎弘教、本田孝祐、大政健史、大竹久夫	大阪大学	組換え CHO 細胞を用いて生産された single-chain diabody 抗体の糖鎖構造解析	化学工学会関西支部第8回最先端バイオテクノロジー発表会	2010
126	Haghparsat Seyed Mohammad Ali、曹 溢華、本田 幸祐、大政 健史、大竹 久夫	大阪大学	Clonal variability and chromosome instability in Chinese hamster ovary cell lines	化学工学会第75年会	2010
127	川口 央、尾崎 弘教、キム ウッドン、本田 孝祐、大政健史、大竹 久夫	大阪大学	Chinese hamster ovary 細胞由来 β -galactosyl- α 2,6sialyltransferase 遺伝子のクローニングと発現	日本農芸化学会 2010 年度大会	2010
128	Takeshi Omasa, Joon Young Park, Miyuki Yamatani, Souhei Wadano, Yasuhiro Takagi, Kohsuke Honda, and Hisao Ohtake	大阪大学	The genomic structure of exogenous <i>Dhfr</i> amplicon and its application in CHO gene amplification	Cell Culture Engineering XII, Banff, Alberta, Canada	2010
129	Wook-Dong Kim, Hiroyuki Ozaki, Takeshi Omasa, Hisao Ohtake, and Ishibashi Takuya	大阪大学	Enhancement of sialylation in biopharmaceuticals production by overexpression of CHO beta-Galactoside alpha 2,6-Sialytransferase	Cell Culture Engineering XII, Banff, Alberta, Canada	2010
130	Takeshi Omasa	徳島大学	Chinese hamster ovary cell genome: impact on cell engineering (シンポジウム講演)	23 th Annual and international meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT '10)	2010
131	Masayoshi Onitsuka, Wook-Dong Kim, Hiroyuki Ozaki, Akira Kawaguchi, Kohsuke Honda, Hisao Ohtake and Takeshi Omasa	徳島大学/ 大阪大学	Improvement of glycosylation pattern of humanized IgG-like bispecific antibody produced by recombinant CHO cells	23 th Annual and international meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT '10)	2010
132	大政 健史	徳島大学	プロセスイノベーションを目指した「工業動物細胞」の開発(シンポジウム講演)	化学工学会第42回 秋季大会	2010

133	大政 健史	徳島大学	「工業動物細胞」の開発を目指したセルエンジニアリング（シンポジウム講演）	第3回化学工学3支部合同徳島大会	2010
134	川口 央、キム ウッドン、尾崎 弘教、徳永美和子、本田 孝祐、大政 健史、大竹 久夫	徳島大学 / 大阪大学	CHO beta-galactosyl-alpha2,6sialyltransferase 発現 CHO 細胞を用いた組換え抗体生産	日本生物工学会、平成22年度大会	2010
135	Takeshi Omasa	徳島大学	【招待講演】Physical mapping of CHO cell genome	The 5 th International Conference on Geomics (iCG-V), Shenzhen, China	2010
136	浅野竜太郎、熊谷 泉、	東北大学	【招待講演】ドメイン組換えに基づく次世代治療抗体創製に向けて	第10回日本蛋白質科学会年会	2010
137	熊谷 泉、	東北大学	【招待講演】次世代抗体医薬開発のフロンティア	第313回CBI学会研究講演会	2010
138	Shuichi Yamamoto	山口大学	Optimization of stepwise elution chromatography on the basis of iso-resolution curve concept	ACS 239th National Meeting, San Francisco No. 229	2010
139	Koji Nishimura, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto	山口大学	Design of stepwise elution chromatography on the basis of iso-resolution curve	American Institute of Chemical Engineering Annual Meeting, Salt Lake City	2010
140	渡邊秀樹、松丸裕之、大石 郁子、馮延文、小田原孝行、本田真也	独立行政法人産業技術総合研究所	pH感受性リガンドの合理設計	第10回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会	2011
141	川口 央、鬼塚正義、大政 健史	徳島大学 / 大阪大学	CHO 細胞におけるヒト型シアル酸修飾を目指して（シンポジウム講演）	第24回日本動物細胞工学会シンポジウム	2011
142	大政健史	徳島大学	【招待講演】バイオ医薬品生産における課題—蛋白質医薬品からワクチンまで	化学工学会関東支部 第6回ホットな話題の講習会	2011

【新聞・マスコミ・その他 発表】 研究開発項目②「高効率な抗体分離精製技術」

番号	会社名	内容	掲載物	掲載日
001	独立行政法人産業技術総合研究所・AGC エスアイテック	「抗体医薬を効率抽出／産総研とASC-SI／修飾分子で新技術」の見出しで発表された。	フジサンケイビジネスイ	2007/9/11
002	独立行政法人産業技術総合研究所・AGC エスアイテック	「抗体医薬精製クロマトグラフィー用高結合能力ビーズ／産総研などが開発」の見出しで発表された。	日刊工業新聞	2007/9/11
003	独立行政法人産業技術総合研究所・AGC エスアイテック	「抗体医薬品／たんぱく質効率精製／産総研とASC エスアイテック／専用粒子を開発」	日経産業新聞	2007/9/13

004	大阪大学	「抗体医薬 飛躍への研究課題(下)」の見出しで発表された。	日経産業新聞	2007/11/22
005	独立行政法人産業技術総合研究・(株)京都モノテック	「スピнкаラム型キット／2分で抗体精製」の見出しで報道された。	化学工業日報新聞	2009/1/23
006	独立行政法人産業技術総合研究・(株)京都モノテック	「短時間で抗体精製／スピнкаラム型キット開発」の見出しで報道された。	化学工業日報新聞	2009/1/27
007	独立行政法人産業技術総合研究・(株)島津製作所・(株)京都モノテック	「たんぱく質迅速選定 産総研・島津など 薄膜を活用」の見出しで報道された。	日経産業新聞	2009/10/2
008	独立行政法人産業技術総合研究・(株)島津製作所・(株)京都モノテック	「たん白アレイ解析システム 抗体医薬精製に対応 NEDO など開発」の見出しで報道された。	化学工業日報新聞	2009/10/2
009	(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構、(株)島津製作所、(独)産業技術総合研究所、(株)京都モノテック、(財)バイオインダストリー協会	たん白アレイ解析システム 抗体医薬精製に対応 NEDO など開発 (上のバイオジャパン 2009 の記事)	化学工業日報	2009/10/2
010	(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構、(株)島津製作所、(独)産業技術総合研究所、(株)京都モノテック、(財)バイオインダストリー協会	たんぱく質迅速選定 産総研・島津など 薄膜を活用 (上のバイオジャパン 2009 の記事)	日経産業新聞	2009/10/2
011	独立行政法人産業技術総合研究・(株)京都モノテック	「新機能抗体創製技術開発プロジェクト モノリスシリカスピнкаラム」のタイトルでパネル掲示、試作品展示、試供品配布。	バイオジャパン 2009	2009/10/7～9
012	独立行政法人産業技術総合研究・(株)島津製作所・(株)京都モノテック	「新機能抗体創製技術開発プロジェクト タンパク質アレイ解析システム」のタイトルでパネル掲示	バイオジャパン 2009	2009/10/7～9
013	独立行政法人産業技術総合研究	「タンパク質を安定化するアミノ酸配列設計ソフトウェア」のタイトルで Web マッチングシステムに登録	バイオジャパン 2009	2009/10/7～9

014	独立行政法人産業技術総合研究	「プロテイン G 変異体」のタイトルで Web マッチングシステムに登録	バイオジャパン 2009	2009/10/7~9
015	(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構、(株)島津製作所、(独)産業技術総合研究所、(株)京都モノテック、(財)バイオインダストリー協会	新機能抗体創製技術開発プロジェクト タンパク質アレイ解析システム	バイオジャパン 2009(パシフィコ横浜)の NEDO ブースで展示	2009/10/7 ~ 2009/10/9
016	独立行政法人産業技術総合研究	「分子をデザインしてタンパク質の安定性と親和性を向上 - 産業技術総合研究所」の見出しで報道された。	Bio Impact (Web 版)	2010/3/17
017	独立行政法人産業技術総合研究	「産総研、分子をデザインしてタンパク質を改変し安定性と親和性を向上させることに成功」の見出しで報道された。	日経ネット (Web 版)	2010/3/17
018	独立行政法人産業技術総合研究	「たんぱく質親和性向上／分子デザイン技術活用／産総研抗体医薬のコスト減」の見出しで報道された。	日刊工業新聞	2010/3/18
019	独立行政法人産業技術総合研究	「産総研、分子デザイン技術でたんぱく質の安定性と親和性向上」の見出しで報道された。	日刊工業新聞 (Web 版)	2010/3/18
020	独立行政法人産業技術総合研究	「抗体精製のたんぱく質／分子デザインで改良／産総研」の見出しで報道された。	日経産業新聞	2010/3/18
021	独立行政法人産業技術総合研究	「プロテイン G 改変／産総研が生体分子デザイン技術／抗体薬精製コスト減に道」の見出しで報道された。	化学工業日報新聞	2010/3/18
022	京都モノテック	抗体精製用シリカモノリスピンカラム『Ex-Pure』の製品化		2010/11/5

契約管理番号 06990416-0 06990417-0

2. 分科会における説明資料

次ページより、プロジェクト推進・実施者が、分科会においてプロジェクトを説明する際に使用した資料を示す。

公開

健康安心イノベーションプログラム
「新機能抗体創製技術開発」プロジェクト
(研究開発期間:平成18~22年度(5年間))

プロジェクトの概要説明(公開)

平成23年7月6日(水)



1 / 38

公開

健康安心イノベーションプログラム
「新機能抗体創製技術開発」プロジェクト

(発表者:NEDO)

- I. 事業の位置付け・必要性について
- II. 研究開発マネジメントについて

(発表者:プロジェクトリーダー)

- III. 研究開発成果について
- IV. 実用化の見通しについて

2 / 38

I. 事業の位置づけ・必要性について

1. 事業目的の妥当性 -取り組みの重要性・必要性-

事業の背景と目的

1. 天然に存在するタンパク質のうち、膜タンパク質やその複合体は、創薬等の産業利用上、非常に有用。
2. 抗体は、ポストゲノム研究のツールとして有用であるとともに、それ自体が診断や創薬につながる重要な分子。結合相手の分子が明確であり、生体がもつ反応を利用していることから副作用の懸念が少ない。
3. このため、膜タンパク質やその複合体を認識する抗体は、研究ツールとして有用であるとともに、診断や創薬といった産業利用上も有用。

3 / 38

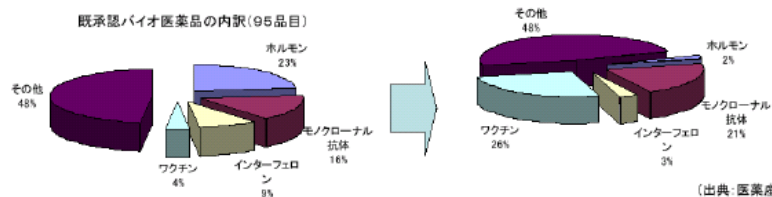
I. 事業の位置づけ・必要性について

1. 事業目的の妥当性 -内外の市場動向等-

バイオ医薬品の開発動向

1. モノクローナル抗体がバイオ医薬品の主流に。
2. 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い。我が国の医薬品産業にとって大きな脅威。

【バイオ医薬品開発の推移(米国:2002年10月現在)】



(出典: 医薬産業政策研究所)

4 / 38

I. 事業の位置づけ・必要性について

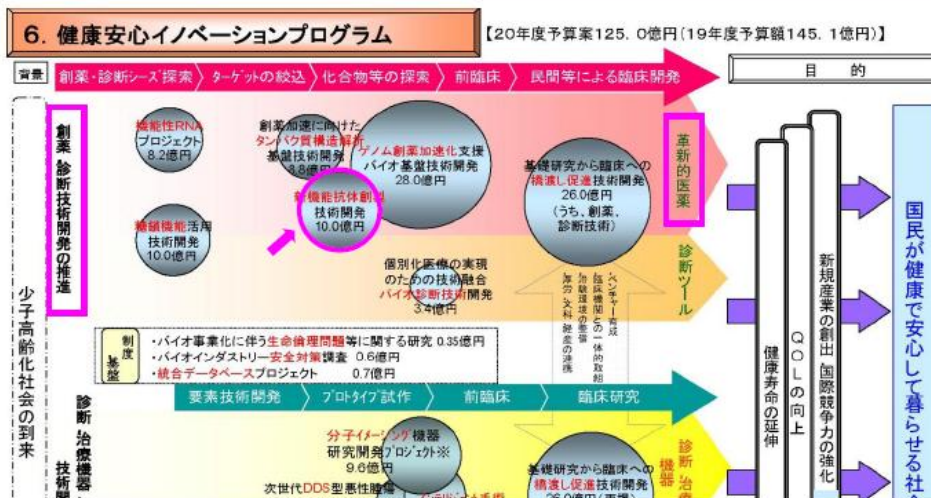
2. NEDO事業としての妥当性

民間のみでは改善が困難	1. リード抗体の創出から工業生産までの幅広い技術を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。
	2. 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。大学病院、専門病院等との連携が不可避。
	3. EU では既に抗体の製造技術の開発等を国が推進。
公共性	4. 開発中の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て優位性を持つ知財となりうる。
費用対効果	5. 創薬研究開発には時間を要するが、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」以来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現。
	6. 本プロジェクトにおいても、すでに多数の治療用候補抗体の作製に成功。今後の新薬誕生への可能性が期待される。
	7. 例えば肝がん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、数百億円の効果も期待できる費用対効果が大変大きい事業。
	8. 抗体医薬の製造コスト減までを視野に入れ、費用対効果を上げている。

I. 事業の位置づけ・必要性について

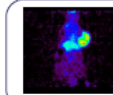
2. NEDO事業としての妥当性 -政策との整合性-

健康安心イノベーションプログラムのもと、「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の1つとしての位置づけ。



プロジェクト前半

- ・基本計画の策定
- ・部分提案を取り込んだ実施体制の構築
 - ・個々の技術を伸ばしつつ、連携の模索
 - ・加速財源の投入
 - ・技術の横展開の可能性検討
 - ・プロジェクト内外の連携



イメージング技術を用いた個体での抗体評価

→厚労省PJとの連携

プロジェクト後半

- ・必要に応じ、体制や開発テーマの柔軟な変更
- ・プロジェクト内での連携強化
- ・プロジェクト外との連携模索
- ・プロジェクト成果の適切な社会還元

【特記事項2】

1. AチームとBチームの連携による生産実証
2. プロジェクトで創製した有望な抗体のプロジェクト外企業への期間中の試用システムの構築

中間評価

(単位:百万円)

18年度	19年度	20年度	21年度	22年度	総額
1,235	1,128	948	854	408	4,573

体制変更

知的財産管理支援技術システムの構築。
(平成19年度より運用開始)

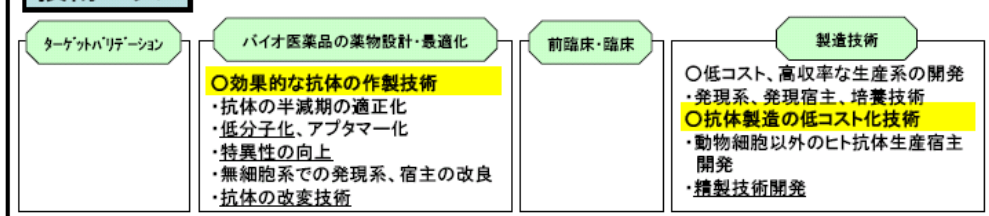
【特記事項1】

1. 最先端研究開発支援プログラム(FIRST)へ一部テーマを切り出し。
2. 「集中と選択」による研究開発体制の大幅な変更。

1. 研究開発計画の妥当性 -目標達成に必要な要素技術-

1. 膜タンパク質抗原の発現が困難なこと等の理由により、**特異性の高い抗体を取得することが困難。** →研究開発項目①
2. 治療薬として大量に必要とされることになる**抗体の製造コストが高い。** →研究開発項目②

技術マップ



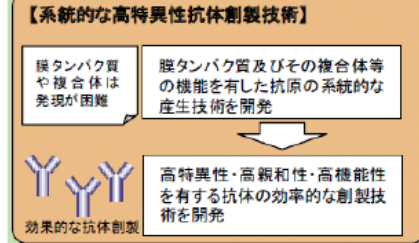
(経済産業省技術マップ2008より抜粋)

技術マップにおいて、本プロジェクトで研究開発目標としている項目が掲げられており、国の施策と合致している。

1. 研究開発計画の妥当性 -要素技術間の関係、順序-

研究開発項目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
- 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



研究開発項目② 高効率な抗体分離精製技術

- 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



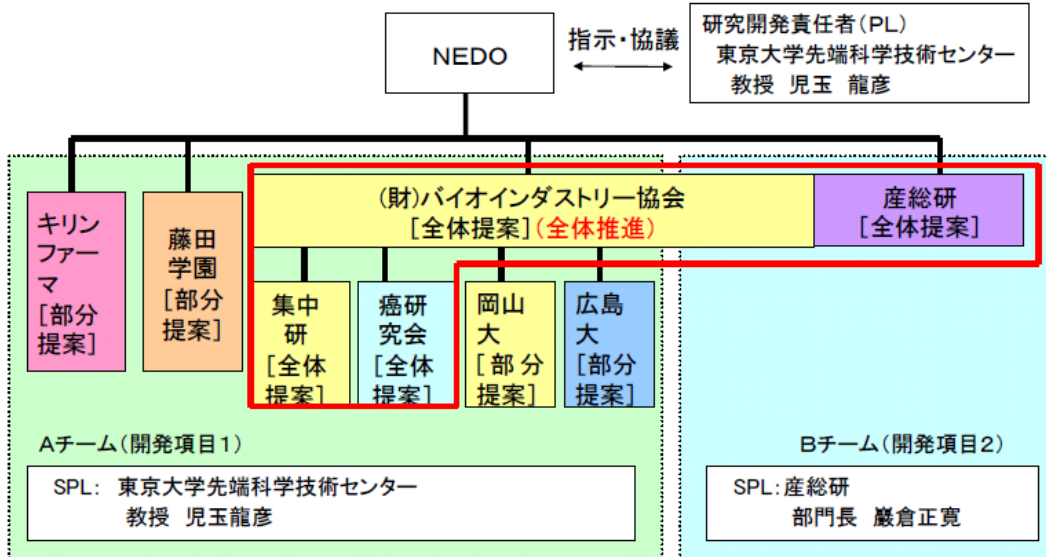
2. 研究開発目標の妥当性

	研究開発項目①(Aチーム)	研究開発項目②(Bチーム)
最終目標 (平成22年度末)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 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。 ・ 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。 	<p>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。</p>
中間目標 (平成20年度末)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 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。 	<p>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。</p>

Ⅱ. 研究開発マネジメントについて

3. 研究開発の実施体制の妥当性

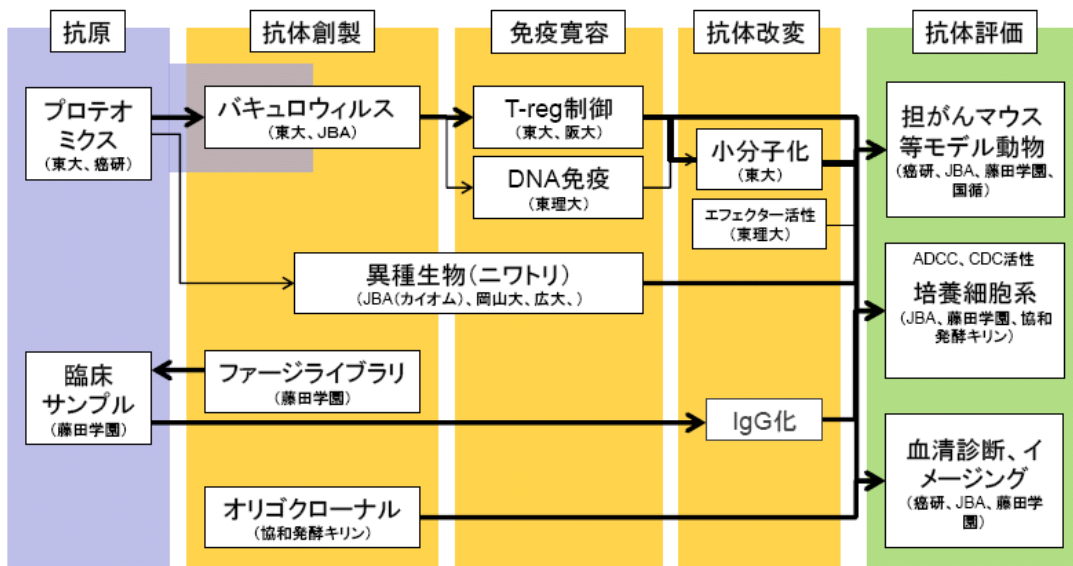
応募のあった24件の提案を評価。技術の相補関係を見据えつつ、5件の提案を採択。



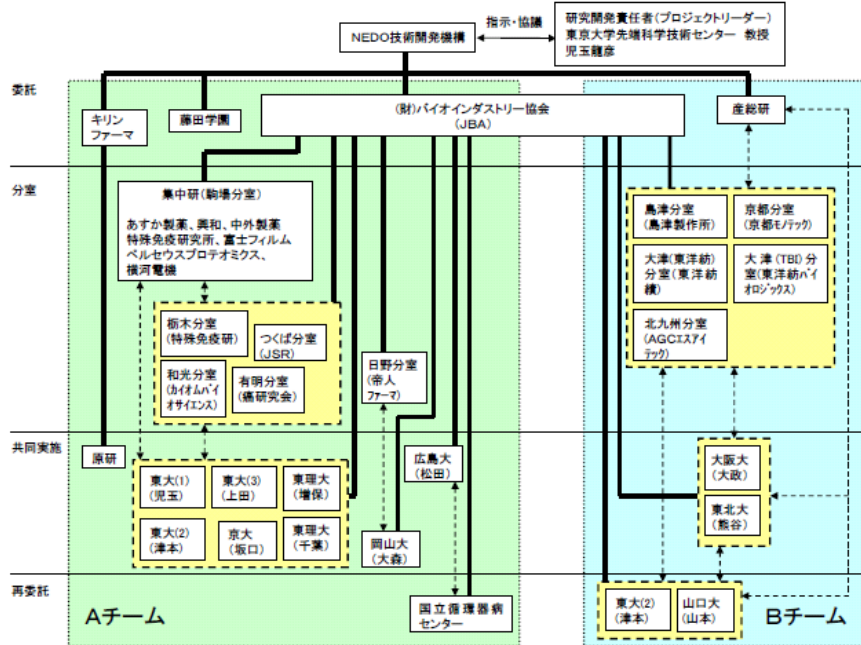
Ⅱ. 研究開発マネジメントについて

3. 研究開発の実施体制の妥当性 -技術の連関(Aチーム)-

採択した研究テーマの技術の相違・相補関係、テーマ毎の連関は次のとおり。



3. 研究開発の実施体制の妥当性 -契約体制図-



- 知財管理 -

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開発

- 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。
- このため、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」が同時に特定されて、アイデアの優先権を明確にするシステムを平成18年度に開発。
- 平成19年度よりプロジェクトで円滑な知財管理のために運用。

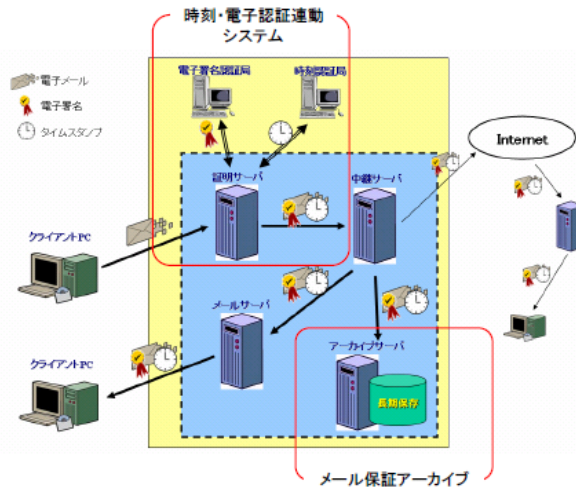


図: 知的財産管理支援技術システムの概要

4. 中間評価への対応 -中間評価結果-

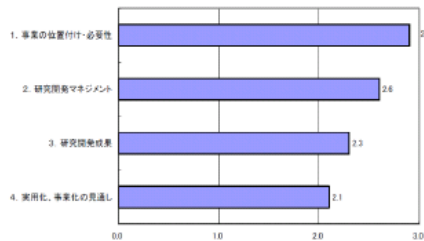
中間評価報告書 総合評価部分の抜粋

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。

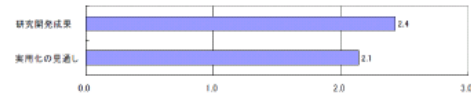
一方で、本事業では様々な技術開発を同時進行的に行っているが、多くの抗体創製基盤技術の相互関係や抗体分離精製技術との関連などに不明確なところがあり、**(指摘1) 標的をしぼるとともにより効果的な連携を検討**する必要がある。また、国内外の抗体医薬の開発と関連の知的財産など周辺状況も踏まえてプロジェクトを推進し、**(指摘2) 知財に配慮しつつ成果をより積極的に公開**することが望まれる。

3. 評点結果

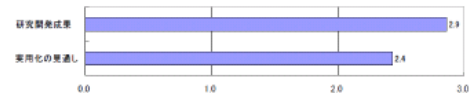
3. 1 プロジェクト全体



3. 2. 1 系統的な高特異性抗体創製技術



3. 2. 2 高効率な抗体分離精製技術



15 / 38

4. 中間評価への対応 -評価結果を踏まえたアクション-

(指摘1) 標的をしぼるとともにより効果的な連携を

Act.1: プレターゲットング技術のスピナウト(最先端研究へ)

Act.2: 開発項目を絞り込むとともに、開発項目内での相互連携

- ・バキュロウィルス以外の抗体創製技術に絞り込み
- ・カイオムと癌研の連携によるGPCRへの対応

Act.3: 開発項目間での相互連携

- ・AチームとBチームの連携による有用抗体の小スケール生産実証

(指摘2) 成果をより積極的に公開

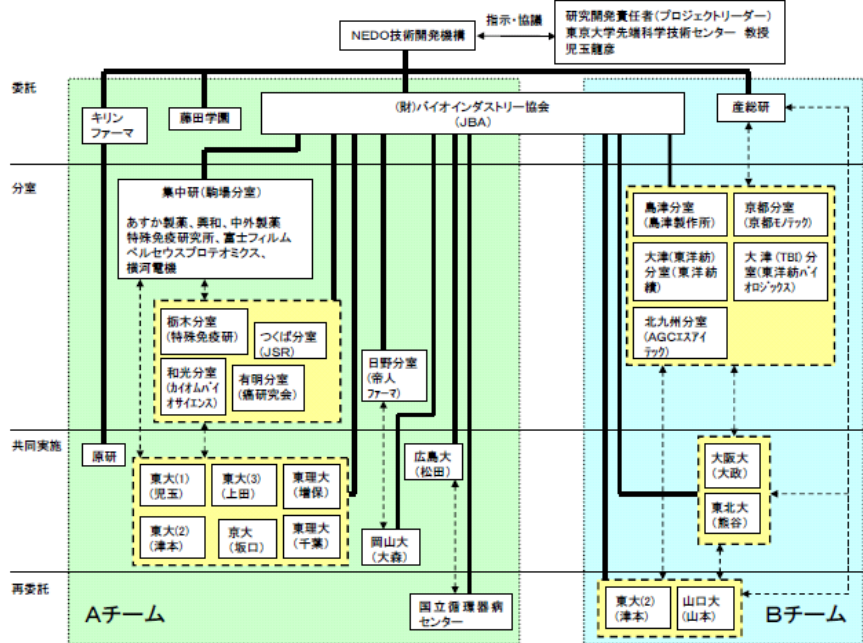
Act.4: 生産実証を行なった抗体のプロジェクト参画企業以外での試用制度

Act.5: 企業の事業化計画に配慮しつつ、プロジェクトで構築した抗体産生細胞の公的機関へ寄託

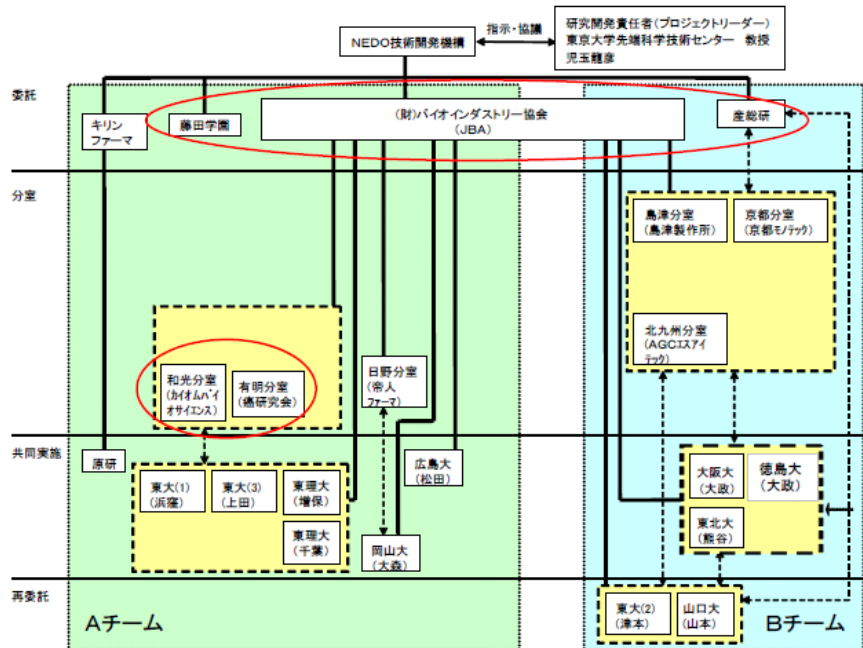
成果の実用化に向けたマネジメント

16 / 38

4. 中間評価への対応 -研究開発実施変更前-



4. 中間評価への対応 -研究開発実施変更後-



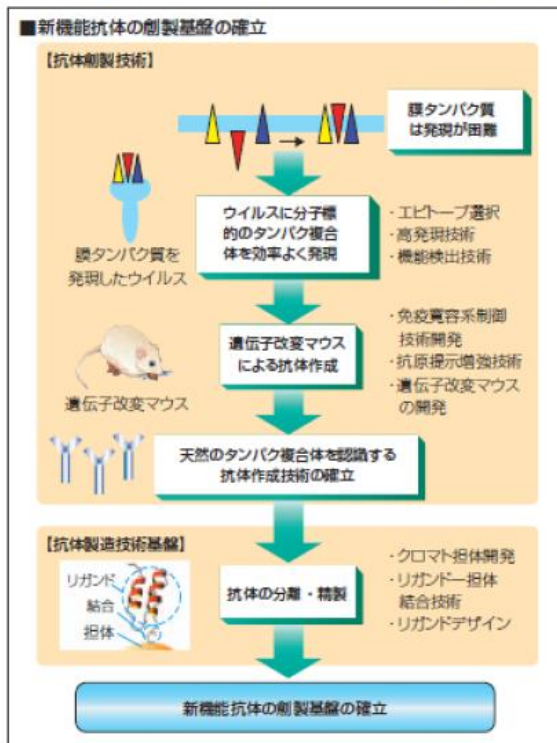
健康安心イノベーションプログラム 「新機能抗体創製技術開発」プロジェクト

III. 研究開発成果について IV. 実用化の見通しについて

H22年度プロジェクトリーダー
(独)産業技術総合研究所
巖倉 正寛

2011年7月6日

プロジェクトの概要



ポストゲノム研究・診断・創薬等において

● 重要な機能を有する抗体を系統的に作製するための技術

(A-チーム)

と

● 抗体製造における高効率な抗体分離精製技術の創製

(B-チーム)

を行う

抗体創製から製造プラットフォーム技術の開発まで取り入れたプロジェクトであり、これまでに例のない新しい試み

抗体創製技術開発チーム (A-チーム)

研究開発項目 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

- ① 系統的な抗体作製技術
- ② 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発現技術開発
- ③ 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
- ④ 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

2) 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

- ① 免疫寛容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
- ② 外来抗原に対する特異的免疫応答の増強
- ③ 抗体工学
- ④ 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

サブチーム1

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 有効な高機能医薬抗体作製システムの開発

4) ニワトリの抗体

- ① 免疫寛容の回避と親和性成熟機能を組み込んだ新規なin vitro 抗体創製技術の確立
- ② 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
- ③ 新規非免疫法による抗体作製

研究開発項目 1-3: ICOS法を用いた癌治療用ヒト抗体単離技術開発

研究開発項目 1-4: オリゴクローナル抗体創製技術開発

21 / 38

研究開発項目①: A-チームの研究開発目標と達成度

[最終目標]

- ・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。
- ・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。

[目標に対する達成度]

- ・抗原の探索、バキュロウイルスによる抗原発現、免疫寛容技術の開発により、165種類、244抗原の作製を試み、130項目558個の抗体を取得
- ・ICOS法により、がん細胞表面抗原(32種類)に強い結合能を示す抗体555個を取得
- ・ニワトリモノクローナル抗体作製技術により、3項目14個を創薬候補として取得
- ・in vivoでの腫瘍縮小効果等の機能の確認により、32個の抗体の有用性を確認。また、イメージング用抗体として、11個の有用性を確認。
- ・有用性が確認された抗体のうち、22抗体を、B-チームの精製実証に用い、精製抗体を試用モニタリング(仮称)として(秘密保持のもとで)提供。
- ・有用性が確認された抗体を用い、実用化に向けた取り組みが始まっている(そのうちの、1例を紹介する)。
- ・以上のことにより、最終目標はクリアできたと考えている。

[成果データ]

- ・特許: 18件 (内 PCT+外国出願 1件)
- ・論文: 220報
- ・学会発表: 384件
- ・プレス発表等: 20件

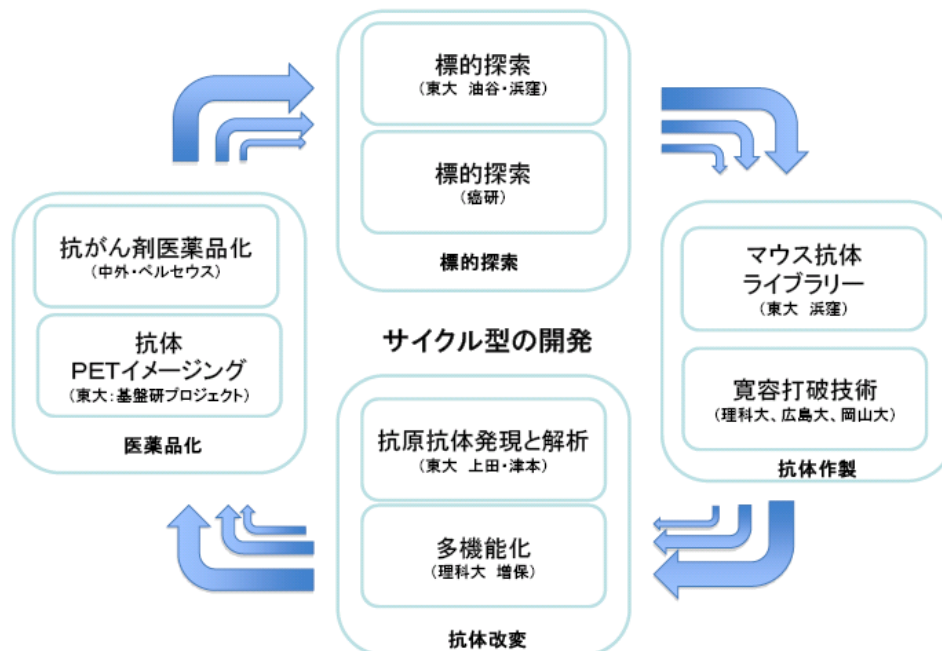
22 / 38

事業成果の概要 / A-チーム

1. 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。
2. 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。
3. 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。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。TNFRIIIFc-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TNFαを発現した細胞に強いADCC活性を発揮した。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 乳がんと膵がんにおいて9個のエクソスキップと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株の膵がん又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。

23 / 38

プロジェクト推進における試み (サブチーム1) サイクル型開発の提案とその実践へのチャレンジ



24 / 38

治療用、診断用、およびGPCR抗体の成果まとめ (サブチーム1)

(1) 疾患治療抗体作製への貢献 標的、到達度

膵がん; Neurotrimin (HNT)(ADCC活性、in vivo 腫瘍縮小効果), TM1 (in vivo 腫瘍縮小効果; 実用化へ), TM2 (in vivo 腫瘍縮小効果; 実用化へ), GPR87(がん細胞FACS),

腎がんENPP3(がん細胞FACS認識抗体取得); TLR3(がん細胞FACS)、

肝がん(in vivo 腫瘍縮小効果)

自己免疫疾患; 脱髄疾患(阻害抗体取得)/ **アルツハイマー症・大腸癌・白血病・乳がん**(γ セクレターゼ阻害抗体、in vivo 腫瘍縮小効果)/ **ウイルス感染**; ケモカイン受容体(N端認識抗体)(2) 診断抗体作製への貢献

イメージング 肝がん; scFv-SA(プレターゲティング)(最先端プロジェクトで続行)

血清診断系/病理診断 白血病, パーキンソン病(酸化型DJ-1), 敗血症2種

(3) 外部への提供の仕組み(GPCR等)

文科省ターゲットタンパクプロジェクトと連携し, 抗体を用いた膜タンパク質X線結晶構造解析への利用を図る。GPCR(8種類)トランスポーター (3種類)

理研リソースセンターへのクローンの寄託

ニフトリモ/クローナル抗体作製技術を用いて作出した産業上有用抗体群のまとめ

1. インテグリン抗体 (158種: 97種)

抗体創薬候補: キメラ阻害抗体 2種, IgY阻害抗体 2種

ヒトキメラ阻害抗体 1種, ヒト化阻害抗体 1種

研究用 (160種)

2. インテグリンリガンド関連抗体 (65種: 2種)

抗体創薬候補: 抗オステオポンチン抗体 2種

抗オステオポンチン抗体 (ヒトキメラ抗体) 1種

抗オステオポンチン抗体 (ヒト化抗体) 1種

研究用 (64種)

3. LOX-1抗体

LOX-1抗体 (142種) 抗体創薬候補: ヒト化抗LOX-1抗体 (4種)

LOX-1リガンド関連抗体 (17種)

ICOS法を用いた癌治療用ヒト抗体単離技術開発により得られた高親和性抗体のまとめ

プロジェクトで同定した癌特異抗原(32種類)と単離したヒトモノクローナル抗体(555種類)

成長因子受容体		細胞接着因子(IgSF)		ヌクレオチド分解酵素	
EGFR	12	CADM1	29	CD73	1
HER2	22	ALCAM/IGSF4	13	補体阻害因子	
HGFR	84	ICAM-1/CD54	25	MCP	101
PTK7/CCK-4	1	L α /BCAM	49	プロテアーゼ誘導因子	
EphA2	26	CEACAM	1	EMMPRIN	5
IGF1R	3	CEA	2	前立腺特異抗原	
PDGFR	3	JAM-1	2	PSMA	1
受容体チロシンフォスファターゼ		MCAM/MUC18/CD146	22	鉄イオン受容体	
PTP-LAR	46	細胞接着分子(非IgSF)		TfR	15
インテグリンファミリー		CD44	13	アポトーシス誘導関連受容体	
$\alpha 3 \beta 1$	16	EpCAM	3	TRAILR2	7
$\alpha V \beta 3$	7	テトラスパニン		補体受容体	
$\alpha 6 \beta 4$	5	CD9	1	C1qR	2
$\alpha 2 \beta 1$	1	テトラスパニンパートナー			
アノキス制御因子		PTGFRN(CD9P-1)	3		
CDCP1	31				

27 / 38

実用化の見込み: 癌特異的抗体の実用化 (サブチーム1)

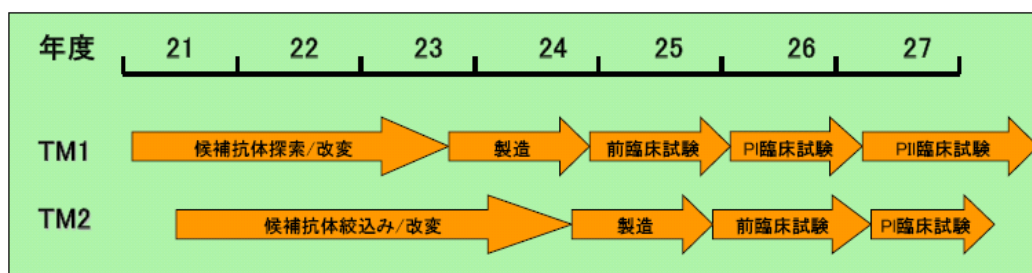
癌治療用抗体

- ・肺癌治療薬; 抗TM1抗体が24年度前臨床試験入りを計画している。
- ・膵癌治療薬; 抗TM2抗体が25年度前臨床試験入りを計画している。

イメージング用抗体

- ・PETによる肝臓癌イメージングできる抗ROBO1抗体の動物実験に成功し、scFv化とプレターゲットングへの取り組みを継続している。

以上の通り、創製した機能性抗体から継続的なパイプライン充実を達成している。肺癌、膵癌など、医療的なニーズの高い疾患に対する治療用抗体、イメージング抗体を開発中である。



28 / 38

研究開発項目②: 高効率な抗体分離精製技術(B-チーム) 研究開発目標と達成度

[最終目標]

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。

[目標に対する達成度]

・回収率の大幅な低下が、アフィニティークロマトにおける酸溶出とその後の中和過程によることから、溶出pHを4.5以上にする事で回収率の大幅な改善を達成した。

・アフィニティリガンドの再デザイン、固定化担体の改良などにより、高流速領域における動的結合容量(DBC)の大幅な増加を達成することで、高効率低コスト精製を可能とする技術を開発した。

・以上のことにより、最終目標を十二分に達成できた。

[成果データ]

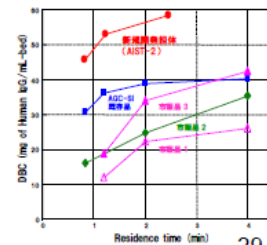
・特許: 49件 (内 PCT+外国出願 7件)

・論文: 68報

・学会発表: 237件

・プレス発表等: 25件

Affinity-Column	Purification steps				Recovery (%)			
	Acid Elution	pH Shift neutralization	IEX	SEC	Acid	pH shift	IEX	SEC
Commercially available	pH 3.0 conventional	NA (82% ppt.)	✓	✓	98	27	21	19
This study	pH 4.5 optimized	✓ (14% ppt.)	✓	✓	90	77	74	68
Commercially available	pH 4.5				50			



29 / 38

事業成果の概要/B-チーム

1. アフィニティ・リガンド開発

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。

2. 精製抗体の品質解析

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。

3. 担体製造

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。

4. (実証パイプラインのための)CHO細胞培養

IgG様抗体を生産する3種類のCHO細胞ラインを構築し、無血清培地で順養した。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。

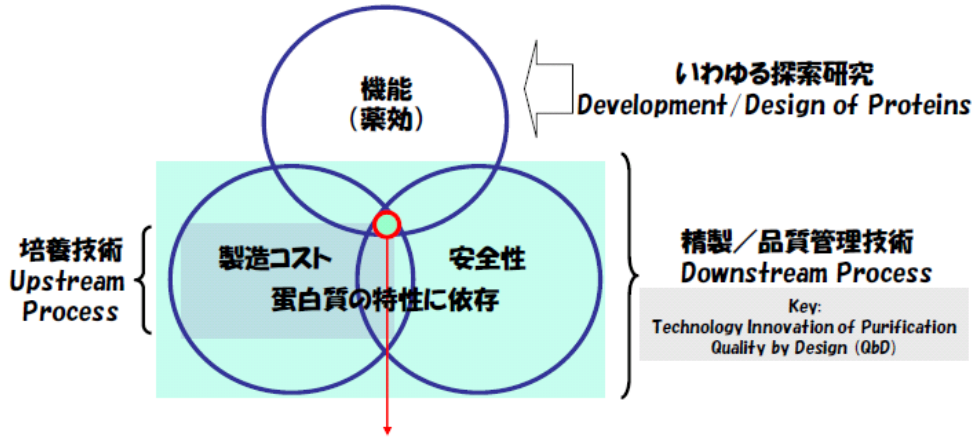
5. 性能検証、実証パイプライン

24種類のヒトもしくはヒト型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。

30 / 38

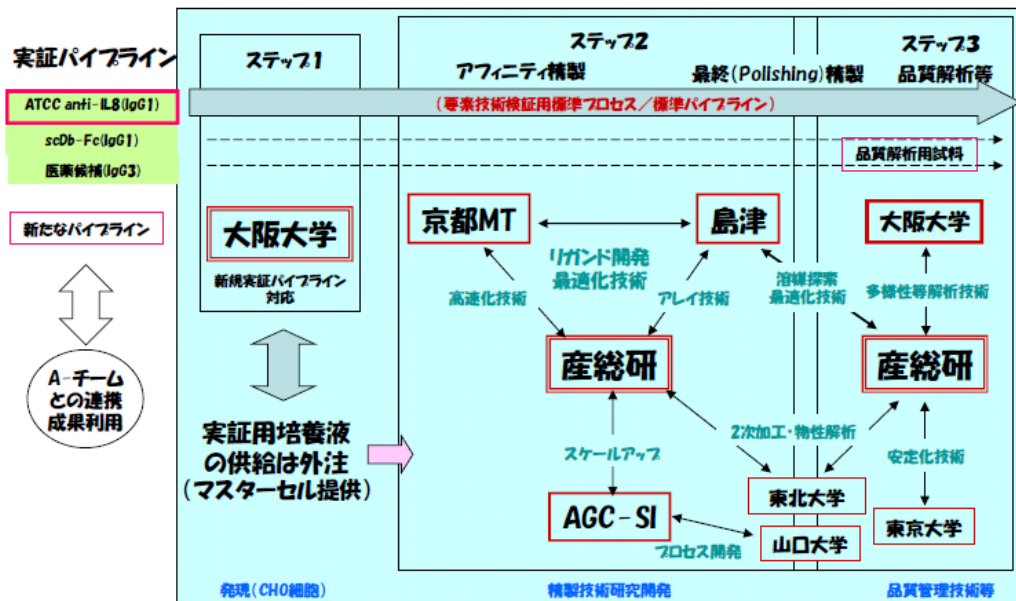
実用化のための意識共有 / 有効な研究開発投資

タンパク質(抗体)医薬品実用化(上市)のための3つの要素
(生きた研究開発投資を行うために)

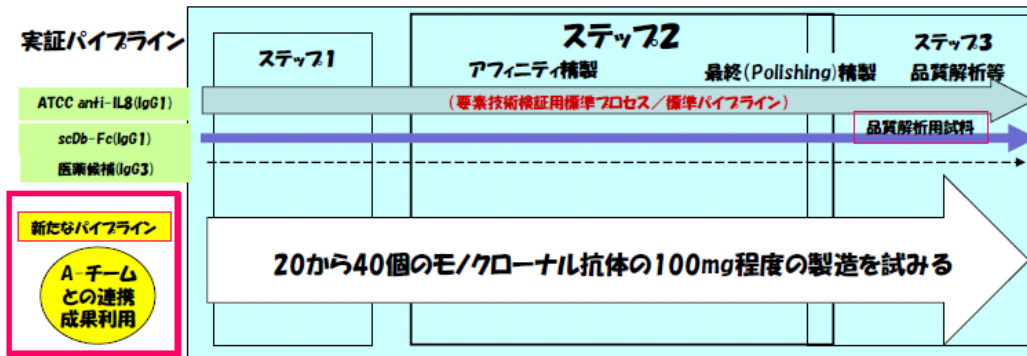


最低この3つの要素を満足したものが上市可能
(研究開発投資が生きる)

実証パイプラインを意識したチーム内連携への取り組み (役割分担の明確化と連携強化)



開発した技術の検証スキームの導入: 実証パイプラインの設定とA-チームとの連携による 実証パイプライン数の拡充



A,Bチーム連携による実証パイプラインに用いた モノクローナル抗体(ヒトIgGタイプ)一覧

抗体番号	抗体名称	認識抗原	抗体が示す作用(確認済み)
1	048-006	EGFR	強い抗腫瘍活性(in vitro, in vivo)
2	067-213	CD73	強い抗腫瘍活性(in vitro, in vivo)
3	059-053	CD147	強いADCC誘導活性, in vivo抗腫瘍活性
4	028-179	TfR	強い抗腫瘍活性(in vitro, in vivo)
5	052-138	TfR	強い抗腫瘍活性(in vitro, in vivo)
6	076-048	IgSF4	ATL細胞に対し増殖阻止効果
7	029-028	EpCAM	強いADCC誘導活性, in vivo抗腫瘍活性
8	059-173	EGFR	強い抗腫瘍活性(in vitro, in vivo)
9	064-139	ITGAV3	強い細胞増殖阻止効果
10	067-153	EpCAM	強いADCC誘導活性, in vivo抗腫瘍活性
11	079-085	PITPNF	強い細胞増殖阻止効果
12	026-001	ITGAV3	強い細胞増殖阻止効果
13	035-212	IgSF4	ATL細胞に対し増殖阻止効果
14	051-054	IgSF4	ATL細胞に対し増殖阻止効果
15	055-237	CD44	強い細胞増殖阻止効果
16	057-024	CD133	強い細胞増殖阻止効果
17	058-069	CD133	強い細胞増殖阻止効果
18	066-166	CD133	強い細胞増殖阻止効果
19	057-091	EGFR	強い抗腫瘍活性
20	015-126	Her-2	強い細胞増殖阻止効果
21	c-HUC52	LOX1	酸化LDLのLOX1結合の阻害
22	h-HUC52	LOX1	酸化LDLのLOX1結合の阻害

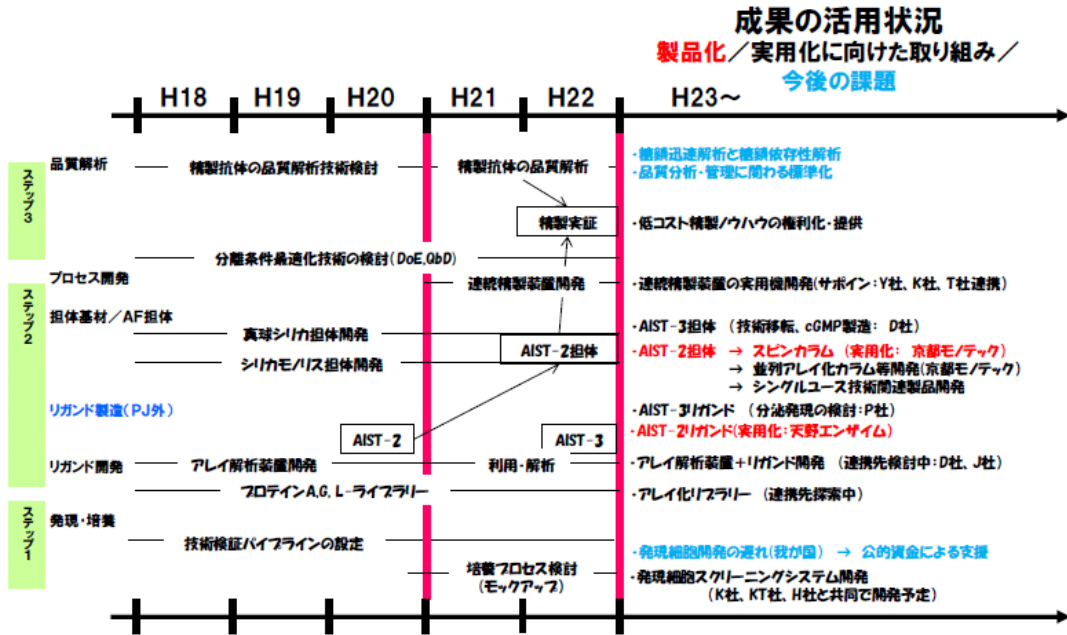
-抗体番号、19および20は、1月以降提供が可能
-抗体番号21は、マウスヒトキメラ抗体、それ以外は、ヒト抗体もしくは、完全ヒト型抗体

公開

IV. 実用化の見通しについて (A-チーム)

実用化の見込み/B-チーム

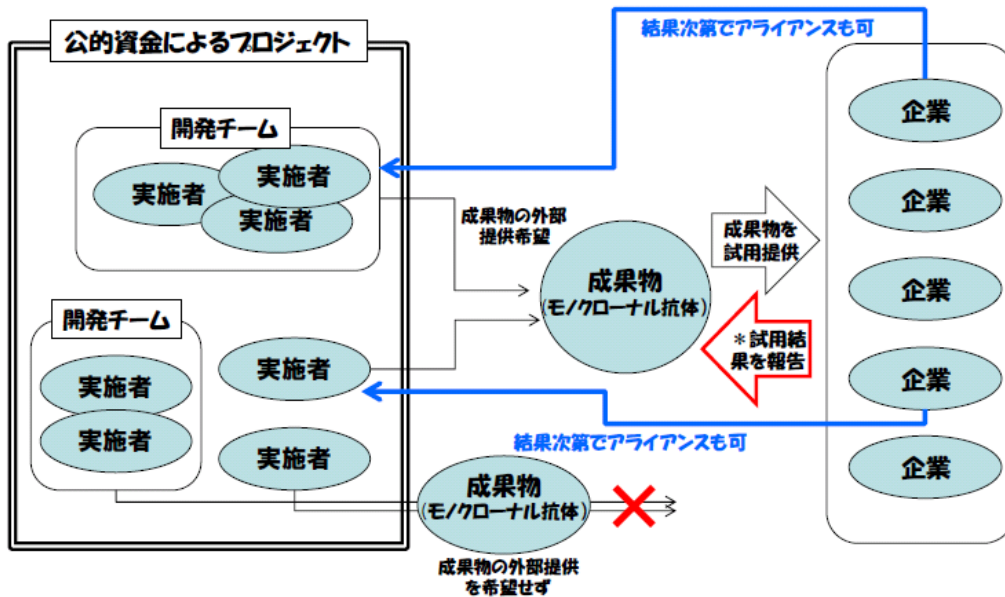
これまでの研究開発の概要と実用化に向けた取り組み



公開

(波及効果)

成果物試用モニタリングの試み



今後注目される動向とそれに向けた本プロジェクト 成果の活用への期待

① バイオシミラー・バイオベターの出現

- ・既知抗原に対する多様な抗体の創製、ライフサイエンス
- ・低コスト製造技術

② バイオ医薬の安全性、品質管理

- ・温和な条件での精製、高回収率の実現

③ 低分子抗体及び非IgG型抗体医薬

- ・イメージング用抗体
- ・(低分子抗体用)ディスプレイ技術
- ・アフィニティ・リガンド開発技術の活用

37 / 38

まとめ

1. 当初設定した最終目標は完全にクリアした。また、本プロジェクトでの成果は、今後の当該分野の発展動向に沿うものである。

2. サイクル型研究開発、実証用パイプライン構築などの試みなど、研究開発推進においてもチャレンジングな試みが行われた。特に、研究開発の投資効率を如何に高めるかに関する意識と連携強化は相当高いものであったと自負する。

3. 各実施者において、成果の実用化に向け精力的に努力がおこなわれている。一方、実用化に向け、(受け入れ企業の)経営レベルでの理解と決断が重要な時期に来ていると考えられる。実施者としては、経営判断(オープン・イノベーション、アライアンス)に必要な各種データ、コンテンツの開発・提示も重要な事項であると考えられる。

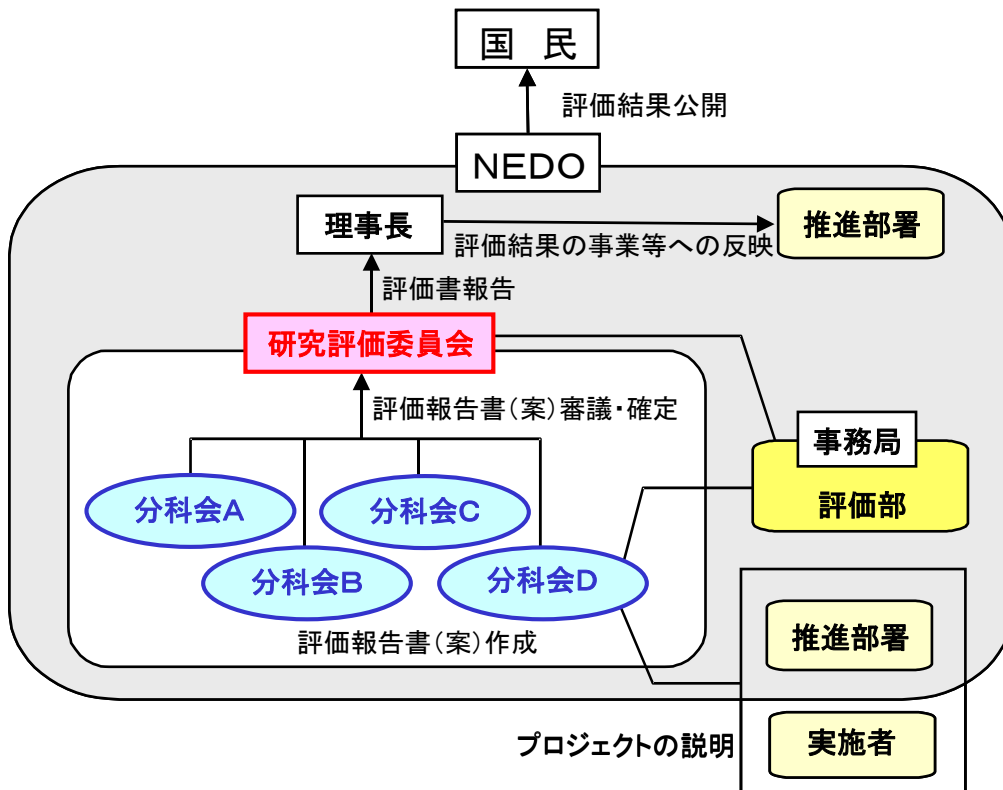
38 / 38

参考資料 1 評価の実施方法

本評価は、「技術評価実施規程」（平成 15 年 10 月制定）に基づいて研究評価を実施する。

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）における研究評価の手順は、以下のように被評価プロジェクトごとに分科会を設置し、同分科会にて研究評価を行い、評価報告書（案）を策定の上、研究評価委員会において確定している。

- 「NEDO 技術委員・技術委員会等規程」に基づき研究評価委員会を設置
- 研究評価委員会はその下に分科会を設置



1. 評価の目的

評価の目的は「技術評価実施規程」において。

- 業務の高度化等の自己改革を促進する
- 社会に対する説明責任を履行するとともに、
経済・社会ニーズを取り込む
- 評価結果を資源配分に反映させ、資源の重点化及び業務の効率化を
促進する

としている。

本評価においては、この趣旨を踏まえ、本事業の意義、研究開発目標・計画の妥当性、計画を比較した達成度、成果の意義、成果の実用化の可能性等について検討・評価した。

2. 評価者

技術評価実施規程に基づき、事業の目的や態様に即した外部の専門家、有識者からなる委員会方式により評価を行う。分科会委員選定に当たっては以下の事項に配慮して行う。

- 科学技術全般に知見のある専門家、有識者
- 当該研究開発の分野の知見を有する専門家
- 研究開発マネジメントの専門家、経済学、環境問題、国際標準、その他社会的ニーズ関連の専門家、有識者
- 産業界の専門家、有識者
- ジャーナリスト

また、評価に対する中立性確保の観点から事業の推進側関係者を選任対象から除外し、また、事前評価の妥当性を判断するとの側面にかんがみ、事前評価に関与していない者を主体とする。

これらに基づき、分科会委員名簿にある7名を選任した。

なお、本分科会の事務局については、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構評価部が担当した。

3. 評価対象

平成18年度に開始された「新機能抗体創成技術開発」プロジェクトを評価対象とした。

なお、分科会においては、当該事業の推進部署から提出された事業原簿、プ

プロジェクトの内容、成果に関する資料をもって評価した。

4. 評価方法

分科会においては、当該事業の推進部署及び研究実施者からのヒアリングと、それを踏まえた分科会委員による評価コメント作成、評点法による評価及び実施者側等との議論等により評価作業を進めた。

なお、評価の透明性確保の観点から、知的財産保護の上で支障が生じると認められる場合等を除き、原則として分科会は公開とし、研究実施者と意見を交換する形で審議を行うこととした。

5. 評価項目・評価基準

分科会においては、次に掲げる「評価項目・評価基準」で評価を行った。これは、研究評価委員会による『各分科会における評価項目・評価基準は、被評価プロジェクトの性格、中間・事後評価の別等に応じて、各分科会において判断すべきものである。』との考え方に従い、第1回分科会において、事務局が、研究評価委員会により示された「標準的評価項目・評価基準」（参考資料1-7頁参照）をもとに改定案を提示し、承認されたものである。

プロジェクト全体に係わる評価においては、主に事業の目的、計画、運営、達成度、成果の意義や実用化への見通し等について評価した。各個別テーマに係る評価については、主にその目標に対する達成度等について評価した。

評価項目・評価基準

1. 事業の位置付け・必要性について

(1) NEDOの事業としての妥当性

- ・ 特定の施策（プログラム）、制度の下で実施する事業の場合、当該施策・制度の目標達成のために寄与しているか。
- ・ 民間活動のみでは改善できないものであること、又は公共性が高いことにより、NEDOの関与が必要とされる事業か。
- ・ 当該事業を実施することによりもたらされる効果が、投じた予算との比較において十分であるか。

(2) 事業目的の妥当性

- ・ 内外の技術開発動向、国際競争力の状況、エネルギー需給動向、市場動向、政策動向、国際貢献の可能性等から見て、事業の目的は妥当か。

2. 研究開発マネジメントについて

(1) 研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2) 研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3) 研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。

- ・ 研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。
 - ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
 - ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
 - ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。
- (4) 研究開発成果の実用化、事業化に向けたマネジメントの妥当性
- ・ 成果の実用化、事業化につなげる戦略が明確になっているか。
 - ・ 成果の実用化、事業化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。
- (5) 情勢変化への対応等
- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
 - ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1) 中間目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2) 成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながることが期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

(5)成果の最終目標の達成可能性

- ・ 最終目標を達成できる見込みか。
- ・ 最終目標に向け、課題とその解決の道筋が明確に示され、かつ妥当なものか。

4. 実用化、事業化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 産業技術としての見極め（適用可能性の明確化）ができているか。
- ・ 実用化に向けて課題が明確になっているか。課題解決の方針が明確になっているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。

(2)事業化までのシナリオ

- ・ 成果は市場やユーザーのニーズに合致しているか。
- ・ 市場の規模や成長性、コストダウン、競合技術との比較、導入普及、事業化までの期間、事業化とそれに伴う経済効果等の見通しは立っているか。

(3)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

標準的評価項目・評価基準（事後評価）

2010. 3. 26

【事後評価 標準的評価項目・評価基準の位置付け（基本的考え方）】

標準的評価項目・評価基準は、第25回研究評価委員会（平成22年3月26日付）において以下のとおり定められている。（本文中の記載例による1…、2…、3…、4…が標準的評価項目、それぞれの項目中の(1)…、(2)…が標準的評価基準、それぞれの基準中の…が視点）

ただし、これらの標準的評価項目・評価基準は、研究開発プロジェクトの事後評価における標準的な評価の視点であり、各分科会における評価項目・評価基準は、被評価プロジェクトの性格等に応じて、各分科会において判断すべきものである。

1. 事業の位置付け・必要性について

(1) NEDOの事業としての妥当性

- ・ 特定の施策（プログラム）、制度の下で実施する事業の場合、当該施策・制度の目標達成のために寄与しているか。
- ・ 民間活動のみでは改善できないものであること、又は公共性が高いことにより、NEDOの関与が必要とされる事業か。
- ・ 当該事業を実施することによりもたらされる効果が、投じた予算との比較において十分であるか。

(2) 事業目的の妥当性

- ・ 内外の技術開発動向、国際競争力の状況、エネルギー需給動向、市場動向、政策動向、国際貢献の可能性等から見て、事業の目的は妥当か。

2. 研究開発マネジメントについて

(1) 研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。
- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化、事業化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化、事業化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化、事業化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5)情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1)目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。（※）

（※事後評価前倒し実施の場合は、「成果は目標値をクリアする見込みか。」）

- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2)成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながる事が期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓する事が期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化、事業化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 産業技術としての見極め（適用可能性の明確化）ができているか。
- ・ 実用化に向けて課題が明確になっているか。課題解決の方針が明確になっているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。

(2)事業化までのシナリオ

- ・ N E D O 後継プロジェクト、N E D O 実用化助成、企業内研究等、プロジェクト終了後の事業化までの道筋は明確か。
- ・ 市場の規模や成長性、コストダウン、競合技術との比較、導入普及、事業化までの期間、事業化とそれに伴う経済効果等の見通しは立っているか。

(3)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

※基礎的・基盤的研究及び知的基盤・標準整備等の研究開発の場合は、以下の項目・基準による。

*基礎的・基盤的研究開発の場合

2. 研究開発マネジメントについて

(1)研究開発目標の妥当性

- ・内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・研究管理法を經由する場合、研究管理法が真に必要な役割を担っているか。
- ・全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

- ・成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5)情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1)目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。（※）
（※事後評価前倒し実施の場合は、「成果は目標値をクリアする見込みか。」）
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2)成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながることを期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1) 成果の実用化可能性

- ・ 実用化イメージ・出口イメージが明確になっているか。
- ・ 実用化イメージ・出口イメージに基づき、開発の各段階でマイルストーンを明確にしているか。それを踏まえ、引き続き研究開発が行われる見通しは立っているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。

(2) 波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

* 知的基盤・標準整備等の研究開発の場合

2. 研究開発マネジメントについて

(1) 研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2) 研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3) 研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担ってい

るか。

- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5) 情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1) 目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。（※）
（※事後評価前倒し実施の場合は、「成果は目標値をクリアする見込みか。」）
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2) 成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながることが期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は公開性が確保されているか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 研究内容に新規性がある場合、知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 整備した知的基盤についての利用は実際にあるか、その見通しが得られているか。
- ・ 公共財として知的基盤を供給、維持するための体制は整備されているか、その見込みはあるか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。
- ・ J I S化、標準整備に向けた見通しが得られているか。注）国内標準に限る
- ・ 一般向け広報は積極的になされているか。

(2)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

参考資料 2 評価に係る被評価者意見

研究評価委員会（分科会）は、評価結果を確定するにあたり、あらかじめ当該実施者に対して評価結果を示し、その内容が、事実関係から正確性を欠くなどの意見がある場合に、補足説明、反論などの意見を求めた。研究評価委員会（分科会）では、意見があったものに対し、必要に応じて評価結果を修正の上、最終的な評価結果を確定した。

評価結果に対する被評価者意見は全て反映された。

本研究評価委員会報告は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）評価部が委員会の事務局として編集しています。

平成23年11月

NEDO 評価部

部長 竹下 満

主幹 三上 強

担当 内田 裕

* 研究評価委員会に関する情報は NEDO のホームページに掲載しています。

(http://www.nedo.go.jp/introducing/iinkai/kenkyuu_index.html)

〒212-8554 神奈川県川崎市幸区大宮町1310番地

ミュージア川崎セントラルタワー20F

TEL 044-520-5161 FAX 044-520-5162