

26-A-12 次世代抗体医薬の開発に基づく新規治療法開発支援のための基盤整備

安永 正浩

国立がん研究センター 先端医療開発センター

研究の分類・属性

発がん・がん生物学分野

研究の概要

次世代抗体医薬などの新規治療法開発の支援を目的として、1) 抗体作製が困難な複数回膜貫通蛋白に対する抗原作製方法の開発研究と、2) 抗体工学を駆使した低分子化抗体・キメラ抗体・ヒト化抗体の開発研究を実施する。3) これらの新たな方法論・技術を基に新規大腸がん複数回膜貫通蛋白に対する抗体を作製する。1) に関しては、複数回膜蛋白を対象にしてネイティブの立体構造を保持した人工抗原蛋白作製法を開発する。さらに、免疫法やスクリーング法に関しても工夫や最適化を行い、複数回膜貫通蛋白に対して成功率の高い抗体作製方法を創出する。これにより、がん細胞での高発現が知られていても、従来法では作製が困難であった複数回膜貫通蛋白に対する特異抗体が、高効率・短期・低コストで取得できるようになる。2) に関しては、低分子化抗体である scFv、Fab、(Fab)₂ を効率的で安定的に作製する方法を確立する。さらに、臨床応用に際しては、IgG と低分子化抗体共に、キメラ化もしくはヒト化が必要である。そこで、抗体遺伝子のクローニングや遺伝子発現系の構築など重要な基盤技術の開発も同時に行う。これにより、臨床応用可能な GMP レベルの抗体作製を円滑に行うことができるようになる。さらに、当該抗体医薬・免疫学的治療薬の効率的な臨床開発を推進するための基盤として、抗体医薬等免疫学的治療薬の免疫モニタリング体制の整備も行う。3) に関しては、DNA マイクロアレイ解析、定量性 PCR、in situ hybridization、バイオインフォマティクスに基づいて同定した大腸がん細胞に高発現する新規の複数回膜貫通蛋白に対して、特異抗体を作製して、特異性を評価する。これら技術基盤の構築・整備を行うことで、本邦の抗体医薬や免疫学的治療薬の研究開発の国際的な競争力を高め、優れた基礎研究成果の実用化促進に貢献することができる。

平成 27 年度研究経費

14,000 千円

研究班の組織

研究者名	所属研究機関名・職名	分担研究課題名
安永 正浩	国立がん研究センター先端医療開発センター・新薬開発分野・ユニット長	研究・全体総括
松村 保広	国立がん研究センター先端医療開発センター・新薬開発分野・分野長	臨床開発
古賀 宣勝	国立がん研究センター先端医療開発センター・実験動物管理室・室長	抗体評価

西條 信史	国立がん研究センター先端医療開発センター・新薬開発分野・研究員	抗体作製
花岡 慎悟	国立がん研究センター先端医療開発センター・新薬開発分野・研究員	抗原作成・抗体精製
生内 寿文	国立がん研究センター先端医療開発センター・新薬開発分野・研究員	抗原作製・抗体精製
淵上 弥史	国立がん研究センター先端医療開発センター・新薬開発分野・研究員	抗体作製
古屋 文昭	国立がん研究センター先端医療開発センター・新薬開発分野・研究員	動物実験
津本 浩平	東京大学大学院工学系研究科 教授	抗体改変と物性評価
青木 一教	国立がん研究センター研究所・遺伝子免疫細胞医学研究分野長	抗体医薬等免疫学的治療薬の免疫モニタリング方法

研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(目的と到達目標)

1. 複数回膜貫通蛋白に対する抗原・抗体作製方法の開発研究と、2. 抗体工学を駆使した低分子化抗体・キメラ抗体・ヒト化抗体の開発研究に基づいて、新しい抗体作製法の基盤整備を行う。3. これらの方法論・技術を基に従来法では作製が困難であった新規大腸がん膜蛋白に対する抗体を作製する。

第2年次

(到達目標)

1. 複数回膜貫通蛋白に対する抗原抗体作製方法の開発研究
 - ① 抗原の立体構造保持・回復法の確立
 - ② 動物免疫法の確立
 - ③ 安定した抗体高産生株樹立法の確立
2. 抗体工学を駆使した低分子化抗体・キメラ抗体・ヒト化抗体の開発研究
 - ① scFv の作製法の確立
 - ② 次世代抗体医薬作製技術の確立

- ③ ヒト化抗体の取得法の確立
- ④ 抗体医薬や免疫学的モニタリング方法の確立
- 3. 複数回膜貫通構造をもつ新規大腸がん複数回膜貫通蛋白に対する抗体を作製する。
 - ① 新規大腸がん複数回膜貫通蛋白に対する抗体作製
 - ② 新規大腸がん複数回膜貫通蛋白に対する抗体の in vitro 特性評価
 - ① 新規大腸がん複数回膜貫通蛋白に対する抗体の in vivo 特性評価

(年次評価時点の実績要点)

- 1. 複数回膜貫通蛋白に対する抗原抗体作製方法の開発研究
 - ① 抗原の立体構造保持・回復法の確立
 - ② 動物免疫法の確立
 - ③ 安定した抗体高産生株樹立法の確立
- 4. 抗体工学を駆使した低分子化抗体・キメラ抗体・ヒト化抗体の開発研究
 - ① scFv の作製法の確立
 - ② ヒト化抗体の取得法の確立
 - ③ ホモロジーモデリングを応用した改変抗体作製法の確立
 - ④ 抗体医薬や免疫学的モニタリング方法の確立
- 5. 複数回膜貫通構造をもつ新規大腸がん複数回膜貫通蛋白に対する抗体を作製する。
 - ① 新規大腸がん複数回膜貫通蛋白に対する抗体作製
 - ② 新規大腸がん複数回膜貫通蛋白に対する抗体の in vitro 特性評価
 - ② 新規大腸がん複数回膜貫通蛋白に対する抗体の in vivo 特性評価

研究成果と考察

第2年次評価時点

1. 抗体作製が困難な複数回膜貫通蛋白に対する抗原作製方法の開発研究

昨年同様に、標的抗原について公共データベース Uniprot を利用して細胞外領域を確認して、免疫用抗原のデザイン・設計を行った。本年度は、アミノ酸の一次配列では連続でも、立体構造上は一部のアミノ酸配列が埋没して表面にないことも多くあることが判明した。そこで、立体構造上連続するアミノ酸配列に基づく合成ペプチドを作製して、抗原として用いる方法を確立した。複数回貫通蛋白の場合には、難溶性に加えて、界面活性剤の調整や適当なデタージェントを用いて溶解できたとしても、その後の操作や保存中に変性状態に陥るといった問題点が存在する。それに対する対策として、変性状態からの回復法の確立を試みた。結果的に、高濃度の尿素で変性させた目的タンパク質を低濃度の尿素条件下で透析することで、ネイティブな立体構造を保ったタンパク質に巻き戻しできることが判明した。巻き戻された目的タンパク質はゲル濾過カラムにて精製した。ペプチドシークエンスによる一次構造配列の確認後、円2色性分散計によるスペクトラム解析で α ヘリックスと β シート構造を分析することで、抗原の立体（二次、三次）構造が回復していることを検証した。以上により、変性した蛋白についても、今回確立した巻き戻し法を使用することで、抗原蛋白として利用できるようになった。

昨年度確立したループ状構造・タグ蛋白による抗原設計について、センター内支援事業として依頼を受けて、作製を行った。

昨年度同様に、抗体迅速作製法としてラット腸骨リンパ節免疫法を利用した。今回は、抗原親和性の高い抗体作製を念頭にして、通常の脾臓免疫法も併用した。腸骨リンパ法と比べて、作製期間に12週間と長期を有したが、平均的に高い抗原親和性の抗体を取得できることが確かめられた。腸骨リンパ法と脾臓免疫法の長所・短所を理解した上で、両者を効率よく併用することの重要性を再認識することができた。

スクリーニング法に関しては、独自のフローサイトメトリー(FCM)を駆使したシステムをルーチンに使用した。すなわち、細胞融合後得られた全ての抗体クローン(1000個以上)について、FCMで評価を行っている。3台の高速の卓上FCMを効率的に使うことなど、労力を減らす工夫も続けている。これにより、生きた細胞表面上の標的抗原を認識する抗体を確実に拾うことができている。本年度の結果からも、FCMで得られた抗体はELISAでは認識されにくく、逆にELISAスクリーニングで得られた抗体ではFCMで生きた細胞表面の抗原を認識できる抗体がほとんど存在しないという逆の相関性が検証できた。

抗体スクリーニング用に、shRNAによる遺伝子ノックダウンとCrisper cas9システムによる遺伝子ノックアウト法で標的とした抗原の発現が低い或いは完全消失した細胞を作製して、標的抗原の確実な陰性コントロールとして評価系に用いている。さらに、プラスミドやレンチウイルスを用いて標的抗原を強制発現した陽性コ

ントロールも評価系として用いている。今回は、強制発現系に対して IRES-GFP 発現コンストラクトを新たに導入した。GFP 陰性抗原陰性細胞と GFP 陽性抗原強陽性細胞を混合して同一サンプルとして利用することで、FCM スクリーニング時に、蛍光抗体と GFP の 2 色による 2 次元展開で解析できる。このおかげで、境界領域の偽陽性・偽陰性を高い確率で除外することができるので、真の陽性クローンを効率よく選択できるようになった。

抗体産生に関しては、昨年同様に、抗体必要量が 10~100 mg では、フラスコにて静置培養を行い、100 mg 以上を必要とする大量培養では、振揺培養を行った。しかしながら、生産量がなかなか増えない場合も多く、新たな抗体高産生株取得法の確立が要求された。そこで、Methotrexate (MTX) を利用した抗体高産生株の取得法の確立を行った。今回用いたハイブリドーマ DG44 株は Dihydrofolate reductase (DHFR) 欠損株のため、チミジンおよびヒポキサンチン要求性である。そのため、IRES で DHFR を発現するベクターに抗体 H 鎖を組み込んだベクターおよび抗体 L 鎖を発現するベクターを共トランスフェクションし、チミジンおよびヒポキサンチンを含まない培地で培養することで、少なくとも抗体 H 鎖が染色体に組み込まれた細胞のみを選別できる。MTX は DHFR の拮抗阻害剤である。MTX を培地に添加することで、DHFR が高発現する細胞株、すなわち H 鎖が高コピーに発現する細胞株をセレクションすることができる。この操作を複数回繰り返すことで、抗体高産生株を取得できる。今回は 1 回の操作で約 5-25 倍の生産量の増加がみられた。抗体高産生株取得法として有用であることが実証できた。

2. 抗体工学を駆使した低分子化抗体・キメラ抗体・ヒト化抗体の開発研究の研究

昨年同様に、免疫した宿主（ラットもしくはマウス）B 細胞の H 鎖と L 鎖の配列情報を基に設計した複数のプライマーセットを用いて遺伝子クローニングを行った。さらに、バイオインフォマティクスを用いて、NCBI と IMGT (Immunogenetics) で検索配列をかけて、オリジナルの配列であることを確認作業として随時行った。scFv についても、新たにクローニングした H 鎖可変領域遺伝子と L 鎖可変領域遺伝子を中間部のリンカー配列と精製用末端部のヒスチジンタグ配列をもつ大腸菌発現用の専用ベクターに組み込む大腸菌に発現させることに成功した。ヒスチジンカラムで回収後に、活性を評価した。抗体クローンによっては、IgG に近い高親和性を示す scFv が作製できることが判明した。さらに、in vivo イメージングでの特性評価法も確立した。scFv の場合には、低分子化したことにより IgG に比較して生体内半減期が 6 時間以内に短縮化させることができる。イムノ PET・SPECT などの分子イメージングに応用する場合には、安全性と共に短時間で検査を終了させることができるので、外来検査用のプローブとしては有用なフォーマットと思われた。

昨年度に確立したヒトキメラ抗体の取得法については、作業の効率化を進めている。今回は新たに、ヒト化抗体用の発現ベクターのコンストラクションとプロトコール作成を行った、作業手順の標準化を進めている。ヒト化以外では、抗体の抗原親和性や非特異反応を下げる基盤技術の必要性から、ホモロジーモデリング構造情報を利用した抗体改変法の確立を試みた。機能性をより高める目的でやみくもに CDR に変異を導入しても立体構造を壊してしまい、逆に機能性を損なってしまう場合がある。そこで、ホモロジーモデルを利用した。まず、CDR 領域も含め、アミノ酸鎖長がほぼ等しく、すでに立体構造情報が PDB に登録されているものをピックアップした。選んだ構造のアミノ酸配列を、改変したい抗体のものに置き換え、モデリングを行うことで、より正確なモデル構造が構築できるようになった。実際にこの情報を元に 20 数種類の改変抗体を取得した。今回は特に、非特異反応性を下げることに成功した。抗原親和性を高める方法についても、変異部位の選択や方法・条件などの最適化を進めている。

臨床応用を考え、外来ウイルス・プリオンが混入する可能性がない安全性に優れた無血清培養への馴化作業も継続中である。また、その前段階として IgG が少ない低血清培養法を導入した。不純な IgG の混入による評価の不安定性を減らすことができるようになった。

抗体医薬等を含めた免疫学的治療薬を対象とする免疫モニタリング体制の整備さらに進め、昨年度確立した免疫細胞パネル(制御性 T 細胞や骨髄性抑制細胞を含む)の検出系に加えて、抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) と抗体依存性細胞貪食活性 (ADCP) を一度に解析できるアッセイ系を確立した。具体的には、CSFE でラベルした腫瘍細胞とリンパ球および抗体を in vitro で 4 時間共培養し、CD45 抗体と Fixable Viability Dye (FVD) で染色しフローサイトメーターで ADCC (CSFE⁺FVD⁺) と ADCC (CSFE⁺CD45⁺) を検出する。実際に、市販の各種分子標的薬と共に新規抗体医薬品に関して運用し、抗体薬によって両活性が異なることを明らかとした。現在、ADCC 及び ADCP 活性効果予測のための免疫学的バイオマーカーを探索している。これら免疫モニタリング体制の構築は、抗体医薬や免疫治療薬の効率的な臨床開発を促進するための基盤として有用である。

3. 複数回膜貫通構造をもつ新規大腸がん膜蛋白に対する抗体の作製

DNA マイクロアレイ解析、定量性 PCR、in situ hybridization を基に同定した大腸がん特異的膜蛋白のうち膜貫通部分が 11 回のトランスポーターに関して、昨年度から継続して抗体作製及び評価を行っている。1. の方法でモノクローナル抗体を作製し、ヒトキメラ化を行った。フローサイトメトリーでは、大腸がん細胞

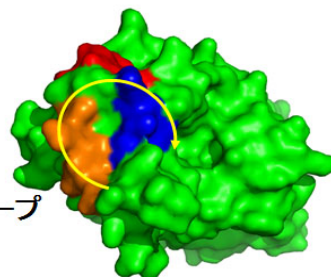
株10株中7株(70%)で強陽性であった。さらに、蛍光標識した抗体の細胞イメージングで細胞膜に強く反応していた。次いで、大腸がんの組織アレイで抗体の特異性を評価した。患者37例中19例(51%)に陽性であった。対照のEGFRは37例中15例(40%)に陽性であった。さらに、本マーカー陰性でEGFR陽性例も存在したが、本マーカー陽性でEGFR陰性或いは本マーカーがEGFRよりも強陽性が10例以上存在した。EGFRの場合は半数近くのKRAS変異では抗EGFR抗体が無効とされており、本抗体はEGFR陰性例やEGFR陽性KRAS変異陽性例に対して有効な抗体医薬になり得るものと判断された。さらに、EGFRは皮膚で強陽性であったが、本抗体は皮膚を含め正常部では陰性であったので、副作用の少ない患者にやさしい抗体医薬を提供できると考えている。

立体構造に基づいた抗原ペプチド作製

本来のアミノ酸配列



新しいペプチド抗原



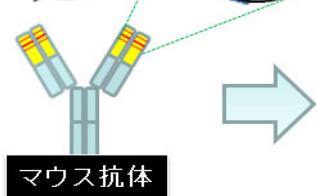
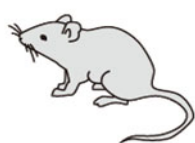
エピトープ
部位

立体構造上連続していない赤い領域を取り除き立体構造上連続したペプチドを作成した。

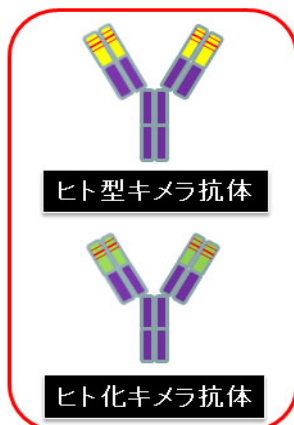
臨床応用のためのヒト型キメラ抗体及びヒト化抗体の作成

CDR領域

抗原を認識する領域
赤い領域は特に重要



マウス抗体



ヒト型キメラ抗体

ヒト化キメラ抗体

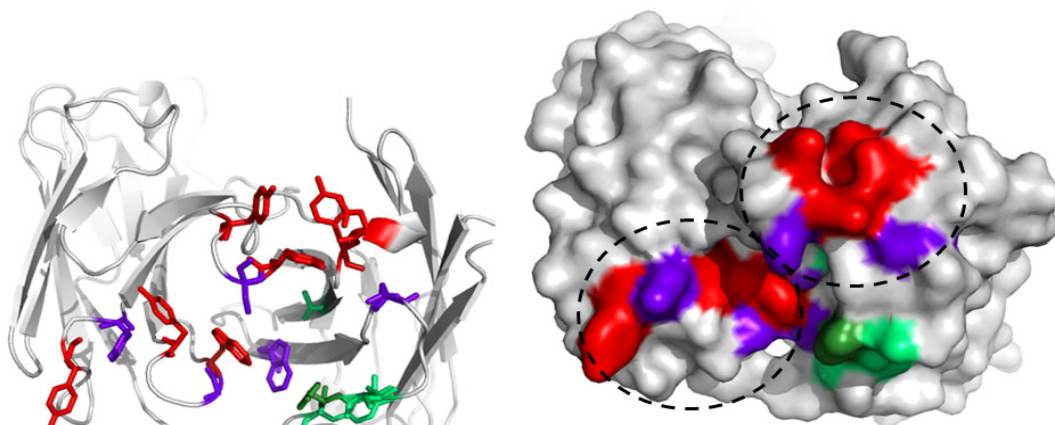


ヒト抗体

ヒト化キメラ抗体:ヒトの抗体上にある抗原を認識するCDR領域のみ改変する。

ホモロジーモデリング構造情報を利用した抗体改変

- 1、ターゲットとなる抗体と残基数が近い抗体の立体構造情報をデータベースより取得
- 2、ターゲットとなる抗体のアミノ酸配列情報を元に、ホモロジーモデル構築
- 3、モデル構造の情報を元に、CDR領域かつ、溶媒に露出している残基、疎水性残基を中心に変異体構築
- 4、FACSまたはELISAによる抗原との相互作用の確認
- 5、免疫染色等を行い、非特異的な結合が少ない改変抗体の取得



構造情報を元に約20種類の一残基変異体を構築、パラトープ領域を決定(赤)、非特異的結合が少なくなる領域を決定(緑)することに成功した。

倫理面への配慮

各がん細胞株に関しては、国立がんセンターで保有されている細胞バンクから入手可能な細胞株を使用する。動物実験は、国立がん研究センターおよび各研究施設の定める「動物実験指針」に従うとともに、動物倫理委員会の承認を得たうえで、動物の苦痛の低減に務め、動物愛護の精神に基づく実験を行う。遺伝子組み換えに関しては法律「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」及び関連する法律・政令・省令・告示を遵守して行う。ヒト由来試料の使用は、国立がん研究センター及び関連省庁の定める臨床指針・疫学指針・ゲノム指針に基づくと共に、倫理審査委員会の承認を得たうえで行う。

本研究に関連する、本研究期間中の主な論文・学会発表等

第2年次

(雑誌論文)

- ・国立がん研究センター研究開発費による成果であることが記載されているもの
 1. Ueda R, Narumi K, Hashimoto H, Miyakawa R, Okusaka T, **Aoki K**. Interaction of natural killer cells with neutrophils exerts a significant antitumor immunity in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Cancer Med*. 5:49-60, 2016.
- ・国立がん研究センター研究開発費による成果であることが記載はないが、関連するもの
 1. Koga Y, Manabe S, Aihara Y, Sato R, Tsumura R, Iwafuji H, Furuya F, Fuchigami H, Fujiwara Y, Hisada Y, Yamamoto Y, **Yasunaga M**, Matsumura Y. Antitumor effect of antitissue factor antibody-MMAE conjugate in human pancreatic tumor xenografts. *Int J Cancer*. 137(6):1457-66, 2015
 2. Ahn J, Miura Y, Yamada N, Chida T, Liu X, Kim A, Sato R, Tsumura R, Koga Y, **Yasunaga M**, Nishiyama N, Matsumura Y, Cabral H, Kataoka K. Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer. *Biomaterials*. 2015 :23-30, 2015
 3. Yamamoto Y, Hyodo I, Koga Y, Tsumura R, Sato R, Obonai T, Fuchigami H, Furuya F, **Yasunaga M**, Harada M, Kato Y, Ohtsu A, Matsumura Y. Enhanced antitumor effect of anti-tissue factor antibody-conjugated epirubicin-incorporating micelles in xenograft models. *Cancer Sci*. 106(5):627-34, 2015.
 4. Tsumura R, Sato R, Furuya F, Koga Y, Yamamoto Y, Fujiwara Y, **Yasunaga M**, Matsumura Y. Feasibility study of the Fab fragment of a monoclonal antibody against tissue factor as a diagnostic tool. *Int J Oncol*. 47(6):2107-14, 2015
 5. Narumi K, Miyakawa R, Ueda R, Hashimoto H, Yamamoto Y, Yoshida T, **Aoki K**. Pro-inflammatory proteins S100A8/S100A9 activate natural killer cells via interaction with a receptor of advanced glycation endproduct. *J Immunol* 194: 5539, 2015.
 6. Nakayama T, Mizohata E, Yamashita T, Nagatoishi S, Nakakido M, Iwanari H, Mochizuki Y, Kado Y, Yokota Y, Satoh R, **Tsumoto K**, Fujitani H, Kodama T, Hamakubo T, Inoue T. Structural features of interfacial tyrosine residue in ROBO1 fibronectin domain-antibody complex: Crystallographic, thermodynamic, and molecular dynamic analyses. *Protein Sci*. 24(3):328-40, 2015
 7. Kiyoshi M, Caaveiro JM, Kawai T, Tashiro S, Ide T, Asaoka Y, Hatayama K, **Tsumoto K**. Structural basis for binding of human IgG1 to its high-affinity human receptor FcγRI. *Nat Commun*. 6:6866, 2015
 8. Caaveiro JM, Kiyoshi M, **Tsumoto K**. Structural analysis of Fc/FcγR complexes: a blueprint for antibody design. *Immunol Rev*. 268(1):201-21, 2015
 9. Rujas E, Gulzar N, Morante K, **Tsumoto K**, Scott JK, Nieva JL, Caaveiro JM. Structural and Thermodynamic Basis of Epitope Binding by Neutralizing and Nonneutralizing Forms of the Anti-HIV-1 Antibody 4E10. *J Virol*. 89(23):11975-89, 2015
 10. Kado Y, Mizohata E, Nagatoishi S, Iijima M, Shinoda K, Miyafusa T, Nakayama T, Yoshizumi T, Sugiyama A, Kawamura T, Lee YH, Matsumura H, Doi H, Fujitani H, Kodama T, Shibasaki Y, **Tsumoto K**, Inoue T. Epi-regulin Recognition Mechanisms by Anti-Epi-regulin Antibody 9E5: Structural, Functional and Molecular Dynamics Simulation Analyses. *J Biol Chem*. 2015 in press.