

創薬基盤推進研究事業 研究開発課題

中間評価報告書

研究開発課題名	膜タンパク質の細胞外ドメインを結合標的とする機能性 ヒト抗体の高効率作製と構造デザイン
代表機関名	国立大学法人京都大学
研究開発代表者名	岩田 想
全研究開発期間	平成30年度 ～ 令和4年度 (予定)

1. 研究開発成果

- ① 大腸がん細胞の悪性化形質や転移能獲得に関与する数種のヒト膜タンパク質を対象として、昆虫細胞 *Sf9* 発現系を用いた膜タンパク質の大量発現・精製法を確立した。この高品質精製標品および当グループが独自に開発した抗体スクリーニング技術（リポソーム免疫、リポソーム ELISA、蛍光ゲル濾過分析等）を用いて、膜タンパク質 A に対する立体構造認識マウス抗体（膜タンパク質の部分ペプチド配列ではなく、膜タンパク質の親水性表面の立体構造を特異的に認識し結合するモノクローナル抗体）を5株取得した。さらに、当該抗体が膜タンパク質の細胞外ドメイン/細胞外ドメインのいずれに結合しているかを識別する新技術（バキュロウイルス標的 ELISA）を確立し、それを用いて細胞外ドメインの立体構造に結合する（すなわち、抗体医薬候補として有望である）マウス抗体が少なくとも3株取得できていることを明らかにした。
- ② 取得した抗体を大量生産し、Fab 抗体フラグメントを調製した。膜タンパク質 A/Fab フラグメント複合体の精製品を調製し、この試料を用いて脂質キュービク相結晶化法により結晶化条件のスクリーニングを実施中である。結晶化実験と並行して、膜タンパク質 A/Fab フラグメント複合体を脂質ナノディスクに再構成し、クライオ電子顕微鏡単粒子解析のための試料調製を進めている。
- ③ 取得したマウス抗体について、大腸がんオルガノイドを用いた薬理活性評価を進めている。*in vitro* 評価（高転移性オルガノイドの培地に抗体を添加することによる浸潤能の変化を観察）と *in vivo* 評価（高転移性オルガノイドをマウス脾臓に移植した後の肝転移を抗体投与により抑制可能かどうかの検討）の双方を実施中である。これらの抗体 IgG を用いてマウス生体への抗体投与実験を実施した。大腸がん細胞（AKTP 細胞）の培地へ各機能性抗体を添加（10mg/ml）後、1時間処置（37°C、5%CO₂）した。各細胞は trypsin によって剥がし、2×10⁵個を NSG マウス（免疫不全マウス）脾臓に移植した。2週間後、肝臓および脾臓を摘出し肝転移巣の形成について調べた。コントロールに比べて、ある抗体クローン群のそれぞれを投与した転移巣では、著しい線維化が観察された。またこれらの抗体クローン投与では肝臓全体に占める転移巣面積の相対比の割合が有意に大きかったため、これらの抗体は大腸がん転移を促進する機能性抗体であると結論した。興味深いことに、これらの抗体を投与すると AKTP 細胞では突起 (protrusion) のようなものを伴うオルガノイドの出現頻度が有意に多く、当該抗体は膜タンパク質 A を介して大腸がん細胞の細胞骨格を制御すると考えられた。今後その分子機構の解明をめざす。

- ④ 完全ヒト抗体産生染色体改変マウスを用いて、創薬標的膜タンパク質の細胞外ドメインを結合標的とするヒト抗体（ヒトに投与した場合に低免疫原性であるというメリットがあり、抗体医薬開発に直結するシーズを発見できる可能性が高い）を作製する技術開発を進めた。京大と鳥取大が協力して、膜タンパク質 A の細胞外ドメインの立体構造に結合するヒト抗体（クラス IgG）を 1 株取得した。現在、上記の③と同様の方法にて *in vivo* 機能性試験を実施しているところである。

大腸がん転移抑制のための創薬標的候補として挙げられた他の 2 種のヒト内在性膜タンパク質を対象として、昆虫細胞 *Sf9* 発現系を用いた膜タンパク質の大量発現系を作製した。機能性抗体を高効率で取得するために必要な抗原として、これらの膜タンパク質の精製を進めている。

2. 総合評価

- ・総合的に期待通りの進捗と成果が得られている。

【評価コメント】

膜タンパク質の細胞外ドメインを結合標的とする機能性ヒト抗体の高効率作製と構造デザインを目指し、膜タンパク質の細胞外ドメインに結合する抗体取得の新技术（バキュロウイルス標的 ELISA）の確立、細胞外ドメインの立体構造に結合するマウス抗体の複数取得など、着実に研究を進めている。また、得られた抗体の生物活性について大腸がんオルガノイドを用いた薬理活性評価を実施し、想定とは異なったが、大腸がん転移促進機能を見出し、新たな病態解明ツールとしての機能性抗体への展開を期待する。

しかし、本事業において期待している研究の中心の構造解析及び抗体の高機能化・高付加価値化の検討は遅れ気味である。そのため、研究期間内で達すべき目的とクライテリアを再度確認し、それに沿った研究を着実に進めること。つまり、①ヒト抗体産生マウスを用いて低免疫原性の機能性ヒト抗体を効率的にスクリーニングし、②膜タンパク質-抗体複合体の構造解析による高機能化・高付加価値抗体デザインに注力すること。また、標的とする細胞外ドメインの研究対象としての優先順位を明確化し、抗体デザイン検討と活性評価検討を綿密な連動性を持って推進し、確実にクライテリアを達成するよう取り組むこと。

さらに、有望な抗体医薬開発を切り開くため、本技術の実用化に向け、大量生産の検討や技術導出、企業連携などの道筋も検討すること。

以上