

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(糖鎖利用による革新的創薬技術開発事業)
事後報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 世界初の抗糖鎖抗体医薬の開発に向けた革新的抗糖鎖モノクローナル抗体作製技術の確立

(英語) Innovative technology for the generation of anti-carbohydrate monoclonal antibodies toward novel antibody drug development

研究開発実施期間: 平成28年9月1日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 川島 博人

(英語) Hiroto Kawashima, Ph.D.

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立大学法人千葉大学・大学院薬学研究院・教授

(英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

糖鎖は、細胞外の環境変化や細胞の状態変化に応じてダイナミックに構造を変化させ、細胞間認識や細胞接着、細胞間シグナル伝達等の多様な機能を発揮することから、病態バイオマーカーとして有用であるとともに新規創薬標的として有望である。しかし、質の良い抗糖鎖モノクローナル抗体の樹立は困難であり、これまでに糖鎖を標的とした抗体医薬開発の前例はない。

一方、これまでに我々は、糖鎖合成酵素欠損マウスを同酵素の過剰発現細胞で免疫することにより、効率良く特定の糖鎖構造を特異的に認識する抗糖鎖モノクローナル抗体を作製する方法論を開発し、糖鎖抗原に対する親和性および特異性の高い良質な抗糖鎖モノクローナル抗体の作製に成功している。そこで、本研究において我々は、この方法論をさらにブラッシュアップし、世界初の抗糖鎖抗体医薬の創成に向けた革新的な抗糖鎖モノクローナル抗体作製技術を確立するとともに、医療分野の進展に資する抗糖鎖モノクローナル抗体を開発することを目標とする。

はじめに、免疫原となる糖鎖合成酵素過剰発現細胞に任意の糖鎖を効率良く発現させる工夫を凝らすなどして、モノクローナル抗体作製の個々のステップの詳細をきめ細かく見直し、抗糖鎖モノクローナル抗体作製の最適な

プロトコルの確立を行い、様々な特異性を有する新規抗糖鎖モノクローナル抗体の体系的な樹立を行う。得られた抗体の中から、組織学的検討により、疾患治療に有望な抗糖鎖モノクローナル抗体を選別し、様々なマウス病態モデルを用いて同抗糖鎖モノクローナル抗体の疾患治療効果を多面的に検討し、抗体医薬としての有用性を検証する。さらに、糖鎖に対する親和性を保持したヒト化抗糖鎖モノクローナル抗体を遺伝子工学的手法を用いて作製し、一連の動物実験の結果と合わせて製薬企業等への技術移転の準備を行う。本研究は、独自技術に基づき確実に進展することの見込まれる基礎・応用融合型の研究課題であり、本研究の成果は糖鎖を標的とした世界初の抗体医薬創成の技術基盤の確立につながることを期待される。

以下に、具体的な研究成果を記載する。

1. 抗糖鎖抗体作製技術の確立と新規抗糖鎖抗体の作製

免疫原とする細胞株に効率良く糖鎖を提示させるために、糖転移酵素とコアタンパク質の遺伝子の双方を発現する安定発現株の樹立を行った。また、ミエローマの増殖に適したウシ胎児血清のロットおよび添加するサプリメントを決定するとともに、細胞融合条件の最適化を図り、効率良く抗糖鎖モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製する条件を確立した。決定した条件を用いて実際に抗体作製を試みたところ、ユニークな特異性を有する複数の新規抗糖鎖モノクローナル抗体の樹立に成功した。

2. マウス白血球亜集団および血管内皮における糖鎖発現の解析

独自に樹立した抗糖鎖抗体を用いて、マウス白血球亜集団および血管内皮細胞における糖鎖発現の解析を行った。その結果、特定のリンパ球亜集団において特定の糖鎖抗原が発現することが明らかとなった。血管内皮における糖鎖発現解析においては、特定の糖鎖が、マウスリンパ組織血管内皮に特異的に発現することが明らかとなった。

3. 抗糖鎖抗体によるマウスリンパ球体内動態の人為的制御

得られた新規抗糖鎖抗体を用いて、マウスリンパ球の体内動態に及ぼす影響を解析した。その結果、特定のリンパ組織へのリンパ球の移行を特異的に抑制する活性を持つ抗糖鎖抗体を見出した。その結果より、同抗体は免疫疾患の治療に活用できる可能性が考えられた。

4. 抗糖鎖抗体のマウス病態モデルにおける疾患治療効果の検討

そこでさらに、マウス疾患モデルを用いて、同抗糖鎖抗体の疾患治療効果の検討を進めた。その結果、同抗体が特定の免疫疾患モデルで顕著な治療効果を示すことを見出した。

5. マウス病態モデルで高い治療効果を示した抗糖鎖抗体のヒト化

上記の免疫疾患モデルで顕著な治療効果を示した抗糖鎖抗体の重鎖・軽鎖可変部フレーム配列を、特定のヒト抗体重鎖・軽鎖可変部フレーム配列に置換し、それらをヒト抗体重鎖定常部およびヒト抗体軽鎖定常部と連結したヒト化抗糖鎖抗体を作製した。さらに、同抗体が、オリジナルのマウス抗体と同様の糖鎖結合特異性を保持すること、および免疫疾患治療効果をもつことを見出した。

以上の様に本研究では、効率の良い抗糖鎖抗体作製法を樹立するとともに、免疫疾患に対する顕著な治療効果を持つ新規抗糖鎖抗体を樹立した。さらに、同抗体のヒト化に成功し、製薬企業等への技術移転に向けた技術基盤を確立した。今後のさらなる研究開発の継続により、糖鎖を標的とする新しい抗体医薬の開発に繋がることを期待される。

The results obtained in this study can be summarized as follows:

1. Establishment of an efficient method for producing an anti-glycan antibody

We established stable cell lines expressing both particular glycosyltransferases and core proteins for an efficient presentation of a certain glycan on the immunogen cell surface. We also determined a suitable lot of

fetal bovine serum and supplements for the growth of myelomas. Cell fusion protocol was also optimized for efficient generation of hybridomas. Utilizing the conditions determined, we obtained a novel hybridoma secreting anti-glycan antibodies.

2. Analysis of the expression of various carbohydrate antigens in leukocyte subsets and endothelium in mice

Using anti-glycan antibodies we generated, we analyzed the expression of various carbohydrate antigens in leukocyte subsets and endothelium in mice. We found that a certain carbohydrate epitope is specifically expressed in a particular lymphocyte subset. We also found that a certain carbohydrate epitope is specifically expressed in blood vessels in certain lymphoid organs.

3. Control of mouse lymphocyte trafficking by an anti-glycan antibody

Effects of anti-glycan antibodies on mouse lymphocyte trafficking was analyzed. As a result, we found that a certain anti-glycan antibody efficiently inhibits migration of lymphocytes to a specific lymphoid organ.

4. Therapeutic effects of an anti-glycan antibody in mouse disease models

We further investigated the therapeutic effects of the anti-glycan antibody using mouse disease models. As a result, we found an anti-glycan antibody that shows a remarkable therapeutic effect in a specific immune-related disease model.

5. Generation of a humanized anti-glycan antibody

Based on the sequence of the abovementioned anti-glycan antibody, we generated a humanized anti-glycan antibody. We also confirmed that the humanized antibody retains the same sugar binding specificity as the original mouse antibody and has therapeutic effects on a mouse immune-related disease model.

In this study, we established an efficient method for producing anti-glycan antibodies. Using the methodology, we also generated a novel anti-glycan antibody having a remarkable therapeutic effect on an immune-related disease in mice. Furthermore, we succeeded in humanizing the antibody and established a technological basis for technology transfer to pharmaceutical companies.