

(別添)

先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業
中間評価報告書

課題分類	次世代技術に関する萌芽的研究開発課題
研究開発課題名	高性能中分子医薬のスマートデザイン基盤技術開発
代表機関名	国立大学法人東京工業大学
研究開発代表者名	門之園 哲哉
全研究開発期間	令和元年10月1日～令和4年3月31日

1. 研究概要

研究開発代表者らは、標的結合ペプチドを足場分子に組み込み、ゆらぎを適切に抑制することで、強い結合力を持つ結合ペプチド **Fluctuation-regulated Affinity Protein (FLAP)** を創出できることを示してきた。本研究開発では、従来の **FLAP** デザイン技術を発展させ、機械学習による高性能化ステップを取り入れた **FLAP** スマートデザインシステムを構築する。

2. 研究成果

1) 研究開発進捗状況

本研究開発により、**FLAP** スマートデザインシステムの構築を達成した。乳がんマーカー **HER2** を抗原とする抗体医薬 **X-Ab** の代替となる高性能化 **FLAP** のスマートデザインに取り組み、① **X-Ab** と同じエピトープに結合する **FLAP** 群を一括同定するスクリーニング技術（特許出願中）、② 同定した **FLAP** 群を発現する遺伝子の並列合成技術、③ **FLAP** 群の **HER2** への結合力を並列評価する技術、を開発した。これにより得られた数百種類の **FLAP** 群のアミノ酸配列と結合力を教師データとし、機械学習により高性能 **FLAP** を探索した。予測された高性能 **FLAP** は、**X-Ab** に匹敵する **HER2** 結合力と薬効（**HER2** 高発現細胞株の細胞増殖阻害効果）を示した。

新たに開発したスクリーニングシステムは、スマートデザインのための独自のコアテクノロジーであり、企業への導出を目指す。

2) 導出状況

導出に向けて特許出願中

3. 総合評価

優れている

【評価コメント】

標的とするタンパク質に強い結合能を有するペプチドのスクリーニング系（ペプチド探索技術）について、独自性のあるプラットフォームを確立できた点は高く評価できる。計画を上回る成果が得られている。

今後は、得られた候補ペプチドの構造活性相関や活性の最適化、ADMET 評価の体系的な構築など、製品化に向けたさらなる検討に期待する。

(別添)

先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業
事後評価報告書

課 題 分 類	次世代技術に関する萌芽的研究開発課題
研 究 開 発 課 題 名	iCAR/TCR ハイブリッド T 細胞を用いた次世代型がん免疫療法の創出
代 表 機 関 名	富山大学
研 究 開 発 代 表 者 名	小林 栄治
全 研 究 開 発 期 間	令和元年 10 月 1 日～令和 4 年 3 月 31 日

1. 研究概要

Chimeric antigen receptor (CAR)-T および T cell receptor (TCR)-T 療法は 2030 年頃にはがん医療における標準治療法となり、数兆円規模の市場を形成すると試算されている。しかしながら、CAR-T 療法は CD19 陽性 B リンパ腫など適応が限られていることなどが克服すべき重要な課題になっている。そのような状況下、我々は免疫系に重要な分子 A(特許申請のため非公開)のヒト化抗分子 A 抗体を用い、分子 A の機能を明らかにしてきた。同時に、がん抗原特異的 T 細胞から TCR 遺伝子を効率的に取得することができる方法を開発し、高機能な分子 B (特許申請のため非公開) 特異的 TCR 遺伝子を取得した。本研究開発では、我々独自の基盤技術を統合し、CAR-T と TCR-T 療法の長所を兼ねた次世代型遺伝子改変 T 細胞の開発を行う。

2. 研究成果

1) 研究開発進捗状況

まず、機能的な分子 A-CAR の *in vitro* および *in vivo* での抗腫瘍効果を検討した。その結果、分子 A を発現する細胞株に対して *in vitro* および *in vivo* において機能的な分子 A-CAR の顕著な抗腫瘍効果が認められた。また、分子 B 特異的 TCR 遺伝子の抗腫瘍効果を検討した結果、分子 B を内在に発現する細胞株への細胞傷害活性が認められた。さらに、不完全型分子 A-CAR と分子 B 特異的 TCR を発現させたハイブリッド T 細胞を作製し、*in vitro* においてハイブリッド T 細胞の抗腫瘍効果を確認した。今後は *in vivo* におけるハイブリッド T 細胞の抗腫瘍効果の検討を行う。

2) 導出状況

機能的な分子 A-CAR による顕著な抗腫瘍活性認められたため、特許出願を行

った。今後、患者検体を用いて *in vitro* および *in vivo* での抗腫瘍効果の検討を進める。世界初の CAR-T による T 細胞リンパ腫治療法の開発を目指し、医師主導型治験を念頭に進めていく。

3. 総合評価 妥当である

【評価コメント】

CAR-T と TCR-T の両方の機能特性を活かしたハイブリッド型 T 細胞を開発する研究であり、分子 B 抗原を標的として適応疾患の拡大にも務めている点は評価できる。計画通り進捗し、強い細胞傷害活性の期待できる成果が得られている。

今後は、医師主導治験へ展開するため、導入効率の改善、ハイブリッド細胞の有効性、安全性に関する更なるデータの取得に期待する。

(別添)

先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業
中間評価報告書

課 題 分 類	次世代技術に関する萌芽的研究開発課題
研 究 開 発 課 題 名	二重特異性を有する完全ヒト抗体の迅速取得とそのシームレスな最適化
代 表 機 関 名	国立大学法人東京大学大学院
研 究 開 発 代 表 者 名	瀬尾 秀宗
全 研 究 開 発 期 間	令和元年10月1日～令和4年3月31日

1. 研究概要

抗体医薬は現在バイオ医薬の主流であるが、将来的な標的抗原の枯渇や限られた作用機序に伴う限界が懸念されている。この状況を打開する次世代抗体医薬として二種の抗原を認識する「二重特異性抗体」が注目されているが、膨大な労力と時間を要する点がボトルネックとなっている。本提案では、全く新しい原理に基づき、簡便かつ迅速に二重特異性ヒト抗体を作製し、さらに得られた抗体の親和性向上も行う技術を実現する。本技術は様々な二重特異性抗体フォーマットに適用可能な汎用性の高い技術であり、次世代抗体医薬探索の大幅な加速が期待される。

2. 研究成果

1) 研究開発進捗状況

二重特異性ヒト抗体作製に必要な要素技術の開発に取り組み、いずれも成功した。またこれら要素技術を搭載し、人為的に制御しうる形で抗体遺伝子再編成を起こしうる細胞も開発した。これは二重特異性抗体を作製するためのベースとなる細胞であり、これらの細胞で抗体遺伝子再編成を誘発させてライブラリを作製し、二重特異性ヒト抗体の取得を行っている。

2) 導出状況

一部の技術について企業への導出を視野に入れた議論を実施中である。

3. 総合評価

大変優れている

【評価コメント】

簡単な作業で二重特異性が担保された完全ヒト抗体を取得可能な技術を開発し、多数の知財化可能な要素技術を創出するなど、当初設定したマイルストーンを一部上回る進捗が得られている。抗体遺伝子の活性を自在に調節する非常にユニークな世界初の技術であり、汎用性のある二重特異性抗体作製のプラットフォーム技術として確立することを望む。

今後は、臨床的有用性の検証と取得した二重特異性抗体の実用化を進めることを期待する。また、成果の論文発表にも期待する。

(別添)

先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業
事後評価報告書

課 題 分 類	次世代技術に関する萌芽的研究開発課題
研 究 開 発 課 題 名	ゲノムを標的とし転写調節可能な新奇人工核酸搭載核酸医薬の開発研究
代 表 機 関 名	国立大学法人九州大学
研 究 開 発 代 表 者 名	谷口 陽祐
全 研 究 開 発 期 間	令和元年10月1日～令和4年3月31日

1. 研究概要

本研究では、独自の人工核酸を用いて次世代技術であるゲノムを標的としたアンチジーン核酸医薬の技術基盤構築を目指します。ガンなど疾患の原因となるタンパク質の発現を人工的に制御する方法の一つに、ゲノムを構成する2本鎖DNAに3本鎖DNAを形成させる手法があります。しかし、任意の2本鎖DNAに安定な3本鎖DNAを形成させるには人工核酸の利用が必要不可欠です。そこで、人工核酸搭載アンチジーン核酸の細胞内導入技術の開発、人工核酸の効率的合成、標的配列の探索さらにはこれらを実証するための培養細胞を用いた遺伝子発現制御機能に関して詳細を検討します。

2. 研究成果

1) 研究開発進捗状況

人工核酸搭載アンチジーン核酸の細胞内利用率の向上を期待して、アンチジーン核酸と2本鎖を形成するような相補鎖を作成した。この相補鎖を化学修飾することにより核への効率的な導入を介した、遺伝子発現阻害効果の増強を明らかにした。さらに、この相補鎖に細胞内導入ユニットを結合させて、細胞導入機能の検証を行い有用な修飾ユニットを明らかにした。人工核酸の効率的な化学合成を達成し、3本鎖DNA形成可能な配列を網羅的に探索したのちに、その配列に対するオリゴヌクレオチドを複数本化学合成することに成功した。そして、天然型のアンチジーン核酸と錯体形成能を比べることにより人工核酸搭載アンチジーン核酸はより安定な3本鎖DNAを形成できることを明らかにした。細胞増殖に関わる遺伝子を標的とした人工核酸搭載アンチジーン核酸を細胞にトランスフェクションした場合、特定の遺伝子発現の阻害や細胞増殖阻害活性があることを明らかにした。以上のように、ゲノムを標的とした新規モダリティ創薬であるの開発の基盤を構築した。

2) 導出状況

無し

3. 総合評価

優れている

【評価コメント】

2本鎖DNAを直接標的として、遺伝子の転写制御を制御するという新規性・独自性の高い研究を着実に進めている。ゲノムを直接標的とするアンチジーン核酸の細胞内導入技術の開発、核移行性、細胞内移行性の検証、3本鎖DNA形成能の評価など、計画当初に設定したマイルストーンは概ね達成している。

一方で、がん化に関連する遺伝子制御のためのプロモータ領域における標的配列が現時点では限定的であり、今後は、当該方法の一般化により、より多くの遺伝子を標的とするシステムを構築すること、個体レベルで有効性を検証することに期待する。

(別添)

先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業
事後評価報告書

課 題 分 類	個別要素技術に関する研究開発課題（モダリティ・周辺技術）
研 究 開 発 課 題 名	遺伝子治療ならびにゲノム編集に適した新規ウイルスベクターの開発
代 表 機 関 名	学校法人埼玉医科大学
研 究 開 発 代 表 者 名	三谷 幸之介
全 研 究 開 発 期 間	令和元年10月1日～令和4年3月31日

1. 研究概要

アデノ随伴ウイルスベクター（AAV）は多くの遺伝子治療やゲノム編集治療の臨床プロトコールで用いられているが、導入できる DNA サイズが 4.5 kb までという大きな制約がある。そこで、この弱点を補う新規ベクターを開発する。本研究では、この新規ベクターの **prime editing** や **base editing** といった新たなゲノム編集技術のためのベクターとしての利点や、大きな DNA を鋳型として運べる遺伝子修復ドナーベクターとしての有用性を検証する。さらに、X 連鎖重症複合免疫不全症（SCID-X1）モデルマーマーモセットを対象とした *ex vivo* ゲノム編集治療を行い、ヒトへの応用の可能性について検証する。

2. 研究成果

1) 研究開発進捗状況

- **primer editor** と **pegRNA** を同時に発現するベクター、**Cas9** と **gRNA** を同時に発現するベクター、約 10kb の大きな治療遺伝子を搭載したベクターなど、計十数種類の新規ベクターを作製し、それぞれについて高濃度ベクターを精製した。**prime editing** への応用に関してはヒト細胞株を用いて効率を検討したところ、これまでに報告された中でも最高レベルの 50%を越える **prime editing** を達成した。
- ヒトならびにマーマーモセットの **IL2RG** 遺伝子座を標的とした相同組換え修復用のドナーベクターを、新規ベクターと **AAV** とで作製した。**K562** 細胞やヒト **CD34** 陽性細胞を用いた実験では、ある標的染色体領域では新規ベクターの方が、その他の領域では **AAV** ベクターの方が高い修復効率を示した。
- その一方で、両ベクター共に半数近い例でドナーベクターが複数繋がって標的染色体部位に組み込まれていた。そこで、それを解決するために新たなネガティブ選択法を開発し、不正確に組み込まれたドナーベクターを除去することが出来た。
- **SCID-X1** マーマーモセットを新たに 2 個体作出した。また、マーマーモセットから低い侵襲

性で骨髄細胞を採取する方法を確立した。今後、これらの遺伝子ノックアウトマーカーセットを用いて、新規ベクターによる *ex vivo* ゲノム編集治療を試みる。

2) 導出状況

なし

3. 総合評価

やや不十分である

【評価コメント】

ゲノム編集治療における HDR の鋳型となるドナーDNA 導入ベクターの開発に関する研究内容であり、**prime editing** 効率が 50%を達成したことは評価できる。しかしながら、研究開始当初に設定されたマイルストーンが一部未達成となっている。

今後は、**HDR** 効率の改善を含め、課題解決のための焦点を絞って研究を推進し、**AAV** に対する優位性が示されることを期待する。

(別添)

先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業
事後評価報告書

課 題 分 類	次世代技術に関する萌芽的研究開発課題
研 究 開 発 課 題 名	生細胞内セントラルドグマ分子の光操作
代 表 機 関 名	国立大学法人東京工業大学
研 究 開 発 代 表 者 名	湯浅 英哉
全 研 究 開 発 期 間	令和元年10月1日～令和4年3月31日

1. 研究概要

がん治療を目的とし、核酸およびタンパク質レベルでグルコース輸送体 (GLUT1) を光によりノックダウンする技術を開発する。光による時空間制御により、選択性の向上や副作用の軽減を狙う。

2. 研究成果

1) 研究開発進捗状況

増感剤としてニトロビフェニル誘導体 (NBP) を含むアンチセンス RNA (NBPU-RNA) を合成した。NBPU-RNA は、グルコース輸送体 (GLUT1) をコードする配列に対するアンチセンス配列を持ち、分解酵素耐性と自己酸化を防ぐ工夫をほどこしてある。NBPU-RNA の前立腺がん細胞株 PC-3 に投与し光照射を行ったところ、GLUT1 の発現が完全阻止されることを示す予備的結果が得られた。また、NBPU-RNA は変異原性および肝毒性を示さないことがわかった。

また、タンパク質レベルの光ノックダウンについては、GLUT1 のリガンド Lg と増感剤 PS の複合体を用いることにより、3種のがん細胞 (HeLa、A549、HepG2) に対して GLUT1 の 100%ノックダウンを検証した。また、Lg-PS は同じがん細胞に対して高い抗腫瘍効果を示した。

2) 導出状況

「小型光増感剤結合アンチセンスオリゴ核酸を用いた光ノックダウン法」について特許出願を行った。Lg-PS によるタンパク質光ノックダウンについては特許申請準備中である。今後 PMDA へ相談後、企業への導出を検討したい。

3. 総合評価

妥当である

【評価コメント】

施設の整備等を含めて高価な放射線の医療技術の代用として、光技術を用いた新たながん治療法開発という点で独自性の高い研究であり、「小型光増感剤結合アンチセンスオリゴ核酸を用いた光ロックダウン法」について特許出願済みである。

一方で、当初設定したマイルストーンの達成状況に若干の遅れが見られており、NPBの変異原性についても、更なる検討が必要と考える。光の深達度やDDSに関する課題も併せて検討すべきと考えるが、未だ未着手である。興味深い技術ではあるので、実用化に向けて有効性、安全性のデータを積み重ねてほしい。