

日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

補助事業課題名: (日本語) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業

(プログラム名) (英語) Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間: 平成29年4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名: (日本語) 加藤 幸成

(英語) Yukinari Kato

補助事業担当者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立大学法人東北大学・大学院医学系研究科・教授

(英語) Tohoku University Graduate School of Medicine, Professor

II 補助事業の概要

(1) 支援

本課題では、東北大学が持つ膜タンパク質生産技術および独自の抗体関連支援技術を用い、あらゆる抗体生産に関する支援と高度化を実施した。支援においては抗体関連高度開発支援を実施した。あと一步で製薬企業に導出できる課題、前臨床試験・臨床試験に供する課題、ハイレベルなサイエンスを目指す課題等を積極的に支援し、プロジェクト全体の成果向上を目指した。依頼者からのすべての相談に対し多角的かつ包括的なコンサルティングを実施した。抗体大量生産支援においては、依頼者からの抗体産生細胞を独自の複数の培養技術から最も産生効率の良い方法を迅速に選び出し、最速で必要量を産生した。抗体遺伝子クローニング支援においては、構造生命科学における立体構造解析や scFv 作製の際に必要な CDR 配列の迅速解読を行い、リコンビナント抗体作製や抗体遺伝子改変を実施した。抗体医薬開発を限られた時間と予算の中でシームレスにスピーディーに行うことは喫緊の課題であり、東北大学が実施する支援のメニューに積極的に取り入れた。プロジェクト期間内の支援総数は 203 件となった。以下、2 件の支援案件について紹介する。

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構（量研）の支援案件では、悪性中皮腫に対する新しい α 線標的アイソトープ治療薬候補の開発を行った。悪性中皮腫に対する α 線放出核種を用いた治療薬候補の開発に成功し、動物実験によりその抗がん効果を明らかにした。中皮腫は、胸膜、腹膜などにある中皮から発生する悪性腫瘍で、80-85%が胸膜から発生する。中皮腫の原因のほとんどは、アスベストばく露である。2005 年のクボタショックを契機に大きな社会問題となった。日本国内における悪性中皮腫による死亡者数は増加の一途をたどっている。アスベストの輸入及び使用量は 1970～1980 年代がピークで、2004 年に全アスベストに対して原則使用禁止となっ

たが、アスベストばく露から発症までの潜伏期間が 25～50 年とされていることから、悪性中皮腫の発生ピークは 2030 年頃、罹患者数は年間 3,000 人に及ぶと予測されている。診断される患者の 7 割以上が進行がんであり、有効な治療法がなく予後が悪いため、新たな治療法が望まれている。量研では、放射線の飛ぶ距離が細胞数個分と短く、当たった細胞を殺傷する能力が高い α 線を放出する核種 ^{225}Ac を加速器で効率よく製造することに成功している。 ^{225}Ac は、近年、前立腺がん特異的膜抗原 (PSMA) を標的とした前立腺がんが注目されている標的アイソトープ治療用の放射性同位体である。この ^{225}Ac を中皮腫細胞だけに届けることができれば、飛距離の短い α 線により、周囲の正常細胞を傷つけることなく、効率よくがん細胞を殺傷することが可能である。そこで、中皮腫細胞の細胞表面に多く存在しているポドプラニンに結合する抗体 NZ-16 を ^{225}Ac で標識し、 α 線標的アイソトープ治療薬候補として ^{225}Ac 標識 NZ-16 を開発した。ポドプラニンは中皮腫の中でも特に悪性度の高い肉腫型でも高発現しているタンパク質で治療標的として有望である。 ^{225}Ac 標識 NZ-16 を中皮腫のモデルマウスに 1 回投与したところ、腫瘍サイズを縮小させ、腫瘍をほぼ消失させる効果があることを確認した。また、生存期間を延長させることも確認した。一方で、副作用の指標となる体重減少や病理所見は認められなかった。さらに、 α 線と同様がん細胞殺傷能力を有する β 線を放出する放射性同位体イットリウム 90 (^{90}Y) を付加した ^{90}Y 標識 NZ-16 と ^{225}Ac 標識 NZ-16 の抗腫瘍効果を比べたところ、 ^{225}Ac 標識 NZ-16 は ^{90}Y 標識 NZ-16 よりも高い腫瘍縮小効果があることを確認した。これらの研究成果から、悪性中皮腫に対して、 ^{225}Ac 標識 NZ-16 による α 線標的アイソトープが副作用の少ない効果的な治療法となることが期待される。現在、臨床応用に向けて関係機関と協力して準備を進めており、First-in-human 試験の実施を目指している。

横浜市立大学の支援案件では、タンパク質の抗体ラベリング技術の改良を行った。タンパク質の立体構造解析は、生命現象の解明だけでなく、創薬においても非常に重要な研究手法である。その解析において、抗体は有用な実験ツールとして用いられてきた。特にタンパク質の抗体によるラベリングは、X 線結晶解析では、結晶になりにくいタンパク質の結晶化を促進させる効果があり、電子顕微鏡解析では、低コントラストの画像から標的のタンパク質を見つけ出す目印として役立つ。しかしながら、抗体でラベリングを行うには、標的のタンパク質を直接認識する抗体があることが前提で、適用範囲は限られていた。この課題に対し、新たな抗体ラベリング技術の開発に取り組んできた。これまでに、東北大学が開発した PA タグと呼ばれる 12 残基のアミノ酸配列を標的のタンパク質に移植し、この PA タグと強固に結合する NZ-1 抗体でラベリングする技術を開発した。この PA タグの移植部位を最適化することで、標的タンパク質に NZ-1 抗体を安定に結合させられることが示されたが、PA タグの移植やその NZ-1 抗体との結合によって標的タンパク質の一部の構造が変化してしまうことも明らかになっていた。そこで本支援案件では、タグの長さを伸ばすことで移植した際の標的タンパク質の構造変化を抑えることを試みた。その結果、PA タグの N 末端側にアミノ酸残基を 2 つ付け加えた PA14 タグでは、標的タンパク質を天然の構造に近い状態に維持できることが示された。標的タンパク質に PA14 タグを移植して X 線結晶解析を行ったところ、PA14 タグは NZ-1 抗体と結合すると末端同士が近づいてリング状の構造をとること、そして NZ-1 抗体が結合しても標的タンパク質の立体構造がほとんど壊れないことが確かめられた。さらに分子動力学シミュレーションからも、PA14 タグを移植した標的タンパク質の構造が安定に維持されることを確認した。そして、PA14 タグを細胞膜の中で働くタンパク質に移植し、NZ-1 抗体を結合させて負染色電子顕微鏡解析を行うことで、標的のタンパク質の構造情報を取得することにも成功した。今回の研究から、PA14 タグは標的タンパク質に移植して抗体を結合させるのに適した配列であることが確かめられたが、その一方で、標的タンパク質に結合した NZ-1 抗体の向きが完全には固定されず、揺らぐ場合があることも分かった。今後、標的タンパク質の構造は壊さずに抗体の向きを固定できるようになれば、クライオ電子顕微鏡などを用いて精密に立体構造を調べることが可能になると期待される。

(2) 高度化

「cell-based 抗体作製技術」を確立し、免疫原作製から抗体作製までの期間を短縮し、効率の良い抗体作製技術を確立した。1 次スクリーニングをハイスループットのフローサイトメトリーで実施し、構造認識抗体を確実

に捕まえた。また、我が国独自の「糖鎖均一化発現細胞」を樹立し、構造生命科学に限らず、多くのライフサイエンス研究に有用な糖鎖不全株の樹立を目指し、細胞バンクを充実させた。さらに、東北大学が所有するタグシステムの精密化研究を実施し、抗体バンクの維持・運営を実施した。BINDS の謝辞入りの 191 件の論文を投稿し、56 件の企業導出に成功した。

(2) -1 : タンパク質精製を要しない高度抗体作製技術の開発

本課題では、「cell-based 抗体作製技術 (CBIS 法)」により、免疫原作製から抗体作製までの期間を短縮し、効率の良い抗体作製技術を確立することを目指した。最先端のスクリーニング機器のない時代には、細胞免疫を用いてもハイスループットのスクリーニングが行えなかったが、一連の作業を効率的に実施するための機器については、これまでの AMED プロジェクトにおいて準備が整っていた。そこで、古典的技術と最新機器を組み合わせた CBIS 法を、本プロジェクトで高度化技術として開発した。本課題においては、スピード、質、量がすべて高い CBIS 法を応用できるように技術開発を行った。CBIS 法を用いて、CD20, CD44, CCR3, CCR6, CCR8, CCR9, HER3, PDPN, TROP2, KLRG1, TIGIT, EpCAM 等に対する抗体作製を成功させ、複数の論文発表を行なった。

(http://www.med-tohoku-antibody.com/topics/BINDS_CBIS.htm)

(2) -2 : 糖鎖不全株の拡充と細胞バンクの維持・運営

本課題では、PDIS において作製した 30 種類以上の糖鎖不全株等の他、O 型糖鎖の基本となる複数の糖転移酵素の糖鎖不全株を作製し、構造生命科学に限らず多くのライフサイエンス研究に有用な糖鎖不全株の樹立を目指し、未解明の生命現象の解明に寄与することを目的とした。現在、ATCC から入手可能な糖鎖不全株は Lec1 (N 型糖鎖不全株)、Lec2 (シアル酸不全株)、Lec8 (O 型糖鎖不全株) の 3 種類であり、糖鎖が部分的に付加された不完全な糖鎖不全株である。我々の糖鎖不全株は、185 種類の糖鎖遺伝子プロファイリングに基づき、CRISPR/Cas9 システムにより糖鎖遺伝子をノックアウトした。さらに、複数の糖鎖遺伝子を同時にノックアウトすることにより、独自の糖鎖不全株も作製した。本課題では、合計 25 種類の細胞株 (BINDS-1~25) を新たに樹立し、細胞バンクに登録し、すぐに支援にも活用した。

(細胞バンク : http://www.med-tohoku-antibody.com/topics/001_paper_cell.htm)

(2) -3 : タグシステムの開発と抗体バンクの維持・運営

本課題においては、PDIS において開発した PA タグシステム、革新的バイオにおいて開発した MAP タグ、RAP タグのさらなる精密化研究を実施した。これらのタグに対する抗体を登録した抗体バンクを PDIS で確立したが、常にタグ抗体のストックがある状態を維持している。平成 30 年度までに、PA タグ抗体、MAP タグ抗体、RAP タグ抗体をすべて 1,000mg 以上生産し、支援に供するためにストックを行い、令和元年度には、新規タグシステムとして BAP タグを開発し、フローサイトメトリーやウェスタンブロットを使用した膜タンパク質の発現検証に有用であることを明らかにした。令和 3 年度には、SARS-CoV-2 に対する複数の抗体を樹立し、さらにそれらを組み合わせた二重特異的抗体を作製し、抗体バンクに登録した。これらの抗体についても、すぐに全国の感染症学専門の研究者への譲渡を開始し、診断や治療を目指して共同研究を実施中した。また、新規のエピトープ解析法 (REMAP 法) の開発に成功し、CD20, CD44, EGFR, HER2 に対する抗体等、これまでエピトープが不明の抗体の解析を行い、複数の原著論文として発表した。

(抗体バンク : http://www.med-tohoku-antibody.com/topics/001_paper_antibody_PDIS.htm)

(1) Support

In this task, we provided support and development for all antibody production using our unique antibody-related support technology and the membrane protein production technology owned by Tohoku University. In terms of support, we provided antibody-related advanced development support. With the aim of improving the outcomes of the entire project, we actively supported research subjects that can be out-licensed to pharmaceutical companies with one further step, subjects proceeding to preclinical

and clinical trials, as well as subjects aiming for high-level science. We provided multifaceted and comprehensive consulting for all consultations from requestors. In support for mass production of antibodies, we have selected the most efficient method from a variety of original culture techniques for producing antibody-producing cells of the requestors without a delay, and produced the required amount at the fastest speed. In support for antibody gene cloning, we performed rapid decoding of the CDR sequence required for three-dimensional structural analysis and scFv production in structural life science, and carried out recombinant antibody production and antibody gene modification. It is an urgent issue to seamlessly and speedily develop antibody drugs within a limited time and budget, and we have actively incorporated this approach into the support menu provided by Tohoku University. The total number of supports during the project period amounted to 203.

(2) Development

We set up a "Cell-Based Immunization and Screening (CBIS) technology", reduced the time taken from immunogen production to antibody production, and established an efficient antibody production technology. Primary screening was performed with high-throughput flow cytometry to ensure that structure-recognizing antibodies were fully captured. In addition, we have established our country's original "homogenized sugar chain expressing cells" and enriched the cell bank with the aim of establishing sugar chain deficient strains that are useful not only for structural life sciences but also for many life science researches. Furthermore, we conducted a refinement study of the tag system owned by Tohoku University, and maintained and operated our antibody bank.

(2)-1: Development of advanced antibody production technology that does not require protein purification

In this task, we aimed to reduce the time taken from immunogen production to antibody production by "Cell-Based Immunization and Screening (CBIS method)" and to establish an efficient antibody production technology. When we had no state-of-the-art screening equipment, high-throughput screening could not be performed using cell-mediated immunity, but the equipment for efficiently performing a series of tasks has now been prepared and set up to be used since the AMED project. Consequently, the CBIS method, which combines the conventional technology and the latest equipment, was developed as an advanced technology in this project. In this task, we developed the technology so that the CBIS method, which has high speed, quality, and volume, can be applied. Using the CBIS method, we succeeded in producing antibodies against CD20, CD44, CCR3, CCR6, CCR8, CCR9, HER3, PDPN, TROP2, KLRG1, TIGIT, EpCAM, etc., and published a number of papers.

(2)-2: Expansion of sugar chain deficient strains and maintenance/operation of cell bank

In this task, we produced glycosyltransferases strains of multiple glycosyltransferases that are the basis of O-type sugar chains in addition to more than 30 types of glyco-deficient strains produced under PDIS, aiming for establishment of glyco-deficient strains useful for life science researches not limited to structural life sciences, and to contribute to revelation of unexplained life phenomena. Currently, there are three types of glycan-deficient strains available from ATCC: Lec1 (N-type glycan deficient strain), Lec2 (sialic acid deficient strain), and Lec8 (O-type glycan deficient strain), and they are incomplete sugar chain deficient strain to which sugar chains are partially added. Our glycan-deficient strains were knocked out of glycan genes by the CRISPR/Cas9 system based on 185 glycan gene profiling. Furthermore, by knocking out multiple sugar chain genes at the same time, unique sugar chain deficient strains were also produced. In this task, a total of 25 types of cell

lines (BINDS-1 to 25) were newly established, registered in the cell bank, and immediately utilized for support.

(2)-3: Development of tag system and maintenance/operation of antibody bank

In this task, we conducted further refinement research on the PA tag system developed under PDIS, the MAP tag developed under Innovative Bio, and the RAP tag. We had established an antibody bank in which antibodies against these tags were registered under PDIS, and the stock of tagged antibodies has been continuously maintained. By 2018, we produced 1,000 mg or more of PA tag antibody, MAP tag antibody, and RAP tag antibody, stocked them for support, developed BAP tag as a new tag system in 2019, and found that they are effective for expression verification of membrane proteins using flow cytometry and Western blotting. In 2021, multiple antibodies against SARS-CoV-2 were established, and some bispecific antibodies were produced by combining them and registered in the antibody bank. Immediately, these antibodies were also transferred to researchers specialized in infectious diseases nationwide, and several joint research projects were conducted with the aim of diagnosis and treatment for the infection. In addition, we succeeded in developing a new epitope analysis method (REMAP method), analyzed antibodies whose epitopes were unknown, such as antibodies against CD20, CD44, EGFR, and HER2, and published the outcomes as multiple original papers.