

日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 安定構造を持つ網羅的低分子ヒト抗体生成モデル
(英語) Generative model of stable small molecule human antibody

研究開発実施期間: 令和元年10月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 石川 俊平
(英語) Ishikawa, Shumpei

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人東京大学・大学院医学系研究科・教授
(英語) The University of Tokyo, Graduate School of Medicine, Professor.

II 研究開発の概要

優れた安定性などの物性・親和性に寄与する抗体アミノ酸配列の特性は極めて複雑なルールの集合体と考えられ、一般的に定式化された規則性は確立されていない。そのため抗体の配列・構造の最適化は、低分子化やヒト化等において抗体誘導体医薬品開発の成否を左右するにも関わらず、技術的に困難な過程となっている。安定性を含む物性・親和性などに優れた抗体の特性を見出すことは、抗体誘導体医薬品開発全体に波及効果の大きい基盤技術になることが期待される。

本研究開発計画の目的は、研究代表者グループが開発した臨床試料を用いたシングルセルレベルでのヒト抗体レパトア配列の取得技術を用いて大量のヒト抗体配列を取得し、研究分担者らが有する低分子化抗体の物性評価技術による実測データを加味した抗体配列の深層学習技術などの計算科学的技術を用いることで、安定した構造を持つ抗体分子の特徴を捉えるモデル技術等を構築することである。より具体的には、シングルセル免疫レパトアシーケンスによって独自性の高いヒト抗体配列情報を大量に取得するとともに、計算科学的手法を用いて生体内で成熟したヒト抗体クローンが有する固有のアミノ酸配列の規則性について解析し、それらのヒト抗体配列情報および計算科学をもとにしたアミノ酸置換抗体配列について、低分子化抗体としての再構築と物理化学的物性評価の実測を進めた。それらの実験を基盤とした計算科学と物性評価のフィードバックによって、安定化構造を持つヒト抗体の特徴抽出を狙ったモデル技術の洗練化を進めた。また、研究代表者らが独自に見いだしていた糖

鎖に対する腫瘍特異的抗体クローン等については、アミノ酸改変抗体を設計することで安定化抗体開発の検討を進めた。さらに、そのようなモデル技術を用いて設計された網羅的な低分子化抗体ライブラリを用いた機能スクリーニングを実施し、新しい機能性抗体の探索を進めた。

本研究開発計画は以下4つの研究開発項目に沿って進められ、それぞれ以下の成果が得られた。

研究開発項目（1）シングルセル抗体レパトアシーケンス

本研究開発項目では、新鮮手術試料および凍結手術試料等に対するシングルセル免疫レパトアシーケンス技術の洗練化を進め、多量の免疫グロブリン・レパトアデータが安定して得られる実験系を樹立した。特に凍結試料を用いた解析が可能になったことで、臨床的あるいは病理学的に特徴的な症例を選択して解析することが可能になり、本研究開発計画の幅を広げることができた。樹立した実験系によって、多様なヒト臨床腫瘍組織に浸潤するB細胞・形質細胞、およびヒトがん細胞株等で免疫刺激したヒト型抗体産生マウスから単離したB細胞に対してシングルセル免疫レパトア解析を実施し、シングルセルレベルで網羅的かつ独自性の高いヒト抗体レパトア配列情報を大量に取得した。ヒト腫瘍組織に特異的に存在する抗体クローンを多く取得することができたことに加えて、ヒト抗体レパトアが有する可変領域アミノ酸配列の固有の規則性に関する特性を抽出するために必要な大量のレパトア配列情報の構築を進めることができたと考えられる。

研究開発項目（2）低分子化抗体の体系的物性評価

本研究開発項目では、研究開発項目（1）において順次取得された腫瘍特異的ヒト抗体クローン等のレパトア配列情報、および一部それらを基盤とした計算科学的解析によって研究開発目標（3）で設計された低分子化抗体等について、実際の組換えタンパクとして網羅的に発現させたうえで物理化学的物性評価を実施し、その実測データを得ることを目標とした。研究期間の前半においては、組換えタンパクとして低分子化抗体を発現させるための包括的プラスミド・ライブラリの構築系を樹立するとともに、発現・精製した低分子化抗体に対する多角的な物理化学的物性評価系のプロトコルの検討を進めた。研究期間の後半では、低分子化抗体の発現と物性評価を実施し、網羅的に実測データの蓄積を進めた。大量の抗体分子に関する物性評価の実測データを研究開発項目（3）で開発されるモデル技術へとフィードバックすることができ、モデル技術の洗練化が継続的に進められた。

研究開発項目（3）安定構造を持つ低分子ヒト抗体生成モデルの構築

本研究開発項目では、臨床腫瘍試料やヒト型抗体産生マウスにおけるシングルセル免疫レパトア解析によって研究開発項目（1）で取得された多量のヒト抗体レパトア配列情報を基盤として、研究開発目標（2）における物性評価実測値を取り入れることによって、安定構造を有するヒト抗体の特徴抽出を狙った基盤モデル技術の構築を進め、優れたヒト抗体が持つ特性のルール性を見出すことを目標とした。

研究期間前半においては、研究開発目標（1）で取得された大量のヒト抗体レパトア配列情報を基盤として、重鎖・軽鎖ペアのヒト抗体可変領域アミノ酸配列を計算科学的解析に適応しやすい形式で正確にマッピングする手法を検討し、V/(D)/J フレームへのアラインメントや配列の変化(somatic hypermutation)の抽出法について洗練化を進めた。また、多量のヒト抗体配列データから類似クローンを抽出するアルゴリズムと、各リネージ内における重鎖・軽鎖の正確な塩基置換を捉えた計算科学的解析を用いた somatic hypermutation の系統樹解析アルゴリズムを検討した。さらに、多量のヒト抗体配列について分子動力学にもとづいた構造シミュレーションを加味した検討を加えるための解析系を樹立することができた。これらの進捗によって、ヒト抗体が有する固有のアミノ酸配列特性について、次世代シーケンスで得られたヒト抗体レパトア配列情報を効率よく計算科学的解析に供することが可能になった。

研究期間後半においては、研究開発項目（1）で取得された多量のヒト抗体レパトア配列について、研究開発項

目(2)による物性評価の実測データを取り込んだ解析を進めることで、安定した抗体が有するアミノ酸配列の特徴抽出を狙ったモデル技術の洗練化を進めることができた。さらに、本研究開発計画で開発・洗練化されたモデル技術をベースにさまざまなアミノ酸置換等を伴う低分子化ヒト抗体配列が設計され、研究開発項目(2)における物性評価とのフィードバックを進めることができた。

研究開発項目(4) モデル技術を用いたアプリケーション

本研究開発項目では、研究開発項目(1)～(3)で開発が進められた安定構造を有するヒト抗体についてのモデル技術を用いることで、研究代表者らが独自に見いだした抗がん糖鎖抗体をはじめとするさまざまな抗体について、安定低分子化あるいは高機能化を行うことを目標とした。さらに、本研究開発計画で開発されたモデル技術を用いて設計した網羅的な低分子化ヒト抗体ライブラリを用いた機能スクリーニングを実施することによって、高機能ヒト抗体を単離することを目標とした。

より具体的には、研究代表者らが新規の抗腫瘍ヒト抗体として独自に見出していた糖鎖がん抗原に対するヒト抗体をリードとして、研究開発項目(1)～(3)で得られたレパトア配列情報に関するモデル技術を基盤として複数のアミノ酸改変抗体を設計し、機能評価等を進めることができた。さらに、研究開発項目(1)のシングルセル抗体レパトア解析で取得した多量のヒト抗体配列情報から、研究開発項目(2)および(3)で開発されたモデル技術を用いた構造最適化を含む大規模な低分子抗体のプラスミド・ライブラリを構築することができ、研究開発計画に沿って機能スクリーニングの実験プロトコルを確立することができた。新しいさまざまな機能性抗体を同定することを狙って、ヒト細胞株を用いた機能スクリーニングを実施することができ、目標の一端を捉えることができた。

総合的にみて本研究開発計画は順調に進められ、当初の目的を達成する成果が得られたと考えられる。臨床腫瘍組織およびマウスモデルに対するシングルセル免疫レパトアシーケンスの実験系を洗練化し、それによって多量かつ独自性の高いヒト抗体アミノ酸配列情報を取得することができた。腫瘍特異的抗体クローンを多く取得することができただけでなく、ヒト抗体レパトアが有する可変領域アミノ酸配列の固有の規則性に関する特性を抽出するために必要な大量のレパトア配列情報を蓄積することができた。これらのデータベースを基盤として、安定した抗体が有するアミノ酸配列の特徴抽出を狙ったモデル技術の開発を進めることができ、さらに、さまざまな抗体分子の実際の物性評価実測データからのフィードバックを反映させることによって、モデル技術の洗練化を進めることができた。また、そのようなモデル技術を基盤として設計された網羅的な低分子化抗体ライブラリを用いた機能スクリーニングを包括的に進めることによって、新しい機能性抗体の一端を捉えることができた。これらの研究成果については、独自に見出した抗がん糖鎖抗体の今後の開発に繋がられることにとどまらず、さまざまな抗体分子の低分子化や、現在活発に開発されている多様な分子構造を含む抗体誘導体医薬品開発へも応用可能性があり、今後のさらなる展開が期待できる。

II. Summary of the research project

This research project progressed according to the following four main projects, each yielding the following achievements:

Research and Development Project (1): Single Cell Immunoglobulin Repertoire Sequencing

We refined single-cell immunoglobulin repertoire sequencing techniques for fresh and frozen surgical samples, establishing a stable experimental protocol for generating a large volume of immunoglobulin repertoire data. Particularly, the capability to analyze frozen samples has broadened

the scope of our research by allowing the selection of clinically or pathologically unique cases for study. Our established protocol enabled comprehensive and unique human antibody repertoire sequencing at the single-cell level from a variety of B cells/plasma cells infiltrating in tumor tissues and B cells isolated from humanized antibody-producing mice which were immunostimulated with human cancer cells.

Research and Development Project (2): Systematic Physicochemical Evaluation of Antibodies

This project focused on the evaluation of physicochemical properties of small molecule antibodies which were identified and/or designed in Projects (1) and/or (3) based on our repertoire sequences and subsequent computational analysis. We established a comprehensive plasmid library for expressing these antibodies and developed protocols for their systematic physicochemical assessment. We conducted systematic expression and physicochemical evaluations, accumulating empirical data on antibody properties, which was fed back into the computational technologies developed in Project (3).

Research and Development Item (3): Development of Computational Technologies for Generating Small Molecule Antibodies with Stable Structures

Based on the large human antibody repertoire datasets obtained in Project (1), and incorporating empirical physicochemical property data from Project (2), this project aimed to refine the computational technologies for identifying features of stable antibodies. We developed algorithms for extracting somatic hypermutations and accurately aligning sequences to V/(D)/J frames, which facilitated computational analysis adapted to next-generation sequencing data. The integration of molecular dynamics-based structural simulations enhanced our analysis, enabling efficient use of human antibody repertoire sequences in computational studies.

Research and Development Item (4): Applications Using Computational Technologies

We aimed to use our computational technologies developed in this research project to enhance the stability or functionality of various antibodies, including our own lead anti-tumor human antibodies which target cancer-specific carbohydrate. Comprehensive functional screening using small molecule human antibody library which was designed using our computational technologies identified potential functional antibodies.

Overall, this research plan was executed as planned, obtaining significant achievements. We refined the experimental system for single-cell immune repertoire sequencing for clinical tumor tissues, gathering unique and extensive human antibody repertoire sequence datasets. Our datasets enabled the development of computational technologies aimed at identifying the features of stable antibodies, which, combined with empirical data from physicochemical evaluation of the actual antibodies, refined these computational tools further. The functional screening of engineered antibodies could potentially identify functional antibodies, promising further research developments with the advancements of this research project.