

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 補助事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
2. 補助事業課題名：動物細胞発現系を用いた高難度タンパク質生産支援と、糖鎖工学・抗体工学を用いたその高度化（高付加価値抗体作製と糖鎖細胞工学）
3. 研究開発代表者：国立大学法人東北大学 大学院医学系研究科 教授 加藤幸成
4. 研究開発の成果

目的及び内容

本課題では、創薬等に重要なタンパク質の構造機能解析を飛躍的に加速するために、ヒトタンパク質などの困難なターゲットの発現精製を動物細胞発現系を利用して生産するパイプラインを構築・提供し、高度な発現精製技術の共有とさらなる技術革新によるソリューションを確立するとともに、新規高付加価値分子の創成、試料評価法の改善、糖タンパク質生産用細胞株の樹立などを通して将来のさらなる汎用化、共有化、および高難度ターゲットの構造解析や医薬開発に大きく寄与する新規技術を開発し、「支援」と「高度化」をすることを目的とする。このため、国立大学法人大阪大学、国立大学法人東北大学、および公立大学法人横浜市立大学は共同で事業を行う。

国立大学法人東北大学では、構造・機能解析に資する高付加価値抗体の創成やそのための革新的な方法論の確立、そして糖鎖細胞工学を駆使した糖タンパク質生産法に関わる研究開発を実施する。

成果概要

支援

①抗体作製支援

結晶化のみならず様々な機能解析において、マウスやラットのモノクローナル抗体は大きな威力を発揮する。しかしながら、ネイティブタンパク質に高親和性かつ高特異度で結合する抗体の作製は非常に困難な作業である。H27年度は、分担研究者が持つ豊富な抗体作製ノウハウを用い、コンサルテーション及び抗体作製支援を4件実施した（課題1184、課題1190、課題2003、課題2009）。

②抗体の遺伝子改変と抗体精製支援

抗体の遺伝子改変と抗体精製支援については、H27年度は7件実施した。外部研究者が作製したマウスやラットのモノクローナル抗体について、構造決定や組み換え抗体作製のために必要な可変領域の遺伝子クローニング（課題2122）やキメラ抗体への改変（課題2158）、キメラ抗体の精製（課題2125）、抗体のサブクラス決定と精製（課題2148）、動物医薬に必要な大量の精製抗体の取得（課題2142、課題2157、課題2183）を実施した。

高度化

③超高親和性、高特異性のアフィニティータグシステムの開発

分担研究者がH18年にラットで作製したモノクローナル抗体（クローン：NZ-1）は、抗原であるリニアペプチドを超高親和性で認識し、その結合は数分で飽和する。さらにNZ-1抗体はCHO細胞など発現ホストとして多用される細胞株の内在性タンパク質に対して一切反応性を示さず、市販・既存のタグ抗体には全く見られない特徴を有している。H26年度までに、NZ-1抗体とその抗原ペプチド配列（PAタグ）を用いた新規のアフィニティー精製システムをほぼ確立し、H26年度には、事業内外で1g以上のNZ-1抗体を供給した。H27年度には、高まる需要に対応するため、NZ-1抗体の生産性の向上を目指した。

④高付加価値抗体の迅速作製技術の開発

糖鎖をエピトープに含む高親和性のIgG抗体は極めて樹立しにくいことが知られている。東北大学では、「特定の糖鎖をタンパク質上に提示した抗原を使用する」ことが最重要であるという独自の知見をもとに、特殊糖タンパク質生産用細胞株の探索を実施中である。293T細胞やCHO細胞のような「タンパク質発現に有利な細胞株」という観点ではなく、「特定の糖鎖構造を付加するための細胞株」の探索のため、細胞ごとに糖転移酵素のプロファイリングをデータベース化することが必要である。H26年度までに、185種類以上の糖転移酵素に対するプライマーセットを用いて、ヒトがん細胞株を中心に糖転移酵素のプロファイリングを行った。プロファイリングの結果、膠芽腫細胞株LN229を選び出し、ポドプラニン遺伝子を導入した結果、がん特異的抗原がポドプラニンに付加されることを確認した。H27年度は、このがん特異的抗原が付加された膜タンパク質に対するがん特異的抗体の作製法を確立した。

⑤構造解析のための新規糖タンパク質発現用動物細胞株の樹立

糖タンパク質において、糖鎖は安定性や生理活性に重要な役割を持っている反面、構造解析に関しては化学的不均一性の原因であり、また結晶への分子パッキングを妨げる障害物でもある。この問題の解決の際に最も重要なのが、各種の「糖鎖修飾変異細胞株」の利用である。H26年度には、我が国独自の「糖鎖均一化発現細胞」として、HEK-293T細胞のGn-T1遺伝子をTALENの技術を用いてノックアウトした細胞（PDIS-1と命名）を樹立した。さらに、項目③で実施中のPAタグシステムに使用しているNZ-1抗体の抗原（PDPN）が、HEK-293T細胞やCOS-7細胞に高発現しているため、HEK-293T細胞やCOS-7細胞のPDPN遺伝子をCRISPR/Casの技術を用いてノックアウトした細胞（それぞれ、PDIS-2、PDIS-4と命名）を樹立した。H27年度は、さらに糖鎖均一化発現細胞を樹立した。

主な原著論文 (H27年度)

1. Kato Y, et al., The chimeric antibody chLpMab-7 targeting human podoplanin suppresses pulmonary metastasis via ADCC and CDC rather than via its neutralizing activity. *Oncotarget*, 2015, 36003-36018
2. Ochoa-Alvarez J, Kato Y, et al., Antibody and lectin target podoplanin to inhibit oral squamous carcinoma cell migration and viability by distinct mechanisms. *Oncotarget*, 2015, 6(11), 9045-9060
3. Kaneko MK, Kato Y, et al., An anti-podoplanin monoclonal antibody LpMab-7 detects metastatic lesions of osteosarcoma. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2015, 34(3), 154-161
4. Oki H, Kato Y, et al., Characterization of a monoclonal antibody LpMab-7 recognizing non-PLAG domain of podoplanin. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2015, 34(3), 174-180
5. Liu X, Kato Y, et al., A novel monoclonal antibody SMab-2 recognizes endogenous IDH2-R172S of chondrosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2015, 459(4), 636-642
6. Kaneko MK, Kato Y, et al., A monoclonal antibody LpMab-9 recognizes O-glycosylated N-terminus of human podoplanin. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2015, 34(5), 310-317
7. Ogasawara S, Kato Y, et al., Development of a monoclonal antibody LpMab-10 recognizing non-glycosylated PLAG1/2 domain including Thr34 of human podoplanin. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2015, 34(5), 318-326
8. Oki H, Kato Y, et al., Characterization of a monoclonal antibody LpMab-3 recognizing sialylated glycopeptide of podoplanin. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2015, 34(1), 44-50
9. Fujii Y, Kato Y, et al., A high-sensitive HMAb-2 specifically detects IDH1-R132H, the most common IDH mutation in gliomas. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2015, 466(4), 733-739
10. Oki H, Kato Y, et al., Development of a sensitive monoclonal antibody PMab-2 against rat podoplanin. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2015, 34(6), 396-403