

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名：臨床腫瘍特異的なシングルドメイン抗体機能複合体の取得技術に関する研究
3. 研究開発代表者： 国立大学法人東京医科歯科大学 教授 石川俊平
4. 研究開発の成果

臨床腫瘍に特徴的な浸潤を呈する抗体分子等の候補配列の同定、およびそれらのレンチウイルス・ライブラリ化と再構築抗体の機能解析に関する基盤的技術の開発、また *in vivo* 評価系の検討を目的として、以下の研究開発を進めた。

- ①次世代シーケンサを用いた免疫ゲノムシーケンス解析の遂行
- ②抗原受容体遺伝子ライブラリの構築
- ③Xenograft 系の構築

以下に項目ごとの研究開発成果をまとめる。

- ① 次世代シーケンサを用いた免疫ゲノムシーケンス解析の遂行：

凍結臨床がん試料からの RNA 抽出、抗原受容体遺伝子の multiplex PCR、PCR 産物の精製など、次世代並列型シーケンサを用いた「免疫ゲノムシーケンス技術」に関する実験プロトコルを継続的に洗練化した。併せて、抗原受容体遺伝子シーケンスの V(D)J 配列へのマッピング、アミノ酸配列への置換、CDR1/2/3 アミノ酸配列の同定およびゲノム再構成や塩基置換過程の定義付けなどバイオインフォマティクス解析パイプラインの整備を進めた。それらの実験プロトコル及び解析パイプラインを応用し、びまん型胃がんの凍結保存試料について、がん部および非がん部に浸潤する B リンパ球(重鎖/軽鎖遺伝子)と T リンパ球(α 鎖/ β 鎖遺伝子)の抗原受容体遺伝子再構成領域の網羅的シーケンス情報を取得した。各サンプルにおいて約数十万リード以上のシーケンスリードが得られた。さらに、びまん型胃がん以外の胃がんおよび他の難治性悪性腫瘍症例についても同様の解析をパイロット実験として進めた。同一症例の非がん部位および他の非腫瘍性組織をコントロールとして、各症例においてがん組織に特徴的にみられる抗原受容体構造を抽出し、がん細胞特異的な BCR 配列(immunoglobulin 配列)および TCR 配列を多数同定した。また、それらの腫瘍特徴的な抗原受容体シーケンス情報と臨床病理学的情報との関連性について解析を進めた。

- ② 抗原受容体遺伝子ライブラリの構築：

びまん性胃がんの免疫ゲノムシーケンスによって得られた免疫グロブリン遺伝子配列(重鎖遺伝子/軽鎖遺伝子)から、腫瘍特異性などの特徴を呈した免疫グロブリン配列を検索し、多数の配列を抽出・同定した。それらの多数の免疫グロブリン遺伝子配列を個別のレンチウイルス・ベクターへと組み込み、免疫グロブリンのレンチウイルス・ライブラリとして再構築するための実験プロトコルを検討・樹立した。びまん性胃がん症例の解析において腫瘍特異性などの特徴を呈した多数の免疫グロブリン配列について、実際にレンチウイルス・ライブラリの構築を進めた。さらに、びまん性胃がん症例において、がん部でのみドミナントな浸潤が認められた複数個の代表的な免疫グロブリン配列については実際に遺伝子クローニングから強制発現系までを実施し、得られた再構築抗体について、ヒトがん細胞株への反応性の機能性を確認することで、本研究開発計画の POC を検討した。ゲノミクス・スクリーニングに用いる予定のさまざまなヒトがん細胞株について、レンチウイルス・ライブラリの感染効率の検討や、セレクション薬剤耐性に関する検討、*in vitro* あるいはヌードマウス皮下における増殖速度の検討を進めた。

③Xenograft 系の構築：

本研究開発の評価系として利用する予定の Xenograft 系の開発を進めた。日本人腫瘍から直接樹立した「PDX (Patient-Derived Xenograft)系」についてそれらの遺伝子発現プロファイルや病理組織構築等の観察を継続的に行った。また、通常の人がん細胞株由来のヌードマウス Xenograft モデルについても継続的な検討を行い、発現プロファイルおよび病理組織像の確認を進めながら、本事業における評価系として適する細胞株系の検討を進めた。