

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「がん微小環境を標的とした革新的治療法の実現」（腫瘍血管特異的分子 BST2 および ROB04 に対する新規バイオ医薬の開発）
2. 研究開発代表者： 鎌田 春彦（国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 バイオ創薬プロジェクト）
3. 研究開発の成果

我々の研究グループでは、当グループで見出された腫瘍血管特異的 BST2 および ROB04 を標的とする新規バイオ医薬の開発に向けて、我々が独自に開発してきたファージ抗体ライブラリを活用した新規抗体誘導体の作製とそれを用いた上記抗原のがん血管の分子標的としての有用性を評価した。

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所では、BST2 (Bone marrow stromal antigen-2) 及び ROB04 (Roundabout homologue 4) に対する新規バイオ医薬の開発に向けた情報収集を図るとともに、実際に医薬品として利用可能なリード分子の設計・開発を行った。BST2 の各種がん組織での発現を確認するとともに、抗原発現の評価に利用可能な scFv 抗体をファージ抗体ライブラリからスクリーニングした。抗ヒト BST2 モノクローナル抗体を用いて、ヒトがん組織が搭載されている組織アレイに対して免疫染色を行った結果、BST2 は一部の腫瘍組織（皮膚がん、子宮がん、腎臓がん）での血管での発現が認められた。またファージ抗体ライブラリを用いて、マウス BST2 に対するパンニングを実施した結果、ヒト・マウス BST2 の両者を認識可能な抗 BST2 scFv 抗体の入手には至らなかったものの、複数の候補 scFv 抗体が得られた。また一方で、ヒト・マウス ROB04 の抗原に対して、同ファージ抗体ライブラリを用いたパンニングを実施した結果、ヒト・マウス ROB04 の両者を認識可能な高親和性抗体の候補が得られ、これら抗体のうち、ヒト ROB04 を強く認識する scFv 抗体を 3 種類入手出来た。

また、国立大学法人大阪大学では、各抗原をターゲットとしたヒトでの臨床応用に向けた検討を行うとともに、それらに対するリード分子の評価を行った。ヒトおよびマウス BST2 および ROB04 の発現・精製を行うために、大腸菌ならびにはほ乳類細胞を用いたタンパク質の発現・精製を行った。その結果、ヒト・マウス BST2 抗原の発現が認められたものの、ヒト BST2 の発現量が原因となって、最終的に純度の高いヒト BST2 を得ることが出来なかった。一方、ROB04 の細胞外ドメインをほ乳類系の発現ベクターにより発現させた結果、高純度のヒト・マウス ROB04 の両抗原が得られた。加えて、既存の抗 ROB04 scFv と Cupid の融合タンパク質の作製を実施した。その結果、SDS-PAGE にて目的の分子量に、抗体-Cupid 融合体の発現が認められ、4 量体の構造を持つ抗体 Cupid 複合体の存在も確認できた。また、ROB04 の組織内・細胞での発現を、パブリックデータベース等を用いて検索した結果、肺、脾臓、ならびに胎盤に発現されることが示唆され、複数の臓器由来血管内皮細胞にも遺伝子レベルで発現することを RT-PCR 法によって確認することが出来た。さらに、抗 ROB04 抗体が *in vitro* での殺細胞効果に関する検討を行うことを目的に、ヒト ROB04 が発現した強制発現細胞を作製した結果、両 ROB04 抗原の発現が認められ、既存の抗 ROB04 抗体および我々が作製した scFv 抗体の結合性についての評価も可能であった。

さらに、国立大学法人東京大学では、Cupid に親和性を示す新規プローブの開発に向け、蛍光ラベル化 Psyche 及びタンパク質が有するアミノ基などとの反応性を持つ Psyche を合成した。リンカーの両末端にイミノビオチンを縮合し、ビスイミノビオチン構造を持つ Psyche を合成した。蛍光ラベル化分子としては FITC を選択した。また、タンパク質反応性 Psyche は、モデルタンパク質のウシ血清アルブミンにリシン残基に対する反応性を示すことが明らかになった。