

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：

膜型 C4.4A を標的とした大腸がんに対する転移再発予測診断技術の開発

2. 研究開発代表者：

堤 康央（国立大学法人大阪大学 大学院薬学研究科）

3. 研究開発の成果

本研究は、我が国独自の知財（W02011158883A1：大腸がんに対する新規転移再発予測診断）を有効活用し、中間ステージがんの薬物治療方針決定に有用な膜型 C4.4A を特異的に検出し得る抗体を、申請者独自のモノクローナル抗体創製技術を用いることで作製し、研究期間終了後、臨床診断薬メーカーと提携することで速やかな実用化を達成しようとするものである。

上記の研究背景と目的のもと、過去の知見をふまえ、膜型 C4.4A を検出する GPI アンカー近傍のペプチドを抗原とし、まず、迅速にモノクローナル抗体を取得可能な合成ファージ抗体ライブラリからの抗体創製を試み、12 種類のクローンを取得した。これら抗体クローンは抗原特異的な結合性が観察されたものの、大腸がん組織全体が染色される傾向があり、抗原への結合親和性が低いこと（数百 nM 程度）による非特異的な結合が考えられた（昨年度の成果）。そこで、本年度は、結合力の強いモノクローナル抗体を取得可能な免疫ファージ抗体ライブラリに着目して、スクリーニングを試みた。抗原ペプチドをマウスに免疫し、その脾臓から抗体遺伝子を増幅し、合計 10.4 億からなる免疫ファージ抗体ライブラリを構築した。抗原ペプチドに結合するクローンを濃縮するパンニング操作を 2 回および 4 回繰り返し、各クローンの結合性を ELISA により評価したところ、66 種類のモノクローナル抗体が取得された。さらに、アビデティー効果によって抗原への結合力を亢進させるため、蛋白質工学的手法を利用し、合成ファージ抗体ライブラリ・免疫ファージ抗体ライブラリから取得された C4.4A に対する一本鎖抗体（scFv）を Fc キメラ化蛋白質として産生・精製した。その結果、結合力は概して数十 nM と大きく改善された。さらに実際の大腸がん組織で染色を試みたところ、がん組織中の細胞膜が染色される傾向のあるクローン（H1、#61 など）を見出すことができた。しかし、従来取得していたポリクローナル抗体による染色像と比較すると、染色感度や特異性の点で劣っているところがあり、改善の余地も考えられた。本研究事業の推進をさらに加速させるため、来年度からは、ハイブリドーマの専門家も研究開発分担者とするすることで、多様なモノクローナル抗体の中から高品質なクローンを選定するとともに、X 線結晶構造解析・情報科学によるシミュレーション・熱力学的解析・ファージ表面提示法の最適化も進んでおり、診断薬に資する高品質なモノクローナル抗体のデザインを図る。さらに現在、数多くの臨床サンプルの収集も順調に進んでいるため、最終的にはこれらがん組織における C4.4A の発現プロファイルと再発との関連をバリデーションすることで、大腸がんに対する転移再発予測診断技術の開発を目指す。

尚、本研究事業を円滑に運営するため、研究開発代表者は、全体を統括すると共に、定期的に班会議を実施（8 月と 2 月の 2 回）し、各研究開発者の意志を統一と、研究者間の効果的な連携を図った。

4. その他

なし