

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業  
(英語) Basic Science and Platform Technology Program for Innovative  
Biological Medicine

研究開発課題名： (日本語) 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  
(英語) Technology development for obtaining functional and cancer-specific  
single-domain antigen receptor complex

研究開発担当者 (日本語) 東京医科歯科大学 教授 石川 俊平  
所属 役職 氏名： (英語) Shumpei Ishikawa, Professor, Tokyo Medical and Dental University

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 低分子化抗体等の物性・活性解析  
開発課題名： (英語) Evaluation of physical property and function of structurally  
modified immunoglobulins

研究開発分担者 (日本語) 東京農工大学 准教授 浅野 竜太郎  
所属 役職 氏名： (英語) Ryutaro Asano, Associate Professor, Tokyo University of Agriculture  
and Technology

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### 和文

平成 28 年度は以下 4 項目について研究開発を進めた。

#### ① 次世代並列型シーケンサーによる完全長免疫ゲノムシーケンス

研究開発代表者らが樹立してきた抗原受容体可変領域レパートリーの次世代シーケンス解析法によって、さまざまな胃癌症例、および肺がんや肝細胞癌など胃癌以外の悪性腫瘍症例について、B 細胞抗原受容体(免疫グロブリン)遺伝子および T 細胞抗原受容体遺伝子の次世代シーケンス解析を実施した。同一症例の非腫瘍部からアーカイブされた凍結試料を解析対照として、症例ごとにがん組織特異的かつドミナントに存在する抗原受容体配列を抽出し、がん特異的免疫グロブリン遺伝子配列を多数同定した。

#### ② 組換え遺伝子ライブラリの作成と機能ゲノミクス・スクリーニング

上記のシーケンス解析によって得られたさまざまな腫瘍特異的抗原受容体(免疫グロブリン)遺伝子の全長配列を発現プラスド・ベクターに組み込み、機能的免疫グロブリン分子の同定を目的とした機能ゲノミクス・スクリーニングに使用する大規模免疫グロブリン・ライブラリの構築を実施した。臨床腫瘍特異的に存在する免疫グロブリン分子のなかから、そのアミノ酸組成の生化学的性質及び somatic hypermutation の特質等を基盤として候補免疫グロブリンを選別し、ライブラリ構成を行った。細胞反応性あるいは細胞増殖抑制能などを指標とする機能ゲノミクス・スクリーニングに関する実験条件の検討を進めた。また、1 細胞単離装置を用いた機能的スクリーニング法に関する検討も進めた。構築された免疫グロブリン・ライブラリを使用して、細胞認識性や機能性についてのスクリーニングを一部実施し、データの取得を行った。

#### ③ ヒト腫瘍から樹立したマウス移植腫瘍の評価系としての応用開発

臨床ヒト腫瘍から直接樹立されたマウス PDX 系あるいは臨床腫瘍の性質をよく保持したヒトがん細胞株由来 Xenograft 系の樹立を複数種類のがんについて進めた。in vivo 腫瘍環境で有効に作用する抗体分子等を同定するための in vivo 評価系としての開発を想定して、実験条件の検討および腫瘍症例やがん細胞株の選別を進めた。マウス移植腫瘍の病理組織像あるいは網羅的遺伝子発現プロファイルも統合的に解析し、本研究開発の評価系として適した PDX 系あるいはヒトがん細胞株由来 Xenograft 系のプロトタイプを樹立を進めた。

#### ④ 機能性抗体のメカニズムの同定および構造最適化

一部実施した細胞反応性あるいは細胞増殖抑制能等の機能的スクリーニングで同定された複数の候補抗体分子について、免疫沈降や質量分析等を用いた抗原探索を進めた。また、それらの候補抗体をリード抗体分子として複数のアミノ酸置換抗体を作成し、機能性の強化した有用な改変抗体の探索を一部進めた。それらのリード抗体についてはさらに低分子化抗体及び二重特異性化抗体を作成するとともに、東京農工大学との再委託契約に基づいて、低分子化抗体や二重特異性抗体に関する物性評価及び機能評価を実施した。

In the FY2016, we promoted researches focusing on the following 4 plans.

① Immunogenetic Profiling by Next-Generation Sequencing

By our next-generation immunogenetic sequencing protocol using frozen clinical samples, we obtained B-cell receptor (BCR, immunoglobulin) and T-cell receptor (TCR) sequences for various gastric cancers and other malignancies including hepatocellular carcinoma and lung cancer. By comparing with the sequence data of normal counterpart tissues of the same patients, we identified cancer-specific dominant immunoglobulins in each of the cancer case.

② Construction of Immunoglobulin cDNA Library and Functional Genomics Screening

We constructed a large-scale immunoglobulin cDNA library which contained various cancer-specific immunoglobulins identified by the sequencing analysis. The cDNA library was designed to conduct functional screening based on such as cell-binding ability and growth-suppression function of the immunoglobulins. For the preparation of such screening experiments, we fine-tuned experiment protocols including that of a single-cell picking system. We performed a part of the screening experiments using the constructed immunoglobulin cDNA library and started to obtain some pilot data.

③ Establishment of Evaluation Animal Models using PDX and/or Xenograft System

In order to establish animal models to evaluate functionalities of immunoglobulins *in vivo*, we kept passaging the PDX (patient-derived xenograft) tumor tissues for various clinical malignancies. We also succeeded in establishing xenograft models using human cancer cell lines which mimic the clinico-pathological features of actual human tumors. Based on the histopathological examination and global gene expression profiles, we selected various types of PDX cases and cancer cell lines which were suitable for our evaluation system. Experimental settings for the evaluation system for the function of immunoglobulins were investigated.

④ Molecular Mechanism of the Functional Immunoglobulins and Structural Optimization

We identified some candidate immunoglobulins by the screening based on cell-binding ability and cell-growth suppression assays, and we attempted to identify their antigens by immune-precipitation assay and mass-spectrometry analysis. We promoted various kinds of structural optimizations for the candidate immunoglobulins: (1) modifications of amino acid constitutions of the lead immunoglobulins and (2) constructions of small molecular immunoglobulins such as ScFv antibodies and some types of bi-specific antibodies. Moreover, under the re-entrusted contract with Tokyo University of Agriculture and Technology (Dr. Asano), we investigated the physical property evaluation and functional evaluation of the structurally modified immunoglobulins.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 1 件）

1. Katoh Hiroto, Ishikawa Shumpei. Genomic Pathobiology of Gastric Carcinoma. Pathology International. 2017 Feb;67(2):63-71. doi: 10.1111/pin.12493. Epub 2016 Dec 22.
2. 石川俊平. 大規模がんゲノミクスデータの再解析による免疫微小環境解析. 実験医学. 2017 Vol.35 No.4 557-561.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Prediction of Antigen-Specific Immunoglobulins from Amino Acid Sequences using Semi-Supervised Deep Learning. ポスター. Hiroki Konishi, Daisuke Komura, Hiroto Katoh, Ken Tominaga, Ryohei Suzuki, Shumpei Ishikawa. 15th European Conference on Computational Biology. Hague, Netherlands, 2016 年 9 月 3 日, 国外
2. Immunogenetic Characterization of Tumor Infiltrating TCR Repertoire in the Gastric Carcinoma Environments Using Archived Histopathological Specimens. ポスター. Hiroto Katoh, Daisuke Komura, Hiroki Konishi, Ryohei Suzuki, Asami Yamamoto, Reiko Sato, Masashi Fukayama, Hiroyuki Aburatani, Shumpei Ishikawa. AIRR 2016 Community Meeting. Rockville, MD, USA. 2016 年 6 月 27 日, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし