

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) 革新的次世代型がん特異的抗体の開発とその臨床応用
(英語) Development of innovative next generation cancer-specific monoclonal
antibodies and clinical application

研究開発担当者 (日本語) 東北大学 大学院医学系研究科 教授 加藤 幸成
所属 役職 氏名： (英語) Yukinari Kato, Professor, Graduate School of Medicine, Tohoku 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)
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

<和文>

東北大学では、がん細胞に特異的反応性を示すモノクローナル抗体作製法 (CasMab 法) を用いることにより、がん細胞と正常細胞に同一のアミノ酸配列の糖タンパク質が発現している場合でも、糖鎖などの翻訳後修飾の違いを利用することでがん細胞のみを攻撃する抗体医薬品を高効率に作製し、副作用のほとんどない抗体医薬品を開発する技術を独自に開発中である。本プロジェクトにおいては、CasMab 開発のためのヒトがん細胞株の樹立、免疫原作製と CasMab 開発、新規タギング技術の開発、抗体改変技術の開発の 4 つが、重要な要素技術となっている。平成 28 年度には、3 つ目の要素技術である、新規タギング技術の開発において大きな進捗があった。

タンパク質は種類によって、大きさや性質が大きく異なる。そのため、それぞれのタンパク質に適した条件で検出や精製を行う必要があり、条件検討に多くの労力を必要とする。多くの場合、タンパク質解析の際には高純度のタンパク質が求められることから、このタンパク質精製の段階が大きな制約となる。このことから、これまでに数多くのタンパク質検出・精製システムが開発されてきた。その中でも最も有効な手法の 1 つと考えられているのが、アフィニティータグシステムである。特に、抗原抗体反応を利用したシステムは、特異性が高いという観点から、他のシステムよりも高純度のタンパク質を得られるという点で優れている。さらに、抗体が認識するアミノ酸数は限られているため、タグは短くなりやすく、タグの付加によるタンパク質への影響が少なく済む。よって、より特異性の高いアフィニティータグシステムを開発することは、これまで困難だったタンパク質の検出・精製を容易にできる可能性がある。

東北大学ではこれまで、PA タグという独自のアフィニティータグシステムを開発した。PA タグシステムは一段階かつ非常に高い純度で目的タンパク質を精製できるタグシステムである。さらに、PA タグはウェスタンブロットティングやフローサイトメトリー等の免疫検出においても使用可能である。一方で、PA タグにも様々な欠点があり、その欠点を補う新規タギングシステムが必要とされていた。

そこで今年度、高精度モノクローナル抗体であるクローン P_{Mab}-1 を用いた新規アフィニティータグシステムとして、MAP タグを新規に開発した。MAP タグを活用すると、ウェスタンブロットティングやフローサイトメトリーなどの代表的なタンパク質検出方法においても機能することを確認できた。さらに、大腸菌や動物細胞で発現させた複数のタンパク質の精製にも成功した。MAP タグは一般的に精製が困難とされている膜タンパク質においても有効であり、今後、精製困難なタンパク質の精製を容易にすることが期待される。

この MAP tag について、Absolute Antibody 社（本社：オックスフォード、英国）とライセンス契約を締結した。この研究成果については、平成 28 年 3 月 22 日にプレスリリースを行った。

<英文>

We recently established a novel method to produce cancer-specific monoclonal antibody (CasMab). The CasMab method is the platform to develop monoclonal antibodies (mAbs), which could attack only cancer cells. This method is useful for not only producing CasMabs against novel targets but also replace the existing mAbs into the side effect-free ones. We can try to develop antibody drugs again against many targets, which were excluded from antibody-drug candidates.

Affinity tag systems are highly useful for protein purification, detection, and analysis. Affinity tag systems are classified broadly as “peptide tags” and “protein tags.” For example, GST tag and MBP tag are protein tags. While these tags are useful for soluble fraction proteins, they are large (over 25 kDa) and thus can affect target protein function, requiring their removal before protein analysis. In contrast, peptide tags are less likely to affect the structure and function of target proteins because they are small (typically 1–2 kDa). Thus, removal of the tag portion is not always required before protein analysis. The most appropriate peptide tag system can be chosen from a variety of options, including the His tag, FLAG tag, TARGET tag, PA tag, AGIA tag, and many others. The fusion peptides are compatible with virtually all expression host cells, including yeast, insect, and mammalian cells, and *Escherichia coli* and can be expressed extracellularly or intracellularly.

An excellent affinity tag system should have high affinity and high specificity. However, not all peptide-based tag systems meet these criteria. For example, the purification of oligohistidine-tagged proteins using metal chelate affinity resin often results in the co-purification of metal-binding proteins present in the starting material, necessitating further purification steps. Generally, epitope tag systems that utilize peptide tags and anti-peptide mAbs are highly specific. However, we often encounter non-specific binding of mAbs to endogenous proteins in certain cell types, even when using the most popular tag system, FLAG tag/anti-FLAG M2 antibody. Importantly, the most suitable tag systems must be chosen based on the target protein, expression host, and many other variables. Therefore, the development of further affinity tag systems is needed to overcome the disadvantages of available affinity tag systems.

This year, we developed a novel affinity tag system designated as the MAP tag system. This system is composed of a rat anti-mouse podoplanin monoclonal antibody (clone PMab-1) and MAP tag (GDGMVPPGIEDK) derived from the platelet aggregation-stimulating (PLAG) domain of mouse podoplanin. PMab-1 possesses high affinity and specificity for the MAP tag, and the PMab-1/MAP tag complex dissociates in the presence of the epitope peptide, indicating that the MAP tag system is suitable for protein purification. We successfully purified several proteins, including a nuclear protein, soluble proteins, and a membrane protein using the MAP tag system. The MAP tag system is very useful not only for protein purification but also in protein detection systems such as western blot and flow cytometric analyses. These findings indicate that the MAP tag system could be a powerful tool for protein purification and detection.

We made a contract with Absolute Antibody (Oxford, UK) about MAP tag system, and made a press release on March 22nd, 2017.

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 0 件、国際誌 16 件)

1. Honma R, Fujii Y, Ogasawara S, Oki H, Liu X, Nakamura T, Kaneko MK, Takagi M, Kato Y. Establishment of a novel monoclonal antibody PMab-32 against rabbit podoplanin. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2016, 35(1), 41-47
2. Honma R, Fujii Y, Ogasawara S, Oki H, Konnai S, Kagawa Y, Takagi M, Kaneko MK, Kato Y. Critical Epitope of Anti-Rabbit Podoplanin Monoclonal Antibodies for Immunohistochemical Analysis. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2016, 35(2), 65-72
3. Ogasawara S, Kaneko MK, Honma R, Oki H, Fujii Y, Takagi M, Suzuki H, Kato Y. Establishment of Mouse Monoclonal Antibody LpMab-13 against Human Podoplanin. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2016, 35(3):155-162
4. Kato Y, Ogasawara Y, Oki H, Honma R, Takagi M, Fujii Y, Nakamura T, Saidoh N, Kanno H, Umetsu M, Kamata S, Kubo H, Yamada M, Sawa Y, Morita K, Harada H, Suzuki H, Kaneko MK. Novel Monoclonal Antibody LpMab-17 Developed by CasMab Technology Distinguishes Human Podoplanin from Monkey Podoplanin. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2016, 35(2), 109-116
5. Kato Y, Ogasawara S, Oki H, Goichberg P, Honma R, Fujii Y, Kaneko MK. LpMab-12 Established by CasMab Technology Specifically Detects Sialylated O-glycan on Thr52 of Platelet Aggregation-stimulating Domain of Human Podoplanin. *PLoS One*, 2016, 11(3), e0152912
6. Honma R, Ogasawara S, Kaneko MK, Fujii Y, Oki H, Nakamura T, Takagi M, Konnai S, Kato Y. PMab-44 Detects Bovine Podoplanin in Immunohistochemistry. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2016, 35(4): 186-190
7. Honma R, Kaneko MK, Ogasawara S, Fujii Y, Konnai S, Takagi M, Kato Y. Specific Detection of Dog Podoplanin Expressed in Renal Glomerulus by A Novel Monoclonal Antibody PMab-38 in Immunohistochemistry. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2016, 35(4): 212-216
8. Ogasawara S, Kaneko MK, Kato Y. LpMab-19 Recognizes Sialylated O-glycan on Thr76 of Human Podoplanin. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2016, 35(5): 245-253
9. Abe S, Kaneko MK, Tsuchihashi Y, Izumi T, Okada N, Miyamoto R, Sato C, Tobiume M, Otsuka K, Tsuchiya K, Kawazoe K, Ogasawara S, Kato Y, and Nishioka Y. Antitumor effect of novel anti-podoplanin antibody NZ-12 against malignant pleural mesothelioma in orthotopic xenograft model. *Cancer Sci.*, 2016, 107(9):1198-205
10. Ogasawara S, Fujii Y, Kaneko MK, Oki H, Sabit H, Nakada M, Suzuki H, Ichimura K, Komori T, Kato Y. Establishment of Anti-Human ATRX Monoclonal Antibody AMab-6. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2016, 35(5): 254-258
11. Kaneko MK, Honma R, Ogasawara S, Fujii Y, Nakamura T, Saidoh N, Takagi M, Kagawa Y, Konnai S, Kato Y. PMab-38 recognizes canine podoplanin of squamous cell carcinomas. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2016, 35(5): 263-266
12. Kitago Y, Kaneko MK, Ogasawara S, Kato Y, Takagi J. Structural basis for multi-specific peptide recognition by the anti-IDH1/2 monoclonal antibody, MsMab-1. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2016,

478(3):1274-1279.

13. Umitsu M, Sakai K, Ogasawara S, Kaneko MK, Asaki R, Tamura-Kawakami K, Kato Y, Matsumoto K, Takagi J. Probing conformational and functional states of human hepatocyte growth factor by a panel of monoclonal antibodies. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 33149
14. Shiina S, Ohno M, Ohka F, Kuramitsu S, Yamamichi A, Kato A, Motomura K, Tanahashi K, Yamamoto T, Watanabe R, Ito I, Senga T, Hamaguchi M, Wakabayashi T, Kaneko MK, Kato Y, Chandramohan V, Bigner DD, Natsume A. CAR T cells targeting podoplanin reduce orthotopic glioblastomas in mouse brains *Cancer Immunol Res.* 2016, 4(3):259-268.
15. Fujii Y, Kaneko MK, Kato Y. MAP tag: A novel tagging system for protein purification and detection. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2016, 35(6): 293-299
16. Ogasawara S, Honma R, Kaneko MK, Fujii Y, Kagawa Y, Konnai S, Kato Y. Podoplanin Expression in Canine Melanoma. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 2016, 35(6): 304-306

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Development of cancer-specific monoclonal antibodies against glycoproteins, 口頭, 加藤幸成, 第89回日本生化学会大会, 2016/9/26, 国内
2. A cancer-specific monoclonal antibody against podocalyxin developed by CasMab technology inhibited the tumor growth by antibody-dependent cellular cytotoxicity, ポスター, Yukinari Kato, Satoshi Ogasawara, Yuki Fujii, Mika K. Kaneko, AACR annual meeting 2016, 2016/4/19, 海外
3. The chimeric antibody NZ-12 or CAR T cells targeting human podoplanin possesses antitumor activity against orthotopic xenograft models, ポスター, Yukinari Kato, Satoshi Shiina, Atsushi Natsume, Shinji Abe, Yasuhiko Nishioka, Satoshi Ogasawara, Mika K. Kaneko, AACR, Tumor Immunology and Immunotherapy, 2016/10/22, 海外
4. Establishment of cancer-specific monoclonal antibodies against podocalyxin using CasMab technology, ポスター, Yukinari Kato, Antibody Engineering & Therapeutics, 2016/12/11, 海外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

特になし

(4) 特許出願

特になし