

平 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) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control
- 研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Development of the diagnostic technology targeting membrane type C4.4A for predicting metastasis recurrence in colorectal cancer
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 大学院薬学研究科 教授 堤 康央
所属 役職 氏名： (英語) Professor Yasuo TSUTSUMI,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University
- 実施期間： 平成 26 年 5 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 臨床検体の収集と膜型 C4.4A の臨床学的な特性の評価
開発課題名： (英語) Collection of clinical cancer tissues
and evaluation of clinical characteristics of membrane type C4.4A
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 大学院医学系研究科 教授 森 正樹
所属 役職 氏名： (英語) Professor Masaki MORI,
Graduate School of Medicine, Osaka University
- 分担研究 (日本語) X 線結晶構造解析技術の最適化とリード抗体の構造決定
開発課題名： (英語) Optimization of X-ray crystal structure analysis technology
and structure determination of lead antibodies
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 大学院工学研究科 教授 井上 豪
所属 役職 氏名： (英語) Professor Tsuyoshi INOUE,
Graduate School of Engineering, Osaka University
- 分担研究 (日本語) 情報科学によるシミュレーションの精度向上とリード抗体の構造予測
開発課題名： (英語) Improvement of accuracy of simulation by informatics
and structure prediction of lead antibodies

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学 先端科学技術研究センター 教授 浜窪隆雄
所属 役職 氏名 : (英語) Professor Takao HAMAKUBO,
Research Center for Advanced Science and Technology,
The University of Tokyo

分担研究 (日本語) 熱力学的解析技術の最適化とリード抗体の構造安定性予測
開発課題名 : (英語) Optimization of thermodynamic analysis technology
and structural stability prediction of lead antibodies

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学 大学院工学系研究科 教授 津本浩平
所属 役職 氏名 : (英語) Professor Kouhei TSUMOTO,
Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

分担研究 (日本語) 候補抗体の取得・評価とリード抗体のデザイン
開発課題名 : (英語) Preparation and evaluation of candidate antibodies
and design for lead antibodies

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 医薬基盤研究所
プロジェクトリーダー 角田慎一
所属 役職 氏名 : (英語) Project Leader Shin-ichi TSUNODA,
National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition

分担研究 (日本語) ハイブリドーマ法による候補抗体の取得と評価
開発課題名 : (英語) Production and characterization of candidate antibodies by hybridoma
method

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 医薬基盤研究所
創薬デザイン研究センター サブプロジェクトリーダー 永田諭志
所属 役職 氏名 : (英語) **Subproject Leader** Satoshi NAGATA, Center for drug design research,
National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition

II. 成果の概要（総括研究報告）

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 の臨床学的な特性を詳細に解析するとともに、膜型 C4.4A を特異的に検出し得る抗体を、独自のモノクローナル抗体創製技術を用いて作製することで、新たな転移再発予測診断法の実用化を達成しようとするものである。

まず、膜型 C4.4A の転移再発との関連を解析した。その結果、C4.4A は、コラーゲン I や IV などと結合し、その相互作用により、細胞の遊走・浸潤を促進させることが明らかとなった。また、浸潤性を亢進させる要因を探るため、蛋白質分解酵素に着目して検証した結果、MMP2、MT1-MMP が関与していることが示され、C4.4A が転移再発を予測診断するための有望な標的であることが示唆された。

そこで次に、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て、モノクローナル抗体の創製を試みた。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、抗原ペプチドに結合する候補抗体の取得を試みた結果、12 種類のクローンが得られた。これら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）による非特異的な結合が考えられた。そこで、結合力の強い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た。10.4 億からなる免疫ファージ抗体ライブラリを構築し、抗原ペプチドに結合するクローンをスクリーニングしたところ、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、合成/免疫ファージ抗体ライブラリから取得された一本鎖抗体を Fc キメラ化蛋白質として産生させた。その結果、結合力は概して数十 nM と改善された。さらに実際の大腸がん組織で染色したところ、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 や#61 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。そこで、抗体作製法として、ファージ抗体ライブラリ法に加え、ハイブリドーマ法での候補抗体の取得を試みた。多様なスクリーニング（①抗原ペプチドやペプチド領域を含む C4.4A 組換え蛋白質との結合性・競合性試験、②Western Blot での変性抗原への結合性評価、③C4.4A の全長を強制発現させた細胞表面上での反応性解析、④ホルマリン固定した細胞を用いた固定抗原への結合性評価）を実施した結果、種々の候補抗体の中で、クローン CF35 は、上記の解析でいずれも C4.4A に特異的な結合を示したため、組織染色に供した。本抗体は種々の解析で、高い反応性を示したものの、がん組織の染色では有意な染色像を示されず、軽微なホルマリン固定では、抗原の構造を保っていないながらも、パラフィン包埋組織切片といった強い変性条件下では抗原性が失われていることが考えられた。

現在までに、約 500 症例の大腸がん臨床検体を収集できたため、既存の抗 C4.4A ポリクローナル抗体と、抗 C4.4A モノクローナル抗体の中で染色特異性が弱いながらも、組織染色性を示したクローン（11A1）を用いて、大腸がんに対する新規転移再発予測診断法としての有用性の検証を進めている。

その一方で、候補抗体 H1 と抗原ペプチド複合体の X 線結晶構造解析から、その結合性が確認され、重鎖 CDR3 上のアルギニンが、抗原ペプチドに対して、Van der Waals 接触や静電相互作用により、特徴的な安定化を受けていることが示唆されている。また、計算機を用いたホモロジーモデリングにより、7 種類の抗体の立体構造を予測し、構造の安定性や静電的性質を特徴付けられている。さらに、結合親和性を向上させる際には、hot-spot を避けた edge 周辺での荷電残基の導入が期待されることを熱力学的に明らかにするなど、C4.4A のみならず、高品質なモノクローナル抗体の汎用的なデザインのための技術基盤の開発に資する知見が収集された。

The goal of this study is the development of a novel diagnosis to predict recurrence in colorectal cancer cases by detecting membrane type C4.4A, which is significantly expressed in recurrence cases. In this study, we have tried to reach the goal by analyzing the characteristics of membrane type C4.4A in recurrence cases and by making a novel monoclonal antibody against membrane type C4.4A using a original phage antibody library system and a hybridoma system.

We firstly analyzed the association of C4.4A expression with recurrence which is caused by metastasis. It was revealed that C4.4A promotes cancer cell migration and invasion by binding to collagen I and IV. In addition, in order to understand the mechanism, we focused on proteolytic enzymes. As a result, C4.4A are involved in MMP2 and MT1-MMP expression, so that C4.4A is useful as a target to predict the recurrence which is caused by metastasis.

We next attempted to create monoclonal antibodies against C4.4A from a synthetic phage antibody library, which enable to isolate a monoclonal antibody quickly, and then isolated 12 kinds of monoclonal antibodies. Although these antibodies are specifically bound to an antigen peptide, the whole colorectal cancer tissues are stained in immunohistochemical analysis. It is suggested that these nonspecific bindings may be due to low affinity to the antigen (several hundred nM). Thus, we tried to the monoclonal antibodies from an immune phage antibody library, which enable to isolate a monoclonal antibody with high affinity, and then isolated 66 kinds of monoclonal antibodies. Furthermore, we have produced and purified single chain antibody (scFv)-Fc chimerized proteins with the avidity effects, so that the binding affinity to the peptide antigen was greatly improved (a few tens of nM). Actually, immunohistochemical staining in colorectal cancer tissues showed that clone H1 and # 61 tend to stain the cell membrane in the cancer tissue. However, these clones are inferior to the existing polyclonal antibody in staining sensitivity and specificity. Therefore, we applied a hybridoma method as a monoclonal antibody creation system, in addition to the phage antibody library method. In various screening such as ELISA, Western Blot and Flow cytometry analysis, only clone CF35 among the candidates was specifically detected C4.4A. Although this clone showed high reactivity to C4.4A in all assays, cell membrane staining was not observed in immunohistochemical analysis. The data suggested that CF35 could not detected C4.4A in strong denaturing conditions such as the paraffin-embedded tissue section.

Currently, we are analyzing the utility as a novel diagnosis to predict recurrence in colorectal cancer cases by detecting membrane type C4.4A in about 500 cases of clinical colorectal cancers using the existing polyclonal antibody and monoclonal antibody (11A1).

On the other hand, X-ray crystal structure analyses of Clone H1-antigen peptides complex showed that arginines on the heavy chain CDR3 interacted with the antigen peptide by Van der Waals force or electrostatic interaction, so that these interactions could contribute to structural stabilization. In addition, we predicted the structures of seven kinds of antibodies by homology modeling using a computer and identified structural stability and electrostatic properties. Furthermore, we thermodynamically demonstrated introduction of charge residues around the edge in the paratope but not hot-spot enable to improve the binding affinity. We believe that these findings will contribute to the development of fundamental technology for the design of monoclonal antibodies with high quality.

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2件、国際誌59件のうち、代表15件を示す）

1. Takeyama H, Yamamoto H, Yamashita S, Wu X, Takahashi H, Nishimura J, Haraguchi N, Miyake Y, Suzuki R, Murata K, Ohue M, Kato T, Takemasa I, Mizushima T, Ishii H, Mimori K, Doki Y, Mori M. : Decreased miR-340 expression in bone marrow is associated with liver metastasis of colorectal cancer, *Mol Cancer Ther.* 2014, 13(4), 976-85.
2. Nagano K, Maeda Y, Kanasaki S, Watanabe T, Yamashita T, Inoue M, Higashisaka K, Yoshioka Y, Abe Y, Mukai Y, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S. : Ephrin receptor A10 is a promising drug target potentially useful for breast cancers including triple negative breast cancers, *J. Controlled Release.* 2014, 189, 72-9.
3. Takahashi H, Nishimura J, Kagawa Y, Kano Y, Takahashi Y, Wu X, Hiraki M, Hamabe A, Konno M, Haraguchi N, Takemasa I, Mizushima T, Ishii M, Mimori K, Ishii H, Doki Y, Mori M, Yamamoto H. : Significance of Polypyrimidine Tract-Binding Protein 1 Expression in Colorectal Cancer, *Mol Cancer Ther.* 2015, 14(7), 1705-16.
4. Taki S, Kamada H, Inoue M, Nagano K, Mukai Y, Higashisaka K, Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Tsunoda S. : A novel bispecific antibody against human CD3 and Ephrin receptor A10 for breast cancer therapy, *PLOS ONE.* 2015, 10(12), e0144712.
5. Kado Y, Mizohata E, Nagatoishi S, Iijima M, Shinoda K, Miyafusa T, Nakayama T, Takuma Y, Sugiyama A, Kawamura T, Lee YH, Matsumura H, Doi H, Fujitani H, Kodama T, Shibasaki Y, Tsumoto K, Inoue T. : Epiregulin recognition mechanisms by anti-epiregulin antibody 9E5: Structural, functional and molecular dynamics simulation analyses, *J. Biol. Chem.* 2016, 291(5), 2319-30.
6. Fukuda Y, Tse KM, Nakane T, Nakatsu T, Suzuki M, Sugahara M, Inoue S, Masuda T, Yumoto F, Matsugaki N, Nango E, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Song C, Hatsui T, Yabashi M, Nureki O, Murphy ME, Inoue T, Iwata S, Mizohata E. : Redox-coupled proton transfer mechanism in nitrite reductase revealed by femtosecond crystallography, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016, 113(11), 2928-33.
7. Nagano K, Tsutsumi Y. : Development of novel drug delivery systems using phage display technology for clinical application of protein drugs, *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B.* 2016, 92(5), 156-66.
8. Munakata K, Uemura M, Tanaka S, Kawai K, Kitahara T, Miyo M, Kano Y, Nishikawa S, Fukusumi T, Takahashi Y, Hata T, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Ikenaga M, Kato T, Murata K, Carethers JM, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. : Cancer stem-like properties in colorectal cancer cells with low proteasome activity, *Clin Cancer Res.* 2016, 22(21), 5277-5286.
9. Yamamoto H, Murata K, Fukunaga M, Ohnishi T, Noura S, Miyake Y, Kato T, Ohtsuka M, Nakamura Y, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Ohue M, Sekimoto M, Nezu R, Matsuura N, Monden M, Doki Y, Mori M. : Micrometastasis Volume in Lymph Nodes Determines Disease Recurrence Rate of Stage II Colorectal Cancer: A Prospective Multicenter Trial, *Clin Cancer Res.* 2016, 1;22(13), 3201-8.

10. Khan S, Sikander M, Ebeling MC, Ganju A, Kumari S, Yallapu MM, Hafeez BB, Ise T, Nagata S, Zafar N, Behrman SW, Wan JY, Ghimire HM, Sahay P, Pradhan P, Chauhan SC, Jaggi M. : MUC13 interaction with receptor tyrosine kinase HER2 drives pancreatic ductal adenocarcinoma progression, *Oncogene*. 2017, 36(4), 491-500.
11. Tominaga Y, Maruyama M, Yoshimura M, Koizumi H, Tachibana M, Sugiyama S, Adachi H, Tsukamoto K, Matsumura H, Takano K, Murakami A, Inoue T, Yoshikawa H, Mori Y. : Promotion of protein crystal growth by actively switching crystal growth mode via femtosecond laser ablation., *Nature Photonics*, 2016, 10, 723-726.
12. Nakane T, Hanashima S, Suzuki M, Saiki H, Hayashi T, Kakinouchi K, Sugiyama S, Kawatake S, Matsuoka S, Matsumori N, Nango E, Kobayashi J, Shimamura T, Kimura K, Mori C, Kunishima N, Sugahara M, Takakyu Y, Inoue S, Masuda T, Hosaka T, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Hatsui T, Yabashi M, Inoue T, Nureki O, Iwata S, Murata M, Mizohata E. : Membrane protein structure determination by SAD, SIR, or SIRAS phasing in serial femtosecond crystallography using an iododetergent., *PNAS*, 2016, 113(46), 13039-13044.
13. Nango E, Royant A, Kubo M, Nakane T, Wickstrand C, Kimura T, Tanaka T, Tono K, Song C, Tanaka R, Arima T, Yamashita A, Kobayashi J, Hosaka T, Mizohata E, Nogly P, Sugahara M, Nam D, Nomura T, Shimamura T, Im D, Fujiwara T, Yamanaka Y, Jeon B, Nishizawa T, Oda K, Fukuda M, Andersson R, Båth P, Dods R, Davidsson J, Matsuoka S, Kawatake S, Murata M, Nureki O, Owada S, Kameshima T, Hatsui T, Joti Y, Schertler G, Yabashi M, Bondar AN, Standfuss J, Neutze R, Iwata S. : A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin., *Science*, 2016, 354(6319), 1552-1557.
14. Takemoto K, Iwanari H, Tada H, Suyama K, Sano A, Nagai T, Hamakubo T, Takahashi T. : Optical inactivation of synaptic AMPA receptors erases fear memory, *Nat Biotechnol*, 2017, 35(1), 38-47.
15. Masuda K, Kitakami JI, Kozasa T, Kodama T, Ihara S, Hamakubo T. : Visualization of ligand-induced Gi-protein activation in chemotaxing cells, *FASEB J.*, 2017, 31(3), 910-919.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表（代表 15 件を示す）

1. オールジャパンでのアカデミア創薬の加速に向けて～産官学連携による抗体医薬開発とその支援にフォーカスして～（口頭），堤 康央, CBI 関西, 2014 年 12 月, 国内.
2. 革新的バイオ医薬品の開発を目指したバイオ創薬技術と創薬支援の取り組み（口頭），角田慎一, アカデミックフォーラム, 2015 年 5 月, 国内.
3. 医薬品設計のための大規模分子シミュレーション（口頭），山下雄史, 岡山（第 4 回スーパーコンピュータ「京」と生命科学）, 2015 年 6 月, 国内.
4. 我が国発のバイオ医薬の創出に向けて～抗体医薬にフォーカスして～（口頭），堤 康央, 関西ライフサイエンス・リーディングサイエンティストセミナー, 2015 年 9 月, 国内.
5. 第 3 世代抗体医薬品の開発に必須のアダプター分子の設計（口頭），井上 豪, 第 6 回関西ライフサイエンス・リーディングサイエンティストセミナー, 2015 年 12 月, 国内.
6. 革新的バイオ医薬の目指すべき安全性面からのアプローチ（口頭），長野一也, 堤 康央, 第 7 回日本安全性薬理研究会学術年会, 2016 年 2 月, 国内.

7. 次世代抗体開発を指向した in silico と in vitro をつなぐ熱力学解析 (口頭), 長門石曉, 津本浩平, バイオプロセス講演会, 2016年6月, 国内.
8. 熱力学・構造から考察した VHH パラトープ側鎖の抗原との相互作用における役割 (ポスター), 田村浩子, 秋葉宏樹, 木吉真人, アベイロホセ, 津本浩平, 第89回日本生化学会大会, 2016年9月, 国内.
9. 造血器型プロスタグランジンD合成酵素変異体 V187I の熱安定性(ポスター), 門 祐示, Pojchanun Kanitthamniyom, 中村 努, Sun Xin, 中山泰亮, 福田庸太, 溝端栄一, 裏出良博, 井上 豪, 日本結晶学会平成28年度年会, 2016年11月, 国内.
10. Creation of a novel non-immune phage human antibody library comprising four stable VH-VL pairs (Poster), Mukai Y, Ogura T, Misato K, Nagano T, Higashisaka K, Yoshioka Y, Nagano K, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y, AAPS National Biotechnology Conference, May, 2014, 国外.
11. Optimization of an immune method to shorten time for inducing antibodies in mice (Poster), Mori T, Nagano K, Higashisaka K, Yoshioka Y, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y, The American Society for Cell Biology 2015 Meeting, Dec, 2015, 国外.
12. Molecular Dynamics Simulation of Biomolecules (Oral), Yamashita T, Accuracy Improvement and Computational Conditions, Athens (ICCMSE2016), March, 2016, 国外.
13. Proteins in Serial Femtosecond Crystallography (Oral), Mizohata E, 14th conference of the Asian Crystallographic Association Meeting (AsCA2016), Dec, 2016, 国外.
14. Molecular Dynamics Analysis of Protein Complex Structures (Oral), Yamashita T, 10th International Conference on Computational Physics (ICCP10), Jan, 2017, 国外.
15. On Quantitative Understanding on Antigen-Antibody Interaction through All-atom Molecular Dynamics Simulations (Oral), Yamashita T, 3rd Symposium on Biophysics Postgraduate Research, Jan, 2017, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. アカデミア創薬最前線～ライフサイエンスへの誘い～, 堤 康央, 長野一也, 東阪和馬, 大阪大学薬学研究科 (大阪府立三国丘高等学校・SSH 選択生の1日体験), 2014年8月, 国内.
2. アカデミア創薬最前線～ライフサイエンスへの誘い～, 堤 康央, 長野一也, 東阪和馬, 大阪大学薬学研究科 (大阪府立三国丘高等学校・SSH 選択生の1日体験), 2015年8月, 国内.
3. 分子シミュレーションの創薬応用, 山下雄史, 岡崎コンファレンスセンター (第9回分子シミュレーションスクールー基礎から応用までー・TCCI ウィンターカレッジー分子シミュレーションー), 2015年10月, 国内.
4. スーパーコンピュータで挑戦する生命・分子・薬の科学, 山下雄史, 鳥栖高校・鳥栖中学校 (理研主催特別講演会), 2015年12月, 国内.
5. 抗体でがんをやっつける, 浜窪隆雄, 東大先端研 (リサーチツアー。島根県立浜田高校), 2015年12月, 国内.
6. 抗体でがんをやっつけるーバイオ医薬の設計, 浜窪隆雄, 東大先端研 (文科省「SPH事業」人材育成プログラム: 石川県立工業高等学校), 2016年7月, 国内.
7. アカデミア創薬最前線～ライフサイエンスへの誘い～, 堤 康央, 長野一也, 東阪和馬, 大阪大学薬学研究科 (大阪府立三国丘高等学校・SSH 選択生の1日体験), 2016年8月, 国内.

8. タンパク質の分子動力学シミュレーションの基礎と新しい分子設計技術への応用展開, 山下雄史, 立山国際ホテル(第20回 分子シミュレーション(2016年度)夏の学校), 2016年9月, 国内.

(4) 特許出願

当該年度の研究開発成果に係る特許出願は、なし。

1.