

医薬品創出基盤技術開発事業

日時: 2018年10月18日(木)13:00~17:20

場所:一橋大学一橋講堂

主催:国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)



国立研究開発法人 日本医療研究開発機構

Japan Agency for Medical Research and Development

目次

P 02				
-	目次			
P 03	プログラム			
P 04~07	PD、PS、PO挨拶			
P 08~09	概要(推進委員·運営体制)		-11-	
P 10~11	特殊環状ペプチドを中核とした革新的次世代バイオ医薬品開発の加速	東京大学		裕明
P 12~13	新規CRISPR-Cas9システムセットの開発とその医療応用	東京大学	濡木	理
P 14~15	第3世代へテロ核酸の開発	東京医科歯科大学	横田	隆徳
P 16~17	毒性ゼロに向けた革新的核酸医薬プラットフォーム構築 ーデュアル修飾型人工核酸の創製・探索・評価ー	大阪大学	小比?	賀 聡
P 18~19	任意の遺伝子発現制御を可能にする革新的ポリアミド薬剤の開発	京都大学	杉山	弘
P 20~21	ヒトIgG特異的修飾技術による多様な機能性抗体医薬の創出	鹿児島大学	伊東	祐二
P 22~23	多機能複合分子標的物質の作製による細胞運命操作技術の開発	徳島大学	岡﨑	拓
P 24~25	高分子ナノテクノロジーを基盤とした革新的核酸医薬シーズ送達システムの創出	東京工業大学	西山	伸宏
P 26~27	染色体工学技術を用いたヒト抗体産生ラットの作製	鳥取大学	香月	康宏
P 28~29	革新的次世代型がん特異的抗体の開発とその臨床応用	東北大学	加藤	幸成
P 30~31	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	東京医科歯科大学	石川	俊平
P 32~33	バイオ医薬品局所徐放のための展開型ナノシート創出技術開発	東北大学	阿部	俊明
P 34~35	エクソソーム改変技術を用いた新規ドラッグデリバリーシステムの開発	国立がん研究センター	·吉岡	祐亮
P 36~37	タンパク質翻訳を促進する新規ノンコーディングRNAを 用いた革新的創薬プラットフォームの構築	理化学研究所	カルコピエロ	
P 38~39	RNAi型医薬品を標的組織ならびに多能性幹細胞で持続的に 発現させるウイルスベクター技術の開発	京都大学	朝長	啓造
P 40~41	アンメット疾患領域を開拓するスマートなケモバイオ抗体	東北大学	梅津	光央
P 42~43	バイオ医薬品評価のための新世代ヒト化マウスの開発	理化学研究所	石川	文彦
P 44~45	革新的バイオ医薬品創出に向けての知財・出口戦略の策定	東北大学	赤堀	浩司
P 46~47	次世代バイオ医薬品を目指した低分子二重特異性抗体の基盤技術開発	東京農工大学	浅野竜	直太郎
P 48~49	新規アミノ酸を用いた高親和性・高安定性VHH抗体の作製技術の開発	理化学研究所	坂本	建作
P 50~51	骨格筋指向性のあるペプチド付加モルフォリノ核酸DDS技術の臨床応用に向けた開発	日本医科大学	岡田	尚巳
P 52~53	組織特異的送達能を有するコンジュゲートsiRNAの創成	岐阜大学	上野	義仁
P 54~55	糖タンパク質バイオ医薬品の糖鎖の高機能化のための解析・制御・管理システムの開発	横浜市立大学	川崎	ナナ
P 56~57	バイオ医薬品のマルチモーダル化による可視化·定量技術開発	理化学研究所	渡辺	恭良
P 58~59	全身・臓器丸ごとイメージング技術による バイオ医薬品の時間的・空間的な体内動態可視化技術の開発	東京大学	上田	泰己
P 60~61	ゼノ核酸アプタマー創薬基盤技術の開発	日本大学	桒原	正靖
P 62~63	細胞内がん抗原を標的とするT細胞受容体様抗体の効率的取得法の開発	富山大学	磯部	正治

AMED成果報告会 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業

プログラム 2018年10月18日(木) ―橋大学―橋講堂

13:00~13:05 開会挨拶 菱山 豊(AMED理事) 13:05~13:15 来賓挨拶 (内閣官房·文部科学省)

13:15~13:30 事業紹介 宮田 敏男(プログラム スーパーバイザー)

【セッション1】

13:30 ~ 13:45 ヒトIgG特異的修飾技術による多様な機能性抗体医薬の創出 伊東 祐二(鹿児島大学)

13:45 ~ 14:00 革新的次世代型がん特異的抗体の開発とその臨床応用 加藤 幸成(東北大学)

14:00 ~ 14:15 バイオ医薬品評価のための新世代ヒト化マウスの開発 石川 文彦(理化学研究所)

- 休憩 15分 —

【セッション2】

14:30 ~ 14:45 毒性ゼロに向けた革新的核酸医薬プラットフォーム構築 - デュアル修飾型人工核酸の創製・探索・評価 - 小比賀 聡 (大阪大学)

14:45~15:00 第3世代へテロ核酸の開発

横田 隆徳(東京医科歯科大学)

15:00 ~ 15:15 高分子ナノテクノロジーを基盤とした革新的核酸医薬シーズ送達システムの創出 西山 伸宏 (東京工業大学)

15:15~16:00 ポスターセッション(革新バイオ事業全27課題)

【セッション3】

16:00 ~ 16:15 糖タンパク質バイオ医薬品の糖鎖の高機能化のための 解析・制御・管理システムの開発

川崎 ナナ(横浜市立大学)

16:15~16:30 全身・臓器丸ごとイメージング技術による

バイオ医薬品の時間的・空間的な体内動態可視化技術の開発

上田 泰己(東京大学)

16:30~16:45 新規CRISPR-Cas9システムセットの開発とその医療応用

濡木 理(東京大学)

16:45~17:15 招待講演 古賀 淳一 氏(日本製薬工業協会)

17:15~17:20 閉会挨拶 竹中 登一(プログラム ディレクター)

AMEDの使命とバイオ医薬品創出の加速



オールジャパンでの 医薬品創出プロジェクト プログラムディレクター(PD)

公益財団法人
ヒューマンサイエンス振興財団
今年

竹中登一 (Toichi Takenaka)

国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の使命の一つは、医療分野の基礎研究や臨床研究から生まれた成果を実用化して、一刻も早く患者さんに届けることです。AMEDは2015年4月に設立され、それ以前は、文部科学省、厚生労働省、経済産業省で別々に推進されていた医療分野の研究開発を、AMEDに予算一元化し、基礎から実用化までの研究を一貫させるマネジメントを行っています。

オールジャパンでの医薬品創出プロジェクトは、政府が 定めた健康医療戦略に基づいてAMEDが進めている9つ の重点施策の1つです。本プロジェクトの事業の一つ「革 新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業」は、創薬研究 の高度化を目的として平成26年度に文部科学省で開始さ れ、平成27年度にAMEDへと引き継がれました。

近年、バイオ医薬品(抗体医薬・核酸医薬等)により、 従来の低分子化合物では困難であった疾患の治療が可能となりつつあることから、世界のバイオ医薬品市場規模 は、著しく成長していますが、日本発のバイオ医薬品の数 は欧米に比べて出遅れているのが現状です。

我が国では、アカデミアで発見される新規創薬標的等の基礎研究成果を、医薬品の創出へと繋げてゆく流れが、必ずしも円滑でないとこれまで指摘されていました。 確実な実用化には、創薬標的の選択から前臨床試験に 至るまでの研究への支援を切れ目なく行うことが必要と なります。

AMEDは、革新的な創薬関連技術の研究開発や医薬 品創出のための基盤整備促進事業を通じ、創薬技術や創 薬シーズが生まれる研究環境を整え、産学官連携プログラム等の仕組みを新たに構築し、日本発の革新的新薬創出を積極的に推進しています。

「革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業」は、バイオ医薬品等の開発における国際競争力の強化を目的としてスタートし、製薬企業が抱える技術的課題の解決および次世代技術の創出をアカデミアが担い、バイオ医薬品(次世代抗体、核酸、ペプチド等)の創出に有用な革新的基盤技術を数多く開発し、実用化に向けて企業への導出を行ってきました。当初は導出件数の目標を3件に設定していましたが、現在までに、目標を遙かに凌駕する企業導出を達成しています。

各課題を担当されている研究者の皆様に、研究成果の 社会実装を精力的に進めていただきましたことを心から 感謝申し上げるとともに、事業満了までの残りの期間に は、更に成果が追加されるものと期待しています。また、 プログラム・スーパーバイザー、プログラム・オフィサー の先生方には、事業の推進に大変ご尽力いただき、本事 業での大きな成果創出は、これら先生方のお力添えなくし ては達成されなかったことと思います。

今後も、引き続きオールジャパンでのバイオ医薬品創出 への支援を継続して行く所存です。

革新的バイオ医薬品の創出に向けて



プログラムスーパーバイザー

東北大学 大学院医学系研究科 教授

宮田 敏男

(Toshio Miyata)

近年、医薬品創出のあり方は大きく変遷し、今後はAI、バイオ医薬品、ゲノム医療、ビックデータを利活用した新たな開発アプローチを行うことが望まれています(「医薬品産業強化総合戦略」)。日本が得意としている、従来の化学合成に基づく「低分子医薬品」だけを頼りに今後も医薬品開発を継続することは難しい環境となり、バイオテクノロジーに基づく「バイオ医薬品」の創出は避けて通ることのできない状況となりつつあります。このような中で、日本医療研究開発機構(AMED)では「革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業」を実施してきました。我が国の国際競争力を強化する目的で、当該分野が抱える技術的課題を解決し、知財やノウハウを企業に繋ぎ、日本発の革新的なバイオ医薬品創出を実現するためです。

実用化研究の加速を意識した近年の政策の下、低分子 医薬品に関してはアカデミアでも、ヒット化合物探索に始 まり、化学構造最適化、GMP合成/製剤、GLP試験を経 て、医師主導治験までも実施することが可能となり、開発 実績やノウハウが蓄積されつつあります。これに対し、バ イオ医薬品の研究開発は遥かに複雑です。一定の品質 を確保するためには、培養条件、精製方法や濃縮方法な どに厳密な管理が必要で、大量生産時の製品の同等性を 確保することは、低分子化合物医薬品に比べて難しい分 野です。これは、低分子医薬品の後続品の開発に比べ、 バイオ医薬品の後続品であるバイオシミラー開発のハード ルが高いことを見ても明らかです。低分子医薬品とは異 なり、日本でバイオ医薬品の研究開発に経験・ノウハウ の蓄積が十分な製薬企業は、まだ限られています。すな わち、現時点では、アカデミア、バイオCRO、製薬企業(バ イオベンチャー) すべてが当該分野で独立して経験を積

でいる段階であり、これらの連携と協業は今後の課題と なっています。

日本発の革新的なバイオ医薬品を創出するためには、 要素技術やシーズ(コンセプト)の発見に加え、複数の革 新的要素技術を組み合わせ、付加価値や実用化可能性を 高めること、オープンイノベーションの「場」を提供し、経験 やノウハウを繋ぐことなど、多くの課題を皆の力で解決し なければいけません。そうしないと、画期的な成果が得 られても、生産技術、知的財産権、薬機法上の課題がネッ クとなり、革新的なバイオ医薬品は生まれず、低分子医薬 品の開発とは異なる経験やノウハウを蓄積していかねばい けません。厚生労働省「薬価制度の抜本的改革について (平成29年6月14日) |では、革新的新薬創出のための取り 組みの加算として、「産学連携の取り組み」が記載されて います。今や、新薬開発はアカデミアと製薬企業(バイオ ベンチャー)が協業して進める時代であり、バイオ医薬品 はまさにその先頭に立つべき[産学連携の取り組み]と考 えています。

アカデミアシーズの大半は開発の初期段階にあり、この段階でしっかりとした動機づけあるいは出口(導出や実用化)を見据えた支援の必要があることから、文部科学省・AMED・事業推進者一丸となり推進してきました。本事業の26の多様な研究開発課題は、いずれも革新的バイオ医薬品につながるポテンシャルを秘めたシーズや技術基盤であり、本事業において数多くの特許出願と企業導出につながる成果をあげ、本成果報告会でそれらをご紹介できる運びとなりました。これら研究のさらに進展を期待しつつ、今後とも柔軟な事業運営を行い、当事業から一つでも多く社会実装につながる成果を創出してまいりたいと思います。

欧米を凌駕したい



プログラムオフィサー 慶應義塾大学医学部 特別招聘教授 **堀内 正** (Tadashi Horiuchi)

事業は、日本のバイオ医薬品開発企業が抱える技術的課題を解決し世界初の次世代バイオ医薬品(ペプチド、核酸、次世代抗体等)の創出に係る革新的基盤技術開発を目指しています。事業公募要項に「5年以内の企業技術導出」との目標を明記し、技術開発をしてまいりました。

この目標を、各課題の研究者の方々に達成していた だくため、我々は他の事業にない以下の支援施策を実 施しました。

第一の支援策は、事業内に、各技術開発課題の研究開発ポートフォリオ・マネジメントを丁寧に推進する「知財戦略課題」を設置しました。この組織は弁理士や製薬企業で医薬品開発経験のある専門家から構成されるグループです。この支援は研究者の先生方から好評で、結果として多くの研究成果が導出に結び付きました。第二の支援策は、「マイルストーン管理」です。この施策は3ヵ月毎に達成管理表を提出いただくため、研究者の先生方の負担になったことと思いますが、各課題の問題点が明確化でき、Go/No-go判断に役立ったと考えております。第三の施策は、宮田PSの指導の下PS/PO/知財戦略課題/推進委員/AMEDスタッフが一体となり、各課題に対して「hands-onで進捗管理・支援」を行いました。即ち、相談が必要な

案件の発生時に随時AMEDで先生方と面談、全課題のサイトビジット、各課題の実用化に向けた具体的なボトルネックを洗い出し、等の施策を実施し、導出へ向けた建設的な議論を先生方とFace to faceで進めました。これらの施策が合わさり高い導出実績に至ったものと思っております。また、いくつかの課題で「事業内研究連携」が生まれ、個々のアカデミア研究をAll-Japanでのバイオ研究推進へと発展させる一つの契機になったと考えています。

以上の施策実施の結果、2018年8月現在で、多くの技術を企業導出しました。これらの成果をさらに発展・展開させることで、近い将来、日本がバイオ創薬の分野で「欧米に追いつき、追い越す」事になると確信しています。

アカデミア発技術の企業導出



プログラムオフィサー 株式会社 バイオフロンティアパートナーズ 代表取締役 大滝 義博

バイオテクノロジー領域の研究は近年、その進展が 目覚ましく、その成果を利用した従来にない新規メカ ニズムをもつバイオ医薬品の開発が進められ、既に多 くの製品が上市されるに至っています。この成功を見 て世界各国は、より有効性が高く副作用の少ないバイ オ医薬品創出を目指して熾烈な研究開発競争を繰り 広げています。そこで我が国で進めているアカデミア 発シーズを用いた研究開発に於いても、出口戦略を明 確にして、基礎研究からバイオ医薬品の製品化に至る までを切れ目なく支援するバイオ医薬品開発支援体 制の構築が必須となります。本事業では出口を、「ア カデミアの研究開発成果を5年以内に企業に移転し、 迅速に製品化に繋げる基盤技術を開発する」ことに置 きました。すなわち、企業での迅速な製品化に繋がる ために有効となる革新的基盤技術を、アカデミアから 産み出そうと研究開発を継続的に実施してきたので す。但し、企業での迅速な製品化を可能とする技術で あるためには、アカデミアは企業が安心して受け取れ る根拠となる質と量を持ったデータを、適切な研究期 間でタイムリーに提供することが重要となります。本 事業では創薬経験者を含む推進委員会および知財戦 略課題を設置し、製薬企業への技術移転に必要となる 試験デザインや項目を検討する際に一緒に議論して効

率的に進める体制を事業内に構築し研究を推進いたしました。

(Yoshihiro Otaki)

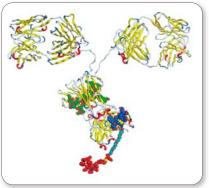
さらに、本事業では企業導出達成の定義を明確に 設定した上で、委員会で必要項目を達成していると判 断した場合に初めて「企業導出達成」と認定すること としました。2018年8月現在、数多くの技術が企業に 導出されたことを本事業として認定するに至っておりま す。このような総合的な仕組みの構築こそが、バイオ 医薬品のシーズ開発につながる基盤技術の継続的創 出を可能にしたと考えています。今後とも、積極的な 事業運営により、さらなる成果の創出を行っていくとと もに、AMED他事業との有機的連携を図り、世界に発 信できるバイオ医薬品の開発を目指して行こうと考え ております。

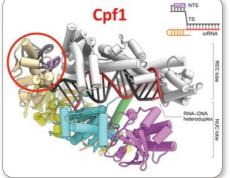
概要

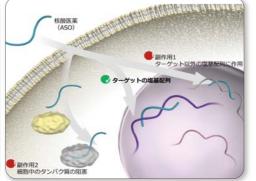
バイオ医薬品は低分子医薬品よりターゲットへの特異性が高いことから効果が劇的であり、副作用も少ないことが期待されています。我が国の製薬企業もバイオ医薬品の開発に取り組みつつありますが、多くの技術的課題の解決(細胞内標的を創薬ターゲットとする技術、バイオ医薬品の低分子化、特定の組織や細胞にバイオ医薬品を送達する技術、核酸医薬の高活性化及び安定性向上、糖鎖構造の制御技術等)が求められています。

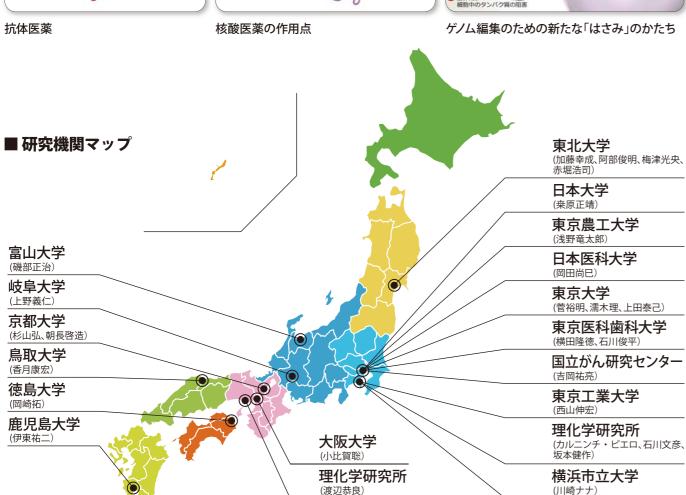
そこで、本事業では、我が国のバイオ医薬品の国際競

争力を強化するため、バイオ医薬品の創出に関する先端的技術を有する機関に対して、製薬企業が抱える技術的課題の解決及び世界初の革新的な次世代技術界初の次世代バイオ医薬品の創出に係る革新的基盤技術(核酸、次世代抗体、ペプチド、遺伝子治療、糖鎖、DDS、実験動物、イメージング等に関する技術)の開発を行っています。開発された基盤技術等については、事業終了時までに企業等へ移転することを目指しています。









運営体制

■ 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業 PS・PO・推進委員

プログラムスーパーバイザー(PS)

宮田 敏男 国立大学法人東北大学大学院医学系研究科 教授

プログラムオフィサー(PO)

堀内 正 慶應義塾大学医学部 特別招聘教授

大滝 義博 株式会社バイオフロンティア パートナーズ 代表取締役社長

推進委員

岡﨑 寛 株式会社カイオム・バイオサイエンス 研究本部長

落谷 孝広 国立研究開発法人国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 プロジェクトリーダー

川口 勉 学校法人埼玉医科大学 リサーチアドミニストレーションセンター 非常勤講師

小梅川純一 株式会社バイオフロンティア パートナーズ 技術顧問

後藤 俊男 国立研究開発法人理化学研究所 産業連携本部 創薬・医療技術基盤プログラム プログラムディレクター

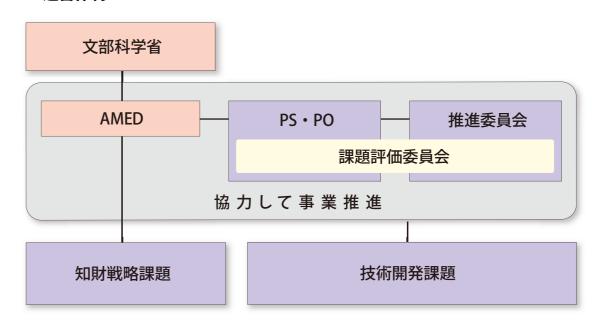
津本 浩平 国立大学法人東京大学大学院工学系研究科 教授

南学 正臣 国立大学法人東京大学大学院医学系研究科 教授

藤本 陽子 ファイザー株式会社 エッセンシャルヘルス事業部門 PEHメディカル・アフェアーズ統括部 統括部長

宮田 満 株式会社宮田総研 代表取締役社長

■ 運営体制



本事業は、文部科学省との連携の下、AMEDによって推進されています。本事業では、1名のプログラムスーパーバイザー(PS)と2名のプログラムオフィサー(PO)が配置されており、事業全体の進捗状況を把握し、事業の円滑な推進に当たり必要となる指導・助言等を行っています。推進委員会は、医薬品の研究開発に精通した有識者からなる機関であり、事業推進、導出活動、成果の公開・利用方策の検討や課題の進捗管理に当たり、PS及びPOに意見を述べるとともに補佐をしています。また、PS、PO及び推進委員をメンバーとする課題評価委員会が設置されており、事前評価、中間評価、事後評価等を実施していきます。

特殊環状ペプチドを中核とした 革新的次世代バイオ医薬品開発の加速

東京大学 大学院理学系研究科 教授 **管 裕明**



1994年マサチューセッツ工科大学PhD。1994年~1997年マサチューセッツ総合病院・ハーバード大学医学部博士研究員。1997年~2002年ニューヨーク州立バッファーロー大学Assistant Professor、2002年~2003年同大Tenured Associate Professor。2003年から東京大学先端科学技術研究センター助教授、2005年から教授。2010年から同大大学院理学系研究科教授。主な専門分野は、ケミカルバイオロジー。受賞歴は2001年内閣府産学官連携功労者表彰「日本学術会議会長賞」、2002年日本化学会学術賞、2014年日本ペプチド学会赤堀メモリアルアワード、2015年科学技術分野の文部科学大臣表彰「科学技術賞・研究部門」、2016年読売テクノフォーラム・ゴールドメダル賞、2017年名古屋シルバーメダル賞他。2006年ペプチドリーム社創業、2013年東証マザーズ上場、2015年東証1部上場、2018年まで社外取締役。

課題概要

(Hiroaki Suga)

特殊環状ペプチドとは、生体内での蛋白質翻訳合成に用いられる20種類の蛋白質性アミノ酸以外のアミノ酸を含むペプチドのことであり、大環状構造の他に、D-アミノ酸・N-メチル化アミノ酸などを含む。これら「特殊な」骨格を有することにより、ペプチダーゼ耐性の獲得やコンフォメーションの安定化が期待され、従来の未修飾直鎖型ペプチドと比較した場合に、医薬品としてより高いポテンシャルを持つ。本課題管理者である菅は、平成19~25年度にわたり日本学術振興会・特別推進研究の代表者として特殊環状ペプチドの研究を遂行し、標的蛋白質に対し数nMからサブnMの解離定数をもつ極めて強力な結合能力をもった特殊環状ペプチドを探索/発見する技術RaPIDシステムの開発に成功した(図1)。

本事業の代表者である菅が15年にわたる歳月をかけて開発したRaPIDシステムにおける「探索」とは、いわゆる古典的な化合物の大規模スクリーニングとは全くコンセプトを異にする。翻訳合成された1兆(10¹³)種類から成る特殊環状ペプチドライブラリーから、標的蛋白質に高い結合能力をもった活性種をセレクションすることで、わずか数週間で目的の生理活性特殊環状ペプチドの同定が可能になった(図1)。「AMED革新的バイオ医薬品創出技術開発事業」が開始した平成26年(2013年)から現在までに、菅研でRaPIDシステムを駆使し特殊環状ペプチドを獲得、論文発表された数は10種類にものぼる。菅研から未だ発表していない特殊環状ペプチドを含めると20種類を超える。いずれの化合物も解離定数あるいはIC50は低nMからサブnMであり、RaPID

システムの広い汎用性と高い信頼性を示している。

特殊ペプチドは、菅のアカデミア研究を中心に、産業側で はペプチドリーム社がイノベーションを牽引し、その創薬応 用を展開している。しかし、この「特殊ペプチド創薬」のコ ンセプト、モダリティー自体が生まれて10年の年月しか経て おらず、いくつかの技術的課題も残されている。また、近 年、抗体領域で流行している薬剤共役体、ADCのように、 特殊ペプチドと薬剤共役体、cPDC (cyclic Peptide Drug Conjugate) としての応用も考えられる。cPDCは完全な合 成化合物であるため、薬剤と共役させるためのリンカー化 合物や薬剤そのものの選択肢も広い。さらに、抗体よりも はるかに分子量が小さいため、標的とした蛋白質が内在さ れる時に細胞内に取り込まれる効率も抗体よりも高い可能 性もある。一方、薬剤の代わりに放射線トレーサー化合物 と共役させることで、PET等の診断薬開発にもつながる可 能性がある。したがって、これらのcPDCの有用性が立証 されれば、ADCより安価で且つ安定な(蛋白質を媒体とし たバイオロジクスADCとは異なり、化学物質としてのcPDC のシェルフライフは長い)新たな薬剤デリバリービークルに なる可能性も高い。これらの応用を考え、本事業では上記 の残された問題点を解決しつつ、本研究計画では「特殊ペ プチド創薬」のさらなるブレークスルーを目指した計画を建 てるべく、cPDC開発においては細胞膜タンパク質標的を 複数選択し、また膜透過性の検証を視野に入れた特殊環 状ペプチド薬剤開発においては細胞内標的を複数選択し、 個々の課題を解決すべく各目標を並行して研究を推進す ることとした。また、各課題を解決すべく、5年間で5人の 共同研究者との連携を取り、本事業を推進してきた。

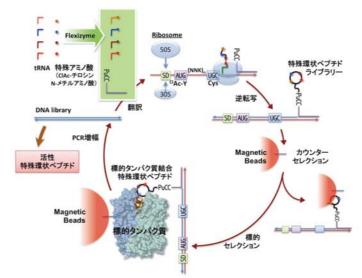


図1 RaPIDシステム:特殊環状ペプチドライブラリーの翻訳合成とmRNAディスプレイを組み合わせることで、標的蛋白質に結合する活性種を濃縮、さらにその活性種をコードしているcDNAを回収してPCRにより増幅をすることで再びmRNAを転写する。この過程を繰り返すことで標的蛋白質に高い親和性と特異性をもつ特殊環状ペプチドを同定できる。

本事業における成果概要

本事業における研究開発課題では、このRaPIDシステムを基盤技術として活用することで、そこから生み出される特殊環状ペプチドを日本発の次世代バイオ医薬品として確固たる地位を確立させることを達成目標とした。この目標を達成するべく、下記の中核技術目標と要素技術目標を設定した。

中核技術目標**①**疾患細胞特異的な薬剤デリバリービー クルとしての技術革新

疾患細胞を特異的に認識する特殊環状ペプチドに薬剤を共役したcPDC (cyclic Peptide-Drug Conjugate)技術を確立し、「薬剤デリバリビークル」開発の技術革新を進めた。

本研究では、7種類のがん疾患マーカーとなる細胞膜タンパク質標的を選び、RaPIDシステムを駆使して標的に特異的且つ強力に結合する特殊ペプチドを探索、発見した特殊

ペプチドをもとにcPDCの開発進めた。うち、3種の標的に 関しては低分子薬剤との特殊ペプチド共役剤の開発を進 め、2種の標的に関してはがん細胞特異的ホウ素中性子捕 獲法(BNCT)の開発を進めた。また1種の標的に関しては、 PETトレーサーとしての診断薬開発、1種に関しては2量化を 施した次世代特殊ペプチド分子を作製した。うち、平成30 年9月現在で、前臨床試験に移行した分子が2つ、その準備 段階にある分子が2つある。各標的の具体名および特殊ペ プチドの配列については、特許出願までにまだ時間を要する ことを考慮し、公開情報となる本報告書には記載しない。

中核技術目標2中分子医薬品としての技術革新

細胞膜を透過し、細胞内のタンパク質間相互作用 (Protein-Protein Interaction, PPI) を効率的に阻害する特殊環状ペプチドの探索法を確立し、「中分子医薬品」開発の技術革新を進めた。

本研究では、3種の細胞内標的タンパク質を選び、RaPIDシステムを駆使して特殊ペプチドの探索を行い、その機能解析を行った。本研究は高いリスクがある研究事業であるが、幸いにして1種の標的に対して細胞内で機能する特殊ペプチドの発見に至り、2018年9月現在、前臨床試験に向けた準備を進めている。各標的の具体名および特殊ペプチドの配列については、特許出願までにまだ時間を要することを考慮し、公開情報となる本報告書には記載しない。

要素技術目標③医療応用としての技術革新

上記の中核技術から生まれる特殊環状ペプチドの生体 内薬効評価と医療応用への突破口を開き、次世代バイオ 医薬品としての実績を積むことを目指した。

●cPDCの開発で得られた2つの特殊ペプチドの前臨床 試験としてモデル動物実験を進め、いずれも生物活性を示 す目的の成果を上げた。また、平成30年度内に前臨床試 験に入ることのできる可能性のある2種のcPDCがあり、現 在準備を進めている。

主な成果

"Highly selective inhibition of histone demethylases by de novo macrocyclic peptides" A. Kawamura; M. Munzel; T. Kojima; C. Yapp; B. Bhushan; Y. Goto; A. Tumber; T. Katoh; O.N. King; T. Passioura; L.J. Walport; S.B. Hatch; S. Madden; S. Muller; P.E. Brennan; R. Chowdhury; R.J. Hopkinson; H. Suga*; C.J. Schofield, Nature Communications 8, 14773 (2017)

"Macrocycle peptides delineate locked-open inhibition mechanism for microorganism phosphoglycerate mutases" H. Yu; P. Dranchak; Z. Li; R. MacArthur; M.S. Munson; N. Mehzabeen; N.J. Baird; K.P. Battalie; D. Ross; S. Lovell; C.K. Carlow; H. Suga*; J. Inglese, Nature Communications 8, 14932 (2017)

"Allosteric Inhibition of a Semaphorin 4D Receptor Plexin B1 by a High-Affinity Macrocyclic Peptide" Y. Matsunaga; N.K. Bashiruddin; Y. Kitago; J. Takagi; H. Suga*, Cell Chemical Biology 23, 1341-1350 (2016)

"Artificial human Met agonists based on macrocycle scaffolds", K. Ito; K. Sakai; Y. Suzuki; N. Ozawa; T. Hatta; T. Natsume; K. Matsumoto; H. Suga*, Nature Communications 6, 6373 (2015)

新規CRISPR-Cas9システムセットの 開発とその医療応用

東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻 教授

濡木 理

(Osamu Nureki)



1988年東京大学理学部生物化学科卒業、1993年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻修了博士(理学)、1993年日本学術振興会特別研究員PD、1994年理化学研究所基礎科学特別研究員、1995年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻助手、2002年同助教授、2003年東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻教授、2008年東京大学医科学研究所基礎医科学部門教授、2010年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻教授、2014年東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻教授(現職)

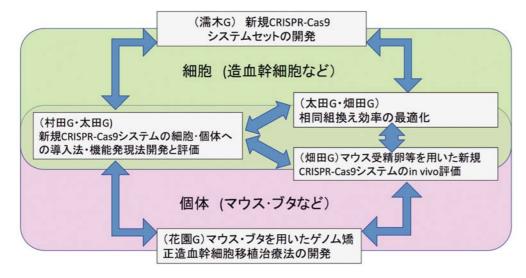
課題概要

2012年、CRISPR-Cas9システムによるゲノム編集技術が開発され、すでに欧米中国で、遺伝子治療の治験が開始されている。しかしながら、日本は特許紛争を懸念するあまり、国際競争に大幅な遅れを取っている。基本特許は欧米に抑えられているものの、現CRISPR-Casを医療応用に用いることは事実上不可能である。なぜなら、CRISPR-Casには、①分子量が大きくウイルスベクターに載せることが困難で細胞導入効率が低い、②CRISPR-Casは標的配列の下流にある2~7塩基からなるPAM配列を(バクテリアが自己と非自己を識別するために)厳密に認識しており、ゲノム編集を行う適用制限となっている、③非特異的切断によるOff targetの問題などの問題が山積しているからである。本プロジェクトでは、CRISPR-Cas9

技術のトップランナーであるFeng Zhangとの共同研究で、様々な生物種のCRISPR-Cas9機能に関する情報をいち早く入手し、機能体であるCas9タンパク質・ガイドRNA・ターゲットDNAの複合体のX線結晶構造を解明し、その構造基盤に基づき、これらの課題を克服する新規

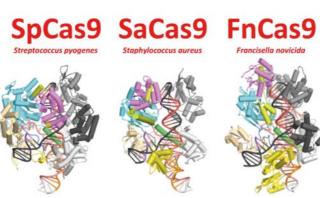
CRISPR-Cas9システムセットを開発してきた。また、医療応用に必須となるゲノム編集効率の高さや精緻さを創出するための周辺技術の開発も併せて実施し、欧米に立ち遅れたCRISPR-Cas9技術に係る、応用開発に真に必要な周辺技術の知財権獲得を目指し、これら革新的なゲノム編集技術を、マウスやブタの遺伝性疾患モデルに適用し、治療を試みてきた。

具体的には、東大の濡木が、新規CRISPR-Cas9システムセットの開発を行い、村田は、新規CRISPR-Cas9システムの細胞内導入法の開発およびゲノム矯正細胞作製法の開発を行い、太田は、高効率な相同組換え技術の開発を実施してきた。自治医大の花園は、東大が開発する技術をX連鎖重症複合免疫不全症患者の治療に応用するため、X-SCIDブタで自家移植による治療法を確立している。群馬大の畑田は、新規CRISPR-Cas9システムの機能評価・選定と、相同組換え効率を上げるためのシステムを開発してきた。



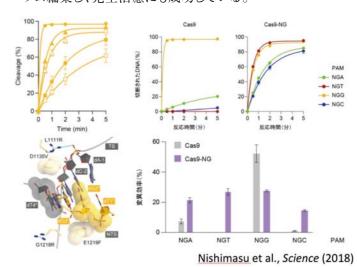
本事業における成果概要

濡木は、最も広範に用いられる、Cas9(SpCas9)と sgRNA、ターゲットDNAの3者複合体の結晶構造を決定 し、RNAに依存したDNA切断の分子機構を世界で初め て解明した(Cell. 2014)。また高速原子間力顕微鏡で、 Cas9がゲノムDNAを切断する様の可視化に成功した (Nat. Commun., 2017)。 またSpCas9より 短い SaCas9 とsgRNA、ターゲット2本鎖DNAの4者複合体の結晶構造 を決定し、SaCas9が、より小さな分子量を持つに至った 機構を明らかにし、Cas9がPAM配列を認識しヘリカーゼ 活性を発動させ、ターゲットDNAの2重らせん構造が緩 みほどけ始めることも明らかにした(Cell, 2015)。 さら に、F. novicida由来Cas9についても4者複合体の結晶構 造を決定し、単純化したPAM配列を認識する変異体の創 出にも成功した(Cell, 2016)。この手法をSpCas9に適用 し、PAMとしてグアニン1塩基を認識するSpCas9変異体 を創出し、Cas9の適用範囲の大幅な拡張に成功した (Science, 2018)。 また、最小の大きさを持つC. jejuni由 来Cas9の4者複合体の結晶構造を決定し、特徴的PAM認 識機構を明らかにし、医療応用に最も近いゲノム編集ツー ルの作成を可能とした(Mol. Cell. 2017)。以上、濡木は、 CRISPR-Cas複合体の立体構造に基づき、小型で、単純 なPAMを認識し、Off-target活性の低い、医療実用化可 能な革新的ゲノム編集ツール「スーパー Cas9」を開発し、 2016年に設立したゲノム編集創薬ベンチャー EdiGENE



本課題で解明したCas9複合体の結晶構造

社にて、遺伝子疾患の治療に向けた研究を推進している。 太田は村田と共同で、評価用マーカー遺伝子を染色体上 に組み込んだヒト培養細胞を作成し、相同組み換えおよ びOff-Targetを可視化する新規の検出系の構築に成功し た。また畑田は、不活性化したdCas9にGCN4のエピトー プを複数つなげたものとGCN4に対するミニ抗体(ScFv) にTET(脱メチル化酵素)とGFPをつなげたものを細胞に 導入し、遺伝子特異的脱メチル化ツールを開発し、DNA の脱メチル化はCas9による切断および相同組み換えを 向上させることを明らかにした。また、遺伝子特異的脱 メチル化ツールにより、発育不全の遺伝病Silver-Russell Syndrome モデルマウスの発育を向上させることに成功 した。花園は、SCIDブタの無菌的な分娩、搬送に成功 し、無菌アイソレーター内で感染徴候なく3ヶ月間の無菌 的飼育に成功した。さらに、SCIDブタから造血幹細胞 を体外に取り出し、Cas9/ガイドRNA複合体および新規 ターゲティングベクターを導入し、SCID原因遺伝子IL2RG 変異の修復に成功したが、特記すべきは、in vitroでノック イン細胞の100%が相同組換え細胞であった。次に、3頭 のSCIDブタでゲノム修復した造血幹細胞を自家移植し、 末梢血に修復細胞を認めることに成功し、これらも100% 相同組換え細胞であった。なお、SCIDマウスで同様にゲ ノム編集し、完全治癒にも成功している。



G1文字をPAMとして認識するCas9の創出

主な成果

原著論文

- 1. Science 361, 1259-1262 (2018).
- 2. Cell 164, 950-961 (2016).
- 3. Nat Biotechnol. 34, 1060-1065 (2016).
- 4. Cell 162, 1113-1126 (2015).

知的財産等

- 1.【出願国】USA【出願日】2017/9/5 【出願番号】US 62/554227
- 2.【出願国】日本【出願日】2017/5/31【出願番号】特願 2017-108556
- 3.【出願日】平成 27 年 11 月 25 日、【出願番号】特願 2015-229896、 【PCT 出願】PCT/JP2016/084958

第3世代ヘテロ核酸の開発

東京医科歯科大学 脳神経病態学分野 教授 横田 降徳

(Takanori Yokota)



1990年10月、東京医科歯科大学医学部神経内科 医員。1998年4月、 米国バーナム研究所 研究員(Prof. Dale E. Bredesen)。1999年7月、 米国バック神経変性疾患研究所 研究員。2000年4月、東京医科歯 科大学医学部神経内科 講師。2004年10月、同 助教授。2009年6 月、同 教授。2014年8月、同 主任教授。

課題概要

アンチセンス核酸、siRNAなどの核酸医薬を用いた治 療は、細胞膜上の分子しか標的にできない抗体医薬と異 なって、細胞内のあらゆる遺伝子を制御可能である。そ の汎用性の高さから、今まで治療困難とされてきたさまざ まな疾患、特に癌や神経疾患への臨床応用が強く期待さ れている。核酸医薬は2013年に高脂血症薬ミポメルセン が米国で認可されて、2016年には難治性神経・筋疾患で 承認されるなど、欧米で急速にその臨床応用は進展して いる。その状況から低分子医薬品と抗体医薬に続く第3 世代の医薬品として核酸医薬が期待を集めている。一方 で核酸医薬の開発は圧倒的に欧米勢に大きく後れをとっ ている。その基本特許を欧米に抑えられており、日本で Cell の開発には大きな制限がある。また既存の核酸医薬品 の問題として全身投与で承認・販売されているミポメルセ ンは肝毒性が問題となったために、米国では承認された が欧州では承認されなかった経緯がある。開発中の核 酸医薬の投与法は経静脈・皮下または局所投与によるも ので、長期に亘り加療を要する慢性疾患に対する核酸医 薬の適応を大きく妨げているのが現状である。日本がこ の核酸医薬開発においてリードするには、有効性が高く、 肝臓以外の臓器へのデリバリーが可能な新規核酸の基 盤技術の開発とその知財や経皮・経口投与可能な基盤 技術が必要となる。

我々は最近、アンチセンス核酸やsiRNAとその分子構造、作用機構が異なる第3の核酸医薬であるDNA/RNA

2本鎖へテロ核酸を創生し特許を取得した(図1)。圧倒的な遺伝子抑制効果を持つヘテロ核酸は従来のアンチセンス核酸の作用を増強して、投与量を著明に減じることが可能で、それによって副作用も低下させる大きな利点を有している。またビタミンE結合ヘテロ核酸では全身臓器での遺伝子抑制効果を示している。

そこで、本事業ではこれまでのヘテロ核酸の分子構造を改良、新規デリバリー分子を開発して、肝臓への negative targetingと疾患環境を利用することによる標的 臓器へのpositive targetingを実現する世界初の肝臓以外の標的臓器特異的な新たな第3世代ヘテロ核酸の分子 設計を行う。

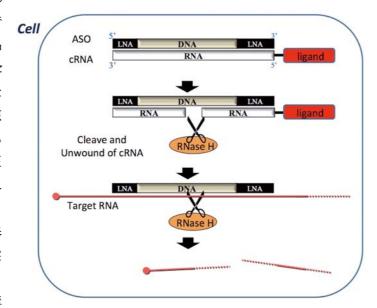


図1 ヘテロ核酸の構造と細胞内遺伝子抑制メカニズム

本事業における成果概要

ヘテロ核酸(HDO)は短鎖DNA/RNAであるが生体内 に内因性の短鎖DNA/RNAまたはDNAが存在するか否 かをヘテロ核酸のメカニズム解明のために検証した。が ん細胞やDNAストレスを与えた条件下ではなく、生理的 に正常な条件下でも細胞質内に存在するゲノムDNAを検 出した。並行して毒性の軽減に取り組んだ。ヘテロ核酸 は高用量で副作用が強く出るが、配列の探索により、高用 量でも副作用が軽減する配列を見出した。またLNAの代 わりに2種類の新規人工核酸をHDOに導入し、いずれに おいても肝毒性の著明な軽減を確認した。またHDOの negative targetingに向けて、HDOと機能性高分子のコ ンジュゲート体の開発を行った。まず、生体適合性に優 れるポリエチレングリコール (PEG)を共有結合でHDOと コンジュゲートしたPEG-HDOを合成して評価を行った。 その結果、PEG分子量(5.10.20.40 kDa)の増大に伴う肝 毒性の低減が認められた。その一方で、40kDaのPEG であっても肝毒性を完全に抑制するレベルには至らな かったことから、PEG結合分子数の増加に取り組んだ。 この際、共有結合を介したコンジュゲーションでは反応 効率の低下が懸念されたことから、より簡便かつ効率の 良いアプローチとして静電相互作用を介したイオン結合 コンジュゲーションを検討した。結果として、40 kDaの PEG 4分子を1分子のHDOに導入することが可能となり (4×PEG40kDa-HDO)、静脈投与後数時間に渡り、肝臓へ

の集積を検出限界レベルまで低下させることに成功した (図2)。

加えてヘテロ核酸の組織特異性を向上させるために新規分子構造のヘテロ核酸を合成した。この合成したヘテロ核酸をマウスに投与したところ、一部が脳へ移行することが確認された。これをもとに遺伝子抑制効果(単回・複数回)や長期の遺伝子抑制効果を確認し、特許出願した。

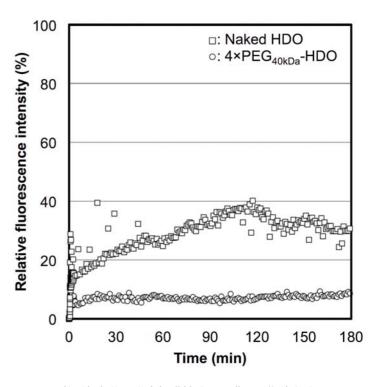


図2 静脈投与後の蛍光標識核酸の肝臓への集積挙動

主な成果

原著論文

- 1. Modulation of blood-brain barrier function by a heteroduplex oligonucleotide in vivo, Sci Rep, Kuwahara H, Song J, Shimoura T, Yoshida-Tanaka K, Mizuno T, Mochizuki T, Zeniya S, Li F, Nishina K, Nagata T, Ito S, Kusuhara H, Yokota T, 2018, 8 (1). 4377.
- 2. Cytosolic Genomic DNA functions as a Natural Antisense, Sci Rep, Asada K, Ito K, Yui D, Tagaya H, Yokota T, 2018, 8(1), 8551.

知的財産

- 1.【発明名称】核酸を含む経腸投与用組成物【発明対象】核酸(例えばHDO)を含む経腸投与用組成物【出願国】日本【出願日】 2015年12月【出願番号】特願2015-234700
- 2. 【発明名称】経皮吸収促進剤【発明対象】核酸(例えばHDO)を含む経皮投与用組成物【出願国】日本【出願日】2017年1月31日 【出願番号】特願2017-014957

毒性ゼロに向けた革新的核酸医薬プラットフォーム構築 ーデュアル修飾型人工核酸の創製・探索・評価ー

大阪大学 薬学研究科 教授 **小比賀 聡** (Satoshi Obika)



1990年 大阪大学薬学部製薬化学科卒業、1992年大阪大学大学院薬学研究科薬品化学専攻博士前期課程修了、1992年 大阪大学薬学部助手、1998年 博士(薬学)(大阪大学)、2002年-2003年 米国カリフォルニア大学サンタバーバラ校化学科客員研究員(兼任)、2004年-2008年 JSTさきがけ研究員(兼任)、2006年 大阪大学大学院薬学研究科助教授、2008年 大阪大学大学院薬学研究科教授、2009年大阪大学国際医工情報センター教授(兼任)、2013年 医薬基盤・健康・栄養研究所創薬デザイン研究センター招聘プロジェクトリーダー(兼任)

課題概要

核酸医薬品は従来型の医薬品とは異なり、特定の遺伝 子の発現を細胞内で抑制できることから、これまでは治 療困難であった疾患に対する革新的な医薬品の創出につ ながるものと期待されている。事実、一昨年から今年に かけて、筋ジストロフィー、脊髄性筋萎縮症、トランスサイ レチン型家族性アミロイドニューロパチーに対する核酸医 薬品が次々と承認されている。一方、核酸医薬品の研究 開発が進展するにつれ、解決すべき新たな課題が顕在化 してきた。その最たるものとして、「人工オリゴヌクレオチ ドが潜在的に有する毒性」があげられる。事実、これまで に臨床試験まで進みながら開発中止となった核酸医薬候 補品の約三分の一では、その毒性発現が原因であるとさ れている。また、1997年に我々が世界に先駆け発表した 架橋型人工核酸(2'.4'-BNA/LNA)は、有効性に優れた人 工核酸であり、欧米を中心として複数の臨床試験が進め られているが、LNAを含む核酸医薬品(アンチセンス医 薬)は時として、重篤な毒性を示すことも明らかとなってき た。核酸医薬品の毒性発現機構の詳細はまだ十分に明 らかになっていないが、過剰な薬効に起因する「オンター ゲット毒性 |を除くと、大きく二つのカテゴリーに分類する ことができる(図1)。一つは、核酸医薬品が細胞内にお いて本来は標的としていないRNAとハイブリッドを形成 し、そのRNAの機能を阻害することに起因するもので、 「狭義のオフターゲット毒性」と呼ばれる。もう一つは、他 の化成品と同様に、物質としての人工オリゴヌクレオチド

が何らかの要因で細胞内のタンパク質等と作用し、その機能を撹乱することに起因するもので、「広義のオフターゲット毒性」と呼ばれる。多くの人工核酸開発が、有効性の追求に終始している中、本課題が目指す「デュアル修飾型人工核酸」は、これまでに構築してきた人工核酸技術により有効性を担保しつつ、核酸医薬品の毒性回避(特に「広義のオフターゲット毒性」の回避)を目指すものである。核酸医薬品の臨床試験数が大きく増加している中、毒性ゼロに向けた人工核酸の開発に対する期待は高まっている。

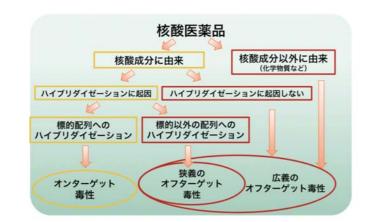


図1 RNAを標的とする核酸医薬品に起因する毒性の分類 (医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、46(8)、p524、Fig.1 を一部改変)

本事業における成果概要

本プロジェクトで開発を行っている「デュアル修飾型人工核酸」とは、文字通り、核酸塩基部と糖部の双方に化学修飾を導入した人工核酸(モノマー及びオリゴマー)であり、その合成並びに機能性評価には高度な核酸化学のノウハウ・技術が必要とされる。我々はこれまでに培ってきた核酸化学・核酸創薬の技術を最大限に駆使し、核酸の塩基部分と糖部分のそれぞれに或いは双方に化学修飾を施した新たな人工核酸の設計・合成を進め、これまでに数十種類の人工核酸の合成に成功してきた。また、in silico解析により綿密に設計した千本もの候補配列からin vivo実験により選別した毒性評価用LNAギャップマーを新たに複数創製し、人工核酸導入に伴う毒性低減効果をin vivo実験により詳細に評価した。その結果、い

くつかの人工核酸において顕著な毒性低減効果が認められた。また、これら人工核酸の導入により、LNAギャップマーのアンチセンス活性は影響を受けない(活性は維持される)ことも合わせて確認している。毒性低減の

メカニズムについては現在詳細な解析を進めているが、化 学修飾による「広義のオフターゲット毒性」の回避がその 主要因であると推察される。これに加えて、本プロジェク トでは「デュアル修飾型人工核酸」等複数の化学修飾導 入にも対応可能なアンチセンス医薬の配列設計法構築を 進めている。

成果の一部については特許出願するとともに、我々は複数の製薬企業との共同研究や成果の導出も進めている。さらに研究成果の社会実装を促進するために、核酸創薬並びに創薬支援を実施する大学発ベンチャー「ルクサナバイオテク(Luxna Biotech)」の設立にも至った。本プロジェクトでは、得られた知見をもとに、「毒性ゼロに向けた革新的核酸医薬プラットフォーム」の構築を目指し、機能性・安全性に優れた核酸医薬品創製につながる研究開発を産官学連携のもと推進していく。

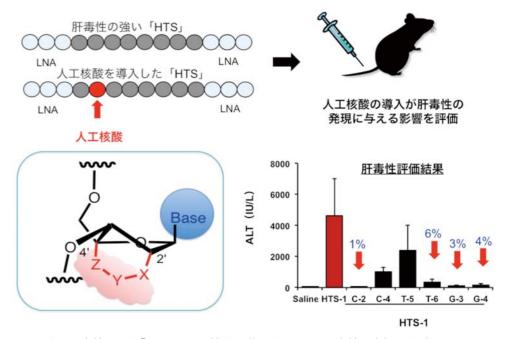


図2 強い肝毒性を示す「HTS」に人工核酸を導入することで肝毒性を大幅に低減

主な成果

原著論文

- Facile synthesis and fundamental properties of an *N*-methylguanidine-bridged nucleic acid (GuNA[NMe]), N. Horie, S. Kumagai, Y. Kotobuki, T. Yamaguchi, S. Obika, *Org. Biomol. Chem.*, 2018, *in press*.
- Hydrogen peroxide-triggered gene silencing in mammalian cells through boronated antisense oligonucleotides, S. Mori, K. Morihiro, T. Okuda, Y. Kasahara, S. Obika, *Chem. Sci.*, 2018, *9*, 1112-1118.
- Synthesis and properties of 7-deazapurine- and 8-aza-7-deazapurine-locked nucleic acid analogs: The effect of glycosidic torsion angle, T. Hara, T. Kodama, Y. Takegaki, K. Morihiro, K. Ito, S. Obika, *J. Org. Chem.*, 2017, 82, 25-36.

ベンチャー

・成果の社会実装を加速するための大学発ベンチャー「ルクサナバイオテク(Luxna Biotech)」を設立(平成29年12月18日)。

任意の遺伝子発現制御を可能にする 革新的ポリアミド薬剤の開発

京都大学 大学院理学研究科 教授 **杉山 弘** (Hiroshi Sugiyama)



1979年4月京都大学工学部合成化学科卒業、1984年3月京都大学大学院工学研究科 合成化学専攻修了工学博士、1984年4月より米国ヴァージニア大学博士研究員、1986年日本学術振興会特別研究員、1987年京都大学工学部合成化学科助手、1993年京都大学工学部合成化学科助教授、1996年東京医科歯科大学医用器材研究所 教授、1999年東京医科歯科大学生体材料工学研究所 教授、2003年より京都大学大学院理学研究科 教授(現職)、2008年より京都大学物質―細胞統合システム拠点主任研究員併任

課題概要

本課題は、核内DNAの特定の塩基配列を認識して、その塩基配列に可逆的に結合する特性(塩基配列特異性)を有するピロール・イミダゾールポリアミド(以下「PI-ポリアミド」と言う)を用い、任意の遺伝子発現制御を可能にする革新的薬剤の開発を目的として研究を進めてきた。一般に、PI-ポリアミドはカリフォルニア工科大学のP.B. Dervan教授らのグループを中心に開発が行われた合成分子である。最近、彼らはPI-ポリアミドの標的をアンドロゲン受容体関連遺伝子に設定し、PI-ポリアミドの拮抗的結合阻害能を活用して、前立腺癌の抗がん剤の実用化を進めている。

我々はPI-ポリアミドにDNAアルキル化を引き起こす seco-CBIやクロラムブシル(Chb)、HAT (ヒストンアセチル 化酵素)やHDAC(ヒストン脱アセチル化酵素)を制御する 薬剤であるSAHA(HDAC阻害)やCTB(HAT活性化)等 と複合化することで、様々なPI-ポリアミドコンジュゲートを 開発した。とりわけ、DNAアルキル化による結合は共有 結合であり、不可逆的な結合で遺伝子発現に強い影響を 与えられると考えた。我々のこれまで培ったPI-ポリアミドコンジュゲートに関する合成評価の経験なしには、他の競合者ではその実現は困難である。

いわば、本課題で目指す物質・技術は、既存のPI-ポリアミドの特性を単に利用したものではなく、「PI-ポリアミドコンジュゲート」の応用を目指した研究である。

なお、先行研究では類似のPI-ポリアミドの明らかな毒

性は見られていないが、水溶性に課題があり大量投与による毒性試験が必要だった。また、DNAに直接作用する薬剤であることから、遺伝毒性についても確認や安全性についての化合物の機能改善を進めつつ、導出に向けたデータパッケージを行ってきた。安全性や薬物動態のデータについては、PI-ポリアミドの分子量の大きさから、低分子医薬品のような多数のデリバティブを作製しての検討は必要ないと予測した。

本課題の遂行によって得られたPI-ポリアミド薬剤に関する知的財産を管理し、更なる企業への技術導出を図るため、京大発ベンチャー企業として株式会社ReguGeneの設立、登記に向けた準備を進めている。現在、代表取締役の候補者、出資者等、京都大学知財部と細部の調整を進めながら、平成30年度中の設立を目指している。今後、ReguGeneにて資金調達を行いつつ、非臨床試験等の研究開発を進める予定である。

本事業における成果概要

我々はPI-ポリアミドコンジュゲートの安定した供給に向けて、固相合成と精製に関する技術的な改良を進めた。 反応条件を精査しPI-ポリアミド合成の純度と収率を向上させることによって、がん細胞の増殖関連遺伝子群を標的とする白血病へのPI-ポリアミドコンジュゲートの医療応用を目指した研究が進展した。

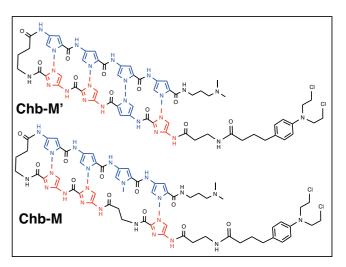
その過程で、DNAアルキル化能を有するChbと複合化したPI-ポリアミド、Chb-M'が増殖関連遺伝子群の抑制において有望であることを見出した。NOGマウスに対して一般状態、体重及び投与後9日目の剖検では、Chb-M'に起因する変化は確認できなかった。一方、血液学的検査では、3.2及び10 mg/kg群で血小板の低値が観察された。

フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病マウスモデルでは、現在最良の治療法であるimatinib投与でも30日で全滅したのに比して、Chb-M'投与では55日経過しても全例生存した。比較として、Chbを持たないM'の配列特異性を有するPI-ポリアミドには抗腫瘍活性がないことを確認した。このことは、ChbのDNAアルキル化能とM'の配列特異性の組み合わせが、白血病の抗腫瘍活性において重要な鍵を握っていることを示している。

その作用機序を解析するため、BCRプロモーターにおけるChIP解析等で、Chb-M'による内在性RUNX1の拮抗的阻害を観察した。現在、Chb-M'によるp53アポトーシス経路の活性化メカニズムを提唱している。

一般に市販のクロラムブシルはヒト肺腺癌には効果がないことが臨床試験により知られている。Chb-M'は市販のクロラムブシルに比べて100分の1の優れたIC50を示し、ヒト肺腺癌に対しても有効な抗腫瘍活性を示した。この結果は、白血病以外の疾患に対しても適用を拡大できる可能性を示唆している。

近年、Chb-M'の設計を見直し合成コストを改善した Chb-Mを開発した。新型Chb-Mは従来型Chb-M'に比べて、薬理活性を維持しつつ、合成コストを約半分に削減できる可能性を有していた。細胞毒性試験でもChb-M'と遜色ない結果が得られており、反復静脈内投与毒性試験、hERG試験、Ames試験、iPS心筋細胞を用いる毒性試験を行い、新型Chb-Mと従来型Chb-M'の機能検証を含めた安全性、毒性評価を行なった。これらの安全性、薬物動態のデータは、今後の薬剤としての問題点の抽出と企業への導出に向けたデータ作製の点から必要と考える。



主な成果

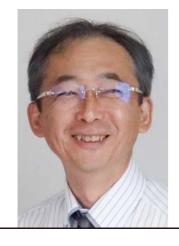
原著論文

- Genetic Regulation of the RUNX Transcription Factor Family Has Antitumor Effects. Morita, K.; Suzuki, K.; Maeda, S.; Matsuo, A.; Mitsuda, Y.; Tokushige, C.; Kashiwazaki, G.; Taniguchi, J.; Maeda, R.; Noura, M.; Hirata, M. Kataoka, T.; Yano, A.; Yamada, Y.; Kiyose, H.; Tokumasu, M.; Matsuo, H.; Tanaka, S.; Okuno, Y.; Muto, M.; Naka, K.; Ito, K.; Kitamura, T.; Kaneda, Y.; Liu, P.P.; Bando, T.; Adachi, S.; Sugiyama, H.; Kamikubo, Y., J. Clin. Invest. 2017, 127, 2815-2828.
- RUNX1 positively regulates ErbB2/HER2 signaling pathway through modulating SOS1 expression in gastric cancer cells. Mitsuda, Y.; Morita, K.; Maeda, S.; Kashiwazaki, G.; Taniguchi, J.; Bando, T.; Hirata, M.; Kataoka, T.R.; Muto, M; Kaneda, Y.; Nakahata, T.; Liu, P.P.; Adachi, S.; Sugiyama, H.; Kamikubo, Y., Sci Rep. 2018, 8, 6423.

ヒトIgG特異的修飾技術による 多様な機能性抗体医薬の創出

鹿児島大学 大学院理工学研究科 教授 伊東 祐二

(Yuji Ito)



1985年九州大学薬学部卒。同大学院薬学研究科修士課程を経て、1990年博士課程単位取得退学(1993年博士(薬学))。主指導教員は、井本泰治教授で、リゾチームの蛋白質工学研究を実施。1990年より九州大学薬学部助手、大学院助手を経て、1997年に、鹿児島大学工学部(杉村研究室)に助教授として赴任。このころから、ファージディスプレイ技術を使ったペプチド・抗体ライブラリ研究を本格的に開始する。2003年米国ガン研究所(NCI-Frederick)にJSPS短期在外研究員として留学。その後、工学系准教授を経て、2010年より理学系教授(現職)。現在の研究テーマは、ファージライブラリ技術による有用抗体・ペプチドの設計に基づいた高機能バイオ医薬品の開発。

課題概要

バイオ医薬品の主流である抗体医薬品は、既に70を超える医薬品が日米欧で認可されているが、その中で日本発のものは、わずか3品目にとどまっており、日本国内からの新たな抗体医薬品の創出が強く望まれている。一方で、従来のADCC活性や阻害活性による治療効果だけでなく、例えば、抗癌剤を抗体に連結してガンに対する特異的な殺傷効果をもたらすADC(抗体薬物複合体)等の高機能化抗体の開発研究も進んでいる。

このような年々激化する抗体医薬品の開発競争の中で、新たなエフェクター機能を有する、さらには未踏の疾患分野に適応可能な抗体医薬品の開発は、日本発の抗体

医薬開発における重要な選択肢の一つである。本課題では、現在までに培われてきた従来のヒトIgG完全抗体の作製・生産技術を最大限に生かしつつ、多彩な機能性を持つエフェクター素子を容易にIgGに付加できる新規技術の導入によって、多様でかつ高度な機能を持った新しい抗体医薬の創出のための基盤技術を確立することを目的とした。

具体的には、ヒトIgG-Fc特異的認識ペプチドを用い、共有結合により IgG-Fcを部位特異的に修飾する技術 であるCCAP (Chemical conjugation by affinity peptide) 法を中核とし、機能性を持つ素子 (①抗癌剤、②放射性核種ラベル化剤、さらには③中枢移行性、④細胞内移入性、⑤IgA受容体結合能を持つ低分子VHH抗体)を、この特異的化学修飾技術で導入することで、多彩な機能を持ったIgG完全抗体を作製・評価する。これらの成果物・知財を基に、日本発の革新的バイオ医薬品の創出を目指した。この目標達成のため、国立大学法人鹿児島大学を代表機関として、分担機関である東京薬科大学(分担者:林良雄教授)、理化学研究所(分担者:金山洋介研究員)、及び協和発酵キリン株式会社(分担者:高橋信明マネジメントオフィス長)と密接に連携し、研究を遂行した。各研究テーマと分担研究機関の関係は、右図の通りである。

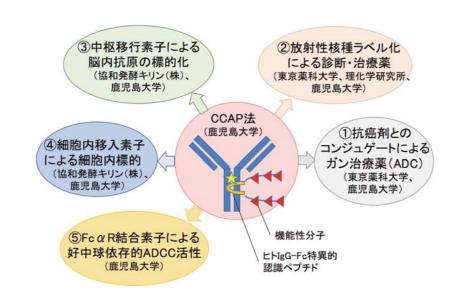


図1 各研究テーマの研究機関による分担

本事業における成果概要

CCAP法では、ヒトIgG抗体(正確にはヒトIgG_{1,2,4}抗体)のFc上のLys248側鎖の ε アミノ基を標的に、DSG (disuccinimidyl glutarate)等の架橋剤を介して、ヒトIgG-Fc特異的認識ペプチドのLys8の側鎖と共有結合にて連結する。この反応の概要を図2Aに示すが、この反応は、穏やかな条件下で、迅速に、また夾雑物(添加されるアミン系化合物やBSA等のタンパク質)にほとんど影響を受けることなく進行する。この反応により1価もしくは2価のみの付加体(コンジュゲート)を生じる(図2Aでは1価のみを表示)が、得られた付加体の抗原結合能は、全

くと言っていいほど、修飾反応によって 影響を受けないのが特徴である。こ の技術を使って、抗体薬物複合体 (ADC)の作製や、金属キレーターを連 結し放射性核種64Cuで標識すること で、担癌マウスを使ったガンのPETイ メージングに成功している(図2C)。 また、アルパカ由来のVHH抗体を CCAP法にてIgG抗体に連結すること で、新しいタイプの2重特異性抗体の 作製にも成功しており、好中球をエフェ クター細胞として利用できるIgG抗体 医薬の創製に活用している。図2Bに は、これらへの利用に加え、抗体の酵 素標識や材料表面への固定化技術へ の応用等、現在、進めている研究課題 について模式的に示した。

一方で、IgG抗体医薬の不適応領域

の問題を解決するための手段として、抗体の細胞内移行技術や脳移行技術の開発を進めてきた。図2Dには、その中で見出した脳移行性抗体の評価結果を示しており、蛍光ラベル化された抗体が、長期(14日)にわたり、対照抗体に比べ、脳内に高い濃度で貯留していることが分かった。

本事業の成果として出願した特許は、2018年8月の時点で7件であり、また、企業への導出も2件達成した。導出先の一つである日本メジフィジックス社は、現在、AMEDの医療研究開発革新基盤創成事業(CiCLE)の中で、本技術を使った放射性核種標識によるガンの診断・治療用セラノスティクス抗体医薬の開発を進めている。

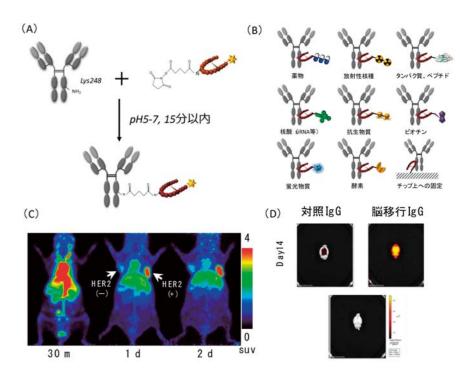


図2 本事業の成果(一部): (A) CCAP法の概要、(B) CCAP法の応用、(C) CCAP法 による抗体のRI (⁶⁴Cu) 標識体を使った担癌マウスのPETイメージング、(D) 蛍光標 識した脳移行性抗体のマウス脳への移行実験

主な成果

原著論文

• Novel hybrid compound of a plinabulin prodrug with an IgG binding peptide for generating a tumor selective non-covalent-type antibody-drug conjugate, Muguruma K, et al., Bioconjug Chem, 2016, 27 (7), 1606-13.

知的財産

- ・特願2015-103153 (WO2016186206A1): IgG結合ペプチドによる抗体の特異的修飾、発明者:伊東 祐二、出願人: 鹿児島大学(2015年5月20日出願)
- ・特願2016-251106 (PCT/JP2017/46445): ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質に結合する抗体、発明者: 高橋 信明、他3名、 出願人: 協和発酵キリン株式会社、鹿児島大学(2016年12月26日出願)
- ・特願2016-227025 (PCT/JP2017/021558) : IgG結合ペプチドによる部位特異的RI標識抗体、発明者:伊東 祐二、他3名、出願人:鹿児島大学(2016年11月28日出願)

多機能複合分子標的物質の作製による細胞運命操作技術の開発

徳島大学 先端酵素学研究所 免疫制御学分野 教授 **岡崎 拓**

(Taku Okazaki)



1999年 京都大学医学部卒業、2003年 京都大学大学院医学研究科終了 博士(医学)、2003年 京都大学大学院医学研究科 日本学術振興会特別研究員、2003年 京都大学大学院医学研究科 助手、2004年 京都大学大学院医学研究科 特任助教授、2008年 徳島大学疾患ゲノム研究センター 教授、2012年徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター 教授、2016年 徳島大学先端酵素学研究所 教授(現職)

課題概要

獲得免疫システムを担うリンパ球は、抗原受容体を用いて抗原を認識して活性化する。しかし、リンパ球は同一の抗原に対して毎回同じように活性化するのではなく、状況に応じて応答しないことがある。また、不可逆的な不応答状態に至る場合や、長期の免疫記憶を担う場合、免疫抑制活性を獲得する場合など様々である。その決定において、興奮性および抑制性の免疫補助受容体が重要な役割を担っていることが明らかとなっている(図1)。

PD-1は1992年に京都大学の本庶佑博士らによって単離同定されたI型の膜タンパク質である。研究代表者らは本庶博士らと共に、PD-1リガンド(PD-L1とPD-L2)の同定、

シグナル伝達機構の解析、PD-1欠損マウスに発症する自己免疫疾患の解析等により、PD-1が自己に対する不適切な免疫応答を抑制し、自己免疫疾患の発症を制御する抑制性免疫補助受容体であることを明らかにしてきた。また、PD-1が感染免疫応答や腫瘍免疫応答を抑制すること、およびPD-1を阻害することにより抗腫瘍免疫応答を増強し、腫瘍を排除し得ることを明らかとしてきた。その後、分担機関である小野薬品工業株式会社において、研究開発分担者を中心としてPD-1阻害抗体が開発され、様々ながん腫に対して劇的な治療効果を示したことから、世界中で大きな関心を集めている。がん治療におけるPD-1阻害抗体の成功により、リンパ球の機能制御による

自己免疫疾患、がん、アレルギー疾患等の根治療法開発 に対する期待が一気に高まっているが、リンパ球の機能、 分化および生死を制御する方法の開発には、依然多くの 問題が残されている。

上述の通りリンパ球の活性化は、様々な興奮性および 抑制性の免疫補助受容体によって制御されていると考え られているものの、実際にどの分子がどのような組み合わ せで協調的に機能することにより、T細胞の機能がどのよ うに制御されるかについては、ほとんど分かっていない。 また、特に抑制性免疫補助受容体の機能を賦活化するこ とは極めて困難であり、その方法論も確立されていない。 さらに、複数の分子を同時に制御することが必要となる が、その方法も確立されていない。

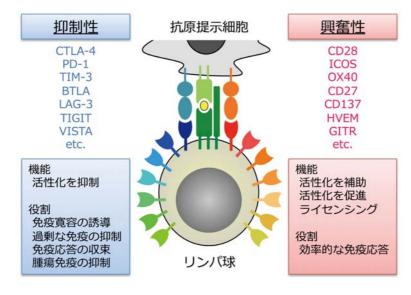


図1 免疫補助受容体によるT細胞活性化制御

そこで本研究計画では、免疫応答を制御して各種疾患を治療する方法を開発することを通して、T細胞の機能、分化および生死を操る技術、抑制性受容体の機能を増強する技術、標的とする細胞の表面に発現する複数の興奮性および抑制性受容体の機能を特定のバランスで阻害あるいは増強する技術、および細胞特異的に小分子RNA等を細胞内に送達する技術を開発することを目的とした。

本事業における成果概要

我々はこれまでに、PD-1が別の抑制性免疫補助受容体であるLAG-3と協調的にT細胞の活性化を抑制し、自己免疫疾患の発症を制御することを明らかとしてきた。そこで、興奮性および抑制性免疫補助受容体の相互作用を、より幅広くかつ詳細に解析するために、CD28やICOSを代表とした複数の興奮性免疫補助受容体、およびPD-1やLAG-3を代表とした複数の抑制性免疫補助受容体について、抗原受容体刺激によるT細胞活性化に与える増強および減弱効果を鋭敏に評価し得るT細胞刺激実験系を構築した。本実験系を用いて、各興奮性免疫補助受容体の相加相乗効果、各興奮性免疫補助受容体刺激に対する各抑制性免疫補助受容体による抑制能等を明ら

かにした(論文投稿中)。また、 ノウハウ実施許諾契約を締結し て本実験系を第三者機関に提 供した。

免疫補助受容体を標的として 免疫応答を制御するには、各免 疫補助受容体の機能を正確に知 る必要がある。既に、がん免疫 療法としてLAG-3阻害抗体が開 発されているものの、LAG-3によ る免疫抑制メカニズムはほとん ど分かっていない。我々は、上 記T細胞刺激実験系等を用いて、LAG-3が特定の構造的条件を満たしたMHCクラスIIに結合し、それらを認識するT細胞の活性化を選択的に抑制することを明らかとした。また、従来LAG-3はCD4の機能を競合的に阻害することによりT細胞の活性化を抑制すると考えられていたが、CD4の機能は阻害せず、細胞内領域を介して抑制シグナルを伝達することによりT細胞の活性化を抑制することを明らかにした(Maruhashi T et al., Nat Immunol, 2018)。

また、各種抑制性免疫補助受容体について、上記T細胞刺激実験系等を用いて、機能制御メカニズム等を解明するとともに(論文投稿中)、それらの機能を賦活化あるいは増強することによりT細胞の活性化を抑制し、自己免疫疾患を治療し得る物質を複数作製することに成功した(図2、特許出願準備中、論文投稿準備中)。さらに、上述の通り各興奮性免疫補助受容体刺激に対する各抑制性免疫補助受容体の抑制能を明らかにしたことから、T細胞を効率的に活性化し得る物質を複数作製することに成功している(特許出願準備中、論文投稿準備中)。今後、これらの物質を用いてがんや免疫関連疾患に対する治療法が開発されるとともに、得られたノウハウが他の分子や現象に応用されると期待される。

20

T細胞活性化阻害 自己免疫疾患の症状軽減 1800 O コントロール O コントロール 1600 ● 免疫抑制物質投与 免疫抑制物質投与 (lm 1400 1200 1000 8.0 (X II) 800 IL-2濃度 兴 0.4 600 400 200 0.3 10 抗原 (uM) 日数

図2 免疫抑制物質によるT細胞活性化抑制と自己免疫疾患の治療

主な成果

原著論文

Maruhashi T, Okazaki I, Sugiura D, Takahashi S, Maeda TK, Shimizu K, Okazaki T. LAG-3 preferentially inhibits the activation of CD4⁺ T cells that recognize stable pMHCII through its conformation-dependent recognition of pMHCII. Nat Immunol, in press

高分子ナノテクノロジーを基盤とした 革新的核酸医薬シーズ送達システムの創出

東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所 教授

西山 伸宏

(Nobuhiro Nishiyama)



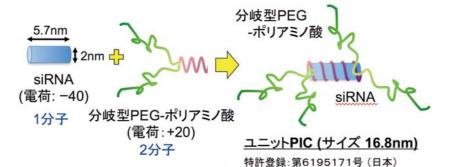
2001年東京大学大学院工学系研究科材料学専攻博士課程修了(博士(工学))、2001年米国ユタ大学薬学部博士研究員、2003年東京大学医学部附属病院TE部助手、東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター助手(2004年)、講師(2006年)、准教授(2009年)を経て、2013年より現職、【研究分野】ドラッグデリバリーシステム、バイオマテリアル【所属学会】高分子学会、日本DDS学会、日本バイオマテリアル学会、日本癌学会、日本分子イメージング学会【受賞等】高分子学会 高分子研究奨励賞(2007)、第一回日本DDS学会奨励賞(基礎)(2009)、日本癌学会奨励賞(2012)、パーティクルデザイン賞(2016)

課題概要

アンチセンス核酸、siRNA等のオリゴ核酸は、あらゆる疾患に対して塩基配列から容易に設計でき、高い特異性を有するために副作用が少なく、さらに化学合成によって製造も容易であることから次世代の医薬品として大きな可能性を秘めている。しかしながら、これらの核酸医薬シーズを疾患治療へと展開するためには、核酸医薬シーズを標的組織に到達させ、かつ細胞内部へと送達することのできるデリバリーシステムの開発が必要不可欠である。これまでに、カチオン性脂質やカチオン性高分子を利用したデリバリーシステムが開発されているが、デリバリーが比較的容易な肝臓を標的とした一部のシステムを除いて、実用化にはまだ遠く、がん等の他の臓器・組織を標的に

した場合には技術的課題が多く存在しているのが現状である。このような背景において、我々は、ポリエチレングリコール(PEG)ポリアミノ酸ブロック共重合体とオリゴ核酸1分子から形成されるユニットPIC型キャリア(図1)の開発を進めてきた。これまでの研究により、ユニットPIC型キャリアは、明確な構造を有し、製造が極めて容易であることに加えて、siRNAのデリバリーにおいて、高い血中滞留性、固形がんへの特異的集積効果、サイズが小さいことによる優れた組織浸透性、標的分子のノックダウンに基づく優れた抗腫瘍効果、高い安全性が確認されてい

る。そこで本研究では、高分子ナノテクノロジーを基盤として、ユニットPIC型キャリアの機能と安全性を高めるための要素技術として、①ポリアミノ酸セグメント(カチオン構造)の最適化、②がん細胞を標的化するための新規リガンド分子の開発、③固形がんへの集積および細胞内移行を促進するための新規環境応答性ポリマーの設計、④核酸医薬の効率的な機能発現のための環境応答性リンカーの開発、⑤ポリマーの長期蓄積を回避するための新規水溶性ポリマーの設計に関する研究開発を実施してきた。本研究では、これらの要素技術を組み込んだユニットPIC型キャリアの機能評価を進める一方で、②・⑤の要素技術に関しては、生理活性タンパク質の修飾剤、がんの光線力学治療やホウ素中性子捕捉治療の目的において、それぞれ単独での実用化を目指した研究を進めている。



US9808480B2(米国)

•優れたがん組織浸透性

・高い安全性

ユニットPICの特徴

- ・製造容易性、明確な構造
- ・優れた血中滞留性
- ・固形がんへの選択的集積
- 図1 ユニットPIC型核酸医薬送達システム

本事業における成果概要

要素技術①に関しては、ポリマーのカチオン構造の最適化を行い、従来型のPEG-poly(L-lysine)の系と比較して、ポリマー投与量を1/2~1/3に低減させても、同等の血中滞留性と抗腫瘍効果が得られることを確認した。要素技術②に関しては、ポリアミノ酸の側鎖にグルタミン(Gln)を結合した新規ポリマー型リガンドを開発し、がん細胞で過剰発現しているGlnトランスポーター (ASCT2)との多価結合を介してがん細胞と特異的に相互作用することを実証した(図2)。同様に、種々のアミノ酸を結合したポリマー型リガンドの開発を行い、がんの光線力学治療やホウ素中性子捕捉治療における有用性を明らかにした。要素技術③に関しては、血中では電荷的中性であるが、腫瘍内pHでカチオン性に変化する新規ベタインポリマーを開発し、量子ドット(QD)の表面修飾においてPEGの3倍以上間

形がん集積性を達成することに成功した(図2)。さらに、要素技術④に関しては、汎用のジスルフィド結合と比較して、血中でより高い安定性を示す一方で、細胞質内の還元環境下で効率的に開裂する新規リンカー分子を開発した。最後に、要素技術⑤においては、分解性結合を導入したPEG誘導体を開発し、生理活性タンパク質の修飾剤として、非分解性のPEGと同等の血中滞留性を示す一方で、頻回投与におけるPEGの蓄積とそれに伴う細胞空胞化を低減させることを明らかにした。これらの成果については、すべて特許出願を行い、その一部は論文発表を行っている(未発表成果については投稿準備中)。また、これらの要素技術について、ユニットPICの高機能化に向けた研究を実施中であるが、それぞれが単独としてもバイオ医薬品分野における画期的技術として期待され、現在、実用化を目指した企業との共同研究を実施中である。

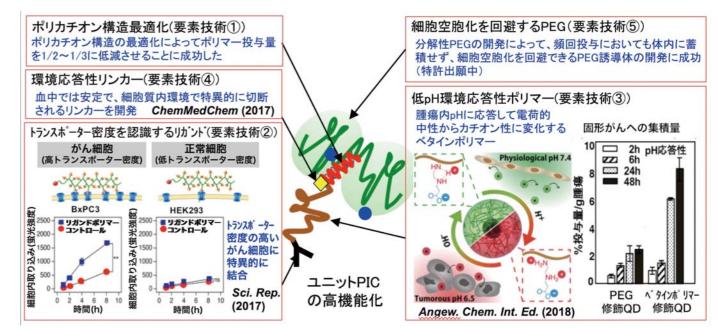


図2 ユニットPICの有効性・安全性を高めるための要素技術①-⑤の研究開発

主な成果

原著論文

- 1. A.-H. Ranneh, H. Takemoto, S. Sakuma, A. Awaad, T. Nomoto, Y. Mochida, M. Matsui, K. Tomoda, M. Naito, N. Nishiyama, An ethylenediamine-based switch to control the polyzwitterion charge at tumorous pH for effective tumor accumulation of coated nanomaterials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 57(18) 5057-5061 (2018)
- 2. N. Yamada, Y. Honda, H. Takemoto, T. Nomoto, M. Matsui, K. Tomoda, M. Konno, H. Ishii, M. Mori, N. Nishiyama, Engineering tumour cell-binding synthetic polymers with sensing dense transporters associated with aberrant glutamine metabolism. *Sci. Rep.* 7 (1) 6077 (2017)

知的財産

1. 特願2016-243749, PCT/JP2017/43604「pH応答性ポリマー及び薬物送達システム」東京工業大学

染色体工学技術を用いた ヒト抗体産生ラットの作製

鳥取大学 大学院医学系研究科/ 染色体工学研究センター 准教授

香月 康宏

(Yasuhiro Kazuki)



2000年 鳥取大学医学部生命科学科卒業、2003年 日本学術振興会特別研究員、2004年 鳥取大学大学院医学系研究科生命科学系専攻修了 博士(生命科学)、2005年 鳥取大学大学院医学系研究科 助 手、2007年 鳥取大学大学院医学系研究科 助教、2010年 鳥取大学大学院医学系研究科/染色体工学研究センター 助教、2015年より鳥取大学大学院医学系研究科/染色体工学研究センター 准教授(現職)

課題概要

2018年現在、医薬品世界売上ベスト10の半数以上が抗体医薬品という事実に象徴されるように、Kohler & Milsteinによるモノクローナル抗体取得技術の開発から約40年、癌/感染症/自己免疫疾患等幅広い疾患の治療における抗体医薬品の存在感はますます大きくなっている。歴史を振り返れば、抗体医薬の実用化における最大の障壁は、通常はマウス由来であるモノクローナル抗体のヒトに対する免疫原性であった。この問題を解決するため様々な技術が開発されたが、今や抗体医薬候補品を得るための標準的プラットフォームとなったのがヒト抗体を産生するトランスジェニック(Tg)マウスである。

内因性免疫グロブリン (Ig)遺伝子をノックアウトしたマウスに機能的なヒトIg遺伝子を導入すれば、マウス抗体の代わりに多様な抗原結合能を持つヒト抗体が産生される。 さらにこのマウスを免疫すれば、抗原性の心配なしにヒトに投与可能な、望みの抗原に対するヒトモノクローナル抗体を容易に得ることができる。 しかし1Mbを超える巨大なヒトIg遺伝子全長のマウスへの導入は、従来のTg作製法では困難であり、1990年代前半に作製された第1世代ヒト抗体産生TgマウスはヒトIg遺伝子座の一部(1900年代前半に作製された第10のみ保持し、免疫応答も不十分であった。 より良い抗体取得のため、ヒトで観察されるものと同様に多様なヒト抗体レパトワをマウスで再現するには、101年 101年 1

この課題を克服するため、1997年、我々は(株)キリンビールと共同でヒト染色体そのものをマウスに導入するトランスク

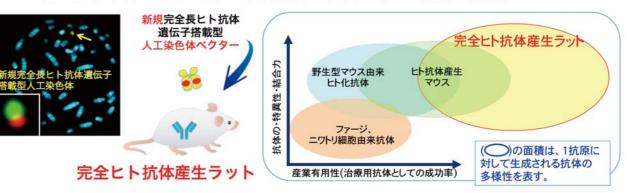
ロモソミック(TC)マウス作製技術の開発に成功した。この 技術により無傷のヒトIg遺伝子座を保持しヒト抗体を産生す るマウスの作製に世界で初めて成功した。激しい研究開発 競争の結果、容易に抗体取得できる有用ターゲット抗原は今 や多くは残されていないものの、ユニークな機能を持つ抗体 や、抗体取得難易度の高い抗原に対する抗体取得のニーズ が高まっており、ヒト抗体産生マウスも更なる高性能化が望 まれ、現在に至るまで改良が続けられている。

一方、ヒト染色体断片導入TCマウスは無傷のヒト抗体遺伝子座全長を保有することから、理論的には最も多様なレパトワを実現できると考えられるが、ヒト由来のセントロメア配列を持つ人工染色体のマウスにおける安定性は完全でなく、その安定化によりさらに高性能化ができると考えられた。また、マウスでの抗体取得が難しい場合には、他の動物種で試みるのが常套手段だが、モノクローナル抗体取得のためのハイブリドーマ法をそのまま使えるラットが選択されることが多い。1個体から調製できるリンパ球の数がマウスと比較して多く、多数のハイブリドーマがスクリーニング可能である点もラット使用のメリットと言える。

すなわち、ヒトIg遺伝子座を含む、安定化された人工染色体を保持し、ヒトIg遺伝子を安定的に発現するラットが得られれば、望みの機能を持つ/より高い性能を発揮する抗体取得の確率を高める画期的なプラットフォーム技術になると期待される。本課題では、最先端の染色体工学技術を用いて、完全ヒト抗体産生ラットの開発に世界で初めて成功した。本研究開発により、安全かつ高機能なヒト抗体を取得するための世界初の基盤技術の確立、ひいては次世代抗体医薬品の創出に繋がることが期待される。

完全ヒト抗体産生ラットの有用性

目的: 広範な抗原に対して望みの特徴(より難しい抗原、よりユニークな機能) を持つ抗体取得の確率を高める画期的なプラットフォーム技術を作製する



▶ラットはマウスに比べ産生抗体の多様性が高い。従来取得できなかった抗原に対する抗体や、機能性抗体の取得が可能 ▶ハイブリドーマ法など、既存のマウス抗体技術・ノウハウをそのまま利用できる

> →革新的次世代バイオ医薬品の創出、 ライフ・イノベーションの推進に大きく貢献

本事業における成果概要

完全ヒト抗体産生ラットの作製を目的として、巨大なヒト遺伝子の完全長を保持でき、かつラットで極めて安定な人工染色体に染色体操作技術、染色体導入技術を駆使することで、新規完全長ヒト抗体遺伝子(ヒトIg重鎖および軽鎖)搭載型人工染色体ベクターの開発に成功した。次に、TCラット作製技術を用いて、新規完全長ヒト抗体遺伝子搭載型人工染色体ベクターを保持するラットの作製に成功した。完全ヒト抗体産生ラットの体細胞において、上記ベクターが安定的に維持されるか、特に血液細胞で安定維持できるかをフローサイトメトリーを用いて解析したところ、90%以上で非常に安定に保持されていること

を確認した。また、種々の組織での安定性をFISH解析により検討したところ、上記ラットの10組織(脳、肝臓、胸腺、肺、心臓、脾臓、腎臓、小腸、筋肉、精巣)において、90%以上で非常に安定に新規完全長ヒト抗体遺伝子搭載型人工染色体ベクターが保持されていることを確認した。さらに、上記組織において、ヒトIg遺伝子が組織特異的に発現するかをmRNAレベルで確認したところ、胸腺と脾臓において特異的に発現することを確認した。今後はヒトで観察されるのと同様に多様なヒトIgレパトワが形成されていることを確認する予定である。

本研究開発により、バイオ医薬品領域における我が国の 競争力向上をもたらすと共に、完治を実現する、より効果的 な治療法の提供による医療費削減に繋がると期待される。

主な成果

原著論文

- 1. Nakamura K, Morimoto K, Shima K, Yoshimura Y, Kazuki Y, Suzuki O, Matsuda J, Ohbayashi T. The effect of supplementation of amino acids and taurine to modified KSOM culture medium on rat embryo development. *Theriogenology*. 2016 Nov;86(8):2083-90. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.07.001.
- 2. Shinohara T, Kazuki K, Ogonuki N, Morimoto H, Matoba S, Hiramatsu K, Honma K, Suzuki T, Hara T, Ogura A, Oshimura M, Kanatsu-Shinohara M, Kazuki Y. Transfer of a Mouse Artificial Chromosome into Spermatogonial Stem Cells Generates Transchromosomic Mice. *Stem Cell Reports*. 2017 Oct 10;9(4):1180-1191. doi:10.1016/j.stemcr.2017.08.012.

総訂

1. Satoh D, Abe S, Kobayashi K, Nakajima Y, Oshimura M, Kazuki Y. Human and mouse artificial chromosome technologies for studies of pharmacokinetics and toxicokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2018 Feb;33(1):17-30. doi:10.1016/j.dmpk.2018.01.002.

革新的次世代型がん特異的抗体の 開発とその臨床応用

東北大学
大学院医学系研究科
教授
加藤 幸成



1995年、東京大学薬学部卒業。1997年、東京大学大学院薬学系研究科修士課程卒業後、協和発酵工業株式会社に入社。1999年、山形大学医学部医学科に入学後、2004年、東京大学大学院薬学系研究科で博士(薬学)取得。2005年、山形大学医学部卒業後、2006年、学術振興会特別研究員(PD)、2008年4月、M.D. Anderson Cancer Center post-doctoral fellow、同年9月、Duke University Medical Center Senior Research Associate。2010年、山形大学医学部准教授、2012年、東北大学大学院医学系研究科教授。2015年、博士(医学)取得。2017年、東北大学未来科学技術共同研究センター教授、同・大学院医学系研究科抗体創薬研究分野教授(兼任)、同・大学院医学系研究科抗体創薬共同研究講座教授(兼任)。

課題概要

(Yukinari Kato)

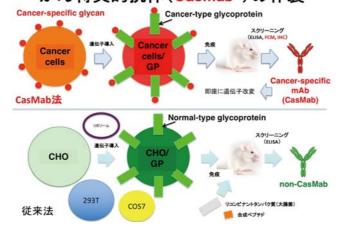
東北大学におけるこれまでの研究成果によって、がん 特異的糖鎖を発現する細胞株や、独自のアフィニティータ グシステムを駆使することにより、がん特異的抗原を大量 に作製することが可能となった。また、フローサイトメト リーや免疫組織染色のスクリーニング法を最適化するこ とにより、がん特異的抗体の樹立法を開発してきた。が ん特異的抗体は、がん患者に対する副作用を限りなく低 減させるだけでなく、抗体医薬を開発する企業にとっても リスクが少なく、今後のバイオ医薬品の開発にとって重要 な課題である。

これまでの抗体医薬開発には複数の問題点がある。 1点目として、DNAマイクロアレイなどの遺伝子発現解析によりがん/正常比が高い抗原を狙ったため、がん細胞に高発現の膜タンパク質でも正常組織にも高発現していると、最初から候補分子から外されていた。2点目として、がん細胞と正常細胞に共通に発現している膜タンパク質の糖鎖構造の差について、質量分析計を用いて検出を試みても、膜タンパク質への糖鎖付加は不均一であるため、がん細胞特異的な糖鎖構造の同定は困難であった。3点目として、研究室レベルでO型糖鎖を人工的に大量合成することは未だに困難である。正常組織に発現している膜タンパク質に対しては、がん特異的抗体を取得する研究開発はあまり進んでいない。

がん細胞に対する抗体医薬開発を行う場合、どんなに 抗体を改変しても、あるいは、どんなに強力な抗がん剤付 加を行ったとしても、がん細胞に特異的な抗体でなければ 常に正常組織への毒性が懸念される。抗体医薬の新た な標的が枯渇している現在、ある標的分子が正常細胞と がん細胞に同等に発現していたとしても、がん細胞の標的 分子のみに特異的に反応するモノクローナル抗体を樹立 することが求められてきた。

本課題では、東北大学が独自開発した、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膜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ことを目的とした。

がん特異的抗体(CasMab®)の作製



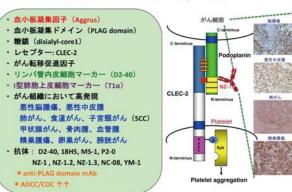
本事業における成果概要

本課題では、CasMab法を用いることにより複数の膜タンパク質に対するがん特異的抗体の作製に成功し、その特許を企業導出まで進めた(主な成果参照)。本成果概要では、企業に導出後、当該企業との共同研究が進行中であるテーマの1つについて紹介する。

我々は以前、がん細胞に発現している血小板凝集因子・転移促進因子としてポドプラニンを発見した。一方、これまでの解析結果から、がん細胞と正常細胞のポドプラニンのアミノ酸配列は100%一致しており、1アミノ酸変異も検出されなかった。ヒトのポドプラニンはムチン型タンパク質であり、O型糖鎖が多数付加されているが、がん細胞と正常細胞のO型糖鎖について、レクチンマイクロアレイや質量分析計で解析を繰り返した結果、全く差を検出することができなかった。

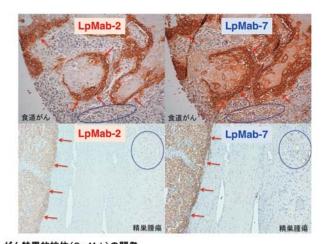
そこで本課題では、様々ながん細胞株の糖鎖遺伝子 を、リアルタイムPCRにより定量し、プロファイリングを行 なった。各種がん細胞株と患者由来がん組織の糖鎖遺 伝子プロファイリングを詳細に比較検討した結果、LN229 という脳腫瘍細胞株がポドプラニンの発現に適している ことを見出した。すなわち、LN229にポドプラニンを発現 すると、正常細胞では付加されない糖鎖が付加されるこ とがわかった。さらに、トランスフェクションによる導入効 率が高いことや、細胞の増殖能が高いことなども、細胞の 選択として重要な条件であった。ポドプラニンの高発現 株であるLN229/hPDPNをマウスに複数回免疫し、 LN229/hPDPNに高い反応性を示す抗体を樹立した。さ らに、ポドプラニンを内在性に高発現するがん細胞株と正 常細胞株との差をフローサイトメトリーで検出した。ま た、ポドプラニンを高発現するがん細胞と正常細胞の両方 が一つの切片に含まれているがん組織切片に対し、免疫 組織染色を実施した。これらの複数のスクリーニングを 用いることが、がん特異的抗体を樹立するための標準の

ポドプラニン (Podoplanin)



方法となった。この方法論を用いることにより、ポドプラニンに対するがん特異的抗体の樹立に成功した。この成功を契機に、ポドプラニン以外にも、複数の膜タンパク質に対してがん特異的抗体の作製に成功し、企業への導出へと至った。

抗体医薬開発のためには、企業との密な共同研究が必 須である。企業への導出後も産学連携による開発を継続 中である。



が人特異的抗体(CasMab)の開発 食道がAと精巣腫瘍に対する免疫組織染色において、LpMab-2(左上図、左下図)とLpMab-7(右上図、右下図)は、共に、 がA細胞に対して反応性を示す(赤矢印)。一方、LpMab-2は正常組織には反応しないのに対し、LpMab-7は正常組織 にも反応性を示す(青丸の中)。このように、同じ配列のタンパク質ががA細胞と正常細胞の両方に発現している場合は、が A特異的抗体(CasMab)はがA細胞のみを攻撃できる。

主な成果

本プロジェクトの謝辞入り原著論文を合計64報発表した。

- Kato Y et al., Oncotarget, 6(34):36003-36018, 2015
- Kato Y et al., PLoS One.11(3): e0152912., 2016
- Kaneko MK, Kato Y et al., Cancer Med., 6(4):768-777, 2017
- Itai S, Kato Y et al., Oncotarget, 9(32):22480-22497, 2018

本プロジェクトの成果として合計16件を企業導出した。

- ・がん特異的抗体に関する特許の導出:5件
- ・膜タンパク質を高感度に検出する抗体に関する導出:9件
- ・高感度タグシステムに関するノウハウの導出:2件

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

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授

石川 俊平

(Shumpei Ishikawa)



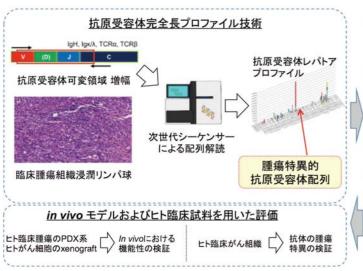
2000年東京大学 医学部医学科 卒業。東京大学 先端科学技術研究センター ゲノムサイエンス部門 特任助手、東京大学 大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野 助教・准教授を経て、2013年より東京 医科歯科大学 難治疾患研究所 ゲノム病理学分野 教授。2018年より東京大学 大学院医学系研究科 分子予防医学分野 教授(兼務)。専門はゲノム科学・病理診断学・バイオインフォマティクス。

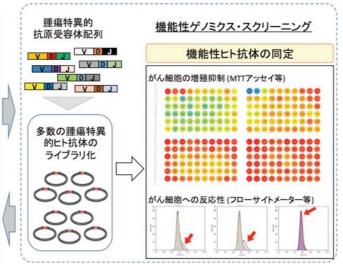
具体的には図1に示すように、多数症例の臨床がん試料

課題概要

がんに浸潤するリンパ球はさまざまながん抗原を認識して集簇するヘテロ細胞集団であり、獲得腫瘍免疫において主要な役割を果たす。本研究課題は、腫瘍浸潤リンパ球から臨床腫瘍特異的な機能性抗体分子の取得およびそれらの抗体誘導体化の研究開発を行うものである。より具体的には、腫瘍浸潤B細胞の抗原受容体(免疫グロブリン)レパトアを次世代シーケンス解析によって網羅的に明らかにし、腫瘍特異的ヒト抗体の基本構造を包括的に取得することを第一の目的とする。さらにそのような腫瘍特異的ヒト抗体の中から、さまざまな機能スクリーニングによって抗腫瘍活性を有する抗体医薬品候補を取得し、アミノ酸改変やscFvなどの低分子化抗体あるいは二重特異性抗体への置換を通しての高機能化を狙う。

について、がん組織内に浸潤するB細胞の抗原受容体全長配列を次世代シーケンサーによって解読し、背景組織との比較によって腫瘍特異的かつ腫瘍部で優位に存在するB細胞クローンの免疫グロブリン配列を網羅的に取得した。さらに、遺伝子組替え法を用いた免疫グロブリン遺伝子の再構築によって、それらの腫瘍特異的免疫グロブリンをヒトIgG抗体分子として精製・ライブラリ化を進めた。抗体ライブラリについてはフローサイトメーターや細胞免疫染色によるヒトがん細胞への反応性のスクリーニングあるいはMTTアッセイ等を用いた細胞増殖抑制効果スクリーニングなどの機能スクリーニングを進め、明瞭な抗腫瘍活性を有するヒト抗体の探索を進めた。同定された治療抗体候補となる抗体分子については、さらにヒトがん組織を用いた免疫染色あるいはマウスin vivoにおける機能評価も実施した。



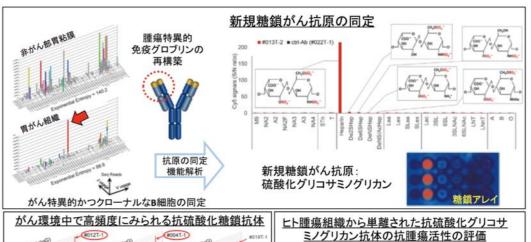


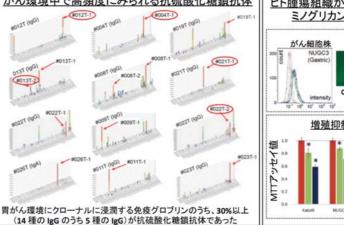
本事業における成果概要

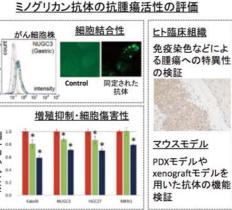
総括すると、本研究における腫瘍浸潤リンパ球の免疫ゲ ノム解析によって、主要な新規液性免疫がん抗原および複 数の抗腫瘍活性を持つヒト抗体を取得することができた。

具体的には、本研究によって腫瘍特異的かつ腫瘍部に 優位に浸潤する免疫グロブリン配列を多数同定すること ができ、それらの再構築抗体の機能解析を進めることに よって、興味深いことに、ヒトがん環境中に優位な抗体の うち35%以上のものが「抗硫酸化グリコサミノグリカン抗 体」であることが明らかになった(図2)。本研究によって単 離された臨床腫瘍特異的に存在する「抗硫酸化グリコサ ミノグリカン抗体」のうち、複数種の抗体(少なくとも2種の 抗体)が、ヒトがん細胞に対する明瞭な増殖抑制効果を呈 した。それらはADCC活性等を要することなく細胞増 殖抑制効果を呈し、scFvとして低分子化した抗体分子で も同様の効果を呈することが確認された。また当該抗 体は結合した細胞内への取り込み活性を有することが 観察され、抗癌剤等を結合させたADC (Antibody-drug conjugate)と併用することによって、さらに強力な抗腫瘍 活性が得られることが分かった。

さらにそれらの「抗硫酸化グリコサミノグリカン抗体」 について、ヒトがん組織における病理組織学的分布を 探索したところ、背景組織に比較してがん細胞への相







主な成果

原著論式

• Katoh H, Komura D, Konishi H, Suzuki R, Yamamoto A, Kakiuchi M, Sato R, Ushiku T, Yamamoto S, Tatsuno K, Oshima T, Nomura S, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, Ishikawa S. *Immunogenetic Profiling for Gastric Cancers Identifies Sulfated Glycosaminoglycans as Major and Functional B Cell Antigens in Human Malignancies. Cell Reports.* 2017 Aug 1;20(5):1073-1087.

バイオ医薬品局所徐放のための 展開型ナノシート創出技術開発

東北大学 大学院医学系研究科 教授

阿部 俊明

(Toshiaki Abe)



1984年、新潟大学医学部卒業。1986年、東北大学医学部助手。1989-1991年、米国国立衛生研究所留学。1994年、東北大学医学部講師。1994年、博士(医学)。1996年、東北大学医学部助教授。2000年、東北大学大学院医学系研究科附属創生応用医学研究センター細胞治療分野教授。2015年、新潟大学医学部内非常勤講師。

課題概要

バイオ医薬品は有効性や特異性でほかの薬剤よりも優 位性が想定されているが、使用方法など患部への送達方 法に課題がある。我々は長年薬剤徐放システムの開発を 行ってきた。主として医療用機材を用いて低分子から高 分子までの薬剤を徐放できるようにする技術であるが、こ れまで蓄積してきたこれらの技術を利用するとバイオ医 薬品の徐放も臨床応用可能なシステムにすることができ ると考えた。そのために我々が目指す技術開発は、初期 バーストを低減させた長期間の局所徐放を可能にする薬 剤徐放シートで、特定の組織や臓器にバイオ医薬品を有 効に送達する技術開発を行った。まず眼疾患を対象に 薬剤徐放を行うことを考慮し、現在盛んにおこなわれてい る硝子体薬剤注射の問題点を考慮した開発を行った。こ の技術は、安全性の問題を考え眼内には手をつけず強膜 上に低侵襲に展開する薬剤徐放デバイスの技術開発であ るが、これが可能になればデバイスの性質上眼疾患にと どまらず汎用性も持ち、さまざまな疾患にも応用できる可 能性があると考えた。

このために、微細加工ナノシート作製とシート生体内局 所展開技術の開発を行い、眼球を標的にバイオ医薬品送 達の検討を行ってきた。上皮細胞のバリア機能を保持す る結膜の下のスペースに合わせて展開ができる薬剤徐放 シートを作製して、一方向性徐放を保持し、経強膜に眼内 に向けて高分子が持続的に徐放されるのを確認した。 低分子徐放とは違う工夫が必要であり、知財取得や論文 報告も同時に行ってきた(図1)。

その後、動物実験で有効性が確認されたバイオ医薬品 (抗体等)を搭載して徐放の確認とモデル動物での効果を 確認した。その結果は、これまで臨床で用いられてきた 繰り返し薬剤が投与される方法と比較しても遜色のない 結果であり、薬剤徐放シートの有効性が示せた。

我々の成果は現在各企業に紹介中であり、すでに1社と 実用化に向けた共同研究を開始し、共同研究に向けた MTAを2社と、NDAを1社と締結して共同研究を検討中 である。MTAを締結した企業から提供していただいた 高分子薬剤を徐放できることが判明し、さらに動物モデ ルを利用した検討で効果が確認できた。

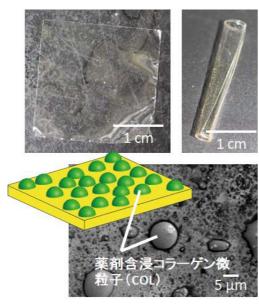


図1 COLとPEGDMを組み合わせて、初期バーストを抑制した 持続的高分子徐放シート

本事業における成果概要

高分子の蛋白質であるアルブミンを徐放できるようになり、また臨床薬の抗VEGF抗体も徐放できるようになった。シートの展開についてはラット用の場合、サイズがもともと2×2mmで小さいために確認は難しいが、結膜の小ホールから強膜上に投与できた。ウサギ用シートはインジェクター等を利用して投与したが、ウサギ強膜上でのシートの展開は蛍光着色をして射出したシートが展開することを蛍光カメラで確認できた。また、150kDaの蛍光デキストランを徐放するシートをウサギ強膜上に埋植し、1週間および4週間目に網膜ホモジネートの蛍光強度を測定した結果、網膜中に300ng/g(1週間)から100ng/g(4週間)の薬物移行を確認した(図2)。

また、同様の方法で使用した高分子徐放シートに抗 VEGF薬を搭載し薬剤が徐放できるのを確認してから ラット動物モデル(加齢黄斑変性)で効果を検討した。こ れまでのところ、モデル薬剤は持続的に網膜に移行して いると考えられた。動物モデルはラットであるが、1回の 結膜下投与で12週間でも効果が見られ、販薬の硝子体内 投与と比較しても同等以上の効果が証明できている。抗 VEGF薬は複数あるが、現在企業とMTAを締結し提供いただいた薬剤についても徐放と効果が同様に確認された(図3)。

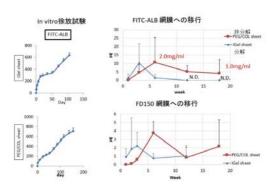


図2 抗VEGF 製剤徐放シートの徐放と網膜移行

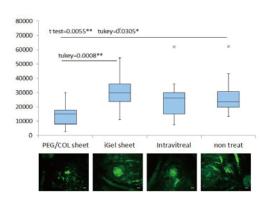


図3 抗VEGF製剤徐放後の新生血管抑制効果の比較(投与8W後)

主な成果

原著論文

- Yamada S, et al. Controlled basic fibroblast growth factor release device made of poly (ethyleneglycol) dimethacrylates for creating a subcutaneous neovascular bed for cell transplantation, J Biomed Mater Res A, 2017 Nov;105 (11):3017-3024.
- Song Y, et al In situ formation of injectable chitosan-gelatin hydrogels through double crosslinking for sustained intraocular drug delivery, Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2018 Jul 1;88:1-12.
- Kondo T, et al. A self-deploying drug release device using polymeric films, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater., 2018, 106. 780-786.
- Kaji H, et al. Drug delivery devices for retinal diseases, Adv. Drug Deliv. Rev., 2018, 128, 148-157.

知的財殖

- ・【発明名称】薬剤徐放デバイス、【発明対象】技術、【発明者】梶 弘和,近藤太郎,ジャレカシュクリネジャド,永井展裕,阿部俊明、【出願人】国立大学法人東北大学、【出願国】日本、【出願日】平成27年5月29日、【出願番号】特願2015-110747、
- ・【発明名称】細胞移植治療用の皮下埋め込みデバイス、【発明対象】技術、【発明者】阿部俊明、【出願人】国立大学法人東北大学、 【出願国】日本、【出願日】平成27年11月6日、【出願番号】JP2015/218456、【PCT出願】PCT/JP2016/082989
- ・【発明名称】形状制御されたナノシート及びその製造方法、【発明対象】技術、【発明者】岩瀬英治,新保創太,武岡真司,藤枝俊宣, 梶 弘和,阿部俊明、【出願人】国立大学法人東北大学、【出願国】PCT、【出願日】平成28年3月4日、【出願番号】PCT/JP2016/56706、 【登録日】出願中、【登録番号】なし、【PCT出願】あり
- ・【発明名称】細胞・薄膜複合体の製造技術、【発明対象】技術、【発明者】梶 弘和,鈴木 仁,永井展裕,阿部俊明、【出願人】国立大学法人東北大学、【出願国】日本、【出願日】平成28年4月22日、【PCT出願】PCT/JP2017/16010

MTA, NDA, 共同研究

- ・共同研究を目指したMTA締結 2社
- ・共同研究開発 1社
- NDA 1社

エクソソーム改変技術を用いた 新規ドラッグデリバリーシステムの開発



国立がん研究センター 研究員 吉岡 祐亮

2008年早稲田大学教育学部卒業、2013年早稲田大学大学院先進理 工学研究科 修了 博士(理学)、2013年 国立がん研究センター研究所 が ん研究特別研究員、2015年より研究員(現職)

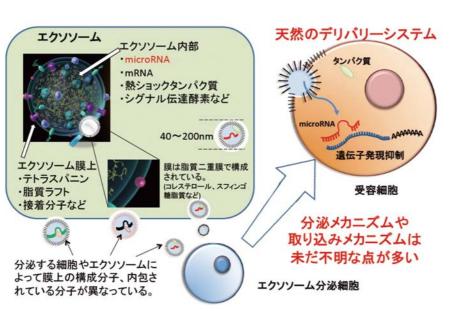
課題概要

(Yusuke Yoshioka)

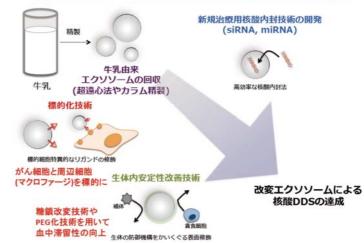
現在、核酸医薬品や抗体医薬品などのバイオ医薬品が 急成長を遂げており、精力的に開発が行われている。し かし、これらバイオ医薬品は安全かつ特定の組織や細胞 に、高効率に送達(デリバリー)されて初めて効果を発揮 する。従って、バイオ医薬品開発の成功には、ドラッグデ リバリーシステム (DDS) の確立が非常に重要となる。本 研究では、エクソソーム (Exosome)と呼ばれる脂質二重 膜を有する100 nmほどの大きさの粒子をDDSに応用する ことを試みている。エクソソームは様々な細胞から分泌さ れ、ヒトの体液中を循環し、細胞に由来するタンパク質や 機能性小分子RNAであるmicroRNA (miRNA)などの核 酸を内包して、近接する細胞や遠隔地に存在する細胞へ

内包物を届ける役割があるとされてい る。また、ヒトなどの哺乳類のみなら ず、ショウジョウバエや細菌などでもエ クソソームの存在が確認されているこ とから、エクソソームは生物が持つ天 然の分子デリバリーシステムだと考える ことができる。本研究では、これらエ クソソームを加工することで、特定の組 織や細胞へ効率的に送達可能なエクソ ソームを作製し、さらに、バイオ医薬品 をエクソソームに内包させる技術開発 を通して、バイオ医薬品を安全かつ高 効率に疾患部位まで運ぶ新たなシステ

ムの開発を目指す。しかし、エクソソームをDDSに応用す るための技術開発以前に、エクソソームが有する性質へ の理解が不十分であることや医薬品開発を見据えたエク ソソームの供給源と回収方法の検討が必要であり、本研 究開発では、エクソソームの供給源として間葉系幹細胞な どの細胞培養系のみならず、食品に由来するエクソソーム として牛乳に着目し、エクソソームの回収方法などを検討 した。さらに、エクソソームを特異的に疾患部位に送達す る技術として、腫瘍関連マクロファージを標的とし、がんの 種類を問わず、疾患部位への送達を試みた。腫瘍内に存 在するマクロファージは抗腫瘍的に働くM1マクロファージ と、がんの悪性化に伴ってがん細胞に教育され、腫瘍免疫 を抑制し、腫瘍増殖を促進するM2マクロファージが存在 するが、これらマクロファージは可塑性を持つため、核酸



牛乳由来エクソソームを利用し、医薬品送達の標的を腫瘍組織へ



を内封したエクソソームでM2をM1へシフトさせることで、 腫瘍の治療が可能だと考えられる。したがって、エクソ ソームに特定の核酸を内封する技術の開発も試みる。

本事業における成果概要

まず、エクソソームの供給源として、牛乳に着目し、牛乳 からエクソソームを大量に回収する方法を開発した。そ の方法は、市販の無脂肪乳のpHを調整して非エクソソー ムタンパク質を沈殿させた後に、超遠心法によってエクソ ソームを回収する方法である。これまで、遠心と超遠心を 組み合わせて牛乳からエクソソームを回収する方法が報

告されていたが、我々の検討と比較した 結果、従来法ではエクソソームの回収効 率・純度ともに非常に低かった。した がって、本研究で確立した牛乳からのエ クソソーム回収法は、従来法と比較し て、高純度なエクソソームを効率的に回 収できるものである。本方法で取得し た牛乳エクソソームの安全性を確かめ るために、動物試験を行い、マウス尾静 脈から6 mg/kgの牛乳エクソソームを

フィラキシーを起こすことはなかった。上記結果より、牛 乳エクソソームの動物個体における毒性は非常に低く、高 いドーズで投与した場合にも、毒性・免疫原性はほぼな いと結論づけた。 また、エクソソームを標的細胞であるマクロファージへ 送達するため、エクソソーム膜状にマンノースを結合させる 方法を考案し、エクソソームへ結合させ、マンノース量依存 的にマクロファージへの取り込みが上昇した。また、マン ノースのレセプターであるCD206の発現を誘導すること

最大4回3日ごとに投与した結果、全身毒性は見られず、

顕著な免疫反応が起こらないことが、血中サイトカインの

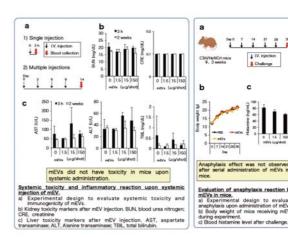
測定から判明した。さらに、同ドーズの牛乳エクソソーム を一週間ごとに5回投与し、その後、アナフィラキシー反

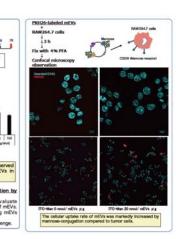
応の有無を確認したところ、牛乳エクソソーム自体がアナ

で、よりマンノースを結合させたエクソソームの取り込みが 上昇した。 上記の牛乳エクソソームにマンノースを結合させたもの を治療薬として用いるために、エクソソームに核酸を内封 する方法を開発した。本研究で開発した核酸内封法は、 従来法であるエレクトロポレーションを用いた方法より内 封効率が良いことを示し、エクソソーム重量に対して、最

大で5wt%程度のsiRNAを内封可能であった。これは現 時点で、従来報告されている核酸内封法の中でも最高レ

ベルの内封効率である。





主な成果

• Biocompatibility of highly purified bovine milk-derived extracellular vesicles. Somiya M, Yoshioka Y, Ochiya T. J Extracell Vesicles, 2018, 7(1), 1440132.

・【名称】牛乳から細胞外小胞エクソソームを精製、分離する技術、【導出先企業名】コスモ・バイオ株式会社、【その他】本技術を 用いてコスモ・バイオ社からミルクエクソソームとして平成29年8月から販売。

タンパク質翻訳を促進する新規ノンコーディングRNAを 用いた革新的創薬プラットフォームの構築

理化学研究所 生命医科学研究センター 副センター長 **カルニンチ・ピエロ** (Piero Carninci)



イタリア出身。1989年トリエステ大学修了博士(Biological Science)、1990年フェラーラ大学生物学国家資格取得、1990年Talent s.r.l 研究員、1995年理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター STAフェロー、1997年理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター 研究員、2003年理化学研究所 先任研究員、ゲノム科学総合研究センター 上級研究員、2008年理化学研究所オミックス基盤研究領域 ゲノム機能研究チーム チームリーダー、2011年トランスサインテクノロジーズ株式会社 取締役(現職)、2012年理化学研究所 専任研究員、2013年理化学研究所 主任研究員(現職)、ライフサイエンス技術基盤研究センター副センター長、機能性ゲノム解析部門部門長、2018年より理化学研究所生命医科学研究センター副センター長、トランスクリプトーム研究チームチームリーダー(現職)

課題概要

SINEUPは、2012年に発表された、新規ノンコーディン グRNAである (Nature, 491:454-7, 2012)。機能領域と結 合領域の二つのドメインで構成され、任意の対象mRNA からのタンパク質翻訳を促進するツールとして使うことが できる(図1)。このユニークな特徴を持ったノンコーディ ングRNAは、標的となるmRNAが発現していない細胞に は影響しないと考えられ、厳密なDrug Delivery System (DDS)を必要とせず、また、標的mRNAに対する翻訳 促進能はおよそ2-4倍であることから、標的遺伝子が極 端な過剰発現状態に陥ることもないと考えられる。我々 は、このSINEUPを疾患への治療に用いることができる のではないかと考えている。遺伝子発現量の異常な増 減に起因する疾患が多いことも、SINEUPの有する特性 が疾患への応用に対して有利に働く点である。タンパク 質の欠損、または発現量減少に起因する疾患の治療法 として、遺伝子治療法がある。これには、遺伝子本体を

アデノ随伴ウィルスベクター (AAV)に乗せ、疾患部位に感染させて発現させる方法 (例えばAADC欠損症ではこの手法で臨床治験が行われている)や、修飾したmRNAを患者の細胞に導入する方法 (Moderna Therapeutics社:アメリカ)がある。これらの

手法は、患者の細胞に存在しない遺伝子を、いわば無の 状態から補充することができるため、究極の治療法と考え られる。しかしながら、「必要な時」に「必要な場所」で 「必要な量」を発現させるためには大きな課題があり、厳 密な発現コントロールやDDSを必要とするような疾患にお いては、既存の手法で過不足なく対応できているわけで はない。このような現状を踏まえ、様々な遺伝子治療法の 選択肢を増やす上で、SINEUPの疾患応用は推進すべき 課題であると考えた。

本課題においては、以下の2点を研究開発目標とした。 SINEUPの機能を最大化するために不可欠な領域の抽出を行い、①設計基礎技術を確立する。そして、SINEUPが生体内で機能し、疾病治癒等の効果を発揮するツールとなりうることを、②マウスを用いた動物実験を通して検証・実証する。これらの研究開発目標は、企業導出を見据え、セールスポイントとなるべき科学的知見を得るための必要な過程として設定しており、これらを達成することで、本技術を企業導出へと繋げていくことを予定している。

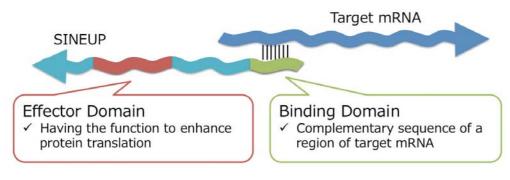


図1 SINEUPの模式図。2つの機能ドメインからなる。

本事業における成果概要

設計基礎技術の確立に関して、高スループットでSINEUPの効果をin vitroで評価する系を完成させた。これを、イメージング機器CeligoSおよびGFP蛍光を利用する高スループットのSINEUP評価系として、論文を発表した(主な成果3参照)。そして、ヒトの疾患に関連する遺伝子に対するSINEUPの設計及び評価を行い、2遺伝子に対する5個の機能するSINEUPを得た。また、SINEUPの機能面の理解を進める上で重要な、機能領域の活性に必要とされるRNA立体構造を理解するために、SINEUP機能の確認されているSINEB2エレメント群に対し、icSHAPE法(細胞内の生理的なRNA構造を解析する手法)を用いた構造データから、共通する立体構造を見出した。現在、この成果に関する論文発表およびPCT国際特許出願を準備中である。

マウスを用いた動物実験を通しての検証・実証に

関しては、アデノ随伴ウィルス8型 (AAV8)を用いて SINEUP-mHnf4 α を8週齢マウスに投与した。投与1週間 後のマウス肝臓におけるmHnf4 α の発現量を測定し、コントロール群と比較して約1.7倍に増強されることを確認した。また、mHnf4 α の下流遺伝子などの発現上昇も確認した(図2)。mHnf4 α をRNAi法によりノックダウンすることにより引き起こされる脂質代謝障害を標的モデルとし、SINEUPによる機能評価実験を行うこととした。本稿執筆時点(平成30年8月下旬)において、実施中である。

知的財産の導出に関連して、本事業開始時から理化学研究所のベンチャー企業であったトランスサインテクノロジーズ株式会社(以下TT社)を、平成29年11月に理化学研究所から独立させ一般企業とした。今後、本事業関連の知的財産については、AMEDの許可を得たうえでTT社へと導出する。TT社が今後行う大手・中堅バイオ企業との交渉に理化学研究所発の知的財産を連携させることが、SINEUP事業のさらなる発展につながると考えている。

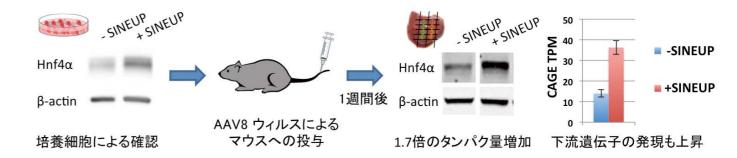


図2 培養細胞及び動物実験における結果。SINEUP-mHnf4αの効果を確認した。

主な成果

原著論文

- 1. Zucchelli S, Cotella D, Takahashi H, Carrieri C, Cimatti L, Fasolo F, Jones MH, Sblattero D, Sanges R, Santoro C, Persichetti F, Carninci P, Gustincich S. SINEUPs: A new class of natural and synthetic antisense long non-coding RNAs that activate translation. *RNA Biol.* 2015. 12(8):771-9. doi: 10.1080/15476286.2015.1060395.
- 2. Schein A, Zucchelli S, Kauppinen S, Gustincich S, <u>Carninci P</u>. Identification of antisense long noncoding RNAs that function as SINEUPs in human cells. *Sci Rep*. 2016. 6:33605. doi: 10.1038/srep33605.
- 3. Takahashi H, Kozhuharova A, Sharma H, Hirose M, Ohyama T, Fasolo F, Yamazaki T, Cotella D, Santoro C, Zucchelli S, Gustincich S, <u>Carninci P</u>. Identification of functional features of synthetic SINEUPs, antisense IncRNAs that specifically enhance protein translation. *PLOS ONE*. 2018. 13(2):e0183229. doi: 10.1371/journal.pone.0183229.
- 4. Takahashi H, Sharma H and <u>Carninci P</u>. Cell based assays of SINEUP non-coding RNAs that can specifically enhance mRNA transformation. JoVE (*in press*).

RNAi型医薬品を標的組織ならびに多能性幹細胞で持続的に発現させるウイルスベクター技術の開発

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 副所長・教授 **朝長 啓造**



1990年 鹿児島大学農学部獣医学科卒業、1994年 東京大学大学院農学研究科修了博士(獣医学)、1994年 東京大学農学部獣医微生物学教室博士研究員(日本学術振興会特別研究員)、1995年 米国タフツ大学医学部Postdoctoral Fellow(日本学術振興会海外特別研究員およびアメリカ白血病協会フェロー)、1998年 北海道大学免疫科学研究所助手、1999年 大阪大学微生物病研究所助手、2000年大阪大学微生物病研究所助教授(准教授)、2006年 日本科学技術振興機構「さきがけ研究」研究員(兼任)、2011年京都大学ウイルス研究所(現・ウイルス・再生医科学研究所)教授(現職)、2018年より京都大学ウイルス・再生医科学研究所副所長を兼任

課題概要

(Keizo Tomonaga)

本研究課題は、ボルナウイルスを利用して、中枢神経系ならびにiPS細胞を含む幹細胞でmiRNAや有用遺伝子を持続的かつ安全に発現する新規RNAウイルスベクタープラットフォームの開発を行うものである。

ボルナウイルスは脳神経細胞に強い親和性を示すRNAウイルスである。ボルナウイルスは、細胞の核内で複製し、非細胞傷害性に持続感染するという他のRNAウイルスでは見られない独特の性状を有している。また、iPS細胞や神経幹細胞など多くの幹細胞への感染性を持っている。ボルナウイルスは細胞核で複製することから、miRNAなどの機能性低分子RNAを中枢神経系で持続発現できるエピゾーマル型のRNAウイルスベクターに

なると期待される。研究開発代表者はボルナウイルスベクターを世界に先駆け開発し、実験動物の脳における長期的な外来遺伝子導入とその安定性の報告を行っている(Daito *et al.*, J. Virol., 2011)。

ボルナウイルスベクターは研究開発代表者のグループのみが持つわが国独自のウイルスベクター技術である。その特許は既に日本・欧州三か国・米国にて成立している(特許5299879; US patent 9365865; European patent 241588)。これまでに技術開発が進んでいる他のウイルスベクターと比較して、ボルナウイルスベクターは、神経細胞やiPS細胞を含む幹細胞で有用遺伝子を持続的かつ安全に導入できる優位性を持っている。ボルナウイルスベ

クターの実用化は、RNAi型医薬品への応用のみならず、 幹細胞を用いたex vivoでの再生医療への活用やin vivo 導入による中枢神経系疾患に対する遺伝子治療の画期的 な技術となると考えられる。一方、実用化を目指すにあた り、ウイルスベクターの産生効率の向上や安全性のさらな る確立など解決すべき課題があると考えられる。

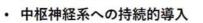
そこで本研究課題では、ボルナウイルスベクター実用化に向けた技術導出を目標に、①RNAi型医薬品を発現するボルナウイルスベクターの確立、②ボルナウイルスベクターの産生と安全性向上のための技術革新、③多能性幹細胞へのボルナウイルスベクターの導入と応用、④実験動物を用いたボルナウイルスベクターの検討の4つの研究開発項目を設定し、その技術開発を実施した。

ボルナウイルスベクターの開発と実用化



主な成果

・ miRNAと有用遺伝子の核内発現



- 産生効率の向上と安全性の確立
- iPS細胞と幹細胞への導入と分化誘導
- 脳内への非侵襲的投与

・ 企業との共同研究



本事業における成果概要

4つの研究開発項目に従い技術開発を進めた。以下 に、各研究開発項目の成果概要を記載する。

①「RNAi型医薬品を発現するボルナウイルスベクターの確立」では、培養細胞と初代神経細胞においてmiRNAを持続的に発現できるボルナウイルスベクターの樹立に成功した(Honda et al., Sci Rep., 2016)。また、ボルナウイルスベクターにテオフィリン作動性のリボザイムを搭載することで外来遺伝子発現のON/OFFを制御できる系の開発に成功し、特許出願を行った。さらに、技術導出の目標に従い、企業への技術指導も行い、最終年度における共同研究開発にもつなげた。

②「ボルナウイルスベクターの産生と安全性向上のための技術革新」では、ボルナウイルス粒子産生に関与する宿主因子の同定を行った。その結果、RNA結合タンパク質であるIGF2BP2の発現により、ボルナウイルスベクターの産生効率が格段に上昇することを明らかにした。また、産生効率に関わる複数の宿主因子を利用することで、ボルナウイルスベクターを高産生する細胞の樹立にも成功している。さらに、細胞からボルナウイルスベクターを除去する方法として、抗ウイルス薬剤であるファビピラビルを用いた排除法の確立を行った(Tokunaga et al., Antiviral Res., 2017)。加えて、タンジェンシャルフローフィルトレーション法を用いたベクター回収法の確立と鳥由来ボルナウイルスの遺伝子を利用したシュードタイプボルナウイル

スベクターの作製を行った。鳥由来ボルナウイルスのエン ベロープ遺伝子を利用することで、ベクター力価が顕著に 上昇することを明らかにし、特許出願を行った。

③「多能性幹細胞へのボルナウイルスベクターの導入と応用」では、ボルナウイルスベクターが、分化能に影響を与えることなく間葉系幹細胞やiPS細胞に持続導入できることを示した(Ikeda et al., Gene Ther., 2016)。また、筋細胞分化のマスター遺伝子であるMyoDを発現するボルナウイルスベクターを作製し、iPS細胞を筋細胞と筋管細胞へと分化誘導させることにも成功している。さらに、iPS細胞への持続的な遺伝子導入において、他ウイルスベクターと比較してボルナウイルスベクターが最も優れていることを明らかにした。

④「実験動物を用いたボルナウイルスベクターの検討」では、実験動物におけるボルナウイルスベクターの臓器送達性と安全性の確認を行った。これまでに、生体蛍光イメージング装置を用いて、マウスおよびラット体内でのボルナウイルスベクターの動態観察を行うとともに、非伝播型とシュードタイプボルナウイルスベクター投与での接種ルートの検討を行った。その結果、鼻腔内への投与により、ボルナウイルスベクターを効率よく脳内に送達できることを示した。

主な成果

原著論文

- 1. Ikeda Y et al., A novel intranuclear RNA vector system for long-term stem cell modification. Gene Ther 23:256-262, 2016
- 2. Honda T et al., Long-term expression of miRNA for RNA interference using a novel vector system based on a negative-strand RNA virus. Sci Rep 6:26154, 2016
- 3. Tokunaga T *et al.*, Antiviral activity of Favipiravir (T-705) against mammalian and avian bornaviruses. Antiviral Res. 143:237-245. 2017
- 4. Fujino K *et al.*, Generation of a non-transmissive Borna disease virus vector lacking both matrix and glycoprotein. Microbiol Immunol. 61:380-386, 2017
- 5. Sakai M *et al.*, Degradation of amyloid β peptide by neprilysin expressed from Borna disease virus vector. Microbiol Immunol, 2018.

知的財産等

出願特許2件、

企業との共同研究1件

アンメット疾患領域を開拓する スマートなケモバイオ抗体

東北大学 大学院工学研究科 教授 **梅津 光央**

(Mitsuo Umetsu)



1995年 東北大学工学部生物化学工学科卒業、2000年 東北大学大学院工学研究科博士課程後期修了 博士(工学)、2000年 日本学術振興会海外特別研究員(ライデン大学)、2001年 東北大学大学院工学研究科助手、2002年 東北大学多元物質科学研究所助手、2006年 東北大学大学院工学研究科助教授、2007年 同准教授、2014年 同教授、現在に至る

課題概要

本研究課題は、低分子医薬のように豊富な標的分子を 対象として多様な作用機序を持ち、かつ、抗体のような標 的特異性と良好な薬物動態を併せ持つケモバイオ抗体を 創り出し、腎臓病のようなアンメットな疾患の標的分子を ターゲットにできる医薬品フォーマットを提案することを 目指した。

現在、既存の低分子(合成)医薬品の標的分子は500 弱、バイオ医薬の主役である抗体医薬品の標的分子は50 弱と見積もられており、多くの薬物標的分子が医薬品開

な疾患の標的分子として手つかずにある。低分子医薬は、細胞内外の幅広い標的分子を対象として多様な作用機序が狙えるものの、低い標的特異性のため複数の作用点を持ってしまいオフターゲット作用や副作用を生じる場合が多く、また、薬物動態の制御が困難で特定の組織へ分布させることが難しい。一方、抗体医薬は、標的特異性が高く特定組織へ集積させることができるが、利用領域が細胞外に限定され、作用も標的抗原との結合による中和活性と抗体依存性(ADCC)や補体依存性(CDC)の細

発の目途が立っていないアンメット

胞傷害作用に限られる。さらに、分子量が15万と巨大なため組織移行や細胞内への到達が限られ、目的細胞に特異的な表面抗原も極めて少ないことから、適応範囲が癌、免疫、感染症等の限定的なものになっている。そこで、本研究課題では、アンメット領域でも難関な代表的疾患である腎臓病疾患をモデルとして、低分子医薬に抗体の必要最小限な構造を結合させて、幅広い標的分子を対象として多様な作用機序を設計できる低分子医薬に抗体レベルの高い標的特異性を付与することによって、アンメットな疾患の標的分子を対象にできる汎用性と実効性のある医薬品フォーマット(ケモバイオ抗体)を提案することを目指した。

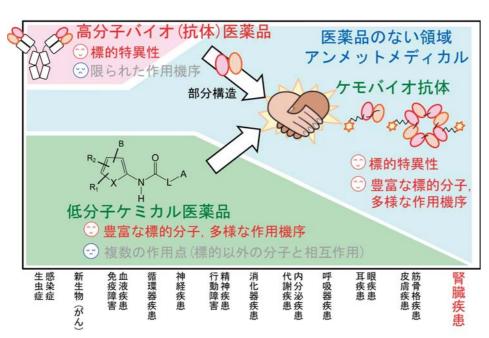
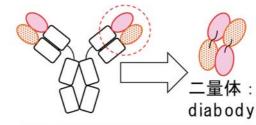


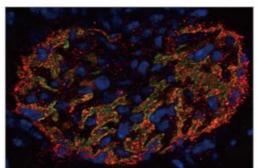
図1 低分子・バイオ医薬で狙えない疾患領域の概念図

本事業における成果概要

腎上皮に優位に発現しているポドプラニンを標的として、腎臓の基底膜を通過し腎上皮へ到達できるサイズを持ち、かつ腎上皮周辺に集積できる抗体を作製した。抗マウスポドプラニン抗体PMab-1の可変領域断片のみからなるdiabody型の二価体を設計することによって、解離速度が1000倍遅い低分子抗体を作製した。このdiabody型抗体をマウスへ投与したところ、抗体は腎臓の基底膜を通過し、腎臓の糸球体のみに集積することが観測された(図2)。そこで、腎上皮細胞の障害を低減する可能性があるPAI-1阻害薬を抗体へ結合させるため、PAI-1阻害薬の機能を損なわずに抗体へ結合可能なリンカー構造を導入した。そして、リンカー構造を最適化することによってPAI-1阻害薬を糸球体へ集積できるケモバイオ抗体を開発した。

ケモバイオ抗体をヒトへ利用するためには、ヒトへ利用 できる抗体であるだけでなく動物実験でも検証可能な物





赤:抗体を検出 緑:Nephrinを検出

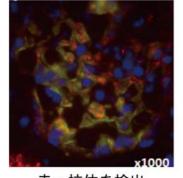
図2 PMab-1 低分子抗体のマウス糸球体に対するin vivo免疫染色イメージング

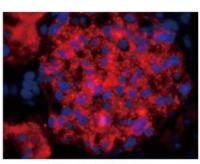
性をもつことが望ましい。そこで、我々は、ヒトとラットの両ポドプラニンに対して結合できる交差性のある抗ポドプラニン抗体を開発し、その抗体の断片から腎上皮に集積する低分子抗体を作製した。まず、ヒトポドプラニンに高い親和性を示す抗体LpMab-16を骨格として、飽和変異と小規模ライブラリー選択を繰り返す手法を開発することで、ヒトポドプラニンへの親和性も向上させると共にラットポドプラニンへも高親和に結合する抗体を作製することができた。この抗体は、ラット実験において、ラット糸球体へ選択的に集積することも確認された(図3)。

ケモバイオ抗体の構造最適化として、部位特異的な化 学結合を可能にするため、低分子薬を結合させるときに利 用されるリジン残基を、抗体の構造安定性を維持しつつ 結合活性を損なわないように他の残基へ変異させていく 方法論も開発した。足場構造と標的結合領域について、 熱的構造安定性と標的結合性を指標として、飽和変異と 小規模ライブラリー選択を繰り返す手法を用いて、改良す ることで、足場構造については、発現量と耐熱性を評価基 準としてポドプラニンに結合する領域に存在するリジン残 基を、標的結合性をほぼ変化させることなくリジン残基が 欠損した低分子抗体を作製した。

LpMab-16

開発した交差性抗体





赤: 抗体を検出

赤:抗体を検出 緑:Nephrinを検出

図3 ヒトとラットの両ポドプラニンへ結合する交差性抗体のin vivo免疫染色イメージング

主な成果

知的財産

- ・特願2018-123699 ヒトとラットの腎上皮ポドプラニンに結合する交差性抗体及びその可変領域断片
- ・特願2018-75344 標的分子と結合するポリペプチド

バイオ医薬品評価のための 新世代ヒト化マウス開発

理化学研究所 生命医科学研究センター チームリーダー 石川 文彦



1997年、九州大学医学部卒業。 臨床研修を終了した後、サウスカロラ イナ医科大学にて幹細胞研究を学ぶ。帰国後、九州大学第一内科学 特任助教。2006年理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究セン ター・ユニットリーダー。理研にて、グループディレクター、主任研究 員などを経て、2018年より現職。2009年、文部科学大臣表彰若手科学 者賞受賞、2014年、第10回日本学術振興会賞受賞。2017年、German Innovation Award "Gottfreid Wagener Prize" 受賞。2016年より米国 がん学会(AACR)の発行するCancer Research 誌のsenior editorを務 める。

共同研究開発者: 古関 明彦 (RIKEN)・小原收(かずさDNA研究所)

課題概要

(Fumihiko Ishikawa)

バイオ医薬品を含む医薬品は、近年、益々多様化してい る。現在の医療で根治が難しい疾患に対しては、分子標 的医薬の開発が精力的になされる一方、その特異性評価 やヒト細胞に対する治療効果や副作用の検証は容易で はない。われわれは、これまでマウスにヒト血液・免疫・ 疾患を再構築した「ヒト化マウス」の開発を行ってきた。 上記の医療・創薬のニーズに答えるべく、ヒトの免疫・ 疾患をよりよく再現する新世代ヒト化マウスを開発す

免疫療法において主た る役割を担うT細胞が 胸腺で正しく教育・成 熟し、ヒトの疾患に由来 する抗原を認識できる ようなヒト化マウス、バ イオ医薬品の中でも抗 体医薬の評価に役立つ ヒト化マウスなどの開発 を進める。

同時に、血液がんに ついて、急性や慢性、成 人白血病や小児白血病 など、多様性を含めて、 病態を再現するヒト化 マウスを作製する。作

製したヒト化マウスを用いることで、白血病の本質や抗が ん剤抵抗性を理解することで治療標的を見出し、治療候 補化合物のヒト化マウス体内での薬効を測定すること で、「生体内」「複数の組織で」「患者由来白血病細胞に対 して」「正常免疫細胞への副作用を最小限に」というキー ワードを持った in vivo アッセイシステムを確立する。難 病と捉えられている白血病の再現から理解へ、治療モデ ル作製から再発の理解へと研究を展開し、新しい治療に 役立つヒト化マウスシステムを提案し、今後のあたらしい 創薬に貢献することを目指す。

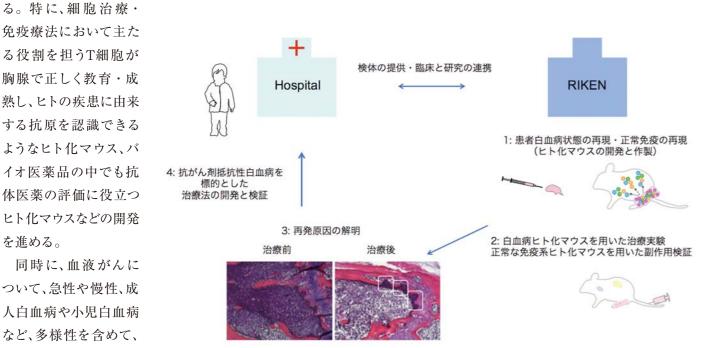


図1 ヒト化マウスを開発して、正常な免疫・悪性の血液を理解する。 臨床上の問題である白血 病再発克服を目指す。

本事業における成果概要

ヒトのT細胞は、病気が発現する抗原タンパクを認識す る際、HLAを手がかりとする。そのため、マウスの胸腺組 織にHLAを発現させることが必要と考えた。CD8を発現 するT細胞が手がかりに用いるHLA class I分子とCD4を 発現するT細胞が必要とするHLA class II分子に大別され るが、本事業にて、HLAのclass I. class II両者を発現する 免疫不全マウスを作製し、そこにヒトの造血幹細胞を移植 することで新たなヒト化マウスを作製することに成功した。

T細胞やB細胞など獲得免疫系細胞とNK細胞やミエロ イド系細胞の自然免疫系細胞の両者が協同することで、免 疫は個体を疾患から守る。NK細胞は、腫瘍性疾患やウイ ルス感染性疾患において重要な役割を担うことが知られて いる。ヒトT細胞を効率よく分化・成熟させるヒト化マウ スに続いて、NK細胞が多く発生するヒト化マウスの開発に も成功した。これらの新世代ヒト化マウスを用いることで、 腫瘍性疾患に対する免疫細胞療法をモデル化し、実際のヒ ト細胞を用いた治療効果を予見できる。

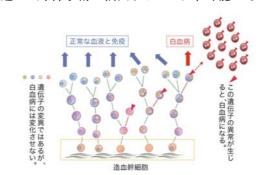
正常な免疫と同時に疾患の研究を進めた。腫瘍性疾患 の中でも、白血病は骨髄から発生した後、末梢血中を循環 し、体中の骨に分布・浸潤する性質を持つため、固形がん と違って外科手術で摘出することが不可能である。言い

換えれば、薬剤と免疫で疾患制御を目指す必要が強く求め られる疾患である。

本事業において、予後不良な白血病の患者検体を集積 し、多くの細胞の中で、どこまでが正常な機能を持ち、どこ からが白血病という悪性疾患に変容したかを同定すること に成功した。また、近年のゲノム科学の発展から、ひとりの 患者に複数の遺伝子異常が生じていることが分かってき た。ヒト化マウスにおいて、そのようなヒト白血病のゲノム 複雑性が再現できているかを検証したところ、確かに、ヒト 化マウスにて発症した白血病細胞は患者体内で見られた 複数の遺伝子異常が維持されていることが確認された。

複数の遺伝子異常が生じた場合に、どの遺伝子変異を 標的にして治療候補化合物を開発するべきかについても白 血病のヒト化マウスと1細胞遺伝子解析を組み合わせるこ とで一部の答えを得ることができた。すなわち、機能的に 正常な幹細胞と悪性化した幹細胞の違いを1細胞ずつ遺 伝子変異解析することで見出した。その違いの一つを標 的として化合物を開発し、ヒト化マウスを用いて検証したと ころ、生体内の骨髄・脾臓・末梢血のすべてにおいて著 明な治療効果を確認することができた。

白血病で得られた知見をほかの疾患へと応用し、多様性 に富むヒトの疾患を理解し、克服するためのリサーチツー ルの一つとして役立てたい。



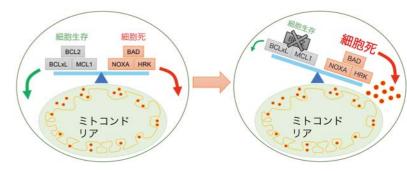


図2 複数の遺伝子異常の中から治療標的を見つける。

図3 Keyとなる遺伝子異常を標的に、同時に、細胞死を誘導する。

主な成果

原著論文

1) Saito Y, Mochizuki Y, Ogahara I, Watanabe T, Hogdal L, Takagi S, Sato K, Kaneko A, Kajita H, Uchida N, Fukami T, Shultz LD, Taniguchi S, Ohara O, Letai AG, Ishikawa F*. Overcoming mutational complexity in acute myeloid leukemia by inhibition of critical pathways. Science Translational Medicine, 9(413) eaao1214. 2017

2) Najima Y, Tomizawa-Murasawa M, Saito Y, Watanabe T, Ono R, Ochi T, Suzuki N, Fujiwara H, Ohara O, Shultz LD, Yasukawa M, Ishikawa F*. Induction of WT1-specific human CD8+ T cells from human HSCs in HLA class I TG NSG mice, Blood 127:722-734, 2016 3) Aoki Y, Watanabe T, Saito Y, Kuroki Y, Hijikata A, Takagi M, Tomizawa D, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Kaneko A, Ono R, Sato K, Suzuki N, Fujiki S, Koh K, Ishii E, Shultz LD, Ohara O, Mizutani S, Ishikawa F*. Identification of CD34+ and CD34leukemia-initiating cells in MLL-rearranged human acute lymphoblastic leukemia. Blood 125:967-980. 2015

出願番号: PCT/JP2016/57795 出願日: 2015 年 3 月 11 日 発明の名称: 難治性白血病治療薬

出願人:国立研究開発法人理化学研究所

革新的バイオ医薬品創出に向けての 知財・出口戦略の策定

東北大学 大学院医学系研究科 非常勤講師 赤堀浩司 (Koji Akahori)



1999年京都大学大学院理学研究科博士課程修了。名古屋大学大学院工学研究科博士研究員、YKI国際特許事務所を経て、2007年10月から東北大学産学連携推進本部特任准教授、2011年9月から東北大学大学院医学系研究科特任准教授/統括産学連携室長。2017年4月から東北大学大学院医学系研究科非常勤講師。YKI国際特許事務所勤務。理学博士。弁理士。

課題概要

革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業(革新的バイオ事業)は、我が国のバイオ医薬品の国際競争力強化を

目的とし、製薬企業が抱える技術的課題の解決及び世界初の革新的な次世代技術の創出を目指して研究開発を推進している。各研究開発課題は事業終了までに研究開発成果を企業導出するよう要請されている。

知財戦略課題は、研究開発課題が企業導出に必要な知的財産を形成するための知財戦略の支援や、企業導出を目指した出口戦略の支援をミッションとしている。平成26年度の事業開始時には「事務局課題」としてスタートしたが、平成27年度のAMED発足後は、事務局業務がAMEDに移管され、知財・導出戦略に特化した「知財戦略課題」となった。

知財戦略課題は、知的財

産や医薬開発に関して専門的な知識と経験を有する者をメンバーとした「支援チーム」によって構成されている。そして、PS、PO、AMEDらと密に連携した上で、各研究開発課題の支援を進めている。

平成 27 年 7 月 30 日

革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業 「目標とする EXIT の考え方」

本事業では、出口戦略として(1)(2)のいずれかの項目に掲げる事項を目標とし、本事業の終了時までに少なくとも 3 件達成する。

- (1) 大学等の単独開発技術
 - ① 導出:実用化を前提に企業との導出入契約を締結すること。
 - ② 共同研究契約:実用化に向けて、企業と研究者との間で、実用化に向けた共同研究契約を締結すること。その際、実用化に向けた具体的な道筋が明示されていること。
- (2) 企業との共同開発技術(本事業において企業と共同で研究開発が実施されている技術)
 - ① 実用化のための研究開発:本事業において分担機関として参画した企業が、得られた技術を個別の製品開発等に応用する研究開発段階への移行、得られた技術を利用した医薬品探索・評価系の構築への移行など、技術の実用化に向けた研究開発段階に移行すること。
 - ② 導出:本事業により研究開発された技術を、実用化を前提に、第三者となる企業への導出契約を締結すること。
- 留意点
 - ・研究開発される技術は多様であり、また、企業との契約も多様であるので、ケースバイケースで判断をする必要がある。
 - ・企業との共同研究は、実用化に結びつける有効な手段である。しかし、共同研究は非常に曖昧な形で実施することもできるので、単なる共同研究は本事業の成果の導出とは認めない。

以上

本事業における成果概要

知財戦略課題では、各研究開発課題の計画書・報告書などを精査して、研究開発状況を把握するとともに、推進委員会・評価委員会によるヒアリングへの陪席、PS,PO,AMEDらとともに行ったサイトビジットなどの機会を利用して、支援等を進めてきた。研究開発課題から個別に相談をいただくことも多く、その対応にも十分な時間を割いている。また、「主な成果」に記載したような調査分析も実施し、研究開発課題に情報提供を行ってきた。具体的な活動は、秘密保持の観点から記載できないが、特許、契約に関する事項、医薬品開発に関する事項、企業紹介に関する事項など様々である。

革新的バイオ事業では、「導出」を図の「目標とする EXITの考え方」によって定義している。この定義を定 めるにあたっては、様々な議論があり、案を複数回改訂 した上で、平成27年7月の推進委員会において承認され ている。

研究開発を企業と連携せずに行った「(1)大学等の単独開発技術」については、原則として「①導出」に記載された実用化を前提とする導出入契約、すなわちライセンス契約や、それに準じたオプション契約等が交わされることをもって導出と定めている。また、オプション条項等を含むような実用化に向けた「②共同研究契約」も導出とみなしている。他方、例えば、研究者自身が関与して設立されたベンチャー企業への単なる特許ライセンスや、国等からの非臨床・臨床開発等の研究費獲得は高く評価するものの導出とはみなさないこととなった。

分担機関の製薬企業等と行った「(2)企業との共同開発技術」については、得られた成果が具体的な製品開発を

目指した研究開発段階等に移行するなど「①実用化のための研究開発」に至った場合及び第三者へ「②導出」された場合に導出として認定される。単に特許共同出願を行った場合や、基礎的な共同研究を進めている場合には、導出とは扱われない。

平成30年8月の時点で、既に30件を越える案件が、推進委員会において「導出」の認定を受けている。導出されたシーズは、バイオ医薬候補品の他、バイオ医薬品開発のための基盤技術、研究開発ツールなど多岐にわたっている。EXITの考え方を策定した時点では、革新的バイオ事業全体として3件の導出ができれば成功と認識されていたが、それをはるかに上回る充実ぶりである。また、導出認定の対象外である製薬企業等との共同研究や、設立したベンチャー企業への導出など、将来的な実用化に繋がる動きも多数みられる。

こうした具体的な活動は、各研究開発課題と、その所属する研究機関等が主体的に行っている。知財戦略課題では、PS、PO、AMEDらとともに、研究機関に不足する部分を補助する活動を行ってきたが、導出活動自体を担ってはいない。革新的バイオ事業における活発な企業導出は、なによりも、研究開発課題自身の精力的な導出活動と、研究機関の知的財産部・TLO・URA等による支援のたまものである。

革新的バイオ事業におけるこうした活発な研究開発と 企業導出は、日本のアカデミアにおけるバイオ医薬品の研 究開発レベルの高さを示すものであり、また、そのポテン シャルを十分に引き出した事業運営は産学連携の大きな 成功モデルであると考える。知財戦略課題としても、関 係者の協力の下、微力ではあるが事業に貢献できたこと を嬉しく思う。

主な成果

実施した主な調査(一般には公表しておりません)

- ・バイオ医薬品(核酸医薬)に関する調査(H26年度)
- ・バイオ医薬品(抗体医薬)に関する調査(H26年度)
- ・核酸医薬の送達を制御するリガンド分子に関する調査 (H27年度)
- ・抗体と薬物の複合体に用いるリンカーについての調査 (H27 年度)
- ・低分子抗体の構造に関する調査 (H27年度)
- ・ウイルスベクターに関する調査 (H28 年度)
- ・新しいバイオ医薬品が目指すターゲット・疾患に関する調査 (H28 年度)
- ・新バイオ医薬開発に向けた T細胞免疫・受容体関連技術の調査(H29年度)

次世代バイオ医薬品を目指した 低分子二重特異性抗体の基盤技術開発

東京農工大学 大学院工学研究院 生命機能科学部門 准教授



1999年 東北大学工学部生物化学工学科 卒業、2000年 同大学大学院工学研究科生物工学専攻博士課程前期課程中途退学 (2006年 同大学大学院工学研究科 博士(工学) 取得)、同年 同大学加齢医学研究所附属 医用細胞資源センター 助手、2002年 同大学大学院工学研究科バイオ工学専攻 助手、2007年 同 助教、2011年 同 准教授、2015年 東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門 准教授 (現職)

^{准教授} **浅野 竜太郎**

(Ryutaro Asano)

課題概要

これまでに研究代表者らが開発してきた低分子二重特 異性抗体医薬シーズであるEx3(図1)は、担がんマウスモデ ルに於ける薬効、および製剤化に十分な安定性を有してい ることを確認してきましたが、既存の調製技術では、実製 造プロセスを見据えることはできませんでした。即ち、言 い換えれば新たに調製に係る革新的な基盤技術を確立 することができれば、このEx3のみならず同様の低分子抗 体医薬の実用化を加速させることが期待できます。本プ ロジェクトでは、より実用化に適した分子設計、遺伝子配 列の改変を応用した微生物発現の最適化、プロテインLを 利用した高効率精製の観点から低分子二重特異性抗体 の調製に係る基盤技術開発を進めました。宿主微生物と しては、汎用されている大腸菌と酵母に加え、組換えタン パク質の分泌生産に優れ、エンドトキシンを持たないこと から、低コストでの製造プロセス構築が期待できるブレビ バチルス菌を用いた検討を行いました。

我々は近年、低分子二重特異性抗体の構成するドメインの連結順を入れ換えた配向性改変体を作製することで、発現量やがん細胞傷害活性が増減することを見出しています。一方で、Ex3は非共有性の相互作用により会合した二量体タンパク質であるため、製造プロセス過程や保存中に、分子が解離してしまう恐れがあります。すべての構成するドメインを連結させた構造であるsingle-chain diabody (scDb)型やtandem scFv (taFv)型は、この解離の懸念はありませんが、それぞれ8通りの配向性が考えら

れ、これらの配向性の違いが及ぼす発現量や機能への影 響を検証した例はありません。そこで、本プロジェクトで は、まず配向性が異なる低分子二重特異性抗体の発現べ クターを網羅的に作製し、大腸菌、酵母、ブレビバチルス菌 をそれぞれ発現宿主として用いて調製し、機能と生産量 の比較を行いました。機能の保持と生産量の観点から至 適な宿主と配向性の選抜を行い、さらなる生産量の向上 を配列の最適化により、また精製の効率化をプロテインL の機能向上の観点から進めました。株式会社プロテイ ン・エクスプレスは、ブレビバチルス菌発現系と低分子抗 体の精製に効果的な高機能化プロテインL変異体に関す る独自の技術を有しています。出光興産株式会社は、酵 母発現系の検討実績と、独自に開発した組換えタンパク 質の高生産に寄与するタンパク質高発現促進配列に関す る技術を有しています。両企業を分担機関とし、研究代 表者らが開発したEx3をモデル医薬シーズとして用い、そ れぞれの技術を統合、有機的な連携を図ることで一連の 技術をパッケージングさせ、低分子二重特異性抗体の実 用化を加速させるための基盤技術として関連企業への導

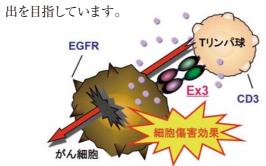


図1 低分子二重特異性抗体Ex3の模式図

本事業における成果概要

配向性が異なるtaFv型およびscDb型低分子二重特異性抗体の、大腸菌、酵母、およびブレビバチルス菌用の発現ベクターをそれぞれ作製しました。3種類の微生物発現宿主を用いて、全16種類の配向性が異なる低分子二重特異性抗体Ex3を発現させ、がん細胞傷害活性評価を行い、配向性の違いがもたらす機能への影響を生産性と併せてパネル化しました(図2)。最も精製度が高かった酵母を用いて調製したサンプルの結果を重視して選定を進めたところ、いずれの発現系を用いても概ね有望な配向性は同様であることが明らかになりました。得られた結果を基に、最終的に計4種類の配向性とバックアップの配向性を選定し、さらに大腸菌、ブレビバチルス菌、および酵母を用いて発現量の向上を目指した検討を進めた結果、ブレビバチルス菌発現系を用いた際に優に10 mg/L以上の発現量を達成することができました。

プロテインLリガンドタンパク質に関しては、アルカリ、 熱条件下における暴露試験を行い、生じた分解物のN末 端分析を行うことで、物理的安定性に関与すると考えられ るアミノ酸残基を同定しました。並行して、一般的にアル カリ条件下で分解が生じるとの報告があるリジン残基に 対する変異、立体構造上の安定性が向上されると推測さ れる残基の変異(水素結合の増強など)を導入した複数の コンストラクトを作製し、その中で最も安定性が高い変異 体を選抜しました。さらに本リガンド変異体を実際にカ ラム担体に固定化した場合でも、他社製品と比べ、アルカ リ洗浄により抗体の結合能の減少が生じにくくなっている ことを確認し、さらに、担体への固定化条件を変更するこ とで、より安定性が高くなることも見出しました。 さらに、他社アルカリ耐性プロテインLレジンと比べても、優れたアルカリ耐性能を保有していることも確認できました。以上を踏まえて、開発したプロテインL固定化カラムの使用と、もう一工程加えるだけで高純度精製できるプロセス開発にも成功しました。

Ex3の発現最適化に向けては、タンパク質高発現促進配列の付加に加えて、リンカーの改変も進めた結果、特に大腸菌発現系に於いて、発現量が増大する傾向がみらました。現在、低分子二重特異性抗体の実製造を視野に入れて、フラスコ培養から、ジャーファーメンター培養に移行し、各種培養条件の検討を行っています。また並行して、配向性の異なる低分子二重特異性抗体へのタンパク質高発現促進配列の適用について検討を進めています。

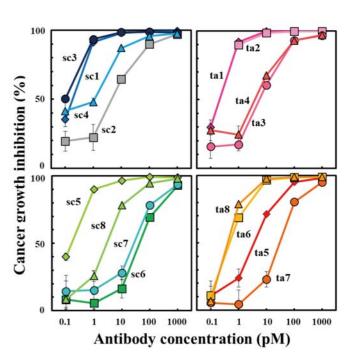


図2 全16種類の配向性が異なるEx3の活性評価

主な成果

原著論文

- 1. Asano R., Nagai K., Makabe K., Takahashi K., Kumagai T., Kawaguchi H., Ogata H., Arai K., Umetsu M., Kumagai I. Structural considerations for functional anti-EGFR \times anti-CD3 bispecific diabodies in light of domain order and binding affinity. *Oncotarget*, 9(17), 13884-13893 (2018)
- 2. Sanada H., Kobayashi K., Oyama K., Maru T., Nakanishi T., Umetsu M., Asano R., Kumagai I., Affinity maturation of humanized anti-epidermal growth factor receptor antibody using a modified phage-based open sandwich selection method. *Sci. Rep.*, 8 (1), 5414 (2018)
- 3. Asano R., Kuroki Y., Honma S., Akabane M., Watanabe S., Mayuzumi S., Hiyamuta S., Kumagai I., Sode K., Comprehensive study of domain rearrangements of single-chain bispecific antibodies to determine the best combination of configurations and microbial host cells. *MAbs*, (2018) in press

新規アミノ酸を用いた 高親和性・高安定性VHH抗体の作製技術の開発

理化学研究所 非天然型アミノ酸 技術研究チーム チーム・リーダー **坂本 健作** (Kensaku Sakamoto)



1987年東京大学理学部卒業、1989年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻修士課程修了、1991年筑波大学生物科学系助手、1992年東京工業大学生命理工学部生体機構学科教務職員、1994年博士号(理学)(東京大学)取得、1994年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻助手、2004年理化学研究所ゲノム科学総合研究センター・チームリーダー、2008年同研究所・生命分子システム基盤研究領域チームリーダー、2013年同研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター生命分子制御研究グループディレクター兼チームリーダー、2018年より同研究所生命機能科学研究センター・非天然型アミノ酸技術研究チームリーダー(現職)

課題概要

VHH抗体(又はナノボディー)はラクダ等の重鎖抗体の 抗原結合ドメインを切り出した抗体分子である。通常の 抗体のH鎖等と同様に3本の抗原結合ループを有している が、1つの構造単位(シングル・ドメイン)で構成されてお り、通常の抗体に比べて10分の1の小ささである。 糖鎖 を有さないため、微生物を用いた生産に適している。これ らの特長から、産業化の大きなポテンシャルを有してい る。とくに、シングル・ドメイン構成であることから、通常 の抗体に伴いがちな凝集性等の不利な性質を免れられる 可能性と、様々な環境下でも活性を保持できる可能性が あり、通常の抗体の適用領域を超えて医療・診断分野で の活用が期待されている。VHH抗体の基本特許が2016 年に期限切れを迎えたことで、様々な企業が開発へ参画 を始めている。VHH抗体開発のパイオニアであり、最大 手のアブリンクス社(ベルギー)から最初のVHH抗体医薬 品が、今年から来年にかけて市場に投入される予定であ り、さらにVHH抗体に対する期待の高まりと競争の激化 を誘っている。

VHH抗体を取得するためには、ラクダやアルパカ等を 抗原で免疫した後、ファージ・ディスプレイ技術によって クローンを単離する方法が用いられている。しかしなが ら、ラクダ等の生体免疫は長期間を要するプロセスである 上に、生体内の抗体選別過程がブラック・ボックスになっ ていることから、取得される抗体クローンのバリエーショ ンには一定の制約が存在している懸念がある。そこで、 免疫プロセスを介さず、ナイーブ・ライブラリーや人工ライブラリーから直接にVHH抗体を取得する技術の開発が試みられているが、免疫によって得られるVHH抗体を超える抗原親和性・構造安定性を創出するまでには至っていない。VHH抗体以外にも、抗体の断片化や、抗体と他のタンパク質とのキメラ分子、さらには人工的な分子構造の枠組みなどが様々提案されている。しかしながら、本課題では、VHH抗体が本来生物で機能している抗体に由来するという素性の良さに加えて、シングル・ドメイン構成である等の利点を持つことから、VHH抗体の産業利用を促進するための技術開発に取り組んだ。

理化学研究所は、新規のアミノ酸を含有する組換えタンパク質を生合成するための独自技術と知財を有しており、この技術をVHH抗体の改良に生かせると考えた。新規アミノ酸技術は、研究代表者である坂本らの多年にわたる研究の成果である。近年になり、坂本らは、新規なアミノ酸レパートリーが蛋白工学上の課題に新しい解決法を提供できることを示した。この成果の中で、タンパク質分子の複数個所に新規アミノ酸が導入できること、さらに、そのことによって比較的容易にタンパク質の性状改善が可能であることが明らかになっている。そこで本課題では、新規アミノ酸の特長を生かしてVHH抗体の親和性向上、性状改善を実現する技術の開発を行なった。理化学研究所、東京大学、及び味の素イノベーション研究所がそれぞれに役割分担を行い、味の素を通じて開発技術を産業につなげることを目指した。

本事業における成果概要

1)VHH抗体への新規アミノ酸組込み技術の開発

タンパク質は20種類のアミノ酸が化学的に連結した高 分子として生合成される。これらのアミノ酸の種類は遺 伝暗号によって指定されている。近年のバイオテクノロ ジーの成果の1つとして、遺伝暗号では指定されていない アミノ酸であって、自然界ではタンパク質中に存在しない アミノ酸(新規アミノ酸)をタンパク質に組込むことが可能 になっている。大腸菌株B-95.ΔA株は、新規アミノ酸の 組込みを効率よく確実に行うために理化学研究所におい て坂本らによって開発された。本課題では、この大腸菌 株を用いてVHH抗体の生産効率を最大化することに成 功した。新規アミノ酸のタンパク質への組込みに関わっ ている分子は、アミノアシルtRNA合成酵素(aaRS)と tRNAである。新規アミノ酸は大腸菌の増殖用培地に添 加されて大腸菌内に取り込まれ、さらに特異的なaaRSに よって選び出されて専用のtRNAに結合されてリボソーム に運ばれる。この際に、大腸菌内に存在するアミノ酸から きちんと区別されることが重要である。新規アミノ酸が 正しく選別されることで、タンパク質への組込みの際に他 のアミノ酸の混入が防がれている。本課題では、tRNA 分子の改変と、大腸菌内でのaaRSおよびtRNAの発現レ ベルの最適化を行うことで、新規アミノ酸を含有する VHH抗体の生産量の最大化を実現した。本技術は理研 から味の素の研究所に技術移転されており、味の素研究 所における発酵生産プロセスの最適化を経て数g/Lの生 産量が実現できる見込みである。

2)VHH抗体の抗原親和性改善のための技術開発

生産技術開発によって、VHH抗体の複数個所に新規アミノ酸が導入できるようになったことから、このような VHH抗体変異体(バリアント)の性質を調べることが可

能になった。複数の導入部位は遺伝子上で指定されており、3か所に新規アミノ酸が導入された抗体であっても、導入個所が違うバリアントを作り分けた上で、それぞれの性質を解析することができる。このような導入部位の特異性のために、VHH抗体について報告されている立体構造が有効活用できている。新規アミノ酸の導入部位を立体構造の観点から選んだり、新規アミノ酸の導入が効果的であった部位を立体構造上にマップすることを行った。このようにして、VHH抗体の抗原親和性を10倍以上向上させることに成功している。

ここまでは、部位を先に決めてから新規アミノ酸を導入する技術だが、もう1つ有用な技術としてランダム・セレクション技術の開発を行った。新規アミノ酸をVHH抗体中のランダムな部位に導入し、抗原親和性が向上したバリアントを選び出すための試験管内mRNAディスプレイ技術である。数個の新規アミノ酸を含有したVHH抗体バリアントがこのようにして選別された。また、コンピュータを用いた仮想的選別技術の開発も行い、複数個所に新規アミノ酸を含有するVHH抗体が選別された。構造シミュレーション技術の活用による選別結果に基づいて、リアルVHH抗体を生産して親和性の改善を迅速に検証することが可能になっている。

主な成果

知的財産

特許出願(理化学研究所、味の素株式会社)、変異VHH抗体及びその製造方法、2017年6月26日出願、出願番号2017-124289。

骨格筋指向性のあるペプチド付加モルフォリノ核酸 DDS技術の臨床応用に向けた開発

日本医科大学 大学院医学研究科 分子遺伝医学分野 教授

岡田尚巳 (Takashi Okada)



1995年金沢大学大学院医学研究科修了、博士(医学)、1996年米国 NHI, NHGRI博士研究員、1999年自治医科大学医学部助手・講師、 2007年国立精神・神経医療研究センター神経研究所遺伝子疾患治 療研究部室長、2014年日本医科大学大学院医学研究科教授(現職)

課題概要

本研究では、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD)の 有効な治療法として期待される人工核酸を用いたエクソン・スキップ法に関し、シーズ技術である薬剤送達粒子と人工核酸を用いて、既存のエクソン・スキップ治療薬の欠点が克服された新規DMD治療製剤の開発を行っている。

DMDは、小児期に発症し進行性の筋力低下・筋萎縮を示す重篤な遺伝性筋疾患である。多くの場合、ジストロフィン(DMD)遺伝子の変異欠失によるフレームシフト変異が原因となり発症する。現在のところ、DMDに対する治療は対症療法のみで、根治療法は存在しない。国立精神・神経医療研究センター(NCNP)では新規DMD治療戦略として、DMDの欠失変異によるアミノ酸読み枠のずれを、モルフォリノ・アンチセンス核酸(PMO)を用いたエクソン・スキップにより修正する治療法開発の非臨床POCを取得した。この成果をもとに、NCNPと日本新薬(株)は共同でエクソン53スキップ治療薬NS-065/NCNP-01の開発を進めている。同剤は、進行中の第I/II相臨床試験において、重篤な有害事象を認めず、筋機能改善に資する明確なDMDタンパク質の発現回

復効果が実証されている。しかし、現存の人工核酸医薬の課題は、有効な薬剤デリバリー(DDS)の不在により、細胞取り込み効率が低いこと、骨格筋・心筋等の標的臓器への指向性が無いことであり、治療効果を高め、安全性とコストを改善するために、これらの課題を改善する新規DDSの開発が望まれている。

上記の課題を克服すべく、本研究ではPMOよりも細胞膜透過性を高めた人工核酸と、薬剤送達粒子をドラッグデリバリーシステム(DDS)として用いることで、薬剤送達粒子の組織親和性と高い細胞内取り込み効率を併せ持った、次世代の核酸医薬品の開発を行うことを目標としている。現在までに、開発薬剤を作製する際の最適な条件を決定し、in vitro, in vivoにおいてその有効性を確認している。このシーズ技術を応用することにより、投与回数や投与量を低減させ、既存薬と比較して筋親和性の高いDMD治療薬の開発を推進する。

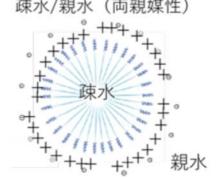
本事業における成果概要

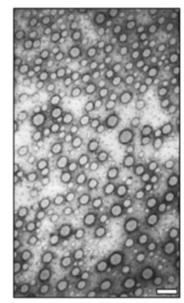
本事業における成果としては、疾患モデルマウス由来の 初代培養細胞を対象に、人工核酸と薬剤送達粒子からな る開発薬剤を生成する際の最適な条件を検討するため、 人工核酸/薬剤送達粒子によるエクソン・スキップ誘導 効果と安全性を評価した。

成果と進捗:ペプチド付加PMOの電気的性質

ペプチド付加PMOによるナノ粒子 疎水/親水(両親媒性)

ペプチド付加 PMO分子 (+)





100 n

51

自発的なミセル化ナノ粒子形成能を有する P-PMOは安全性および治療効果が高い (Aoki *et al.*, Nano Letters, 2015, 4364-4373)

主な成果

原著論文

- 1. Miyatake S, Shimizu-Motohashi Y, Takeda S, Aoki Y. Anti-inflammatory drugs for Duchenne muscular dystrophy: focus on skeletal muscle-releasing factors. *Drug Des Devel Ther*.2016;10:2745-58.
- 2. Miyatake S, Mizobe Y, Takizawa H, Hara Y, Yokota T, Takeda S, Aoki Y. Exon Skipping Therapy Using Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers in the mdx52 Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Methods Mol Biol*.2018;1687:123-141.
- 3. Hara Y, Mizobe Y, Miyatake S, Takizawa H, Nagata T, Yokota T, Takeda S, Aoki Y. Exon Skipping Using Antisense Oligonucleotides for Laminin-Alpha2-Deficient Muscular Dystrophy. Exon Skipping & Splice Modulation Therapies. *Methods Mol Biol.* in press.
- 4. Mizobe Y, Miyatake S, Takizawa H, Hara Y, Yokota T, Nakamura A, Takeda S, Aoki Y. In Vivo Evaluation of Single-Exon and Multiexon Skipping in mdx52 Mice. Exon Skipping & Splice Modulation Therapies. *Methods Mol Biol.* in press.
- 5. 青木吉嗣、岡田尚巳、武田伸一、筋ジストロフィーの遺伝子治療、「Precision Medicine」12月号、北隆館,東京、2018 (in press) **知的財産**

該当なし(出願準備中)

組織特異的送達能を有するコンジュゲートsiRNAの創成

岐阜大学 応用生物科学部 教授

上野 義仁
(Yoshihito Ueno)



1987年3月、東京理科大学理学部 卒業。1992年3月 東京工業大学大学院総合理工学研究科修了 博士(理学)。1992年4月、科学技術厅基礎科学特別研究員。1993年6月、北海道大学薬学部助手。2001年4月、岐阜大学工学部助教授。2007年4月、岐阜大学工学部准教授。2011年4月、岐阜大学応用生物科学部准教授。2013年4月、岐阜大学応用生物科学部教授(現職)。

課題概要

核酸医薬、特にsiRNA医薬は、その特異性と安全性の高さから次世代の抗がん剤候補として大きく期待されているが、①体内での不安定性や、②標的細胞、組織への効率的な送達が課題となり、未だ医薬品として世に出ているものはない(研究開始時点)。本研究開発では、上記課題を克服する為、1)siRNAに新規化学修飾を施して生体内でも安定なsiRNAを創出し、2)がん細胞表面に過剰発現している受容体を標的としたリガンド・パイロット分子をコンジュゲートとして、上記安定化siRNAと組み合わせることによりシンプルで有効性と安全性に優れた核酸医薬を創出することを目的として研究を行った。

現在、siRNA医薬ではリポソーム(LNP)を用いて複合体を調製し、保護機能と送達機能を持たせる第1世代の技術による開発が進められているが、LNPを用いる送達

では製剤が肝臓にトラップされるなど問題点が多く、製剤化に於いても粒子径の均一化、安定性、矮小化の必要性が大きな課題となる。本研究開発では、リポソーム・フリーの新しいsiRNA医薬の開発を目指し研究を行った。本研究で開発する化学修飾siRNAは、ヌクレアーゼ耐性が強化された基本構造を持っているので、付加するリガンドを選択することにより特定組織中のがん細胞への選択的な送達が可能となり、様々ながんに対し有効で安全性の高い画期的な抗がん剤となる。

種々のsiRNA誘導体の合成を行い、製造面、体内安定性、組織選択性、薬効と活性、安全性などの観点から総合的に評価・選定する。評価方法については、生物学的な定量方法に加え、ヒトにも適用できる非侵襲的なPETイメージング法により、岐阜大学で独自に開発した高効率的な短寿命放射性核種標識化技術によりRNAを¹¹C(あるいは¹⁸F)標識し、RNA分子の組織選択性と体内動態を非侵襲的に測定する。

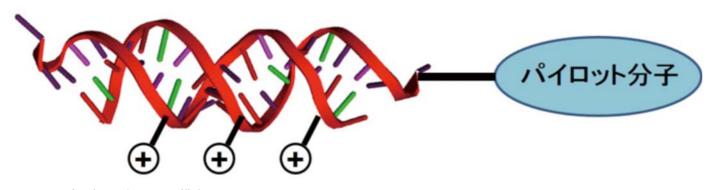


図 コンジュゲート型 siRNA の構造

本事業における成果概要

siRNAに適応可能な新規ヌクレオシドアナログとして、 糖部4'-位に各種アミノアルキル基及び2'-位にメトキシ基 を導入したヌクレオシドアナログ(4'-AA-2'-OMe-Nt)を設 計・合成した。4'-AA-2'-OMe-NtをRNAに導入し、その 性質を検証したところ、アナログを導入することにより RNAのヌクレアーゼに対する抵抗性並びに血清中での安 定性が大幅に向上することが明らかとなった。その耐性 及び安定性は、鎖長の伸長に伴い向上した。また、4'-AA・ 2'-OMe-Ntを導入した一本鎖RNAの細胞膜浸透性を HeLa細胞を用いて検討したところ、アナログを導入するこ とにより一本鎖RNAの細胞膜浸透性が向上することが明 らかとなった。一方、4'-AA-2'-OMe-Ntを導入することによ りRNA/RNA二重鎖の熱的安定性が低下することも判明 した。そこで、二重鎖の安定性の向上を目的とし、4'-AA· 2'-OMe-Ntの2'-位メトキシ基をフッ素原子で置換した4'-ア ミノアルキル-2'-フルオロヌクレオシド(4'-A A·2'-F-Nt)を設 計・合成し、4'-AA-2'-F-Ntを含むRNAの性質を検証した ところ、4'-AA-2'-F-Ntを導入したRNAは天然のRNAと同 等のRNA/RNA二重鎖形成能を有することが明らかと なった。また、同様に糖部にアミノアルキル側鎖を有する5-アミノアルキル-2'-O-メチルヌクレオシド(5'-A A-2'-OMe-Nt) を設計・合成し、その性質を検証したところ、5'-(R)体及 5'-(S)体の二つの立体異性体で特性が異なり、5'-(S)体を 導入したRNAは5'-(R)体を導入したRNAよりも RNA/RNA二重鎖形成能が高く、よりヌクレアーゼ耐性 であることが判明した。

続いて、4'-アミノアルキル修飾ヌクレオシド(4'-AA.

2'-OMe-Nt及び4'-AA·2'-F-Nt)をRecQL1-siRNAに網羅的に導入し、これらの遺伝子発現抑制能及びがん細胞殺傷能を測定することで、化学修飾RecQL1-siRNAのプラットフォームを構築することに成功した。その結果、4'-AA·2'-F-Ntは4'-AA·2'-OMe-Ntよりも、siRNAの遺伝子発現抑制能及びがん細胞殺傷能をより増強させることが明らかとなった。

組織特異性を誘導する各種リガンド並びに新規糖鎖クラスターを装着したsiRNAコンジュゲートの合成に成功した。合成したsiRNAのRNA干渉能を検証した結果、リポフェクタミンを導入剤として使う限り、リガンド修飾型及び糖鎖クラスター修飾型siRNAは、RNA干渉効果に於いて無修飾のsiRNAと差はなく、数nMで遺伝子の発現を抑制出来ることが確認された。また、siRNAコンジュゲートの体内動態評価に関しては、大腸がん移植モデルマウスを作製し、18F標識接合団を経静脈投与したときの放射能分布の経時変化を、PETイメージングとγカウンターを用いて評価した。その結果、18F標識接合団の移植腫瘍への特異的な集積は認めず、現在合成検討中の18F標識修飾siRNAコンジュゲート投与時の放射能分布がsiRNAコンジュゲートの組織分布を反映しうることが確認できた。

主な成果

原菨論戈

- K. Koizumi, Y. Maeda, T. Kano, H. Yoshida, T. Sakamoto, K. Yamagishi, Y. Ueno. Synthesis of 4'-C-aminoalkyl-2'-O-methyl modified RNA and their biological properties. Bioorg. Med. Chem., 26, 3521-3434 (2018).
- K. Nakamoto, Y. Akao, Y. Furuichi, Y. Ueno. Enhanced intercellular delivery of cRGD-siRNA conjugates by an additional oligospermine modification. ACS Omega, 3, 8226-8232 (2018).
- T. Kano, Y. Katsuragi, Y. Maeda, Y. Ueno. Synthesis and properties of 4'-C-aminoalkyl-2'-fluoro-modified RNA oligomers. Bioorg. Med. Chem., in press.

知的財産

・上野義仁, ヌクレオシド誘導体及びその利用, 特願2016-244916, PCT/JP2017/44995.

糖タンパク質バイオ医薬品の糖鎖の 高機能化のための解析・制御・管理システムの開発



横浜市立大学 大学院生命医科学研究科 教授

川崎 ナナ (Nana Kawasaki) 1984年北海道大学薬学部卒業、1986年北海道大学大学院薬学研究 科修了、1986年国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部研究員、1996年薬学博士取得、1996年米国Johns Hopkins大学客員研究員、2010年国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長、2015年より横浜市立大学教授(現職)

課題概要

抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品は、不均一なタンパク質分子の集合体である。不均一性を生じる要因として、糖鎖付加、脱アミド化、酸化、C末端プロセシングなどの品質特性がある。これらは製造方法に依存して変化し、医薬品の生物活性、安定性、体内動態、及び免疫原性などに影響を及ぼす可能性がある。そのため、これら品質特性を詳細に解析し、必要に応じて、制御または管理することが求められる。しかし、とりわけ糖鎖は構造が複雑で多様性が高いこと、データベースの整備が不十分であることから、解析・制御・管理は容易ではない。

本研究では、複数の品質特性を自動で解析・制御・管理できる『Multi-Attribute自動解析システム』の開発を目標とする。LC/MS/MSによるペプチドマッピングを基本技術とし、最も困難な糖鎖(主にN-結合型糖鎖)解析の自動化は、(1)効率的MSデータ取得のための糖ペプチド濃縮法開発、(2)自動解析のためのプログラムの作成、及び(3)シングルユースパーフュージョン培養システム(SUBP)で試験的に製造した抗体医薬品の糖鎖解析データを用いたデータベースの整備、により達成する。加えて、糖鎖解析と並行しながら、(4)高機能糖鎖製造が可能なSUBPを開発する。本研究の分担機関(略称、担当課題)は、日京テクノス株式会社(日京テク社、(1))、公益財団法人木原記念横浜生命科学振興財団(木原、(3)、(4))、株式会社横浜バイオリサーチアンドサプライ(YBRS社、(3)、(4))である。

本事業における成果概要

(1)効率的MSデータ取得のための糖ペプチド濃縮法開発

糖ペプチドのMSにおいてペプチドの共存は、イオン化抑制の原因となる。そこで、C18とセルロースの2層からなる糖鎖濃縮用チップ(G-TIP)を開発した。これにより、トリプシン消化物から数分でN-結合型糖鎖付加ペプチドを濃縮することが可能になった。図1は抗体のトリプシン消化物のトータルイオンカレントクロマトグラム(TIC)と糖ペプチド溶出位置のマススペクトルである。G-TIPにより、良好なマススペクトルの取得が可能となった。

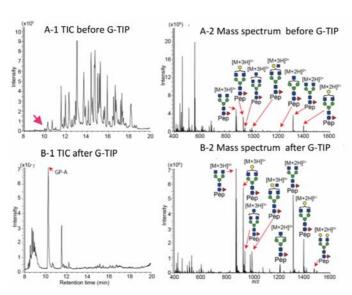


図1 G-TIP使用前後の抗体トリプシン消化物のLC/MS G-TIP使用前のTIC (A-1)、及び糖ペプチド溶出位置(約11分、赤矢印)のマススペクトル(A-2)には多数のペプチドに由来するピークが検出されている。G-TIP使用後のTIC(B-1)とマススペクトル(B-2) では糖ペプチドが主ピークとして検出されている。

(2) 自動解析のためのプログラムの作成

糖鎖を含む多数の品質特性を自動で解析可能なシステムを開発した(図2)。まず、糖タンパク質のトリプシン消化物のLC/MS/MS(Run1)により、主な糖鎖、脱アミド化、酸化、C末端プロセシングなどを解析する。つぎに、G-TIPで濃縮した糖ペプチドのLC/MS/MS(RUN2)により、糖鎖を詳細に解析する。RUN1及び2の結果は、解析結果リスト、定量グラフ、糖鎖推定構造を含むマススペクトルとして出力される。予め、糖ペプチドをエンドグリコシダーゼ処理し、生じたGlcNAc結合ペプチドのLC/MS/MS(RUN3)により、プリカーサーイオンリストを作成し、糖ペプチド選択的MS/MS(RUN2)を実施することで、複雑な糖タンパク質でも糖鎖解析が容易となる。

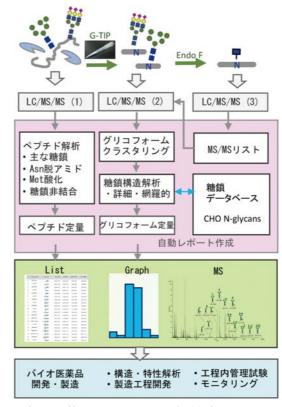


図2 バイオ医薬品Multi-Attribute自動解析システム 桃色部分:自動解析プログラム。ペプチド配列確認、糖鎖及び 分子変化 (Asn脱アシド、Met配化など) を解析・定量出来る。 黄緑:自動出力レポートの例、水色:バイオ医薬品開発・製造 における応用例

(3) 糖鎖データベースの作成

公開糖鎖データを用い、CHO細胞由来N-結合型糖鎖のデータベースを作成した。現在、SUBPで試験的に製造したトラスツブマブの糖鎖を解析し、データベースの拡張を行っている。(2)のプログラムと糖鎖データベースにより糖鎖構造推定の自動化が可能になった。(図3)

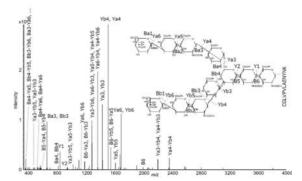


図3 糖鎖構造自動解析例 糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルと推定構造

(4) 高機能糖鎖製造が可能なSUBPの開発

高機能糖鎖製造が可能なSUBPを開発した(図4)。本装置は 0.1~25L培養が可能であり、20日間で生細胞密度 9×10⁷ cells/mLまで到達できる。現在、スケールアップと外挿性評価を実施中である。また、糖鎖修飾は培地の影響を受けることを明らかにし、SUBPに適した培地の開発を行っている。



図4 シングルユースパーフュージョン培養システム 左から右へ:培地タンク〜貯留用Bin(HI) 〜培養バッグ〜ハーベストタンク、左奥:グルコース、左手前:セルブリード用培地(LOW)、右端:セルブリード用タンク

主な成果

原著論式

1) Ohta, Y., Kameda, K., Matsumoto, M., Kawasaki, N.: Rapid glycopeptide enrichment using cellulose hydrophilic interaction/styrene-divinylbenzene StageTips. Mass Spectrom (Tokyo). 2017;6(1):A0061.

技術導出

1) 横浜市大:日京テク社と糖ペプチド濃縮カラム及び糖ペプチド濃縮方法のライセンス契約締結

2) 木原財団、YBRS社:極東製薬工業とパーフュージョン培養用培地の共同研究契約を締結

_ _

バイオ医薬品のマルチモーダル化による 可視化•定量技術開発



理化学研究所 生命機能科学研究センター チームリーダー 渡辺 恭良 (Yasuyoshi Watanabe)

課題概要

バイオ医薬品は、疾患ターゲットへの特異性が高いこと から効果が劇的であり、患者負担の少ない医療を実現す ると期待されています。その実現には、バイオ医薬品が 疾患部位に正しく集積し、機能を発揮していることを、複 数の画像計測技術手法を組み合わせることで可視化し、 高精度で定量することが重要です。

本研究では、複数のモダリティ(検査技術)を用いて、 生体内のバイオ医薬品の動態を観察する技術基盤を構築 することで、診断精度の高い可視化・定量計測技術を開発 します。さらに、バイオ医薬品に対して、診断と治療の両者 を担う複数の機能性分子を導入することで、診断と治療を 同一薬剤で行うセラノスティックスの実現を目指します。

複数の機能性分子をバイオ医薬品に導入するために は、既存の化学技術では十分と言えません。そこで本研 究では、必要に応じて、簡単に、確実に、迅速に、二つ以上 の化学修飾を、同時に、バイオ医薬品の同一箇所に導入す る技術を開発します(図1)。これを達成するために、我々 がこれまで開発してきた生体親和性の高い有機化学反応 であるクリック反応をさらに発展させます。具体的には、 同一分子内に反応性の異なる複数のクリック反応部位を 有する新規化合物であるマルチ・クリック・プラットフォー ム化合物を開発します。これを用いることで、バイオ医薬 品に対して、複数の機能性分子を簡単に、確実に、迅速に 導入する技術を開発します。

このプラットフォーム化合物に対して、治療用の薬剤を

康科学イノベーションセンター顧問を兼務。 導入することで、バイオ医薬品の性能を飛躍的に向上させ ることが可能となると期待されます。たとえば、最近で は、乳がん細胞を標的とした抗体に抗がん剤を結合させ た抗体薬物複合体(カドサイラ)が、手術不能または再発 乳がん患者に対して効果が認められています。本研究で

1976年京都大学医学部卒業、1980年京都大学大学院医学研究科博士

課程修了(医学博士)。1980年日本学術振興会奨励研究員、1981年京

都大学医学部附属病院検査部医員、京都大学放射性同位元素総合セ ンター助手、1984年大阪医科大学医学部医化学講師、1987年大阪バイ

オサイエンス研究所研究部長、1999年大阪市立大学大学院医学研究

科教授、2006年理化学研究所分子イメージング研究プログラムディレ

クター、2008年理化学研究所分子イメージング科学研究センター長、

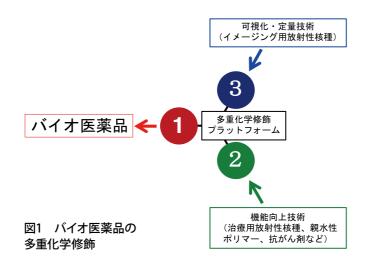
2013年理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター長、2017

年より理化学研究所健康活き生き羅針盤リサーチコンプレックス推進 プログラムプログラムディレクター(現職)。理化学研究所生命機能科

学研究センター健康・病態科学研究チームリーダー、大阪市立大学健

開発する多重化学修飾技術は、この次世代医薬品に対し て、抗がん剤だけでなく、イメージング用・治療用放射性 核種や薬物動態改善のための親水性ポリマーなどの複数 の機能性分子の導入を可能とします。

複数の機能性分子の導入には、マルチ・クリック・プ ラットフォーム化合物以外にも、クリック反応性部位を有 する機能性分子を設計・合成する必要があります。そ こで現在、プラットフォーム化合物の改良に加え、機能性 分子の設計・合成を進めています。様々なバイオ医薬 品に適用可能な技術基盤を構築し、グローバル競争に打 ち勝つ日本独自技術の創出を目指します。

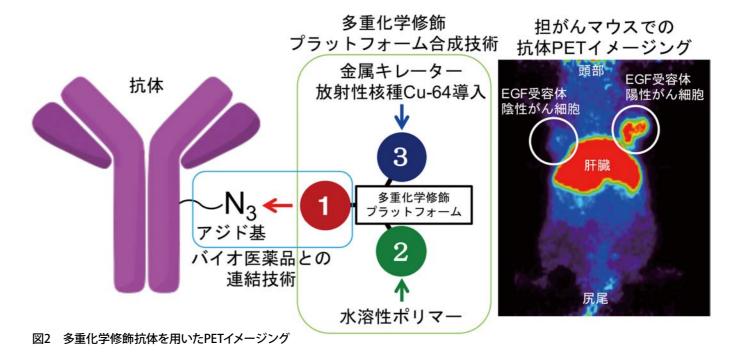


本事業における成果概要

我々独自のマルチ・クリック・ケミストリーをさらに 発展させ、応用することで、抗体などのバイオ医薬品に対 して複数の機能性分子を導入する技術の開発を進めま した。具体的には、異なる反応性を示すアジド基を複数 (3-4個)有するプラットフォーム化合物の設計と合成を 行いました。続いて、これらプラットフォーム化合物と反 応性アジド基を導入した抗体との連結手法の最適化を 進め、高効率でのプラットフォーム・抗体間の連結技術 を確立しました。さらに、様々な機能性分子をプラット フォーム化合物へ導入するための分子の合成を達成する と共に、プラットフォーム化合物自身の水溶性の向上を目 指した検討も進めました。また、プラットフォームに「切 断」の機能を付加するために、光照射により結合切断が 起こるリンカー化合物の開発を行い、ある種のホウ素化 合物が開裂部位として有望であることを見いだしまし

た。これに合わせ、ホウ素化合物の新規合成法も開発 しました。

マルチ・クリック・ケミストリーによる多重化学修飾技 術の有用性を立証するため、がん細胞を移植したマウス (担がんマウス)を用いたPETイメージングを実施しまし た。まず、金属キレーター部位と水溶性部位の二つの機 能性分子を導入した抗EGF受容体抗体に対して、サイク ロトロンで製造したPET核種Cu-64を導入しました。この ようにして得たCu-64導入多重化学修飾抗体を担がんマウ スに投与し、その体内動態をPETイメージングにより解析 したところ、抗体がEGF受容性陽性のがん組織に特異的 に集積することが確認されました(図2)。この結果は、多 重化学修飾技術の抗体PET診断への応用可能性を示唆 しています。さらに、多重化学修飾抗体の水溶性がその 生体内動態に影響することを明らかにしました。この結 果を基に、プラットフォームの水溶性化に向けた化合物設 計へと情報のフィードバックを行っています。



主な成果

原著論文

1. Convergent synthesis of trifunctional molecules by three sequential azido-type-selective cycloadditions, Yoshida S, Kanno K, Kii I, Misawa Y, Hagiwara M, Hosoya T, Chem Commun, 2018, 54(30), 3705–3708.

- 2. Staudinger reaction using 2,6-dichlorophenyl azide derivatives for robust aza-ylide formation applicable to bioconjugation in living cells, Meguro T, Terashima N, Ito H, Koike Y, Kii I, Yoshida S, Hosoya T, Chem Commun, 2018, 54(57),
- 3. Transient Protection of Organic Azides from Click Reactions with Alkynes by Phosphazide Formation, Meguro T, Yoshida S, Igawa K, Tomooka K, Hosoya T, Org Lett, 2018, 20(13), 4126–4130.

全身・臓器丸ごとイメージング技術によるバイオ医薬品の時間的・空間的な体内動態可視化技術の開発

東京大学 大学院医学系研究科 教授

上田 泰己 (Hiroki Ueda)



2000年東京大学医学部卒業、2004年同大大学院医学系研究科修了。2003年理化学研究所システムバイオロジー研究チームチームリーダー、2009年同プロジェクトリーダー、2011年生命システム研究センターグループディレクターを経て2013年より東京大学大学院医学系研究科教授。同大大学院情報理工学研究科システム情報学専攻教授、ニューロインテリジェンス国際研究機構主任教授、理化学研究所生命機能科学研究センターチームリーダー、大阪大学客員教授等を兼務。「細胞を創る」研究会会長(2008年)、さきがけ「細胞機能の構成的な理解と制御」研究領域総括(2011年-218年)、時間生物学会大会長(2015年)、日本学術会議若手アカデミー代表(2015年-2018年)。第15回山崎貞一賞(2015年)、第4回イノベーター・オブ・ザ・イヤー(2017年)、第50回市村学術賞功績賞(2018年)等を受賞。

課題概要

本課題の研究チームでは、固定組織を高度に透明化し てインフォマティクス解析に資する全組織レベルの3D蛍 光イメージングデータを取得し、異なるサンプル間の遺伝 子発現を定量的に直接比較するための世界最先端のパイ プラインである「CUBIC」法の開発に成功した(Susaki et al. Cell 2014; Tainaka et al. Cell 2014; Susaki et al. Nat Protocols, 2015: Tatsuki et al. Neuron 2016等)。 本手法は、1)世界最高性能の水溶性透明化試薬を用い て、2)マウス脳だけでなく、より大きなマウス全身などの サンプルに対して高速に、かつ1細胞解像度で3Dイメージ ングを行い、3)シグナル比較を行うための情報科学的解 析手法や、4)3D免疫染色や3D解剖学・病理学を通じた 解析パイプラインからなる。 さらに本技術は、CTやMRI、 PETと比較してマウス個体全身から細胞内局在に及ぶ広 い範囲で撮像できる点において際立った優位性があり、 全身における体内局在や作用結果を包括的に観察するこ とができるため、個々のバイオ医薬品の予期しない体内 局在や副作用に関する知見も同時に得ることができると 想定された。従って、個々のバイオ医薬品がどのような副 作用を誘発しうるかを開発段階で予想することが可能で あり、DDSとの組み合わせにより、副作用を未然に回避可 能なバイオ医薬品製剤開発の道を拓くことができる。以 上の背景から、本研究課題ではCUBIC法を用いることで 全身丸ごと透明化・イメージング技術によるバイオ医薬 品およびその作用結果の解析パイプラインの開発が可能 であると考えられた。

そこで本研究開発では、本研究チームがこれまでに開 発した臓器および全身丸ごと透明化・イメージング技術 CUBICを用いて、バイオ医薬品の分布やその生体応答の 時間的・空間的な変化を包括的に観察するための解析パ イプラインを構築することを目的とした。CUBICで用いて いる透明化試薬は、光の散乱因子である脂質を高度に除 去する性能に加えて、光を吸収するヘムを代表とする生体 色素を高効率に脱色する性質を有しているため、既存の 透明化技術と比較して、全身の様々な臓器に適用可能な 透明化試薬である。また、既に成獣マウスをハイスルー プットかつ1細胞解像度で全身丸ごとイメージングが可能 な大型シート照明型蛍光顕微鏡を整備している。このよ うに現時点で他の追随を許さない全身透明化・イメージ ング技術の優位性を最大限に活用し、世界でも未だ取り 組まれていないバイオ医薬品(生体高分子)の投与後の臓 器および全身局在動態やその生体応答の解析パイプライ ンの確立に取り組んだ。また、確立した技術について試 薬メーカーや製薬企業らへの技術導出、コンサルティング 契約等による社会実装を進めた。

本事業における成果概要

本研究課題では、1600以上の化合物を用いた大規模ケミカルスクリーニングを実施し、組織透明化の化学的な原理を追求するとともに、マウス全身を対象としたより高効率な組織透明化試薬の確立を目指した。さらに、大型

シート照明型蛍光顕微鏡を用いてマウス全身の1細胞解像度イメージングに成功するとともに、大容量データの運用体制を構築した。本体制構築により、転移癌モデルマウスの各種臓器における転移がん細胞の可視化、マルチカラーイメージング、時系列サンプリングによる医薬品投与効果(抗がん剤)の検証等、当初のメルクマークを全て達成し論文報告した(Kubota et al. Cell Reports 2017; Tainaka et al. Cell Reports 2018)。また、交配なしで遺伝子改変マウスを作製し解析に使用する「次世代マウス遺伝学」を確立し、レポーターマウスの高効率な作出体制

を構築・運用した(Susaki et al. npj Syst Biol App. 2017, Ukai et al. Nat. Protocols 2017他)。さらに当初達成予定を超えた取り組みとして、抗体医薬品そのものを観察対象とし投与後の全身分布を観察するための検討を行った。また、本課題遂行中に開発に成功した次世代の透明化試薬の国際特許出願を行うとともに、国内試薬メーカー、製薬企業等との技術導出に関わる契約締結を目指し、東京化成工業への特許ライセンスアウトによる試薬販売を開始する(URL: 図中2次元バーコード)とともに、国内製薬企業1社との共同研究契約の締結に至った。

CUBICによるバイオ医薬品の時間的・空間的な体内動態可視化技術の開発: 主要成果



主な成果

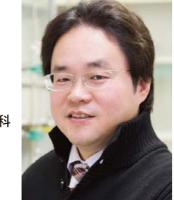
原著論文

- Whole-Body Profiling of Cancer Metastasis with Single-Cell Resolution. Kubota SI, Takahashi K, et al. Cell Rep. 2017, 20: 236-250.
- A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing. Murakami TC, et al. Nat. Neurosci. 2018, 21: 625-637.
- Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. Tainaka K, et al. Cell Rep. 2018, 24: 2196-2210. 他13点

技術導出

・CUBIC透明化試薬(第二世代)の東京化成工業への導出・市販化 他国内製薬企業との共同研究契約1件

ゼノ核酸アプタマー創薬基盤技術の開発



日本大学 大学院総合基礎科学研究科 教授

桒原 正靖

(Masayasu Kuwahara)

1994年岡山大学工学部卒業、1999年岡山大学大学院自然科学研究科修了博士(学術)、1999年岡山大学工学部非常勤講師、2000年米国バージニア大学 Postdoctoral Fellow、2001年群馬大学工学部応用化学科助手、2007年群馬大学大学院工学研究科助教、2009年群馬大学大学院工学研究科准教授、2013年群馬大学大学院理工学府准教授、2018年より教授(現職)、この間、2004年~2008年科学技術振興機構さきがけ研究者(兼任)

課題概要

化学修飾を導入したゼノ核酸アプタマーは、抗体を代 替する若しくは補完するレセプター分子として、米国 SomaLogic社を筆頭に、近年、急速に実用化研究が進め られている。それらのレセプター分子を組み込んだキッ トや計測機器(医療診断や食品・環境検査等)の製造販 売や、それらを利用した受託検査・測定サービス等への 波及、さらには、ゼノ核酸医薬品(治療薬や画像診断用プ ローブ、再生医療用バイオ試薬等)に特化したバイオベン チャーなどの創設等が期待されている。標的に対して特 異的に結合するレセプター分子を自在に創製する技術の 開発は、医療、食品、環境等、幅広い分野において、国民 の健康維持増進とQOLの向上への貢献が期待できる。 また、学術面でも、ゼノ核酸を用いたアプタマーやリボザ イムなど機能性核酸に関する研究は、現在、国際的に注目 度が高く、当該研究開発は、生命の起源や人工生命体の 創出、生命現象の総合的理解等への貢献も期待される。

核酸アプタマーは、標的を特異的に認識できる一本鎖のDNAやRNAであり、抗体と同様に治療薬や診断薬等への応用が期待されている。近年、バイオマーカー (標的)探索技術の向上により、がんや循環器系をはじめとするさまざまな疾患関連バイオマーカーが見出されている。また、アジア経済の発展やグローバル化に伴い、PM2.5に含まれる汚染物質や、輸入食品に含まれる農薬等の有害化合物、MERSコロナウイルス(中東呼吸器症候群)、デングウイルス(デング熱)、SARSコロナウイルス(重症急性呼吸

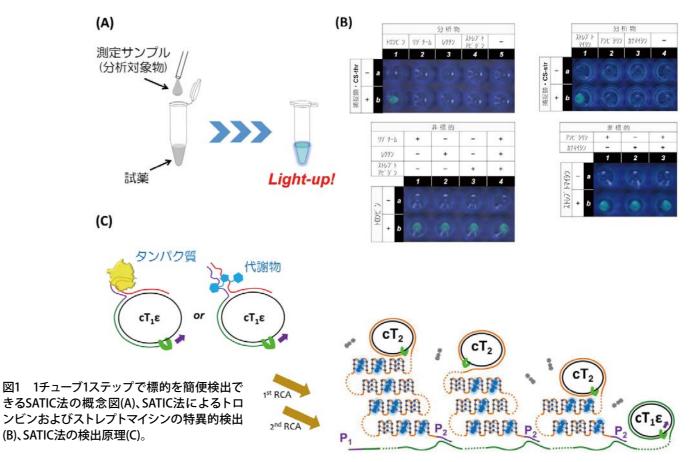
器症候群)等が、身近な脅威として迫りつつある。故に、それら標的の特異的検出や活性阻害に対する社会ニーズが高まっており、標的に対して特異的に結合するレセプター分子を自在に創製する技術の開発が急務となっている。さらに、人工レセプター分子の技術イノベーションにおいては、抗体にはできない核酸アプタマーならではの特長を発揮したアプリケーションの創出(実用性の実証)が求められている。

抗体はレセプター分子の代表格であるが、開発や製造 に高コストを要する。一方、核酸アプタマーは、安価に創 製できるだけでなく、標的に結合すると、多くの場合、その 高次構造が大きく変化することが知られており、その性質 を利用することによって、抗体にはない仕組みで特異的検 出や活性阻害を果たし得ることが、近年の研究で実証さ れ注目を集めている。さらに、分子レベルでの標的が明 らかになっていなくても、疾患因子である細胞やウイルス そのものを標的として、それらに特異的に結合するレセプ ター分子を作製できることも、核酸アプタマーのユニーク な特長である。そこで、我々は、生体内安定性(ヌクレアー ゼ抵抗性)に優れた糖修飾核酸アプタマーの創製法の確 立を目指すと共に、塩基修飾核酸と組み合わせることで、 DNAやRNAなどの天然型核酸アプタマーで懸案となって いる構造多様性の限界を克服したセレクション系を開発 し、治療薬への応用を指向したゼノ核酸アプタマー創薬 の基盤技術の創出を試みた。また、同時に核酸アプタ マーを用いた簡便検出系の構築と診断薬への応用につい ても検討した。

本事業における成果概要

超好熱始原菌Thermococcus kodakaraensis由来の耐熱性DNAポリメラーゼ(KOD DNAポリメラーゼ)を改変し、それらを用いて架橋型核酸(LNA: Locked Nucleic Acid)や塩基修飾核酸などを含む種々のゼノ核酸ライブラリーを調製することに成功した。それらのライブラリーから、アフィニティー・クロマトグラフィーや非平衡キャピラリー電気泳動、セルソーターなどを用いた試験管内選択法によって、標的に親和性を示す配列の濃縮を検討したところ、共通配列をもつゼノ核酸アプタマー候補群を見出すことができた。それらの結合親和性についてはセレクション系の改良も含め検討中であり十分な結果は得られ

ていないが、これは、標的結合性による選択効果よりも、選択されたゼノ核酸鎖からDNA鎖への逆転写反応とその増幅反応における配列依存性の効果の方が大きかったためと考えている。また、核酸アプタマーを用いた簡便検出系では、測定サンプルと検出試薬を混ぜて37℃下で暫く放置しておくだけで、標的があれば蛍光を発するというSATIC(Signal Amplification by Ternary Initiation Complexes)法を考案した。本法は、細菌やウイルスの遺伝子の検出や疾患に関わる変異の検出が可能であるが、当該検出系に核酸アプタマーを標的認識分子として導入することで、タンパク質や代謝物など非核酸分子のバイオマーカーも検出できるため(図1)、術中迅速診断や在宅検査など診断医療分野において幅広い用途が期待される。



主な成果

原著論文

- 1. Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures-based affinity separation and selective enrichment of a long-length DNA aptamer. Hagiwara K, Kasahara Y, Fujita H, Kuwahara M*. *Aust. J. Chem.*, 2016, 69(10): 1102–1107.
- 2. Specific light-up system for protein and metabolite targets triggered by initiation complex formation. Fujita H, Kataoka Y, Nagano R, Nakajima Y, Yamada M, Sugimoto N, Kuwahara M*. *Sci Rep.*, 2017, 7(1): 15191.
- 3. Selective incorporation of foreign functionality into fibrin gels through a chemically modified DNA aptamer. Fujita H, Inoue Y, Kuwahara M*. *Bioorg Med Chem Lett.*, 2018, 28(1): 35–39.

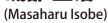
企業導出

1件(製薬企業)

細胞内がん抗原を標的とする T細胞受容体様抗体の効率的取得法の開発

富山大学 大学院理工学研究部(工学) 教授

磯部 正治





1979年 富山大学薬学部製薬化学科卒業、1981年 富山医科薬科大学 大学院薬学研究科博士前期課程修了、1984年3月富山医科薬科大学 大学院薬学研究科博士後期課程修了、1984年薬学博士、1984年3月 アメリカ合衆国Wistar研究所Carlo M. Croce研究室において特別研究 員、1988年富山医科薬科大学 和漢薬研究所 助手、1994年4月富 山大学工学部化学生物工学科 助教授、1997年4月 学科改組に伴い 富山大学工学部物質生命システム工学科 助教授に所属変更、1999 年4月 富山大学工学部物質生命システム工学科 教授、2006年4月 三 大学の統合改組により富山大学大学院理工学研究部 教授、現在に 至る

課題概要

がん細胞のみで発現する「がん抗原」や、がん細胞と正 常細胞で発現するものの、がん細胞で遙かに高い発現が 観察される「がん関連抗原」は、これまでに数百種類以上 明らかにされている。ところがこれら、がん抗原やがん関 連抗原の大半は、細胞内でしか発現せず細胞表面におけ る発現が認められないことから、治療用抗体の標的分子 として適さないとこれまで考えられてきた。しかし、たと え細胞内タンパク質であっても、その一部分は抗原ペプチ

ドとして主要組織適合抗原 (MHC)クラスI分子との複合 体(pMHC)を形成することで 細胞表面に提示されること から、このpMHCを認識する T細胞受容体(TCR)様抗体 の利用に注目が集まってい る。TCR様抗体はpMHCの 抗原ペプチドとMHCの両者 を認識する必要があるため、 従来法では取得が極めて困 難であった。そこでわれわ れの開発した抗体取得プラッ トホームを応用することで、 TCR様抗体の確実な取得法 の開発を目指した。本プラッ トホームは右図に示すよう

に、(1)セルソーターを用いた抗原特異的抗体産生単一細 胞の分離、(2)懸垂液滴アレイ式磁気ビーズ反応 (MAGrahd)法と命名した独自開発の手法による、多数の 単一細胞からの5'RACE用cDNAの自動合成、(3)免疫グ ロブリン軽鎖ならびに重鎖可変領域の増幅、(4)標的配列 選択的連結PCR(TS-iPCR)法を用いた、一切の精製や大 腸菌を介さない抗体可変領域遺伝子断片の抗体発現ユ ニットへの選択的組込み、(5)得られた発現ユニットの培養 細胞への導入と発現というステップで構成され、合計わず か5日間の行程で抗原特異的な抗体を多数単離できると

細胞内がん抗原を標的とするT細胞受容体様抗体の効率的取得法の開発

コア技術

単一細胞由来高性能モノクローナル抗体取得システム

・最短4日間で抗原特異的モノクローナル抗体を取得可能

・多種類の候補抗体の中から使用目的に適した最良の抗体を選択可能

発現ユニット調製

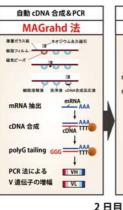
TS-iPCR 法

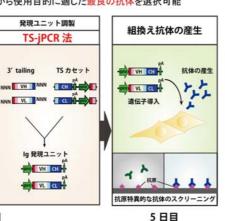
la 発現ユニット

VH CH

VL a







BMC Biotechnology 2011, 11:39 BMC Biotechnology 2011, 11:75 BMC Biology 2012, 10:80 Scientific Reports 2016, 6:25174 小胞体に基づく抗原特異的形質細胞の分離

netic beads Reaction through Arrayed Hanging Drops (MAGrahd)法 抗体産生単一細胞からの確実なcDNA合成

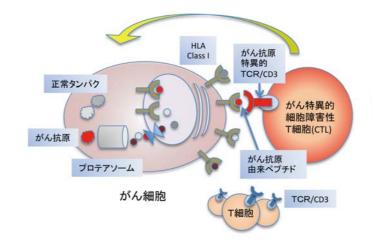
·Target Selective-joint Polymerase Chain Reaction (TS-iPCR)法 抗体可変領域遺伝子断片からの発現ユニットの迅速構築

いう特徴を有する。本研究課題では目的のpMHCに特異 的なTCR様抗体を発現する形質細胞の同定法を開発し、 細胞内がん抗原由来のpMHCを標的とするTCR様抗体 を取得し治療用抗体シーズの開発を目指すとともに、様々 な有用抗体を取得し、本技術や抗体に興味を示す企業に 対して抗体取得技術や得られた抗体の導出を行った。

本事業における成果概要

がん抗原に由来するペプチドとヒトMHCであるヒト白 血球抗原(HLA)との複合体(pHLA)で免役された動物か らのpHLAに特異的な形質細胞の同定法を開発した。こ の手法を用いて3種類の異なるがん抗原についてセルソー ターにより抗原特異的単一形質細胞を多数単離し、それ ぞれの単一細胞から抗体遺伝子を取得し培養細胞を用い て発現させ、得られた各抗体クローンについてELISA法 を用いて抗原との反応性を評価した。さらにTAP遺伝子 の欠損によりペプチドを乗せていない空のMHCクラスI

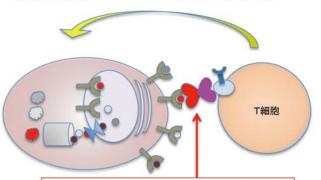
> がん抗原特異的 細胞障害性T細胞(CTL) による、がん細胞認識



分子を発現するT2細胞株に細胞外から種々の抗原ペプ チドを加えることで再構成した細胞表面pMHC分子に対 して、抗体の反応性を評価した。その結果、標的抗原ペ プチドを乗せたpMHCには反応性を示すが、非標的抗原 ペプチドを乗せたpMHCとは反応しない抗原特異的な TCR様抗体を、試した3種類のがん抗原の全てにおいて 多数取得することに成功した。得られた抗体クローンの 中から高い特異性と親和性を示したTCR様抗体クローン について、抗CD3抗体との二重特異性抗体、またはキメラ 抗原受容体(CAR)T細胞を作製し、T2細胞と固形腫瘍 由来のがん細胞株に対する細胞障害活性を解析した。 その結果、二つのがん抗原についてはin vitroにおける顕 著な細胞障害活性を示すTCR様抗体の取得に成功した。 担癌マウスを用いたin vivo における腫瘍抑制効果につい て現在解析を進めている。本手法はこれまで取得が困難 とされてきた多様なTCR様抗体の単離に適しており、細 胞内がん抗原を標的とした治療用抗体の開発に大きく貢 献すると考えられる。

TCR様抗体による がん治療

本研究ではTCR様抗体の効率的取得 法を開発し二重特異性抗体を作製



二重特異性抗体 (TCR様抗体+抗CD3抗体) Bi-specific T-cell Engager(BiTE)法

主な成果

1. Novel method for the high-throughput production of phosphorylation site-specific monoclonal antibodies, Scientific reports, Kurosawa N. Wakata Y. Inobe T. Kitamura H. Yoshioka M. Matsuzawa S. Kishi Y. Isobe M. 2016. 6, 25174.

知的財産

1. 抗原特異的モノクローナル抗体作製方法【発明者】黒澤信幸、磯部正治【出願番号】2017-534496

- 1. 本抗体取得システムに関する通常実施契約を、試薬・診断薬開発企業である株式会社医学生物学研究所(MBL)と締結した。
- 2. 本抗体取得システムに関する通常実施契約を、国内大手製薬企業と締結した。
- 3. 治療薬開発中の標的がん抗原に関連するツール用抗体を取得し第一三共に対して有償譲渡した。



国立研究開発法人 日本医療研究開発機構

創薬戦略部 医薬品研究課

〒100-0004 東京都千代田区大手町1-7-1 読売新聞ビル22F Tel:03-6870-2219 Fax:03-6870-2244 Email:kaku-bio27@amed.go.jp URL:http://www.amed.go.jp