

「新機能抗体創成技術開発」
事後評価報告書（案）概要

目 次

分科会委員名簿	1
プロジェクト概要	2
評価概要（案）	29
評点結果	35

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 研究評価委員会

「新機能抗体創成技術開発」(事後評価)

分科会委員名簿

(平成23年7月現在)

	氏名	所属、役職
分科会長	うへだ りゅうぞう 上田 龍三	名古屋市 病院局 局長
分科会長 代理	しゆく ひろし 珠玖 洋	三重大学 大学院医学研究科 教授
委員	こうろ たく 紅露 拓	独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 免疫応答制御プロジェクトリーダー
	なかにし あつし 中西 淳	武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 生物研究 所 リサーチマネジャー
	なかの ひでお 中野 秀雄	名古屋大学 大学院生命農学研究科 教授
	ひ の もとひろ 日野 資弘	アステラス製薬株式会社 生物工学研究所 所長
	ふるかわ ひでひこ 古川 秀比古	第一三共株式会社 研究開発本部 抗体医薬研究 所 所長

敬称略、五十音順

プロジェクト概要

作成日 平成23年 5月30日

制度・施策(プログラム)名	健康安心イノベーションプログラム						
事業(プロジェクト)名	新機能抗体創製技術開発	プロジェクト番号	P06009				
担当推進部/担当者	バイオテクノロジー・医療技術部 担当者 田伏 洋(平成23年4月現在) バイオテクノロジー・医療技術部 担当者 佐野 亨(平成19年4月～23年3月) バイオテクノロジー・医療技術開発部 担当者平井良彦(平成18年4月～19年3月)						
0. 事業の概要	本事業は、系統的な高特異性抗体創製技術及び高効率な抗体分離精製技術であり、具体的には、前者は(1)膜タンパク質及びその複合体等の機能を有した抗原の系統的な産生技術開発(2)高特異性・高親和性・高機能性を有する抗体の効率的な創製技術開発(3)抗体を系統的に創製するための基盤技術及び創製された抗体の評価、後者は(1)タンパク質分子リガンド技術開発(2)高効率クロマト担体技術開発(3)溶出工程技術開発を行う。						
I. 事業の位置付け・必要性について	近年、抗体はポストゲノム研究に重要であるとともに、創薬や診断等への応用が期待されることから、幅広い産業利用が期待されるため、極めて重要なものとなっており、世界的にも研究競争が激化している。しかし、産業上有用と考えられるタンパク質やその複合体を特異的に認識する抗体を創製する際、抗原の産生が困難なことや、抗体の創製が免疫寛容等により困難であることが技術課題となっている。このため、こうした課題に対応し、創薬上重要なタンパク質やその複合体等の機能を有した抗原を系統的に産生する技術や、様々な膜タンパク質等を抗原として特異性が高く、機能性の高い抗体を創製する技術の革新が必要である。また、抗体の産業利用を促進するには、その高い製造コストが大きな課題となっていることから、抗体創製の基盤技術の開発に加えて、ダウンストリームにあたる抗体製造プロセスにおける技術革新も同時に必要となる。具体的には、抗体の製造コストの低減を図るべく、抗体の分離・精製技術について高純度精製化、高機能化、低コスト化の技術革新が必要である。これらの技術革新により抗体を活用した研究や創薬、診断を加速し、ポストゲノム研究の産業化を促進することが重要である。 そこで、本研究開発は、創薬等のポストゲノム研究の産業化において重要と考えられるタンパク質やその複合体等について、タンパク質を抗原として特異性の高い抗体を系統的に創製するための抗原産生技術、抗原提示増強や免疫寛容回避等の基盤技術の開発及び抗体の分離・精製を効率化するための技術を開発することを目的とする。 これら一連の技術を開発し、統合的に利用することは広く国民の利益に資する基盤的研究であり、国(NEDO)の積極的な関与が必要なものと考えられることから、今後、世界に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題であり、個の医療を通じて健康寿命の延伸、QOL(Quality of Life: 生活の質)の向上を図る目的で行われる「健康安心イノベーションプログラム」の一環として本プロジェクトを実施する。						
II. 研究開発マネジメントについて							
事業の目標	産業利用上重要なタンパク質やその複合体等を特異的に認識できる抗体を系統的に創製するための技術を開発し、産業上有用なタンパク質を生体内における機能を有した状態で500程度産生する。さらに、これを抗原として産業上有用な機能を有する抗体を50程度取得することで、技術の有用性を評価する。また、抗体の製造コスト低減に向けた抗体の分離・精製等を高効率に行う技術を開発し、既存のProtein A クロマト担体の適用が困難な抗体(回収率 50%以下)の抗体回収率を70%以上に向上する技術を開発する。						
事業の計画内容	主な実施事項		H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy
	系統的な高特異性抗体創製技術	①膜タンパク質及びその複合体等の機能を有した抗原の系統的な産生技術					
		②高特異性・高親和性・高機能性を有する抗体の効率的な創製技術					
		③抗体を系統的に創製するための基盤技術及び創製された抗体の評価					

	精製技術 高効率な抗体分離	④ICOS法を用いた癌治療用ヒト抗体単離技術開発						
		⑤オリゴクローナル抗体創製技術開発						
		①タンパク質分子リガンド技術開発						
		②高効率クロマト担体技術開発						
		③溶出工程技術開発						
開発予算 (会計・勘定別に事業費の実績額を記載)(単位:百万円) 契約種類: ○をつける (委託(○) 助成() 共同研究 (負担率 ()	会計・勘定	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy	総額	
	一般会計	1235	1128	948	854	408	4573	
	特別会計							
	総予算額	1235	1128	948	854	408	4573	
	(委託)							
	(助成) :助成率							
	(共同研究) :負担率							
開発体制	経産省担当原課	経済産業省産業技術環境局研究開発課 経済産業省製造産業局生物化学産業課						
	プロジェクトリーダー	18年度より21年度までは国立大学法人東京大学先端科学技術研究センター 児玉龍彦教授 22年度は独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター第六事業所 生物機能工学研究部門 巖倉 正寛 部門長 サブプロジェクトリーダー 藤田保健衛生大学 黒澤 良和 学長						

	<p>委託先(*委託先が管理法人の場合は参加企業数も記載)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・独立行政法人産業技術総合研究所 ・学校法人藤田学園(藤田保健衛生大学) ・協和発酵キリン株式会社 ・財団法人バイオインダストリー協会 <p>(参加機関:15社):(株)特殊免疫研究所、(株)ペルセウスプロテオミクス、(株)カイオム・バイオサイエンス、(株)島津製作所、(株)京都モノテック、あすか製薬(株)、興和(株)、中外製薬(株)、富士フィルム(株)、横河電機(株)、帝人ファーマ(株)、JSR(株)、AGCエスアイテック(株)、東洋紡績(株)、東洋紡バイオロジックス(株)</p> <p>(共同実施先):(財)癌研究会、東京大学先端科学技術研究センター、東京大学大学院新領域創成科学研究科分子医科学、東京大学大学院新領域創成科学研究科生命分子解析学、東京大学医科学研究所プロテオミクス研究部、京都大学再生医科学研究所、東京理科大学薬学部、東京理科大学基礎工学部、岡山大学工学部、広島大学大学院生物圏科学、広島大学大学院医歯薬学総合、国立循環器病センター、東北大学大学院工学研究科、大阪大学大学院工学研究科、徳島大学ソシオテクノサイエンス研究部、山口大学工学部</p>
<p>情勢変化への対応</p>	<p>ターゲットの枯渇等立案時に予想されなかった状況への対応を検討している。本プロジェクトで作製した抗体を厚生労働省のプロジェクトで診断、治療へ向けた研究材料とした研究を開始。独立行政法人への移行に伴い新設された、著しい成果を挙げているプロジェクトに対してプロジェクト予算とは別に追加的な資金を投入する「加速財源制度」を用いて、東京大学先端科学技術研究センターに対し追加資金の配分を行った。また平成20年度予算では、抗原の修飾を解析するために必須である高精度質量分析計を集中研に導入し、プロジェクトメンバーが使用できるようにした。平成18年度から19年度の2年間の契約であったが、20年度まで契約を延長し、さらに、22年度まで延長した。</p>	

	<p>(1) 中間評価での主な指摘事項</p> <p>① 総合評価</p> <p>本事業は、我が国の抗体医薬の国際競争力をリードしようとするものであり、医薬品産業、生命科学産業の発展に貢献する重要なテーマである。プロジェクトリーダーの卓越した指導力のもと、適切なマネジメントが行われ、ほぼ目標を達成する成果が得られている。抗体創製技術開発においては、省庁間連携による in vivo イメージング開発など新たな展開もある。一部の抗体では参加企業による抗体治療の治験が始まるなど、すでに実用化に近いものもある。抗体分離精製技術開発においては、中間目標を超える成果が得られており、要素技術の融合で実用化が見通される段階に達している。</p> <p>一方で、(指摘事項1) 本事業では様々な技術開発を同時進行的に行っているが、多くの抗体創製基盤技術の相互関係や抗体分離精製技術との関連などに不明確なところがあり、標的をしぼるとともにより効果的な連携を検討する必要がある。(指摘事項2) また、国内外の抗体医薬の開発と関連の知的財産など周辺状況も踏まえてプロジェクトを推進し、知財に配慮しつつ成果をより積極的に公開することが望まれる。</p> <p>(2) 指摘事項への対応</p> <p>① 指摘事項1への対応</p> <p>a) プレターゲティング技術を最先端研究へスピンアウトするとともに開発項目の絞り込みを行い、効率的な基盤技術の開発を推進。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・抗体を認識分子として用いるプレターゲティング技術については、プロジェクトの設定課題と異なる技術開発が重要であることから、最先端研究開発支援プログラム (FIRST プログラム) へ技術開発をスピンアウト。 ・バキュロウィルスを用いた抗体創製技術については、創製した抗体の製薬企業等への導出実績を生み出したことから、基盤技術としての開発はほぼ完了、4年度目をもって開発を終了。まだ製薬企業への導出実績のないファージやニワトリ系の抗体創製技術の開発に焦点を絞り、相互連携体制を強化し、基盤技術の開発を推進した。具体的には、癌研のゲノミクスの手法により見出された癌組織特異的に発現する細胞膜タンパクに対する抗体作製を ADLib® axCELL システムにより行い、ELISA レベルで反応性を示したクローンを200個以上得ることに成功した。現在その他の手法により、ターゲットへの反応性の検証を続けている。 <p>b) 抗体創製技術開発と分離精製技術開発を連携し、効率的な基盤技術の開発を推進。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・22種類のニワトリ及びファージを用いて創製したヒト型化モノクローナル抗体を精製技術検用パイプラインとして用いそれを発現する CHO 細胞培養液から精製を行い、開発した精製技術の検証を行い、技術の有用性を確認した。 <p>② 指摘事項2への対応</p> <p>a) 生産実証を行なった抗体のプロジェクト参加企業以外での試用制度の創出・運用。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・生産実証の結果として得られたニワトリ及びファージを用いて創製した抗体について、その有用性の検討を製薬企業等が無償で試用する仕組みを構築し、抗体の提供を行なった。有用性の早期見極めに繋げるとともに、開発経験の浅いタイプの抗体創製技術の実用化促進への寄与を期待。 <p>b) プロジェクトで構築した抗体産生細胞を公的機関へ寄託し、研究資源へのアクセシビリティの確保と成果の積極的な公開を行なった。</p>	
評価に関する事項	事前評価	平成 17 年度実施 担当部 バイオテクノロジー・医療技術開発部
	中間評価	平成 20 年度 中間評価実施
	事後評価	平成 23 年度 事後評価実施

Ⅲ. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

1.1 系統的な高特異性抗体創製技術

①膜タンパク質及びその複合体等の機能を有した抗原の系統的な産生技術

GPCR を含む癌表面マーカータンパク質およびその関連タンパク質に対する抗体作製のため、抗原発現バキュロウイルス、定常発現細胞等を作製した。疾病のマーカー候補として癌、心血管疾患、精神神経疾患、骨運動器疾患、糖尿病等、計 165 種類 244 抗原を作製した。うち取得抗体数は 130 項目 558 クローンである。うち治療用抗体候補 6 種類、診断用抗体候補 6 種類を取得した。

G タンパク質共役型受容体(GPCR)に対するモノクローナル抗体(mAb)を効率的に作製するための大腸菌由来 Gro-EL を分子アジュバントとした改良 DNA 免疫法を確立し、機能性抗体を含む 10 種類の抗 GPCR mAb を作製した。

②高特異性・高親和性・高機能性を有する抗体の効率的な創製技術

末梢性免疫寛容の打破を目的として制御性 T 細胞(Treg)を除去した細胞を移入したマウスを免疫動物として、2 種類の自己抗原に対する抗体作製に成功した。B 細胞活性化促進作用を持つ蛋白質と目的抗原膜蛋白質を共発現するバキュロウイルスを免疫源として、2 種類の膜蛋白質に対する抗体作製に成功した。*in vivo*で Treg を特異的に除去できるモノクローナル抗体を樹立し、認識抗原を同定した。

抗 CD20 抗体の Fab 下流に Fc を 2 個ないし 3 個タンデムに連結した改変抗体を作製した。このタンデム Fc 型改変抗体は、天然型抗体よりも Fc 受容体に強い親和性を持ち、CD20 発現細胞に対して天然型抗体より約 100 倍強い ADCC 活性を発揮した。*in vivo*でも制がん活性は評価を開始したばかりであるが、低い投与量で治療効果を示した。

TNF α に対する受容体 TNFR2 に Fc をタンデムに連結した受容体-Fc 融合タンパク質(TNFR2-Fc-Fc)を作製し、TNFR2-Fc(Enbrel)と比較した。TNFR2-Fc-Fc は、TNFR2-Fc に比べて、Fc 受容体に対して強い親和性を示し、細胞膜上に TNF α を発現した細胞に強い ADCC 活性を発揮した。さらに、大腸炎モデルマウスにおいて、TNFR2-Fc-Fc は TNFR2-Fc の数十倍強い治療効果を示した。

再構築型無細胞蛋白質合成系 PURE system による高効率リボソームディスプレイ(PURE RD)を確立した。このシステムにより、scFv、Fab、スクヤフォールドの選抜系を開発した。また、抗原の調製法として、脂質を共存させた PURE system による膜蛋白質合成システムを構築した。

界面活性剤にはアミノ酸系界面活性剤である C12-Glu、希釈時における凝集抑制剤として Arg-HCl を添加すること、希釈方法を多段階とすることにより、顕著な巻き戻し効率を得た。これらは、アミノ酸自身が持つ蛋白質水和構造の安定化作用と、界面活性剤が持つ吸着能、蛋白質の折り畳みにより自発的に脱離する活性剤の選択が鍵となった。本手法により、scFv はもとより、Fab、scFv-SA、scFv-SAc core、scFv-Fc の巻き戻しが可能となった。

抗原 A 発現バキュロウイルスを用いた ADLib システムによって抗原 A に対して特異的に反応する抗体の作製に成功した。最終年度は癌研究会との共同研究を進め、癌研究所で見出された癌特異的発現抗原 RCAA-01 に対する抗体作製を ADLib システムによって実施し、特異的に反応する抗体が得られ、現在、癌研究所において免疫組織染色による抗体の反応性を検証中である。

変異機能の ON/OFF 制御可能なニワトリ B 細胞株 DT40-SW を用いて、効率的な抗体作製システムを開発することに成功した。このシステムは抗体の取得のみならず、任意の抗体の遺伝子を導入して機能改変するのにも応用可能である。

ニワトリモノクローナル抗体作製技術の高度化と複数の有用抗原に対する抗体作製、ニワトリ抗体のキメラ抗体化、ヒト抗体化などの実験を行い、優れた抗体の作製・改変に成功した。

③抗体を系統的に創製するための基盤技術及び創製された抗体の評価

新たな標的分子探索のため、従来蓄積してきた長鎖オリゴアレイによる遺伝子発現プロファイルデータからの抗体候補遺伝子抽出システムの構築を行い、12 種のがんの解析から 85 個、がん幹細胞から 15 個、合計 100 個の新規抗体候補分子を同定した。乳がんと膵がんにおいて 9 個のエクソスキップと 6 個のがん特異的融合遺伝子を同定した。抗体作製用のマウスは 6 種を作製した。さらに合計 39 株の膵がんまたは乳がんの

ジェノグラフトを樹立し、新規抗体の体系的評価システムを構築した。

1.2 高効率な抗体分離精製技術

下記の成果を統合化することにより、抗体の製造コスト低減に大きく寄与でき、且つ、既存の Protein A クロマト担体の適用が困難な抗体(回収率 50%以下)の抗体回収率を 70%以上に向上する技術を開発した。

抗体結合性を有する新規タンパク質の設計・創製技術の開発、多品種の抗体分子に対応可能で、結合・解離特性の優れたタンパク質分子リガンドを迅速・安価に提供するための設計技術、合成技術、評価技術の観点から行き、低コストで且つ効率の良い配向制御固定化を可能にするアフィニティリガンドの基本配列様式を開発し、これをプラットフォームとし、各種抗体に対応できる骨格配列を収集することにより、一次ライブラリーを作製した。一次ライブラリーの中から高親和性を示した 3 種類の骨格配列について、網羅的アミノ酸置換を行い、2 次ライブラリーを作製した。

多数のリガンド IgG 結合特性を同時に評価できる固定化リガンドのハイスループット分析装置と、多数の溶媒に対する特定のリガンドからの IgG 溶出パターンを順次測定できる装置を開発した。凝集検出技術に関し、抗体試料の FTIR スペクトルを、新規方法を使用して統計学的に分析した。

商業スケールでモノクローナル抗体を高効率に精製するため、化学的安定性を有するシリカ担体を開発し、cGMP 準拠の製法を確立した。リガンド評価装置用として、ガラス板上薄層モノリスシリカゲル、およびマイクロサイズモノリスカラムを開発し、品質の安定した製造技術を確立した。

IgG 様抗体を生産する 3 種類の CHO 細胞ラインを構築し、無血清培地で培養した。また、動力学的パラメータと抗体多様性を、構築したレクチン結合アッセイを使用して小規模フェドバッチ培養で評価した。

24 種類の人もしくは人型モノクローナル抗体を精製技術検証用パイプラインとして用いそれを発現する CHO 細胞培養液から精製を行い、開発した精製技術の検証を行い、技術の有用性を確認した。

1.3 ICOS 法を用いた癌治療用ヒト抗体単離技術開発

本研究開発は、創薬等のポストゲノム研究の産業化において重要と考えられるタンパク質やその複合体等を抗原として、高特異性・高親和性・高機能性を有する抗体を系統的・効率的に創製するための基盤技術を開発することを目的としている。我々は、ファージディスプレイ技術を用いて巨大なヒト抗体ライブラリーを作製し、そのスクリーニング法を開発してきた。我々の作製した AIMS ライブラリーは、臍帯血、扁桃、骨髓細胞、末梢血由来の B 細胞を用いて、さらにライブラリー作製に際しては H 鎖ライブラリーの大きさが独立したクローン数にして 10^8 以上、L 鎖のライブラリーサイズが 10^6 、それを組み合わせて 10^{11} の巨大抗体ライブラリーからなる。これより巨大な抗体ライブラリー作製は、その多様性を保ったまま操作できないという点で、現実的方針とはなり得ない。そこで多様性という点ではほぼ理想的なナイーブヒト抗体ライブラリーである。有用な抗体を単離する目的を達成するために、いかにして抗体ライブラリーを作製するかと並んで重要な点は、どのように目的とする抗原に特異的に結合するクローンを単離するかであり、ライブラリーのスクリーニング法である。本プロジェクトで対象としている癌特異抗原は細胞膜タンパク質なので、様々な抗体を含むファージ抗体ライブラリーと生きた癌細胞株を混合してしばらく放置すれば、細胞膜上で抗原抗体複合体ができるはずである。そこでそれを遠心して細胞を集めれば、細胞膜上のタンパク質に結合する様々な抗体が網羅的に回収できると期待される。我々を含めて、この操作により抗体単離を多くのグループが行った。結果は極めて不満足なものであった。得られる抗体は、特定のクローンに偏っており、さらにその抗体の抗原結合力は一般的に低かった。我々が本プロジェクトに採用された時、すでに ICOS (isolation of antigen/antibody complexes through organic solvent) 法の開発に成功していた。ICOS 法の開発は、生きた細胞の膜上に存在する様々な膜タンパク質分子に対して、それぞれ特異的に結合する抗体を多数かつ網羅的に単離することを可能にした。その結果、従来抗体単離に用いられる研究戦略とは逆の研究方針が可能となった。たとえば癌治療用抗体を開発する目的で研究を開始するグループは、まず標的分子を選択する。その次にモノクローン抗体単離を実施する。我々は、最初に癌細胞膜上に存在する様々なタンパク質に対する抗体を多数単離する。その次に手術で摘出した癌組織を用いて個々の抗体について免疫組織染色 (IHC) を行い、癌特異的染色像を与えるクローンを選別する、そののち癌特異的染色像を与えた抗体が認識する抗原を決定する。本プロジェクトはこの研究戦略に基づき、

体系的かつ大規模に実施された。

我々の作製した AIMS ライブラリーを用いて癌細胞と混合し ICOS 法でスクリーニングすると、一種類の癌特異抗原に対して 10 種類以上の様々な部位に特異的に結合するモノクローナル抗体を単離できる。本研究で対象とした癌特異抗原は、癌細胞膜上に癌特異的に大量に発現している分子を同定すること、それと同時に抗体を単離することを目的としたので、ICOS 法は大きな威力を発揮した。

1.4 オリゴクローナル抗体創製技術開発

抗原 A モノクローナル抗体のパネルを作製し、抗体を混合した場合、どのような活性が増強されるか調べた。抗原 A については、特に CDC 活性が顕著に増強された。ヒト・マウスキメラ抗原を用いた解析から、抗体が結合するエピトープが重要であることが示唆された。一方で、最も CDC 活性を増強する抗体の組み合わせは、たとえば、ADCC 活性や細胞増殖抑制活性においても最強であるわけではなく、発揮したい活性によって組み合わせを検討する必要があることが分かった。さらに、抗原 A に対する抗体は 1/3 がアゴニスト抗体を示すことがわかったが、たとえば癌の治療を考慮し、オリゴクローナル抗体技術を用いた場合、いかにこのような活性を持たない抗体の組み合わせにより最大の薬効を発揮するかが重要となる。抗原 A の場合、アゴニスト活性の発揮による副作用を考慮した場合、3 種類のモノクローナル抗体を組み合わせることによって、抗腫瘍活性の効率的誘導と増殖促進抑制能を併せ持つ、オリゴクローナル抗体の作製が可能になると考えられた。

CDC 活性増強の作用機構を調べるため、結晶構造解析を行った。CDC 活性増強する Fab 単独、もしくは Fab と抗原複合体の結晶化条件を検討した。Fab については、結晶化に成功した。一方で、Fab と抗原の複合体の結晶化については、結晶は得られたものの解像度が低く、必要な情報を得ることができなかった。キメラ抗原への結合性から、エピトープは分かっているため、Fab の結合領域の構造から、蛋白質結合モデリングにより、抗原への結合様式を推定したところ、CDC の状況には、Fab の向き、距離、抗原の構造が関与することが示唆された。

抗原 A 以外に活性増強が観察されるか調べるため、抗原 A を含め計 10 種の抗原を免疫した。モノクローナル抗体を複数個取得できたもののうち、抗原 B, E, F については抗原 A と同様に CDC 活性の増強が観察されたが、抗原 A と同様に多数のマウスを免疫し、抗体のパネルを作製した。抗原 C については CDC 活性の増強は観察されなかった。抗原 A, B, E, F と抗原 C との違いから、CDC 活性増強には、抗原が持つドメイン構造が重要であることが示唆された。

本研究により、抗体を混合することにより活性が著しく増強する場合があることがわかり、その活性は、エピトープや抗原の構造的長に依存する可能性が示唆され、医薬品としてオリゴクローナル抗体を開発する上で重要な知見を得ることが出来た。

2. 研究開発項目毎の成果

2. 1. 系統的な高特異性抗体創製技術

① 膜タンパク質及びその複合体等の機能を有した抗原の系統的な産生技術

①-1 抗体創製のためのバキュロウイルスを用いた膜タンパク質及びその複合体の発現技術開発

がん表面マーカー候補を含む 8 種類の GPCR についてリコンビナント BV (buddedvirus:発芽型バキュロウイルス)を作製し発現を確認した。心血管疾患および骨代謝等に関与する GPCR の stable 発現系細胞 4 種類を樹立した。また GPCR 4 種類について KO マウスを入手し、gp64 トランスジェニックマウスと交配し、免疫のための KO/gp64Tg マウスを作製した。細胞接着および修飾に関与する膜タンパク質の発現ウイルス 10 種類を作製した。

様々な疾病のマーカー候補として、癌関連(54種類)、心血管系疾患(45種類)、糖尿病(29種類)、精神神経疾患(17種類)、骨運動器疾患(10種類)その他核内タンパク質あるいはシグナル伝達複合体あわせて165種類244抗原で BV および gp64 フュージョン BV を作製した。

ウイルスの作製を Bacto-bac 法に変えたことで BV 調製に要する過程を平均3ヶ月から1ヶ月半に短縮できた。また、この方法では、トランスフォーメーション後 10 日前後で発現チェックができることから、発現のよくない抗原について、迅速に対応できるようになった。また、抗原タンパク質の発現が悪いものについて、抗原の長さを 30 アミノ酸まで

短くすることで発現を上げることができ、抗体の作製にも問題が無いことを確かめた。

修飾を受けたケモカイン受容体を認識する抗体を作製する方法として、修飾されていない受容体を発現した BV と修飾された受容体を発現した BV を ELISA プレートに固相した ELISA 法を確立し、これをスクリーニングに用いた。その結果、受容体の修飾部位を特異的に認識するモノクローナル抗体が得られた。

①-2 DNA 免疫法による GPCR など細胞膜タンパク質に対する抗体の作製法の開発

開発した分子アジュバントを用いた DNA 免疫法によって、GPCR のクラス A とクラス C に対する抗体を作製した。

1 回膜貫通型細胞膜タンパク質であるヒトの erb-B2 に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製した。また、機能未知の 2 回膜貫通型細胞膜タンパク質に対するポリクローナル抗体を作製した。

KO マウスを用いて、我々の確立した DNA 免疫を行うことでホモロジーが 99% であるラットの AT2R に対するマウスモノクローナル抗体を作製することができた。この抗体はヒトとマウスの AT2R を認識できる。

② 高特異性、高親和性、高機能性を有する抗体の効率的な創製技術

②-1-1 免疫寛容の打破とアフィニティーマチュレーションの促進による抗体産生能の増強

1) Treg 機能不活化作用を持つ抗 GITR アゴニスト抗体投与効果の検討

Treg 機能不活化作用を持つ膜タンパク質抗 GITR アゴニスト抗体投与群では、コントロール抗体投与群と比較して、血中抗体価の上昇が認められた。

Treg 除去細胞移入マウスに免疫することにより、従来は抗体作製が困難であった自己蛋白質抗原や自己蛋白質と相同性の高い抗原に対しても、抗体を作製可能であることが示された。

2) アフィニティーマチュレーションの促進による高親和性抗体作製技術の開発

B 細胞共刺激分子を介するシグナル増強の抗体産生反応への効果の検討: ROBO1 ディスプレイウイルスと B 細胞共刺激分子発現ウイルスを共免疫したマウスより得られたモノクローナル抗体は細胞上に発現するがん特異抗原蛋白と結合した。得られた抗体は、抗原ディスプレイウイルスのみを免疫して得られた抗体と比較して、より低濃度で癌抗原発現細胞に結合した。すなわち、native な構造の抗原を認識し、なおかつ抗原に対する親和性が高い抗体が得られた。

B 細胞活性化分子 BCSM ディスプレイウイルスの作製と、抗体作製への効果の検討: B 細胞活性化分子 BCSM の cDNA をマウス肝 cDNA ライブラリーよりクローニングし、バキュロウイルスエンベロープタンパク質 gp64 の膜貫通・細胞内ドメインと融合させて、BCSM をディスプレイする組み換えバキュロウイルスを作製した。ウイルス上にディスプレイされた BCSM が受容体結合活性を有することを、BCSM 受容体発現 B 細胞株を用いた FACS により確認した。BCSM と標的抗原膜蛋白質を共発現するバキュロウイルスをマウスに免疫した。2 種類の膜蛋白質に関して検討を行ったところ、いずれの場合にも抗体産生ハイブリドーマ形成数の顕著な増加がみられた。

②-1-2 外来抗原に対する特異的免疫応答の増強

1) 制御性 T 細胞を効率的かつ特異的に除去する方法の開発

免疫応答において、抗原特異的 Treg 細胞の抑制活性はより強化され、FR4 を標的にして、この強化された Treg 細胞を活性化 T 細胞と区別して除いたり抽出したりすることで免疫応答をコントロールすることができることが分かった。このように Treg 細胞を操作することにより、自己抗原もしくは種間で相同性が高い抗原に対しても抗体産生を効率よく誘導できる可能性が示唆された。

2) 制御性 T 細胞の機能をつかさどる転写因子に介入することで免疫抑制機能を解除する方法の開発

AML1/CBF β 複合体の Treg における重要性を示すと同時に、これら Treg 細胞で重要な役割を担う転写因子群を標的にすることが、新規の抗体産生誘導の手法となりうることを示した。

3) 胸腺と末梢での免疫自己寛容を操作したマウスの作製

Treg 細胞を除去するかその機能を阻害すること、さらに、胸腺での負の選択に異常のあるマウスを組み合わせることで、免疫自己寛容を打破することが可能であった。自己抗原と相同性が高いために従来法では作製が困難であった抗体の作製が容易になる可能性を示した。

②-2-1 抗体工学

②-2-1-1 PURE SYSTEM による小分子化抗体の改良と創製

1) PURE Ribosome Display の確立: 因子の調製法、特にリボソーム調製法の改良や、RD 反応条件の検討を行なった。その結果、大腸菌 S30 抽出液を使用した従来法に比べ、mRNA の回収率が 2 桁高い反応系の構築に成功し、PURE Ribosome Display (PRD) と名付けた。

2) PURE system を生かした scFv 選択系の確立: マウスナイーブ scFv ライブラリーから特異的な scFv の選択を行なった。その結果、1 回の選択で、DHFR 特異的な scFv を取得することに成功した。これにより、抗原調製から抗体選択まで PURE system を用いて迅速に行なう系が確立できた。

3) PRD を用いた無細胞エピトープマッピング法の開発および改良: 東京理科大学の増保教授のグループで取得されたモノクローナル抗体の提供を受け、PURE system を用いたエピトープマッピング法の開発を行い、リボソームディスプレイ法により抗体のエピトープを決定することが可能であることが示された。従来法と比較し、より迅速かつ簡便にモノクローナル抗体のエピトープマッピングができる方法へ改良することが出来た。このことにより、配列認識の抗体についてリボソームディスプレイ法によるエピトープマッピングが可能であることが示されたと言える。

4) 膜タンパク質合成系の確立: 通常の PURE system 反応液に NLP を添加して合成するだけで、合成されたモデル膜タンパク質が NLP に埋め込まれ、可溶性分子として存在できることを確認した。

②-2-1-2 変異導入と物理生物化学解析

児玉・浜窪グループで調製・構築される抗体の中で特にその医療への展開が期待され科学的に重要であると考えられる分子種 4 種類(抗体クローン#1、クローン#2、クローン#3、クローン#4)について、焦点を絞り、研究を進めた。

1) ターゲット抗体クローン#1について: 抗体クローン#1 は CDR 配列依存的に多量体化する傾向を有することが示唆された。また、ヒト型化 scFv-Fc でも大腸菌を用いた発現システムによる調製方法を検討したところ、やはり得られる分子種は多量体が優勢であった。

2) 新規ターゲット抗体クローン#2について: マウス由来モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから遺伝子を増幅、可変領域配列を決定し、Fv ならびに scFv について大腸菌を用いた調製システムを構築した。Fv は菌体内で封入体として発現し、一方、scFv は培地上清中に可溶性分子として発現した。scFv は、1.58 mg/1L 培地の高収率で均一分子種の単量体を得ることができた。

②-2-2 高特異性、高親和性、高機能性を有する抗体を用いた生体分子の細胞内局在解析

高特異性、高親和性、高機能性を有する抗体を用いた生体分子の細胞内局在解析を行うために、引き続き抗体の作製を継続した。抗原として gp64 融合タンパクをウイルス表面上に発現させたバキュロウイルスを用いた。得られた複数タンパクの複数エピトープに対する各クローンの評価を Western blot、細胞免疫染色によって実施し、各用途に最適なクローンを絞り込んだ上で、ハイブリドーマのクローニングと抗体の精製を実施した。

選択した抗体を用いて、内因性タンパクの局在が、成長因子刺激、細胞接着、細胞周期などに伴い変化するかを検討した。これらの中には、細胞周期特異的に細胞内局在を変化させるタンパク質が認められた。また解析したタンパク質の中には、プラスミドやアデノウイルスを用いた強制発現系による細胞内局在と内因性タンパク質の局在が異なるものが認められ、高特異性の抗体を作製した上で生体分子の機能解析を行うことの重要性が示された。

プロテオミクスへの着手: 細胞内局在や分子の修飾を受けるタンパクについては、そのような変化が他のタンパクとの相互作用によって生じていると考えられ、このようなタンパクについては、内因性結合タンパクを検討するために、磁気ビーズと共有結合させた抗体による免疫沈降と免疫沈降物の LC-MS で解析することとした。複数エピトープに対して抗体が得られている分子については、特異性および免疫沈降効率が最も高い抗体を比較検討して選択し、実験に用いる抗体を精製した。

②-2-3 強力なエフェクター活性または天然にないエフェクター機能を有する超活性抗体

抗 CD20 抗体の Fab 下流に Fc を 2 個ないし 3 個タンデムに連結した改変抗体を作製

した。このタンデム Fc 型改変抗体は、天然型抗体よりも Fc 受容体に強い親和性を持ち、CD20 発現細胞に対して天然型抗体より約 100 倍強い ADCC 活性を発揮した。*in vivo* でも制がん活性は評価を開始したばかりであるが、低い投与量で治療効果を示した。

TNF α に対する受容体 TNFR_{II} に Fc をタンデムに連結した受容体-Fc 融合タンパク質 (TNFR_{II}-Fc-Fc) を作製し、TNFR_{II}-Fc (Enbrel[®]) と比較した。TNFR_{II}-Fc-Fc は、TNFR_{II}-Fc に比べて、Fc 受容体に対して強い親和性を示し、細胞膜上に TNF α を発現した細胞に強い ADCC 活性を発揮した。さらに、大腸炎モデルマウスにおいて、TNFR_{II}-Fc-Fc は TNFR_{II}-Fc の数十倍強い治療効果を示した。

②-2-4 新規非免疫法による抗体作製

発芽バキュロウイルス発現系と ADLib[®] システムを組み合わせた膜タンパクに対する新規抗体作製法の開発

MACS[®] システムと FACS システムの組み合わせによるバキュロウイルスと DT40 細胞の相互作用の観察の系の確立を行った。その結果、バキュロウイルスと特異的に相互作用する DT40 細胞クローンの単離に成功し、これを用いたバキュロウイルスに反応する DT40 細胞を濃縮する系の確立に成功した。

浜窪グループより提供の細胞内因子 A の gp64 フュージョン型タンパクを発現するバキュロウイルスを用い、開発した磁気カラムおよびセルソーティングを組み合わせたセレクション系を用いて因子 A に対する特異的な抗体の作製を試みた。因子 A 発現バキュロウイルスと野生型バキュロウイルスを同時に用いて細胞染色する系を用いることで、因子 A に対して特異的に反応する抗体の単離に成功した。

癌研のゲノミクス的手法により見出された癌組織特異的に発現する細胞膜タンパクに対する抗体作製を ADLib[®] axCELL システムにより行い、ELISA レベルで反応性を示したクローンを 200 個以上得ることに成功した。現在その他の手法により、ターゲットへの反応性の検証を続けている。

②-3 DT40細胞を中心とした抗体創製技術開発

変異機能の可逆的 ON/OFF 制御が可能な DT40-SW 株を用いて、免疫寛容の制限の少ない抗体ライブラリーを構築した。

DT40-SW のライブラリーから、迅速に目的抗体産生クローンを単離する方法を確立し、AID 発現を OFF にすることにより、単離したクローンの抗原特異性を安定化できることを確認した。また変異機能の ON/OFF 制御と選択によって、親和性成熟による抗体の改良を行うことができることを確認した。

遺伝子変換、点突然変異の両変異機構を、XRCC3 の発現スイッチによって必要に応じて転換し、より効率的に親和性成熟を実施できる条件を確立した。内因性 XRCC3 遺伝子座の片方だけをノックアウトすることにより、親和性成熟に適した点突然変異型が得られることが分かった。

遺伝子ターゲティングにより、Pax5 の一方の遺伝子座をノックアウトし発現を低下させることで、形質細胞に特有の転写因子 Blimp-1、XBP-1 の発現が上昇し、抗体産生が約 2 倍に増加することを確認した。この方法は、一般にマウスハイブリドーマよりも抗体産生能の低い DT40 の抗体分泌量を増加させる技術として有用である。

②-4 ニワトリモノクローナル抗体作製技術を活用した免疫寛容回避等の基盤技術の開発

1) トリナイーブ抗体ライブラリー作製と既知の細胞融合用ニワトリ細胞株の改変

ニワトリナイーブファージ抗体ライブラリー (ライブラリーサイズは約 1.3×10^9 CFU) の作製に成功した。このライブラリーから種々の抗体クローンの作製が可能であった。

既知細胞株に IL-6 産生能を付加することで、融合効率の大幅な改善が達成されるとともに、従来法よりも安定して陽性ハイブリドーマを維持できるようにした。

2) トリ抗体可変領域のアミノ酸変異による親和性拡大技術の開発

ニワトリ抗体可変領域のある特定領域に変異導入することによって、抗体の親和性を高めること明らかにした。この変異は調べた限りの全ての抗体において親和性拡大に関与していた。

3) インテグリンおよび関連リガンド特異的ニワトリモノクローナル抗体の作製

種々のヒトインテグリンに特異的なニワトリモノクローナル抗体を樹立するとともに、これらの抗体のニワトリ・マウスキメラ抗体、ニワトリ・ヒトキメラ抗体およびヒト化抗体を作製した。併せて、ヒトインテグリン発現ニワトリまたはヒト細胞株の樹立に成功した。

4) 性のあるアポB特異的モノクローナル抗体および酸化LDL受容体 (LOX-1) 特異的モ

ノクローナル抗体の作製

アポB特異的ニワトリモノクローナル抗体の作製に成功した。

5) トリ・マウスキメラ抗体の作製とその安全性評価

304個の抗体を作製し、そのうちの幾つかについてはニワトリ・マウスキメラ抗体作製用ベクターを用いてニワトリ・マウスキメラ抗体を作製し、マウスへの投与実験を行い、マウスに対する免疫原性が極めて低いことを確認した。

③ 抗体を系統的に創製するための基盤技術及び創製された抗体の評価

③-1-1 機能ゲノム解析による標的探索技術の開発

1) 全エクソン発現データベースの構築とデータマイニング手法の開発

候補遺伝子に対してRACE(Rapid Amplification of cDNA End)法により変異転写産物の融合遺伝子の同定を進めており、2遺伝子について転座が確認されている。

2) 癌特異的発現遺伝子および癌特異的エピトープ候補の同定

いわゆる“トリプルネガティブ”乳癌(エストロゲン受容体陰性、Her-2 陰性)23例、スキルス胃癌23例、正常組織38検体を解析した。特異的発現遺伝子を探索した結果、腫瘍において高発現する新規分子を数種同定し、抗体作製に着手した。

③-1-2 有効な高機能医薬抗体作製システムの開発

高機能抗体の標的となる候補分子を同定する目的で、従来蓄積してきた各種ヒトがんサンプルに対してカスタムアレイ、U133P2アレイ、エクソンアレイによる遺伝子発現解析を行い、これを既に蓄積されている癌研がんゲノムデータベース中の発現プロファイルデータと併せて解析することにより抗体医薬標的分子候補の抽出システムを構築し、12種のがん(乳がん、大腸がん、大腸がん肝転移、食道がん、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、膵がん、肺がん、子宮体がん、卵巣がん、MFH、トリプルネガティブ乳がん)に関して先進的発現プロファイリングによる標的分子探索を行い、新規医薬抗体標的分子85分子を同定した。最も優位性の高い9分子に関しては抗体作製分子と決定し、乳がんまたは大腸がんに関する3分子については東京大学先端科学技術研究センターに遺伝子情報の提供を行った。残る6分子については遺伝子情報に加え当該分子のタンパク発現ベクターの構築を行いカイオム社に情報を提供し、カイオム社で抗体を作製した。

先進的発現プロファイリングにより医薬抗体標的分子候補を探索するため、エクソンアレイ(GeneChip Human Exon 1.0 ST array)を用いて、既に100例を超える数の発現解析を行った。また、解析と並行して臨床腫瘍検体の収集は16種のがんに対して継続中であり、このうち11種のがんについては、各100症例を超える数の検体の収集を終え、収集された総検体数は8948例にのぼる。

種を越えて広く保存されている標的候補分子については免疫寛容を回避するためにマウス発生工学を用いてこれらの標的候補分子を欠失したノックアウトマウスを作製し、このマウスを用いて標的候補分子に対する抗体作製を行う必要がある。そこで我々は、PCR法を用いて迅速にターゲティングベクターを作製するシステムを開発し、さらに、連続的に体外受精を繰り返すことにより迅速にノックアウトマウスを作製するシステムを開発した。このシステムを用いて、9種類の抗体標的候補分子についてノックアウトマウスの作製に着手し、現在までに6種類の抗体標的候補分子のノックアウトマウスを開発した。さらに、バキュロウイルス抗原発現系を用いた高機能抗体の作製を効率的に行うために、gp64トランスジーンを導入したノックアウトマウスの作製を3種類の抗体標的候補分子について完了した。

③-2-1 高親和性抗体を用いたターゲットプロテオミクスによる複合体解析

核内受容体に結合するコファクターの同定的手段として、培養細胞中で発現している内在性のタンパク質複合体を抗体を結合した磁性ビーズで免疫精製し、得られた複合体をショットガン法を用いた質量分析の手法で同定している。JSR社の開発した非特異的タンパク質低吸着な磁性ビーズと本プロジェクトで作製した高親和性抗体を用いることで内在性タンパク質を1万倍以上濃縮することが可能になり10cm dish1枚程度の細胞から複合体を同定している。

複数回のプロテオミクスにより測定したデータにより、同定ペプチドの上位3個の定量値(レファレンスをHNF4 α で求めた)を平均したものが免疫沈降でもとめた蛋白量とよく相関することから、ノンラベルのMS定量法として使用できることを示した。これにより、仮説として相互作用すると考えられている転写コアクチベーターやコリプレッサーの複合体を同定することができた。また、新規のコアクチベーター候補分子を複数同定した。

アルツハイマー症に深く関連すると考えられている γ セクレターゼ複合体は、プレセニリン、APH1、PEN2、ニカストリンの4種類の膜タンパク質によって構成される複合体

タンパク質で、アミロイド前駆体タンパク質や Notch タンパク質等を基質として、膜貫通領域にあるペプチド結合を切断するカルボキシルプロテアーゼである。γ-セクレターゼ複合体の構成成分の一つであるニカストリンの解析で γ-セクレターゼ複合体のプレセリニン、APH1 が同定された。

③-2-2 同定された標的タンパク質に対する系統的抗体作製技術の開発

1) 抗体作製

転写因子およびその構成するコファクター、あるいは癌・代謝性疾患にかかる関連タンパク質等プロファイリングされたターゲットタンパク質およびその部位特異的エピトープについて、130 項目で抗体を樹立した。バキュロウィルス発現系によるタンパク抗原として癌関連 55 項目、血管新生関連 28 項目、糖尿病関連 27 項目、骨運動器疾患関連 3 項目、筋萎縮症関連 10 項目、炎症関連 3 項目の計 130 項目樹立クローン数 538 クローンについて抗体作製に至った。

2) 抗体の寄託について

本新機能抗体作製プロジェクトにて作製した抗体および先行する FOCUS プロジェクトと NEDO タンパクチッププロジェクトにおいて作製した抗体については、参加企業の要請により製品化されているものあるいは今後製品化の予定のあるもの、特許の範囲にあるものを除いて、広く一般の研究者および抗体製品開発企業に活用されることを目的としてパブリックのリソースセンターに寄託することとした。理研バイオリソースセンターへの寄託を予定しており、まず前提条件のマイコプラズマ感染について、貯蔵室タンク別のチェックを行い、感染フリーであることを確認した。

2. 2 高効率な分離精製技術

2. 2-1 ステップ I (培養)における技術融合の進捗と成果

ステップ I(培養)は、新たな技術開発を行うのではなく、内外の大学、公的機関および製薬メーカー・創薬ベンチャーに対し、本プロジェクトの意義を説明し、医薬候補であるヒト型モノクローナル抗体の提供を頂き、提供を受けた遺伝子または抗体産生細胞を元に、抗体産生細胞の調製を行い、以降のステップ II,III において検証可能な抗体培養液をすみやかに供給することを主眼とするステップである。供給を受けた遺伝子または抗体産生細胞より、最終的に 3 種類(IgG1、IgG3、ならびに scDb-Fc (IgG1 型次世代抗体)のヒト型抗体を生産する CHO(Chinese Hamster Ovary)細胞を調製した。

現在上市されている抗体医薬にはサブクラス IgG の違いがあるが、IgG1 が最も数多く市販されている抗体医薬である。そこで、要素技術検証用標準プロセス／標準パイプラインとして成立しうるヒト型 IgG1 抗体として、組換えヒト抗 IL-8 IgG1 を選択し、この生産株について、工業生産に用いるレベルの抗体産生細胞調製に必要な安定株を得るための、細胞株のクローニング、高生産性候補株取得、さらには無血清馴化ステップまでの調製を行い、マスターセルバンク、ワーキングセルバンクを構築し、さらに小スケールでの培地最適化を行い、30L 培養槽にて培養を行い、培養上清を 2 回作製し提供した。

次に、次世代型抗体として、東北大学が構築、調製したリンパ球をがん細胞に標的化できる様な二重特異性を有している scDb-Fc (IgG1)抗体発現 CHO 細胞について、工業生産に用いるレベルの抗体産生細胞調製に必要な無血清培地への馴化、ならびに浮遊培養系への馴化を行い、マスターセルバンク、ワーキングセルバンクを構築し、さらに小スケールでの培地最適化を行い、30L 培養槽にて培養を行い、次世代型抗体を含む培養上清を 2 回作製し提供した。

さらにまた、3番目のパイプラインとして、通常条件では ProteinA への結合が弱い IgG3 タイプを選択した。製薬会社から提供された IgG3タイプ医薬品候補のヒト IgG3 抗体遺伝子を元に、2種類の発現ベクターを構築し、これを CHO 細胞に形質転換を行い、IgG3 抗体産生細胞株を構築した。構築した細胞株のクローニング、培地選択、無血清馴化を完了し、実際の工業生産に用いるレベルの抗体産生細胞の候補株を調製し、マスターセルバンク、ワーキングセルバンクを構築し、30L 培養槽にて培養を行い、培養上清を 1 回作製し提供した。

以上の 3 種類のパイプラインについては、CTD-品質に関する概括資料：新規生物薬品(原薬)のモックアップに準じて分離精製プロセスに至る前段階までの工程において、供給方法の標準化を行った。

さらに、「系統的な高特異性抗体創製技術開発」チームから提供される医薬候補のヒト型モノクローナル抗体(IgG1 生産株)について、発現ベクター構築、CHO 細胞へのトランスフェクションならびに、無血清培地への馴化、ならびに培養条件の検討を行い、そのうち、1 種類について 1L リアクタースケールでの回分培養を用いた培養原液の供給

方法を確立し、これについてもモックアップに準じた標準化を行った。

2. 2-2 ステップⅡ(精製)における技術融合の進捗と成果

ステップⅡ(精製)における技術融合は、アフィニティリガンドのライブラリー構築、リガンド・ライブラリーのハイスループットスクリーニング技術の開発、計算機を利用したリガンドの論理的改変、流動特性の優れた次世代型クロマト担体基材の開発、効率的リガンド固定化反応の開発、リガンドタンパク質およびクロマト担体基材の商業規模生産技術等の各要素技術開発の成果を受けて、(1)高性能な抗体精製用アフィニティクロマトグラフィー担体を開発し、それを用いて培養原液から医薬候補のヒト型モノクローナル抗体の精製を行い、実用化に向けた必要性能を評価するとともに、新たな開発指針を得て、各要素技術開発にフィードバックし、持続的な性能改良に資すること、(2)開発した精製技術の特性をより解析し、開発した技術の適用分野をさらに広げることにも貢献できるものと考えられる。

技術融合の成果のうち主なものとしては、アフィニティ担体構築のために、リガンド開発のハイスループット化に向けたリガンドアレイとその検出装置の開発、そこで得られた成果としてのプロトタイプリガンドである AIST-2、更にその改良型リガンドである AIST-3 の開発、プロトタイプリガンドである AIST-2 を用いた各種シリカ担体の開発、開発したアフィニティ担体を利用した実証パイプラインの構築などがあげられる。

アフィニティ担体を構成する要素としては、担体基材、固体化反応及びタンパク質リガンドの 3 通の要素があり、それらの要素技術を集合することにより、優れたアフィニティ担体を構築することができる。このうち、タンパク質リガンドの再デザイン技術については、新たな基本フレームを創出し、これをプラットフォームとし技術開発を行った。なお、このプラットフォームについては、本プロジェクト終了時点で、5 社に特許ライセンス(実施契約)という形で技術移転が行われた。

リガンド機能を担うタンパク質部分として、IgG 結合を示す各種タンパク質ドメインを公知データベースやコンピュータデザイン等により探索し、これをシステイン且つリジンフリー化し、それぞれ基本フレームに組み込み、これをタンパク質として発現生産することにより、一次ライブラリーを作製した。この一次ライブラリーを構成中に、すでに優れたアフィニティリガンド機能を発揮するものが見つかり、これをプロトタイプリガンド AIST-2 と命名し、その後の担体開発に用いた。一次ライブラリーに構成要素について、リガンド機能を発揮する部分について網羅的アミノ酸置換を施したものを作製し、これを二次ライブラリーと称した。作製した二次ライブラリーから、温和な条件でのモノクローナル抗体の溶出・回収特性に優れた性能を発揮できる改良型リガンド AIST-3 を見出すことに成功した。

二次ライブラリーを構成する各変異体タンパク質のリガンド機能を効率よく測定するために、アレイ解析装置を開発し、また、2 次ライブラリーを構成する各変異体タンパク質をアレイ化することによりリガンドアレイライブラリーを作製した。

開発したリガンドアレイライブラリーをアレイ解析装置で開発することにより、その特性を効率よく測定できた。この測定そのものは、原理的にはクロマトグラフィーを並列化(アレイ化)したものと考えられ、アレイ化したリガンドが示すアフィニティクロマトグラフィーとしての特性と効率よく測定できるものであった。この測定で得られた特性をパラメータ化し、中性における各リガンドが示す IgG との結合の強さ(Kd)と温和な条件である pH5 での溶出回収のしやすさを示す指標としての T0.5 の値とをプロットした結果、プロトタイプリガンドである AIST-2 の改良リガンドとして AIST-3 が得られた。

得られた AIST-3 をシリカモノリスに導入して作製したアフィニティカラムを用いて抗 IL8 モノクローナル抗体を発現する CHO 細胞の培養液を用いてクロマトグラフィーを行い、AIST-2 カラムと比較した。その結果、AIST-2 では溶出回収できない pH4.5 において容易に溶出回収できること、また、より温和な酸性である pH5.0 においても、定量的に溶出回収できることが示された。

プロトタイプリガンドである AIST-2 リガンドを用いて、多孔質性能の高度に制御したシリカ担体、固定化反応の高度制御技術の確立、担体基材上の未反応官能基の効率的マスク条件開発などの技術集積を行うことにより、プロトタイプではあるが、静的結合特性(80mg-IgG1/mL-bed 以上)および動的結合特性(保持時間 1 分未満の高条件において 40mg-IgG1/mL-bed 以上)としては世界トップの特性を発揮できる IgG 精製用アフィニティ担体(AIST-2 と名づけた)の開発に成功した。

この AIST-2 担体を用いて、実証パイプラインの構築を行った。実証パイプラインとしては、ステップⅠにおいて作製したモデルパイプラインと、A-チームで開発した高親和

で今後医薬候補品として期待が持てるものを選び、約 100mg の精製スケールを念頭に置き、培養液2から3L を一度に処理することを行った。この際、プロトタイプ担体の大量供給に制限により、1mL サイズのカラムを有効に活用することを試み、連続試料注入クロマトグラフィーの開発を行った。開発した装置を用い、アフィニティクロマトグラフィーとそれに引き続くポリッシングのためのクロマトグラフィーを組み合わせることで、高度に精製されたモノクローナル抗体を得ることができた。

結果的に、25種類の実証パイプラインを設定し、いずれも有効に精製を行うことができることを確認した。このようにして精製したモノクローナル抗体は、試用モニタリング用サンプルとして、希望する製薬企業等に提供した。

シリカモノリス基材は、超高速領域での流動特性に優れていることから、この特性を利用することにより、多くの抗体を迅速に精製できる精製システムとして活用できるようにすることを試み、婚ことを実現する担体として、スピнкаラムに組み込むことを行った。このことにより、迅速に実用化更に商品化が行われた。AIST-2 を導入したシリカモノリス担体をスピнкаラムに組み込むことにより、たった数分でサブミリグラム程度の抗体が高度に精製できる。

このように、開発した各種技術を融合することにより、実用化に向けた多くの成果が得られた。

2. 2-3 ステップⅢ(品質管理)における技術融合の成果

プロジェクト全体におけるステップⅢの役割は、「品質分析」のための技術開発と、精製抗体の「品質評価」による精製システムの検証である。「品質分析」に関しては、「抗体の分子多様性」と「変性・凝集による劣化」に焦点をあて、主に各機関が独立に要素技術を開発することで進めた。抗体の分子多様性に関しては、大阪大学が分析手法の高度化を、大津(TBI)分室(㈱東洋紡バイオロジックス)が実用的な評価系の改善を主に担当した。抗体の変性・凝集に関しては、東京大学が原理・機構の解明を、産業技術総合研究所が分析手法の高度化を、大津(TBI)分室(㈱東洋紡バイオロジックス)が実用的な評価系の改善を主に担当した。一方、「品質評価」に関しては、「実証パイプライン」として設定した医薬候補のモノクローナル抗体(研究開発項目①「系統的な高特異性抗体の創製技術開発」にて開発した新規抗体を含む)に関して、ステップⅠで調整した培養原液をステップⅡで精製することで得られた精製抗体の品質を評価することで、プロジェクトで開発した精製システムの性能を評価した。主に産業技術総合研究所が精製抗体の物理化学特性解析を主に東北大学が精製抗体の生物活性と保存安定性を評価した。また、それらの評価結果をステップⅠまたはステップⅡにフィードバックすることで、「培養時の分子多様性の恒常化」と「分離精製時の変性・凝集の低減化」を目指した。以下のそれらの成果と進捗の概略を列挙する。

抗体の分子多様性の品質分析に関しては、大阪大学を中心として、シアル酸糖鎖付加による抗体糖鎖の多様性を分析する手法の高感度化を進めた。Lectin Binding Assay を基盤とする微量分析法を構築し、100 μ L のサンプル量にて抗体糖鎖のシアル酸、フコース、ガラクトース修飾を定量的に評価可能な系を開発した。抗体の変性・凝集の品質分析に関しては、東京大学を中心として、酸性暴露とpH 滴定における凝集形成に関する基礎的な知見を蓄積した。酸処理後の抗体分子の変性・凝集化は、pH2.7 の酸処理の場合、劣化の程度が顕著であるのに対し、pH3.5 の酸処理ではそのダメージが大きく軽減することを明らかにした。アルギニンによる凝集抑制法の開発を行い、濃度、温度、pH、あるいはサブクラスに応じた凝集抑制条件を検討した。さらに、各種クロマトグラフィーの展開・溶出溶媒にアルギニンを用いた、効率的かつ定量性の方法を開拓した。また、抗体の変性・凝集の品質分析に関しては、産業技術総合研究所を中心として、赤外スペクトルを利用した分析手法の高度化を進め、50 μ L のサンプル量にて抗体溶液内の凝集の存在量を評価する系を構築した。これを用いて、28 種類の異なる溶媒に溶解した抗体の凝集性について解析し、最適な溶媒を探索するためのシステム開発の基礎とした。さらに、大津(TBI)分室(㈱東洋紡バイオロジックス)を中心として、サイズ排除クロマトグラフィーによる抗体の凝集評価の精度の向上を進めた。移動層の組成が変化するとクロマトグラムが変化することを明らかにし、ついで、実験計画法の一種である応答曲面法を利用して、もっとも鋭敏な応答を示す移動層の組成を決定した。

精製システムの検証としては、産業技術総合研究所が、「実証パイプライン」として得た 20 種類以上の精製抗体の物理化学特性解析を行った。マイクロチップ電気泳動法により純度を、赤外スペクトル法により構造安定性を、動的光散乱法により凝集性を評価した。また、ELISA 法により精製時にアフィニティクロマト担体からの脱離が危惧されるプ

ロテインAリガンドのリーク試験もあわせて行った。精製抗体の純度は大部分が99%以上で、開発した精製システムの高い性能が実証された。

また、リガンド・リーク試験により、測定したすべてのケースで自主的に設定したプロジェクト基準値(88ng/mg-IgG)を下回ることが確認され、開発したリガンド固定化技術と担体基材の有効性が実証された。構造安定性と凝集性の解析からは、分子のコンパクトさと微視的不均一性と構造安定性の3特性が相関することが示された。東北大学では、精製抗体の生物活性と保存安定性を評価した。その結果、次世代型抗体 scDb-Fc (IgG1)は、パイロットスケールで培養、精製されたものでも、その特徴的な二重特異性を定量的に保持していることが確認され、また、サイズ排除クロマトグラフィーにより、6ヶ月以上の長期保存安定性も確認され、開発した精製システムが精製抗体に対して好ましからざるストレスを与えるものでないことが証明された。

回収率の改善に関しては、産業技術総合研究所で開発に成功した温和な条件で抗体を効率よくできるアフィニティリガンドを組み込んだアフィニティカラムを利用することにより、抗体タンパク質にダメージを与えることの少ない温和な条件であるpH5.0で定量的溶出を達成し、従来ほとんど回収できなかった条件で90%以上の回収率を達成した。また、プロテインA型プロトタイプアフィニティ担体を用いて、「実証パイプライン」のパイロットスケールの培養液を系統的に精製したところ、用いた24種類のモノクローナル抗体のうち19種類に関して、80%以上回収率でアフィニティ精製が実施できることを確認した。

以上は、本プロジェクトの成果の顕著な技術優位性を表すものであり、先行技術に対して十分な市場競争力を有していることを示している。

2.3 ICOS法を用いた癌治療用ヒト抗体単離技術開発

① 抗原同定技術

我々の研究戦略は、「抗体の網羅的単離-クローンの選別-選ばれた抗体が認識する抗原の同定」と進む。すべての段階がある限られた時間で終了できる方法を開発してはじめて成立する研究戦略である。その様な目標を達成する技術開発および、その開発した方法を用いた研究の推進が本プロジェクトに課せられた任務である。本プロジェクトでは癌種を限定せずに、すべての固形癌を対象とすることとした。そこで最初は7種類の固形癌(肝癌、腎癌、膵癌、肺癌、大腸癌、胃癌、卵巣癌)を対象とし、途中から更に4種類(乳癌、前立腺癌、メラノーマ、グリオブラストーマ)を加えた。この癌種だけで、白血病を除く癌患者の90%を超える。49種類の癌細胞株を抗原としてICOS法で総数67回のスクリーニングを実施した。1回のスクリーニングで約200個のクローンを単離したので結果として約13,000個のクローンを回収した。個々のクローンについてはVH鎖について塩基配列を決定し分類した。それをすべてデータベース化し詳細に解析すると、独立したスクリーニングで単離されたクローン間で、まったく同じ配列のものが頻繁に見出され、結局数千数百種類の異なる抗体が単離されたことになった。第二段階はクローンの選別である。この段階は藤田保健衛生大学病院で癌治療を実施している多くの外科教室が本プロジェクトに全面的に協力・参加していることにより可能になった。癌標本の染色像は、次の4パターンに分類された。1. 癌特異的染色像、2. 正常細胞もある程度染色されるが、癌細胞膜の染色が際立っている例、3. 癌細胞も正常細胞も類似の染色像を与える、4. 癌細胞も正常細胞も全く染色されない例。癌特異的抗原を厳格に定義するならば、1のカテゴリーがそれに相当するが、1及び2も含めると、単離された抗体の約3分の1が、癌特異的発現をしている可能性が示唆された。個々の抗体が結合する抗原が判明したのち、多数の肺癌組織を用いて極めて体系的に免疫組織染色を実施したが、上記の分類でカテゴリー1と2は、大きく二群に分かれることと対応していた(後述)。ここからが第三段階となるが、癌特異的染色像を与える800種類を超えるモノクローン抗体が認識する抗原を同定するステップである。モノクローン抗体を有しており、その標的抗原が大量に発現している癌細胞株が分かっているので、抗体を用いた免疫沈降(IP)もしくはアフィニティークロマトグラフィーで抗原を精製すれば、後はマス(MS)解析で抗原を決定できるはずだとかなり安易に考えていた。研究を進める上で明確になってきたことは、マス解析でタンパク質を同定していると主張しているグループは多く存在するが、グループごとに決定できているタンパク質の使用量が、何桁ものレベルで相互に全く異なっていることであった。我々の大学では、多くの努力により500fmolあれば、対象が何であるか決定できる段階までマス解析の精度が高まった。その結果、次のようなステップを経ることにより抗原決定が可能となった。1. 様々な細胞株に対してフローサイトメトリー(FCM)を行って、対象抗原を大量に発現した細胞株を探す。2.

細胞膜上のタンパク質をビオチン化する。3. detergent を用いて細胞膜を溶かして、膜タンパク質を可溶化する。4. 抗体を用いてIPLし、標的抗原を回収する。5. サンプルを二つに分けて、SDS ゲル電気泳動(SDS-PAGE)によりタンパク質を分離する。6. 一方は、銀染色し、もう一方はストレプトアビジンを用いたウエスタンブロットを行う。以上の操作により、ウエスタンブロットで一本のバンドが得られて、そこに相当する場所に銀染色でバンドが見られればそれがマス解析の対象となる。ゲル内で直接トリプシン処理をして、ペプチドを溶出しマス解析でタンパク質を決定する。この一連のプロセスは、完全に確立した。ウエスタンブロットでバンドが数本検出される場合は、そのすべてについて解析した。マス解析の結果得られる抗原候補は複数であることも多く、更なる確認実験が必要であった。そのために候補膜タンパク質の膜外部分をポリペプチド鎖として組換えDNA技術により調製し、それと抗体の反応性を確認した。一部については標的タンパク質を膜上に強制発現して抗体との反応性を確認した。更に siRNA 技術を用いて抗体との反応性の消失も調べた。本プロジェクトで同定された癌特異抗原は、すべてこの手続きを経て同定・確認されたものである。

我々は、800 種類を超える抗体を有している。その一つ一つについてこのような操作を行っていけばいくら時間があっても足りない。この状況を打破するために二種類の技術開発に成功した。上記したように多くの抗原について、様々な細胞株を用いた FCM を実施する中で、そのパターンが相互に似ているケースが数多く存在することに気がついた。これは同じ抗原に結合している、もしくは同じ複合体を構成している成分を認識していることを意味するのではないかと推定された。このことによりFCMにより多くの抗体を分類する方法 GFC (grouping of clones by flow cytometry)の開発につながった。これは多数のクローンのマス解析を効率化するのにつながった。つまりこの方法の開発により、同一の抗原を認識する可能性の高い抗体を一度に処理することが可能になった。更に大量処理をより可能にしたのは、抗原確認のため調製したすでに同定された癌特異抗原の膜外部分に相当するポリペプチド鎖を用いた ELISA による各抗体の抗原決定である。上記した癌特異的染色像を与えなかったクローンも含めて、ICOS 法で単離されたすべてのクローン二千数百種類を対象に ELISA で標的抗原と結合するクローンを選び出した。この際にすべてのクローンを個別に ELISA すれば大量の精製抗原がプローブとして必要となる。それを96穴プレートにストックしたクローンを3種類の手法(三次元的に組み合わせる)で混合したサンプルに対して ELISA を行うことにより、限られた量の抗原でクローンを見つけ出す方法 SITE(simultaneous identification through three dimensional ELISA)法の開発に成功した。この方法が成功した理由は、混合した数十種類の抗体の中に一種類のポジティブクローンがあるか正確に判断できたことに基づいており、我々の単離した抗体の高い特異性及び強い結合力の裏付けがあったことから可能となった。

以上の三段階 抗体単離－抗体の選別－抗原決定、から成るプロセスが完全にシステムティックに機能することにより、表2に示すように、32 種類の癌特異抗原の同定と555 種類のヒトモノクローン抗体の単離に成功した。

② 機能制御抗体単離技術

動物を抗原で免疫することにより動物体内へ抗体産生を誘導させる従来法と異なり、ファージ抗体ライブラリーから特定の機能を有するクローンを単離するには、二つの条件を考える必要がある。1000 億種類のクローンから成るといってもライブラリーに含まれる抗体には限度があり、その中に入っていない抗体はいかなる方法を駆使しても得られない。ライブラリーをスクリーニングして抗体を回収する作業は、使用した抗原分子とファージ粒子上に存在する抗体分子の立体的相補性を基盤とした相互作用に基づく結合力で複合体が形成されるかどうかによって、クローンとして得られるかどうかが決まる。我々の場合は、癌治療用抗体単離を目標としており、抗原は生きた細胞上に存在する分子なので、結局は、前章に記した抗体単離により、いかに多数かつ多種類の抗体を得るかに始まり、単離した抗体群から、いかにして使用目的に合致したクローンを選び出すかが高機能性抗体を得るかの課題となる。我々の採用した研究戦略の有用性を示す例を先に示す。CADM1/IGSF4 分子は癌抑制遺伝子として注目されていたが、我々の本プロジェクトによりこの分子が癌で大量発現している例も相当高頻度に存在することが判明し、その分子がヘテロな機能を担っていることが強く示唆されている。この分子に結合する様々な抗体が単離されているが、それを用いていくつかの細胞株に対するFCMおよび多くの肺癌組織に対するIHCを実施した。その結果特定の抗体によって認識されるが他の抗体によっては全く認識されない CADM1/IGSF4 分子が癌組織で見いだ

された(文献3)。なぜこのようなことが起こりうるかについて、CADM1/IGSF4 がいくつかの異なる分子複合体を形成していると考えるのが一番理解しやすいが、これに類似した現象は他のタンパク質でも見いだされており、特定のタンパク質に関して癌特異的複合体を見つけ出すことができるとすれば治療用抗体創薬にとっては大きなブレイクスルーとなる可能性がある。

この章では、同定した 32 種類の癌特異抗原と単離した数百種類の抗体の中から、いかにして癌治療用抗体を選び出すかについての戦略と実験結果を報告する。そのためには、癌細胞膜上に存在するタンパク質に特異的に結合する抗体を用いていかに癌細胞を殺傷するかにより戦略が異なる。成功例が多いのは IgG 型(とりわけ IgG1)抗体である。この抗体が癌細胞を殺す機構は、1. まずは抗体が細胞膜上の抗原分子に結合することによりその分子が果たしていた機能を阻害し、細胞が生存できない、もしくはアポトーシスを起こして死滅する、2. その抗原の分子の性質によっては、抗体の結合によりアポトーシスを誘発する、3. 細胞膜上での抗原抗体複合体の存在がナチュラルキラー細胞等による ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) や補体経路を刺激し CDC(complement-dependent cytotoxicity) を引き起こす、が示されている。とりわけ成功例では、抗原分子の機能を抑えるという内容が、細胞の存続自身を不可能にするほどに多岐にわたった影響を与えることが判明している。EGFR に対するエルビタックス、HER2 に対するハーセプチン、CD20 に対するリツキシマンがこれに相当する。癌化において重要な機能を担っていても抗体が結合しただけではその機能に影響を与えない抗原や、元来、癌が artifact として発現している癌特異抗原の場合は、上記機構3のみで癌を殺そうという試みもなされているが成功例は未だない。それ以外については、抗体分子のVDメインの抗原結合力を生かして、さらに別の機能を付与して癌を殺す戦略は各種存在するが、その場合は抗体を、癌細胞への運搬手段(delivery system)と考えている。具体的には、放射性同位元素を付加する例(CD20に対する抗体ゼバリン)と毒素を付加する例が考えられている。毒素は細胞質まで運搬されて効果があるので、抗原と結合して抗体が細胞質へ入り込む(internalization)が必要となる。キラーT細胞(cytotoxic T cell)やナチュラルキラー細胞の強い細胞殺傷力を使って、その際、癌細胞を認識させるために抗体を使うというアイデアに基づき研究が進められているが、まだ成功例はない。さらに抗体が二価であることを利用して、二重に抗原識別能力(bi-specific Ab)を持たせて癌細胞とキラーT細胞を近傍に引き寄せるアイデアも採用されている。我々は、本プロジェクトでは、IgG1型ヒト抗体を用いて癌治療薬とすることを基本に考えて研究を進めた。

いずれの場合でも抗体を用いて癌治療薬とする場合に、標的抗原として求められる性質がある。1. 癌細胞膜上に存在し、抗体がその分子にアクセスできる。2. 癌は決して一様ではなくヘテロな集団になっているが、できる限りすべての癌細胞で発現している。3. 正常細胞では一切発現していないことがベストだが、少なくとも vital organ(心臓、肺、肝臓、脾臓、消化器、泌尿器等)では発現していないか発現していてもごく微量である。しかし現実には、我々が本プロジェクトで同定した癌特異抗原はすべて正常な状態にある健康人の体内で機能している分子であり、これらを標的とする抗体治療が成立するかどうかは、癌細胞をいかなる方法で殺傷するか、その際、副次的に損傷を受ける正常細胞(副作用)のレベルが許容範囲にあるかの兼ね合いによる。癌特異抗原として成功例である EGFR や HER2 にしても、明らかに様々な正常組織で発現している。更に癌特異抗原ですらない CD20 や VEGF が、なぜ癌治療用抗体の標的になり得たかは、それぞれ特別な理由づけ(rationale)がある。そこでまず発現レベルを知るために、我々の単離した抗体を用いて肺癌を例に体系的に免疫組織染色を実施した。染色結果は7種類のパターンに分類された。A, 癌細胞膜のみが染色される; B, 癌細胞と気管支上皮の細胞膜が染色される; C, 正常細胞膜も含めて染色される; D, 癌細胞特異的染色だが細胞質が染色される; E, 癌細胞の細胞質以外に正常細胞が染色される; F, 正常細胞しか染色されない; G, 染色像はどこにも見えない。結果は大きくカテゴリー(I)多くが A か G に分類される、とカテゴリー(II)IHC の結果が C に分類されたものが多い、のどちらかのカテゴリーに分類された。

さて現在、製薬会社が治療用抗体候補クローンを入手した際に、臨床試験を実施するかどうかをいかなる基準で判断するかについて考えてみる。1. 抗体が ADCC 活性もしくは CDC 活性を示すか、2. 標的抗原の機能としてその活性が測定できる場合は、抗原機能の抑制能力があるか、3. In vitro で細胞増殖抑制効果を示すか、4. 主として xenograft モデルを用いて、抗腫瘍効果の有無。結果は all-or-none で得られるわけ

ではないが、すべてがポジティブであった場合は、あとは成功確率の判断となる。臨床試験を実施することになると、最初抗体を調製することとなる。一度選んだ抗体は、途中で変更できないためにその選択は慎重になる。GMP(good manufacturing practice)レベルの規格に合格する必要がある元となる抗体産生細胞株をマスターセルバンクとして確立するところから始まる。行く先のことを考えて、動物内での体内動態(基本的には、体内半減期が長いほうが良いと判断される)、動物とりわけサルを用いた安全性試験を目的とした前臨床試験実施のために、標的であるヒトタンパク質と同時に、同等のサルタンパク質とも結合することが求められる(ヒトサル間のアミノ酸の相違はわずかであるためにほとんどがOK)、これをクリアすると抗体の調製が始まる。この段階で約百億円程度の出費が最低限必要と言われている。

我々の場合も、条件検討のために上記1-4の検討を行った。ファージ抗体は、最初 single chain Fv 型抗体が ep3 タンパクに融合した形で調製される。そこでクローンごとに IgG₁に変換する必要がある。最初 IgG₁に変換したのち ADCC 活性を解析したが、多くのモノクローン抗体が ADCC 活性を示した。ナチュラルキラー細胞が示す ADCC 活性の場合、Fc に対するレセプターが抗原抗体複合体を認識して細胞殺傷能力のある分子を分泌することにより癌細胞を殺す。そこで、本プロジェクトで同定した癌特異抗原のように癌細胞で大量発現の見られる分子が標的である場合は、解析した中で約半数の抗体が ADCC 活性を示したというのが結論である。

上記2と3は表裏一体の関係にある。分泌された分子 EGF がリガンドとなってその受容体である EGFR に結合し、それがシグナルとなって細胞増殖が起こる例では、抗体が EGF と EGFR の相互作用を阻害することにより細胞分裂を阻害するという極めてわかりやすくまた測定し易い系である。一方、CD44 に抗体が結合して細胞増殖が阻害される例では、CD44 の機能が判明しておらず、どのようにその機能に関与した活性を測定するかの手がかりがない。結果として、体系的に解析が可能なことは、抗体存在下で細胞を増殖させて、増殖速度に変化があるかどうかを解析する、さらに xenograft モデルでの抗腫瘍効果の測定となる。結局、28 種類の癌特異抗原に対する 87 種類の IgG₁を調製し、in vitro での細胞増殖速度への影響、xenograft モデルでの抗腫瘍効果の測定を行った。

抗 EGFR 抗体はすでに治療薬として抗体が市販されているが、我々の単離した抗 EGFR 抗体を例にそれぞれのクローンの EGFR に対する生物学的効果を解析した。たとえば図1に示すように、cetuximab と同等レベルの抗腫瘍活性を持ち、059-152 の場合は作用がすでに報告されているクローンとはまったく異なる機構で抗腫瘍活性を示すことが示されている。さらに様々な癌細胞株に対して xenograft モデルで抗体腫瘍効果を解析した結果では、市販されているエルビタックスやベクチバックスに対して、我々のクローンが抗腫瘍効果を示す例も見つかる。世界中で癌治療用抗体の開発が進められているが、実際に標的とされている抗原の種類は思いの外少ない。更に癌治療薬として認可され、その標的が癌特異抗原である例は、未だに EGFR と HER2 に限られている。本プロジェクトのように癌で異常に大量発現している様々な性質をした癌特異抗原を標的にしようとする場合、更なる独自の工夫が必要となる。この解析を通して得られたことで重要な点は、癌がきわめてヘテロな原因に基づく疾患である点である。更に状況を複雑にするのは、同じ癌細胞に対する同じ抗体の及ぼす効果についても細胞の培養条件が異なると異なった結果をもたらすことすらある。

我々が同定した 32 種類の癌特異抗原の場合、EGFR や HER2 そのもの及びそれに類似の細胞増殖因子受容体も含まれているが、CAM(cell adhesion molecule)に分類される分子を含めて様々な機能を示す分子群である。このような分子の機能を抗体の投与により抑制するには、その機能の実体を明らかにする必要がある。そこで本研究では同定された抗原に対して、全て siRNA によるノックダウンを実施してその表現型を解析することとした。その結果、程度の差はあれ、かなりの頻度で増殖抑制が観察され、更にアポトーシスが誘導される例も見出された。その中には従来知られている性質からは、この現象は全く予想できない例もある。それぞれの抗原ごとに平均 10 種類ほどのモノクローン抗体が既に単離されているので、その中から siRNA と同様の効果をもたらすものを選び出すことも可能かもしれない。ファージディスプレイ抗体では最初利用可能なものが scFv 型抗体であるために、一価の抗体である。抗腫瘍効果を示すには二価であることが条件となる例も予想され、その場合には IgG 型抗体への変換が必要となる。ADCC 活性についても、大量の抗原を発現した癌細胞について ADCC 活性のある抗体と無い抗体があり、それが、認識するエピトープの差なのか抗体の結合力の差の結

果なのかを判定する必要がある。

ファージ抗体ライブラリーから得られた抗体にとって癌特異抗原はナイーブ抗原であると推定される。そのためにここで単離された抗体の多くは抗原に対して強い結合力を示さずに治療用抗体としては作り直す必要があると当初予想されていた。しかし ICOS 法が我々の期待するように”平衡反応である抗原抗体複合体形成反応を忠実に反映した結果に基づき抗体を単離している”とすれば、抗原に対して結合力の高い抗体が選択的に濃縮されていることを期待できる。今までに得られたデータは、この期待を支持するものが多い。その顕著な例が抗 EGFR 抗体である。Kd 値が 0.1nM 以下であり、ヌードマウス中で育つヒト癌組織に対して、抗体単独投与で、既に市販されているエルビタックスと同様の効果もしくはより低濃度で強い抗腫瘍効果を示す。このクローン場合は、肝癌、腎癌、膵癌、肺癌から全く独立に単離され、独立に癌特異抗体であると判定されていた。同様に EpCAM に対する抗体は pM オーダーの濃度ですら ADCC 活性を示し、また担癌マウス中で強力な抗腫瘍活性を示した。抗体を投与することより癌治療に役立つ例が、抗 EGFR 抗体や抗 HER2 抗体以外でもありうるとすれば、我々がすでに単離したクローンの中に含まれているに違いないと確信している。そこで次の最大の課題は、それをいかに見出して臨床試験を実施するかである。

2. 4 オリゴクローナル抗体創製技術開発

1) モデル抗原 A に対する抗体の取得と評価

市販マウスと、弊社所有のヒト抗体産生マウスを 100 匹程度免疫し、抗体価が上昇したもののうち 12 匹を細胞融合に使用した。抗体を 40 個程度の抗体を取得した。マウス・ヒトキメラ抗原を用いて結合領域を分類し、29 個の抗体を選択した。

オリゴクローナル抗体作製のため、互いに競合しない clone を選抜する目的で、同一ドメイン認識抗体間の競合試験を Biacore 2000 を用いて行った。

その結果、同時に抗原 A 分子に結合できるモノクローナル抗体は、6 クローンが選抜された。この 6 クローンについて競合試験を実施したところ、6 クローンのうち、AC と AB は、結合ドメインは異なるものの、弱いながら競合することがわかった。

2) 抗原 A に対するオリゴクローナル抗体の活性評価

最初に抗原 A を中程度発現する Colo205 細胞を用いて、6 種類の抗体を単独、2 種、3 種、4 種、5 種、6 種混合した場合の ADCC 活性を調べた。それぞれの抗体単独では、ADCC 活性の強弱は観察されたが、混合する抗体の数が増えるにしたがって、ADCC 活性が上昇する傾向が見られた。Colo205 においては、3-4 個程度の抗体数で活性がほぼ飽和しており、抗体のエピトープ依存性は低いと考えられた。

一方、抗原 A を高発現している、A431 細胞を用いて、ADCC 活性を測定したところ、Colo205 の場合と異なる挙動が観察された。A431 の場合は、抗体単独と 6 つの抗体すべてを混合した場合でも、ADCC 活性に差が観察されなかった。ADCC 活性は、標的細胞に結合した抗体の Fc 領域を、NK 細胞などのエフェクター細胞が認識し、活性化することにより、細胞死を誘導する。この作用機構から類推すると、抗原が高発現している場合は、すでに過剰量の Fc が存在することにより、エフェクター細胞の活性が飽和しているためであると考えられる。したがって、抗体を混合することにより、ADCC 活性を増強する技術は、比較的発現量が低い抗原において有効であることが示唆された。A431 細胞を用いて、抗体の組み合わせによる影響を調べた。ADCC 活性とは異なり、CDC 活性は 1 個の抗体のみでは活性を検出することができなかった。しかしながら、2 つ以上の抗体を組み合わせることにより、活性を検出することができた。CDC 活性の場合、ADCC とは異なり、抗体の数が増加すれば、抗体の種類に関係なく活性が増強するというわけではなく、どの抗体を混合するかが重要であり、エピトープ依存性が示唆された。図9に示すように、AA と AD という 2 つの抗体を混合した場合、6 個の抗体を混合した場合と、ほぼ同程度の活性を示していることから、CDC 活性の場合、選抜した 2 個の抗体により最大限の効果を発揮できると考えられた。抗体 AA は強度の違いはあるが、残りの 5 個の抗体のうち、4 個の抗体と組み合わせることにより、CDC 活性が検出できる程度に増強することができている。一方、AA との組み合わせで最大の効果を生み出す、AD 抗体も 4 個の抗体との組み合わせで増強効果を確認できている。AB, AC, AE は、AA, AD 以外の抗体との組み合わせでは CDC 活性は観察されない。また、AF は AA, AD の両方の抗体との組み合わせにおいても、CDC 活性が観察されていない。これらのことから、CDC 活性増強のため抗体を混合する場合は、抗体のそれぞれの特性が寄与することが分かった。

3) 結晶構造解析によるオリゴクローナル抗体活性増強機構の解明

	<p><u>オリゴクローナル抗体を構成する各抗体由来 Fab の結晶構造解析</u> PEG を沈殿剤とした条件で結晶を取得することができた。得られた結晶を用いて、X線回折データを収集し、引き続き分子置換法による位相決定と精密化により結晶構造解析を実施した。</p> <p><u>Fab/抗原 A 複合体の結晶化</u> Fab と抗原 A との複合体の構造解析に向けた結晶作製においては、大きく分けて2つアプローチをとった。一つは、①: 抗原 A 全長に対して1分子あるいは複数の Fab を結合させた複合体の結晶化実験、もう一つは、②: ドメイン分割した抗原 A に対し1分子の Fab を結合させた複合体の結晶化実験である。①の方法からは、Fab 間の相対配置や Fab が結合したときの抗原 A 全体構造を直接得られるが、結晶化の難易度は高い。一方、②の方法は、分子が小さくなるため結晶を取得できる可能性が高まると考えられるが、各 1:1 構造データ取得後に、抗原 A 全体構造構築のためのモデリングが必要になる。</p> <p>①抗原 A に対して1分子あるいは複数の Fab を結合させた複合体の結晶化実験 結晶化スクリーニングの結果、1:1:1 および 1:1 複合体については、数条件において結晶を取得し、X 線回折実験をしたが、いずれも立体構造解析に十分な回折データ収集するには至らなかった。</p> <p>②については、マウス/ヒト-キメラ抗体由来 Fab とドメイン分割した抗原 A との複合体の結晶化を試みた。エピトープ解析の結果に基づき、Fab とドメイン分割した抗原 A を混合し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによってその結合を確認した。</p> <p>以上の点から、オリゴクローナル抗体による細胞障害活性の増大機構について、次のように考察した。オリゴクローナル抗体における CDC 活性上昇には、(1) 抗体の結合方向 (Fc の C 末端が細胞膜から見て上を向いている)、(2) 1つの抗原に対して相対的に離れたエピトープを認識する抗体の組み合わせが効果的であること、(3) オリゴクローナル抗体が同一の抗原に対して生成されているのであれば、作用する抗原 A の細胞外ドメインの構造は活性型であると考えられる。</p> <p><u>他抗原への応用の可能性</u> 市販マウスを 20 匹程度免疫し、抗体価が上昇したもののうち数匹を細胞融合に使用した。抗抗原 E 抗体については、1 クローンのみ取得できた。抗原 F については、3 クローン取得できた。CDC 活性の評価のため、可変領域をクローニングし、キメラ抗体を発現・精製し、活性の評価を行った。抗抗原 E、F 抗体についても、単独では CDC 活性を発揮しなかったものの、抗抗原 E 抗体と抗抗原 F 抗体を混合することにより、CDC 活性を検出することができるようになった。</p> <table border="1" data-bbox="518 1294 1420 1451"> <tr> <td>投稿論文</td> <td>「査読付き」 288 件、「学会発表」 333 件、「総説」23 件</td> </tr> <tr> <td>特許</td> <td>「出願済」 51 件</td> </tr> <tr> <td>その他の外部発表 (プレス発表等)</td> <td>プレス発表 45 件</td> </tr> </table>	投稿論文	「査読付き」 288 件、「学会発表」 333 件、「総説」23 件	特許	「出願済」 51 件	その他の外部発表 (プレス発表等)	プレス発表 45 件
投稿論文	「査読付き」 288 件、「学会発表」 333 件、「総説」23 件						
特許	「出願済」 51 件						
その他の外部発表 (プレス発表等)	プレス発表 45 件						
IV. 実用化の見通しについて	<p>1. 実用化の見通し</p> <p>1.1 系統的な高特異性抗体創製技術 既に実用化されているものとしてはヒトゲノム上の48種の全ての核内受容体抗体を作製し、そのうち24種は免疫染色可能である。 その中から、診断薬が認可され臨床応用され厚生省の認可をうけ診断薬として市販されている(平成18年から)、核内受容体研究用抗体は世界のスタンダード化し、市販額だけで年間5000万円となっている。 実用化の見通しとしては下記のことが考えられる。 治療薬として肝臓がん治療薬、グリピカン3がヒト型化されP1臨床試験を終了し、P2臨床試験に入っている。肺がん治療薬として抗 CDH3抗体、膵がん治療薬として AMIG0 2 抗体がそれぞれ前臨床試験に向け製造段階あるいは候補抗体絞込みに入っている。実用化候補として、γセクレターゼ阻害抗体、HIV 感染阻害抗体を取得した。肝がんおよび扁平上皮がんのターゲットとしての ROBO1 抗体を取得して、放射線治療およびイメージング試薬としてPETによる肝臓がんイメージングの動物実験に成功した。さらに scFv 化とプレターゲティングへの分子デザインを最先端プロジェクトに移行して継続しており、4年後の前臨床試験に向けて開発中である。リボゾーマルディスプレイによる改変抗体のエピトープマッピング技術や膜タンパク質合成技術を開発し、2年後のキット発</p>						

売を予定している。診断試薬は新規炎症マーカーのPTX3について大規模な臨床サンプルで炎症性疾患マーカーとしての有用性検定に入っている。同様に、パーキンソン病診断薬としてのDJ-1および白血病治療マーカーとしての抗体が検定に入っている。その他、これまでに難治性疾患に関わるタンパク質に対する抗体が種々得られており、数年後に疾患マーカーとして診断および研究試薬として実用化されると考えられる。また抗体を用いる複合体プロテオミクス解析技術を確認し、細胞の分化および癌化に關与するヒストンの修飾因子に対する抗体や転写因子およびコファクター等の抗体が、新規創薬ターゲット探索に強力なツールを提供するものであることが明らかになった。今後世界的な規模で進むと考えられる高速シークエンサーを用いるゲノムワイドの治療ターゲット探索や新規バイオマーカーの探索にも重要であると期待される。また同技術は、前身プロジェクトのチップ技術開発の延長にあり、高感度診断法としての分子標的医薬のコンパニオン血清診断を可能とするもので、実用化に向け開発を行っている。

免疫寛容を破る、制御性 T 細胞除去モデルマウスあるいは欠損マウスを作製し、自己抗原に対する抗体作製または自己免疫疾患のモデル動物として使用可能であることが明らかになった。細胞障害機能をあげるため、タンデム Fc 型融合タンパク質を開発し、既存の Fc 融合タンパク質に対する優位性を明らかにし、実用化に向けて企業との共同研究を進めていく。

循環器系疾患の治療用シーズ抗体に関して、ApoB、LOX1 他2種のニワトリ抗体を1～2年で研究用試薬としてキット販売を予定している。また、LOX1、インテグリン抗体について前臨床試験実施を予定している。ADLib システムによるがん特異的抗原に対する抗体をがん研究会で評価し2年後の臨床試験を目指して開発している。

1. 2 高効率な抗体分離精製技術

実用化を強く意識し、研究開発成果の知的財産権の確保、およびその技術移転を積極的に進めてきた。この目的で、種々の業種の企業等からの要望・期待・実情を集約し、研究開発のペクトルをより現実性の高い方向に修正することなどを目的のひとつとした「バイオリジカルズ(タンパク医薬)製造技術研究会」を、JBA と産業技術総合研究所との協力で開催し、当該分野の連携を深めることで、実用化、実用化に向けた取り組みを積極的に行ってきた。以下に、現時点で進行している技術移転の概要を記す。

本プロジェクトの成果として、既存品に比べて性能的に優れており、競争力の高いアフィニティリガンド及びアフィニティ担体の開発に成功したが、それらアフィニティリガンド、アフィニティリガンドの配向制御固定化方法、およびアフィニティ担体に関する特許群(産業技術総合研究所保有)に関しては、タンパク質製造を業とする企業及びクロマトカラムなどの実用化を希望する企業 5 社とライセンス契約を締結した。現在、ライセンスを受けた企業において市場への供給が準備されつつある。特に、抗体医薬品開発・製造目的に本技術が使用されるためには、cGMP 準拠でアフィニティリガンド及びアフィニティ担体の製造が必要であるが、すでに、cGMP 適合製造施設を有している企業にもライセンスが付与されており、実用化・製品化の実現が近い。

アフィニティリガンド開発のハイスループット化を目指したタンパク質アレイ基板技術に関しては、基本特許(産業技術総合研究所保有)のライセンスを受けた企業において、その技術を元にしたアレイ検出機器等の開発が進んでおり、今後製品化が期待される。

シリカモノリスを利用したアフィニティ新素材については、スピнкаラムとして、製品化された。この製品は、研究開発向けの簡易抗体精製に便利であるが、そのような利用だけでなく、今後、製造プロセス分析、培養細胞開発、臨床検査用キット開発等幅広い利用が考えられ、このような利用開発がすすめられている。

小さいカラムを並列に設置し、大量の試料を連続的に処理・精製できる連続精製装置については、平成 22 年度戦略的基盤技術高度化支援事業において、3 社の中小企業の連携で製品化を目指した研究開発が行われており、平成 23 年度内の上市が期待される。

本プロジェクトで開発した 24 種類の人もしくは人型化モノクローナル抗体を用いた精製技術実証の結果得られた精製抗体の性能モニタリング活動により、抗体開発技術及び抗体精製技術に関して、医薬品製造企業への成果普及活動を行った結果、成果利用に関する問い合わせがあり、連携が進んでいる。

1. 3 ICOS 法を用いた癌治療用ヒト抗体単離技術開発

本プロジェクトは、癌治療用ヒトモノクローナル抗体を開発することを目指しており、我々が単離した多くのヒトモノクローナル抗体の中から、具体的に薬が作られ医療現場に出回ることがなければ、プロジェクトが成功したとは考えない。そこで、どのような問題が存在

し、どのように解決しようとしているかを報告する。1997年の非ホジキン型リンパ腫に対する抗 CD20抗体であるリツキシマンの FDA による認可、および翌年の乳癌に対する抗 HER2 抗体であるハーセプチンの認可は、製薬業界にきわめて大きなインパクトを与えた。1975 年 Keller と Milstein による細胞融合法を用いたモノクローン抗体作製法の開発により、その直後から癌に対するモノクローン抗体を治療薬とする“ミサイル療法”の可能性が叫ばれ始め、癌治療抗体開発競争が世界中で起こった。その後約 20 年間にわたる研究の歴史は、“ジェットコースター”に例えられる期待に基づく昂揚感と挫折の繰り返しであった。この間、マウスモノクローン抗体をヒト・マウスキメラ抗体に変換する技術開発、CDR 部分のみをマウス由来とするヒト化抗体とする技術、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスの開発及びファージディスプレイ技術によるヒト抗体ライブラリー技術の開発で完全ヒト抗体の作製も可能となり、遺伝子操作による抗体の改編はほぼ完成の域に到達した。しかし 2006 年のベクテビックスを最後に、ここ数年間新しい癌治療用抗体の認可が止まっている。更によく見れば、癌特異抗原に結合する抗体で成功しているのは、EGFR と HER2 だけであるのが実態である。その抗 EGFR 抗体についても、エルピタックスとベクテビックスの成功例以外にも強力な数グループが独立して開発に取り組んでいるにもかかわらず認可まで到達していない。抗 HER2 抗体についても、ハーセプチンの開発に成功した Genentech 自身がハーセプチンとは作用が異なると期待される抗体を薬として開発中だが未だ成功していない。それ以外の世界中で異なる数グループが独立して取り組んでいる標的について、たとえば抗 EpCAM 抗体の場合、1995 年に一度認可されたが、そののち開発企業自身が販売を取り消した。しかし我々自身も経験しているが、EpCAM の癌での発現は極めて impressive なほど強烈であり、また抗体が示す ADCC 活性が極めて強いために、未だに数グループが開発をあきらめずに取り組んでいる。MUC1, CEA, PSMA などの癌抗原は診断マーカーとして実用化しており、様々な形で抗体治療薬の標的となっている。

我々はエルピタックスやベクテビックスは抗腫瘍効果を示さないが我々の抗体が強い抗腫瘍効果を示す例に数多く遭遇している。このことは実際のヒト癌患者の中に、この観察を生かせる対象がいることを示しているのか、そのことをどのようにして臨床試験の初期段階で知ることが可能か。実施されている臨床試験の報告を読むと、結局課題は、次の二点に集約される。課題 1. 副作用の強さと抗腫瘍効果の強さの兼ね合いで、後者が強いものは前者も強く、前者が許容範囲のものは後者も十分でない。このジレンマをいかに突破するかである。課題 2. フェーズ 3 まで到達した例でも、抗腫瘍効果がある患者とない患者の相違を生み出す原因が定かでない段階で、対象となる数多くの患者をランダマイズして二群にわけ、現在行われている最も優れた治療法と比較して、延命効果（平均生存日数）の点で著しく改善した結果が得られるかという評価基準から見て良好な成績を得られないでいる。もし抗腫瘍効果が期待できる患者の選別法が分かっている（薬使用に関する rationale が確立している）なら、そのような患者を対象とする臨床試験実施が可能となり、成績もずっと良くなるはずである。腫瘍効果の有無を作り出している背景にある真の原因の探索を地道に続けることが、臨床試験の成功率を高める近道と考えている。

1.4 オリゴクローナル抗体創製技術開発

抗 EGFR モノクローナル抗体を 2 種類混合することによって CDC 活性が誘導されることは以前から知られていたが、本研究によって CDC 活性を効率的に誘導するためのエピトープが解明された。また、EGFR をターゲットとした抗体医薬において、アゴニスト抗体によるリン酸化シグナルは細胞増殖を引き起こす危険性が大きく、オリゴクローナル抗体の作製には不適であると考えるのが一般的であるが、本研究によってアゴニスト抗体による EGFR リン酸化を完全に抑制できるアンタゴニスト抗体が取得され、さらにその認識部位が解明された。即ち、これら 3 種類のモノクローナル抗体を組み合わせることによって、抗腫瘍活性の効率的誘導と増殖促進抑制能を併せ持つ、抗 EGFR オリゴクローナル抗体の作製が可能になると考えられる。さらに、これら 3 種類のモノクローナル抗体に ADCC 活性増強技術を組み合わせることによって、既存の抗体医薬品を越える抗腫瘍効果を発揮する新たなオリゴクローナル抗体医薬品として期待できるのではないかと考えられる。以上のオリゴクローナル抗体の結果より、より多くのエピトープを認識する抗体を含むと思われるマウスポリクローナル抗体においても同様の活性を期待したが、明確な活性は認められなかった。即ち、ポリクロには 153 のようなアゴニスト抗体も、695 のようなリン酸化阻害抗体も含まれていると思われるが、活性を評価するために十分な抗体価に達していないなど、lot による活性の差があると思われる。本研

究で見出された EGFR をターゲットとしたオリゴクローナル抗体の知見は、ポリクローナル抗体においても応用が可能であると考えられる。即ち、ポリクローナル抗体においても、これら 3 種類のエピトープを認識する抗体が確実に含まれていることが重要であり、そのためにこれらのエピトープ認識抗体の抗体価が上昇しやすいような抗原による免疫の工夫が必要であると考えられる。

オリゴクローナル抗体を作製するにあたり、副作用の危険性や製造コストの側面から、最大の抗腫瘍活性を有するための過不足ないモノクローナル抗体を選抜することが重要である。そのために不可欠なのは、ターゲット分子に対してなるべく多くの種類のモノクローナル抗体を取得・解析することである。本研究においても、上記のような抗体の組み合わせの知見が得られた最大の要因は、最初のステップであるモノクローナル抗体のパネルの作製にあった。EGFR 細胞表面をほぼ網羅できるだけのモノクローナル抗体が取得でき、個々のモノクローナル抗体の認識部位が解析できた。現時点で、これら 3 種類の抗体と hEGFR との結晶構造解析は解かれていないが、構造が解かれれば活性強化のメカニズム解明の足掛かりになるのではないかと期待される。今後、他の ErbB family をはじめとする RTK などについても同様の解析が行われ、情報が蓄積されていけば、ターゲット分子の立体構造情報や発現パターンなどを基に、バイオインフォマティクスによってオリゴクローナル抗体に最適な抗体の数や組み合わせが予測できるようになり、将来的にはピンポイントでモノクローナル抗体を取得できるようになるように期待する。

2. 実用化までのシナリオ

2.1 系統的な高特異性抗体創製技術

肺がん治療薬として抗 CDH3 抗体が 24 年度前臨床試験入りを計画し、製造段階（1 年程度）に入っている。また膵がん治療薬として AMIGO 2 抗体が 25 年度前臨床試験入りを計画している。それぞれ、1 年後程度に P1 臨床試験、その 1 年後に P2 臨床試験にはいる予定である。その他、実用化候補として、 γ セクレターゼ阻害抗体、HIV 感染阻害抗体については導出も含め実用化への検討を行う。肝がんおよび扁平上皮がんのターゲットの ROBO1 抗体は、現在 FIRST プログラムでコンピュータデザインを行っており、s cFv 改変とプレターゲティング技術の開発により、4 年後の診断用および治療用抗体医薬として前臨床試験を予定している。

新 PURE システムを今年度夏にキット発売予定であり、リボゾーマルディスプレイによるエピトープマッピングおよび膜タンパク質合成について 2 年後キット発売を予定している。診断試薬は新規炎症マーカーの PTX3 について大規模な臨床サンプルで炎症性疾患マーカーとしての有用性検定に入っている。パーキンソン病診断薬としての DJ-1 に対する抗体が検定に入っている。DJ-1 抗体はマイケルフォックス財団の研究課題に選定されており、抗体の性能の検定後製品化する見込みである。その他、これまでに難治性疾患に関わるタンパク質に対する抗体が種々得られており、数年後に疾患マーカーとして、診断および研究試薬として実用化されると期待される。現在、本プロジェクトにおいて直近の製品化のメドのない抗体クローンについては、公的細胞バンクに寄託し、研究および医薬開発に広く公共に提供できるようにした。

抗体を用いる複合体プロテオミクス解析技術と並行して、抗体磁気ビーズの性能を高め、高感度検出が可能となった。抗体医薬の適応や治療効果を検査するためのコンパニオン血清診断を可能とするもので、数年後に実用化される見込みである。制御性 T 細胞除去モデルマウスあるいは欠損マウスを作製し、自己抗原に対する抗体作製または自己免疫疾患のモデル動物として使用可能である。

ApoB ニワトリモノクローナル抗体については、本年度研究用試薬として販売予定であり、酸化 LDL 検出抗体としてキット製造予定である。LOX1 抗体は本年国外製薬企業にサンプル提供し、前臨床試験前段階の ex vivo 実験実施予定。また、国内製薬企業でも前臨床実験実施予定である。抗インテグリン抗体については、国内製薬企業にサンプル提供を行った。

2.2 高効率な抗体分離精製技術

精製を含む製造技術の実用化における大きな障壁の一つに、技術ユーザー側の保守性があげられる。近年製造者責任が厳しくなってきたことから、この傾向は顕著になってきていると考えられる。また、医薬品の特徴として、一度認可を受けた製造方法を変更することは大変な労力とコストが必要であることがあげられる。従って、実用化までのシナリオ構築においては、ユーザー側の保守性を打破して、新規技術の導入を歓迎す

る素地を如何に作るか？という観点での検討が必要である。すなわち、「優秀な技術が必ずしも利用されるとは限らない」、という現実があることをまず理解する必要がある。

実用化までのシナリオの前提としては、本プロジェクトで開発した各技術それらを集積化した成果物は、真に、従来の物に比べて優れているということである。特に、アフィニティ担体としては、動的結合容量、処理速度(接触時間)、温和な溶出において、他の追従を許さない性能が発揮できる。一方、唯一、アフィニティ担体のアルカリ耐性についてのみ、従来品に一步及ばない可能性がある。

ユーザー側の保守性を打破する事柄としては、性能が優れていることに加えて、コストメリットと使い勝手、それに、安心感が大きなファクターである。

コストメリットに関しては、アフィニティ担体のうち大きな割合を占めるリガンドタンパク質の製造コストがあげられる。リガンドタンパク質の製造については、本技術をライセンスしている企業において、独自に製造工程の見直しを行うとともに、本技術の特徴であるリガンドタンパク質がタグタンパク質であることから、タグ精製のコストダウンについて検討を行っており、1から2年後には、現在の製造コストの数分の1(目標5分の1)にまでコストを下げるができるものと考えられる。このことにより、担体そのものの提供価格を大幅に引き下げることにより、本技術を使用することによるコストメリットが達成されるものと期待される。一方、よりコストを引き下げするためには、高価なアフィニティ担体の使用量を減らすことが考えられる。この観点では、本プロジェクトの成果である、並列カラムを用いた連続精製装置を組み込むことにより、使用担体量を数分の1以下に減らすことが可能となる。連続精製装置については、平成23年度に上市される見込みが高いため、上記アフィニティ担体の製造コストの引き下げ効果と合わせて、大幅な製造コストの低下が、ここ1から2年で実現できることになる。

ユーザーの使い勝手については、プレパックカラムとシングルユーステクノロジーの開発を行い、製造現場における洗浄バリデーションの苦労を少なくするという観点でのメリットを実現することを計画している。カラムコストの引き下げと連続精製プロセスの実現により、従来の製造コストを引き下げながら、精製のシングルユーステクノロジーの実現は可能であり、本技術をライセンスしている企業を中心に、数年以内にその実現を目指している。

安心感については、ライセンスしている企業にcGMP製造に実績がある企業があることから、医薬品製造に適用可能な製品を随時提供できる環境が整っており、この点での実用化を早期に行うことができるものと期待される。

本プロジェクトの成果は、小スケールから巨大スケールまで適用可能であるが、今すぐ現在稼働中の製造プロセスに組み込まれることは、製造承認変更の観点で困難であると考えられることから、小スケール精製についての各種デバイスを商品化し、抗体開発の現場における活用を目指す。この観点で、すでに、96穴タイプの並列カラム等の開発がおこなわれており、試供品としての提供が行われている。抗体開発段階での利用から開始して、大スケールの製造工程にまで至るには、5年ないし10年ぐらいの時を要することから、本成果の本格的な実用化は、5年ないし10年後ということになる。この間、各種製造スケールに対応した製品及びその使用法(いわゆる使用コンテンツ)開発をこまめに行うことが重要であると考えられる。

2.3 ICOS法を用いた癌治療用ヒト抗体単離技術開発

本プロジェクトの最終年度である平成22年度には産総研巖倉博士のグループと我々が協力して表3に示す20種類の抗体を大量調製/精製し、それを希望する国内の製薬メーカーに1mgずつ配布し、活性等のモニタリングをお願いする企画を実施した。この企画に答えた企業が、ここで記述した我々の持つ抗体の可能性について追認し、創薬への高い成功確率を確信する例が生まれることを期待している。我々自身は次のように研究を進める。

(i)すでに単離した抗体を対象にハイスルーブットに行なっている方針は、1. ノードマウス中で、抗腫瘍活性を示す細胞株とモノクローン抗体の組み合わせの探索(臨床試験開始に必要な最低限の条件)、及び2. 担癌モデルマウス中での癌集積性の検討(集積性の高いクローンについては、IgG₁以外で癌細胞を殺す方針も検討する)。

(ii)すでに治療用抗体が開発されている例、とりわけ抗EGFR抗体について、市販されている抗体との差別化をはかるため、エピトープの同定(これについては、抗原抗体複合体の結晶解析がベスト)及び担癌マウス中での抗腫瘍効果について新規性のある組み合わせの例を探索している。

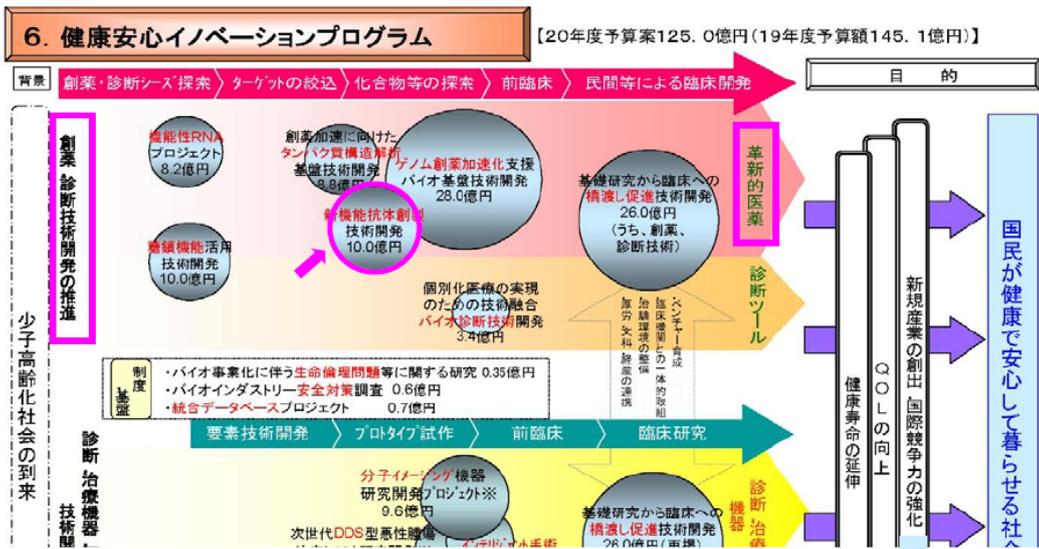
(iii)CD44を代表例として、分子としては同じ抗原を認識するが、結合するエピトープは

	<p>相互に大きく異なるクローンが見出されており、その中で特定のクローンが癌特異的染色像を与える。これは癌特異抗原について、新しい概念を提起しており、このような例についてその実体を明らかにすることが重要と考えている。</p> <p>(iv) 本研究で対象としている肝臓、及び肺癌についてはほとんど全ての症例で血液も保存されている。そこで、発現している癌特異抗原の種類と血液中に含まれる成分更には DNA に導入された変異との間の規則性を見出すハイスループットな解析を開始した。</p> <p>(v) 我々が単離した多くの抗体の中で癌特異的染色像を与える抗体が認識する抗原の同定については、容易でないもののみが未同定のまま残っており、その標的抗原についても更に新しい方法を開発して同定を進める。</p> <p>以上のような研究の展開の中から、臨床現場にまで到達する抗体を作り出すべく今後も努力を続ける。</p> <p>2.4 オリゴクローナル抗体創製技術開発 弊社内で検討を行い、医薬品としての可能性を検証する。</p>	
V. 評価に関する事項	評価履歴	平成 20 年度 中間評価実施
	評価予定	平成 23 年度 事後評価実施予定
VI. 基本計画に関する事項	作成時期	平成 18 年 1 月 制定
	変更履歴	平成 20 年 3 月 改訂。プロジェクトリーダー名の記載

技術分野全体での位置づけ

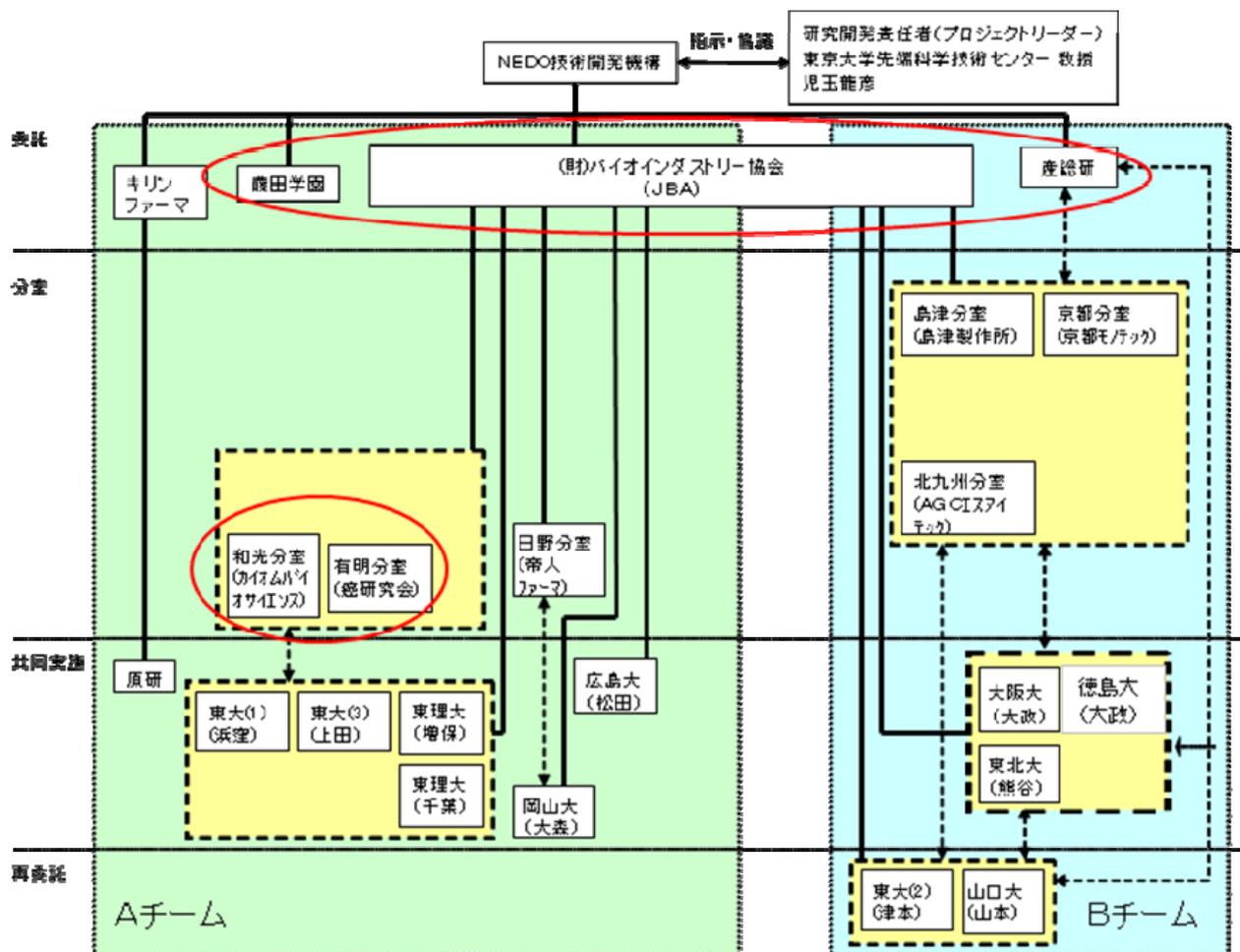
(分科会資料5-3より抜粋)

健康安心イノベーションプログラムのもと、「創薬・診断技術開発」の推進における「革新的医薬品の創出」を目指すプロジェクトの1つとしての位置づけ。



「新機能抗体創製技術開発」

全体の研究開発実施体制（平成21～22年度）



「新機能抗体創製技術開発」(事後評価)

評価概要 (案)

1. 総論

1) 総合評価

本プロジェクトは、系統的な高特異性抗体創製技術および高効率な抗体分離精製技術の基礎的・基盤的研究開発であり、がんや免疫を対象とした医薬品開発の中で極めて重要な位置付けを確保しつつある。また、この分野の研究開発が米国に比し、大きく遅れを取っていた日本において、本プロジェクトが遂行されたことは意義深い。さらに、技術整備の結果として多くのシーズ抗体が取得されており、その一部については前臨床試験も予定されている点は高く評価できる。抗体精製法に関しても従来の技術を凌駕する技術が育ちつつあり、今後の実用化展開に期待が持てる。

一方、個々の技術についての成果は素晴らしいが、それらの相互関係が弱いために、成果の一般化という面で不十分である。その成果を利用して第三者が抗体創製を行なえるか課題も残る。また、抗体開発は国際的な競争の中で行われているが、国際特許出願が少ない。

今後、本プロジェクトの成果として生まれてきた多くのシーズの焦点を絞り、医薬品としての成功第一例を示すことを期待する。

2) 今後に対する提言

本プロジェクトでの抗体創製技術開発および分離精製技術開発の成果や知財を明確にし、積極的に企業での利用、応用を更に促進することが重要である。その成果を礎にして、我が国のバイオベンチャーの擁立や育成を少しでも刺激できるような仕組みを検討して欲しい。参加企業が第一優先権を有するのは当然であるが、税金を投入して創出した成果であり、日本企業に対して優先的にライセンスすることや、情報を提供する仕組みも検討して欲しい。

ファージの系による抗体作製技術は確立され、非常に多彩な抗体が得られたが、その多くが結合能は良好であるが生体における機能抗体として有用なものは得難い事実に関して、抗体医薬として開発をどう切り開くかは今後の課題である。

2. 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

抗体産生技術及び抗体精製技術の革新が本プロジェクトの根幹であり、抗体産生技術の革新はバイオテクノロジーの基幹でもある。この分野の開発研究が米国に比し、大きく遅れを取っていた日本において、本プロジェクトが遂行されたことは意義深い。優れた抗体医薬品の開発は、今後の医療の発展にとって極めて大きな位置を占め、健康安心イノベーションプログラムにとって非常に適切な事業である。大学や公共研究機関の技術・知識やインフラがベースにあって初めて推進できるものであり、NEDOの関与は重要である。

一方、本プロジェクトで多くの抗体を産生した実施者と、抗体を分析してその有用性を解析できる専門集団とは異なることから、その専門集団との連携を大きくし、一つでも二つでも生物学や医療に有用性を見出すことが重要である。その連携や情宣活動がもっと社会に見える形にして欲しい。

今後ますます抗体医薬市場が大きくなると期待されていることから、製薬企業やベンチャーキャピタルが、研究資金の出し手として期待されても良い分野である。今後はこのプロジェクトの成果をベースに、民間から資金がこの分野に投入され、それがうまく回っていくようなシステムづくりに注力していくことも重要であろう。

2) 研究開発マネジメントについて

アカデミアと産業化能力のある企業をバランスよく配置した実施体制を構築し、相互の連携を密にして開発を進めた。プロジェクト進行中に、当初のプロジェクトリーダーの関与した重要なコアである研究開発項目がスピアウトするという大きな発展的变化があったが、その後の調整も含めて適切にマネージされた。

一方、現在の抗体医薬の市場は成熟化しつつある中で、新たな領域・市場を切り拓くための新機能抗体という観点から、より戦略的な目標設定が必要であった。また、目標設定が抗体の数など量的なものにこだわり過ぎた。

国際競争力の向上のためには研究の能力に加え、成果の適切な権利化が不可欠である。今後のプロジェクト立案に際しては、どのように知的財産権を確立するかについて、実施者に任せるだけでなく、より戦略的な取組体制が構築できるよう留意して欲しい。

3) 研究開発成果について

掲げられた数値目標がほぼクリアされている点は、高く評価できる。得られた研究成果の中には、世界初のものも多々あり、また科学的にみて興味深いも

のも多い。学術論文への発表は投入された予算に見合っていると評価できる。特に、抗体創製技術については、発芽バキュロウイルス（BV）上への膜タンパク質のディスプレイによる抗原を用いた免疫により色々な膜抗原に対する抗体創製の方法論を確立した。抗体分離精製技術については、従来法より効率が高く、また穏和な精製が可能な新規なリガンドを、網羅的な変異導入と徹底的なスクリーニングにより得ている。

一方、作製した抗体の数は目標を達成しているが、個々の抗体の有用性を判断する材料が少ない。既存抗体との比較検証を行い、新規性、有用性に関する訴求点をさらに明確する必要がある。また、残念ながら国際特許の数が必ずしも多くない。知的財産の確保に関しては、国際特許を取得できて初めて国際競争力を有することから、プロジェクト終了後でも特許戦略、特許出願は継続して欲しい。さらに、今回のプロジェクトで出願された特許の中で、どれだけ多く数年後にグローバルレベルな権利化がされているかについての検証も必要である。

4) 実用化の見通しについて

本プロジェクトで創製された抗体の中に、参画企業が関心を示し実用化に向けて開発を進めている抗体があることは評価できる。また、高効率な抗体分離精製のためのアフィニティー・リガンドなど、早期の実用化が期待される。さらに、抗体の取得システムも本プロジェクトを通じてシステムとして完成しつつある。プロジェクト期間の途中でスピナウトしたリボゾームディスプレイは商品化されており、高く評価できる。

一方、本プロジェクトの成果物である抗体のプロジェクト外への情報提供をさらに促進するとともに、実用化の判断となる成果物の競争力をアピールできるデータの取得が必要である。また、抗体分離精製技術は、スケールアップの成否で実用化の見通しが大きく異なる。課題を明確にし、実用化できるように解決策を立案することが求められる。

本プロジェクトの成果としての技術情報や生産物情報を共有したオールジャパン的な連携組織による抗体作製技術の創製と応用を継続することが重要であろう。

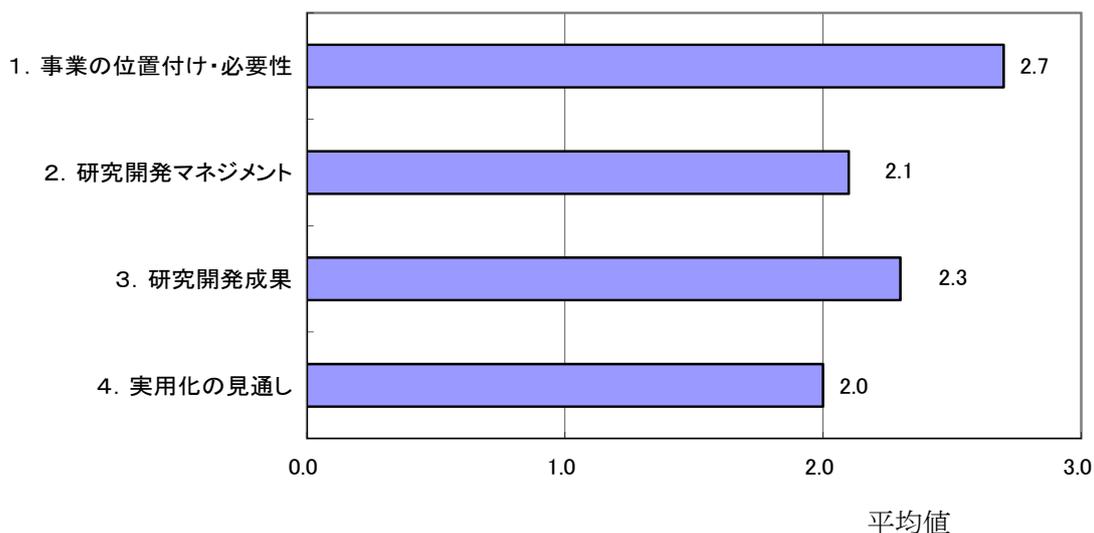
個別テーマに関する評価

	成果に関する評価	実用化の見通しに関する評価	今後に対する提言
系統的な高特異性抗体創製技術	<p>全体的に極めて先端的で高いレベルでの技術開発が行われている。抗原タンパク作製、目的とする標的抗原に対する抗体を高効率で作製する技術開発、強い親和性を持った自然な分子構造に反応する抗体の高効率の取得法については全体に大きな成果を挙げている。特に、一般的に発現困難である膜タンパク質を対象とし、発現からその取得まで一貫して研究を行い、多数のモノクローナル抗体を実際に取得していることは、その困難さと有用性を考えると、非常に価値ある研究であると評価できる。免疫寛容打破技術により、従来の正常マウスでは得られなかった抗体作製法を確立したことも特記すべきである。ファージディスプレイ法によ</p>	<p>臨床開発候補抗体が複数取得されていることから、本技術の応用から新規抗体医薬を創出するという実用化の可能性が認められる。</p> <p>しかし、ファージライブラリーにより作製された抗体は、一般に結合能は良好だが、生体での機能抗体として有用なものは少ないとされており、この点の検討が今後の臨床応用では求められる。また、がん治療用抗体については、開発中の抗体が多数存在し競争が非常に激しい。先行品に対して治療効果、安全性の面で差別化、優位性を証明するのは非常にハードルが高い。独自性のある抗原の探索や、先行品がない対象疾患の開拓も視野に入れて実用化を進めるべきであろう。</p>	<p>細胞株 DT40-SW など研究途中にある技術については早期の完成が望まれる。ICOS (isolation of antigen/antibody complexes through organic solvent) 法による抗体作製技術は応用範囲の広い技術であるので、がん関連のみでなく他の疾患の病態解析にも活用されることを期待する。</p> <p>ここで検討された抗体取得法は基本的に試験管内で抗体を選択する技術であり、B 細胞 1 個から抗体を取得する技術を取り入れることにより、試験管内での結合能でスクリーニングされた抗体とは質的に異なる抗体を取得できると期待され、このプロジェクトに新たな展開を生む可能性があると考えられる。</p> <p>本プロジェクトの成果として</p>

	<p>り得られた非常に多くのヒト抗体は、患者サンプルに対しアッセイしており、有用性が期待できる。オリゴクローナル抗体によるCDC（補体依存性細胞障害）活性の発現について、抗原と抗体の立体構造解析をベースにした解析は、今後の抗体医薬に新しい展開を与えるものと期待できる。</p> <p>しかし、得られた有用な抗体が全て新規技術によるものではなく、新規技術のメリットが明確でない。特に、数値目標は十分にクリアしているものの、機能的な面で既存の抗体に対する差別点・優位性を示す検証データが不足している。</p>		<p>の技術情報や生産物情報を共有した抗体作製のオールジャパン的な連携組織、機構の充実による抗体作製技術の創製と応用の継続性が重要である。</p>
<p>高効率な抗体分離精製技術</p>	<p>従来法より効率がが高く、また穏和な精製が可能な新規なリガンドを、網羅的な変異導入と徹底的なスクリーニングにより得ている。そのためこれにより得られる</p>	<p>参加企業による商品化も含めて、中規模精製のレベルまでの実用化の目処がついていることは評価できる。ラボスケールの技術が確立できていることから、スケ</p>	<p>新規リガンドの探索により全く新しい抗体精製技術の確立にもチャレンジしてほしい。リガンドアレイライブラリーの技術は、抗体精製以外の広範な分野での</p>

	<p>特許はかなり強力であることが期待できる。Protein Aは広く用いられており、これに置き換わるようになれば、今回のプロジェクトの成果としては十分である。また、海外メーカーの主流製品と比べ、高効率だけでなく、高品質の抗体が精製できる点は高く評価できる。実証パイプラインのための無血清 CHO (チャイニーズハムスターの卵巣) 細胞培養による評価システム及びヒト化抗体の精製技術検証用のパイプラインを確立したことも高く評価できる。</p> <p>しかし、Protein Aは長年抗体精製リガンドとして一般的に用いられてきており、海外でも同様な最適化が行なわれる可能性が高い。今後、長期にわたり優位性を維持するための独創性を明らかにして欲しい。</p>	<p>ールアップが可能になれば、コスト低減の分離精製技術としても実用化が期待できる。</p> <p>しかし、スケールアップについては、課題を十分に整理すべきである。また、実際に本プロジェクトで開発した技術を用いることにより、どの程度のコスト削減が可能かについて数値として示し、競争力をアピールする必要がある。</p> <p>既に広く用いられている海外企業のシステムに比べ、低廉性や簡便性などの別の付加価値が無いと、新規参入は苦しいであろう。実用化にあたっては商品開発的な視点からのアプローチが必要である。</p>	<p>活用も期待できる。</p> <p>大規模な生産プロセスへの応用は、実験室レベルのものとはまた違った難しさがある。研究を進め、実績を積み重ねて信頼性を勝ち取って欲しい。スケールアップの課題を整理し、課題解決のための最適な研究チームを作ることも検討して欲しい。</p> <p>貴重な抗体を如何に低コストで高効率に調整し得るかは、抗体医薬品に伴う高医療費の問題を解決する重要な課題である。今後、この優れた技術開発成果が、一社でも多くの企業に技術移入される様な積極的努力が重要である。</p>
--	--	--	---

評点結果〔プロジェクト全体〕



評価項目	平均値	素点 (注)							
		A	A	A	A	C	A	A	
1. 事業の位置付け・必要性について	2.7	A	A	A	A	C	A	A	
2. 研究開発マネジメントについて	2.1	B	A	A	B	C	B	B	
3. 研究開発成果について	2.3	B	A	A	B	C	A	B	
4. 実用化の見通しについて	2.0	B	B	B	C	B	A	B	

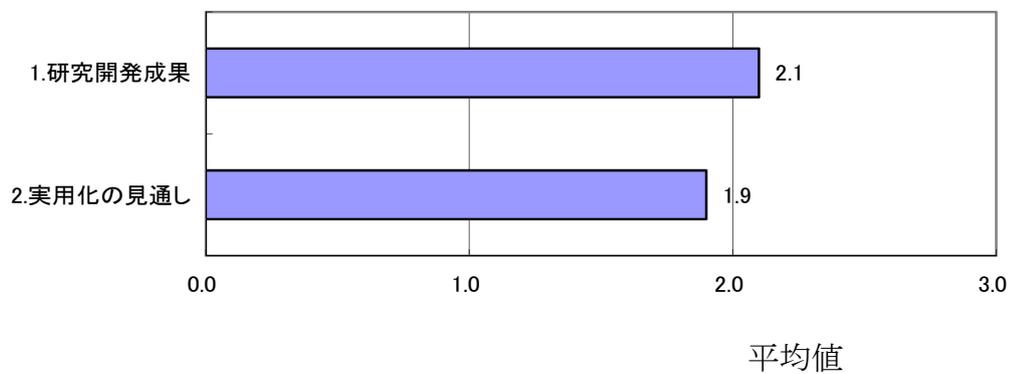
(注) A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

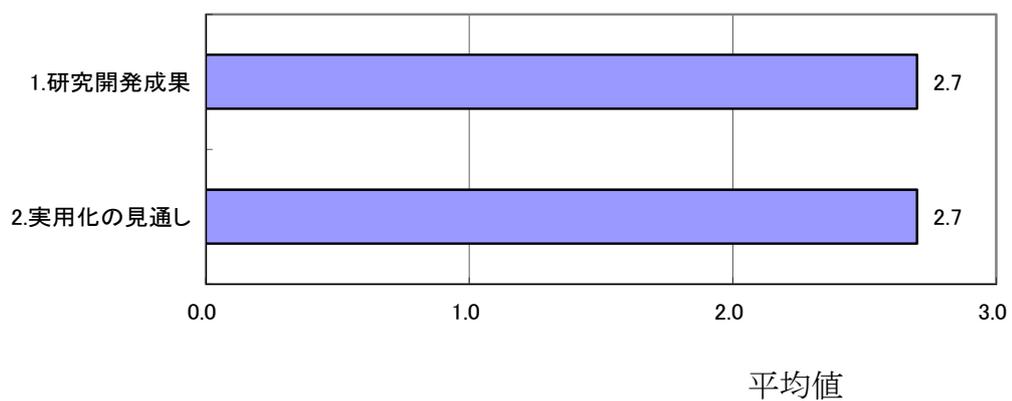
1. 事業の位置付け・必要性について	3. 研究開発成果について
・非常に重要 →A	・非常によい →A
・重要 →B	・よい →B
・概ね妥当 →C	・概ね妥当 →C
・妥当性がない、又は失われた →D	・妥当とはいえない →D
2. 研究開発マネジメントについて	4. 実用化の見通しについて
・非常によい →A	・明確 →A
・よい →B	・妥当 →B
・概ね適切 →C	・概ね妥当であるが、課題あり →C
・適切とはいえない →D	・見通しが不明 →D

評点結果〔個別テーマ〕

系統的な高特異性抗体創成技術



高効率な抗体分離精製技術



個別テーマ名と評価項目	平均値	素点（注）							
3. 2. 1 系統的な高特異性抗体創製技術									
1. 研究開発成果について	2.1	B	A	A	B	C	B	B	
2. 実用化の見通しについて	1.9	B	B	B	C	C	A	B	
3. 2. 2 高効率な抗体分離精製技術									
1. 研究開発成果について	2.7	A	A	A	A	B	A	B	
2. 実用化の見通しについて	2.7	B	A	A	A	A	A	B	

（注）A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

1. 研究開発成果について

- ・非常によい
- ・よい
- ・概ね適切
- ・適切とはいえない

2. 実用化の見通しについて

- A ・明確
- B ・妥当
- C ・概ね妥当であるが、課題あり
- D ・見通しが不明