

研 究 報 告 書
2019 年度：A 課題

2021 年 4 月 19 日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設 慶應義塾大学医学部

住 所 東京都新宿区信濃町 35

研究者氏名 谷口 博昭



(研究課題)

革新的エピトープ探索法によるがん幹細胞性分子特異的な重鎖抗体作出とコンパニオン診断法の確立

2019 年 12 月 1 日付助成金交付のあった標記 A 課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【研究目的】

申請者は先行研究で、がん幹細胞性を担い、抗がん剤耐性や遠隔転移に関与する PRDM14 分子に対する診断方法、およびキメラ型 siRNA 核酸による乳がん・膵がん治療法を開発した (Cancer Res 2018, Carcinogenesis 2017, Oncotarget 2017; 特願 2015-033381) (図 1, 2)。前者に関しては、病理診断に供することのできるポリクローナル抗体の選定 (SPR 法、Xenograft、病理組織で検証)、同抗体を用いた血中循環腫瘍細胞 (CTCs) 検出系を樹立した (特願 2017-185200)。しかし、今後計画されるキメラ型 siRNA 核酸医薬の治験時に評価するコンパニオン診断 (CDx) の用途に同抗体が最適化されているとは言い難い状況にある。

一般に診断・治療に適する標的分子に対する抗体の作成は種間で抗原構造が保持されるため、動物免疫では必ずしも容易で無く、得られた抗体が最善のエピトープに対応しているかは最終ステップに至るまで確証が無い。そこで、最適な CDx を実現するため、既存の開発手法と異なる方法により解決を図る。

研究協力者の名取幸和博士 (阪大招聘教授) が発案された方法でのアプローチを図る。インシリコで標的分子の全 variants を検証、12 万弱の全遺伝子産物の配列と比較し、類似性が極めて低い特異的なエピトープ配列候補を選定する。

得られた特異的なエピトープ候補配列に相当するペプチドを合成し、リボソーマルディスプレイ法による V_H 型モノクローナル抗体の作成を行う。得られた抗体に対して ELISA 法によりスクリーニングを行い、さらに、腫瘍細胞を用いた細胞染色やフローサイトメトリー、臨床検体を用いた免疫組織染色で実証する。

最終的に PRDM14 分子による抗がん剤耐性や遠隔転移の予測診断や PRDM14 分子に対する核酸医薬品の患者層別化マーカーの創出を目的とする。

【申請時の研究実施計画】

1. 候補分子の選定と POC の取得 (先行研究) :

申請者は先行研究で PRDM14 分子が乳がん、膵がんの抗がん剤耐性や遠隔転移に関与することを示し、免疫染色用のポリクローナル抗体の選定に加え、同抗体を用いた低侵襲な血中循環腫瘍細胞(CTCs)の解析法を樹立済(特許申請済)である。

抗がん剤耐性や遠隔転移の指標として、また、現在、治験準備している PRDM14 siRNA によるがん治療の際の CDx としての活用の可能性の高い抗体を作出する。

2. エピトープ配列候補の選別 (2020 年度) :

公共データベースを活用した新規データマイニング手法により特異的なエピトープ配列候補の選定を進める。PRDM14 分子の全 variants を検証し、12 万弱の全遺伝子産物の配列と比較、類似性が極めて低い特異的なエピトープ配列候補が選別される。一部の候補配列は抗原候補として下記の過程を試験的に実施している (図.4)。

3. 低分子抗体の作成 (2020~2021 年度) :

項目2で得られる特異性の高いエピトープ候補配列に対し、リボソーマルディスプレイ法を基盤とした 1012 オーダー以上のライブラリーから遺伝子工学的な抗体スクリーニングを行い、特異性の高いエピトープに最適な抗体を得る。エピトープ候補配列に対し、実用的リボソーマルディスプレイ法を開発してきた国内企業と VH 型モノクローナル抗体の試験的な作成に着手している。

4. 低分子抗体・環状ペプチドの評価 (2021 年度~):

(4-1) 物理化学的評価・in vitro 評価 (2021 年度)

得られた低分子抗体に対して ELISA, western blot、並びに生細胞を用いたフローサイトメトリ (FCM)によるスクリーニングを実施する。

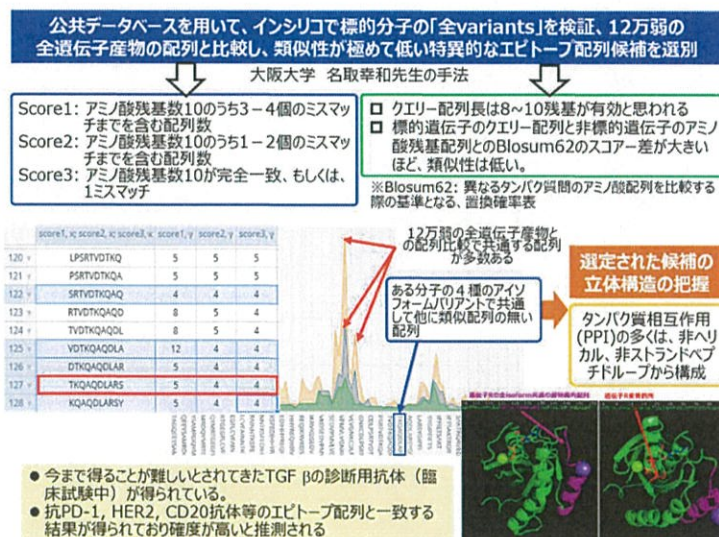
(4-2) 臨床検体での評価 (2021 年度~)

1. 患者検体を用いた免疫組織化学的な病理診断評価
2. がん組織由来のがん細胞や CTCs を分取し解析する

【研究の成果】

1. エピトープ配列候補の選別 (2020 年度) :

研究協力者の名取幸和博士(阪大招聘教授)が発案された方法により、インシリコで標的分子の全 variants を検証、12 万弱の全遺伝子産物の配列と比較し、PRDM14 分子、及び、腫瘍表面に特異的に発現する Wnt 関連シグナルに関わる膜蛋白 A に対して、バリエーション間で共通し類似性が極めて低い特異的なエピトープ配列候補を PRDM14 に関しては 5 か所、蛋白 A に関しては 4 か所を選定した (図.1)。



【図.1】 特異的なエピトープの確度が高い部位の絞り込み

2. 低分子抗体の作成 (2020~2021 年度) :

得られた特異的なエピトープ候補配列に相当するペプチドを合成し、リボソーマルディスプレイ法による VH 型モノクローナル抗体 (His tag 融合) の作成を行った。

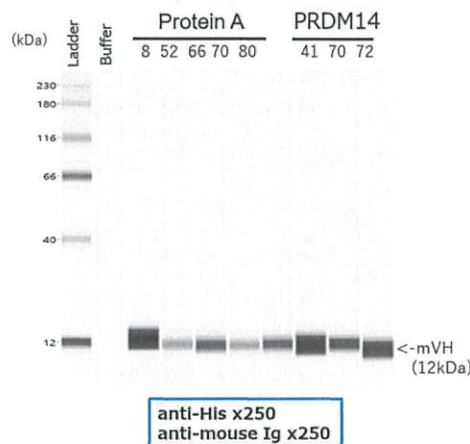
得られた抗体に対して ELISA 法によりスクリーニングを行い複数の陽性クローンを得た。それらを抗 His 抗体で検出することで、少なくとも V_H 型モノクローナル抗体の分子量のサイズにバンドが検出できるか検証したところ、すべての陽性クローンでバンドが確認された (図.2)。

3. 低分子抗体・環状ペプチドの評価 (2021 年度~):

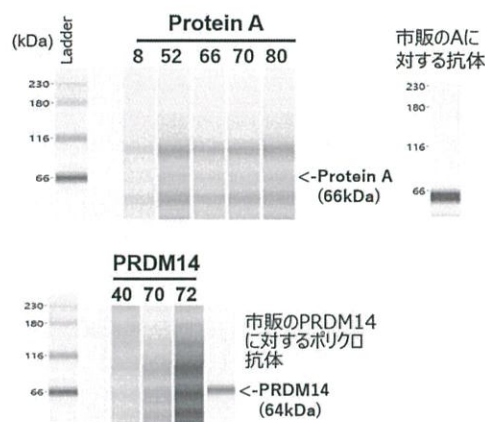
蛋白 A が発現している膵がん細胞 PANC-1、PRDM14 が発現している N-Tera2 細胞を用いて、上記の抗体を Western Blot 法にて評価した。対象蛋白が検出されている可能性があったが、non specific なバンドが複数観察されたため、これらの V_H 型モノクローナル抗体は Western Blot 法に使用するには不向きと考えられた (図.3)。蛋白 A は細胞膜表面に発現することから、これらのクローンがフローサイトメリー (FACS) 解析に使用できるかどうか評価した (PRDM14 は核内蛋白であるため検証できない)。

具体的には、まず、293T 細胞に蛋白 A を強制的に発現した細胞を用意した。蛋白 A に対して得られた 5 つのクローンに関して、上記の 293T 細胞と反応させた後、His 抗体(mouse)と 2 次抗体に PE 標識マウス抗体を用いて、細胞表面に発現する蛋白 A を FACS 法で検出できるかどうか検討した。

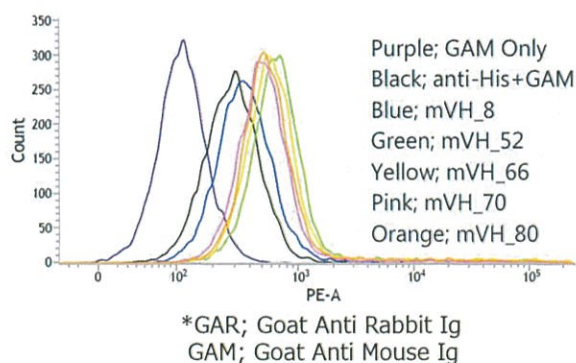
その結果、複数のクローンで反応が見られ、クローン #8 は弱い反応のみであったが、残りのクローンは全て蛋白 A を検出することができた (図.4)。



【図.2】 ELISA 陽性クローンを抗 His 抗体で検出



【図.3】 それぞれの蛋白質を発現する腫瘍細胞の lysate にて Western Blot を実施

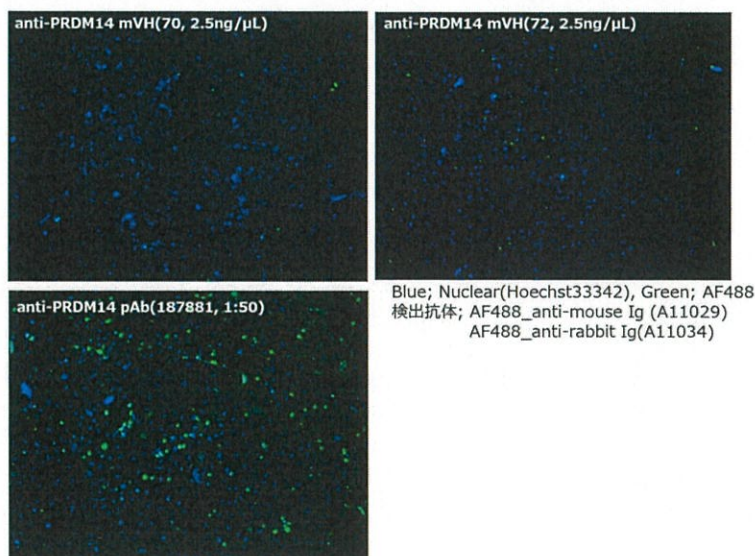


【図.4】 蛋白 A に対して得られた 5 つのクローン(#8, #52, #66, #70, #80)に関して、蛋白 A を強制発現した 293T 細胞と反応させた後、His 抗体(mouse)と 2 次抗体に PE 標識マウス抗体を用いて、細胞表面に発現する蛋白 A を FACS 法で検出した

PRDM14 に対する 3 クローンに対しては、細胞組織化学法 (ICC) にて評価した。PRDM14 を強制発現させた HCC1937 細胞に対して染色を行った。

2 クローンの mVH でシグナルがみられたが、多くは細胞／核と場所が一致せず、陽性コントロールとして使用したポリクローナル抗体での染色シグナルパターンと異なることから非特異的シグナルと考えられた (図.5)。

【図.5】 PRDM14 に対する 3 クローンに対する細胞組織化学法 (ICC) 評価。PRDM14 を強制発現させた HCC1937 細胞に対して染色を行った。



【まとめ】

残念ながら、PRDM14 に対する抗体は特異性が高いモダニティは検証した中には存在しなかった。

リボソーマルディスプレイ法において、抗体セレクション(パニング)に用いる抗原が、設計したエピトープそのものであるため、もともとの蛋白(全長)の抗原性が担保されなかった可能性がある。

一方で、蛋白 A に対する抗体は、FACS に使用が可能であり、がん細胞の表面に発現する分子であるため、将来的的に治療や免疫組織染色等で診断に使

用できる可能性が示された。以上より、当初申請した研究計画はほぼ予定通りに進み、有望な VH 型モノクローナル抗体が得られた。